



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **125311** (13) **C2**
(51) МПК (2022.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00
A61P 31/18 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2019 09898**

(22) Дата подання
заявки: **27.03.2018**

(24) Дата, з якої є
чинними права
інтелектуальної
власності: **17.02.2022**

(31) Номер
попередньої
заявки
відповідно до
Паризької
конвенції: **17163065.0**

(32) Дата подання
попередньої
заявки
відповідно до
Паризької
конвенції: **27.03.2017**

(33) Код держави-
учасниці
Паризької
конвенції, до
якої подано
попередню
заявку: **EP**

(41) Публікація
відомостей про
заявку: **26.12.2019, Бюл.№ 24**

(46) Публікація
відомостей про
державну
реєстрацію: **16.02.2022, Бюл.№ 7**

(86) Номер та дата
подання
міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ **PCT/EP2018/057744,
27.03.2018**

(72) Винахідник(и):

**Веші Лоредана (ІТ),
де Сантіс Ріта (ІТ),
Мілаццо Фердінандо Марія (ІТ),
Джанніні Джузеппе (ІТ),
Таддеї Мауріціо (ІТ),
Фальтоні Валентіна (ІТ),
Петріччі Елена (ІТ)**

(73) Володілець (володільці):

**АЛЬФАСІГМА С.П.А.,
Via Ragazzi del '99 n. 5, 40133 Bologna, Italy (ІТ)**

(74) Представник:

Бреус Наталія Володимирівна, реєстр. №167

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:

WO 2015/157595 A1, 15.10.2015
CHOI S ET AL, "Single chain variable fragment CD7 antibody conjugated PLGA/HDAC inhibitor immuno-nanoparticles: developing human T cell-specific nano-technology for delivery of therapeutic drugs targeting latent HIV", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, (20111130), vol. 152, no. suppl. 1, pages e9 - e10
Gianfranco Battistuzzi ET AL, "Current Bioactive Compounds", doi:10.2174/15734072126661605041605, (20161201), URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5101637/pdf/CBC-12-282.pdf>, (20170912)
LOREDANA VESCI ET AL, "Preclinical antitumor activity of ST7612AA1: a new oral thiol-based histone deacetylase (HDAC) inhibitor", ONCOTARGET, (20150320), vol. 6, no. 8, doi:10.18632/oncotarget.3240, pages 5735 - 5748
T. AI ET AL, "Multi-Targeted Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy", CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY : THE NEW INTERNATIONAL JOURNAL FOR TIMELY IN-DEPTH REVIEWS IN MEDICINAL CHEMISTRY, NL, (20120201), vol. 19, no. 4, pages 475 - 487
ALISON C. WEST ET AL, "The combination of histone deacetylase inhibitors with immune-stimulating antibodies has potent anti-cancer effects", ONCOIMMUNOLOGY, (20120501), vol. 1, no. 3, pages 377 - 379
WILLIAM GUERRANT ET AL, "Dual Targeting of Histone Deacetylase and Topoisomerase II with Novel Bifunctional Inhibitors", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, (20120223), vol. 55, no. 4, pages 1465 - 1477
IZA DENIS ET AL, "Vorinostat-Polymer Conjugate Nanoparticles for Acid-Responsive Delivery and Passive Tumor Targeting", BIOMACROMOLECULES, US, (20141107), vol. 15, no. 12, pages 4534 - 4543

UA 125311 C2

(54) КОН'ЮГАТИ АНТИТІЛО-ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ (КАЛС) НА ОСНОВІ ІНГІБІТОРІВ ГДАЦ І ЗАСТОСУВАННЯ В ТЕРАПІЇ

(57) Реферат:

Даний винахід стосується нових кон'югатів антитіло-лікарський засіб на основі інгібіторів гістондеацетилази (ІГДАЦ), зокрема, з антитілами, спрямованими на рецептори ErbB1, ErbB2 і ErbB3, фармацевтичних композицій, які містять зазначені антитіла, а також їх застосування в лікуванні раку або пухлини й інших захворювань, де модулювання однієї або більше ізоформ гістондеацетилази може бути ефективним для терапевтичних втручань.

Галузь техніки

Даний винахід стосується нових кон'югатів антитіло-лікарський засіб на основі інгібіторів гістондеацетилази (іГДАЦ), застосовуваних для лікування проліферативних захворювань. Винахід, зокрема, стосується кон'югата антитіло-лікарський засіб, який містить антитіло до рецепторів ErbB1, ErbB2, ErbB3 або споріднених молекулярних цілей. У винаході також представлені нові інгібітори ГДАЦ, які містяться в кон'югатах антитіло-лікарський засіб. Більше того, винахід стосується фармацевтичних композицій КАЛС і їх застосування в лікуванні раку або пухлин і інших захворювань, де модулювання однієї або більше ізоформ гістондеацетилази може бути ефективним для терапевтичних втручань.

Рівень техніки

Медичні дослідження сфокусовані на персоналізованій медицині для лікування раку, неврологічних розладів, запальних захворювань і вірусних інфекцій. На даний час, знання про зв'язки між генетичними змінами й людськими захворюваннями дозволяють більше розуміння їх етіології.

Епігенетичні аберації можуть сприяти виникненню й прогресуванню вищезгаданих захворювань людини за допомогою посилення або втрати функції епігенетичних регуляторних білків. (Berdasco, 2013, Hum. Genet. 132:359-83), тому що більше 1750 білків у клітинах людини можуть бути посттрансляційно модифіковані на лізінних залишках через ацетилювання й деацетилювання (Choudhary, 2009, Science, 325:834-40). Деацетилюючі ферменти вважаються цінними цілями для лікування аберантного деацетилювання, пов'язаного з раком, а також для різних інших захворювань, таких як неврологічні розлади, запалення, вірусні інфекції й серцево-судинні розлади (Minucci, 2006, Nature Rev. Cancer, 6:38-51; Glozak, 2007, Oncogene, 26:5420-32; Zhang, 2015, Med. Res. Rev. 35:63-84; Dinarello, 2010, Mol. Med. 17:333-52).

На даний час декілька іГДАЦ були схвалені FDA: вориностат (Zolinza®; Merck) для лікування резистентної шкірної Т-клітинної лімфоми (CTCL) (Duvic, 2007, Blood, 109:31-39); ромідепсин (Istodax®; Celgene) для лікування CTCL і периферичної Т-клітинної лімфоми (PTCL) (VanderMolen, 2011, J. Antibiot (Tokyo), 64:525-531) і беліностат (Beleodaq®; Spectrum Pharmaceuticals) для лікування PTCL (West, 2014, J. Clin. Invest. 124:30-39). На початку 2015 пероральний ранобіностат (Farydak®, Novartis) був схвалений FDA як комбінована терапія з бортезомібом і дексаметазоном у пацієнтів з рецидивуючою множинною мієломою (Gamock-Jones K.P. (2015), Drugs. 75:695-704). Знову, у січні 2015, перорально доступний низькомолекулярний бензамід інгібітор ГДАЦ1, 2, 3 і 10 хідамід (Epidaza®, Shenzhen Chipscreen Biosciences (розробник) ліцензований HUYA Bioscience) був схвалений китайським FDA для лікування раку прямої і ободової кишки й легені, а також для лікування рецидивуючої або рефракторної PTCL (Ruolan Gu (2015), Journal of Chromatography B, 1000:181-186).

Інгібітори ГДАЦ (іГДАЦ) найбільш вивчені як протиракові агенти, але існує зростаюча кількість літератури, яка описує ферменти ГДАЦ як такі, що відіграють найважливішу роль в інших захворюваннях, таких як неврологічні розлади, запальні процеси й вірусні інфекції (Dinarello, 2010, Cell, 140:935-950; Gray, 2011, Epigenomics, 3:431-450; Giannini, 2012, Future Med. Chem. 4:1439-60).

В WO 2015/157595 описані кон'югати цистеїн-інженерних антитіл і гетерологічної групи. Як гетерологічна група згадані лікарські засоби, і серед лікарських засобів зазначені інгібітори гістондеацетилази (ГДАЦ).

В Choi S. et al. in J. Control. Release, 152, suppl.1, 2011, e9-e10a, описаний генеричний кон'югат іГДАЦ з CD7 антитілом через наночастинки PLGA. Кон'югат зможе доставити інгібітори ГДАЦ до Т-клітин людини, з CD7 рецептором яєчників. У цьому документі не описані які-небудь специфічні кон'югати.

В Battistuzzi G. et al. in Current Bioactive Compounds 12, 2016, 282-288, описані чотири стадії синтезу інгібітору ГДАЦ, який є похідним тіолу. У цьому документі відсутня інформація по застосуванню цієї сполуки для одержання інших фармацевтичних сполук.

В Ai T. et al. in Current Med. Chem. 2012, 19, 475, описане застосування іГДАЦ з протираковим і синергетичним ефектом. Там описані похідні інгібітору ГДАЦ з фолієвою кислотою, ретиноевою кислотою, агентами на основі платини, інгібіторами протеїнкінази й інгібіторами інозинмонофосфатдегідрогенази.

В West A.C. et al. in Oncoimmunology 1, 2012, 376, описане застосування сполучення інгібіторів ГДАЦ з імуностимулюючими антитілами як протиракового лікарського засобу.

Зокрема, ГДАЦ1, 2 і 3, переважно ядерні, були знайдені, особливо на пізній стадії, в пухлинних клітинах агресивних злоякісних новоутворень, і вони корелюють з низькою виживаністю (Gryder, 2012, Future Med. Chem. 4:505-24); ГДАЦ6 з первинною клітинною локалізацією в цитоплазмі регулюють стани ацетилювання, і тому функціональність тубуліну,

HSP90 і інших екстрацелюлярних білків, тим самим підтверджуючи їх залучення у видалення неправильно згорнутих білків у клітинах, рухливість клітин і метастатичний потенціал (Clawson, 2016, *Ann. Transl. Med.* 4:287).

Ізоформи ГДАЦ (2, 3, 6, 9, 10) також залучені в хронічне кишкове запалення, тому інгібітори ГДАЦ, на доповнення до індукції апоптозу в пухлинних клітинах, можуть застосовуватися для хвороби запаленого кишечника (Felice, 2015, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 41:26-38).

Нещодавно був описаний новий клас ефективних пан-іГДАЦ на основі тіолу (Giannini, 2014, *J. Med. Chem.* 57:8358-77), де ефективний інгібітор ГДАЦ, ST7612AA1, вибирають як лікарський кандидат, що характеризується широким спектром активності проти солідних і гематологічних злоякісних новоутворень у людини.

ST7612AA1 демонструє особливість інгібувати ріст декількох пухлин, таких як Рамутантано карцинома товстої кишки, підвид сильно проліферуючого дедиференційованого раку товстої кишки, асоційований зі зниженою виживаністю пацієнта; недрібноклітинні пухлини легень з диким типом EGFR (і мутантним KRAS) і мутацією T790 EGFR; рак яєчників з низькими рівнями PTEN і надекспресією ErbB1 і ErbB2 або рак яєчників без PTEN; рак молочної залози з потріпним негативним фенотипом (TNBC), визначений відсутністю рецептора естрогену, рецептора прогестерону й ErbB2; гострий мієлоїдний лейкоз, дифузна В-великоклітинна лімфома. Більше того, ST7612AA1 показав здатність модулювати деякі транскрипти, залучені в імунну реакцію й у ключові патогенетичні шляхи, такі як NF-κB-шлях, і епітеліально-мезенхімальний перехід (ЕМП), таким чином пропонуючи відповідне залучення не тільки в рак, але й у запальні захворювання (Vesci, 2015, *Oncotarget*, 20:5735-48).

Дія ST7612AA1 виявляється проти ядерних і цитоплазматичних ізоформ ГДАЦ пухлинних клітин, що приводить до підвищеної транскрипції е-кадгерину, кератинів і інших типових епітеліальних маркерів і, паралельно, пригнічення віментину й інших генів, асоційованих з мезенхімальним фенотипом. Ці дані дозволяють передбачити, що лікування ST7612AA1 може викликати "кадгеринове перемикання" і зворотну мутацію процесу епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП), сприяючи диференціації клітин. Здатність клітин трансдиференціювати і дедиференціювати відіграє ключову роль в інвазії й метастазах через процес ЕМП, і диференціація може застосовуватися як додатковий прогностичний індикатор терапевтичної ефективності. Через інгібування ГДАЦ6, ST7612AA1 також здатний уражувати негістонові субстрати ГДАЦ, наприклад TP53, альфа-тубулін або білок температурного шоку 90 (HSP90), залучений у подачу сигналу ушкодження ДНК, зв'язування фактора транскрипції, молекулярний гомеостаз і процеси відновлення ДНК.

Було доведено, що ST7612AA1 здатний викликати реактивацію ВІЛ, будучи потенційно корисним для нових терапій, орієнтованих на знищення вірусних резервуарів (Badia, 2015, *Antiviral. Res.* 123:62-9).

Для поліпшення пухлинної специфічності й зниження токсичності, нещодавно кон'югати антитіло-лікарський засіб стали клінічно підтвердженим методом лікування раку. Хоча були досягнуті значні успіхи в лікуванні гематологічних пухлин, проблеми залишаються в більш складних для лікування солідних формах раку.

Кон'югати антитіло-лікарський засіб (КАЛС) є швидко зростаючим класом протиракових лікарських засобів, які об'єднують цільові властивості mAbs з протипухлинною дією ефективних цитотоксичних лікарських засобів (Leal M., 2014, *Ann. NY Acad. Sci.* 1321:41-54).

На даний час інгібітори мікротрубочок є клінічно підтвердженими корисними КАЛС. Кадцила (Трастузумаб емтанзин; Genentech), Адцетрис (брентуксимаб ведотин; Seattle Genetics), Беспона (Інотузумаб озогаміцин; Pfizer) і Мілотарг (Гемтузумаб Озогаміцин; Pfizer) є схваленими FDA терапевтичними агентами КАЛС, і більше 40 інших КАЛС передані в клініку (Okeley, 2014, *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 28:13-25; Baron, 2015, *J. Oncol. Pharm. Pract.* 21:132-42).

