

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040940**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.22

(51) Int. Cl. **A61K 38/08** (2006.01)

(21) Номер заявки
201691650

(22) Дата подачи заявки
2015.02.17

(54) **ГИДРОФИЛЬНЫЕ КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО**

(31) **61/940,759; 61/947,368**

(56) US-A1-20120141509
US-A1-20090018086
WO-A1-9819705

(32) **2014.02.17; 2014.03.03**

(33) **US**

(43) **2017.04.28**

(86) **PCT/US2015/016185**

(87) **WO 2015/123679 2015.08.20**

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

(72) Изобретатель:
**Доронина Светлана, Лайон Роберт,
Сентер Питер (US)**

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

(57) Предоставлены гидрофильные соединения конъюгата лекарственное средство-лиганд, способ лечения пациента с помощью этих конъюгатов, фармацевтическая композиция, содержащая эти конъюгаты.

040940
B1

040940
B1

040940

B1

Данная заявка утверждает преимущество предварительной патентной заявки США № 61/940,759, поданной 17 февраля 2014 г., и предварительной патентной заявки США № 61/947368, поданной 3 марта 2014 г., каждая из которых включена в настоящее описание во всей своей полноте.

Предпосылки создания изобретения

Большой интерес окружает применение моноклональных антител (mAb) для направленной доставки цитотоксических средств к злокачественным клеткам. Конструирование конъюгатов антител с лекарственными препаратами путем присоединения цитотоксических средств к антителу, обычно посредством линкера, предполагает рассмотрение целого ряда факторов. Эти факторы включают идентичность и расположение химической группы (групп) для конъюгации с цитотоксическим средством, механизм высвобождения цитотоксического средства, структурный элемент(ы) (если таковые имеются), обеспечивающие высвобождение средства, и структурную модификацию высвобожденного свободного средства, если таковая имеет место. Кроме того, если цитотоксическое средство должно высвобождаться после интернализации антитела, структурные элементы для высвобождения средства и механизм его высвобождения должны быть консонантны с внутриклеточной миграцией конъюгата.

Несмотря на то, что оценивался целый ряд различных классов лекарственных средств для доставки посредством антител, только несколько классов лекарственных средств оказались достаточно активными в качестве конъюгатов антитело-лекарственное средство, обладающих при этом соответствующим профилем токсичности, чтобы гарантировать клиническое развитие. Одним из таких классов являются ауристатины, родственные натуральному продукту доластатину 10. Типичные ауристатины включают ММАЕ (N-метилвалин-валин-долаизолеуин-долапроин-норэфедрин) и ММАF (N-метилвалин-валин-долаизолеуин-долапроин-фенилаланин).

ММАЕ является примером цитотоксического средства, которое активно в качестве свободного лекарственного средства, и является сильнодействующим после конъюгации с моноклональными антителами (mAb) и высвобождения после интернализации в клетки. ММАЕ был успешно конъюгирован с mAb по N-концевой аминокислоте ММАЕ через линкер на основе катепсин-расщепляемого пептида, содержащего малеимидокапроил-валин-цитруллин (mc-vc-) и самостоятельную иммолативную группу, р-аминобензил-карбамоил (РАВС), для получения конъюгатов антитело-лекарственное средство следующей структуры, mAb-(mc-vc-РАВС-ММАЕ)_p. (В приведенной выше формуле, p относится к числу единиц (mc-vc-РАВС-ММАЕ) на mAb или антитело). После расщепления связи между vc-пептидом и самостоятельной иммолативной группой РАВС, РАВС-группа освобождает себя от ММАЕ, высвобождая свободный ММАЕ.

Другой ауристин, ММАF, менее активен в качестве свободного лекарственного средства (по сравнению с ММАЕ), но является сильнодействующим после конъюгации с антителом, интернализации и высвобождения в клетках. ММАF был успешно конъюгирован с моноклональным антителом (mAb) по его N-концевой аминокислоте через линкер на основе катепсин-расщепляемого пептида, содержащий малеимидокапроил-валин-цитруллин (mc-vc-) и самостоятельную иммолативную группу, р-аминобензил-карбамоил (РАВС), для получения конъюгатов антитело-лекарственное средство следующей структуры, mAb-(mc-vc-РАВС-ММАF)_p. (p относится к числу единиц (mc-vc-РАВС-ММАF) на mAb или антитело). При расщеплении связи между пептидом и РАВС-субъединицей самостоятельная иммолативная группа РАВС освобождает себя от ММАF, высвобождая свободный ММАF.

ММАF также активен в качестве нерасщепляемого конъюгата, содержащего лекарственное средство-линкер малеимидокапроил ММАF (mcММАF). Когда этот конъюгат, mAb-(mcММАF)_p, интернализируется в клетках, высвобождаемые активные частицы представляют собой cys-mcММАF. Поскольку линкер является нерасщепляемым, то малеимидокапроил и остаток цистеина антитела остаются присоединенными к N-концу ММАF. Также сообщалось, что ММАF активен в качестве C-концевого конъюгата, присоединенного по его C-концевой аминокислоте, фенилаланину, к пептид-малеимидокапроиловому линкеру. Когда этот конъюгат, (ММАF-пептид-mc)_p-mAb интернализируется в клетках, активная частица, ММАF, высвобождается после расщепления ММАF(фенилаланин)-пептидной связи.

В моделях животных, эти ММАЕ- и ММАF-конъюгаты, как правило, демонстрировали зависящие от нагрузки лекарственного средства снижение фармакокинетических свойств. В частности, при увеличении числа звеньев лекарственное средство-линкер, присоединенных к каждому антителу, фармакокинетика (PK) конъюгатов снижалась.

Вследствие этого, еще одним важным фактором при разработке конъюгатов антитело-лекарственное средство является количество лекарственного средства, которое может быть доставлено, на нацеливающее средство (т.е. число цитотоксических средств, присоединенных к каждому нацеливающему средству (например, антителу), называемое нагрузкой лекарственного средства или загрузка лекарственного средства). Исторически сложилось так, что исходили из предположения, что более высокие нагрузки лекарственного средства превосходили более низкие нагрузки лекарственного средства (например, 8-кратные нагрузки vs 4-кратных нагрузок). Смысл в том, что более высоко нагруженные конъюгаты поставляли бы больше лекарственного средства (цитотоксических средств) для клеток-мишеней. Это соображение было поддержано наблюдениями, что конъюгаты с более высокими нагрузками лекарственных средств были более активны в отношении клеточных линий *in vitro*. Некоторые более поздние исследования показали, однако, что это предположение не было подтверждено в моделях на животных.

Конъюгаты, имеющие нагрузку лекарственного средства 4 или 8 определенных ауристатинов, по наблюдениям, обладали аналогичной активностью в мышинных моделях. См, например, Hamblett et al., *Clinical Cancer Res.* 10:7063-70 (2004). В Hamblett et al. сообщалось, что более нагруженные ADC выводились более быстро из кровообращения в животных моделях. Это более быстрое выведение позволило предположить более высокую РК-подверженность для более нагруженных видов по сравнению с менее нагруженными видами. Смотри Hamblett et al. Кроме того, более нагруженные конъюгаты имели более низкие MTD у мышей, и как результат, имели наименьшие из опубликованного терапевтические индексы. Id. В отличие от этого, ADC с лекарственной нагрузкой 2 на сконструированных участках в моноклональном антителе обладали, как сообщалось, такими же или лучшими РК-свойствами и терапевтическими индексами по сравнению с некоторыми 4-кратно нагруженными ADC. Например, смотри Junutula et al., *Clinical Cancer Res.* 16:4769 (2010). Таким образом, последние тенденции состоят в разработке ADC с низкими нагрузками лекарственных средств.

Альтернативными подходами к преодолению РК-подверженности ADC с более высокой нагрузкой являются добавление солибилизирующих групп к ADC. Например, в попытке преодолеть РК-подверженность полимеры полиэтиленгликоля или другие водорастворимые полимеры включали в линкеры (например, между лекарственным средством и участком присоединения антитела). Другой подход заключается в добавлении лекарственное средство-полимеров к антителу, где каждый полимер содержит большое число лекарственных средств. Эти альтернативные варианты, впрочем, не обязательно достигали желаемого результата. Кроме того, добавление солибилизирующих групп может увеличивать сложность изготовления таких конъюгатов.

Таким образом, остается потребность в форматах для конъюгатов антитела с лекарственным средством (а в более общем смысле, для форматов для других конъюгатов), которые обеспечивают более высокие нагрузки лекарственного средства при сохранении других желательных характеристик менее нагруженных конъюгатов, таких как благоприятные РК-свойства. Удивительно, что настоящее изобретение направлено на удовлетворение этих потребностей.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение предоставляет, *inter alia*, гидрофильные конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство. При помощи конструирования конъюгатов, обладающих гидрофильностью, сходной с таковой неконъюгированного нацеливающего лекарственного средства (например, лиганда, такого как антитело), конъюгаты сохраняют способность обеспечивать фармакокинетические (РК) свойства, аналогичные таковым у неконъюгированного нацеливающего лекарственного средства *in vivo*. Конъюгаты также могут иметь более высокую нагрузку лекарственного средства (т.е. более высокие числа гидрофильных лекарственное средство-линкеров на нацеливающее средство), по сравнению с менее нагруженными конъюгатами, сохраняя при этом такие же желательные РК-свойства и имеющие такую же или более высокую активность *in vivo*. (Например, 4-кратно нагруженные или 8-кратно нагруженные конъюгаты могут иметь такие же или лучшие РК-свойства, чем их 2-кратно или 4-кратно нагруженных аналоги, соответственно; такие 4-кратно нагруженные или 8-кратно нагруженные конъюгаты могут иметь такую же или лучшую активность, чем их 2-кратно или 4-кратно нагруженные аналоги, соответственно). Таким образом, нацеливающие лекарственные средства, выбранные на основе определенных желательных свойств, могут быть конъюгированы с линкерами лекарственных средств без значительного отрицательного воздействия на такие желательные свойства, как РК-свойства нацеливающего лекарственного средства самого по себе. Также предложен способ получения и применения таких конъюгатов.

Также представлены соединения линкер-лекарственное средство для конъюгации с нацеливающими средствами (лигандами) и способы получения и применения таких соединений. Кроме того, предоставлены соединения линкер-лекарственное средство, к которым могут быть присоединены соединения лекарственного средства, а также способы получения и применения таких соединений.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана типичная схема синтеза для сборки конъюгатов лиганд-линкер-лекарственное средство, описанных в настоящем документе.

На фиг. 2 показаны результаты исследования на мышах по сравнению фармакокинетической стабильности неконъюгированного антитела, двух гидрофильных ADC и трех контрольных ADC. ADC показаны в порядке сверху вниз.

На фиг. 3 показаны результаты исследования на мышах по сравнению фармакокинетической стабильностью пяти гидрофильных ADC и контрольного ADC.

На фиг. 4 показаны результаты HPLC-хроматографии конъюгатов антител с лекарственными средствами.

На фиг. 5 показаны результаты HPLC-хроматографии конъюгатов антител с лекарственными средствами.

На фиг. 6 показаны результаты исследований на мышинных ксенотрансплантатах по сравнению активности 4-кратно нагруженных и 8-кратно нагруженных ADC.

На фиг. 7 показаны результаты исследований на мышинных ксенотрансплантатах по сравнению активности 4-кратно нагруженных и 8-кратно нагруженных ADC.

На фиг. 8 показаны результаты исследований на мышинных ксенотрансплантатах по сравнению активности 4-кратно нагруженных и 8-кратно нагруженных ADC.

На фиг. 9 приведены результаты исследований на мышинных ксенотрансплантатах по сравнению активности 4-кратно нагруженных и 8-кратно нагруженных ADC.

Сокращения и определения

Если не указано иное, то подразумевается, что следующие термины и выражения, используемые в настоящем описании, имеют следующие значения. При использовании торгового названия в настоящем описании, торговое название включает состав продукта, генерический лекарственный препарат и активный фармацевтический ингредиент(ы) продукта торгового названия, если контекстом не указано иное.

Термин "индекс гидрофильности" относится к степени гидрофильности конъюгата по отношению к гидрофильности нацеливающего средства самого по себе (т.е. лиганда, как правило, антитела). Индекс гидрофильности измеряется как время удерживания конъюгата к таковому соответствующего неконъюгированного нацеливающего средства (самого по себе) при условиях высокоэффективной жидкофазной хроматографии (ВЭЖХ), как дополнительно описано в настоящем документе. Например, можно определить время удерживания конъюгата лиганд-линкер-лекарственное средство, по отношению к времени удерживания неконъюгированного лиганда (обычно антитела). В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения время удерживания конъюгата не больше, чем на две минуты медленнее, чем время удерживания неконъюгированного лиганда, как определено, как описано в примерах (называемый как индекс гидрофильности 2). В некоторых вариантах осуществления время удерживания конъюгата не больше, чем на одну минуту медленнее, чем время удерживания неконъюгированного лиганда, как определено, как описано в примерах (называемый как индекс гидрофильности 1). В некоторых вариантах осуществления время удерживания конъюгата не больше, чем на половину минуты медленнее, чем время удерживания неконъюгированного лиганда, как определено, как описано в примерах (называемый как индекс гидрофильности 0,5). Если используется другая гидрофобная колонка и/или способ взаимодействия, она может быть откалибрована с использованием конъюгатов из табл. 2 в качестве ссылки для определения референсных подвижностей конъюгатов (время элюции) при выбранной колонке и/или способе. Определенные референсные подвижности на выбранной гидрофобной колонке и/или способе взаимодействия могут быть использованы для расчета индекса гидрофильности тестируемого образца (как будет определено ниже в примере 3). Например, лекарственное средство-линкеры ауристин T-Glu-Dpr-MA, MC-MMAF и mc-vc-PAVC-MMAE могут быть использованы для формирования конъюгатов для использования в качестве референсных. В другом примере ауристин T-Glu-Dpr-MA-h1F6 ADC, h1F6-mc-MMAF и h1F6-mc-vc-PAVC-MMAE ADC могут быть использованы в качестве референсных.

Термин "алкил", сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, прямой или разветвленный углеводородный радикал, имеющий определенное число обозначенных атомов углерода (т.е. C₁₋₈ означает от одного до восьми атомов углерода). Примеры алкильных групп включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил и тому подобное. Термин "алкенил" относится к ненасыщенной алкильной группы, имеющей одну или более двойных связей. Аналогичным образом, термин "алкинил" относится к ненасыщенной алкильной группы, имеющей одну или несколько тройных связей. Примеры таких ненасыщенных алкильных групп включают винил, 2-пропенил, кротил, 2-изопентенил, 2-(бутадиенил), 2,4-пентадиенил, 3-(1,4-пентадиенил), этинил, 1- и 3-пропинил, 3-бутинил и высшие гомологи и изомеры. Термин "циклоалкил" относится к углеводородным кольцам, имеющим указанное число атомов в кольце (например, C₃₋₆циклоалкил) и являющимся полностью насыщенным или имеющим не более, чем одну двойную связь между кольцевыми вершинами. "Циклоалкил" также предназначен для обозначения бициклических и полициклических углеводородных колец, таких как, например, бицикло[2,2,1]гептан, бицикло[2,2,2]октан и т.д. Термин "гетероциклоалкан" или "гетероциклоалкил" относится к циклоалкильной группе, содержащей от одного до пяти гетероатомов, выбранных из N, O и S, причем атомы азота и серы необязательно окислены, а атом(ы) азота необязательно кватернизирован. Гетероциклоалкан может представлять собой моноциклическую, бициклическую или полициклическую кольцевую систему. Неограничивающие примеры гетероциклоалкановых групп включают пирролидин, имидазолидин, пирозолидин, бутиролактамы, валеролактамы, имидазолидинон, гидантоин, диоксолан, фталимида, пиперидин, 1,4-диоксан, морфолин, тиоморфолин, тиоморфолин-S-оксид, тиоморфолин S,S-оксид, пиперазин, пиран, пиридон, 3-пирролин, тиопиран, пирон, тетрагидрофуран, тетрагидротиофен, хинуклидин и тому подобное. Гетероциклоалкановая группа может быть присоединена к остальной части молекулы через углерод кольца или гетероатом.

Термин "алкилен", сам по себе или как часть другого заместителя, означает двухвалентный радикал, полученный из алкана, например, -CH₂CH₂CH₂CH₂-. Как правило, алкиловая (или алкиленовая) группа содержит от 1 до 24 атомов углерода, с теми группами, имеющими 10 или менее атомов углерода, являющимися предпочтительными в настоящем изобретении. "Низший алкил" или "низший алкилен" представляет собой алкильную или алкиленовую группу с более короткой цепью, как правило, имеющей четыре или менее атома углерода. Аналогичным образом, "алкенилен" и "алкинилен" относятся к ненасыщенным формам "алкилена", имеющим двойные или тройные связи, соответственно.

Используемая в настоящем описании волнистая линия "...", которая пересекает одиночную, двойную или тройную связь в любой химической структуре, изображенной в настоящем описании, представляет точечное присоединение одиночной, двойной или тройной связи к остальной части молекулы.

Термины "алкокси", "алкиламино" и "алкилтио" (или тиоалкокси) используются в их обычном смысле и относятся к таким алкильным группам, присоединенным к остатку молекулы через атом кислорода, аминогруппу или атом серы, соответственно. Кроме того, для диалкиламиногрупп алкильные части могут быть одинаковыми или различными и могут быть объединены с образованием 3-7-членного кольца с атомом азота, к которому каждый присоединен. Соответственно, группа, представленная как диалкиламино или $-NR^aR^b$, подразумевает включение пиперидинила, пирролидинила, морфолинила, азетидинила и тому подобного.

Термины "гало" или "галоген", сами по себе или как часть другого заместителя, означают, если не указано иное, атом фтора, хлора, брома или йода. Кроме того, такие термины, как "галогеналкил", подразумевают включение моногалогеналкила и полигалогеналкила. Например, термин " C_{1-4} галоалкил" подразумевает включение трифторметила, 2,2,2-трифторэтила, 4-хлорбутила, 3-бромпропила и тому подобного.

Термин "арил" означает, если не указано иное, полиненасыщенную, как правило, ароматическую, углеводородную группу, которая может представлять собой одно кольцо или несколько колец (до трех колец), которые слиты вместе или связаны ковалентно. Термин "гетероарил" относится к арильным группам (или кольцам), которые содержат от одного до пяти гетероатомов, выбранных из N, O и S, где атомы азота и серы необязательно окислены, а атом(ы) азота необязательно кватернизированы. Гетероарильная группа может быть присоединена к остальной части молекулы через гетероатом. Неограничивающие примеры арильных групп включают фенил, нафтил и дифенил, а неограничивающие примеры гетероарильных групп включают пиридил, пиридазинил, пиазинил, пиридиндинил, триазинил, хинолинил, хиноксалинил, хиназолинил, циннолинил, фталазинил, бензотриазинил, пуринил, бензимидазолил, бензопиразолил, бензотриазолил, бензизоксазолил, изобензофурил, индолизинил, бензотриазинил, тиенопиридинил, тиенопиримидинил, пиазолопиримидинил, имидазопиридин, бензотиаксолил, бензофуранил, бензотиенил, индолил, хинолил, изохинолил, изотиазолил, пиазолил, индазолил, птеридинил, имидазолил, триазолил, тетразолил, оксазолил, изоксазолил, тиadiaзолил, пирролил, тиазолил, фурил, тиенил и тому подобное. Заместители для каждого из приведенных выше арильных и гетероарильных кольцевых систем, когда описывается как "замещенные", выбирают из группы приемлемых заместителей, описанных ниже.

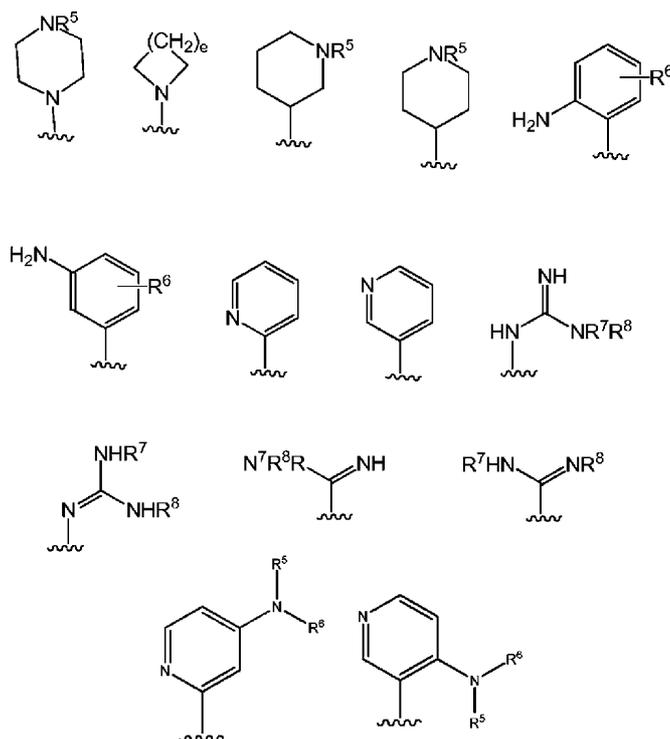
Термин "арилалкил" подразумевает включение тех радикалов, в которых арильная группа присоединена к алкильной группе (например, бензил, фенетил и тому подобное). Аналогичным образом, термин "гетероарил-алкил" означает включение тех радикалов, в которых гетероарильная группа присоединена к алкильной группе (например, пиридилметил, тиазолилэтил и тому подобное).

Вышеуказанные термины (например, "алкил", "арил" и "гетероарил") в некоторых вариантах осуществления включают как замещенные, так и незамещенные формы указанного радикала. Предпочтительные заместители для каждого типа радикала представлены ниже.

Если не указано иное контекстом, заместители для алкильных радикалов (включая группы, часто называемые алкиленом, алкенилом, алкинилом и циклоалкилом) могут представлять собой различные группы, выбранные из: -галогена, $-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $NR''C(O)R'$, $-NR'-C(O)NR'R''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NH-C(NH_2)=NH$, $-NR'C(NH_2)=NH$, $-NH-C(NH_2)=NR'$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NR'S(O)_2R''$, $-CN$ и $-NO_2$ в числе в пределах диапазона от нуля до $(2m'+1)$, где m' представляет собой общее число атомов углерода в таком радикале. Каждый из R' , R'' и R''' независимо относится к водороду, незамещенному C_{1-8} алкилу, незамещенному арилу, арилу, замещенному 1-3 галогенами, незамещенной C_{1-8} алкильной, C_{1-8} алкокси или C_{1-8} тиоалкокси группам, или незамещенным арил- C_{1-4} алкильным группам. Когда R' и R'' присоединены к одному атому азота, они могут быть объединены с атомом азота с образованием 3-, 4-, 5-, 6- или 7-членного кольца. Например, $-NR'R''$ означает включение 1-пирролидинила и 4-морфолинила.

Аналогичным образом, заместители для арильных и гетероарильных групп разнообразны и, как правило, их выбирают из: -галогена, $-OR'$, $-OC(O)R'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-R'$, $-CN$, $-NO_2$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-C(O)R'$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR'-C(O)NR'R''$, $-NH-C(NH_2)=NH$, $-NR'C(NH_2)=NH$, $-NH-C(NH_2)=NR'$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NR'S(O)_2R''$, $-N_3$, перфтор(C_{1-4})алкокси, и перфтор(C_{1-4})алкила в числе в пределах диапазона от нуля до общего числа открытых валентностей на ароматической кольцевой системе, и где R' , R'' и R''' независимо выбраны из водорода, C_{1-8} алкила, C_{1-8} галогеналкила, C_{3-6} циклоалкилг, C_{2-8} алкенила, C_{2-8} алкинила, незамещенного арила и гетероарила, (незамещенный арил)- C_{1-4} -алкила и незамещенного арилокси- C_{1-4} алкила. Другие подходящие заместители включают в себя каждый из вышеуказанных арильных заместителей, присоединенных к атому кольца алкиленовой связкой 1-4 атомов углерода.

Термин "основание" относится к функциональной группе, которая депротонирует воду для получения гидроксид-иона. Типичными основаниями являются амины и азотсодержащие гетероциклы. Типичные основания включают $-N(R^3)(R^4)$, 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 конкретном случае, независимо выбраны из водорода или C_{1-6} алкила, предпочтительно H или метил, и e представляет собой 0-4. В некоторых аспектах, основание представляет собой азотистое основание.

Термин "антитело" используется здесь в самом 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 (т.е. специфическое связывание с антигеном-мишенью). Интактное антитело имеет, главным образом, две области: переменную область и константную область. Переменная область специфически связывается и взаимодействует с антигеном-мишенью. Переменная область включает в себя гиперпеременные области (CDR), которые распознают и связываются с определенным участком связывания на конкретном антигене. Константная область может распознаваться иммунной системой и взаимодействовать с ней (смотри, 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 быть получено из любого подходящего вида. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет человеческое или мышинное происхождение. Моноклональное антитело может являться, например, человеческим, гуманизированным или химерным.

Термин "моноклональное антитело", используемый в настоящем описании, относится к антителу, полученному из популяции, по существу, гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высоко специфичными, направленными против одного антигенного сайта. Термин "Моноклональное" указывает на характер антитела, полученного в основном из гомогенной популяции антител, и не должен быть истолкован как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом.

"Интактным антителом" является такое, которое включает антигенсвязывающую переменную область, а также константный домен легкой цепи (C_L) и константный домен тяжелой цепи, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} и C_{H4} , в соответствии с классом антитела. Константные домены могут представлять собой константные домены природной последовательности (например, константные домены природной последовательности человека) или вариант аминокислотной последовательности этого.

"Фрагмент антитела" включает часть интактного антитела, содержащий антиген-связывающую или переменную область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', $F(ab')_2$ и Fv-фрагменты, диатела, триатела, тетраатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител, ScFv, ScFv-Fc, мультиспецифические фрагменты антител, образованные из фрагмента(ов) антител, фрагмент(ы), продуцируемые при помощи Fab-библиотеки экспрессии, или эпитоп-связывающие фрагменты любого из перечисленного выше, которые специфически связываются с антигеном-мишенью (например, антиген раковой клетки, вирусный антиген или микробный антиген).

"Антиген" представляет собой объект, с которым антитело специфически связывается. Антиген

может быть, например, белковым (например, белок, полипептид или пептид), небелковым (например, углевод) или комбинацией из двух.

Термины "специфическое связывание" и "специфически связывает" означает, что нацеливающее средство или лиганд, такое как антитело или его антиген-связывающий фрагмент, связываются с высокой селективностью с соответствующим ему антигеном-мишенью, а не с множеством других антигенов. Для антитела, антитело или фрагмент антитела, как правило, связывается с аффинностью, по меньшей мере примерно 1×10^{-7} М и, предпочтительно, от 10^{-8} до 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} или 10^{-12} М и связывается с заданным антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше, чем его аффинность связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеин), кроме предопределенного антигена или близко родственного антигена, имеющего один и тот же эпитоп.

Термины "ингибировать" или "ингибирование" означает уменьшение на измеримое количество или предотвращение полностью.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству конъюгата (например, конъюгат антитела с лекарственным средством), которое является эффективным для лечения заболевания или расстройства у млекопитающего. В случае злокачественного новообразования, терапевтически эффективное количество конъюгата может уменьшить число злокачественных клеток; уменьшить размер опухоли; ингибировать (т.е. медленно до некоторой степени и предпочтительно останавливать) инфильтрацию злокачественных клеток в периферические органы; ингибировать (т.е. медленно до некоторой степени и предпочтительно останавливать) метастазирование опухоли; ингибировать рост опухоли; и/или облегчать один или более симптомов, связанных со злокачественным новообразованием. В той степени, в какой лекарственное средство может ингибировать рост и/или убивать существующие злокачественные клетки, оно может являться цитостатическим и/или цитотоксическим. Для терапии рака эффективность может, например, измеряться путем оценки времени до прогрессирования заболевания (ТТР) и/или определения скорости реакции (RR).

Термин "существенный" или "по существу" относится к большинству, т.е. >50% 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 расщепляемый" и "внутриклеточное расщепление" относятся к метаболическому процессу или реакции внутри клетки на конъюгат лиганд-линкер-лекарственное средство (например, конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC) или тому подобное), в результате чего ковалентное соединение (звено линкера) между D_E-составляющей и звеном лиганда (например, антитела (Ab)) нарушается, что приводит к высвобождению D_E-звена. Расщепленные составляющие конъюгата лиганд-линкер-лекарственное средство, таким образом, представляют собой внутриклеточные метаболиты.

Термин "цитотоксическая активность" относится к убивающему клетки или цитотоксическому действию соединения конъюгата лиганд-линкер-лекарственное средство, как правило, с помощью высвобожденного звена лекарственного средства, на клетки-мишени. Цитотоксическая активность может быть выражена в виде значения IC₅₀ (называемого также половиной от максимальной ингибирующей концентрации), которое представляет собой концентрацию (молярную или массовую) на единицу объема, при которой половина клетки выживает при воздействии конъюгата.

Термин "цитотоксическое средство", используемое в данном описании, относится к веществу, которое убивает клетки или иным образом вызывает разрушение клеток.

Термины "злокачественное новообразование" и "злокачественный" относятся к или описывают физиологическое состояние или расстройство у млекопитающих, которое обычно характеризуется неконтролируемым ростом клеток. Термин "опухоль" включает в злокачественные клетки.