Корисні навантаження, на даний час застосовувані в КАЛС, є високоефективними цитотоксичними лікарськими засобами, що виявляють дію на критичні клітинні процеси, необхідні для виживання. Високоефективні інгібітори мікротрубочок, такі як похідні майтанзину (DM1/DM4) або ауристатини (MMAE/MMAF), переважають на поточному полі КАЛС. Вони звичайно викликають апоптоз у клітинах, що переносять мітоз через зупинення клітинного циклу на G2/M. Більш свіжі роботи показують, що інгібітори мікротрубочок також руйнують клітини, що не діляться, в інтерфазі. Ці відкриття надають пояснення того, як інгібітори мікротрубочок також є цитотоксичними до пухлинних клітин, що повільно реплікують або не діляться, демонструючи значну токсичність. Інші класи цитотоксичних лікарських засобів, застосовувані в КАЛС, включають енедіїни (каліхеаміцин), похідні дуокарміцину, піролобензодіазепіни (ПБД) і індолінобензодіазепіни, усі з яких уражують малу борозенку ДНК, і алкалоїди хіноліну (SN-38),

які інгібують топоізомеразу I. Таким чином, основна частина корисних навантажень, на даний час застосовуваних у КАЛС, є високоефективними, часто цитотоксичними в пікомолярному інтервалі, що вважається вимогою до стратегії КАЛС, тому що тільки дуже незначна кількість (<1 %) ін'єктованої дози КАЛС локалізується в пухлинах (Bornstein, 2015, AAPS Journal, 17:525-34; Casi and Neri, 2015, J. Med. Chem. 58:8751-61).

Вважається, що основна токсичність КАЛС походить з виділення корисного навантаження через нестабільність лінкера. Нормальні клітини, що швидко діляться, такі як клітини, що вистилають травний тракт, клітини у волоссяних фолікулах і мієлоїдні клітини, схильні до токсичності від виділених інгібіторів мікротрубочок, що викликає шлунково-кишкові симптоми, втрату волосся й мієлодепресію. Деякі ключові токсичності були знайдені для різних корисних навантажень. Зокрема, MMAE викликають периферичну невропатію й нейтропенію; MMAF пов'язані з тромбоцитопенією і очною токсичністю; DM1 викликають шлунково-кишкові проблеми, а також тромбоцитопенію й нейтропенію, залежно від лінкера й наступних метаболітів; очна токсичність є найбільш частим побічним ефектом для DM4-кон'югованих КАЛС; каліхеаміцин викликає тромбоцитопенію й печінкову дисфункцію; і раннє призначення кон'югованих лікарських засобів SN-38 передбачає нейтропенію як часту токсичність.

Можливою стратегією мінімізації токсичності КАЛС наступного покоління є селекція низькотоксичних корисних навантажень.

Даний винахід несподівано демонструє, що кон'югати антитіло-лікарський засіб, одержані з антипухлинного антитіла, кон'югованого з лікарським засобом з низькою токсичністю, такі як іГДАЦ, можуть показувати чудову ефективність *in vivo*. Більше того, застосування епігенетичних модуляторів (тобто іГДАЦ) для побудови КАЛС надає перший у своєму класі приклад у цій галузі. Подібно інгібіторам ГДАЦ, можуть застосовуватися інші епігенетичні модулятори, які модулюють експресію гена без зміни базової послідовності ДНК, такі як інгібітори метилтрансферази ДНК (азацитидин і децитабін) (Pachaiyappan, 2014, Bioorg. and Med. Chem. Lett. 24:21-32).

Кон'югат антитіло-лікарський засіб також має гарну стабільність у крові й рідинах тіла і чудову протиракову дію, маючи низьку токсичність у порівнянні з кон'югатами антитіло-лікарський засіб відомого рівня техніки.

Тому об'єктом даного винаходу є одержання кон'югата антитіло-лікарський засіб, який містить безпечний протираковий лікарський засіб, кон'югований з антитілом. Іншим об'єктом даного винаходу є створення способу одержання зазначеного кон'югата антитіло-лікарський засіб (КАЛС).

Іншим об'єктом даного винаходу є одержання фармацевтичної композиції, яка містить зазначений кон'югат антитіло-лікарський засіб.

Ще одним об'єктом даного винаходу є одержання зазначеного кон'югата антитіло-лікарський засіб для застосування в лікуванні раку або пухлини й інших захворювань, де модулювання однієї або більше ізоформ гістондеацетилази може бути ефективним для терапевтичних втручань.

Зокрема, інші захворювання, такі як метаболічні розлади, аутизм або захворювання, пов'язані з запаленням, такі як ушкодження легені, аутоімунне захворювання, астма й діабет 2 типу, які демонструють аберантну експресію гена й епігенетичне регулювання під час їх виникнення, можуть бути залучені (Samanta, 2017, Biochim. Biophys. Acta, 1863:518-28; Akhtar, 2013, Plos One 8:e67813; Mei, 2014, Neuron. 83:27-49). Епігенетичні модифікатори, спрямовані на метилювання ДНК і ферменти гістонового деацетилювання, можуть бути джерелом для лікування патогенезу цих захворювань.

Суть винаходу

Даний винахід стосується кон'югатів антитіло-лікарський засіб формули (I)

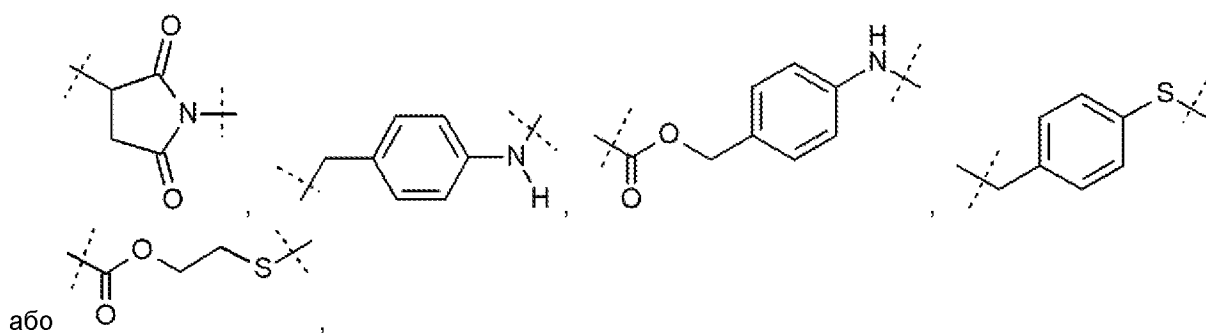
$D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)_o-(CG)_p-Ab$

(формула I)

або їх фармацевтично прийнятної солі, де

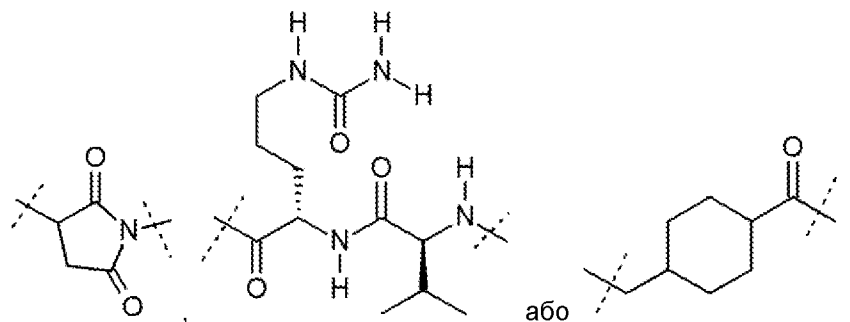
D є цитотоксичним лікарським засобом (також називаним боєголовка), інгібітором гістондеацетилази, який містить бензамідні, гідроксаматні або тіольні групи як групу, що зв'язує цинк (ГЗЦ),

CU є сполучною одиницею, яка може бути відсутня або яку вибирають з



5

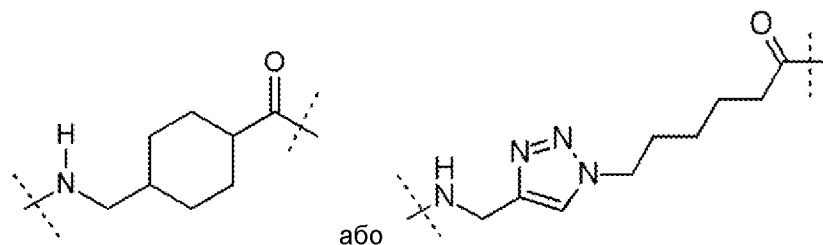
S1 є спейсером і може бути відсутній або є



10

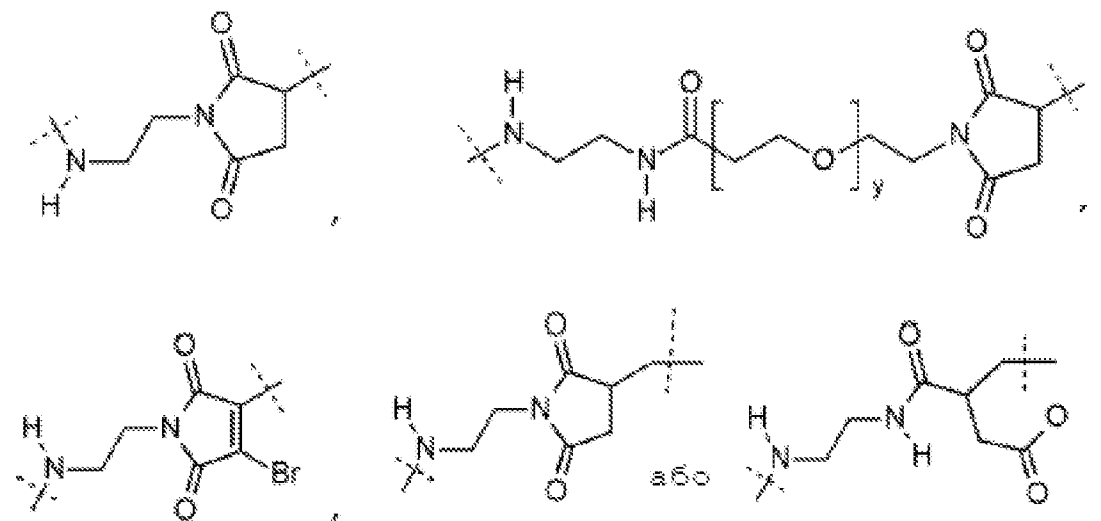
L є лінкером, який вибирають з $(\text{CH}_2)_q\text{-CO}$, $\text{NH-(CH}_2)_r\text{-(ПЕГ)}_s\text{-(CH}_2)_w\text{-CO}$, $\text{NH-CO-(CH}_2)_r\text{-(ПЕГ)}_s\text{-X-(CH}_2)_w\text{-CO}$, де X може бути відсутній, є NH або O, q є цілим числом 2-8, r може бути відсутній або є цілим числом 1-4, s може бути відсутній або є цілим числом 1-6, і w може бути відсутній або є цілим числом 1-2,

S2 є спейсером і може бути відсутній або є



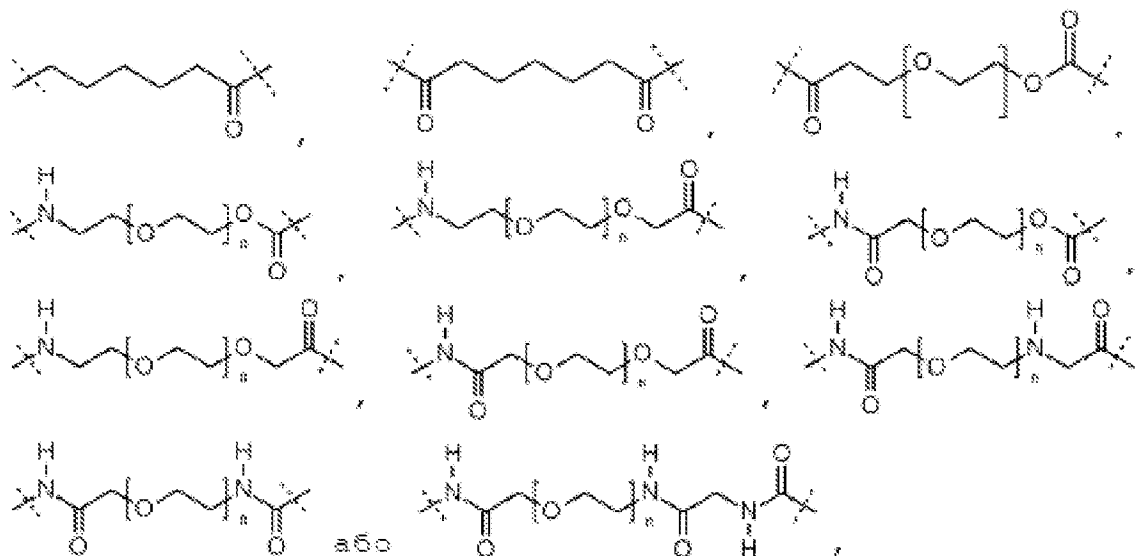
15

CG є сполучною групою, одержаною після кон'югування з цистеїнтіол- або лізінаміногрупами антитіл, яка може бути відсутня або є однією з наступних груп:



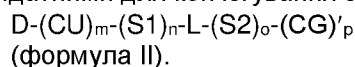
де у є цілим числом від 0 до 8,
 Аб є антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, і
 m, n, o і p є цілими числами 0 або 1.

5 Лінкер (L) переважно вибирають з



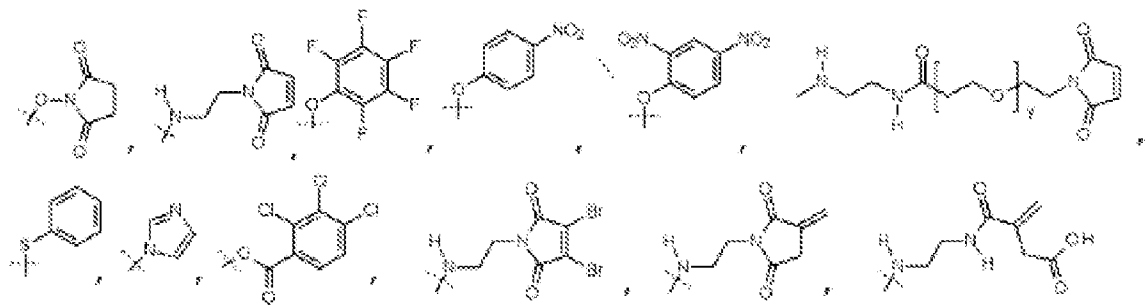
де n є цілим числом 2-5.