"Аутоиммунное заболевание" представляет собой заболевание или нарушение, возникающее из и направленное против собственных тканей или белков индивидуума.

Неограничивающие примеры "пациента" включают человека, крысу, мышь, морскую свинку, обезьяну, свинью, козу, корову, лошадь, собаку, кошку, птицу и домашнюю птицу. В типичном варианте осуществления изобретения пациентом является человек.

Термины "лечить" или "лечение", если контекстом не указано иное, относятся к терапевтическому лечению и профилактическим мерам по предотвращению рецидивов, при котором у субъекта должна подавляться или замедляться (уменьшаться) нежелательное физиологическое изменение или расстройство, такое, как развитие или распространение злокачественного новообразования. Благоприятные или желательные клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, ослабление симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизирование (т.е. не ухудшение) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), либо детектируемую, либо недетектируемую. "Лечение" может также означать продление выживания по сравнению с ожидаемой выживаемости, если лечение не проводится. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, у которых уже присутствует состояние или расстройство.

В контексте злокачественного новообразования, термин "лечение" включает в себя некоторые из

или каждое из: ингибирование роста опухолевых клеток, злокачественных клеток или опухоли; ингибирование репликации опухолевых клеток или злокачественных клеток, уменьшение общей опухолевой массы или уменьшение числа злокачественных клеток и облегчение одного или более симптомов, связанных с этим заболеванием.

В контексте аутоиммунного заболевания, термин "лечение" включает в себя некоторое из или каждое из: ингибирование репликации клеток, ассоциированных с состоянием аутоиммунного заболевания, включая, но не ограничиваясь этим, клетки, которые продуцируют аутоиммунное антитело, уменьшение нагрузки аутоиммуноподобного антитела и облегчение одного или более симптомов аутоиммунного заболевания.

Выражение "фармацевтически приемлемая соль", используемое в данном описании, относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям соединения (например, лекарственное средство, лекарственное средство-линкер или конъюгат лиганд-линкер-лекарственное средство). Соединение может содержать по меньшей мере одну аминогруппу, и, соответственно, кислотно-аддитивные соли могут быть образованы с аминогруппой. Примеры солей включают, но не ограничиваются ими, сульфатные, трифторацетатные, цитратные, ацетатные, оксалатные, хлоридные, бромидные, иодидные, нитратные, бисульфатные, фосфатные, кислородфосфатные, изоникотинатные, лактатные, салицилатные, кислородцитратные, тартратные, олеатные, таннатные, пантотенатные, битартратные, аскорбатные, сукцинатные, малеатные, гентизинатные, фумаратные, глюконатные, глюкуронатные, сахаратные, формиатные, бензоатные, глутаматные, метансульфонатные, этансульфонатные, бензолсульфонатные, р-толуолсульфонатные и памоатные (т.е., 1,1'-метилден-бис-(2-гидрокси-3-нафтоатные)) соли. Фармацевтически приемлемая соль может содержать включение другой молекулы, такой как ацетат-иона, ион сукцината или другого противоиона. Противоион может представлять собой любое органическое или неорганическое составляющее, которое стабилизирует заряд на исходном соединении. Кроме того, его фармацевтически приемлемая соль может иметь более чем один заряженный атом в своей структуре. Случаи, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, могут иметь несколько противоионов. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или несколько заряженных атомов и/или один или более противоион.

Подробное описание

Общее.

Настоящее изобретение основано, частично, на обнаружении того факта, что определенные комбинации связывающих групп и цитотоксических средств могут быть использованы для получения конъюгатов лиганд-линкер-лекарственное средство, таких как конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), которые имеют гидрофильность, аналогичную таковой неконъюгированного лиганда (т.е. нацеливающего средства, такого как антитело или его антиген-связывающий фрагмент). Поддерживая гидрофильность конъюгата, аналогичную таковой неконъюгированного лиганда, полученные конъюгаты могут иметь более высокие нагрузки лекарственного средства (например, по меньшей мере 4 или 8 лекарственное средство-линкеры на лиганд), сохраняя при этом определенные желательные характеристики лиганда самого по себе, такие как снижение выведения *in vivo*, увеличение фармакокинетического профиля *in vivo*, более высокий уровень воздействия конъюгатов на клетку(и)-мишень(и) и т.д. Предпочтительно, могут быть разработаны гидрофильные конъюгаты, имеющие гидрофильность, аналогичную таковой лиганда без необходимости включения дополнительных солюбилизирующих групп, таких как полиэтиленгликоль или другие водорастворимые полимеры.

(Конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство в настоящем документе также называются конъюгатами лекарственное средство-лиганд, конъюгатами лиганд-лекарственное средство или конъюгатами лиганда с лекарственным средством).

Гидрофильные связующие группы (также называемые как линкеры или звенья линкера) конъюгатов предназначены для повышенной гидрофильности. Связующая группа обеспечивает эффективное высвобождение цитотоксического средства (также называемого как звено лекарственного средства или лекарственное средство) в клетке-мишени, достаточное для индукции цитотоксичности или цитостатического действия в случае цитотоксического средства. Как правило, гидрофильные линкеры предназначены для эффективного высвобождения звена лекарственного средства, как только конъюгат интернализуется в клетку-мишень. Подходящими сайтами узнавания для высвобождения звена лекарственного средства за счет расщепления являются такие, которые позволяют эффективно отделить звено от гидрофильной связывающей группы. Как правило, сайт распознавания представляет собой пептидный сайт расщепления (например, образуемый в комбинации с цитотоксическим средством, которое имеет аминокислотную или пептидную характерную особенность в участке присоединения связующей группы). Примеры пептидных сайтов расщепления включают в себя такие, которые распознаются внутриклеточными протеазами, например, присутствующими в лизосомах. В вариантах осуществления, где связывающая группа присоединена к аминокислоте эффекторной части молекулы (D_E), AA_1 образует расщепляемую пептидную связь со звеном D_E . Расщепляемая пептидная связь чувствительна к расщеплению протеазами, когда конъюгат достигает своего сайта-мишени. В других вариантах осуществления AA_1 образует амидную связь с участком присоединения эффекторной составляющей (D_E), которая чувствительна к расщеплению (например, с помощью протеаз), когда конъюгат достигает сайта-мишени.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения звенья лекарственного средства представляют собой ауристатины, которые разработаны для увеличения гидрофильности в сочетании с гидрофильным звеном линкера. Преимущественно можно сконструировать звенья лекарственного средства, чтобы иметь гидрофильные заместители, при сохранении сильной цитотоксической активности. Звенья лекарственного средства ауристатины присоединяются по их С-концу к звену линкера, как более подробно описано в настоящем документе.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления L^H представляет собой гидрофильный линкер, содержащий одну, две, три или четыре гидрофильные аминокислоты, в котором первая аминокислота образует участок расщепления с частью звена лекарственного средства, к которому он присоединен. В некоторых вариантах осуществления L^H представляет собой гидрофильный линкер, содержащий одну или две гидрофильные аминокислоты, в котором первая аминокислота образует участок расщепления с частью звена лекарственного средства, к которому он присоединен. В некоторых вариантах осуществления L^H представляет собой гидрофильный линкер, содержащий аминокислоту, которая образует участок расщепления с частью звена лекарственного средства, к которому он присоединен. В некоторых вариантах осуществления вторая, третья и/или четвертая гидрофильная аминокислота заменена необязательно замещенной алкиленовой или гетероалкиленовой группой.

Гидрофильность конъюгата можно определить путем сравнения гидрофильности конъюгата с таковой неконъюгированного нацеливающего средства (т.е. лиганда или звена лиганда), называемого индексом гидрофильности. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения время удерживания конъюгата является не большим, чем на две минуты медленнее, чем время удерживания неконъюгированного лиганда, как определено, как описано в примерах. В некоторых других вариантах осуществления настоящего изобретения время удерживания конъюгата является не большим, чем на одну минуту медленнее, чем время удерживания неконъюгированного лиганда, как определено, как описано в примерах. В некоторых других вариантах осуществления настоящего изобретения время удерживания конъюгата является не большим, чем на половину минуты медленнее, чем время удерживания неконъюгированного лиганда, как определено, как описано в примерах. Со ссылкой на примеры, пример 3 раскрывает предпочтительный способ определения индекса гидрофильности конъюгата. В качестве альтернативы, другая гидрофобная колонка взаимодействия и/или способ может быть откалибрована с использованием конъюгатов из табл. 2 в качестве ссылки для определения референсных подвижностей конъюгатов (времена элюции) референсов при помощи выбранной колонки и/или способа. Определенные референсных подвижностей при помощи выбранной гидрофобной колонки взаимодействия и/или способа может быть использован для расчета индекса гидрофильности тестируемого образца (как будет определено ниже в примере 3). Например, ауристин T-Glu-Dpr-MA, mc-MMAF и mc-vc-PABC-MMAE могут быть использованы для формирования конъюгатов для использования в качестве референсных. В другом примере ауристин T-Glu-Dpr-MA-h1F6 ADC, h1F6-mc-MMAF и h1F6-mc-vc-PABC-MMAE ADC могут быть использованы в качестве референсных.

С учетом вышеизложенного, в одной группе вариантов осуществления предоставлены конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство, включающие звено лиганда и несколько звеньев линкер-лекарственное средство, присоединенны к звену лиганда. Звено линкера содержит совокупность гидрофильных линкеров (L^H), в том числе компонент присоединения лиганда, такого как с помощью тиоэфирной связи. Звено лекарственного средства содержит цитотоксическое средство, имеющее компонент присоединения для соединения со звеном линкера. В другой группе вариантов осуществления, предоставлены конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство, в которых часть линкера содержит совокупность гидрофильных линкеров и звено лекарственного средства содержит цитотоксическое средство.

В родственных вариантах осуществления предоставлены способы для введения конъюгатов лиганд-линкер-лекарственное средство пациенту для лечения заболевания. Заболевание может представлять, например, злокачественное новообразование или аутоиммунное заболевание. Конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство вводят в терапевтически эффективном количестве и по терапевтически эффективной схеме. В некоторых аспектах доза конъюгат является такой же или меньше, чем у аналогичного двухкратно нагруженного конъюгата (вводимого по аналогичной схеме). В некоторых аспектах доза конъюгат является такой же или меньше, чем у аналогичного четырехкратно нагруженного конъюгата (вводимого по аналогичной схеме). В некоторых аспектах доза конъюгата является такой же или меньше, чем у аналогичного двухкратно нагруженного конъюгата, в то время как схема дозирования является такой же или менее частой. В некоторых аспектах доза конъюгат является такой же или меньше, чем у аналогичного четырехкратно нагруженного конъюгата, в то время как схема дозирования является такой же или менее частой. В некоторых других аспектах доза конъюгат меньше, и схема дозирования является такой же или менее частой, чем у сопоставимого двухкратно нагруженного конъюгата. В некоторых других аспектах доза конъюгат меньше, и схема дозирования является такой же или менее частой, чем у сопоставимого четырехкратно нагруженного конъюгата. Конъюгат-компаратор может представлять собой, например, тот же конъюгат лиганд-лекарственное средство-линкер, имеющий нагрузку лекарственного средства 2 или 4.

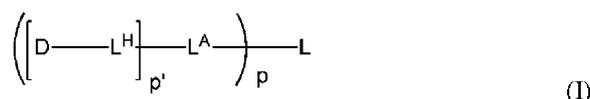
В другой группе вариантов осуществления, предоставлены способы изготовления конъюгатов ли-

ганд-линкер-лекарственное средство. В некоторых аспектах часть линкера содержит совокупность гидрофильных линкеров (L^H), имеющую компоненту присоединения лиганда (например, присоединенную малеимидную составляющую), пригодную для взаимодействия с лигандом. В другой группе вариантов осуществления, предоставлены конъюгаты лиганд-линкер, в которых часть линкера содержит совокупность гидрофильных линкеров (L^H), имеющую особенности, пригодные для присоединения и высвобождения звена лекарственного средства.

В другой группе вариантов осуществления, предусмотрены способы получения конъюгатов лиганд-линкер-лекарственное средство. В некоторых аспектах, часть линкера содержит совокупность гидрофильных линкеров (L^H), имеющих присоединенную малеимидную составляющую, подходящую для реакции с лигандом. В другом аспекте, линкерная часть содержит совокупность гидрофильных линкеров (L^H), имеющих особенности, пригодные для высвобождения звена лекарственного средства (в случае присоединения).

Конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство.

В одном из аспектов предоставлены конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство, имеющее следующую формулу



или фармацевтически приемлемая соль или сольват этого, где:

L представляет собой лиганд, который специфически связывается с мишенью;

L^A представляет собой компоненту присоединения лиганда;

L^H представляет собой необязательно разветвленный гидрофильный линкер, каждая ветвь L^H имеет формулу



в которой

AA_1 представляет собой гидрофильную аминокислоту, которая образует расщепляемую пептидную связь с С-концом звена лекарственного средства, к которому она присоединена;

$\text{R}^{\text{L}1}$ является необязательным, и выбран из гидрофильной аминокислоты и необязательно замещенного алкилена, который может разделять атом с L^A в присутствии $\text{R}^{\text{L}1}$ и отсутствии $\text{R}^{\text{L}2}$ и $\text{R}^{\text{L}3}$;

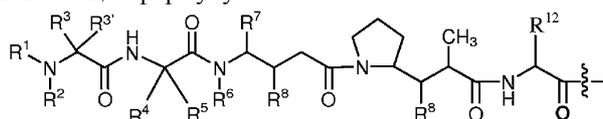
$\text{R}^{\text{L}2}$ не является обязательным, и выбран из гидрофильной аминокислоты и необязательно замещенного алкилена, который может разделять атом с L^A в присутствии $\text{R}^{\text{L}2}$ и отсутствии $\text{R}^{\text{L}3}$; и

$\text{R}^{\text{L}3}$ не является обязательным, и выбран из гидрофильной аминокислоты и необязательно замещенного алкилена, который может разделять атом с L^A в присутствии $\text{R}^{\text{L}3}$;

индекс p представляет собой целое число в диапазоне от 4 до приблизительно 20;

индекс p' представляет собой целое число от 1 до 4; и

D представляет собой имеющее формулу



в которой

каждый из R^1 и R^2 независимо выбран из группы, состоящей из водорода (H) и необязательно замещенного $-\text{C}_1-\text{C}_8$ -алкила; при условии, что оба R^1 и R^2 не являются H, за исключением того, что оба из R^3 и R^3' не являются H;

R^3 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-\text{C}_1-\text{C}_8$ -алкила,

R^3' выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-\text{C}_1-\text{C}_8$ -алкила, и по меньшей мере один из R^3 и R^3' не является H;

R^4 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного алкила;

R^5 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-\text{C}_1-\text{C}_8$ -алкила;

или R^4 и R^5 совместно образуют карбоциклическое кольцо и имеют формулу $-(\text{CR}^a\text{R}^b)_n-$, в которой R^a и R^b независимо выбраны из группы, включающей H и необязательно замещенный $-\text{C}_1-\text{C}_8$ -алкил и n выбран из группы, состоящей из 2, 3, 4, 5 и 6;

R^6 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-\text{C}_1-\text{C}_8$ -алкила;

R^7 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-\text{C}_1-\text{C}_8$ -алкила;

каждый R^8 независимо выбран из группы, состоящей из H, $-\text{OH}$, необязательно замещенного $-\text{C}_1-\text{C}_8$ -алкила и необязательно замещенного $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8$ -алкила);

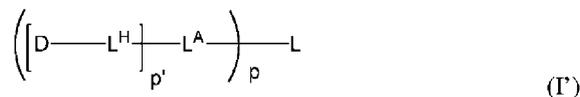
R^{12} выбран из H, необязательно замещенного $-\text{C}_1-\text{C}_8$ -алкила, необязательно замещенного арила, необязательно замещенного $-\text{X}^1$ арила, необязательно замещенного $-\text{C}_3-\text{C}_8$ -карбоцикла, необязательно замещенного $-\text{X}^1-(\text{C}_3-\text{C}_8$ -карбоцикла), необязательно замещенного $-\text{C}_1-\text{C}_8$ -алкилена- NH_2 , необязательно замещенного C_3-C_8 -гетероцикла и необязательно замещенного $-\text{X}^1-(\text{C}_3-\text{C}_8$ -гетероцикла); и

каждый X^1 независимо представляет собой $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ -алкилен;

где конъюгат лиганд-линкер-лекарственное средство имеет индекс гидрофильности меньше или равным 2;

где левая и правая линии L^H показывают ковалентные присоединения к звену лекарственного средства и L^A , соответственно; и волнистая линия каждого D показывает ковалентное присоединение к L^H .

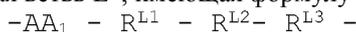
В родственном аспекте предоставлены конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство, имеющее следующую формулу



или фармацевтически приемлемая соль или сольват этого, где:

L представляет собой лиганд, который специфически связан с мишенью;

L^A является компонентом присоединения лиганда; L^H представляет собой необязательно разветвленный гидрофильный линкер, каждая ветвь L^H , имеющая формулу



в которой

AA_1 представляет собой гидрофильную аминокислоту, которая образует расщепляемую пептидную связь с C-концом звена лекарственного средства, к которому она присоединена;

R^{L1} является необязательным и выбран из гидрофильной аминокислоты и необязательно замещенного алкилена, который может разделять атом с L^A в отсутствии R^{L3} и R^{L3} ;

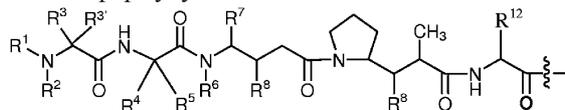
R^{L2} не является обязательным, и выбран из гидрофильной аминокислоты и необязательно замещенного алкилена, который может разделять атом с L^A в присутствии R^{L2} и отсутствии R^{L3} ; и

R^{L3} не является обязательным, и выбран из гидрофильной аминокислоты и необязательно замещенного алкилена, который может разделять атом с L^A в присутствии R^{L3} ;

индекс p представляет собой целое число в диапазоне от 4 до приблизительно 20;

индекс p' представляет собой целое число от 1 до 4; и

D представляет собой имеющее формулу



в которой

каждый из R^1 и R^2 независимо выбран из группы, состоящей из водорода (H) и необязательно замещенного -C₁-C₄-алкила; при условии, что оба R^1 и R^2 не являются H, если оба из R^3 и R^3 не являются H;

R^3 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного -C₁-C₄-алкила;

R^3 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенный -C₁-C₄-алкила и, по меньшей мере один из R^3 и R^3 не является H;

R^4 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного алкила;

R^5 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного -C₁-C₄-алкила;

или R^4 и R^5 совместно образуют карбоциклическое кольцо и имеют формулу $-(CR^aR^b)_n-$, в которой R^a и R^b независимо выбраны из группы, включающей H и необязательно замещенный -C₁-C₄-алкил и n выбран из группы, состоящей из 2, 3, 4, 5 и 6;

R^6 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного -C₁-C₄-алкила;

R^7 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного -C₁-C₄-алкила;

каждый R^8 независимо выбран из группы, состоящей из H, -OH, необязательно замещенного -C₁-C₄-алкила и необязательно замещенного -O-(C₁-C₄-алкила);

R^{12} выбран из H, необязательно замещенного -C₁-C₈-алкила, необязательно замещенного арила, необязательно замещенный -X¹ арила, необязательно замещенного -C₃-C₈-карбоцикла, необязательно замещенного -X¹-(C₃-C₈-карбоцикла), необязательно замещенного -C₁-C₈-алкилена-NH₂, необязательно замещенного C₃-C₈-гетероцикла и необязательно замещенного -X¹-(C₃-C₈-гетероцикла); и

каждый X¹ представляет собой независимо -C₁-C₁₀-алкилен;

где конъюгат лиганд-линкер-лекарственное средство имеет индекс гидрофильности меньше чем или равным 2;

где левая и правая линии L^H показывают ковалентные присоединения к звену лекарственного средства и L^A , соответственно; и волнистая линия каждого D показывает ковалентное присоединение к L^H .

Различные компоненты конъюгатов лиганд-линкер-лекарственное средство с формулами I и Γ представлены более подробно ниже.

В некоторых аспектах конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство включают звено лиганда и по меньшей мере четыре звена линкер-лекарственное средство, причем звено лиганда и каждое из звена(ев) лекарственного средства соединены звеном(ями) линкера, содержащим совокупность гидрофильных линкеров (L^H). В некоторых других аспектах звенья линкера присоединены к звену лиганда через тиоэфирную связь. В некоторых родственных аспектах, каждое звено линкера дополнительно содержит

гидролизованное сукцинимидное кольцо (или янтарную кислоту), непосредственно конъюгированное со звеном лиганда через тиоэфирную связь.

В некоторых аспектах конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство включают звено лиганда и по меньшей мере шесть звеньев линкер-лекарственное средство, причем звено лиганда и каждое из звена(ев) лекарственного средства соединены звеном(ями) линкера, содержащим совокупность гидрофильных линкеров (L^H). В некоторых других аспектах звенья линкера присоединены к звену лиганда через тиоэфирную связь. В некоторых родственных аспектах, каждое звено линкера дополнительно содержит гидролизованное сукцинимидное кольцо (или янтарную кислоту), непосредственно конъюгированное со звеном лиганда через тиоэфирную связь.

В некоторых аспектах конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство включают звено лиганда и по меньшей мере восемь звеньев линкер-лекарственное средство, причем звено лиганда и каждое из звена(ев) лекарственного средства соединены звеном(ми) линкера, содержащим совокупность гидрофильных линкеров (L^H). В некоторых других аспектах звенья линкера присоединены к звену лиганда через тиоэфирную связь. В некоторых родственных аспектах, каждое звено линкера дополнительно содержит гидролизованное сукцинимидное кольцо (или янтарную кислоту), непосредственно конъюгированное со звеном лиганда через тиоэфирную связь.

В некоторых аспектах конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство включают звено лиганда и по меньшей мере десять звеньев линкер-лекарственное средство, причем звено лиганда и каждое из звена(ев) лекарственного средства соединены звеном(ми) линкера, содержащим совокупность гидрофильных линкеров (L^H). В некоторых других аспектах звенья линкера присоединены к звену лиганда через тиоэфирную связь. В некоторых родственных аспектах, каждое звено линкера дополнительно содержит гидролизованное сукцинимидное кольцо (или янтарную кислоту), непосредственно конъюгированное со звеном лиганда через тиоэфирную связь.

В некоторых аспектах конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство включают звено лиганда и по меньшей мере шестнадцать звеньев линкер-лекарственное средство, причем звено лиганда и каждое из звена(ев) лекарственного средства соединены звеном(ми) линкера, содержащим совокупность гидрофильных линкеров (L^H). В некоторых других аспектах звенья линкера присоединены к звену лиганда через тиоэфирную связь. В некоторых родственных аспектах, каждое звено линкера дополнительно содержит гидролизованное сукцинимидное кольцо (или янтарную кислоту), непосредственно конъюгированное со звеном лиганда через тиоэфирную связь.

Звено лекарственного средства.

Обращаясь к звену лекарственного средства с формулами I и I', в некоторых вариантах осуществления R^{12} выбран из H, необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила, необязательно замещенного арила, необязательно замещенного $-X^1$ арила, необязательно замещенного $-C_3-C_8$ -карбоцикла, необязательно замещенного $-X^1-(C_3-C_8$ -карбоцикла), необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкилена- NH_2 , необязательно замещенного $-C_3-C_8$ -гетероцикла и необязательно замещенного $-X^1-(C_3-C_8$ -гетероцикла).

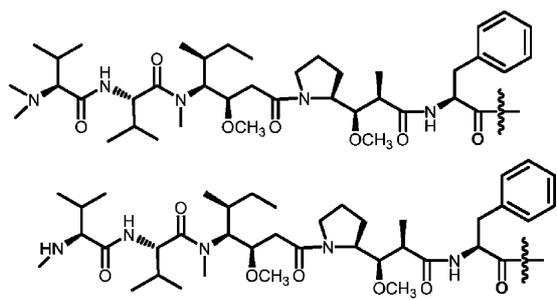
В некоторых родственных вариантах осуществления R^{12} не обозначает боковую цепь фенилаланина или пролина. В некоторых дополнительных вариантах осуществления R^{12} не обозначает боковую цепь фенилаланина, метионина, триптофана или пролина.

В некоторых вариантах осуществления R^{12} выбран из боковых цепей природных L-аминокислот, отличных от пролина и глицина. В некоторых других вариантах осуществления R^{12} выбран из боковых цепей природных L-аминокислот, отличных от пролина, глицина или фенилаланина. В некоторых дополнительных вариантах осуществления R^{12} выбран из боковых цепей природных L-аминокислот, отличных от пролина, глицина, триптофана, метионина или фенилаланина.

В некоторых других вариантах осуществления R^{12} выбран из боковых цепей группы гидрофильных аминокислот, состоящей из треонина, серина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, гомосерина, гидроксивалина, фурилаланина, треонин (PO_3H_2), пирозолилаланина, триазилилаланина и тиазолилаланина.

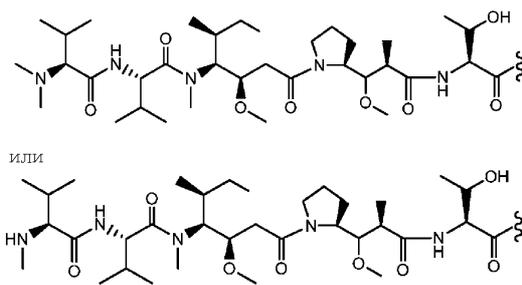
В некоторых вариантах осуществления R^{12} представляет собой боковую цепь треонина.

Типичные звенья лекарственного средства имеют следующую формулу, или фармацевтически приемлемую соль этого, где волнистая линия указывает участок присоединения к звену линкера. В некоторых типичных звеньях, звено лекарственного средства представляет собой диметил- или монометил-ауристин F, как показано ниже:



или фармацевтически приемлемую соль или сольвата этого.

Другие типичные звенья лекарственного средства представляют собой диметил- или монометил-вые формы ауристатиона Т.



или фармацевтически приемлемую соль или сольвата этого.

Звено линкера.

Обращаясь к звену линкера с формулами I и I', в некоторых вариантах осуществления L^A ковалентно связан с атомом серы лиганда. В некоторых аспектах, атом серы является таковым остатка цистеина, который может образовывать межцепочечную дисульфидную связь антитела. В другом аспекте, атом серы является таковым остатка цистеина, который был введен в звено лиганда (например, с помощью сайт-направленного мутагенеза или химической реакции). В других аспектах, атомы серы, к которым L^A присоединены, выбирают из остатков цистеина, образующих межцепочечную дисульфидную связь антитела и цистеина, который был введен в звено лиганда (например, с помощью сайт-направленного мутагенеза или химической реакции).

AA_1 образует расщепляемую связь со звеном лекарственного средства. В вариантах осуществления, где AA_1 присоединен к аминокислоте звена лекарственного средства, AA_1 образует расщепляемую пептидную связь со звеном лекарственного средства. Расщепляемая пептидная связь чувствительна к расщеплению протеазами, когда конъюгат достигает сайта мишени. В некоторых вариантах осуществления AA_1 представляет собой гидрофильную аминокислоту, обычно представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина и L-формы аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина. В некоторых вариантах осуществления AA_1 является глутаминовой кислотой.

В вариантах осуществления, где R^{L1} присутствует и представляет собой гидрофильную аминокислоту, он может быть выбран из группы, состоящей из глицина; L- или D- форм аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; $-NH-CH(R^a)-CO-$; и $-NH-CH(COOH)-R^b-$; где R^a выбран из $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CH_2CH_2CO_2H$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$; и R^b выбран из $-CH_2NH-$, $-CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2C(O)-$, $-CH_2CH_2CH_2C(O)-$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)-$. В некоторых других вариантах осуществления R^{L1} выбран из группы, состоящей из D-аминокислот аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; глицина; $-NH-CH(R^a)-CO-$; и $-NH-CH(COOH)-R^b-$; где R^a выбран из $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CH_2CH_2CO_2H$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$; и R^b выбран из $-CH_2NH-$, $-CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2C(O)-$, $-CH_2CH_2CH_2C(O)-$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)-$.

В вариантах осуществления, где R^{L1} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, он может представлять собой C_1-C_6 -алкилен, необязательно замещенный 1-4 заместителями, выбранными из $-NH-$, $-C(O)-$, $-COOH$, $-N(C_1-C_3\text{-алкила})$, $-NH_2$ или $-NH(C_1-C_3\text{-алкила})$. В некоторых вариантах осуществления R^{L1} является этилендиамином, $-NH-CH(COOH)-C_2-NH-$ или $-C(O)-CH(CH_2NH_2)-$.

В вариантах осуществления, где R^{L2} присутствует и представляет собой гидрофильную аминокислоту, он может быть выбран из группы, состоящей из глицина; L- или D- форм аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; $-NH-CH(R^a)-CO-$; и $-NH-CH(COOH)-R^b-$; где R^a выбран из $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CH_2CH_2CO_2H$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$; и R^b выбран из $-CH_2NH-$, $-CH_2CH_2NH-$,

$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$. В некоторых других вариантах осуществления изобретения, когда $\text{R}^{\text{L}2}$ присутствует, его выбирают из группы, состоящей из D аминокислот аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; глицина; $-\text{NH}-\text{CH}(\text{R}^{\text{a}})-\text{CO}-$; и $-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-\text{R}^{\text{b}}-$; где R^{a} выбран из $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$; и R^{b} выбран из $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$.

В вариантах осуществления, где $\text{R}^{\text{L}2}$ присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, он может представлять собой C_1 - C_6 -алкилен, необязательно замещенный 1-4 заместителями, выбранными из $-\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{COOH}$, $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_3\text{-алкила})$, $-\text{NH}_2$ или $-\text{NH}(\text{C}_1-\text{C}_3\text{-алкила})$. В некоторых вариантах осуществления $\text{R}^{\text{L}2}$ является этилендиамином, $-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-\text{CH}_2-\text{NH}-$ или $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{NH}_2)-$.

В вариантах осуществления, где $\text{R}^{\text{L}3}$ присутствует и представляет собой гидрофильную аминокислоту, он может быть выбран из группы, состоящей из глицина; L- или D- форм аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; $-\text{NH}-\text{CH}(\text{R}^{\text{a}})-\text{CO}-$; и $-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-\text{R}^{\text{b}}-$; где R^{a} выбран из $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$; и R^{b} выбран из $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$.

В некоторых других вариантах осуществления изобретения, где $\text{R}^{\text{L}3}$ присутствует, его выбирают из группы, состоящей из D-аминокислот аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; глицина; $-\text{NH}-\text{CH}(\text{R}^{\text{a}})-\text{CO}-$; и $-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-\text{R}^{\text{b}}-$; где R^{a} выбран из $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$; и R^{b} выбран из $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$.

В вариантах осуществления, где $\text{R}^{\text{L}3}$ присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, он может представлять собой C_1 - C_6 -алкилен, необязательно замещенный 1-4 заместителями, выбранными из $-\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{COOH}$, $-\text{N}(\text{C}_1-\text{C}_3\text{-алкила})$, $-\text{NH}_2$ или $-\text{NH}(\text{C}_1-\text{C}_3\text{-алкила})$. В некоторых вариантах осуществления $\text{R}^{\text{L}3}$ является этилендиамином, $-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-\text{CH}_2-\text{NH}-$ или $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{NH}_2)-$.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 присутствует, а $\text{R}^{\text{L}1}$, $\text{R}^{\text{L}2}$ и $\text{R}^{\text{L}3}$ отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 присутствует, а $\text{R}^{\text{L}1}$ присутствует, а $\text{R}^{\text{L}2}$ и $\text{R}^{\text{L}3}$ отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 присутствует, $\text{R}^{\text{L}1}$ присутствует, $\text{R}^{\text{L}2}$ присутствует и $\text{R}^{\text{L}3}$ отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного, AA_1 присутствует, $\text{R}^{\text{L}1}$ присутствует, $\text{R}^{\text{L}2}$ присутствует и $\text{R}^{\text{L}3}$ присутствует.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 представляет собой гидрофильную аминокислоту и по меньшей мере один из $\text{R}^{\text{L}1}$, $\text{R}^{\text{L}2}$ и $\text{R}^{\text{L}3}$ присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 является глутаминовой кислотой и по меньшей мере один из $\text{R}^{\text{L}1}$, $\text{R}^{\text{L}2}$ и $\text{R}^{\text{L}3}$ присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 является глутаминовой кислотой, $\text{R}^{\text{L}1}$ представляет собой гидрофильную аминокислоту и по меньшей мере один из $\text{R}^{\text{L}2}$ и $\text{R}^{\text{L}3}$ присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 и $\text{R}^{\text{L}1}$ представляют собой гидрофильные аминокислоты и по меньшей мере один из $\text{R}^{\text{L}2}$ и $\text{R}^{\text{L}3}$ присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 представляет собой гидрофильную аминокислоту и $\text{R}^{\text{L}1}$ и, необязательно, $\text{R}^{\text{L}2}$ являются необязательно замещенным алкиленом, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного L^{H} не содержит глициновый дипептид (Gly-Gly), трипептид или тетрапептид. В некоторых вариантах осуществления L^{H} не включает пептид Asn-(D)Lys.

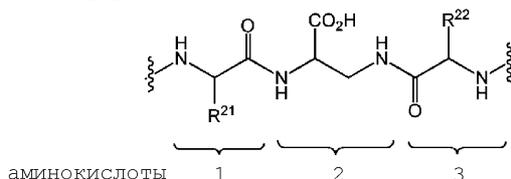
В некоторых вариантах осуществления L^{H} включает модифицированный пептид, имеющий от двух до четырех аминокислот. Модифицированный пептид имеет аминокислоту в положении 1 (AA_1), которая выбрана для оптимизации высвобождения звена лекарственного средства (например, путем протеазного расщепления амидной пептидной связи). В одном или обоих положениях $\text{R}^{\text{L}1}$ и $\text{R}^{\text{L}2}$ представляет собой аминокислоту, которая меняет ориентацию типичных N связей на C пептидов (образующих амидные связи) и облегчает присоединение последней аминокислоты (например, $\text{R}^{\text{L}2}$ или $\text{R}^{\text{L}3}$), которая, перед присоединением звена лиганда включает α -аминогруппу, защищенную в качестве малеимида. Аминокислота, имеющая обращенную N на C связь, присоединена к следующей группе с помощью своей боковой цепи. В некоторых вариантах осуществления эта аминокислота представляет собой альфа-аминокислоту.

В других вариантах осуществления она может представлять собой бета- или гамма-аминокислоту. В некоторых из этих вариантов осуществления боковая цепь выбрана из $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$.

В некоторых вариантах осуществления L^{H} , аминокислоты, имеющие обращенную N на C связь (R^{L1}) присоединены к R^{L2} или R^{L3} , где R^{L2} или R^{L3} представляет собой гидрофильную аминокислоту или необязательно замещенный алкилен, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных выше.

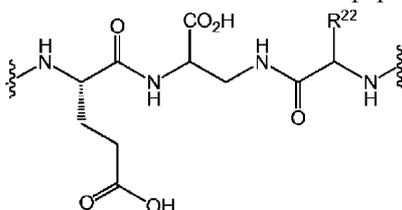
В некоторых вариантах осуществления L^{H} , аминокислоты, имеющие обращенную N на C связь (R^{L1}) присоединены к R^{L2} , где R^{L2} представляет собой гидрофильную аминокислоту или необязательно замещенный алкилен, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных выше.

В некоторых других вариантах осуществления L^{H} представляет собой гидрофильный, расщепляемый линкер, каждая ветвь, имеющая формулу



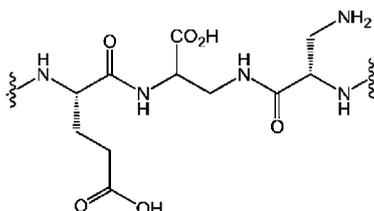
в которой R^{21} выбран из $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$; и R^{22} выбран из $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{OH}$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. Левая и правая волнистые линии указывают присоединение к звену лекарственного средства и L^{A} , или ветви L^{H} , соответственно.

В других вариантах осуществления L^{H} или его ветвь имеет формулу



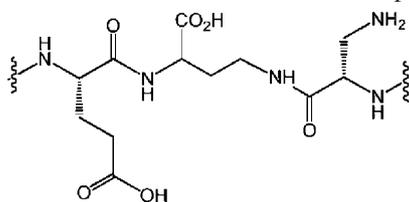
в которой R^{22} выбран из $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{OH}$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. В некоторых вариантах осуществления R^{22} выбран из $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$. Левая и правая волнистые линии указывают присоединение к звену лекарственного средства и L^{A} , или ветви L^{H} , соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^{H} или его ветвь имеет формулу



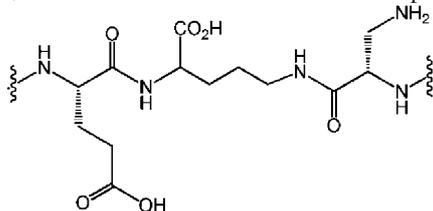
Левая и правая волнистые линии указывают присоединение к звену лекарственного средства и L^{A} , соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^{H} или его ветвь имеет формулу



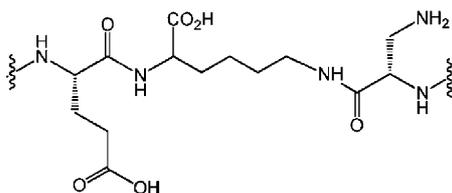
Левая и правая волнистые линии указывают присоединение к звену лекарственного средства и L^{A} , или ветви L^{H} , соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^{H} или его ветвь имеет формулу



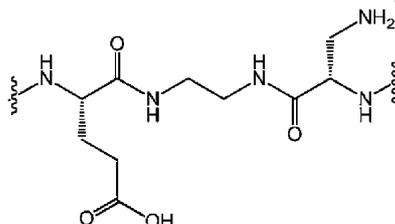
Левая и правая волнистые линии указывают присоединение к звену лекарственного средства и L^A , или ветви L^H , соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



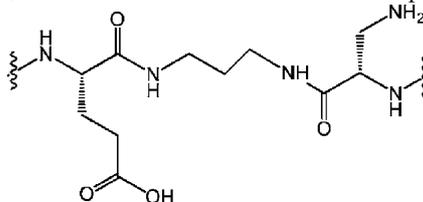
Левая и правая волнистые линии указывают присоединение к звену лекарственного средства и L^A , или ветви L^H , соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



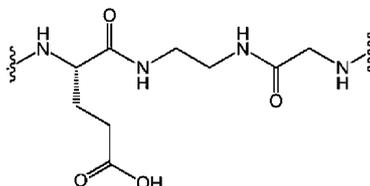
Левая и правая волнистые линии указывают присоединение к звену лекарственного средства и L^A , или ветви L^H , соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



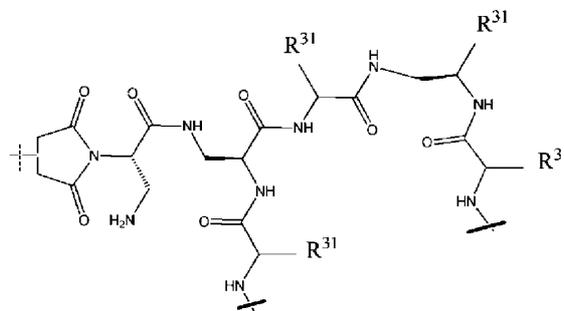
Левая и правая волнистые линии указывают присоединение к звену лекарственного средства и L^A , соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



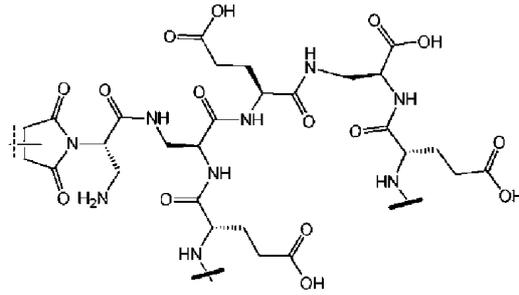
Левая и правая волнистые линии указывают присоединение к звену лекарственного средства и L^A , или ветвь L^H , соответственно.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления вышеизложенного, L^H представляет собой разветвленный гидрофильный линкер, имеющий формулу



где каждый R независимо выбран из группы, включающей из $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$; и каждая из полосок рядом с R^{31} указывает на присоединение к звену D_E , а вертикальная пунктирная линия указывает на присоединение к звену лиганда.

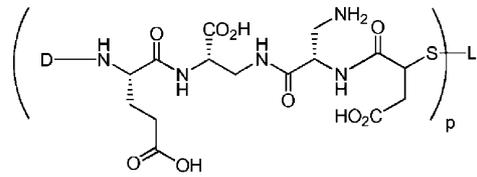
В некоторых дополнительных вариантах осуществления вышеизложенного, L^H представляет собой разветвленный гидрофильный линкер, имеющий формулу



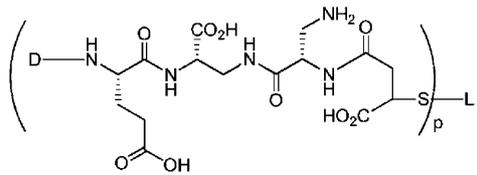
в которой каждая из полос показывает присоединение к звену лекарственного средства, а вертикальная пунктирная линия указывает на присоединение к звену лиганда.

Субъединица L^A описывается более подробно ниже.

Вновь обращаясь к конъюгатам линкер-лиганд-лекарственное средство с формулой I и I', в некоторых других вариантах осуществления конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство имеют формулу, выбранную из



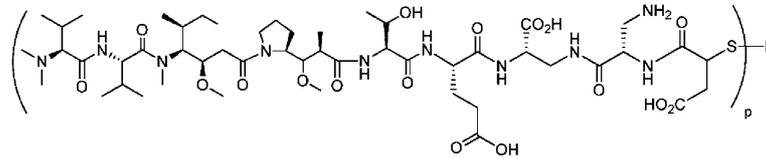
И



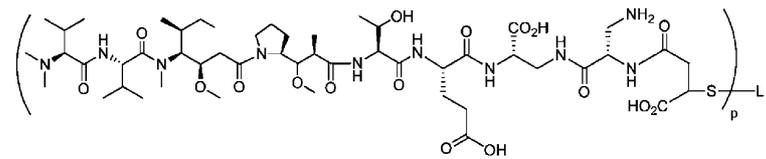
;

где S относится к атому серы лиганда.

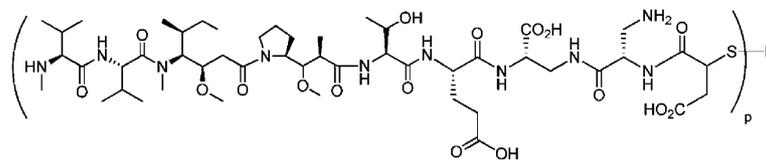
Конкретные варианты осуществления включают в себя следующее:



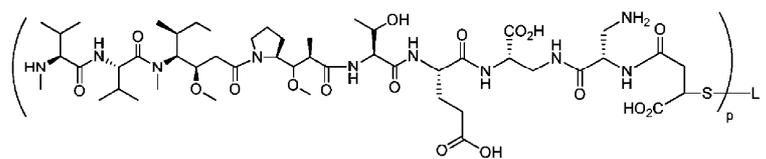
(Ia),



(Ib),



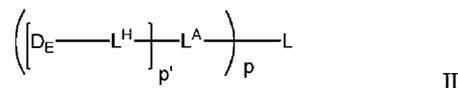
(Ic), II



(Id);

где S относится к атому серы лиганда, или фармацевтически приемлемую соль или сольват этого.

В еще одном аспекте, предоставлены конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство, имеющие следующую формулу



в которой

L представляет собой лиганд, который специфически связывается с мишенью;

L^A является компонентом присоединения лиганда;

L^H представляет собой необязательный гидрофильный линкер, каждая ветвь L^H , имеющая формулу:
 $-AA_1 - R^{L1} - R^{L2} - R^{L3} -$

в которой

AA_1 представляет собой гидрофильную аминокислоту, которая образует отщепляемую связь с D_E ;

R^{L1} является необязательным и выбран из гидрофильной аминокислоты и необязательно замещенного алкилена, который может разделять атом с L^A в присутствии R^{L1} в отсутствии R^{L3} и R^{L3} ;

R^{L2} не является обязательным, и выбран из гидрофильной аминокислоты и необязательно замещенного алкилена, который может разделять атом с L^A в присутствии R^{L2} и отсутствии R^{L3} ; и

R^{L3} не является обязательным, и выбран из гидрофильной аминокислоты и необязательно замещенного алкилена, который может разделять атом с L^A в присутствии R^{L3} ;

L^A является компонентом присоединения лиганда;

индекс p представляет собой целое число в диапазоне от 4 до приблизительно 20;

индекс p' представляет собой целое число от 1 до 4; и

конъюгат лиганд-линкер-лекарственное средство имеет индекс гидрофильности меньше или равный 2; где левая и правая линии L^H указывают на ковалентные присоединения к звену D_E и L^A , соответственно; и

D_E является эффекторной составляющей, как далее описано в настоящем документе.

Различные компоненты конъюгатов лиганд-линкер-лекарственное средство с формулой II предоставлены ниже более подробно.

В некоторых аспектах конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство включают звено лиганда и по меньшей мере четыре звена линкер- D_E , где звено лиганда и каждое из звена(ев) D_E соединены звеном линкера, содержащим совокупность гидрофильных линкеров (L^H). В некоторых других аспектах звенья линкера присоединены к звену лиганда через тиоэфирную связь. В некоторых родственных аспектах, звено линкера дополнительно содержит гидролизованное сукцинимидное кольцо (или янтарную кислоту), непосредственно конъюгированное со звеном лиганда через тиоэфирную связь.

В некоторых аспектах конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство включают звено лиганда и по меньшей мере шесть звеньев линкер- D_E , где звено лиганда и каждое из звена(ев) D_E соединены звеном линкера, содержащим совокупность гидрофильных линкеров (L^H). В некоторых других аспектах звенья линкера присоединены к звену лиганда через тиоэфирную связь. В некоторых родственных аспектах, звено линкера дополнительно содержит гидролизованное сукцинимидное кольцо (или янтарную кислоту), непосредственно конъюгированное со звеном лиганда через тиоэфирную связь.

В некоторых аспектах конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство включают звено лиганда и по меньшей мере восемь звеньев линкер- D_E , где звено лиганда и каждое из звена(ев) D_E соединены звеном линкера, содержащим совокупность гидрофильных линкеров (L^H). В некоторых других аспектах звенья линкера присоединены к звену лиганда через тиоэфирную связь. В некоторых родственных аспектах, звено линкера дополнительно содержит гидролизованное сукцинимидное кольцо (или янтарную кислоту), непосредственно конъюгированное со звеном лиганда через тиоэфирную связь.

В некоторых аспектах конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство включают звено лиганда и по меньшей мере десять звеньев линкер- D_E , где звено лиганда и каждое из звена(ев) D_E соединены звеном линкера, содержащим совокупность гидрофильных линкеров (L^H). В некоторых других аспектах звенья линкера присоединены к звену лиганда через тиоэфирную связь. В некоторых родственных аспектах, звено линкера дополнительно содержит гидролизованное сукцинимидное кольцо (или янтарную кислоту), непосредственно конъюгированное со звеном лиганда через тиоэфирную связь.

В некоторых аспектах конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство включают звено лиганда и по меньшей мере шестнадцать звеньев линкер- D_E , где звено лиганда и каждое из звена(ев) D_E соединены звеном линкера, содержащим совокупность гидрофильных линкеров (L^H). В некоторых других аспектах звенья линкера присоединены к звену лиганда через тиоэфирную связь. В некоторых родственных аспектах, звено линкера дополнительно содержит гидролизованное сукцинимидное кольцо (или янтарную кислоту), непосредственно конъюгированное со звеном лиганда через тиоэфирную связь.

Со ссылкой на звено линкера с формулой II, В некоторых вариантах осуществления L^A ковалентно связан с атомом серы лиганда. В некоторых аспектах, атом серы является таковым остатка цистеина, который образует межцепочечную дисульфидную связь антигена. В другом аспекте, атом серы является таковым остатка цистеина, который был введен в звено лиганда (например, с помощью сайт-

направленного мутагенеза или химической реакции). В других аспектах, атом(ы) серы, к которому L^A присоединены, выбран из остатков цистеина, образующих межцепочечную дисульфидную связь антите-ла и остатков цистеина, которые были введены в звено лиганда (например, сайт-направленным мутагене-зом или химической реакцией).

AA₁ образует расщепляемую связь со звеном D_E. В вариантах осуществления, где AA₁ присоединен к аминокислоте звена D_E, AA₁ образует расщепляемую пептидную связь со звеном D_E. Расщепляемая пептидная связь чувствительна к расщеплению протеазами, когда конъюгат достигает сайта мишени. В других вариантах осуществления AA₁ образует амидную связь с участком присоединения эффекторной составляющей (D_E), которая восприимчива к расщеплению (например, с помощью протеаз), когда конъюгат достигает сайта мишени. В некоторых вариантах осуществления формулы II, AA₁ представляет собой гидрофильную аминокислоту, обычно природную аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из глицина и L форм аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина. В некоторых вариантах осуществления AA₁ является глутаматом.

В вариантах осуществления, где R^{L1} присутствует и представляет собой гидрофильную аминокислоту, он может быть выбран из группы, состоящей из глицина; L- или D-форм аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; -NH-CH(R^a)-CO-; и -NH-CH(COOH)-R^b-; где R^a выбран из -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H и -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; и R^b выбран из -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- и -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-. В некоторых других вариантах осуществления R^{L1} выбран из группы, состоящей из D аминокислот аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; глицина; -NH-CH(R^a)-CO-; и -NH-CH(COOH)-R^b-; где R^a выбран из -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H и -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; и R^b выбран из -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- и -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-.

В вариантах осуществления, где R^{L1} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, он может представлять собой C₁-C₆-алкилен, необязательно замещенный 1-4 заместителями, выбранными из -NH-, -C(O)-, -COOH, -N(C₁-C₃-алкила)-, -NH₂ или -NH(C₁-C₃-алкила). В некоторых вариантах осуществления R^{L1} является этилендиамином, -NH-CH(COOH)-CH₂-NH- или -C(O)-CH(CH₂NH₂)-.

В вариантах осуществления, где R^{L2} присутствует и представляет собой гидрофильную аминокислоту, он может быть выбран из группы, состоящей из глицина; L- или D- форм аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; -NH-CH(R^a)-CO-; и -NH-CH(COOH)-R^b-; где R^a выбран из -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H и -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; и R^b выбран из -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- и -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-.

В некоторых других вариантах осуществления изобретения, когда R^{L2} присутствует, его выбирают из группы, состоящей из D аминокислот аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; глицина; -NH-CH(R^a)-CO-; и -NH-CH(COOH)-R^b-; где R^a выбран из -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H и -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; и R^b выбран из -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- и -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-.

В вариантах осуществления, где R^{L2} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, он может быть C₁-C₆-алкилен, необязательно замещенный 1-4 заместителями, выбранными из -NH-, -C(O)-, -COOH, -N(C₁-C₃-алкила)-, -NH₂ или -NH(C₁-C₃-алкила). В некоторых вариантах осуществления R^{L2} является этилендиамином, -NH-CH(COOH)-CH₂-NH- или -C(O)-CH(CH₂NH₂)-.

В вариантах осуществления, где R^{L3} присутствует, и представляет собой гидрофильную аминокислоту, он может быть выбран из группы, состоящей из глицина; L- или D- форм аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; -NH-CH(R^a)-CO-; и -NH-CH(COOH)-R^b-; где R^a выбран из -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H и -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; и R^b выбран из -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- и -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-.

В некоторых других вариантах осуществления изобретения, когда R^{L3} присутствует, его выбирают из группы, состоящей из D аминокислот аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; глицина; -NH-CH(R^a)-CO-; и -NH-CH(COOH)-R^b-; где R^a выбран из -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H и -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; и R^b выбран из -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- и -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-.

В вариантах осуществления, где R^{L3} присутствует, и представляет собой необязательно замещенный алкилен, он может представлять собой C₁-C₆-алкилен, необязательно замещенный 1-4 заместителя-

ми, выбранными из $-\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{COOH}$, $-\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_3\text{-алкила})-$, $-\text{NH}_2$ или $-\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_3\text{-алкила})$. В некоторых вариантах осуществления $\text{R}^{\text{L}3}$ является этилендиамином, $-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-\text{CH}_2-\text{NH}-$ или $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{CH}_2\text{NH}_2)-$.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 присутствует и $\text{R}^{\text{L}1}$, $\text{R}^{\text{L}2}$ и $\text{R}^{\text{L}3}$ отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 присутствует, $\text{R}^{\text{L}1}$ присутствует и $\text{R}^{\text{L}2}$ и $\text{R}^{\text{L}3}$ отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 присутствует, $\text{R}^{\text{L}1}$ присутствует, $\text{R}^{\text{L}2}$ присутствует и $\text{R}^{\text{L}3}$ отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 присутствует, $\text{R}^{\text{L}1}$ присутствует, $\text{R}^{\text{L}2}$ присутствует и $\text{R}^{\text{L}3}$ присутствует.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления вышеперечисленного AA_1 представляет собой гидрофильную аминокислоту и по меньшей мере один из $\text{R}^{\text{L}1}$, $\text{R}^{\text{L}2}$ и $\text{R}^{\text{L}3}$ присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 является глутаминовой кислотой, и по меньшей мере один из $\text{R}^{\text{L}1}$, $\text{R}^{\text{L}2}$ и $\text{R}^{\text{L}3}$ присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 является глутаминовой кислотой, $\text{R}^{\text{L}1}$ представляет собой гидрофильную аминокислоту и по меньшей мере один из $\text{R}^{\text{L}2}$ и $\text{R}^{\text{L}3}$ присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых других вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 и $\text{R}^{\text{L}1}$ представляют собой гидрофильные аминокислоты и, по меньшей мере, один из $\text{R}^{\text{L}2}$ и $\text{R}^{\text{L}3}$ присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 представляет собой гидрофильную аминокислоту и $\text{R}^{\text{L}1}$ и, необязательно, $\text{R}^{\text{L}2}$ представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

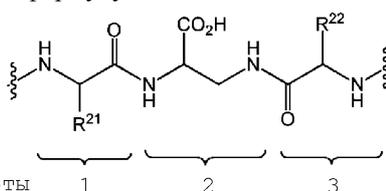
В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного L^{H} не содержит глициновый дипептид ($\text{Gly}-\text{Gly}$), трипептид или тетрапептид. В некоторых вариантах осуществления L^{H} не включает пептидный $\text{Asn}-(\text{D})\text{Lys}$.

В некоторых вариантах осуществления L^{H} включает модифицированный пептид, имеющий от двух до четырех аминокислот. Модифицированный пептид содержит аминокислоту в 1 положении (AA_1), которая выбрана для оптимизации выхода звена D_E (например, протеазное расщепление посредством амидной пептидной связи). В одном или обоих положениях $\text{R}^{\text{L}1}$ и $\text{R}^{\text{L}2}$ находится аминокислота, которая меняет ориентацию типичный N на C связей пептидов и способствует присоединению последней аминокислоты (например, $\text{R}^{\text{L}2}$ или $\text{R}^{\text{L}3}$), которая, до присоединения звена лиганда, включает α -аминогруппу, защищенную как малеимид. Аминокислота, имеющая обращенную N на C связь, присоединяется к следующей группе через свою боковую цепь. В некоторых вариантах осуществления эта аминокислота является альфа-аминокислотой. В других вариантах осуществления, она может представлять собой бета- или гамма-аминокислотой. В некоторых вариантах осуществления боковую цепь выбрана из $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ - и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$.

В некоторых вариантах осуществления L^{H} аминокислота, имеющая обращенную N на C связь ($\text{R}^{\text{L}1}$), присоединена к $\text{R}^{\text{L}2}$ или $\text{R}^{\text{L}3}$, где $\text{R}^{\text{L}2}$ или $\text{R}^{\text{L}3}$ представляет собой гидрофильную аминокислоту или необязательно замещенный алкилен, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных выше.

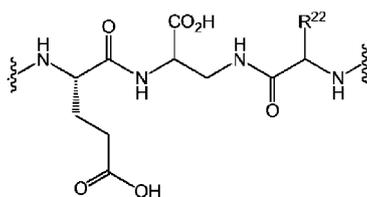
В некоторых вариантах осуществления L^{H} , аминокислота, имеющая обращенную N на C связь ($\text{R}^{\text{L}1}$), присоединена к $\text{R}^{\text{L}2}$, где $\text{R}^{\text{L}2}$ представляет собой необязательно замещенный алкилен, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных выше.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления L^{H} представляет собой гидрофильный, расщепляемый линкер, каждая ветвь имеет формулу



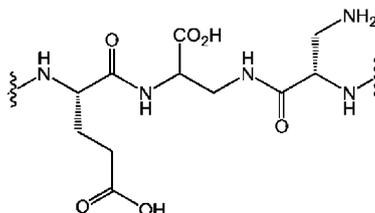
где $\text{R}^{\text{L}1}$ выбран из CH_2NH_2 , $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$; и $\text{R}^{\text{L}2}$ выбран из $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{OH}$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. Волнистые линии слева и справа обозначают присоединения к звену D_E и L^A , или ветви L^{H} , соответственно.