10 Зокрема, корисним навантаженням є токсин (інгібітор ГДАЦ), з'єднаний з придатним лінкером/спейсером, який закінчується групами (тобто maleimide, складними ефірами NHS), придатними для кон'югування з антитілами, і містить наступну частину формули I:



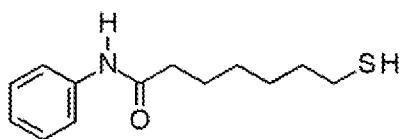
15 У даному винаході, (CG)' у корисних навантаженнях формули II може бути NHS (N-гідроксисукцинімід) або активоване ацильне похідне (включаючи пентафторфеніловий ефір, п-нітро й 2,4-динітрофеноловий ефір, тіофеноловий ефір, ацилімідазол, ізобутилкарбонат, трихлорбензойний ангідрид) або maleimide- або {амінокарбоніл}-3-бутенова кислота наступних формул:

20



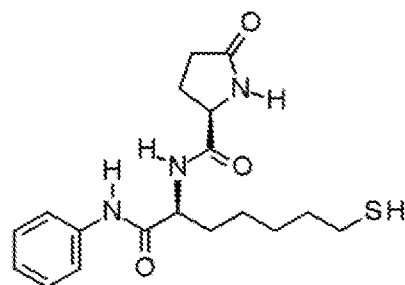
Зокрема, даний винахід стосується КАЛС, які мають як боєголовку інгібітор ГДАЦ, який вибирають з тіольних інгібіторів гістондеацетилази, таких як ST7464AA1 і ST7660AA1 (тіольний аналог воріностату), що мають наступні формули:

25



ST7660AA1

тіольний аналог SAHA (Вориностат)

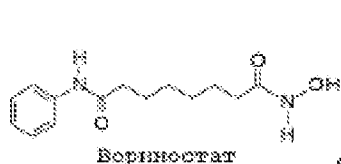


ST7464AA1

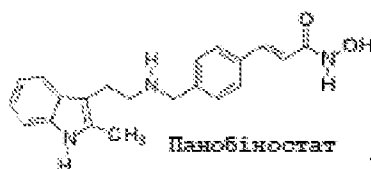
тіол (активний лікарський засіб) відповідного тіоацетилу ST7612AA1 (проліки)

або з інгібіторів гістондеацетилази на основі гідроксамінової кислоти (ГДАЦ), таких як вориностат (SAHA), панобіностат (LBH589) або дацिनостат (LAQ824), що мають наступні формули:

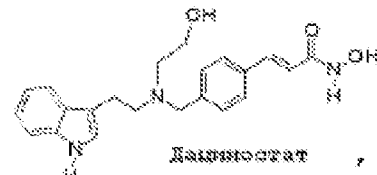
5



Вориностат



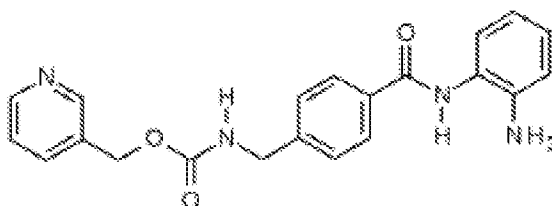
Панобіностат



Дацिनостат

або з бензамідних інгібіторів гістондеацетилази (ГДАЦ), таких як ентиностат (MS275), що має наступну формулу:

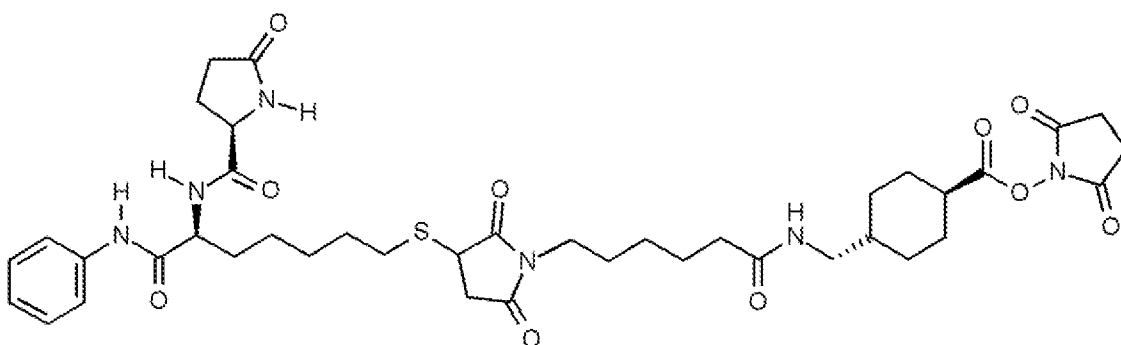
10



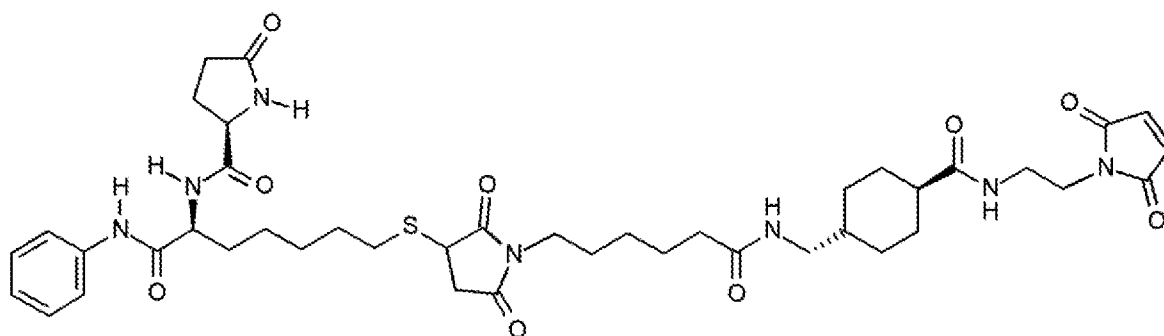
Ентиностат

Інгібітором гістондеацетилази й корисним навантаженням, що містить $D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)-(CG)'_p$ (формула II), може бути сполука, вибрана з:

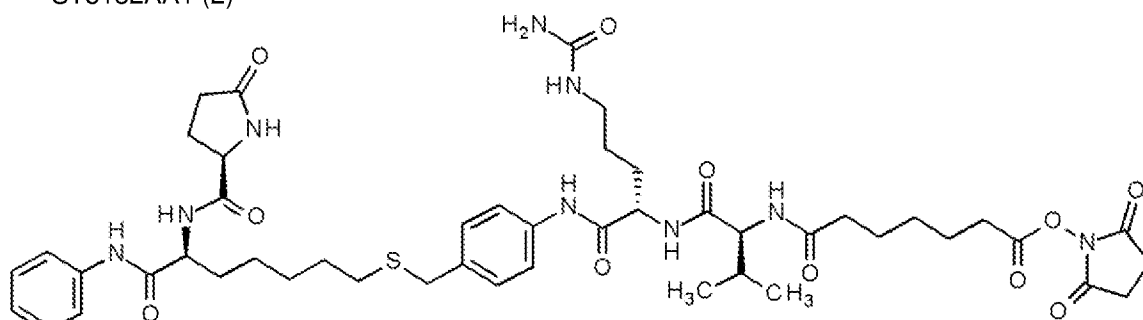
15



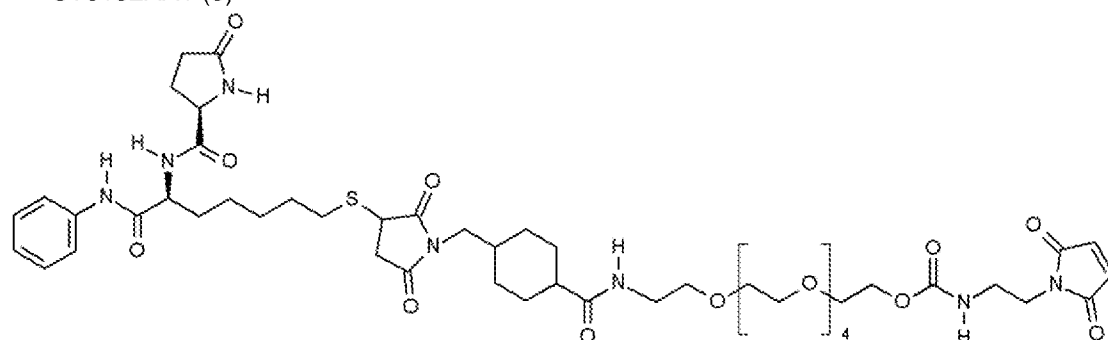
ST8128AA1 (1)



ST8152AA1 (2)

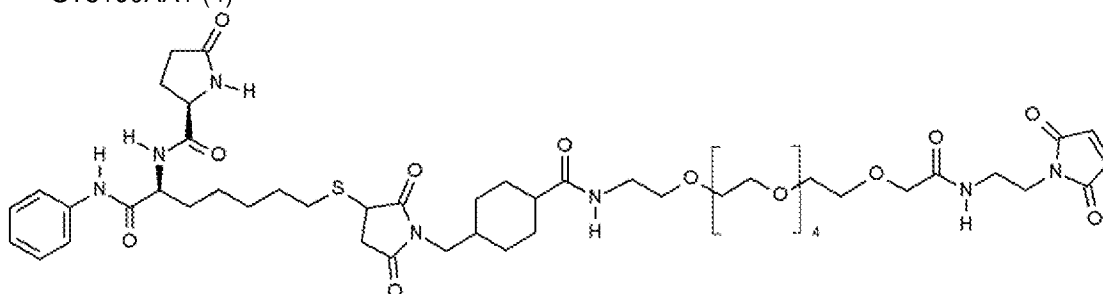


ST8132AA1 (3)

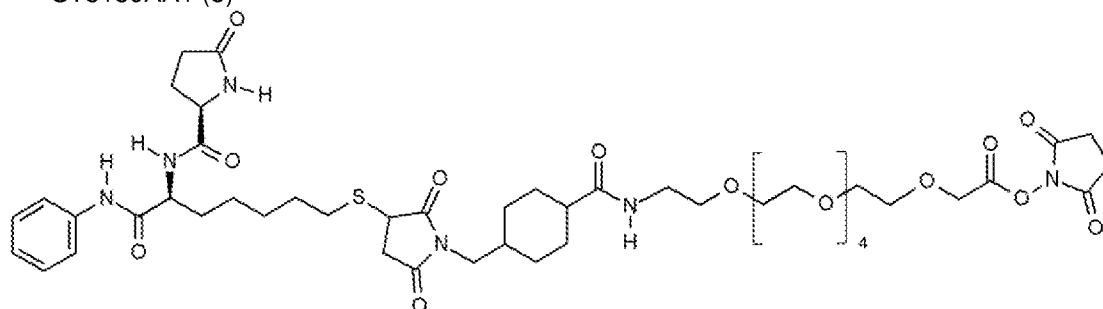


5

ST8190AA1 (4)

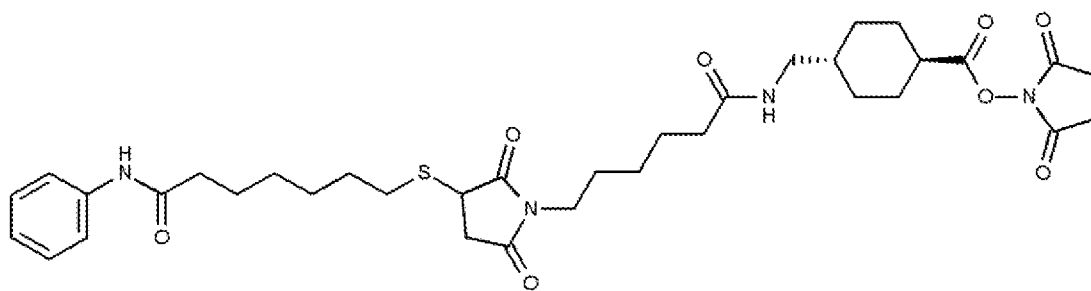


ST8189AA1 (5)

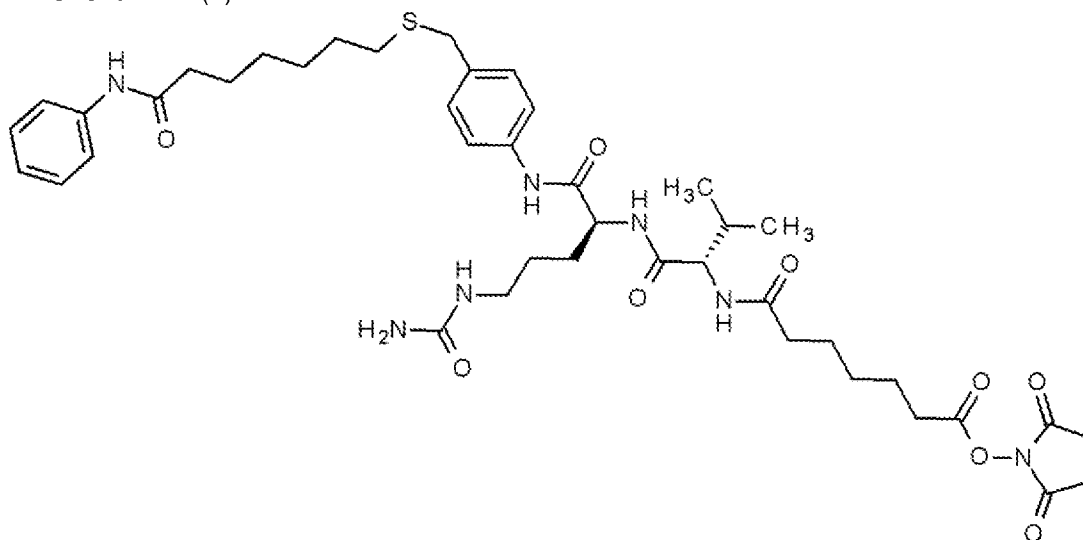


10

ST8191AA1 (6)



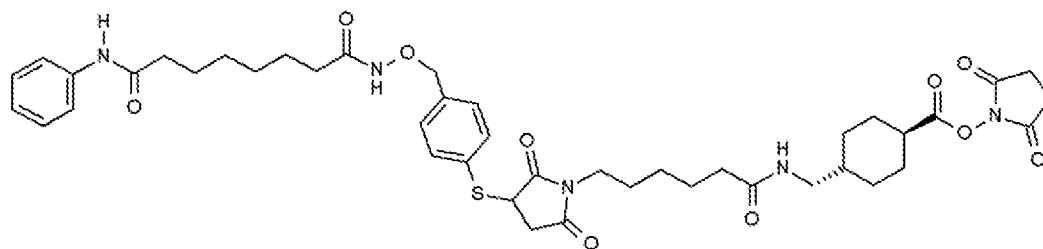
ST8197AA1 (7)



ST8235AA1 (8)