В дополнительных вариантах осуществления L^{H} или его ветвь имеет формулу



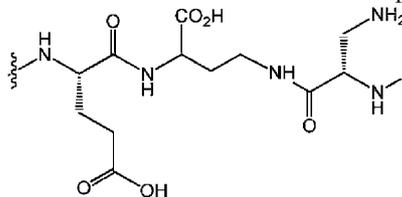
где R^{22} выбран из $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{OH}$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. В некоторых вариантах осуществления R^2 выбран из $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$. Волнистые линии слева и справа обозначают присоединения к звену D_E и L^A , соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



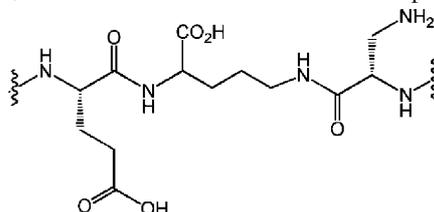
Волнистые линии слева и справа обозначают присоединения к звену D_E и L^A , или ветви L^H , соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



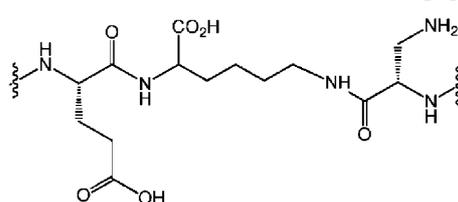
Волнистые линии слева и справа обозначают присоединения к звену D_E и L^A , или ветви L^H , соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



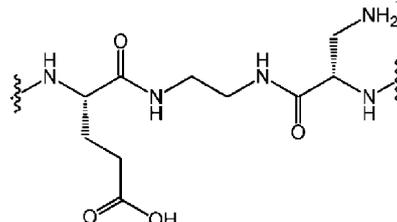
Волнистые линии слева и справа обозначают присоединения к звену D_E и L^A , или ветви L^H , соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



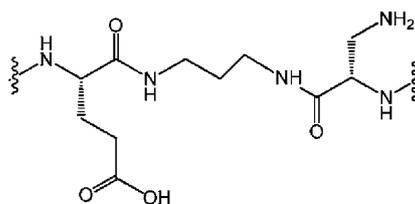
Волнистые линии слева и справа обозначают присоединения к звену D_E и L^A , соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



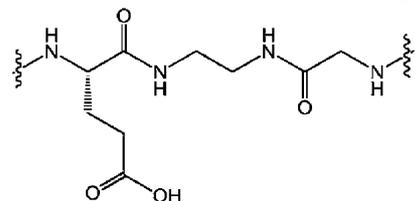
Волнистые линии слева и справа обозначают присоединения к звену D_E и L^A , или ветви L^H , соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



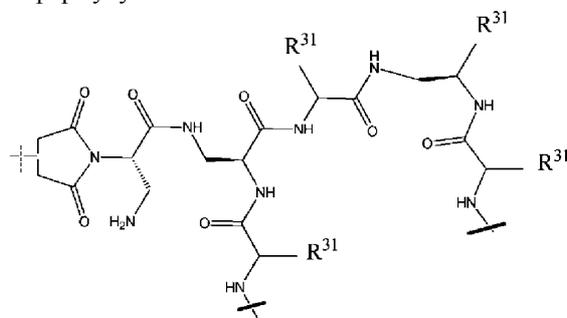
Волнистые линии слева и справа обозначают присоединения к звену D_E и L^A , или ветви L^H , соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



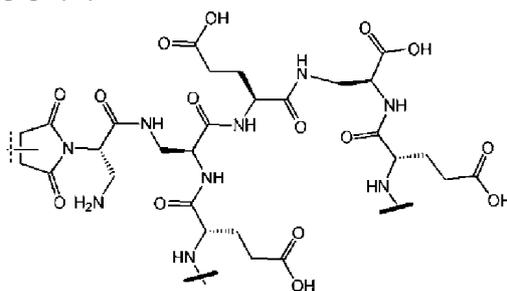
Волнистые линии слева и справа обозначают присоединения к звену D_E и L^A , или ветви L^H , соответственно.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления L^H представляет собой разветвленный гидрофильный линкер, имеющий формулу



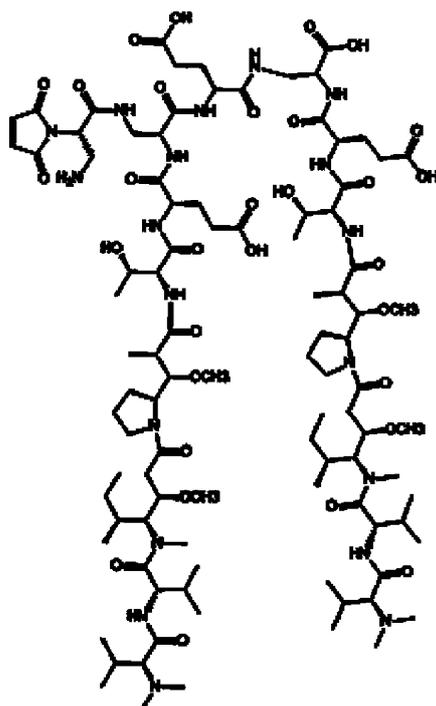
где каждый R^{31} независимо выбран из группы, состоящей из $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2OH$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CO_2H$, $-CH_2CH_2CO_2H$, $-CH_2CH_2CH_2CO_2H$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$; и каждая из полосок, примыкающих к R^{31} , показывает присоединение к звену D_E , и вертикальная пунктирная линия показывает присоединение к звену лиганда.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления L^H представляет собой разветвленный гидрофильный линкер, имеющий формулу

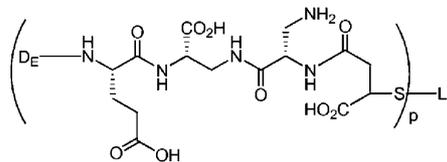
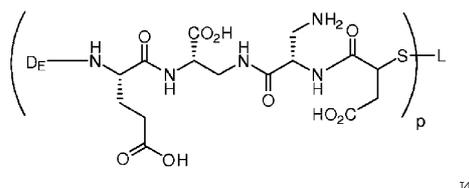


при этом каждая из полосок показывает присоединение к звену D_E , и вертикальная пунктирная линия показывает присоединение к звену лиганда.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления вышеизложенного, разветвленный гидрофильный линкер имеет формулу



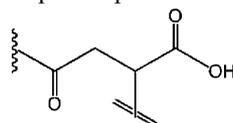
Вновь обращаясь к конъюгатам лиганд-линкер-лекарственное средство с формулой II, в некоторых дополнительных вариантах осуществления конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство имеют формулу, выбранную из



при этом S означает атом серы лиганда.

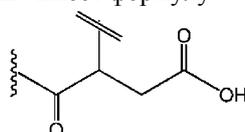
L^A - компонент присоединения лиганда.

Вновь обращаясь к формулам I, Г и II (см. выше), L^A представляет собой компонент присоединения лиганда. В некоторых вариантах осуществления L^A может представлять собой малеимид или гидролизованый малеимид или сукцинимидную группу (показано на фигуре ниже в качестве составляющей янтарной кислоты). В некоторых вариантах осуществления, где L^A присоединен к звену лиганда, он представляет собой гидролизованый малеимид или сукцинимидную группу (показано как составляющая янтарной кислоты). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления L^A имеет формулу



где волнистая линия обозначает точку присоединения к L^A и $\backslash\backslash$ указывает точку присоединения к L, звену лиганда.

В других вариантах осуществления, L^A имеет формулу



где волнистая линия обозначает точку присоединения к L^A и $\backslash\backslash$ указывает точку присоединения к L, звену лиганда.

В контексте настоящего изобретения, в некоторых вариантах осуществления (как показано выше) L^A представляет собой остаток малеимидной группы, используемой для присоединения части лиганда. Конструкция L и L^A позволяет легко добавить звено лиганда, а также предоставление дополнительной карбоксильной группы, которая увеличивает гидрофильность конъюгата лиганд-лекарственное средство. Еще малеимидазот становится α -амином аминокислоты 3 (со ссылкой на L^H).

L - лиганд.

Снова обращаясь к формулам I, I' и II, звено лиганда (L -) представляет собой нацеливающее средство, которое специфически связывается с составляющей-мишенью. Лиганд может специфически связываться с компонентом клетки или другими представляющими интерес молекулами-мишенями. Составляющая мишени, или мишень, обычно находится на поверхности клетки. В некоторых аспектах, звено лиганда действует, чтобы доставить звено Лекарственного средства к конкретной популяции клеток-мишеней, с которой взаимодействует звено лиганда. Лиганды включают, но не ограничиваются этим, белки, полипептиды и пептиды, а также небелковые вещества, такие как углеводы. К подходящим звеньям лиганда относятся, например, антитела, например, полноразмерные (интактные) антитела, а также их антиген-связывающие фрагменты.

В вариантах осуществления, где звено лиганда является отличным от антитела направляемым средством, оно может представлять собой пептид или полипептид, или небелковую молекулу. Примеры таких направляющих средств включают интерферон, лимфокин, гормон, фактор роста и колонии-стимулирующий фактор, витамин, молекулу транспорта питательных веществ (такую как, без ограничения, трансферрин) или любую другую связывающуюся с клеткой молекулу или вещество.

В некоторых вариантах осуществления L^A ковалентно связан с атомом серы лиганда. В некоторых аспектах, атом серы представляет собой таковой остатка цистеина, который образует межцепочечную дисульфидную связь антитела. В другом аспекте, атом серы представляет собой таковой остатка цистеина, который был введен в звено лиганда (например, с помощью сайт направленного мутагенеза или химической реакции). В дополнительных аспектах, атомы серы, присоединяемые к L^A , выбирают из остатков цистеина, которые образуют межцепочечную дисульфидную связь антитела и остатков цистеина, которые были введены в звено лиганда (например, сайт направленным мутагенезом или химической реакцией). В некоторых вариантах осуществления остаток цистеина вводят в Fc-область в положение 239 в соответствии с индексом EU системы нумерации, как у Kabat (Kabat E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, NIH Publication No 91 3242).

В некоторых аспектах, звено лиганда образует связь с малеимидом, находящимся на L^H , через сульфгидрильную группу лиганда, образуя тио-замещенный сукцинимид. Сульфгидрильная группа может присутствовать на лиганде в естественном состоянии лиганда, например природном антителе, или может быть введена в лиганд посредством химической модификации. Гидролиз оставшегося сукцинимидом производит L^A -часть.

В одном аспекте, звено лиганда содержит и один или несколько остатков лизина, которые могут быть химически модифицированы для введения одной или более сульфгидрильных групп. Реагенты, которые могут быть использованы для модификации остатков лизина, включают, но не ограничиваются ими, N-сукцинимидил S-ацетилтиоацетат (SATA) и 2-иминотиолапидрохлорид (реагент Траута).

В другом варианте осуществления звено лиганд может иметь одну или несколько групп углеводов, которые могут быть химически модифицированы, чтобы иметь одну или несколько сульфгидрильных групп.

В другом варианте осуществления сульфгидрильные группы могут быть образованы восстановлением межцепочечных дисульфидов. Соответственно, В некоторых вариантах осуществления звено линкера конъюгировано с остатком цистеина восстановленных межцепочечных дисульфидов.

В другом варианте осуществления сульфгидрильная группа химически введена в антитело, например, путем введения остатка цистеина. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления звено линкера конъюгировано с введенным остатком цистеина.

Полезные неиммуореактивные белковые, полипептидные или пептидные лиганды включают, в качестве неограничивающих примеров, трансферрин, эпидермальный фактор роста ("EGF"), бомбезин, гастрин, гастрин-высвобождающий пептид, тромбоцитарный фактор роста, IL-2, IL-6, трансформирующие факторы роста ("TGF"), такие как TGF- α и TGF- β , фактор роста коровьей оспы ("VGF"), инсулин и инсулиноподобные факторы роста I и II, соматостатин, лектины и апобелок липопотеина низкой плотности.

Особенно предпочтительными лигандами являются антитела. Полезные поликлональные антитела представляют собой гетерогенные популяции молекул антител, полученных из сыворотки иммунизированных животных. Полезные моноклональные антитела представляют собой гомогенной популяции антител к определенной антигенной детерминанте (например, к антигену злокачественной клетки, вирусному антигену, микробному антигену, белку, пептиду, углеводу factor ("VGF"), химическому веществу, нуклеиновой кислоте или фрагментам этого). Моноклональное антитело (mAb) к представляющему интерес антигену можно получить с помощью любого способа, известного в рассматриваемой области техники, который предусматривает производство молекул антител при помощи непрерывных клеточных линий в культуре.

Полезные моноклональные антитела включают, но не ограничиваются этим, моноклональные антитела человека, гуманизированные моноклональные антитела или химерные человек-мышь (или другие виды) моноклональные антитела. Антитела включают полноразмерные антитела и их антиген-связывающие фрагменты. Моноклональные антитела человека могут быть получены с помощью любого из многочисленных способов, известных в рассматриваемой области техники (например, Teng et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:7308-7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72-79; and Olsson et al., 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16).

Антитело может представлять собой антиген-связывающий фрагмент, производное или аналог антитела, которое иммуноспецифически связывается с клетками-мишенями (например, антигенами злокачественных клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами) или другое антитело, связанное с опухолевыми клетками или матриксом. В этой связи, "связывание с антигеном" означает, что фрагмент, производное или аналог способен специфически связываться с составляющей-мишенью. В частности, в типичном варианте осуществления антигенность идиотипа молекулы иммуноглобулина может быть повышена за счет делеции каркасной и CDR последовательностей, которые находятся С-конца от CDR-последовательности, которая специфически распознает антиген. Чтобы определить, какие CDR последовательности связывают антиген, синтетические пептиды, содержащие CDR-последовательности, могут быть использованы в анализах связывания антигена при помощи любого способа анализа связывания, известного в данной области (например, анализ BIA core) (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 антиген-связывающие фрагменты антител, такие как, в качестве неограничивающих примеров, F(ab')₂-фрагменты, Fab-фрагменты, Fvs, одноцепочечные антитела, диатела, тритела, тетратела, scFv, scFv-FV или любые другие молекулы, полученные из антитела и имеющие ту же специфичность, что и антитело.

Кроме того, рекомбинантные антитела, такие как химерные и гуманизированные моноклональные антитела, включающие части как относящиеся к человеку, так и не относящиеся к человеку, которые могут быть выполнены с использованием стандартных способов рекомбинантной ДНК, являются полезными антителами. Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой различные части являются производными от различных видов животных, таких, как, например, имеющие вариабельную область, полученную из константных областей мышиноного моноклонального и иммуноглобулина человека. (см., например, патент США № 4,816,567; и патент США № 4,816,397, которые включены в настоящий документ ссылкой во всей их полноте). Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител от видов, отличных от человека, животных, имеющие один или более гипервариабельных участков (CDR) от видов, отличных от человека, и каркасную область, полученную из молекулы иммуноглобулина человека. (См., например, патент США № 5,585,089, который включен в настоящий документ ссылкой во всей своей полноте.) Такие химерные и гуманизированные моноклональные антитела могут быть получены способами рекомбинантной ДНК, известными в рассматриваемой области техники, например, используя способы, описанные в Международной публикации № WO 87/02671; Европейской патентной публикации № 0184187; Европейской патентной публикации № 0171496; Европейской патентной публикации № 0173494; Международной публикации № WO 86/01533; патенте США № 4,816,567; Европейской патентной публикации № 012 023; Berter et al., 1988, Science 240:1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Cancer. Res. 47:999-1005; Wood et al., 1985, Nature 314:446-449; and Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; U.S. Patent No. 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; каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Полностью человеческие антитела являются особенно желательными и могут быть получены с использованием трансгенных мышей, которые не способны экспрессировать гены вариабельных областей тяжелых и легких цепей эндогенного иммуноглобулина, но которые могут экспрессировать гены вариабельных областей тяжелых и легких цепей человека.

Антитела могут иметь модификации (например, замены, делеции и/или добавления) в аминокислотных остатках, которые взаимодействуют с Fc-рецепторами. В частности, антитела могут иметь модификации аминокислотных остатков, идентифицированных участвующие во взаимодействии между анти-Fc доменом и FcRn-рецептором (см., например, международную публикацию № WO 97/34631, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Антитела также могут иметь модификации аминокислотных остатков, идентифицированных как участвующие во взаимодействии между анти-Fc доменом и Fc гамма рецептором III.

Антитела, иммуноспецифические для антигена злокачественной клетки, могут быть получены коммерчески путем или произведены любым способом, известным специалистам в рассматриваемой области техники, как, например, способы химического синтеза или рекомбинантной экспрессии.

Последовательность нуклеотидов, кодирующих антитела, иммуноспецифические для антигена зло-

качественной клетки, может быть получена, например, из базы данных GenBank или базы данных, подобной этой, в литературных публикациях или рутинным клонированием и секвенированием.

В конкретном варианте осуществления можно использовать антитело для лечения злокачественного новообразования. Антитела, иммуноспецифичные для антигена злокачественной клетки, могут быть получены коммерческим путем или произведены любым способом, известным специалистам в рассматриваемой области техники, как, например, способами рекомбинантной экспрессии. Последовательность нуклеотидов, кодирующих антитела, иммуноспецифичные для антигена злокачественной клетки, может быть получена, например, из базы данных GenBank или базы данных, подобной этой, в литературных публикациях или рутинным клонированием и секвенированием.

В другом конкретном варианте осуществления, используются антитела для лечения аутоиммунных заболеваний в соответствии с композициями и способами по изобретению. Антитела, иммуноспецифичные для антигена клеток, которая отвечает за выработку аутоиммунных антител, могут быть получены из какой-либо организации (например, научного сотрудника университета или компании) или произведены любым способом, известным специалистам в рассматриваемой области техники, как, например, способами химического синтеза или рекомбинантной экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления полезные антитела могут связываться с рецептором или рецепторным комплексом. Рецептор или рецепторный комплекс может содержать, например, член надсемейства генов иммуноглобулинов, член надсемейства TNF-рецепторов, интегрин, рецептор цитокина, рецептор хемокина, основной белок гистосовместимости, лектин или контрольный белок комплемента.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизованное антитело CD70 (см., например, US 2009/0148942), гуманизованное антитело CD19 (см., например, US 2009/0136526), химерное или гуманизованное антитело CD30 (см., например, US 2010/0239571), гуманизованное антитело CD33 (US 2013/0309223), гуманизованное антитело Beta6 (см., например, WO 2013/123152) или гуманизованное антитело Liv-1 (см., например, US 2013/0259860).

Нагрузка лекарственного средства - "р".

Снова обращаясь в общем к конъюгатам лиганд-линкер-лекарственное средство с формулами I, I' и II, число звеньев лекарственное средство-линкер на лиганд представлено как r . (В этом контексте, лекарственное средство в лекарственное средство-линкер может представлять собой цитотоксическое средство.) В вариантах осуществления, в которых линкеры не являются разветвленными, r представляет собой число молекул лекарственное средство-линкер на лиганд (например, антитело). При рассмотрении отдельных конъюгатов, r представляет собой целое число, представляющее число молекул лекарственное средство-линкер на лиганд. При рассмотрении композиции, содержащей несколько конъюгатов, r представляет собой среднее число лекарственное средство-линкеры в лиганд (или в вариантах осуществления, в которых линкеры не являются разветвленными, среднее число молекул лекарственное средство-линкер на лиганд (например, антитела)). Переменная r находится в пределах диапазона от 4 до 20, обычно от 6 до 12, от 8 до 12 или от 8 до 16, или до 20.

Среднее число звеньев лекарственное средство-линкер на звено лиганда в препарате от реакции конъюгации может быть охарактеризовано с помощью обычных средств, таких как масс-спектрометрия, иммуноферментный анализ ELISA, HIC и ВЭЖХ. Количественное распределение конъюгатов лиганд-линкер-лекарственное средство в понятиях r также может быть определено. В некоторых случаях разделение, очистка и характеристика гомогенных конъюгатов лиганд-лекарственное средство, где r представляет собой определенный показатель конъюгата лиганд-лекарственное средство с другими лекарственными нагрузками, можно достичь с помощью таких средств, как обращенно фазовая ВЭЖХ или электрофорез.

Анализ активности.

Существует целый ряд различных анализов, которые могут быть использованы для определения того, оказывает ли конъюгат лиганд-лекарственное средство цитотоксический эффект на клеточную линию. В одном примере для определения того, оказывает ли конъюгат лиганд-лекарственное средство цитотоксический эффект на клеточную линию, используется анализ включения тимидина. Например, клетки с плотностью 5000 клеток/лунку 96-луночного планшета культивируют в течение 72-часового периода и подвергают воздействию 0,5 мКи ^3H -тимидина в течение заключительных 8 ч 72-часового периода, и включение ^3H -тимидина в клетки культуры измеряется в присутствии и в отсутствие конъюгата лиганд-лекарственное средство. Конъюгат лиганд-лекарственное средство оказывает цитотоксическое действие на клетки, если клетки культуры уменьшают включение ^3H -тимидина по сравнению с аналогичными клетками, культивируемыми в тех же условиях, но не контактировавшими с конъюгатом лиганд-лекарственное средство.

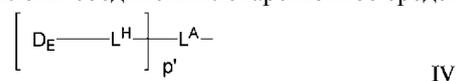
(См. также Klussman et al., *Bioconjugate Chemistry* 15: 765-773 (2004); Doronina et al., *Bioconjugate Chemistry* 17:114-124 (2006)).

В другом примере, для определения того, оказывает ли конъюгат лиганд-лекарственное средство цитотоксическое действие на клеточную линию, клеточную жизнеспособность определяли путем определения в клетке поглощения красителя, например, нейтрального красного, трипанового синего или AL-AMAR™ blue (см., например, Page et al., 1993, *Intl. J. of Oncology* 3:473-476). В таком анализе, клетки инкубируют в средах, содержащих краситель, клетки промывают, и остающийся краситель, отражающий

клеточное поглощение красителя, измеряется спектрофотометрически. Белок-связывающий краситель сульфорохамин В (SRB) также может быть использован для измерения цитотоксичности (Skehan et al., 1990, J. Nat'l Cancer Inst. 82:1107-12). Предпочтительные конъюгаты лиганд-лекарственное средство включают таковые со значением IC_{50} (определяется как концентрация mAb, которая приводит к 50% гибели клеток) менее 1000 нг/мл, предпочтительно менее 500 нг/мл, более предпочтительно, менее 100 нг/мл, даже наиболее предпочтительно, менее 50 или даже менее 10 нг/мл в клеточной линии.

Соединения лекарственное средство-линкер.

В другом аспекте предоставлены соединения лекарственное средство-линкер, имеющие формулу



или фармацевтически приемлемая соль или сольват этого, где:

L^A представляет собой компоненту присоединения лиганда; L^H представляет собой необязательно разветвленный гидрофильный линкер, каждая ветвь L^H имеет формулу



в которой

AA_1 представляет собой гидрофильную аминокислоту, которая образует расщепляемую пептидную связь с С-концом звена D_E , к которому она присоединена;

R^{L1} является необязательным, и представляет собой гидрофильную аминокислоту или необязательно замещенный алкилен, который может разделять атом с L^A в присутствии R^{L1} и отсутствии R^{L2} и R^{L3} ;

R^{L2} не является обязательным, и выбран из гидрофильной аминокислоты и необязательно замещенного алкилена, который может разделять атом с L^A в присутствии R^{L2} и отсутствии R^{L3} ; и

R^{L3} не является обязательным, и выбран из гидрофильной аминокислоты и необязательно замещенного алкилена, который может разделять атом с L^A в присутствии R^{L3} ;

индекс p' представляет собой целое число от 1 до 4; и

D_E представляет собой эффекторную составляющую (как описано в настоящем документе);

при этом конъюгат лиганд-линкер-лекарственное средство, образованный с лекарственное средство-линкерами, имеет индекс гидрофильности менее чем или равный 2; и

при этом левая и правая линии L^H показывают ковалентные присоединения к звену D_E и L^A , соответственно.

В родственном аспекте IV' предоставлены соединения лекарственное средство-линкер, имеющие следующую формулу



или фармацевтически приемлемая соль или сольват этого, где:

L^A представляет собой компоненту присоединения лиганда;

L^H представляет собой необязательно разветвленный гидрофильный линкер, имеющий формулу:



в которой

AA_1 представляет собой гидрофильную аминокислоту, которая образует расщепляемую пептидную связь с С-концом звена D_E , к которому она присоединена;

R^{L1} представляет собой гидрофильную аминокислоту или необязательно замещенный алкилен, который может разделять атом с L^A в отсутствии R^{L2} и R^{L3} ;

R^{L2} не является обязательным, и выбран из гидрофильной аминокислоты и необязательно замещенного алкилена, который может разделять атом с L^A в присутствии R^{L2} и отсутствии R^{L3} ; и

R^{L3} не является обязательным, и выбран из гидрофильной аминокислоты и необязательно замещенного алкилена, который может разделять атом с L^A в присутствии R^{L3} ;

L^A представляет собой компоненту присоединения лиганда;

индекс p' представляет собой целое число от 1 до 4; и

D_E представляет собой эффекторную составляющую (как описано в настоящем документе);

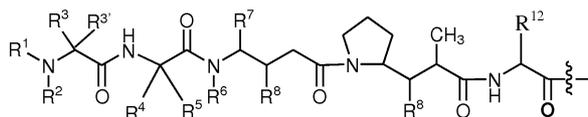
при этом конъюгат лиганд-линкер-лекарственное средство, образованный с лекарственное средство-линкерами, имеет индекс гидрофильности менее чем или равный 2; и

при этом левая и правая линии L^H показывают ковалентные присоединения к звену D_E и L^A , соответственно.

Различные компоненты конъюгатов лиганд-линкер-лекарственное средство с формулами IV и IV' приводятся более подробно ниже.

Звено лекарственного средства, D_E .

Обращаясь к формулам IV и IV', звено лекарственного средства, D_E , является эффекторной составляющей, имеющей формулу



в которой

каждый из R^1 и R^2 независимо выбран из группы, состоящей из водорода (H) и необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила; при условии, что оба R^1 и R^2 не являются H, за исключением того, что оба из R^3 и R^3' не являются H;

R^3 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила;

R^3' выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила и по меньшей мере один из R^3 и R^3' не является H;

R^4 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила;

R^5 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила;

или R^4 и R^5 совместно образуют карбоциклическое кольцо и имеют формулу $-(CR^aR^b)_n-$, в которой R^a и R^b независимо выбраны из группы, включающей H и необязательно замещенный $-C_1-C_8$ -алкил и n выбран из группы, состоящей из 2, 3, 4, 5 и 6;

R^6 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила;

R^7 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила;

каждый R^8 независимо выбран из группы, состоящей из H, $-OH$, необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила и необязательно замещенного $-O-(C_1-C_8$ -алкила);

R^{12} выбран из H, необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила, необязательно замещенного арила, необязательно замещенного $-X^1$ арила, необязательно замещенного $-C_3-C_8$ -карбоцикла, необязательно замещенного $-X^1-(C_3-C_8$ -карбоцикла), необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкилена- NH_2 , необязательно замещенного C_3-C_8 -гетероцикла и необязательно замещенного $-X^1-(C_3-C_8$ -гетероцикла); и

каждый X^1 независимо представляет собой $-C_1-C_{10}$ -алкилен.

В некоторых родственных вариантах осуществления, R^{12} не является боковой цепью фенилаланина и пролина. В некоторых родственных вариантах осуществления, R^{12} не является боковой цепью фенилаланина, метионина, триптофана или пролина.

В некоторых вариантах осуществления R^{12} выбран из боковых цепей природных L-аминокислот (кроме пролина) и глицина. В некоторых дополнительных вариантах осуществления R^{12} выбран из боковых цепей природных L-аминокислот, кроме пролина, глицина или фенилаланина. В некоторых дополнительных вариантах осуществления R^{12} выбран из боковых цепей природных L-аминокислот, кроме пролина, глицина, триптофана, метионина и фенилаланина.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления R^{12} выбран из боковых цепей группы гидрофильных аминокислот, состоящей из треонина, серина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, гомосерина, гидроксивалина, фурилаланина, треонин (PO_3H_2), пирозолилаланина, триазолилаланина и триазолилаланина.

В некоторых вариантах осуществления R^{12} является боковой цепью треонина.

Звено линкера.

Обращаясь к звену линкера с формулами IV и IV, в некоторых вариантах осуществления L^A ковалентно связан с атомом серы лиганда. В некоторых аспектах, атом серы представляет собой таковой остаток цистеина, который образует межцепочечную дисульфидную связь антитела. В другом аспекте, атом серы представляет собой таковой остаток цистеина, который был введен в звено лиганда (например, с помощью сайт направленного мутагенеза или химической реакции). В дополнительных аспектах, атомы серы, к которым L^A присоединяют, выбирают из остатков цистеина, образующих межцепочечную дисульфидную связь антитела и остатков цистеина, которые были введены в звено лиганда (например, путем сайт направленного мутагенеза или химической реакции).

AA_1 образует расщепляемую связь с эффекторной составляющей, D_E , такой как звено лекарственного средства. В вариантах осуществления, где AA_1 присоединен к аминокислоте из D_E , AA_1 образует расщепляемую пептидную связь с D_E . Расщепляемая пептидная связь подвержена расщеплению протеаз, когда конъюгата достигает своей сайта-мишени. В других вариантах осуществления AA_1 формирует амидную связь с участком присоединения эффекторной составляющей, которая подвержена расщеплению (например, протеазами), когда конъюгат достигает своего сайта-мишени. В некоторых вариантах осуществления AA_1 представляет собой гидрофильную аминокислоту, как правило, природную аминокислоту, которая выбрана из группы, состоящей из глицина и L-форм аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина. В некоторых вариантах осуществления AA_1 представляет собой глутаминовую кислоту.

В вариантах осуществления, где R^{L1} присутствует и является гидрофильной аминокислотой, он может быть выбран из группы, состоящей из глицина; L или D форм аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; $-NH-CH(R^a)-CO-$; и $-NH-CH(COOH)-R^b-$; где R^a выбран из $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CH_2CH_2CO_2H$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$; и R^b выбран из $-CH_2NH-$, $-CH_2CH_2NH-$,

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенного AA_1 и R^{L1} представляют собой гидрофильную аминокислоту и, по меньшей мере, один из R^{L2} и R^{L3} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеприведенного AA_1 и представляют собой гидрофильную аминокислоту и R^{L1} и необязательно R^{L2} представляют собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

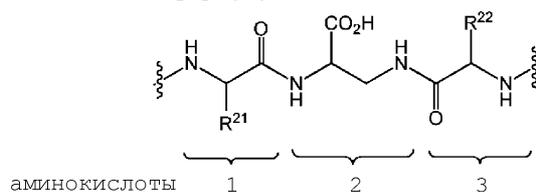
В некоторых вариантах осуществления вышеприведенного L^H не содержит глициновый дипептид (Gly-Gly), трипептид или тетрапептид. В некоторых вариантах осуществления L^H не включает пептид Asn - (D)Lys.

В некоторых вариантах осуществления L^H включает модифицированный пептид, имеющий от двух до четырех аминокислот. Модифицированный пептид содержит аминокислоту в положении 1 (AA_1), которая выбрана для оптимизации выхода звена D_E (например, протеазное расщепление через амидную пептидную связь). В одном или обоих из положений R^{L1} и R^{L2} представляет собой аминокислоту, которая меняет ориентацию типичных N на C связи пептидов и способствует присоединению последнего аминокислоты (например, R^{L2} или R^{L3}), которая, перед присоединением звена лиганда, включает α -аминогруппу, защищенную как малеимид. Аминокислота, имеющая обращенную N на C связь, присоединяется к следующей группе через свою боковую цепь. В некоторых вариантах осуществления эта аминокислота является альфа-аминокислотой. В других вариантах осуществления, она может представлять собой бета- или гамма-аминокислоту. В некоторых из этих вариантов осуществления, боковая цепь выбрана из $-CH_2NH_2$ -, $-CH_2CH_2NH_2$ -, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$ - и $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ -.

В некоторых вариантах осуществления L^H , аминокислота, имеющая обращенную N на C связь (R^{L1}), присоединена к R^{L2} или R^{L3} , где R^{L2} или R^{L3} представляет собой гидрофильную аминокислоту или необязательно замещенный алкилен, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных выше.

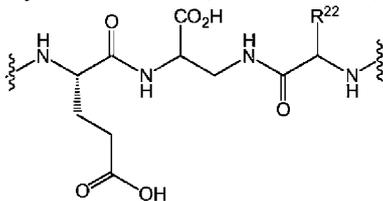
В некоторых вариантах осуществления L^H , аминокислота, имеющая обращенную N на C связь (R^{L1}) присоединена к R^{L2} , где R^{L2} представляет собой необязательно замещенный алкилен, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных выше.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления, L^H представляет собой гидрофильный, расщепляемый линкер, каждая ветвь имеет формулу



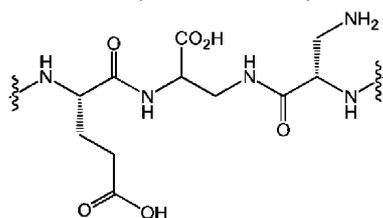
где R^{21} выбран из CH_2NH_2 , $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2OH$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CO_2H$, $-CH_2CH_2CO_2H$, $-CH_2CH_2CH_2CO_2H$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$, и R^{22} выбран из $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2OH$ и $-CH_2CH_2OH$. Волнистые линии слева и справа показывают присоединения к звену D_E и L^A , соответственно.

В дополнительных вариантах осуществления L^H , или его ветвь, имеет формулу



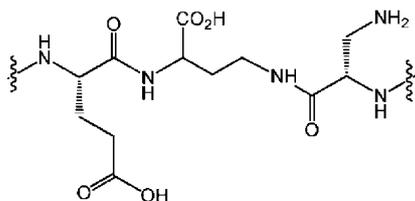
где R^{22} выбран из $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2OH$ и $-CH_2CH_2OH$. В некоторых вариантах осуществления R^{22} выбран из $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$. Волнистые линии слева и справа показывают присоединения к звену D_E и L^A , соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H , или его ветвь, имеет формулу

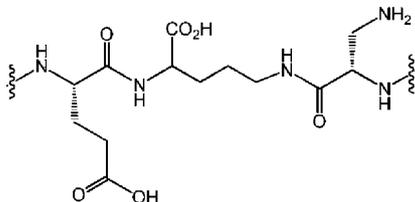


Волнистые линии слева и справа показывают присоединения к звену D_E и L^A , соответственно.

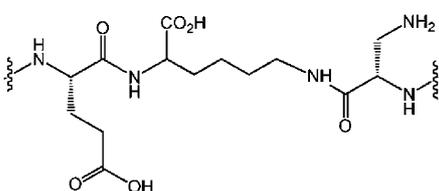
В некоторых вариантах осуществления L^H , или его ветвь, имеет формулу



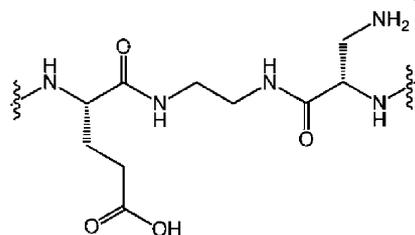
Волнистые линии слева и справа показывают присоединения к звену D_E и L^A , соответственно. В некоторых вариантах осуществления L^H , или его ветвь, имеет формулу



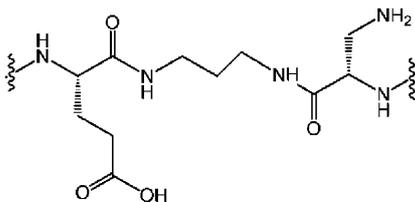
Волнистые линии слева и справа показывают присоединения к звену D_E и L^A , соответственно. В некоторых вариантах осуществления L^H , или его ветвь, имеет формулу



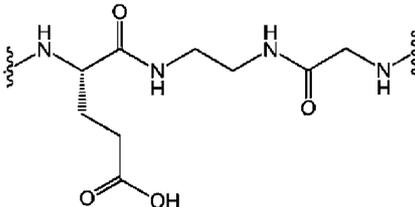
Волнистые линии слева и справа показывают присоединения к звену D_E и L^A , соответственно. В некоторых вариантах осуществления L^H , или его ветвь, имеет формулу



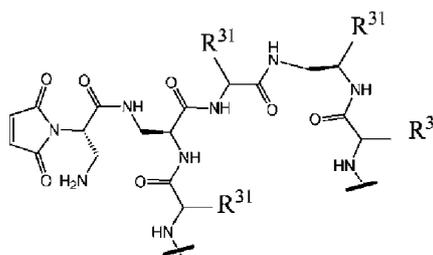
Волнистые линии слева и справа показывают присоединения к звену D_E и L^A , соответственно. В некоторых вариантах осуществления L^H , или его ветвь, имеет формулу



Волнистые линии слева и справа показывают присоединения к звену D_E и L^A , соответственно. В некоторых вариантах осуществления L^H , или его ветвь, имеет формулу

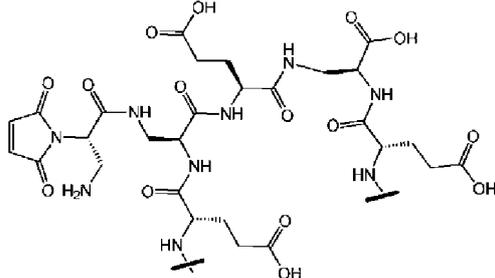


Волнистые линии слева и справа показывают присоединения к звену D_E и L^A , соответственно. В некоторых дополнительных вариантах осуществления вышеизложенного, L^H представляет собой разветвленный гидрофильный линкер, имеющий формулу



при этом каждый R^{31} независимо выбран из группы, состоящей из $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$; и каждая из полосок показывает сайт присоединения к звену D_E .

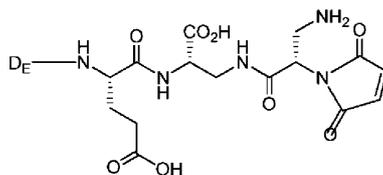
В некоторых дополнительных вариантах осуществления вышеизложенного, L^H представляет собой разветвленный гидрофильный линкер, имеющий формулу



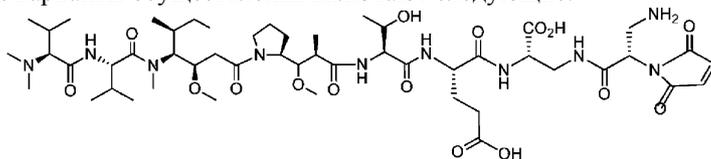
при этом каждая из полосок показывает сайт присоединения к звену D_E .

L^A -субъединица описана более подробно выше.

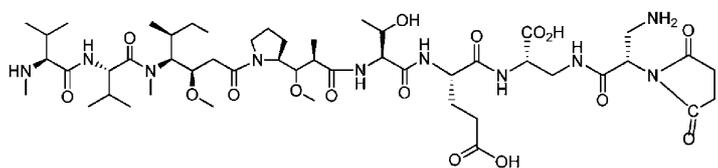
Снова обращаясь к конъюгатам лекарственное средство-линкер с формулами IV и IV', в некоторых дополнительных вариантах осуществления лекарственное средство-линкеры имеют формулу, выбранную из



Специфические варианты осуществления включают следующие:



(IVa), и



или фармацевтически приемлемую соль или сольват этого.

Линкеры.

В другом аспекте, предоставлены гидрофильные линкеры, имеющие формулу



где L представляет собой обязательно разветвленный гидрофильный линкер, имеющий формулу



L^A является компонентом присоединения лиганда; и

p' представляет собой целое число от 1 до 4; и линии слева и справа от L^H показывают сайты присоединения звена D_E и L^A , соответственно;

или фармацевтически приемлемую соль или сольват этого. Обращаясь к формуле VII, в некоторых вариантах осуществления L^A ковалентно связан с атомом серы лиганда. L^A может представлять собой, например, малеимид или сукцимид, подходящий для присоединения к атому серы.

AA_1 может образовывать расщепляемую связь с эффекторной составляющей D_E , например, звеном лекарственного средства. В вариантах осуществления, где AA_1 присоединен к аминокислоте из D_E , AA_1

образует расщепляемую пептидную связь с D_E. Расщепляемая пептидная связь подвержена расщеплению протеазами, когда конъюгат достигает своего сайта-мишени. В других вариантах осуществления AA₁ формирует амидную связь с участком присоединения эффекторной составляющей, которая подвержена расщеплению (например, протеазами), когда конъюгата достигает своего сайта-мишени. В некоторых вариантах осуществления, AA₁ представляет собой гидрофильную аминокислоту, как правило, природную аминокислоту, которая выбрана из группы, состоящей из глицина и L форм аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина. В некоторых вариантах осуществления AA₁ представляет собой глутаминовую кислоту.

В вариантах осуществления, где R^{L1} присутствует и является гидрофильной аминокислотой, он может быть выбран из группы, состоящей из глицина; L и D форм из аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; -NH-CH(R^a)-CO-; и -NH-CH(COOH)-R^b-; где R^a выбран из -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H и -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; и R^b выбран из -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- и -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-. В некоторых дополнительных вариантах осуществления R^{L1} выбран из группы, состоящей из D аминокислоты аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; глицина; -NH-CH(R^a)-CO-; и -NH-CH(COOH)-R^b-; где R^a выбран из -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H и -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; и R^b выбран из -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- и -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-.

В вариантах осуществления, где R^{L1} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, он может представлять собой C₁-C₆-алкилен, необязательно замещенный 1-4 заместителями, выбранными из -NH-, -C(O)-, -COOH, -N(C₁-C₃-алкила)-, -NH₂ или -NH(C₁-C₃-алкила). В некоторых вариантах осуществления R^{L1} является этилендиамином, -NH-CH(COOH)-CH₂-NH- или -C(O)-CH(CH₂NH₂)-.

В вариантах осуществления, где R^{L2} существует и является гидрофильная аминокислота, он может быть выбран из группы, состоящей из глицина; L и D формы аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; -NH-CH(R^a)-CO-; и -NH-CH(COOH)-R^b-; где R^a выбран из -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H и -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; и R^b выбран из -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- и -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, если R^{L2} присутствует, он выбран из группы, состоящей из D аминокислот аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; глицина; -NH-CH(R^a)-CO-; и -NH-CH(COOH)-R^b-; где R^a выбран из -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H и -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; и R^b выбран из -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- и -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-.

В вариантах осуществления, где R^{L2} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, он может представлять собой C₁-C₆-алкилен, необязательно замещенный 1-4 заместителями, выбранными из -NH-, -C(O)-, -COOH, -N(C₁-C₃-алкила)-, -NH₂ или -NH(C₁-C₃-алкила). В некоторых вариантах осуществления R^{L2} является этилендиамином, -NH-CH(COOH)-CH₂-NH-или -C(O)-CH(CH₂NH₂)-.

В вариантах осуществления, где R^{L3} присутствует и представляет собой гидрофильную аминокислоту, он может быть выбран из группы, состоящей из глицина; L и D форм аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; -NH-CH(R^a)-CO-; и -NH-CH(COOH)-R^b-; где R^a выбран из -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H и -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; и R^b выбран из -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- и -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления, где R^{L3} присутствует, он выбран из группы, состоящей из D аминокислоты аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; глицина; -NH-CH(R^a)-CO-; и -NH-CH(COOH)-R^b-; где R^a выбран из -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CO₂H и -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; и R^b выбран из -CH₂NH-, -CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂CH₂CH₂NH-, -CH₂CH₂C(O)-, -CH₂CH₂CH₂C(O)- и -CH₂CH₂CH₂CH₂C(O)-.

В вариантах осуществления, где R^{L3} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, он может представлять собой C₁-C₆-алкилен, необязательно замещенный 1-4 заместителями, выбранными из -NH-, -C(O)-, -COOH, -N(C₁-C₃-алкила)-, -NH₂ или -NH(C₁-C₃-алкила). В некоторых вариантах осуществления R^{L3} представляет собой этилендиамин, -NH-CH(COOH)-CH₂-NH- или -C(O)-CH(CH₂NH₂)-.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA₁ присутствует и R^{L1}, R^{L2} и R^{L3} отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA₁ присутствует, R^{L1} присутствует и R^{L2} и R^{L3} отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA₁ присутствует, R^{L1} присутствует, R^{L2} присутствует и R^{L3} отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA₁ присутствует, R^{L1} присутствует, R^{L2} присутствует и R^{L3} присутствует.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA₁ представляет собой гидрофильную аминокислоту и по меньшей мере один из R^{L1}, R^{L2} и R^{L3} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA₁ представляет собой глутаминовую кислоту и по меньшей мере один из R^{L1}, R^{L2} и R^{L3} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA₁ представляет собой глутаминовую кислоту, R^{L1} представляет собой гидрофильную аминокислоту и по меньшей мере один из R^{L2} и R^{L3} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA₁ и R^{L1} представляют собой гидрофильные аминокислоты и по меньшей мере один из R^{L2} и R^{L3} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA₁ представляет собой гидрофильной аминокислотой и R^{L1} и необязательно R^{L2} представляют собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

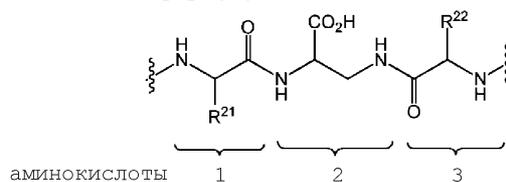
В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного L^H не содержит глициновый дипептид (Gly-Gly), трипептид или тетрапептид. В некоторых вариантах осуществления L^H не включает пептид Asn - (D)Lys.

В некоторых вариантах осуществления L^H включает модифицированный пептид, имеющий от двух до четырех аминокислот. Модифицированный пептид содержит аминокислоту в положении 1 (AA₁), которая выбрана для оптимизации выхода звена D_E (например, расщепление протеазами через амидную пептидную связь). В одном или обоих положениях R^{L1} и R^{L2} представляет собой аминокислоту, которая меняет ориентацию типичных N связей пептидов на C и способствует присоединению последней аминокислоты (например, R^{L2} или R^{L3}), которая, до присоединения звена лиганда, включает α-аминогруппу, защищенную как малеимид. Аминокислота, имеющие обращенную N на C связь, присоединяется к следующей группе через свою боковой цепи. В некоторых вариантах осуществления эта аминокислота является альфа-аминокислотой. В других вариантах осуществления, она может представлять собой бета- или гамма-аминокислоту. В некоторых из этих вариантов осуществления, боковая цепь выбрана из -CH₂NH₂-, -CH₂CH₂NH₂-, -CH₂CH₂CH₂NH₂- и -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-.

В некоторых вариантах осуществления L^H, аминокислота, имеющей обращенную N на C связь (R^{L1}), присоединена к R^{L2} или R^{L3}, где R^{L2} и R^{L3} представляет собой гидрофильную аминокислоту или необязательно замещенный алкилен, по любому из вариантов осуществления, описанных выше.

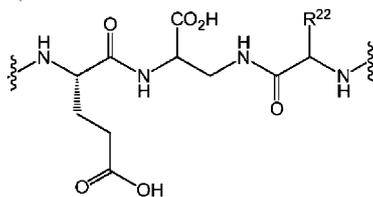
В некоторых вариантах осуществления L^H, аминокислота, имеющей обращенную N на C связь (R^{L1}), присоединена к R^{L2}, где R^{L2} представляет собой гидрофильную аминокислоту или необязательно замещенный алкилен, по любому из вариантов осуществления, описанных выше.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления L^H представляет собой гидрофильный, расщепляемый линкер, каждая ветвь имеет формулу



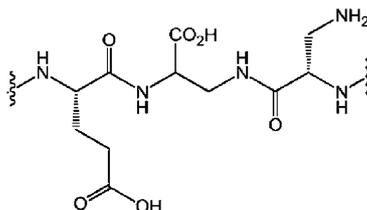
где R²¹ выбран из CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂CO₂H, -CH₂CH₂CO₂H, -CH₂CH₂CH₂CO₂H и -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; и R²² выбран из -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂OH и -CH₂CH₂OH. Волнистые линии слева и справа показывают сайты присоединения к звену D_E и L^A, соответственно.

В последующих вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



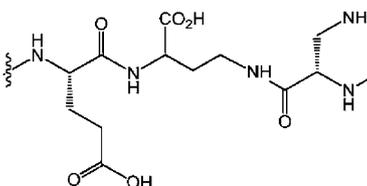
где R²² выбран из CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂OH и -CH₂CH₂OH. В некоторых вариантах осуществления R²² выбран из -CH₂NH₂ и -CH₂CH₂NH₂. Волнистые линии слева и справа показывают сайты присоединения к звену D_E и L^A, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



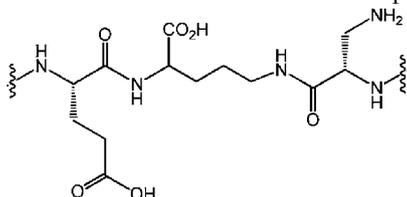
Волнистые линии слева и справа показывают сайты присоединения к звену D_E и L^A, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



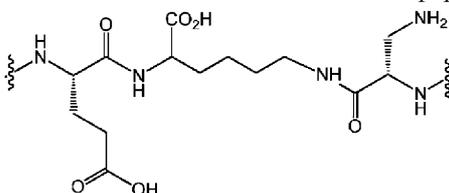
Волнистые линии слева и справа показывают сайты присоединения к звену D_E и L^A, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



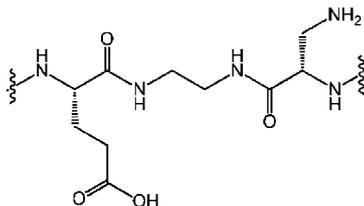
Волнистые линии слева и справа показывают сайты присоединения к звену D_E и L^A, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



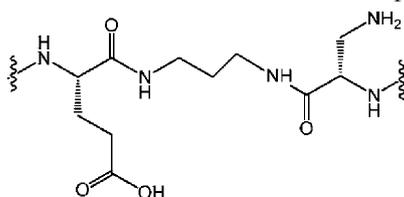
Волнистые линии слева и справа показывают сайты присоединения к звену D_E и L^A, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



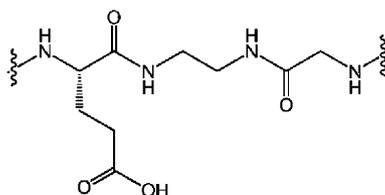
Волнистые линии слева и справа показывают сайты присоединения к звену D_E и L^A, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



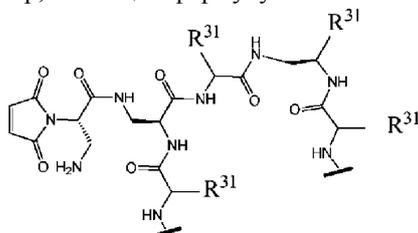
Волнистые линии слева и справа показывают сайты присоединения к звену D_E и L^A, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



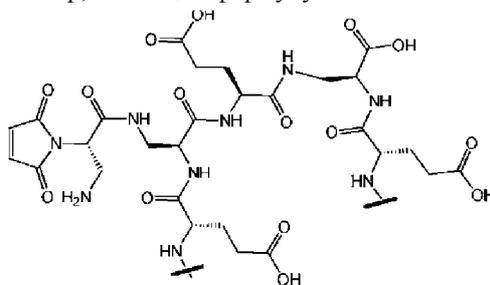
Волнистые линии слева и справа показывают сайты присоединения к звену D_E и L^A, соответственно.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления вышеизложенного, L^H представляет собой разветвленный гидрофильный линкер, имеющий формулу



при этом каждый R³¹ независимо выбран из группы, состоящей из -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂CO₂H, -CH₂CH₂CO₂H, -CH₂CH₂CH₂CO₂H и -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; и каждая из полосок показывает сайт присоединения к звену D_E.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления вышеизложенного, L^H представляет собой разветвленный гидрофильный линкер, имеющий формулу



при этом каждая из полосок показывает сайт присоединения к звену D_E и вертикальная пунктирная линия обозначает сайт присоединения для звена лиганда.

L^A-субъединица описывается более подробно в этом документе.

В каждом из вариантов осуществления, продемонстрированном выше, каждая из аминной, гидроксильной и карбоксильной групп необязательно находятся в защищенной форме. Подходящие защитные группы представлены, например, в Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, J. Wiley & Sonsand, и их обычно выбирают так, чтобы удалять независимо друг от друга.

Конъюгаты линкер-лиганд.

В еще одном аспекте предоставлены конъюгаты линкер-лиганд, имеющие формулу, выбранную из



или фармацевтически приемлемой соли или сольвата этого;

при этом:

L представляет собой лиганд, который специфически связывается с мишенью;

L^H представляет собой необязательно разветвленный гидрофильный линкер, каждая ветвь L^H имеет формулу



L^A представляет собой компоненту присоединения лиганда;

нижний индекс p представляет собой целое число от примерно 4 до 20; и

нижний индекс p' представляет собой целое число от 1 до 4;

при этом левая и правая линии L^H указывают сайты присоединения к звену D_E и L^A, соответственно.

AA₁ могут образовывать расщепляемую связь с эффекторной составляющей D_E, например звеном лекарственного средства. В вариантах осуществления, где AA₁ присоединен к аминокислоте из D_E, AA₁ образует расщепляемую пептидную связь с D_E. Расщепляемая пептидная связь подвержена расщеплению протеазами, когда конъюгат достигает своего сайта-мишени. В других вариантах осуществления AA₁ формирует амидную связь с участком присоединения эффекторной составляющей, которая подвержена расщеплению (например, протеазами), когда конъюгата достигает своего сайта-мишени. В некоторых вариантах осуществления AA₁ представляет собой гидрофильную аминокислоту, как правило, природную аминокислоту, которая выбрана из группы, состоящей из глицина и L форм аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина. В некоторых вариантах осуществления AA₁ представляет собой глутаминовую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления L^A ковалентно связан с атомом серы лиганда. L^A может представлять собой, например, малеимид или сукцимимид, подходящий для присоединения к атому серы.

В вариантах осуществления, где R^{L1} присутствует и является гидрофильная аминокислота, он может быть выбран из группы, состоящей из глицина; L и D форм аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; $-NH-CH(R^a)-CO-$; и $-NH-CH(COOH)-R^b-$; где R^a выбран из $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CH_2CH_2CO_2H$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$; и R^b выбран из $-CH_2NH-$, $-CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2C(O)-$, $-CH_2CH_2CH_2C(O)-$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)-$. В некоторых дополнительных вариантах осуществления R^{L1} выбран из группы, состоящей из D аминокислот аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; глицина; $-NH-CH(R^a)-CO-$; и $-NH-CH(COOH)-R^b-$; где R^a выбран из $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CH_2CH_2CO_2H$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$; и R^b выбран из $-CH_2NH-$, $-CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2C(O)-$, $-CH_2CH_2CH_2C(O)-$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)-$.

В вариантах осуществления, где R^{L1} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, он может представлять собой C_1-C_6 -алкилен, необязательно замещенный 1-4 заместителями, выбранными из $-NH-$, $-C(O)-$, $-COOH$, $-N(C_1-C_3\text{-алкила})-$, $-NH_2$ или $-NH(C_1-C_3\text{-алкила})$. В некоторых вариантах осуществления R^{L1} представляет собой этилендиамин, $-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-$ или $-C(O)-CH(CH_2NH_2)-$.

В вариантах осуществления, где R^{L2} существует и является гидрофильной аминокислотой, он может быть выбран из группы, состоящей из глицина; L и D форм аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; $-NH-CH(R^a)-CO-$; и $-NH-CH(COOH)-R^b-$; где R^a выбран из $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CH_2CH_2CO_2H$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$; и R^b выбран из $-CH_2NH-$, $-CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2C(O)-$, $-CH_2CH_2CH_2C(O)-$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)-$.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления, когда R^{L2} присутствует, он выбран из группы, состоящей из D аминокислот аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; глицина; $-NH-CH(R^a)-CO-$; и $-NH-CH(COOH)-R^b-$; где R^a выбран из $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CH_2CH_2CO_2H$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$; и R^b выбран из $-CH_2NH-$, $-CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2C(O)-$, $-CH_2CH_2CH_2C(O)-$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)-$.

В вариантах осуществления, где R^{L2} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, он может представлять собой C_1-C_6 -алкилен, необязательно замещенный 1-4 заместителями, выбранными из $-NH-$, $-C(O)-$, $-COOH$, $-N(C_1-C_3\text{-алкила})-$, $-NH_2$ или $-NH(C_1-C_3\text{-алкила})$. В некоторых вариантах осуществления R^{L2} представляет собой этилендиамин, $-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-$ или $-C(O)-CH(CH_2NH_2)-$.

В вариантах осуществления, где R^{L2} присутствует и является гидрофильной аминокислотой, он может быть выбран из группы, состоящей из глицина; L или D форм аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; $-NH-CH(R^a)-CO-$; и $-NH-CH(COOH)-R^b-$; где R^a выбран из $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CH_2CH_2CO_2H$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$; и R^b выбран из $-CH_2NH-$, $-CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2C(O)-$, $-CH_2CH_2CH_2C(O)-$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)-$. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, где R^{L3} присутствует, он выбран из группы, состоящей из D аминокислот аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, аспарагина, глутамина, гистидина, лизина, аргинина, серина и аланина; глицина; $-NH-CH(R^a)-CO-$; и $-NH-CH(COOH)-R^b-$; где R^a выбран из $-CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CH_2CH_2CO_2H$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$; и R^b выбран из $-CH_2NH-$, $-CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH-$, $-CH_2CH_2C(O)-$, $-CH_2CH_2CH_2C(O)-$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2C(O)-$.

В вариантах осуществления, где R^{L3} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, он может представлять собой C_1-C_6 -алкилен, необязательно замещенный 1-4 заместителями, выбранными из $-NH-$, $-C(O)-$, $-COOH$, $-N(C_1-C_3\text{-алкила})-$, $-NH_2$ или $-NH(C_1-C_3\text{-алкила})$. В некоторых вариантах осуществления R^{L3} представляет собой этилендиамин, $-NH-CH(COOH)-CH_2-NH-$ или $-C(O)-CH(CH_2NH_2)-$. В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 присутствует, а R^{L1} , R^{L2} и R^{L3} отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 присутствует и R^{L1} , R^{L2} и R^{L3} отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 присутствует, а R^{L1} присутствует, а R^{L2} и R^{L3} отсутствуют.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 присутствует, R^{L1} присутствует, R^{L2} присутствует и R^{L3} отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 присутствует, R^{L1} присутствует, R^{L2} присутствует и R^{L3} присутствует.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 представляет собой гидрофильную аминокислоту и по меньшей мере один из R^{L1} , R^{L2} и R^{L3} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 представляет собой глутаминовую кислоту и по меньшей мере один из R^{L1} , R^{L2} и R^{L3} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 представляет собой глутаминовую кислоту, R^{L1} представляет собой гидрофильную аминокислоту и по меньшей мере один из R^{L2} и R^{L3} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 и R^{L1} представляют собой гидрофильные аминокислоты и по меньшей мере один из R^{L2} и R^{L3} присутствует и представляет собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного AA_1 представляет собой гидрофильную аминокислоту и R^{L1} и необязательно R^{L2} представляют собой необязательно замещенный алкилен, как указано выше.