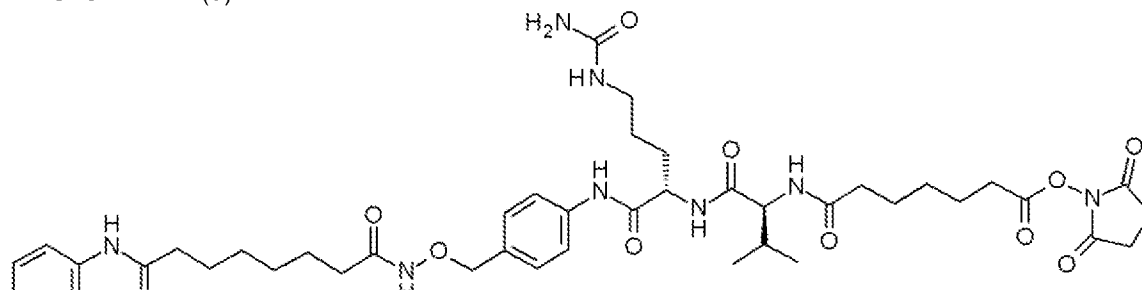
5

В іншому варіанті, винахід стосується кон'югатів антитіло-лікарський засіб, де інгібітор гістондеацетилази й корисне навантаження, що містить структуру $D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)-(CG)'_p$, вибирають з:

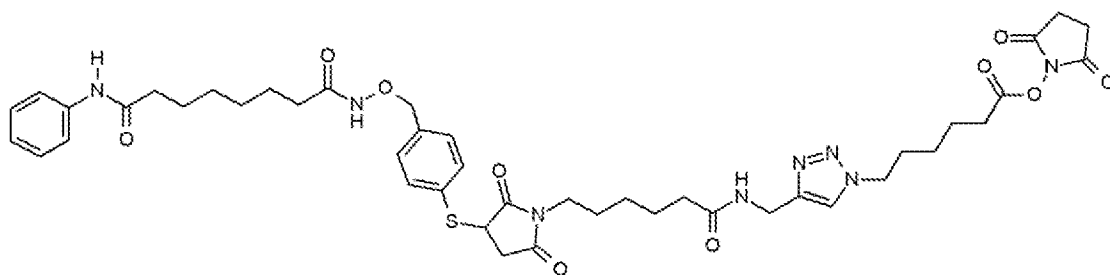


10

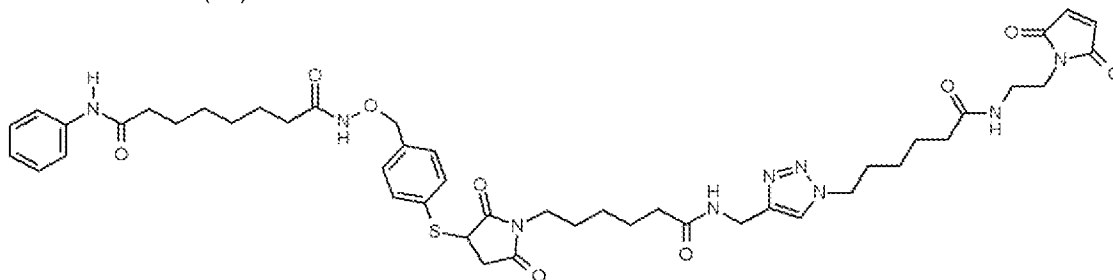
ST8217AA1 (9)



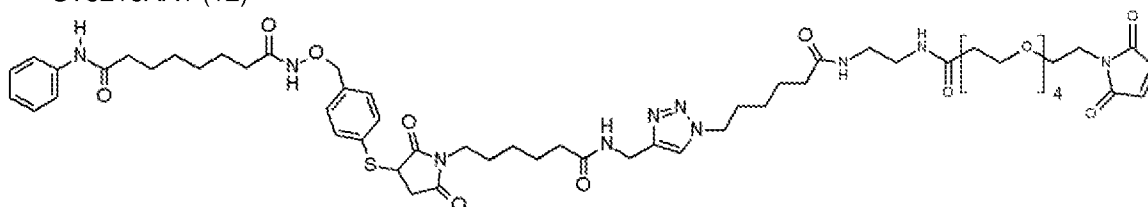
ST8201AA1 (10)



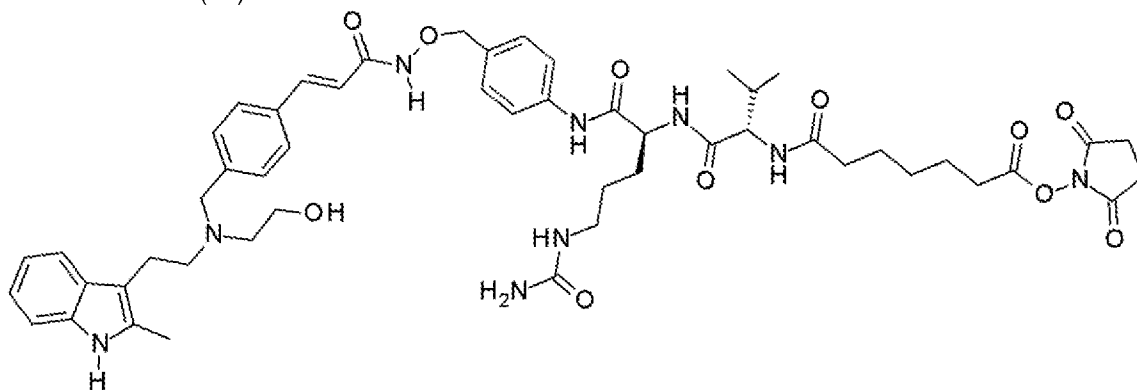
ST8215AA1 (11)



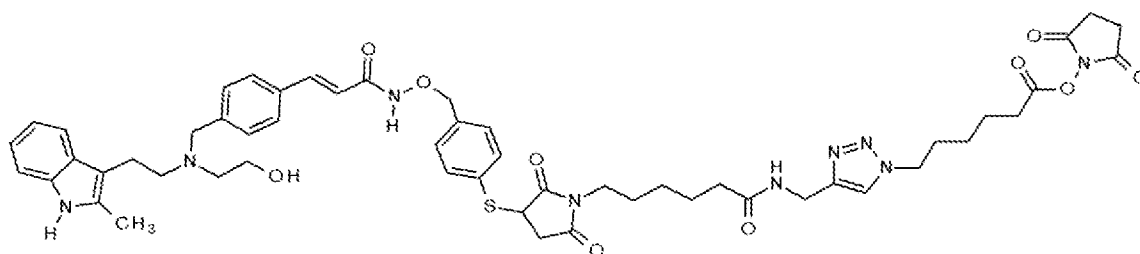
ST8216AA1 (12)



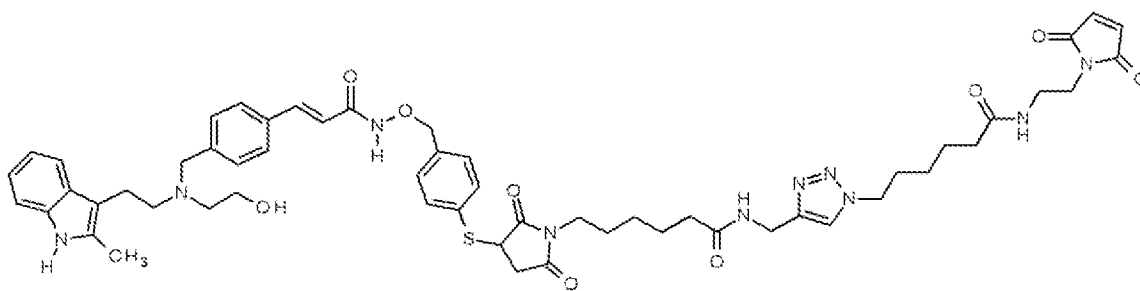
ST8236AA1 (13)



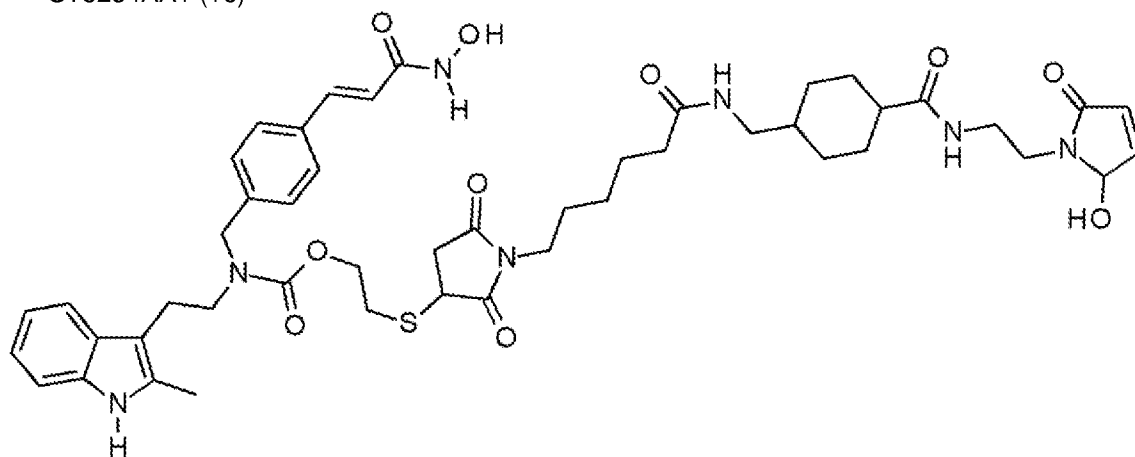
ST8232AA1 (14)



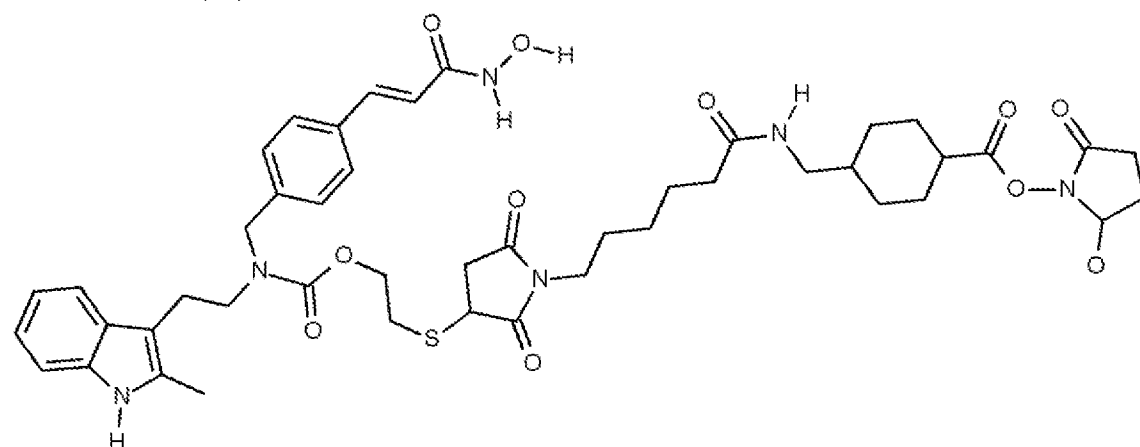
ST8233AA1 (15)



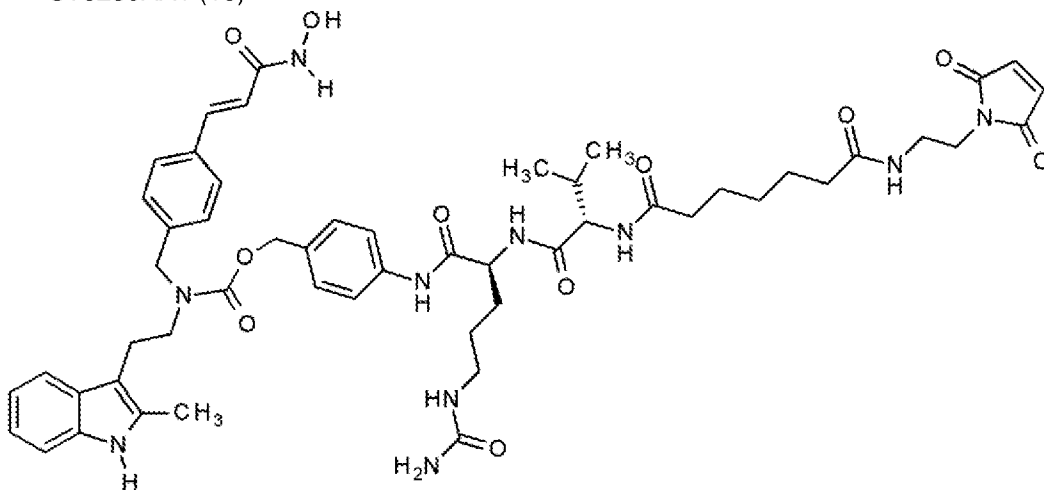
ST8234AA1 (16)



ST8229AA1 (17)



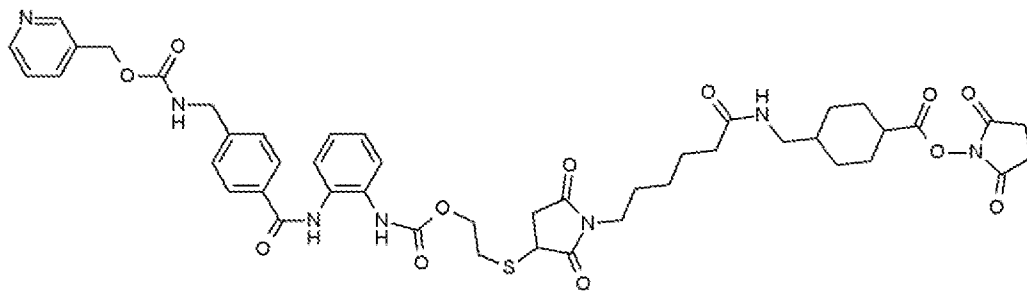
ST8230AA1 (18)



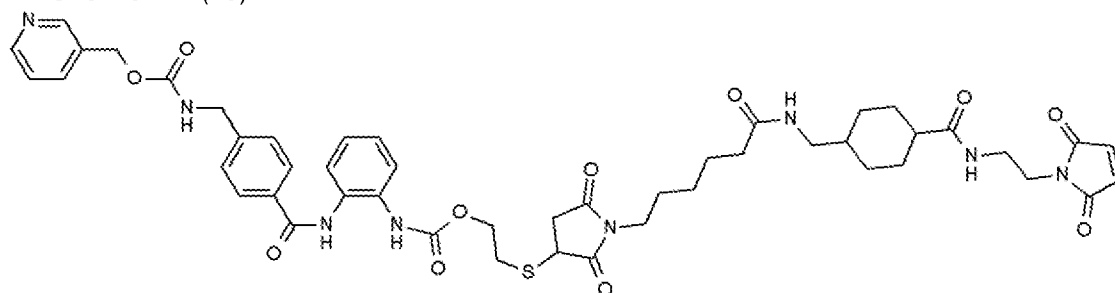
ST8231AA1 (19)