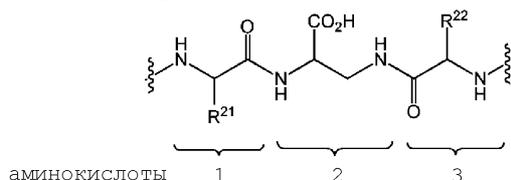
В некоторых вариантах осуществления вышеизложенного L^H не содержит глициновый дипептид (Gly-Gly), трипептид или тетрапептид. В некоторых вариантах осуществления L^H не включает пептид Asn - (D)Lys.

В некоторых вариантах осуществления, L^H включает модифицированный пептид, имеющий от двух до четырех аминокислот. Модифицированный пептид содержит аминокислоту в положении 1 (AA_1), выбранную для оптимизации высвобождения звена D_E (например, протеазным расщеплением через амидную пептидную связь). В одном или обоих из положений R^{L1} и R^{L2} представляет собой аминокислоту, которая меняет ориентацию типичных связей пептидов N на C и способствует присоединению последней аминокислоты (например, R^{L2} или R^{L3}), которая, до присоединения звена лиганда, включает α -аминогруппу, защищенную как малеимид. Аминокислота, имеющая обращенную N на C связь, присоединяется к следующей группе через свою боковую цепь. В некоторых вариантах осуществления эта аминокислота является альфа-аминокислотой. В других вариантах осуществления, она может представлять собой бета- или гамма-аминокислоту. В некоторых из этих вариантов осуществления, боковая цепь выбрана из $-CH_2NH_2$ -, $-CH_2CH_2NH_2$ -, $CH_2CH_2CH_2NH_2$ - и $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ -.

В некоторых вариантах осуществления L^H аминокислота, имеющая обращенную N на C связь (R^{L1}) присоединена к R^{L2} или R^{L3} , где R^{L2} или R^{L3} представляет собой гидрофильную аминокислоту или необязательно замещенный алкилен, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных выше.

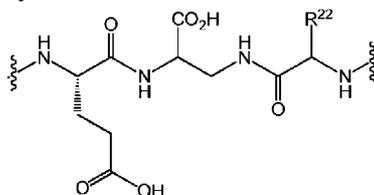
В некоторых вариантах осуществления L^H аминокислота, имеющая обращенную N на C связь, (R^{L1}) присоединена к R^{L2} , где R^{L2} представляет собой необязательно замещенный алкилен, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных выше.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления, L^H представляет собой гидрофильный, расщепляемый линкер, каждая ветвь имеет формулу



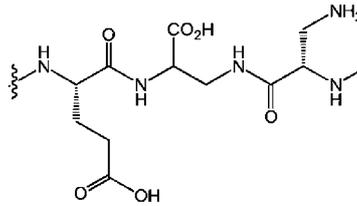
в которой R^{21} выбран из CH_2NH_2 -, $-CH_2CH_2NH_2$ -, $-CH_2OH$ -, $-CH_2CH_2OH$ -, $-CH_2CO_2H$ -, $-CH_2CH_2CO_2H$ -, $-CH_2CH_2CH_2CO_2H$ и $-CH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$; и R^{22} выбран из $-CH_2NH_2$ -, $-CH_2CH_2NH_2$ -, $-CH_2OH$ и $-CH_2CH_2OH$. Левая и правая волнистые линии указывают присоединение к звену D_E и L^A , или ветви L^H , соответственно.

В дополнительных вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу

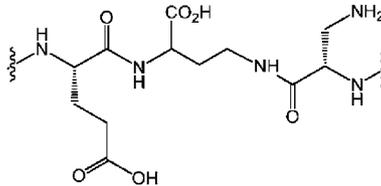


в которой R^{22} выбран из $-CH_2NH_2$ -, $-CH_2CH_2NH_2$ -, $-CH_2OH$ и $-CH_2CH_2OH$. В некоторых вариантах осуществления R^{22} выбран из $-CH_2NH_2$ и $-CH_2CH_2NH_2$. Левая и правая волнистые линии указывают присоединение к звену D_E и L^A , или ветви L^H , соответственно.

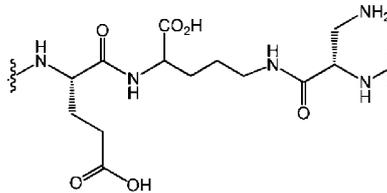
В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



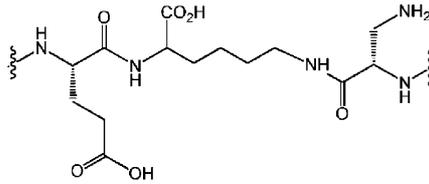
Волнистые линии слева и справа указывают положения звена D_E и L^A , соответственно.
В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



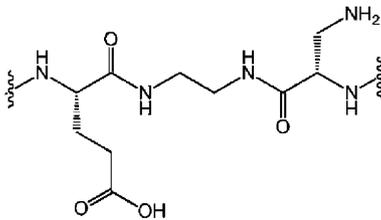
Волнистые линии слева и справа указывают положения звена D_E и L^A , соответственно.
В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



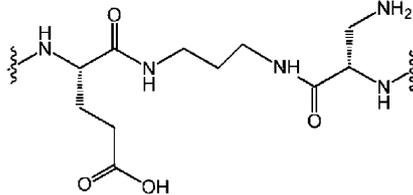
Волнистые линии слева и справа указывают положения звена D_E и L^A , соответственно.
В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



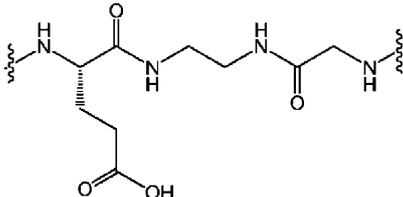
Волнистые линии слева и справа указывают положения звена D_E и L^A , соответственно.
В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



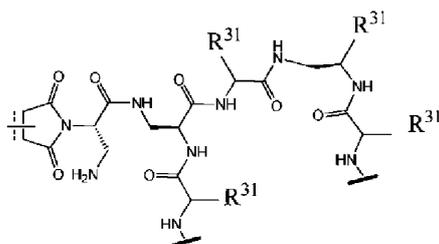
Волнистые линии слева и справа указывают положения звена D_E и L^A , соответственно.
В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу



Волнистые линии слева и справа указывают положения звена D_E и L^A , соответственно.
В некоторых вариантах осуществления L^H или его ветвь имеет формулу

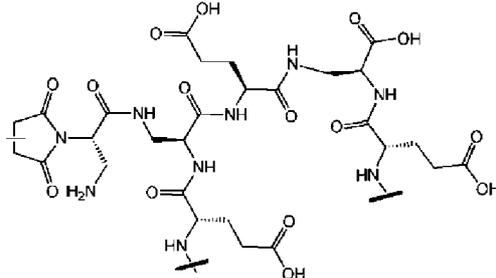


Волнистые линии слева и справа указывают положения звена D_E и L^A , соответственно.
В некоторых дополнительных вариантах осуществления вышеизложенного, L^H представляет собой разветвленный гидрофильный линкер, имеющий формулу



где каждый R^{31} независимо выбран из группы, состоящей из $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$; и каждая из полосок показывает присоединение к звену D_E , и вертикальная пунктирная линия показывает сайт присоединения к звену лиганда.

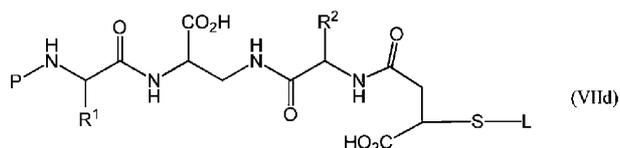
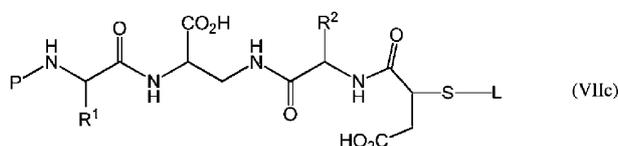
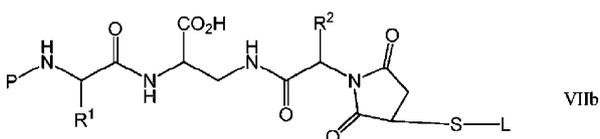
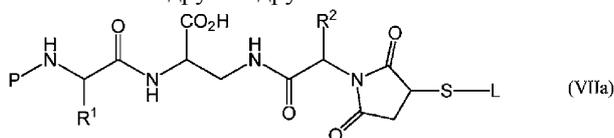
В некоторых дополнительных вариантах осуществления вышеизложенного L^H представляет собой разветвленный гидрофильный линкер, имеющий формулу



при этом каждая из полосок показывает присоединение к звену D_E и вертикальная пунктирная линия обозначает сайт присоединения для звену лиганда.

L^A - субъединица описана более подробно выше.

В каждом из вариантов осуществления, представленных выше, каждая из аминных, гидроксильных и карбоксильных групп необязательно находится в защищенной форме. Подходящие защитные группы представлены в Greene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, J. Wiley & Sons и обычно выбираются так, чтобы удаляться независимо друг от друга.



где P является H или защитной группой, и каждая из оставшихся функциональных групп, присутствующие в R^1 , R^2 , показанных карбоновых кислотах, являются необязательно защищенными и S представляет собой атом серы лиганда.

Лечение заболеваний.

Также приведены способы лечения заболеваний с помощью конъюгатов лиганд-линкер-лекарственное средство с любой из формул, описанных в данном документе. Заболевание может представлять собой, например, злокачественное новообразование или аутоиммунное заболевание. Конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство вводят в терапевтически эффективном количестве и по терапев-

тически эффективной схеме. В некоторых аспектах, доза конъюгата составляет равную или меньше, чем у сопоставимого двукратно нагруженного конъюгата. В некоторых аспектах, доза конъюгата составляет равную или меньше, чем у сопоставимого четырехкратно нагруженного конъюгата. В некоторых аспектах, доза конъюгата составляет равную или меньше, чем у сопоставимого двукратно нагруженного конъюгата, в то время как схема дозирования такая же, или более редкая. В некоторых аспектах, доза конъюгата составляет равную или меньше, чем у сопоставимого четырехкратно нагруженного конъюгата, в то время как схема дозирования такая же, или более редкая. В некоторых дополнительных аспектах, дозу конъюгата больше и схема дозирования такая же или реже, чем у сопоставимого двукратно нагруженного конъюгата. В некоторых дополнительных аспектах, доза конъюгата меньше и схема дозирования такая же, или более редкая, чем у сопоставимого четырехкратно нагруженного конъюгата. Компаративный конъюгат может представлять собой, например, тот же конъюгат лиганд-лекарственное средство-линкер, имеющий нагрузку лекарственного средства 2 или 4.

Лечение злокачественного новообразования.

Конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство являются полезными для ингибирования размножения опухолевых клеток или раковых клеток, вызывая апоптоз в опухолевых или раковых клетках, или для лечения злокачественного новообразования у пациента. Конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство могут быть использованы, соответственно, в различных условиях для лечения злокачественных новообразований. Конъюгаты лиганд-лекарственное средство могут быть использованы для доставки лекарственного средства к опухолевым клеткам или другим раковым клеткам. Не будучи связанными теорией, в одном варианте осуществления звено лиганда конъюгата лиганд-линкер-лекарственное средство специфически связывается с мишенью (например, антигеном раковых клеток), и конъюгат лиганд-лекарственное средство может быть поглощен (интернализирован) внутрь опухолевой клетки или раковой клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза и другого механизма интернализации. Антиген может быть присоединен к опухолевой клетке или раковой клетке или может быть белком внеклеточного матрикса, связанным с опухолевой клеткой или раковой клеткой. Попав внутрь клетки, лекарственное средство (цитостатическое средство) высвобождается в клетке. В альтернативном варианте осуществления, лекарственное средство или звено лекарственного средства отщепляется от конъюгата лиганд-линкер-лекарственное средство вне опухолевой клетки или раковой клетки, и лекарственное средство или звено лекарственного средства впоследствии проникает в клетку.

Конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство могут обеспечивать конъюгация-специфическое лекарственное нацеливание на опухоль или злокачественное новообразование, тем самым уменьшая общую токсичность препарата (если назначают отдельно).

В одном варианте осуществления звено лиганда специфически связывается с опухолевой клетки или раковой клетки. В другом варианте осуществления звено лиганда специфически связывается с антигеном опухолевой клетки или раковой клетки, который находится на поверхности опухолевой клетки или раковой клетки.

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

Специфичность звена лиганда для конкретной опухолевой клетки или раковой клетки может быть важным для определения тех опухолей или злокачественных новообразований, которые наиболее эффективно поддаются лечению.

Конкретные виды злокачественных новообразований, которые можно лечить с помощью конъюгатов лиганд-линкер-лекарственное средство, включают, но не ограничиваются ими, солидные опухоли (например, почечно-клеточный рак, рак печени и рак кожи) и злокачественные новообразования крови (например, острый миелобластный лейкоз (AML), хронический миелоцитарный лейкоз (CML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и множественная миелома). Можно лечить острые и хронические лейкозы и лимфомы (такие как лимфома Ходжкина и неходжкинские лимфомы).

Злокачественные новообразования, включая, в качестве неограничивающих примеров, опухоль, метастазы или другое заболевание или расстройство, характеризующееся неконтролируемым ростом клеток, можно лечить или подавлять введением конъюгатов лиганд-линкер-лекарственное средство.

В других вариантах осуществления, предоставлены способы лечения злокачественного новообразования, включающие введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества конъюгата лиганд-лекарственное средство и химиотерапевтического средства. В одном варианте осуществления, химиотерапевтическое средство представляет собой таковое, при лечении которым злокачественного новообразования не обнаруживается, что злокачественное новообразование является рефракторный. В другом варианте осуществления, химиотерапевтическое средство представляет собой таковое, при лечении которым злокачественного новообразования обнаруживается, что злокачественное новообразование является рефракторный. Конъюгаты лиганд-лекарственное средство можно вводить пациенту, который также перенес операцию в качестве лечения рака.

В некоторых вариантах осуществления пациент также получает дополнительное лечение, такое как лучевая терапия. В конкретном варианте осуществления лиганд-лекарственное средство конъюгат назна-

чают одновременно с химиотерапевтическим средством или с лучевой терапией. В другом конкретном варианте осуществления химиотерапевтическое средство или лучевую терапию применяют до или после введения конъюгата лиганд-лекарственное средство.

Химиотерапевтическое средство можно вводить в течение ряда сессий или в качестве однократной дозы. Можно вводить любое из или комбинацию химиотерапевтических средств, например, стандартное из лечебных химиотерапевтических средств(ва).

Кроме того, предоставляются способы лечения злокачественного новообразования конъюгатом лиганд-лекарственное средство как альтернатива химиотерапии или лучевой терапии, где химиотерапия или лучевая терапия оказалась или могут оказаться слишком токсичными, например приводят к неприемлемым или непереносимым побочным эффектам для индивидуума, подлежащего лечению. Подлежащий лечению пациента можно, по желанию, лечить с помощью другого противоракового лечения, такого как хирургия, лучевая терапия или химиотерапия, в зависимости от того, какое лечение является приемлемым или переносимым.

Лечение аутоиммунных заболеваний.

Конъюгаты лиганд-лекарственное средство полезны для уничтожения или ингибирования репликации клетки(ок), которая вызывает или вовлечена в аутоиммунное заболевание, или для лечения аутоиммунного заболевания. Конъюгаты лиганд-лекарственное средство могут быть использованы соответственно в самых разных условиях для лечения аутоиммунного заболевания у пациента. Конъюгаты лиганд-лекарственное средство могут быть использованы для доставки лекарств в клетки-мишени. Не будучи связанными теорией, в одном варианте осуществления конъюгат лиганд-лекарственное средство специфически связывается с антигеном на поверхности клетки-мишени, и конъюгат лиганд-линкер-лекарственное средство затем попадает внутрь клетки-мишени посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза или другого механизма интернализации. Оказавшись внутри клетки, звено лекарственного средства высвобождается. Высвободившееся звено лекарственного средства затем свободно для перемещения в цитозоле и стимулирования цитотоксических или цитостатических активностей. В альтернативном варианте осуществления лекарственное средство отщепляется от конъюгата лиганд-лекарственное средство снаружи клетки-мишени, и лекарственное средство или звено лекарственного средства впоследствии проникает в клетку.

В одном варианте осуществления звено лиганда связывается с аутоиммунным антигеном. В одном аспекте, антиген находится на поверхности клетки, участвующей в аутоиммунном состоянии.

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

В одном варианте осуществления звено лиганда связывается с активированными лимфоцитами, которые связаны с состоянием аутоиммунного заболевания.

В дополнительном варианте осуществления конъюгат лиганд-лекарственное средство убивает или подавляет размножение клеток, которые производят аутоиммунные антитела, связанные с определенным аутоиммунным заболеванием.

Конкретные виды аутоиммунных заболеваний, которые можно лечить конъюгатами лиганда с лекарственным средством, включают, в качестве неограничивающих примеров, нарушения, связанные с Th2-лимфоцитами (например, atopический дерматит, atopическая бронхиальная астма, риноконъюнктивит, аллергический ринит, синдром Оменна, системная склеродермия и реакция трансплантат против хозяина); расстройства, связанные с Th1-лимфоцитами (напр., ревматоидный артрит, рассеянный склероз, псориаз, синдром Сьергрена, тиреодит Хашимото, диффузный токсический зоб, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера и туберкулез); заболевания, связанные с активированными В лимфоцитами (например, системная красная волчанка, синдром Гудпасчера, ревматоидный артрит и диабет I типа).

Также раскрыты способы лечения аутоиммунного заболевания, в том числе введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества конъюгата лиганд-линкер-лекарственное средство и другого терапевтического средства для лечения, как известно, аутоиммунного заболевания.

Лечение инфекционных заболеваний.

Конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство полезны для уничтожения или ингибирования размножения клетки, которая вызывает инфекционное заболевание, или для лечения инфекционного заболевания. Конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство могут быть использованы, соответственно, в различных условиях для лечения инфекционного заболевания у пациента. Конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство могут быть использованы для доставки лекарственного средства (например, антибиотика) к клетке-мишени. В одном варианте осуществления звено лиганда связывается с клеткой инфекционного заболевания.

В одном варианте осуществления конъюгаты уничтожают или ингибируют размножение клеток, которые вызывают конкретное инфекционное заболевание.

Раскрыты способы лечения инфекционных заболеваний, в том числе введение пациенту, нуждающемуся в этом, конъюгата лиганд-линкер-лекарственное средство и другого терапевтического средства, которое является средством против возбудителя заболевания.

Композиции и способы введения.

Настоящее изобретение также предусматривает фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство, описанные в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство могут находиться в любой форме, которая позволяет вводить соединение пациенту для лечения расстройства, связанного с экспрессией антигена, с которым звено лиганда специфически связывается. Например, конъюгаты могут быть в форме жидкости или твердого тела. Предпочтительным способом введения является парентеральный. Парентеральное введение включает подкожные, внутривенные, внутримышечные, надчревные методики инъекции или инфузии. В одном аспекте, композиции вводят парентерально. В другом аспекте соединения вводят внутривенно.

Фармацевтические композиции конъюгатов лиганд-линкер-лекарственное средство могут быть сформулированы таким образом, чтобы дать возможность соединению быть биодоступным при введении конъюгата пациенту. Композиции могут иметь форму одной или более единиц дозирования, когда, например, флакон может представлять собой одну единицу дозы.

Материалы, используемые при подготовке фармацевтических композиций, могут быть нетоксичными при используемых количествах. Для специалиста в данной области является очевидным, что оптимальная дозировка активного ингредиента(ов) в фармацевтической композиции будет зависеть от множества факторов. Соответствующие факторы включают, без ограничения, тип животного (например, человек), конкретную форму соединения, способ введения и применяемую композицию.

Фармацевтические композиции могут быть, например, в виде жидкости. Жидкость может быть полезна для доставки путем инъекции. В композиции для введения путем инъекции или внутривенного введения также может быть включено одно или более поверхностно-активное вещество, консервант, смачивающее средство, диспергирующее средство, суспендирующее средство, буфер, стабилизатор и/или изотоническое средство.

Жидкие композиции, будь то растворы, суспензии или иной формы, могут также включать один или более из следующего: стерильные разбавители, такие как вода для инъекции, солевой раствор, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как аминокислоты, соли или эфиры уксусной кислоты, соли или эфиры лимонной кислоты или соли или эфиры фосфорной кислоты; детергенты, такие как неионные поверхностно-активные вещества, полиолы; и средства для регулирования тонуса, такие как хлорид натрия или декстроза. Композиция для парентерального введения может быть заключена в ампулу, одноразовый шприц или одно- или многодозовый флакон из стекла, пластика или другого материала. Физиологический раствор является типичным адьювантом.

Инъекционная композиция предпочтительно является стерильной.

Количество конъюгата, которое является эффективным в лечении конкретного нарушения или состояния, будет зависеть от природы нарушения или состояния и может быть определено с помощью стандартных клинических способов. Кроме того, *in vitro* или *in vivo* анализы могут быть использованы для определения оптимальных диапазонов доз. Точная доза, предназначенная для использования в фармацевтической композиции, будет зависеть от способа введения и тяжести заболевания или расстройства, и решение должно быть принято в соответствии с решением практикующего врача и обстоятельствами каждого пациента.

Композиции содержат количество соединения, такое, чтобы получить подходящую дозировку. Как правило, это количество составляет, по меньшей мере, примерно 0,01% соединения от массы композиции.

Для внутривенного введения, композиция может содержать от примерно 0,01 до примерно 10 мг конъюгата лиганд-линкер-лекарственное средство на кг массы тела животного. В одном аспекте, композиция может содержать от примерно 0,01 до примерно 10 мг лиганда-лекарственное средство конъюгата на кг массы тела животного. В другом аспекте количество вводимого препарата будет находиться в диапазоне от примерно 0,1 до примерно 7,5 мг соединения/кг массы тела.

Как правило, дозировка соединения, вводимого пациенту обычно составляет от примерно 0,01 мг/кг до примерно 10 мг/кг массы тела индивидуума. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет от примерно 0,01 мг/кг до примерно 7,5 мг/кг массы тела индивидуума. В неких вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет от примерно 0,1 мг/кг и 5 мг/кг массы тела индивидуума. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет от примерно 0,1 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг массы тела индивидуума. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза составляет от примерно 0,1 мг/кг до примерно 3 мг/кг или примерно 0,1 мг/кг до примерно 2 мг/кг массы тела индивидуума. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза составляет от примерно 0,5 мг/кг до примерно 5 мг/кг массы тела индивидуума. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза составляет от примерно 1 мг/кг до примерно 5 мг/кг массы тела индивидуума. В

некоторых вариантах осуществления вводимая доза составляет от примерно 0,1 до 4 мг/кг, еще более предпочтительно от 0,1 до 3,2 мг/кг, или даже более предпочтительно от 0,1 до 2,7 мг/кг массы тела индивида в течение цикла лечения.

Конъюгаты лиганд-линкер-лекарственное средство можно вводить любым удобным способом, например путем инфузии или болюсной инъекции, путем всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые накладки (например, слизистая оболочка рта, слизистая оболочка прямой кишки и кишечника). Введение может быть системным или местным. Известны различные системы доставки, например инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, капсулы, и могут быть использованы для введения соединения. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят более одного соединения или композиции.

Термин "носитель" означает разбавитель, адъювант или наполнитель, с которым вводят соединение. Такие фармацевтические носители могут быть жидкими, как вода. Носители могут представлять собой физиологический раствор, гуммиарабик, желатин, крахмальную пасту, тальк, кератин, коллоидный кремнезем, мочевины. Кроме того, вспомогательные, стабилизирующие, загущающие, смазывающие и красящие средства могут быть использованы. В одном варианте осуществления, при введении пациенту, соединение или композиции и фармацевтически приемлемые носители являются стерильными. Вода является типичным носителем, когда соединения вводят внутривенно. Солевые растворы и водный раствор декстрозы и растворы глицерина также могут быть использованы в качестве жидких носителей, особенно для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические носители также включают наполнители, такие как крахмал, глюкоза, лактоза, сахароза, желатин, солод, рис, мука, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, высушенное обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, вода, этанол. Настоящие композиции, при желании, могут также содержать небольшие количества смачивающих или эмульгирующих средств или pH-буферных средств.

В варианте осуществления конъюгаты составляют в соответствии с рутинными процедурами в качестве фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения животным, в частности людям. Как правило, носители или средства доставки для внутривенного введения представляют собой стерильные изотонические буферные водные растворы. При необходимости, композиции могут также включать солубилизирующее средство. Композиции для внутривенного введения при необходимости может содержать местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Как правило, ингредиенты поставляются либо отдельно, либо смешанными вместе в дозированном виде, например в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше с указанием количества активного средства. В случае, если конъюгат вводят путем инфузии, он может быть распределенным, например, при помощи инфузионного флакона, содержащего стерильные фармацевтического качества воду или физраствор. В случае если конъюгат вводят с помощью инъекций, может быть предоставлена ампула со стерильной водой для инъекций или физраствором, так что ингредиенты могут быть смешаны перед введением.

Фармацевтические композиции, как правило, формулируются как стерильные, в существенной степени изотонические и в полном соответствии со всеми правилами Надлежащей производственной практики (GMP) Управления по контролю за продуктами и лекарствами США.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают конъюгаты лиганд-лекарственное средство по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, все, или практически все, или более чем 50% конъюгатов лиганд-лекарственное средство, присутствующих в фармацевтической композиции содержит гидролизованный тио-замещенный сукцинимид. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, более 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, или 99% конъюгатов лиганд-лекарственное средство, присутствующих в фармацевтической композиции, содержит гидролизованный тио-замещенный сукцинимид.

Способы подготовки конъюгатов лиганд-лекарственное средство.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет способы получения конъюгатов лиганд-лекарственное средство, линкеры, конъюгатов лекарственное средство-линкер и линкер-лиганд.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению включают стадии получения лекарственное средство-линкер или звена линкера, как описано в настоящем документе, конъюгируя указанное лекарственное средство-линкер или звено линкера с сульфгидрильной группой звена лиганда с образованием конъюгата. В некоторых дополнительных вариантах осуществления тио-замещенная малеимидная или сукцинимидная группа(ы) конъюгата может подвергаться реакции гидролиза.

Скоростью гидролиза тио-замещенного сукцинимидом можно управлять, регулируя условия реакции после конъюгации лекарственное средство-линкер с лигандом, например, путем корректировки pH или температуры. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения весь, практически весь или по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 85, 90 или даже 95% тио-замещенного сукцинимидом гидролизуется без управления условиями реакции, т.е. реакция гидролиза происходит при тех же условиях реакции, что и реакция конъюгации. В некоторых вариантах осуществления весь, практически весь или по меньшей

мере 50, 60, 70, 80, 85, 90 или даже 95% тио-замещенного сукцинимид гидролизуеться от в течение от 20 мин до 4 ч после конъюгации, предпочтительно от 20 мин до 2 ч после конъюгации. В типичных вариантах осуществления условия проведения конъюгирования составляют рН примерно 7,4 и температура примерно 22°C.

В некоторых вариантах осуществления способы подготовки конъюгата лиганд-лекарственное средство включают стадии получения лекарственное средство-линкер или звена линкера; конъюгирование указанного лекарственное средство-линкер или звено линкера с сульфгидрильной группой лиганда с образованием конъюгата конъюгат лиганд-лекарственное средство, содержащего негидролизованый тио-замещенный сукцинимид, предоставление возможности негидролизованному тио-замещенному сукцинимиду подвергаться реакции прохождения гидролиза, причем весь, практически весь или по меньшей мере 50, 60, 70, 80 или даже 85% сукцинимид гидролизуеться в течение от 10 мин до 4 ч после конъюгации. В некоторых вариантах осуществления весь, практически весь или по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 85, 90 или даже 95% сукцинимид гидролизуеться через 10 мин, через 20, 40, 60, 90 или 120 мин после конъюгации. В некоторых вариантах осуществления реакция гидролиза происходит при тех же условиях реакции, что и реакция конъюгации. В типичных вариантах осуществления условия проведения конъюгирования составляют рН примерно 7,4 и температура примерно 22°C.

Сборка конъюгатов лиганд-лекарственное средство.

Конъюгаты лиганд-лекарственное средство по настоящему изобретению могут быть собраны, следуя общей схеме, показанной на фиг. 1.

Примеры

Общее.

Если не указано иное, материалы были получены от коммерческих поставщиков с высшей из имеющийся в распоряжении степенью чистоты и использовали без дальнейшей очистки. Безводный ДМФ и CH_2Cl_2 были приобретены у Aldrich. Fmoc-долапроин-ОН был специально синтезирован Albany Molecular Research, Inc. (Олбани, Нью-Йорк). Долавалин-Val-Dil-ОН подготавливали, как описано в другом месте. Fmoc-Dpr(ivDde)-ОН и смолу 2-хлоротритилхлорид, поливинилхлорид (200-300 сетка, 1% DVB, замещение 1 ммоль/грамм) была приобретена у Novabiochem. Твердофазный синтез проводили в пластиковых шприцах (National Scientific Company), оснащенных фильтром, вырезанным из товарного PE-листа среднепористого класса (Scienceware). Шейкер Burrell wrist action® (Burrell Scientific, Питсбург, Пенсильвания) был использован для взбалтывания. Все сообщенные твердофазные показатели основаны на начальном уровне замещения смолы и представляют собой баланс массы изолированного чистого материала, если не указано иное.