В іншому варіанті, винахід стосується кон'югатів корисне навантаження-лікарський засіб, де кон'югат корисне навантаження-лікарський засіб вибирають з:

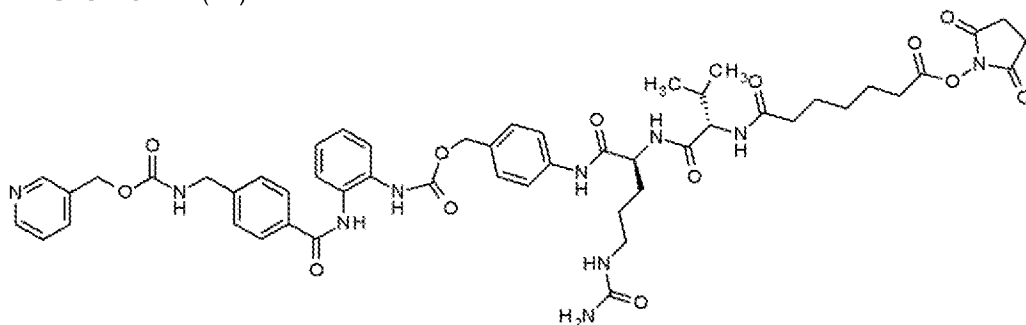
5



ST8225AA1 (20)

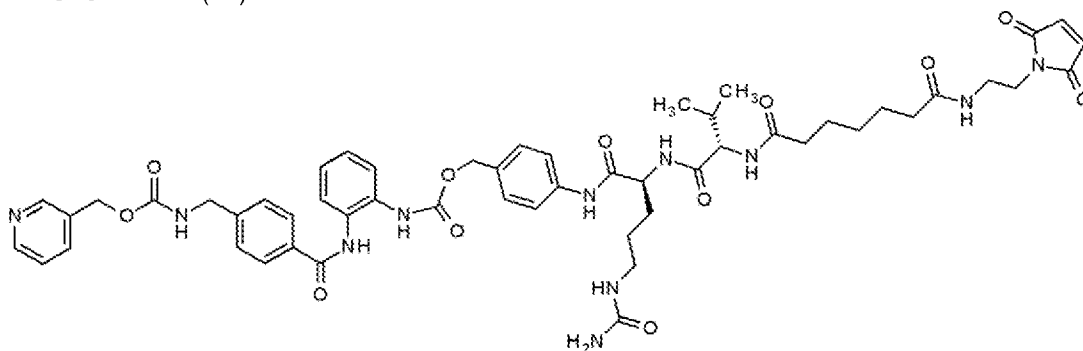


ST8226AA1 (21)



10

ST8227AA1 (22)

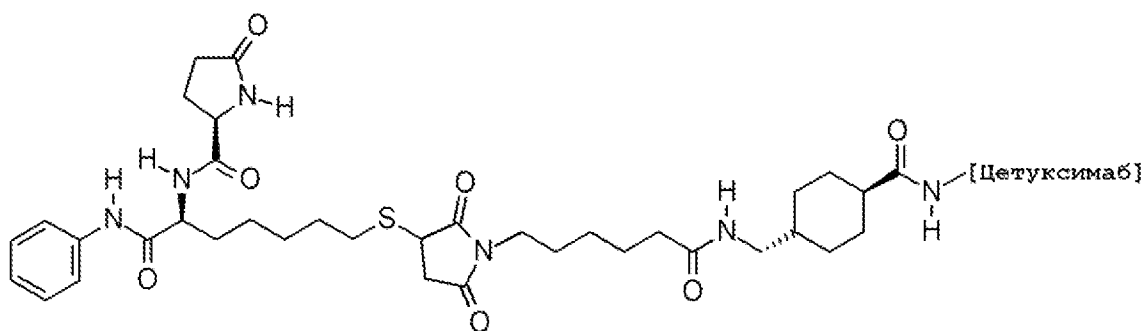


ST8228AA1 (23)

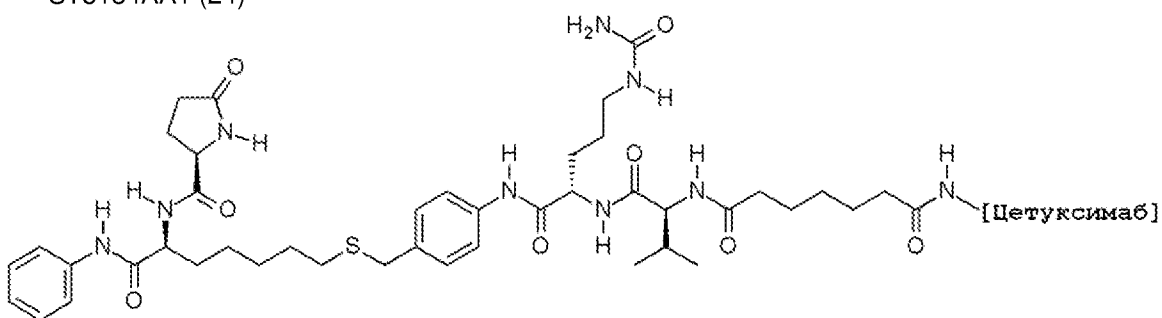
15

В іншому варіанті винаходу, кон'югат антитіло-лікарський засіб (КАЛС) одержують зі сполук 1-23.

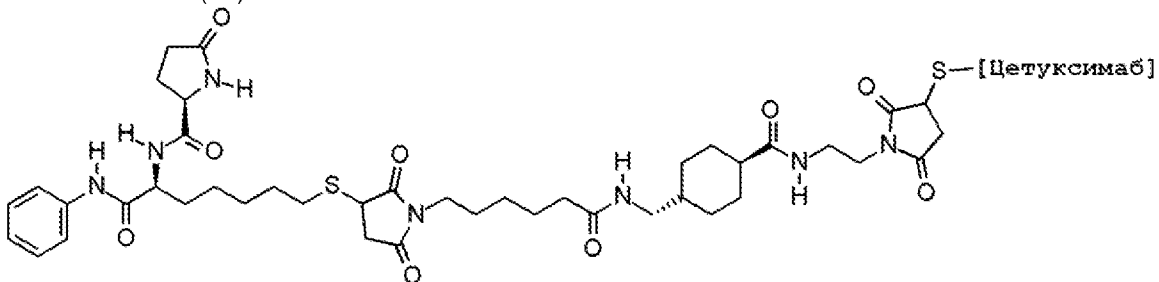
В іншому варіанті, КАЛС вибирають зі сполук, представлених формулами 24-37:



ST8154AA1 (24)

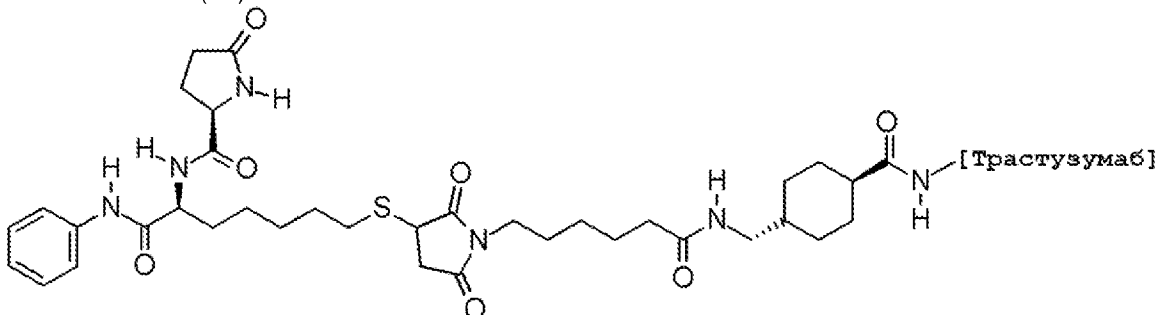


ST8155AA1 (25)

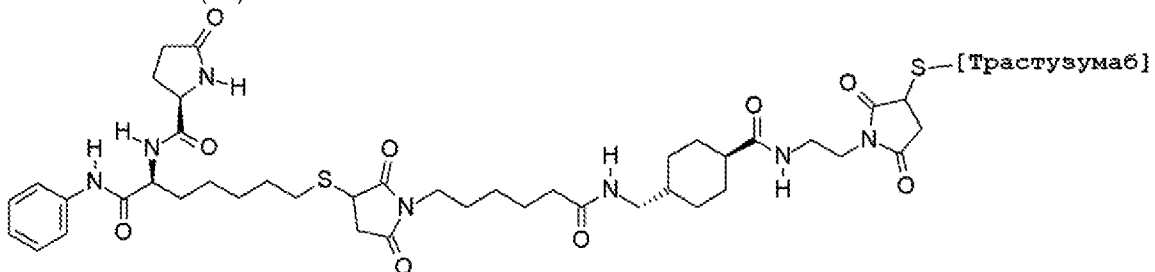


5

ST8177AA1 (26)

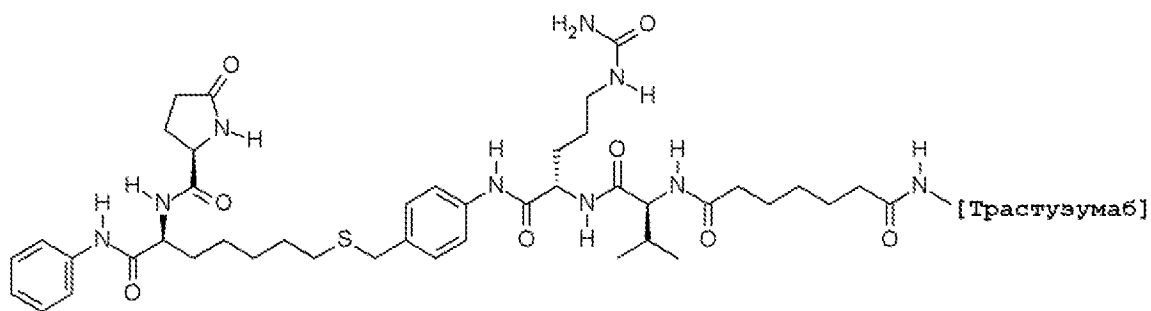


ST8178AA1 (27)

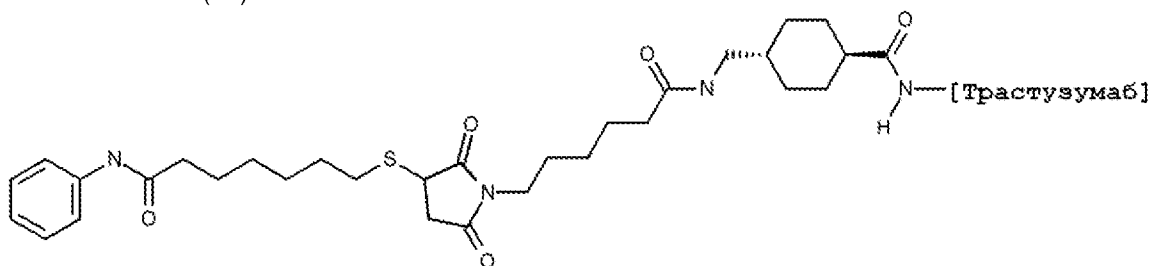


10

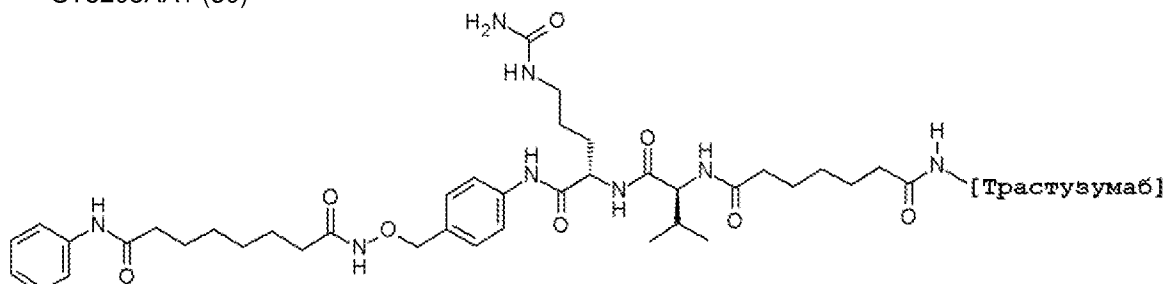
ST8176AA1 (28)



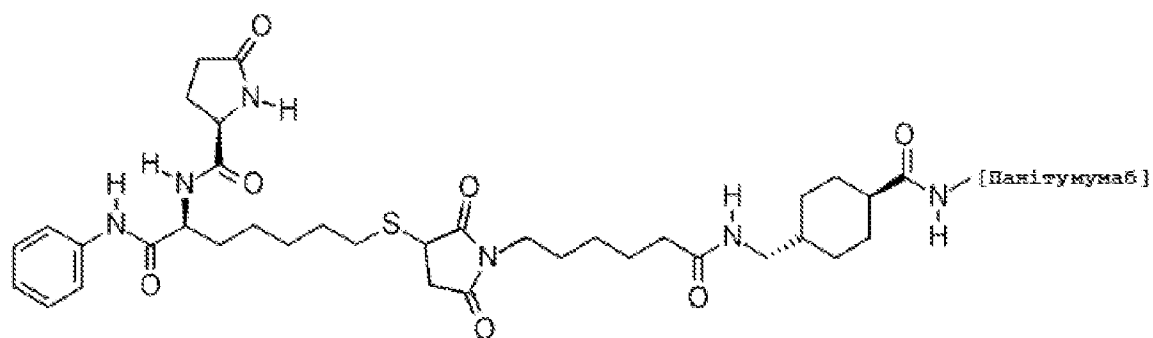
ST8179AA1 (29)



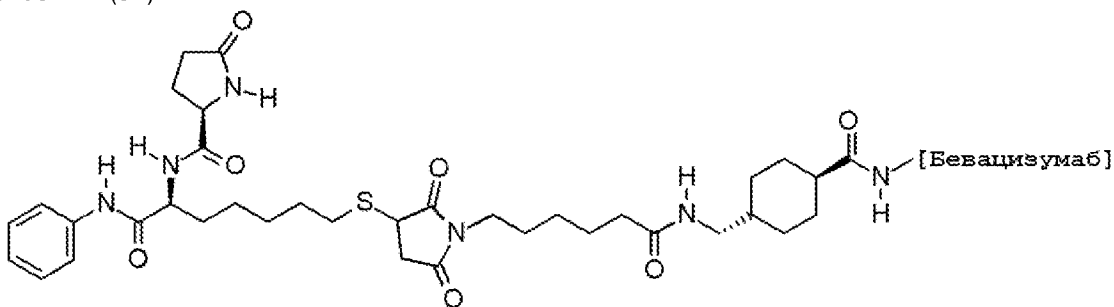
ST8205AA1 (30)



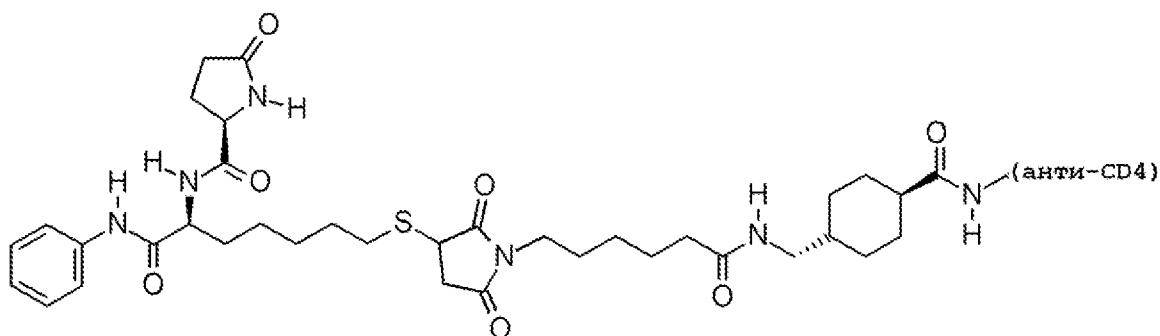
ST8202AA1 (31)



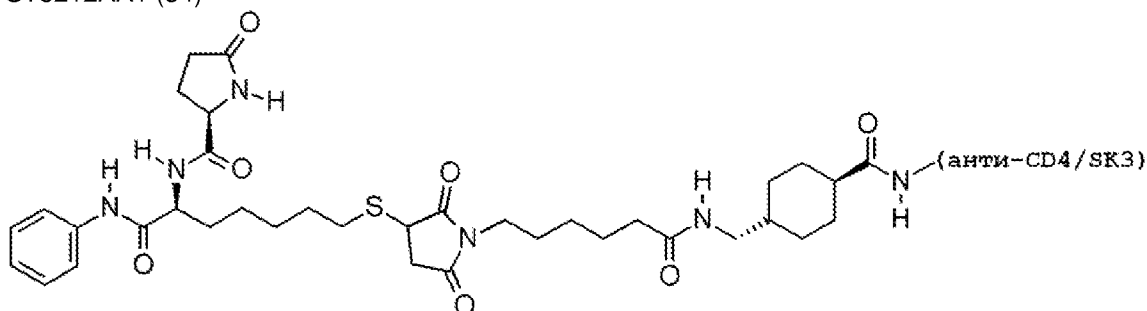
ST8193AA1 (32)



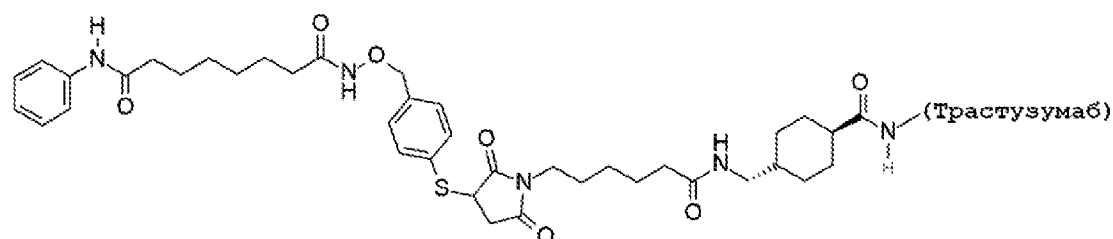
ST8194AA1 (33)



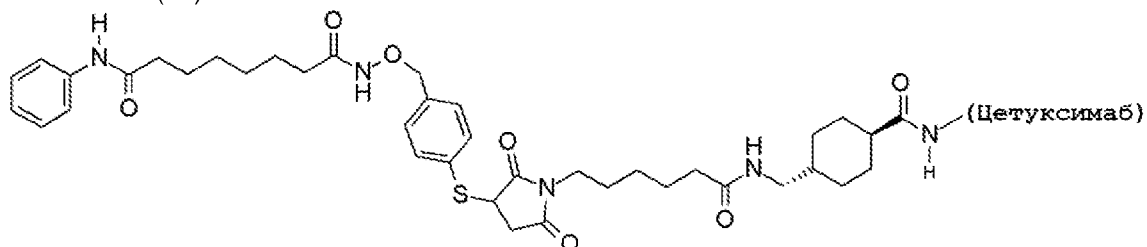
ST8212AA1 (34)



ST8213AA1 (35)



ST8218AA1 (36)



ST8219AA1 (37)

Особливо переважними є КАЛС формул 24-29.

Інші варіанти даного винаходу включають інші КАЛС, де mAb може бути вибраний з зазначених у даному винаході.

У даному винаході також представлена фармацевтична композиція, яка містить терапевтично ефективну кількість похідного формули I з фармацевтично прийнятними ексципієнтами.

Фармацевтична композиція може бути для ентерального або парентерального введення, де ентеральне введення включає пероральний, аерозольний, ректальний або букальний шляхи, і парентеральне введення включає підшкірний, внутрішньом'язовий або внутрішньовенний і інтрадермальний шляхи.

У даному винаході також представлена фармацевтична композиція, яка містить терапевтично ефективну кількість похідного формули I у сполученні з іншими відомими протираковими лікуваннями, такими як радіаційна терапія або хіміотерапевтичний режим, у сполученні з цитостатичними або цитотоксичними агентами, антибіотиками, алкілувальними агентами, антиметаболітами, гормональними агентами, інтерферонами, інгібіторами циклооксигенази (наприклад, інгібіторами COX-2), інгібіторами металопротеїнази, інгібіторами

теломерази, інгібіторами тирозинкінази, агентами проти рецептора фактора росту, анти-HER2 агентами, анти-EGFR агентами, протиангіогенезними агентами (наприклад, інгібіторами ангіогенезу), інгібіторами фарнезилтрансферази, інгібіторами шляху трансдукції сигналу *gas-raf*, інгібіторами клітинного циклу, іншими інгібіторами *cdks*, агентами зв'язування тубуліну, інгібіторами топоізомерази I, інгібіторами топоізомерази II і подібними.

Додатково, у винаході представлений продукт, який містить похідне формули (I) або його фармацевтично прийнятну сіль, як визначено вище, і один або більше хіміотерапевтичних агентів, у вигляді об'єднаного препарату для одночасного, роздільного або послідовного застосування в протираковій терапії.

У ще одному аспекті, у винаході представлено похідне формули (I) або його фармацевтично прийнятну сіль, як визначено вище, для застосування як лікарського засобу.

Більше того, даний винахід стосується кон'югатів антитіло-лікарський засіб або фармацевтичних композицій, які містять кон'югати антитіло-лікарський засіб відповідно до даного винаходу, для застосування в лікуванні раку або пухлини. Винахід більш конкретно стосується лікування раку або пухлини, що експресує рецептори ErbB1, ErbB2 і/або ErbB3. Конкретні приклади раку, що лікується відповідно до даного винаходу, включають карциноми, включаючи карциному сечового міхура, молочної залози, товстої кишки, нирок, печінки, легені, включаючи дрібноклітинний рак легені, стравоходу, жовчного міхура, яєчників, підшлункової залози, шлунка, шийки матки, щитовидної залози, простати й шкіри, включаючи плоскоклітинну карциному; гемопоетичні пухлини лімфатичних клітин, включаючи лейкоз, гострий лімфатичний лейкоз, гострий лімфобластний лейкоз, В-клітинну лімфому, Т-клітинну лімфому, ходжкінську лімфому, неходжкінську лімфому, волосатоклітинну лімфому і лімфому Беркитта; гемопоетичні пухлини мієлогенних клітин, включаючи гострий і хронічний мієлогенний лейкоз, мієлодиспластичний синдром і промієлоцитарний лейкоз; пухлини мезенхімального походження, включаючи фібросаркому й рабдіоміосаркому; пухлини центральної й периферичної нервової системи, включаючи астроцитому, нейробластому, гліому й шваному; і інші пухлини, включаючи меланому, семіному, тератокарциному, остеосаркому, пігментарну ксеродермію, кератоксантому, фолікулярний рак щитовидної залози, саркому Капоші й мезотеліому. Крім того, реактивація ВІЛ, викликана КАЛС на основі іГДАЦ, може бути потенційно корисною для нових терапій, призначених для знищення вірусних резервуарів (Badia, 2015, Antiviral. Res. 123:62-9). У зв'язку з цим, описані вище кон'югати антитіло-лікарський засіб можуть застосовуватися як ад'ювантний терапевтичний засіб в лікуванні ВІЛ.

Більше того, винахід стосується фармацевтичної композиції, яка містить зазначені кон'югати антитіло-лікарський засіб, а також зазначених кон'югатів антитіло-лікарський засіб або зазначеної фармацевтичної композиції для застосування в лікуванні раку або пухлини, що експресує рецептор, вибраний з ErbB1, ErbB2 або ErbB3.

Корисні ефекти

Кон'югати антитіло-лікарський засіб відповідно до даного винаходу є більш ефективними, ніж окремі антитіла й цитотоксичний агент, що даються в тій же концентрації, тим же способом і по тій же схемі. Більше того, було несподіваним, що цитотоксичний агент, такий як інгібітор ГДАЦ, кон'югований з антитілами, у субоптимальних дозах, є дуже ефективним, не залежить від лінкерів або типу кон'югування (лізин або цистеїн). Отже, такі КАЛС на основі інгібіторів ГДАЦ дозволяють одержати протипухлинну дію при більш низьких дозах, ніж відповідні антитіла, що дає незначну токсичність.

Короткий опис креслень

На фігурі 1 показаний мас-спектр MALDI Цетуксимабу (верх) і його кон'югованих форм ST8154AA1 (24) з корисним навантаженням-NHS ST8128AA1 (1) (низ). ВЛА, розраховане з різниці мас, становить 8,9.

На фігурі 2 показаний мас-спектр MALDI Трастузумабу (верх) і його кон'югованих форм ST8178AA1 (27) з корисним навантаженням-NHS ST8128AA1 (1) (низ). ВЛА, розраховане з різниці мас, становить 6,9.

На фігурі 3 показане зв'язування (аналіз FACS) природного Цетуксимабу й одержаних з Цетуксимабу КАЛС, ST8154AA1 (24) і ST8177AA1 (26) (А) або ST8219AA1 (37) (В), з різними колоніями пухлинних клітин. Зв'язування антитіла визначене FITC-кон'югованим мишачим анти-людським Ig (BD). Сірі піки стосуються клітин без первинного антитіла.

На фігурі 4 показане зв'язування (аналіз FACS) природного Трастузумабу й одержаних з Трастузумабу КАЛС, ST8178AA1 (27) і ST8176AA1 (28) (А) або ST8205AA1 (30) і ST8218AA1 (36) (В), з різними колоніями пухлинних клітин. Зв'язування антитіла визначене FITC-кон'югованим мишачим анти-людським Ig (BD). Сірі піки стосуються клітин без первинного антитіла.

На фігурі 5 показана імунореактивність КАЛС, тестована антиген-специфічним ELISA.

Активність виміряна проти А) химери рекомбінантного людського EGF-R/ErbB1 Fc або В) рекомбінантного людського білка ErbB2/HER2. Визначення через анти-людське антитіло, кон'юговане з легким ланцюгом К пероксидази хрому (HRP) і додаванням субстрату. Оптичну густину при 450 нм вимірюють спектрофотометром ELISA. Результати є середніми ($\pm$ СВ) для двох незалежних повторів.

На фігурі 6 показана антипроліферативна дія ST8154AA1 (24) на клітини недрібноклітинного раку легенів NCI-H1975 після 6 днів лікування. Значення $IC_{50} \pm$ СВ для КАЛС становить 250 ± 10 нМ, у порівнянні з Цетуксимабом, який був неефективний ($IC_{50} > 500$ нМ).

На фігурі 7 показана антипроліферативна дія ST8154AA1 (24) на клітини недрібноклітинного раку легенів Calu-3 після 6 днів лікування. Значення $IC_{50} \pm$ СВ для КАЛС становить 450 ± 10 нМ, у порівнянні з Цетуксимабом, який був неефективний ($IC_{50} > 500$ нМ).

На фігурі 8 показана дія одержаних з Цетуксимабу КАЛС, ST8154AA1 (24) і ST8177AA1 (26) (А) або ST8219AA1 (37) (В), на рівень ацетильованого α -тубуліну в різних колоніях пухлинних клітин. Клітини культивують протягом 3 годин при 37 °С з антитілами (5 мкг/мл). Після двох промивань клітини потім фіксують і забарвлюють мишачим анти-ацетильований α -тубулін IgG і потім FITC-кон'югованим козячим анти-мишачим IgG. Барвник Draq5 забарвлює ядро й цитоплазму. Вставки показують сигнали флуоресценції, специфічно асоційовані з ацетильованим α -тубуліном. Зображення флуоресценції одержують одночасним багатопараметричним аналізом (ОБА) Operetta. Кожне зображення є типовим для принаймні 5 полів подвійних ямок. Збільшення 60 $\times$. Дані взяті з одного репрезентативного експерименту з двох.

На фігурі 9a і фігурі 9b показана дія одержаних з Трастузумабу КАЛС, ST8178AA1 (27) і ST8176AA1 (28) (А) або ST8202AA1 (31), ST8205AA1 (30) і ST8218AA1 (36) (В), на рівень ацетильованого α -тубуліну у різних колоніях пухлинних клітин. Клітини культивують протягом 3 годин при 37 °С з антитілами (5 мкг/мл). Після двох промивань клітини потім фіксують і забарвлюють мишачим анти-ацетильований α -тубулін IgG і потім FITC-кон'югованим козячим анти-мишачим IgG. Барвник Draq5 забарвлює ядро й цитоплазму. Вставки показують сигнали флуоресценції, специфічно асоційовані з ацетильованим α -тубуліном. Зображення флуоресценції одержують одночасним багатопараметричним аналізом (ОБА) Operetta. Кожне зображення є типовим для принаймні 5 полів подвійних ямок. Збільшення 60 $\times$. Дані взяті з одного репрезентативного експерименту з двох.