Очистку на препаративной ВЭЖХ проводили на приборе Varian, оснащенном обращеннофазовой колонкой C12 Phenomenex Synergy MAX-RP 4μ, 250×10 мм, элюированной 0,05% ТФУ в градиенте вода-ацетонитрил.

Данные по масс-спектрам были получены на XEVO TOF MS, подключенной к Waters 2795 ВЭЖХ, оборудованной обращеннофазовой колонкой C12 Phenomenex Synergi 2,0×150 мм, 4 μm, 80 Å. Элюент состоял из линейного градиента ацетонитрила от 5 до 95% в 0,1% водной муравьиной кислоте в течение 10 мин, затем изократический 95% ацетонитрил в течение 5 мин при скорости потока 0,4 мл/мин.

Гуманизированное антитело h1F6 специфически связывается с антиген CD70 человека (Cancer Res 2006, 66(4), p. 2328; патент США № 8,067,546). Гуманизированное антитело hBU12 специфически связывается антигеном CD19 человека (Blood, 2009, 113(18), p. 4362; патент США № 7,968,687). Клеточные линии карциномы клеток почки человека, 786-0 и Saki-1, экспрессирующие CD70 человека, и трансформированные клетки фолликулярной лимфомы человека DОНН2, экспрессирующие CD19 человека, были приобретены в Американской коллекции типовых культур (АТСС; Манассас, штат Виргиния). Все клеточные линии выращивали согласно рекомендациям поставщиков и регулярно проверяли на загрязнение микоплазмой.

Аббревиатуры: DPR означает диаминопропионовую кислоту; ivDde представляет собой L-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)-3-метилбутил-.

Пример 1. Общие процедуры синтеза.

Синтез малеимида-Dpr(Вос)-ОН.

N_β -Вос-L-2,3-диаминопропионовую кислоту (1 ммоль) и малеиновый ангидрид (98 мг, 1 ммоль) растворяли в уксусной кислоте (1 мл) в 50 мл круглодонной колбе, и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Затем раствор концентрировали до масла при пониженном давлении. Интермедиат малеиновой кислоты осаждали путем добавления ~10 мл CH_2Cl_2 /гексан, 1/1, об/об, и осадок собирали путем вакуумной фильтрации. Этот материал затем суспендировали в толуоле (9 мл), с последующим добавлением DMA (0,3 мл) и триэтиламина (0,42 мл, 3 ммоль). Смесь перемешивали при 40-60°C под N_2 , пока весь материал не будет в растворе. Затем сосуд снабжали конденсатором и раствор нагревали до 120°C и кипятили 4 ч над молекулярными ситами. Реакционную смесь фильтровали через спеченную стеклянную воронку и концентрировали почти до сухости при пониженном давлении. Остаток растворяли в этилацетате (10 мл), переносили в делительную воронку и промывали 10% лимонной кислотой в воде (2×10 мл) и

соляным раствором (2×10 мл). Органический слой высушивали над сульфатом магния, концентрировали при пониженном давлении и высушивали под высоким вакуумом в течение ночи, получая продукт в виде белого порошка с выходом 72%. ¹H ЯМР (DMCO): δ 1,29 (с, 9H), 3,41 (м, 1H), 3,52 (м, 1H) 4,57 (дд, 1H). 6,97 (т, 1H), 7,07 (с, 2H). LCMS (ESI), рассчитанное для (M+Na)⁺ 307,09; установленное m/z 307,17.

Общие процедуры для синтеза ауристатин-AA₁-MDPr.

Фиг. 1 иллюстрирует типичный синтез ауристатин-(AA₂)-AA₁-MDPr лекарственное средство-линкер.

Нагрузка смолы. В 20 мл твердофазный реакционный сосуд (пластиковый шприц с PET фриттой) добавляли 1 г 2-хлоротритилхлоридной смолы (1 ммоль, на основании ярлыка ее производителя), затем раствор Fmoc-Dpr(ivDde)-OH или Fmoc-Lys(ivDde)-OH (1,5 ммоль, 1,5 экв) и DIEA (1 ммоль, 1 экв) в 10 мл сухого CH₂Cl₂/DMF, 1/1, об/об. Сосуд встряхивали в течение 5 мин, а затем добавляли еще DIEA (1,5 ммоль, 1,5 экв). Смесь встряхивали в течение дополнительных 2 ч при комнатной температуре. Метанол (2,5 мл) добавляли, чтобы погасить непрореагировавшие участки. Через 30 мин, смолу промывали DMF (5×10 мл), CH₂Cl₂ (5×10 мл), этиловым эфиром (5×10 мл) и высушивали в вакууме.

Нагрузку определяли путем обработки небольшого количества смолы (2-4 мг) 20% пиперидином/DMF (2 мл) в течение 2 ч в мерной колбе (10 или 20 мл). Объем довели DMF; измеряли поглощение при 301 нм. Нагрузку рассчитывали с помощью следующего уравнения:

$$\text{Нагрузка (ммоль/г)} = (\text{объем сосуда} \times A_{301}) / (7800 \times \text{мг}) \times 1000$$

Средняя нагрузка составляла ~ 0,6 ммоль/г

Стадия удаления Fmoc. Смолу, содержащую Fmoc-защитный пептид, обрабатывали 20% пиперидином в DMF (10 мл/ г смолы) в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем смолу промывали DMF (5×1 мл на грамм смолы), CH₂Cl₂ (5×1 мл на грамм смолы), этиловым эфиром (5×1 мл на грамм смолы) и высушивали в вакууме.

Стадия присоединения. К смоле (1 экв), содержащей деблокированную N-концевую аминокислоту (AA), добавляли раствор Fmoc-AA-OH (2 экв), HATU (2 экв) и DIEA (4 экв) в DMF (1 мл на грамм смолы). Реакционный сосуд взбалтывали в течение 3-4 с. Затем смолу промывали в DMF (5×1 мл на грамм смолы), CH₂Cl₂ (5×1 мл на грамм смолы), этиловым эфиром (5×1 мл на грамм смолы) и высушивали in vacuo. Завершение реакции подтверждали отрицательным тестом Кайзера в случае необходимости.

Присоединение N-концевого доловалин-Val-Dil-OH выполняли аналогичным образом.

Снятие защиты ivDde и присоединение MDPr(Вое)-OH. После присоединения трипептида доловалин-Val-Dil-OH смолу обрабатывали 2% гидразином/DMF (1 мл/ г смолы) в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем смолу промывали DMF (5×1 мл на грамм смолы), CH₂Cl₂ (5×1 мл на грамм смолы), этиловым эфиром (5 ×1 мл на грамм смолы) и высушивали in vacuo. Раствор Fmoc-MDPr(Вое)-OH (2 экв), HATU (2 экв) и DIEA (4 экв) в DMF (1 мл на грамм смолы) добавляли к смоле, смесь встряхивали в течение 3 ч при комнатной температуре (RT). Завершение реакции подтверждали отрицательным тестом Кайзера. Смолу промывают DMF (5×1 мл на грамм смолы), CH₂Cl₂ (5×1 мл на грамм смолы), этиловым эфиром (5×1 мл на грамм смолы) и высушивали in vacuo.

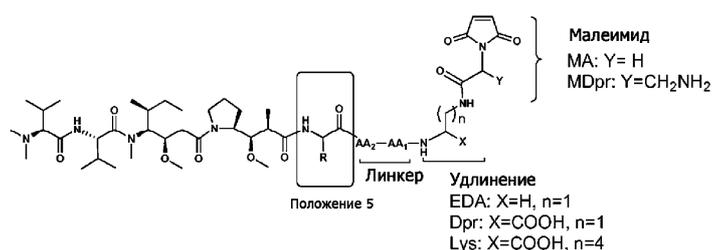
Отщепление от смолы и снятие защиты. Пептид-содержащую смолу обрабатывали 20% TФУ/CH₂Cl₂ (2 мл/г смолы) в течение 10 мин при комнатной температуре, и раствор собирали в круглодонной колбе. Смолу промывали 20% TФУ/CH₂Cl₂ (2×0,5 мл на грамм смолы). Объединенные растворы оставляли при комнатной температуре в течение 3 ч. После снятия защиты, завершение подтверждали LC-MS. Летучие вещества удалили при пониженном давлении на Rotavap, и конечный продукт очищали с помощью обращеннофазовой препаративной ВЭЖХ. Все лекарственное средство-линкеры были получены с >95% чистоты по ВЭЖХ с обращенной фазой при 215 нм.

Лекарственное средство-линкеры с МА малеимидом подготавливали таким же образом, как описано выше, с использованием α-малеимидоуксусной кислоты-NHS (Molecular Biosciences, Боулдер, Колорадо) вместо MDPr(Вое)-OH.

Лекарственное средство-линкеры с этилендиаминовым (EDA) удлинителем подготавливали при помощи процедуры, аналогичной процедуре, о которой сообщалось ранее (Bioconjugate Chem. 2008, 19, 1960-1963).

Пример 2. Линкеры лекарственного средства.

Линкеры лекарственного средства синтезировали, как описано выше. Общая формула выглядит следующим образом:



(В этой формуле следует обратить внимание на то, что обозначение AA₂ и AA₁ перевернуто. R соответствует R¹².)

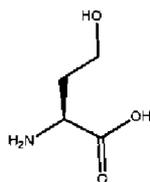
В следующей табл. 1 суммированы синтез и характеристики различных линкеров лекарственного средства. В таблице, первый столбец (слева) относится к номеру соединения. Второй столбец (слева) относится аминокислоте на С-конце ауристатина. Третий, четвертый и пятый столбцы относятся к компонентам линкера. В колонке 3 определены аминокислотные составляющие линкера. В столбце 4, определены дополнительные аминокислотные и/или не относящиеся к аминокислотам компоненты линкера. В столбце 5, определена композиция малеимидной составляющей линкера. Шестой столбец относится к выходу лекарственное средство-линкера. Седьмой и восьмой столбцы относятся к расчетным и наблюдаемым массам лекарственное средство-линкеров, как определено с помощью масс-спектропии. Последний столбец (справа) относится к НИС времени удерживания АСД, содержащих лекарственное средство-линкеры как 8-кратные нагрузки (как правило, определяется как описано в примере 3).

Таблица 1

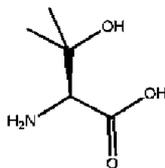
| # | Положение 5 ауристатина | Линкер | | | Выход, % | MS: Рассчитанная (MH) ⁺ | MS: Определенная, m/z | НИС время удерживания (мин) |
|----|-------------------------|------------------|------------------------------------|------------------------|----------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| | | Аминокислота (ы) | Аминокислота или другой удлинитель | Малеимид (МА или MDPr) | | | | |
| 1 | Phe | нет | Dpr | МА | 14 | 969,6 | 969,7 | NT |
| 2 | Phe | Glu | Dpr | МА | 11 | 1098,6 | 1098,8 | NT |
| 3 | Thr | none | Dpr | МА | 7,3 | 923,5 | 923,7 | NT |
| 4 | Thr | Glu | Dpr | МА | 8,1 | 1052,6 | 1052,8 | 5 |
| 5 | Phe | Glu | Dpr | MDPr | 20 | 1127,6 | 1127,4 | NT |
| 6 | Thr | Glu | Dpr | MDPr | 20 | 1081,6 | 1081,7 | 4,5 |
| 7 | Thr | Glu | Lys | MDPr | 36 | 1123,7 | 562,5 дв заряд | 4,6 |
| 8 | Триазол | Glu | Lys | MDPr | 28 | 1176,6 | 588,9 дв заряд | NT |
| 9 | Phe | Glu | EDA | MDPr | 30 | 1083,6 | 1083,9 | 5,8 |
| 10 | Thr | Glu | EDA | MDPr | 23 | 1037,6 | 1037,8 | NT |
| 11 | Phe | Ile | EDA | MDPr | 25 | 1067,7 | 1067,9 | 6,9 |
| 12 | Thr | Ile | EDA | MDPr | 20 | 1021,7 | 511,5 дв заряд | 5,2 |
| 13 | Триазол | Glu | EDA | MDPr | 43 | 1090,6 | 1091,6 | 4,9 |
| 14 | Asp | Ala | Lys | MDPr | 70 | 1079,6 | 1079,9 | 4,98 |
| 15 | Glu | Ala | Lys | MDPr | 81 | 1093,6 | 1093,8 | 5,02 |
| 16 | ФосфоThr | Ala | Lys | MDPr | 4,5 | 1145,6 | 1145,9 | 4,81 |
| 17 | Asn | AlaGlu | Dpr | MDPr | 70 | 1165,6 | 1165,5 | 5 |
| 18 | Gln | AlaGlu | Dpr | MDPr | 40 | 1179,7 | 1180,09 | 5,1 |
| 19 | Asp | AlaGlu | Dpr | MDPr | 67 | 1166,6 | 1167,3 | 4,95 |
| 20 | Glu | AlaGlu | Dpr | MDPr | 72 | 1180,6 | 1180,96 | 4,98 |
| 21 | hSer | AlaGlu | Dpr | MDPr | 71 | 1152,6 | 1152,7 | 5,1 |
| 22 | ValOH | AlaGlu | Dpr | MDPr | 21 | 1166,7 | 1167,1 | 5,2 |
| 23 | ФосфоThr | AlaGlu | Dpr | MDPr | 13 | 1232,6 | 1232,78 | 4,8 |
| 24 | Пиразол | Glu | Dpr | MDPr | 73 | 1117,6 | 1117,5 | 5,2 |
| 25 | Триазол | Glu | Dpr | MDPr | 85 | 1118,6 | 1118,7 | 5 |
| 26 | Asn | Glu | Dpr | MDPr | 91 | 1108,6 | 1108,5 | 4,9 |
| 27 | Asp | Glu | Dpr | MDPr | 90 | 1095,6 | 1095,4 | 4,8 |
| 28 | Fur | Glu | Dpr | MDPr | 11 | 1117,6 | 1117,6 | 5,6 |
| 29 | ValOH | Glu | Dpr | MDPr | 22 | 1095,6 | 1095,7 | 5,1 |
| 30 | Ser | Glu | Dpr | MDPr | 86 | 1067,6 | 1068,3 | 4,9 |
| 31 | hSer | Glu | Dpr | MDPr | 68 | 1081,6 | 1081,5 | 4,96 |
| 32 | Thr | IleLeu | Dpr | MDPr | 30-50 | 1178,7 | 1178,8 | 6,1 |
| 33 | Phe | IleLeu | Dpr | MDPr | 30-50 | 1224,7 | 1224,9 | 7,4 |
| 34 | Glu | PheLeu | Dpr | MDPr | 30-50 | 1240,7 | 1241,1 | 5,9 |
| 35 | Thr | LeuPhe | Dpr | MDPr | 30-50 | 1212,7 | 1212,8 | 6,7 |
| 36 | Phe | LeuPhe | Dpr | MDPr | 30-50 | 1258,7 | 1258,9 | 7,8 |
| 37 | Glu | PhePhe | Dpr | MDPr | 30-50 | 1274,7 | 1274,8 | 6,1 |
| 38 | Thr | LysAla | Dpr | MDPr | 30-50 | 1151,7 | 1151,9 | 4,9 |
| 39 | Thr | Lys | Dpr | MDPr | 30-50 | 1080,6 | 1181,1 | 4,8 |
| | mc-MMAF | | | | | | | 7,0 |
| | mc-vc-PABC-MMAF | | | | | | | 8,2 |
| | mc-vc-PABC-MMAE | | | | | | | 9,8 |

Сокращения:

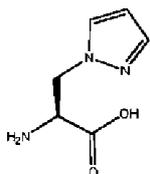
Ala относится к L-аланину; Asn относится к аспарагину; Asp относится к L-аспарагиновой кислоте; Gln относится к L-глутамину; Glu относится к L-глутаминовой кислоте; Ile относится к L-изолейцину; Leu относится к L-лейцину; Lys относится к L-лизину; Phe относится к L-фенилаланину; ФосфоThr относится к L-фосфотреонину; Thr относится к L-треонин; hSer относится к L-гидроксисерину



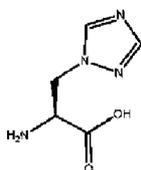
ValOH относится к L-гидровалину



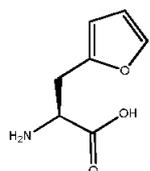
Пиразол относится к



Триазол относится к



Fug относится к



MA относится к малеимидацетилену; Drg относится к диаминопропионовой кислоте; MDrg относится к малеимидо-диаминопропионовой кислоте; EDA относится к диамину; mc-MMAF относится к линкер-малеимидакапроил MMAF; mc-vc-PABC-MMAF относится к малеимидакапроил-валин-цитруллин-п-аминобензил-карбамоильную MMAF; mc-vc-PABC-MMAE относится к малеимидакапроил-валин-цитруллин-р-аминобензил-карбамоилMMAE.

Пример 3. Конъюгаты антитела с лекарственным средством Подготовка конъюгатов антитело-лекарственное средство.

Типичная для h1F6 ADC.

Конъюгаты антитело h1F6-лекарственное средство (ADC) с восьмью лекарственными средствами на антитело были подготовлены путем полного восстановления антитела с последующей реакцией с нужным лекарственным средством-линкером. Антитело (10 мг/мл) было полностью восстановлено путем добавления 10 молярных эквивалентов трис(2-карбокsetил)фосфина (ТСЕР) в фосфатно-солевом буфере (PBS) pH 7,4 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) с 1 мМ диэтилен-триаминпентауксусной кислоты (ДТРА), с последующим инкубированием при 37°C в течение ~1 с. Избыток ТСЕР удаляли 10-кратным разбавлением PBS и концентрацией антитела, повторив 2 раза с помощью центрифужного фильтра с номинальным отсечением по молекулярной массе 30 Кд (EMD Millipore, Биллерика, Массачусетс). Полное редуцирование антитела было подтверждено анализом обращенно-фазовой ВЭЖХ, где в легкая и тяжелая цепи полностью отделялись от нередуцированного антитела. Лекарственное средство-линкер (10 эквивалентов) затем добавляли из исходного раствора, подготовленного в ДМСО (10 мМ). Реакцию оставляли при комнатной температуре в течение приблизительно 2 ч, чтобы обеспечить конъюгацию и последующий гидролиз тиосукцинимидного кольца (MDrg). Реакционную смесь очищали и осуществляли смену буфера в PBS с использованием колонок для обессаливания PD-10 (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси). Соотношение лекарственного средства/Ab оценивали анализом PLRP-МС, и оно находится в диапазоне 7,8-8,0 лекарственное средство/Ab. Кроме того, каждый ADC анализировали эксклюзионной хроматографией, где HMW-виды находятся в пределах 0,5-2,0%.

Хроматография гидрофобного взаимодействия.

Анализ ADC проводили с использованием хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC). HIC выполняли с проведением линейного градиента от 0 до 100% подвижной фазы В (MPB), где подвижная фаза А (MPA) состоит из 1,5 М сульфата аммония, 25 мМ фосфата калия, pH 7,0, и MPB состоит

из 75% 25 мМ фосфата калия, рН 7,0, и 25% изопропанола. Разделение было достигнуто с помощью колонки Tosoh t-Butyl (TSK-Gel Butyl-NPR 4,6x35мм, PN: 14947), нагретой до до 25°C. Образцы для тестирования готовили путем разбавления 70 мкг ADC в МПА, так что суммарная концентрация соли больше или равна 1,0 М сульфата аммония в общем объеме 100 мкл. Образцы вводили в 90 мкл и элюировали с использованием 12 минутного градиента. Мониторинг при $\lambda=280$ нм. ADC с большей гидрофобностью, или большим количеством лекарственных средств на молекулу элюируются при более поздних временах удерживания.

Фиг. 4 и 5 показывают результаты НИС-анализа различных 8-кратно нагруженных ADC, по сравнению с родительским, неконъюгированным антителом (h1F6). ADC были подготовлены, как описано выше. Результаты в целом показывают, что увеличение гидрофильности ауристинина, в сочетании с гидрофильным линкером, уменьшает наблюдаемую гидрофобность конъюгата.

В следующей табл. 2 приведены композиции различных линкеров лекарственных препаратов табл. 1 и анализируются полученные конъюгат 8-кратно нагруженных антител с лекарственными препаратами с антителом h1F6. Величину времени удерживания НИС (НИС RT) определяли, как описано выше. h1F6 ADC, содержащие лекарственное средство-линкеры MC-vc-PABC-MMAE, MC-vc-PABC-MMAF и MC-MMAF, были использованы в качестве контроля.

Таблица 2

| № | (AA5 ауристинина) - AA1-AA2-MDpr | НИС RT (мин) | |
|------|----------------------------------|--------------|--------------------|
| | | h1F6 | 8-кратная нагрузка |
| 4967 | (Asp)-Ala-Lys (MDpr) | 4,98 | |
| 4968 | (Glu)-Ala-Lys (MDpr) | 5,02 | |
| 4969 | (Phospho-Thr)-Ala-Lys (MDpr) | 4,81 | |
| 4970 | (Asn)-Ala-Glu-MDpr | 5,0 | |
| 4971 | (Gln)-Ala-Glu-MDpr | 5,1 | |
| 4972 | (Asp)-Ala-Glu-MDpr | 4,95 | |
| 4973 | (Glu)-Ala-Glu-MDpr | 4,98 | |
| 4974 | (homoSer)-Ala-Glu-MDpr | 5,1 | |
| 4975 | (ValOH)-Ala-Glu-MDpr | 5,2 | |
| 4976 | (Phospho-Thr)-Ala-Glu-MDpr | 4,8 | |
| 4977 | (Pyrazol)-Glu-MDpr | 5,2 | |
| 4978 | (Triazol)-Glu-MDpr | 5,0 | |
| 4979 | (Asn)-Glu-MDpr | 4,9 | |
| 4980 | (Asp)-Glu-MDpr | 4,8 | |
| 4981 | (Furyl)-Glu-MDpr | 5,6 | |
| 4982 | (ValOH)-Glu-MDpr | 5,1 | |
| 4983 | (Ser)-Glu-MDpr | 4,9 | |
| 4984 | (homoSer)-Glu-MDpr | 4,96 | |
| 4830 | (Thr)-Glu-MDpr | 4,5 | |
| 4808 | (Thr)-Glu-MA | 5,0 | |
| 4851 | (Thr)-Glu-Lys (MDpr) | 4,6 | |
| 4854 | (Thr)-Glu-EDA-MDpr | NT | |
| 4856 | (Thr)-Ile-EDA-MDpr | 5,2 | |
| 4853 | (Phe)-Glu-EDA-MDpr | 5,8 | |
| 4855 | (Phe)-Ile-EDA-MDpr | 6,9 | |
| 4882 | (Thiazole)-Glu-EDA-MDpr | 4,9 | |
| 4883 | (Met)-Asn-(D) Lys-EDA-MDpr | 4,8 | |

| | | |
|------|-----------------|-----|
| 1006 | MC-vc-PABC-MMAE | 9,8 |
| 1251 | MC-vc-PABC-MMAF | 8,2 |
| 1269 | MC-MMAF | 7,0 |

Пример 4. Анализы активности *in vitro*.

Анализы цитотоксичности *in vitro* проводили, как правило, как описано ранее (см. выше, анализы активности). Кратко, культуры клеток в логарифмической фазе собирали и клетки засеивали с плотностями посева от 500 до 10 000 клеток/лунку в соответствии с заранее определенными условиями. После инкубации в течение 24 ч, чтобы обеспечить реконструкцию поверхностных белков, добавляли серийные разведения тестируемых конъюгатов и культуры инкубировали еще в течение 4 дней. Оценку клеточного роста и уменьшение окрашивания для образования значения IC_{50} проводили при помощи анализа уменьшения окрашивания аламаром синим (Biosource International, Камарилло, Калифорния). Кратко, 40% раствор (масса/объем) аламара синего заново подготавливали в полной среде непосредственно перед добавлением культур. Через девяносто два часа после воздействия лекарственного средства, раствор аламара синего добавляли к клеткам, чтобы составлять 10% объема культуры. Клетки инкубировали в течение 4 ч, а уменьшение окрашивания измеряли на флуоресцентном ридере для плашек Fusion HT (Packard Instruments, Мериден, штат Коннектикут).

Были использованы очищенные клеточные линии клеток почечного рака 786-0 и Caki-1. Эти клеточные линии экспрессировали примерно 190000 и 135000 молекул CD70 человека на клетку, соответственно. Лекарственное средство-линкеры, присоединенные к антителу h1F6, описаны в табл. 1 и 2. Обращаясь к следующим табл. 3А-С, h1F6 ADC имеют среднюю нагрузку лекарственного средства в 8 лекарственных средств/антитело, если не указано иное. Протестированные гидрофильные h1F6 ADC проявили в этих исследованиях активность (значения IC_{50}), сопоставимую с, или даже лучшую, чем контроль, h1F6-мсММАF (1269).

Таблица 3А. Обобщенные результаты по IC_{50} для ADC на основе ауристатина

| ADC | Dr/Ab | Caki-1 | 786-0 |
|---------|-------|--------|-------|
| h1F6-1 | 4 | 21 | 21 |
| | 8 | 8 | 7 |
| h1F6-2 | 4 | 17 | 21 |
| | 8 | 7 | 7 |
| h1F6-3 | 4 | 27 | 28 |
| | 8 | 13 | 13 |
| h1F6-4 | 4 | 20 | 21 |
| | 8 | 11 | 9 |
| h1F6-5 | 4 | 39 | 32 |
| | 8 | 22 | 19 |
| h1F6-6 | 4 | 23 | 26 |
| | 8 | 7 | 9 |
| h1F6-7 | 4 | 80 | 10 |
| | 8 | 24 | 4 |
| h1F6-8 | 8 | 19 | 4 |
| h1F6-9 | 8 | 21 | 3 |
| h1F6-10 | 8 | 57 | 5 |
| h1F6-11 | 8 | 9 | 1 |
| h1F6-12 | 8 | 12 | 4 |
| h1F6-13 | 8 | 60 | 5 |

DR/Ab относится к средней нагрузке лекарственного средства;

IC_{50} приведены в нг/мл.

Таблица 3В. Обобщенные результаты по IC_{50} для ADC на основе ауристатина

| ADC на основе ауристатина | Dr/Ab | 786-0 | Caki-1 |
|---------------------------|-------|-------|--------|
| h1F6-14 | 8,0 | 8 | 19 |
| h1F6-15 | 8,0 | 8 | 16 |

| | | | |
|-------------|-----|----|----|
| h1F6-16 | 8,0 | 9 | 12 |
| h1F6-17 | 8,0 | 8 | 14 |
| h1F6-18 | 8,0 | 8 | 16 |
| h1F6-19 | 8,0 | 7 | 20 |
| h1F6-20 | 8,0 | 7 | 9 |
| h1F6-21 | 8,0 | 12 | 22 |
| h1F6-22 | 8,0 | 24 | 21 |
| h1F6-23 | 8,0 | 11 | 18 |
| h1F6-24 | 8,0 | 11 | 33 |
| h1F6-25 | 8,0 | 14 | 34 |
| h1F6-26 | 8,0 | 9 | 19 |
| h1F6-27 | 8,0 | 7 | 15 |
| h1F6-28 | 8,0 | 7 | 21 |
| h1F6-29 | 8,0 | 31 | 33 |
| h1F6-30 | 8,0 | 12 | 18 |
| h1F6-31 | 8,0 | 13 | 20 |
| h1F6-6 | 8,0 | 11 | 12 |
| h1F6-мсММАF | 4,0 | 44 | 42 |

Таблица 3С. IC₅₀ для ADC на основе h1F6, нг/мл

| ADC на основе ауристатины | Dr/Ab | 786-0 Чистый RCC | Saki-1 Чистый RCC |
|------------------------------|-------|---------------------|----------------------|
| h1F6-32 | 8,0 | 5 | 3 |
| h1F6-33 | 8,0 | 0,8 | 0,8 |
| h1F6-34 | 8,0 | 3 | 6 |
| h1F6-35 | 8,0 | 3 | 3 |
| h1F6-36 | 8,0 | 0,7 | 0,5 |
| h1F6-37 | 8,0 | 4 | 4 |
| h1F6-38 | 8,0 | 3 | 3 |
| h1F6-39 | 8,0 | 3 | 3 |
| h1F6-6 | 8,0 | 7 | 5 |
| h1F6-мсММАF | 4,0 | 34 | 12 |

Пример 5. Исследования фармакокинетики Радиоактивное мечение антител и ADC.