На фігурі 10 показана дія одержаних з Цетуксимабу КАЛС, ST8154AA1 (24) і ST8177AA1 (26) (А) або ST8219AA1 (37) (В), на рівень ацетильованого гістону H3 у різних колоніях пухлинних клітин. Клітини культивують протягом 3 годин при 37 °С з антитілами (5 мкг/мл). Після двох промивань клітини потім фіксують і забарвлюють кролячим анти-ацетильований гістон H3 IgG і потім FITC-кон'югованим козячим анти-кролячим IgG. Барвник Draq5 забарвлює ядро й цитоплазму. Вставки показують сигнали флуоресценції, специфічно асоційовані з ацетильованим гістоном H3. Зображення флуоресценції одержують одночасним багатопараметричним аналізом (ОБА) Operetta. Кожне зображення є типовим для принаймні 5 полів подвійних ямок. Збільшення 60 $\times$. Дані взяті з одного репрезентативного експерименту з двох.

На фігурі 11 показана дія одержаних з Трастузумабу КАЛС, ST8178AA1 (27) і ST8176AA1 (28) (А) або ST8202AA1 (31), ST8205AA1 (30) і ST8218AA1 (36) (В), на рівень ацетильованого гістону H3 у різних колоніях пухлинних клітин. Клітини культивують протягом 3 годин при 37 °С з антитілами (5 мкг/мл). Після двох промивань клітини потім фіксують і забарвлюють кролячим анти-ацетильований гістон H3 IgG і потім FITC-кон'югованим козячим анти-кролячим IgG. Барвник Draq5 забарвлює ядро й цитоплазму. Вставки показують сигнали флуоресценції, специфічно асоційовані з ацетильованим гістоном H3. Зображення флуоресценції одержують одночасним багатопараметричним аналізом (ОБА) Operetta. Кожне зображення є типовим для принаймні 5 полів подвійних ямок. Збільшення 60 $\times$. Дані взяті з одного репрезентативного експерименту з двох.

На фігурі 12 показана дія КАЛС на ацетильовання α -тубуліну й гістону H4 в A549 (А) і SKBR3 (В) колоніях клітин. Клітини культивують 3 години при 37 °С з антитілами (20 мкг/мл) і потім проводять вестерн-блотинг для повних білкових лізатів. Типові блоти показані.

На фігурі 13 показана протипухлинна дія ST8155AA1 (25), ST8154AA1 (24) і ST7612AA1, що вводяться внутрішньоочередово за схемою q4dx4, у порівнянні з Цетуксимабом у мишей з п.ш. пухлиною NCI-H1975. Пухлинні клітини (5×10^6) п.ш. вводять у правий бік миші. КАЛС і Цетуксимаб дають у дозі 50 мг/кг, а ST7612AA1 - у дозі 120 мг/кг. Осередки пухлини оцінюють цифровим циркулем ($n=8$ мишей/групу, середнє й СПС, $^{***}P < 0,001$ і $^{**}P < 0,01$ до тільки

Цетуксимабу, тест Манна-Уїтні).

На фігурі 14 показана протипухлинна дія КАЛС ST8154AA1 (24) у порівнянні з Цетуксимабом у пухлинах, що розвилися у мишей Nu/Nu після п.ш. ін'єкції 5×10^6 клітин A549. Розвиток ушкодження й реакцію на лікування антитілом відслідковують за допомогою цифрового циркуля. Мишам вводять в.о. або (24) і Цетуксимаб (4 дози 50 мг/кг один раз на добу кожні 4 дні), або ФРФБ (n=10 мишей/групу, середнє й СПС, $^{\circ}P < 0,05$ до Цетуксимабу; $^{**}P < 0,01$ і $^{*}P < 0,05$ до носія, тест Манна-Уїтні).

На фігурі 15 показана антиметастатична дія ST8154AA1 (24) у порівнянні з Цетуксимабом (Ctx) на штучному метастатичному раку легенів, що виникає при ін'єкції 5×10^6 клітин A549-luc-c8 (A549luc) у хвостову вену імунodefіцитних мишей SCID/beige. Зображення біолюмінесценції пухлини (ЗБЛ) записують на Xenogen IVIS Imaging System 200, у різні моменти часу (+35, +49 і +56 днів після ін'єкції клітин), після в.о. ін'єкції люциферину (150 мкг/мишу). Мишей обробляють аерозолем з ФРФБ або ST8154AA1 або Ctx (3,5 мл 100 мкг/мл розчину) q7dx4 (n=12 мишей/групу, середнє й СПС, $^{\circ}P < 0,01$ до Ctx; $^{*}P < 0,05$ і $^{**}P < 0,01$ до носія).

На фігурі 16 показана протипухлинна дія ST8154AA1 (24) у порівнянні з Цетуксимабом (Ctx) і ST7612AA1 проти ортотопічної пухлини підшлункової залози. Клітини пухлини 1×10^6 вводять безпосередньо в підшлункову залозу. Масу пухлини оцінюють через 90 днів після ін'єкції пухлини. Мишей лікують внутрішньоочеревинно (24) або Ctx (4 дози 40 мг/кг один раз кожні 4 дні), ФРФБ і ST7612AA1 (200 мг/кг, q4dx4) (n=10 мишей/групу); середнє й СПС, $^{\circ}P < 0,05$ до Ctx, $^{*}P < 0,05$ і $^{**}P < 0,01$ до носія.

На фігурі 17 показана протипухлинна дія ST8154AA1 (24) у порівнянні з Цетуксимабом, що доставляється внутрішньоочеревинно (q4dx5), проти одержаного у пацієнта ксенотрансплантата пухлини (ОПК) раку підшлункової залози, імплантованого п.ш. голим мишам. Миші NOD SCID одержують п.ш. клітини пухлини (51000 клітин) від пацієнта PA5363. Лікування мишей з пухлиною проводять КАЛС у дозі 40 мг/кг в.о. Ріст пухлини оцінюють цифровим циркулем (n=10 мишей/групу). Середнє й СПС, $^{\circ}P < 0,05$ до Цетуксимабу, $^{***}P < 0,001$ до носія.

На фігурі 18 показана протипухлинна дія ST8178AA1 (27) у порівнянні з Трастузумабом, що доставляється внутрішньоочеревинно за схемою q4dx4, проти раку яєчників SKOV-3. Пухлини вирощують у мишей Nu/Nu після п.ш. введення 5×10^6 клітин яєчників SKOV-3. Лікування проводять КАЛС і Трастузумабом у дозі 15 мг/кг, в.о. (n=11 мишей/групу; середнє й СПС, $^{*}P < 0,05$ до носія, $^{\circ}P < 0,05$ до Трастузумабу, тест Манна-Уїтні).

На фігурі 19 показана протипухлинна дія ST8176AA1 (28) у порівнянні з Трастузумабом, що доставляється внутрішньоочеревинно за схемою q4dx4, проти раку яєчників SKOV-3. Пухлини вирощують у мишей Nu/Nu після п.ш. введення 5×10^6 клітин яєчників SKOV-3. Лікування проводять КАЛС і Трастузумабом у дозі 30 і 15 мг/кг, в.о. (n=12 мишей/групу; середнє й СПС, $^{*}P < 0,05$ до носія, $^{\circ}P < 0,05$ до Трастузумабу, тест Манна-Уїтні).

На фігурі 20 показана протипухлинна дія ST8176AA1 (28) у порівнянні з Трастузумабом, що доставляється внутрішньоочеревинно за схемою q4dx4, проти раку яєчників SKOV-3. Пухлини вирощують у мишей Nu/Nu після п.ш. введення 10×10^6 клітин яєчників SKOV-3. Лікування проводять КАЛС і Трастузумабом у дозі 15 мг/кг, в.о. (n=9 мишей/групу). Криву виживання одержують аналізом Каплана-Мейєра. $^{*}P < 0,05$ і $^{**}P < 0,01$ до носія, $^{\circ}P < 0,05$ до Трастузумабу.

На фігурі 21 показана протипухлинна дія ST8176AA1 (28) у порівнянні з Трастузумабом, що доставляється внутрішньоочеревинно за схемою q4dx4, проти раку товстої кишки LS174T. Пухлини вирощують у мишей Nu/Nu після в.о. введення 10×10^6 клітин раку товстої кишки LS174T. Лікування проводять КАЛС і Трастузумабом у дозі 15 мг/кг, в.о. (n=9 мишей/групу). Криву виживання одержують аналізом Каплана-Мейєра. Значення P розраховують із застосуванням двостороннього логарифмічного рангового критерію, $^{*}P < 0,05$ до носія й $^{\circ}P < 0,05$ до Трастузумабу.

На фігурі 22 показана протипухлинна дія ST8176AA1 (28) у порівнянні з Трастузумабом, що доставляється внутрішньоочеревинно за схемою q4dx4, проти раку товстої кишки LS174T. Пухлини вирощують у мишей Nu/Nu після п.ш. введення 5×10^6 клітин раку товстої кишки LS174T. Лікування проводять КАЛС і Трастузумабом у дозі 15 мг/кг, в.о. (n=10 мишей/групу; середнє й СПС, $^{*}P < 0,05$ до носія, $^{\circ}P < 0,05$ до Трастузумабу, тест Манна-Уїтні).

На фігурі 23 показана протипухлинна дія ST8176AA1 (28) у порівнянні з Трастузумабом, що доставляється внутрішньоочеревинно за схемою q4dx4, проти ОПК (одержаного у пацієнта ксенотрансплантата) раку підшлункової залози. Клітини пухлини підшлункової залози людини (77×10^3) від пацієнта PA5363 п.ш. вводять мишам NOD-SCID. Лікування проводять ST8176AA1 або Трастузумабом у дозі 15 мг/кг (n=10 мишей/групу; середнє й СПС, $^{*}P < 0,05$ до носія й

$^{\circ}P < 0,05$ до Трастузумабу, тест Манна-Уїтні).

Докладний опис винаходу

Винахід стосується нових КАЛС, одержаних з протиракових антитіл, кон'югованих з корисними навантаженнями на основі іГДАЦ. Показано, що такі КАЛС специфічно зв'язуються з пухлинними рецепторами, щоб бути поглиненими й доставленими в лізосоми. Ці властивості несподівано корелюють з *in vitro* цитотоксичністю й *in vivo* протипухлинною дією, незважаючи на низьку активність ГДАЦ. Кон'югати антитіло-лікарський засіб відповідно до даного винаходу особливо корисні в лікуванні пухлин або будь-яких інших захворювань, де модулювання однієї або більше ізоформ гістондеацетилази й експресії рецепторів ErbB є ефективним для терапевтичного втручання.

У даному винаході описані безпечні й ефективні КАЛС, які містять безпечні іГДАЦ, кон'юговані через лінкер з антитілом, зокрема імуноглобуліном, застосовуваним для лікування раку. Епігенетичний модулятор, інгібітор ГДАЦ, дозволяє створювати КАЛС зі зниженими негативними й токсичними ефектами.

Переважаючим варіантом даного винаходу є застосування КАЛС на основі іГДАЦ для терапії раку, експресуючого рецептори, такі як ErbB1, ErbB2 або ErbB3, що включає, наприклад, рак легені, молочної залози, товстої кишки, мозку, голови й шиї, ендометрія, нирок, підшлункової залози, шлунка, стравоходу, яєчників і простати й лейкоз.

Даний винахід стосується кон'югатів антитіло-лікарський засіб формули (I)

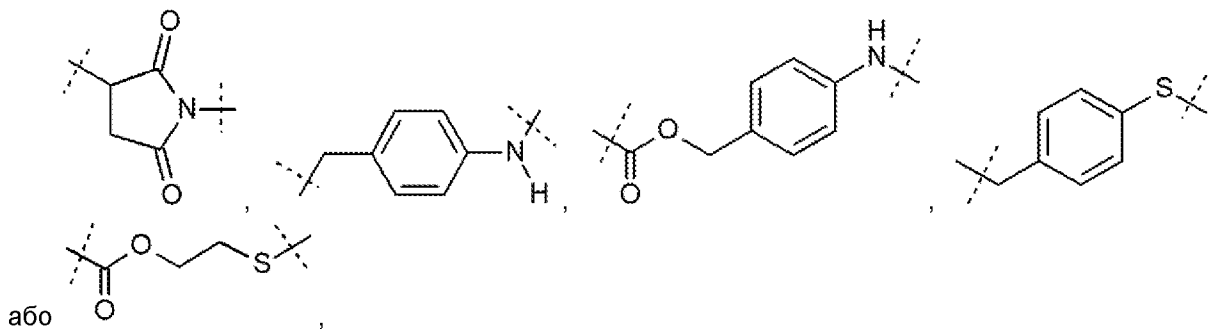
$D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)_o-(CG)_p-Ab$

(формула I)

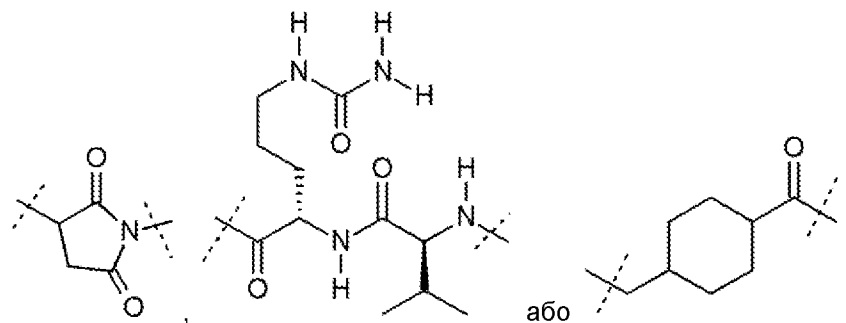
або їх фармацевтично прийнятної солі, де

D є цитотоксичним лікарським засобом (також називаним боеголовка), інгібітором гістондеацетилази, який містить бензамідні, гідроксаматні або тіольні групи як групу, що зв'язує цинк (ГЗЦ),