Эксперименты по фармакокинетики (ПК) проводили с использованием радиоактивно меченого антитела или ADC. Образцы для ПК-теста радиоактивно метили при помощи следующей процедуры. К раствору антитела или ADC в 500 мМ фосфате калия (рН 8,0) и 500 мМ хлориде натрия добавляли 55 μ Ci N-сукцинимидилпропионата, [пропионата-2,3-³H]- (Moravek Biochemicals, Cat. No.: MT 919, 80 Ки/ммоль, 1 мКи/мл, раствор 9:1 гексан:этилацетат) на мг антитела или ADC. Полученную смесь перемешивали на вортексе и оставляли при комнатной температуре на 2 ч. Смесь центрифугировали при 4000 \times g в течение 5 мин, и нижний водный слой удаляли и распределяли по центрифужным фильтровальным ячейкам Amicon Ultra-15 (Millipore, Cat. No.: UFC903024, номинальное отсечение по молекулярной массе 30 кДа). Неконъюгированную радиоактивность удаляли за 4 раунда разбавления и центрифугирования при 4000 \times g. Полученные продукты фильтровали через стерильные 0,22-мкм центрифужные фильтровальные ячейки Ultrafree-MC (Millipore, Cat. No.: UFC30GV0S), и конечные концентрации антитела или ADC измеряли спектрофотометрически. Специфическую активность (мкКи/мг) каждого продукта определяли способом жидкостно-сцинтилляционного счета.

Фармакокинетические исследования.

Фармакокинетические свойства неконъюгированного антитела и различных ADC этого антитела (нагрузка лекарственного средства 8) были исследованы в нескольких моделях на грызунах. В каждом эксперименте 3 мг радиоактивно меченого антитела или ADC на кг массы животного вводили через хвостовую вену. Каждый тестируемый образец дозировали один раз животным в 3 повторностях. Кровь отбирали в пробирки K2EDTA через подкожную вену или пункцию сердца для терминальных отборов в различные моменты времени. Плазму выделяли центрифугированием в течение 10 мин при 10000 \times g. 10 мкл образца плазмы от каждой временной точки добавляли к 4 мл жидкого сцинтилляционного коктейля Ecoscint-A (National Diagnostics), и общую радиоактивность измеряли в жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Полученные в результате значения распадов в минуту переводили в мкКи, и удельную активность радиоактивно меченых тестируемых образцов использовали для расчета концентрации антитела или ADC, остающихся в плазме в каждой временной точке.

Обращаясь к фиг. 2, фармакокинетические свойства h1F6 и двух его гидрофильных ADC были сопоставлены со свойствами трех контрольных ADC. Гидрофильные ADC представляли собой h1F6-4 (8-кратно

нагруженное (ауристин-Т)-Glu-Dpr-MA)₈-h1F6) и h1F6-11 ((ауристин F)-Ile-EDA-MDpr)₈-h1F6). Результаты показали, что гидрофильные ADC демонстрировали увеличенную фармакокинетическую стабильность в курсе этого исследования на мышах. Гидрофильный ауристин с ауристином-Т демонстрировали стабильность, близкой к таковой неконъюгированного антитела. Гидрофильная конструкция ADC h1F6-11 демонстрировала улучшенную PK-стабильность по сравнению с контролем, два из которых включали монометиловую форму того же ауристина (ауристин F vs монометилового ауристина F).

Обращаясь к фиг. 3, фармакокинетические свойства гидрофильных конъюгатов другого моноклонального антитела были сопоставлены со свойствами контрольного конъюгата, mAb-mcMMAF. Все ADC имели среднюю загрузку лекарственного средства 8. Каждый из гидрофильных ADC демонстрировал улучшенную фармакокинетическую стабильность, по сравнению с контрольным ADC.

Два гидрофильных ADC этого были сопоставлены со свойствами трех контрольных ADC. Гидрофильные ADC представляли собой h1F6-8 (8-кратно нагруженное (ауристин-тиазол)-Glu-Lys-MDpr)₈-h1F6) и h1F6-11 ((ауристин F)-Ile-EDA-MDpr)₈ - h1F6). Результаты показывают, что гидрофильные ADC демонстрировали улучшенную фармакокинетическую стабильность в курсе этого исследования на мышах. В частности, гидрофильная конструкция h1F6-11 демонстрировала улучшенную стабильность по сравнению с контролями, два из которых включали монометиловую форму того же ауристина (ауристин F vs монометилового ауристина F).

Пример 6. Терапевтические эксперименты *in vivo*.

Клетки 786-0 были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Вирджиния), и их размножали в условиях культивирования, рекомендованных ATCC. Для образования опухолей 786-0, 5×10^6 клеток было имплантировано в правый бок самок бестимусных nu/nu мышей-доноров (Harlan, Индианаполис, Индиана). Когда донорские опухоли становились примерно 500 мм^3 , мышей эвтаназировали и опухоли вырезали в асептических условиях, и фрагменты $\sim 0,5 \times 0,5 \text{ мм}$ помещали в стерилизованную троакар 13-го размера для вживления nu/nu мышам. Когда опухоли достигали $\sim 100 \text{ мм}^3$, мышей случайным образом распределяли по группам лечения.

Для образования опухолей DONH2, 5×10^6 клеток имплантировали в правый бок мышей C.B.-17 SCID (Harlan, Индианаполис, Индиана). Когда опухоли достигали $\sim 100 \text{ мм}^3$, мышей случайным образом распределяли по группам лечения.

Экспериментальные группы подвергали лечению с помощью внутрибрюшинного введения соединений с указанными дозой и графиком, или, альтернативно, не подвергали лечению. Опухоли периодически обмеряли, и объемы рассчитывали с использованием формулы $V = ((L \times W^2) / 2)$. Животных усыпляли, когда опухоли достигали объема 1000 мм^3 или в конце исследования, в зависимости от того, что наступало раньше.

Времена учетверения опухоли были выбраны как время в конечной точке (TTE), которое было определено с помощью анализа нелинейной регрессии экспоненциального роста набора данных роста каждой отдельной опухоли у каждого экспериментального животного. Среднее время учетверения опухоли рассчитывали на основе объема опухоли в начале лечения. Животным, которые не достигали конечной точки, присваивали значение TTE, приравненное к последнему дню исследования.

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad) для Windows. Тест Logrank у TTE был использован для анализа значимости различий между двумя группами, причем различия считаются значимыми на уровне $0,01 \leq P \leq 0,05$ и высоко значимыми при $P \leq 0,01$.

Обращаясь к фиг. 6, активность 4-кратно нагруженных и 8-кратно нагруженных ADC (4d/Ab и 8d/Ab, соответственно) тестировали в однократном ксенотрансплантном исследовании на мышах. Впервые, со ссылкой на контроль, h1F6-mc-vc-PABC-MMAF, 4-кратно нагруженный ADC дал лучшую активность, чем 8-кратно нагруженный ADC. В отличие от этого, 8-кратно нагруженные ADC гидрофильных h1F6-6 (ауристин T-Glu-Dpr-MDPr) и h1F6-13 (ауристин тиазол-Glu-EDA-MDPr) показали большую активность, чем 4-кратно нагруженные аналоги.

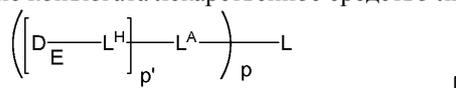
Обращаясь к фиг. 7, активность различных 4-кратно нагруженных и 8-кратно нагруженных ADC тестировали в однократном ксенотрансплантном исследовании на мышах. Снова в данной модели, 8-кратно нагруженный гидрофильный ADC hBU12-6 (ауристин T-Glu-Dpr-MDPr) проявил большую активность, чем его 4-кратно нагруженный аналог.

Обращаясь к фиг. 8, активность различных 4-кратно нагруженных и 8-кратно нагруженных ADC тестировали в однократном ксенотрансплантном исследовании на мышах. В данной модели, каждый из 8-кратно нагруженных ADC h1F6-12 (ауристин T-Ile-EDA-MDPr) и h1F6-5 (ауристин F-Glu-Dpr-MDPr) показал большую активность, чем 4-кратно нагруженные аналоги. 8-кратно нагруженный ADC h1F6-11 (ауристин F-Ile-EDA-MDPr) демонстрировал обратную тенденцию.

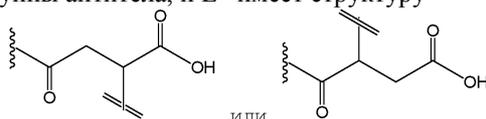
Обращаясь на фиг. 9, активность различных 4-кратно нагруженных и 8-кратно нагруженных ADC тестировали в однократном ксенотрансплантном исследовании на мышах. В данной модели 8-кратно нагруженные ADC h1F6-17, h1F6-20, h1F6-24 и h1F6-29 проявили большую активность, чем 4-кратно нагруженные аналоги.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гидрофильное соединение конъюгата лекарственное средство-лиганд, имеющее формулу

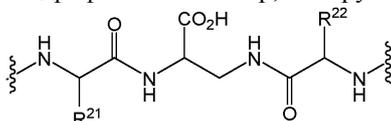


или его фармацевтически приемлемая соль,
 где L представляет собой лиганд, который представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которое специфически связывается с мишенью;
 где мишенью является антиген клеточной поверхности мишени клетки,
 каждый L^A представляет собой компонент присоединения лиганда, ковалентно связанный с атомом серы цистеиновой тиольной группы антитела, и L^A имеет структуру



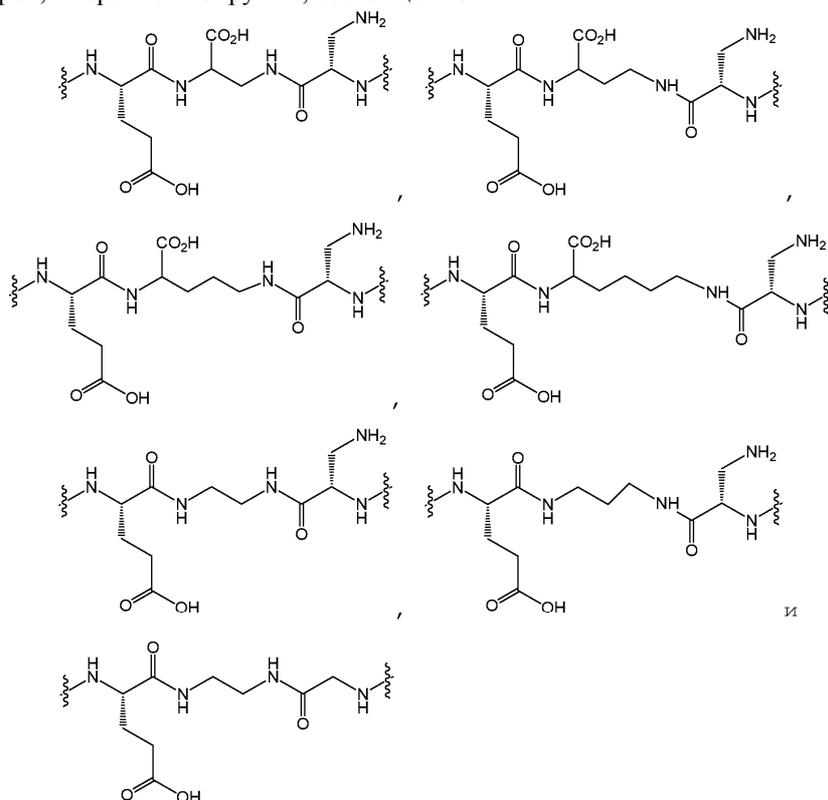
где волнистая линия обозначает точку присоединения к L^H и \\\\ указывает на ковалентное присоединение к атому серы цистеиновой тиольной группы антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела;

каждый L^H представляет собой гидрофильный линкер, со структурой



где R²¹ выбран из группы, состоящей из -CH₂NH₂, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂CO₂H, -CH₂CH₂CO₂H, -CH₂CH₂CH₂CO₂H и -CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂H; и

R²² выбран из группы, состоящей из CH₂NH₂, CH₂CH₂NH₂, CH₂OH и CH₂CH₂OH; или со структурой, выбранной из группы, состоящей из



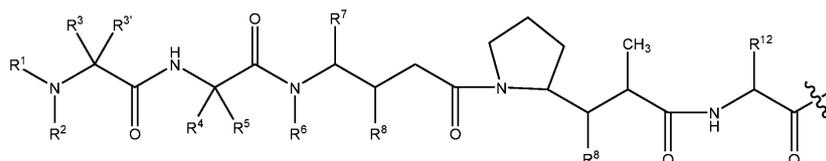
где в каждой структуре L^H левая и правая волнистые линии указывают на ковалентное присоединение к D_E и L^A, соответственно,

где ковалентное присоединение к D_E происходит через пептидную связь, расщепляемую внутриклеточной протеазой, когда гидрофильное соединение конъюгата "лекарственное средство-лиганд" достигает своего антигена-мишени и интернализуется в мишеневую клетку;

индекс p представляет собой целое число от 6 до 12, от 8 до 12 или от 8 до 16;

индекс p' представляет собой целое число 1; и

каждое D_E представляет собой ауристин с формулой:



где каждый из R^1 и R^2 независимо выбран из группы, состоящей из водорода (H) и необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила; при условии, что оба R^1 и R^2 не являются H, за исключением того, что оба из R^3 и $R^{3'}$ не являются H;

R^3 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила;

$R^{3'}$ выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила и по меньшей мере один из R^3 и $R^{3'}$ не является H;

R^4 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила;

R^5 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила; или

R^4 и R^5 совместно образуют карбоциклическое кольцо и имеют формулу $-(CR^aR^b)_n-$, в которой R^a и R^b независимо выбраны из группы, включающей H и необязательно замещенный $-C_1-C_8$ -алкил, и n выбран из группы, состоящей из 2, 3, 4, 5 и 6;

R^6 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила;

R^7 выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила;

каждый R^8 независимо выбран из группы, состоящей из H, -OH, необязательно замещенного $-C_1-C_8$ -алкила и необязательно замещенного $-O-(C_1-C_8$ -алкила);

R^{12} выбран из боковых цепей аминокислот, выбранных из группы, состоящей из треонина, серина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, гомосерина, гидроксивалина, фурилаланина, треонин (PO_3H_2), пирозолилаланина, триазолилаланина и тиазолилаланина; и

где гидрофильное соединение конъюгата лекарственное средство-лиганд имеет индекс гидрофильности менее чем два, где "индекс гидрофильности" измеряется как время удерживания гидрофильного соединения конъюгата лекарственное средство-лиганд по отношению к времени удерживания неконъюгированного лиганда в условиях высокоэффективной жидкофазной хроматографии,

где, если группа является замещенной, то она замещена одним, двумя, тремя или четырьмя заместителями, выбранными из группы, состоящей из -галогена, $-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR'C(O)R'$, $-NR'-C(O)NR'R''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NH-C(NH_2)=NH$, $-NR'C(NH_2)=NH$, $-NH-C(NH_2)=NR'$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NR'S(O)_2R''$, $-CN$ и $-NO_2$,

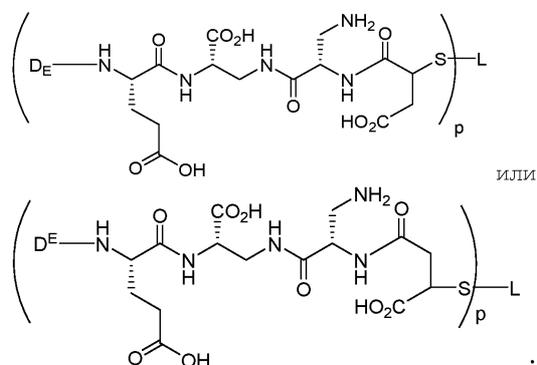
где каждый R' , R'' и R''' независимо относится к водороду, незамещенному C_{1-8} -алкилу, незамещенному арилу, арилу, замещенному 1-3 галогенами, незамещенному C_{1-8} -алкилу, C_{1-8} -алкокси или C_{1-8} -тиоалкоксигруппам или незамещенным арил- C_{1-4} -алкильным группам; или если R' и R'' присоединены к одному атому азота, то они могут быть объединены с атомом азота с образованием 3-, 4-, 5-, 6- или 7-членное кольцо.

2. Гидрофильное соединение конъюгата лекарственное средство-лиганд по п.1, где R^{12} представляет собой боковую цепь L-треонина.

3. Гидрофильное соединение конъюгата лекарственное средство-лиганд по п.1 или 2, где индекс p равен 8.

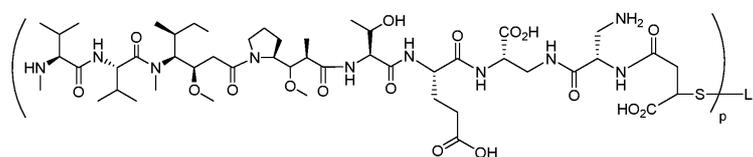
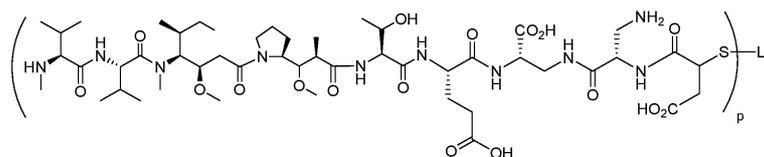
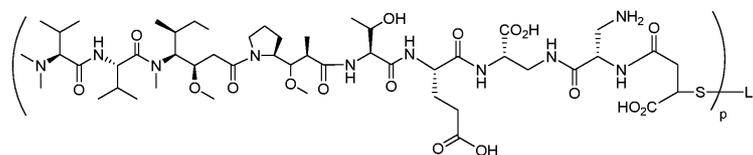
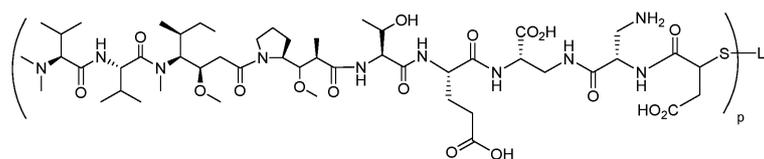
4. Гидрофильное соединение конъюгата лекарственное средство-лиганд по п.1, где индекс p равен 10.

5. Гидрофильное соединение конъюгата лекарственное средство-лиганд по п.1, которое имеет структуру



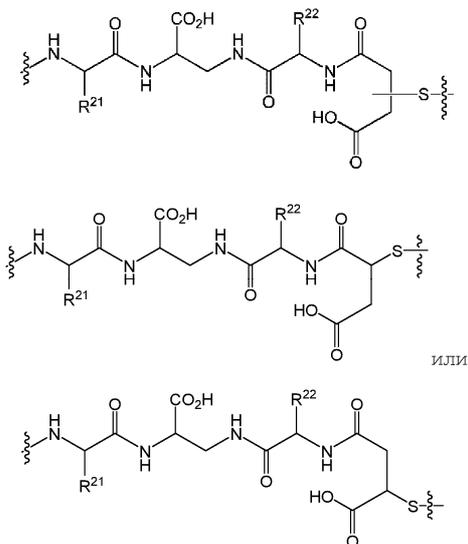
где каждый S представляет собой атом серы цистеиновой тиольной группы антитела или антиген-связывающего фрагмента антитела.

6. Гидрофильное соединение конъюгата лекарственное средство-лиганд по п.1, которое имеет структуру любой из формулы Ia-Ic:



где каждый S представляет собой атом серы цистеиновой тиольной группы антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела.

7. Гидрофильное соединение конъюгата лекарственное средство-лиганд по п.1 или 2, где $-L^A-L^H$ имеет формулу



где R^{21} выбран из группы, состоящей $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$; и

R^{22} представляет собой $-\text{CH}_2\text{NH}_2$;

и волнистые линии слева и справа показывают ковалентное присоединение к D_E и антителу или антигенсвязывающему фрагменту антитела, соответственно; и

S представляет собой атом серы цистеиновой тиольной группы антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела.

8. Способ лечения пациента, включающий введение пациенту эффективного количества гидрофильного соединения конъюгата лекарственное средство-лиганд по любому из пп.1-7,

где пациент имеет злокачественное новообразование, и где антиген клеточной поверхности, с которым специфически связывается антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела гидрофильного соединения конъюгата лекарственного средства-лиганд, представляет собой антиген злокачественной клетки.

9. Способ по п.8, где эффективное количество гидрофильного соединения конъюгата лекарственное средство-лиганд представляет собой дозу от 0,1 до 10 мг/кг.

10. Способ по п.8 или 9, где:

(а) индекс р составляет 8, и эффективная доза соединения конъюгата лекарственное средство-лиганд является такой же или меньшей, чем соединение конъюгата сравнения, где индекс р составляет 2;

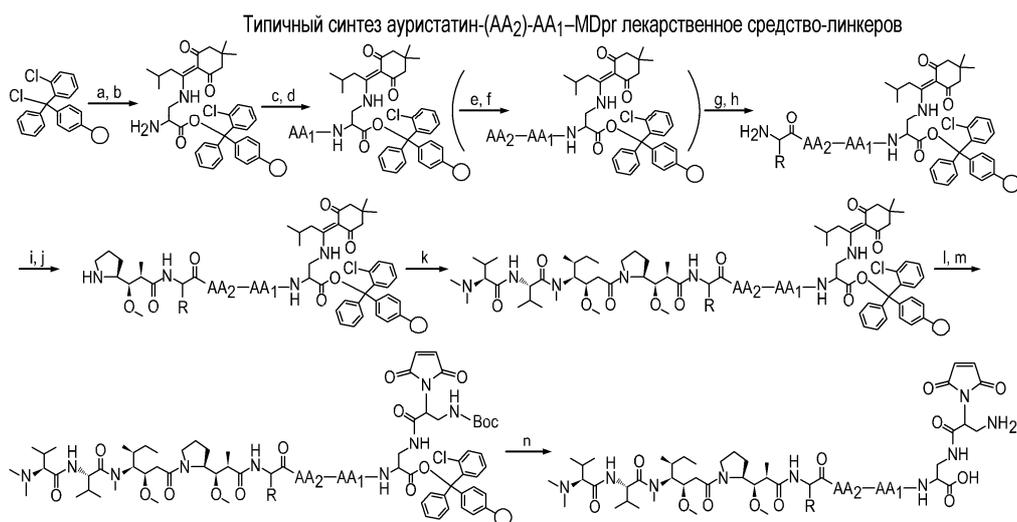
(б) индекс р составляет 8, и эффективная доза соединения конъюгата лекарственное средство-лиганд является такой же или меньшей, чем соединение конъюгата сравнения, где индекс р составляет 4;

где указанное введение гидрфильного соединения конъюгата лекарственное средство-лиганд и соединения конъюгата сравнения проводят по сопоставимой схеме.

11. Способ по любому из пп.8-10, где пациентом является человек.

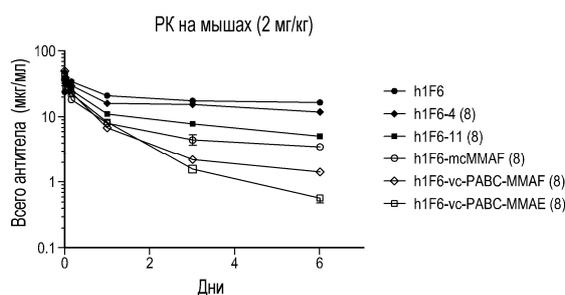
12. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество гидрофильного соединения конъюгата лекарственное средство-лиганд по любому из пп.1-7, и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или наполнитель.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, которая представляет собой стандартную инъекционную лекарственную форму для внутривенного введения пациенту.

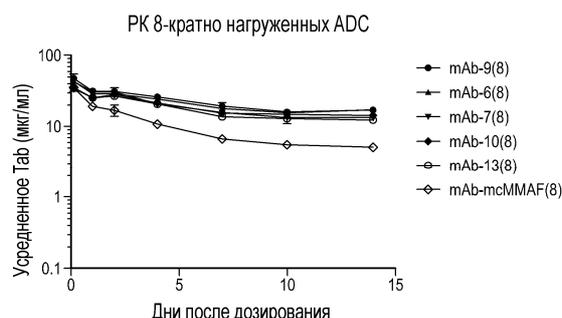


Условия реакции: (а) Fmoc-Dpr(ivDde)-OH (1.5 эквив.), DIEA (2.5 эквив.), CH₂Cl₂/DMF, 2 ч; (б) 20% пиперидин/DMF, 2 ч; (с) Fmoc-AA₁-OH (2 эквив.), HATU (2 эквив.) и DIEA (4 эквив.), DMF, 3 ч; (d) 20% пиперидин/DMF, 2 ч; (е, необязат.) Fmoc-AA₂-OH (2 эквив.), HATU (2 эквив.) и DIEA (4 эквив.), DMF, 3 ч; (f, необязат.) 20% пиперидин/DMF, 2 ч; (g) Fmoc-Phe-OH, или Fmoc-Met-OH, или Fmoc-Trp(Boc)-OH (2 эквив.), HATU (2 эквив.) и DIEA (4 эквив.), DMF, 3 ч; (h) 20% пиперидин/DMF, 2 ч; (i) Fmoc-Dap-OH (2 эквив.), HATU (2 эквив.) и DIEA (4 эквив.), DMF, 3 ч; (j) 20% пиперидин/DMF, 2 ч; (k) Dov-Val-Dil-OH (2 эквив.), HATU (2 эквив.) и DIEA (4 эквив.), DMF, 2 ч; (l) 2% гидразин/DMF, 2 ч; (m) MDrg(Boc)-OH (2 эквив.), DIEA (4 эквив.), CH₂Cl₂, 2 ч; (n) 20% TFA/CH₂Cl₂, 2 ч.

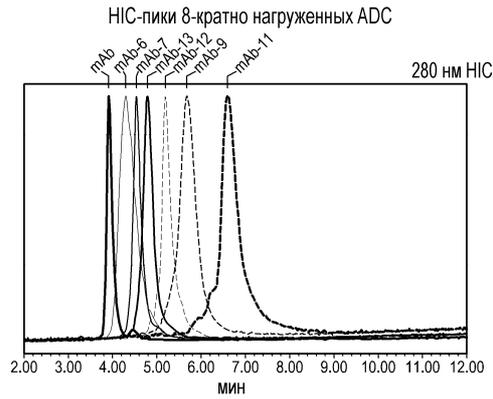
Фиг. 1



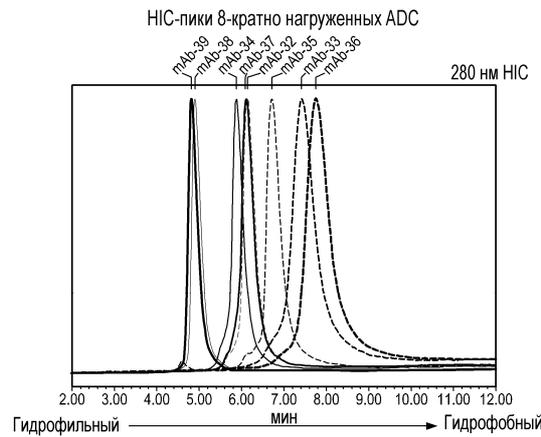
Фиг. 2



Фиг. 3

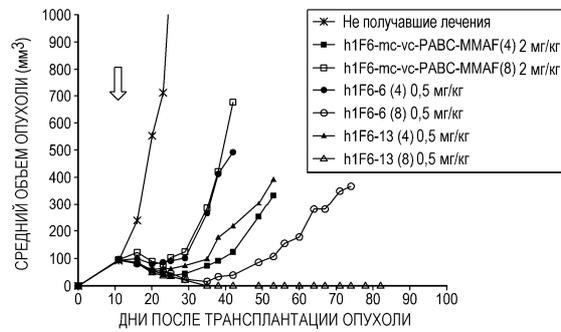


Фиг. 4



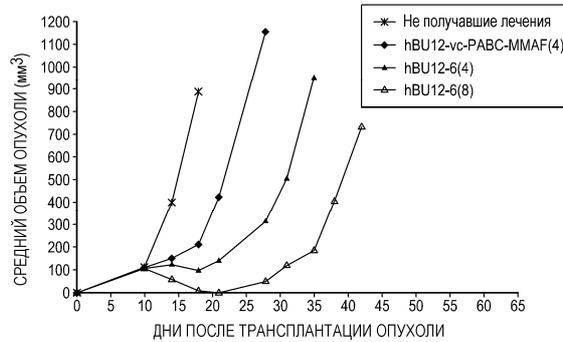
Фиг. 5

Сравнительная активность 4d/Ab и 8d/Ab ADC в опухолевой ксенотрансплантатной модели 7860, одна доза



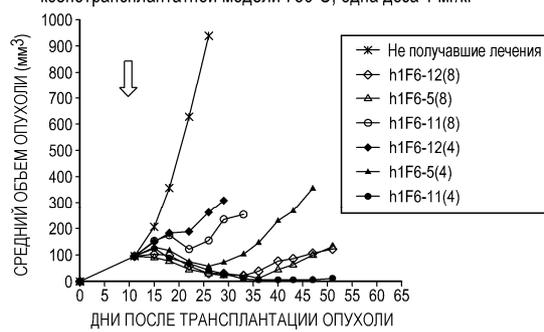
Фиг. 6

Активность 4- и 8-кратно нагруженного ADC на ксенотрансплантатах DONH2 (В-клеточная лимфома), одна доза 4 мг/кг



Фиг. 7

Эффективность 4- и 8-кратно нагруженных ADC в опухолевой ксенотрансплантатной модели 786-О, одна доза 1 мг/кг



Активность 4- и 8-кратно нагруженных, присоединенных с С-конца ауристатинов на ксенотрансплантатах RCC 786O у лысых мышей, одна доза 0,5 мг/кг