CU є сполучною одиницею, яка може бути відсутня або яку вибирають з

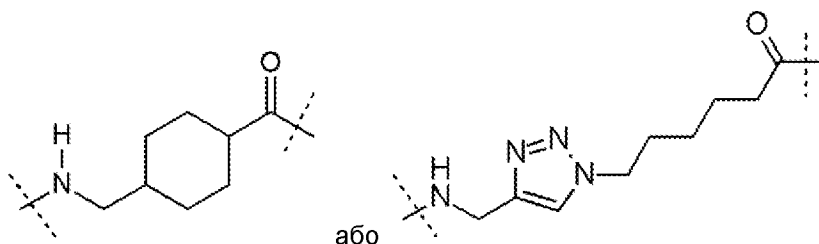


S1 є спейсером і може бути відсутній або є



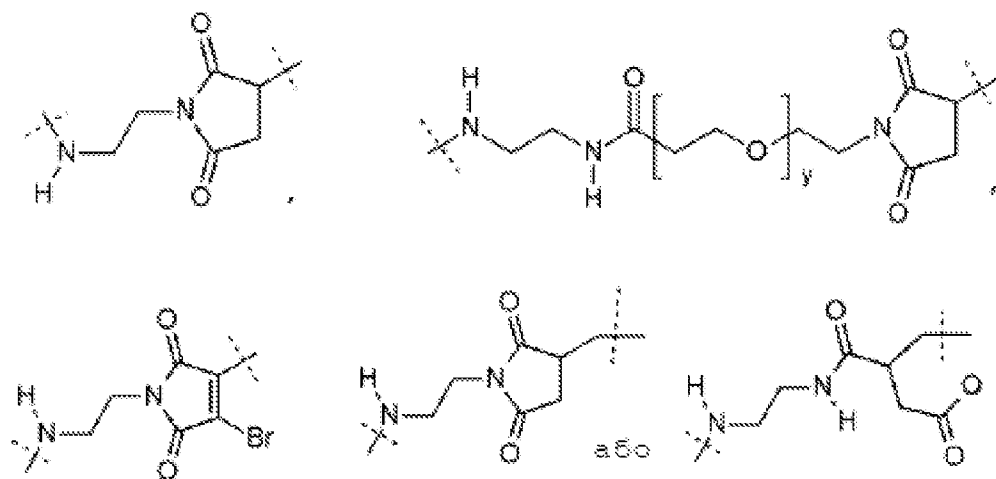
L є лінкером, який вибирають із $(CH_2)_q-CO$, $NH-(CH_2)_r-(ПЕГ)_s-(CH_2)_w-CO$, $NH-CO-(CH_2)_r-(ПЕГ)_s-X-(CH_2)_w-CO$, де X може бути відсутній, є NH або O, q є цілим числом 2-8, r може бути відсутній або є цілим числом 1-4, s може бути відсутній або є цілим числом 1-6, і w може бути відсутній або є цілим числом 1-2,

S2 є спейсером і може бути відсутній або є



CG є сполучною групою, одержаною після кон'югування з цистеїнтіол- або лізінаміногрупами антитіл, яка може бути відсутня або є однією з наступних груп:

5



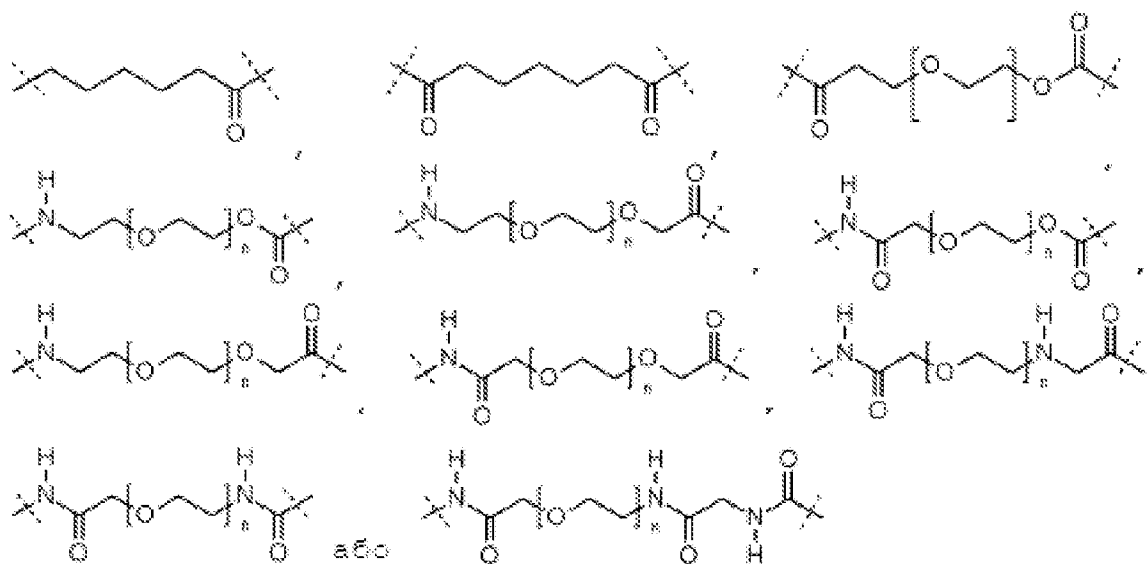
де у є цілим числом від 0 до 8,

Ab є антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, і

m, n, o і p є цілими числами 0 або 1.

Лінкер (L) переважно вибирають з

10



15

де n є цілим числом 2-5.

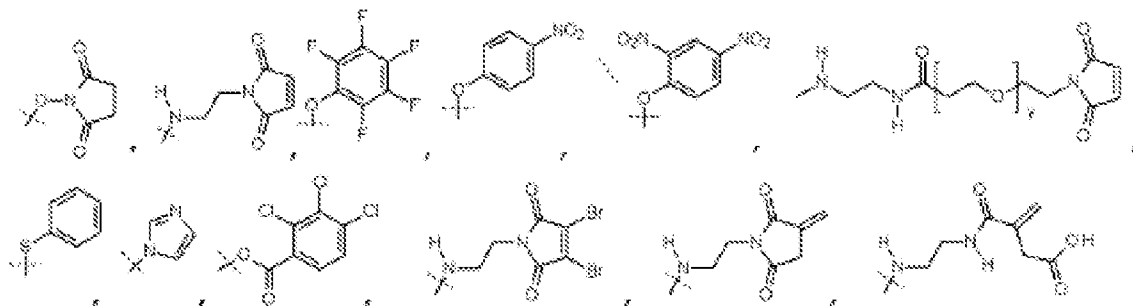
Зокрема, корисним навантаженням є токсин (інгібітор ГДАЦ), з'єднаний з придатним лінкером/спейсером, який закінчується групами (тобто малеїмідом, складними ефірами NHS), придатними для кон'югування з антитілами, і містить наступну частину формули I:

$D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)_o-(CG)_p$

(формула II).

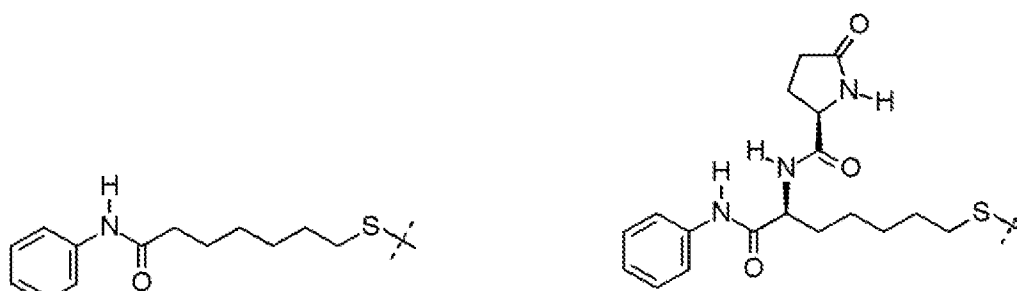
20

У даному винаході, (CG)' у корисних навантаженнях формули II може бути NHS (N-гідроксисукцинімід) або активоване ацильне похідне (включаючи пентафторфеніловий ефір, п-нітро й 2,4-динітрофеноловий ефір, тіофеноловий ефір, ацилімідазол, ізобутилкарбонат, трихлорбензойний ангідрид) або малеїмід- або {амінокарбоніл}-3-бутенова кислота наступних формул:



Інгібітором гістондеацетилази (ГДАЦ), застосовуваним у корисному навантаженні D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)_o-(CG)_p-, може бути інгібітор гістондеацетилази, який відомий у даній галузі техніки й належить наступних категорій:

- інгібітори гістондеацетилази на основі тіолу, такі як ST7464AA1 і ST7660AA1 (тіольний аналог вориностату), що мають наступні формули:



тіольний аналог SAHA (Вориностату)

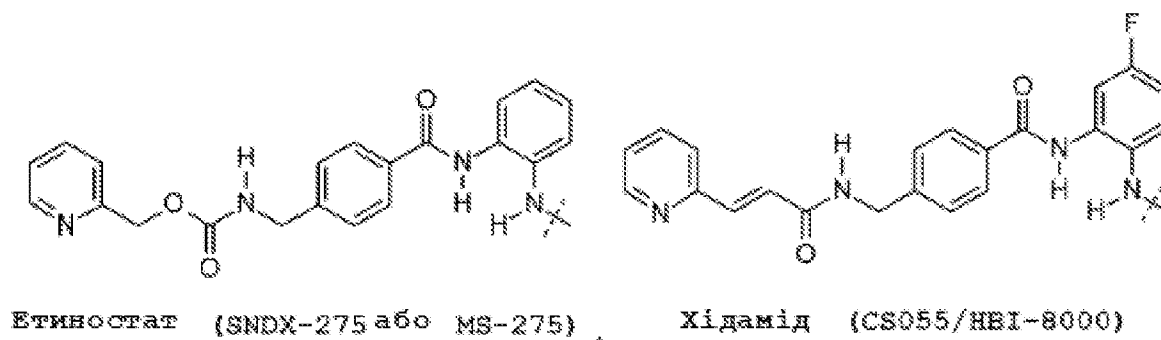
тіол (активний лікарський засіб) відповідного тіоацетилу ST7612AA1 (проліки)

- інгібітори гістондеацетилази (ГДАЦ) на основі гідроксамінової кислоти, такі як вориностат (SAHA), панобіностат (LBH589) або даціностат (LAQ824), що мають наступні формули:

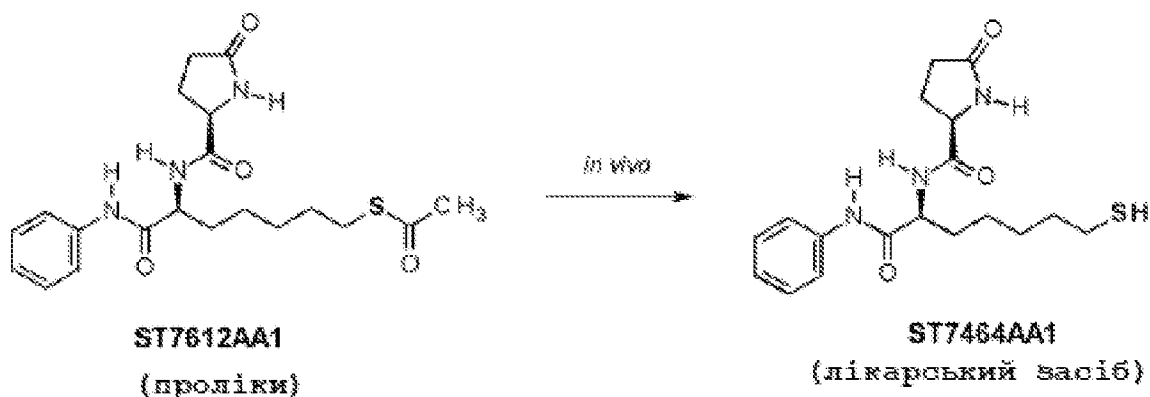
Інгібітор ГДАЦ	ADC на основі кон'югування ГЗЦ (групи, що зв'язує цинк)	Інші ADC на основі бічного кон'югування
Вориностат (SAHA)		
Панобіностат (LBH589)		
Даціностат (LAQ824)		

- інгібітори гістондеацетилази (ГДАЦ) на основі бензаміду, такі як етиностат (MS275) і

хідамід (CS055), що мають наступні формули:



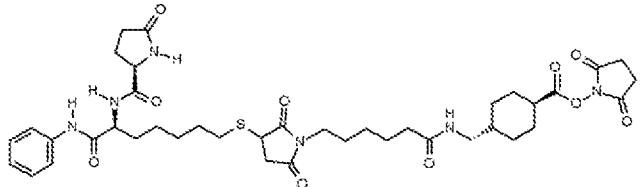
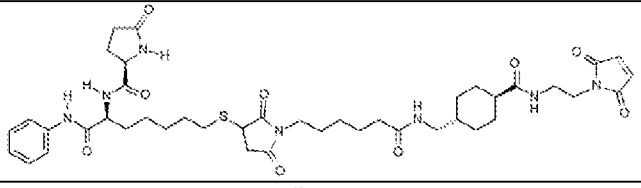
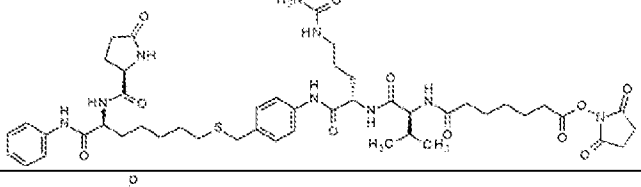
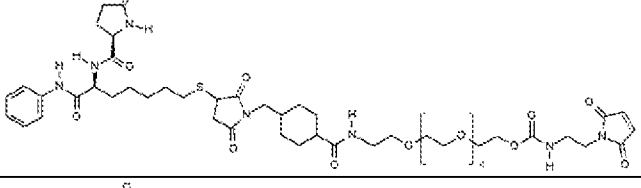
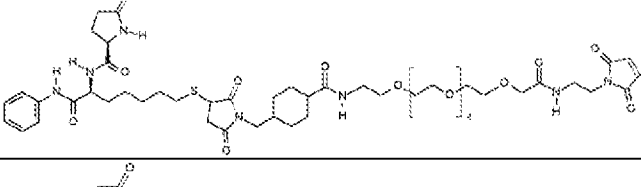
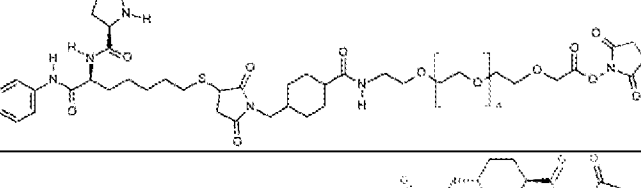
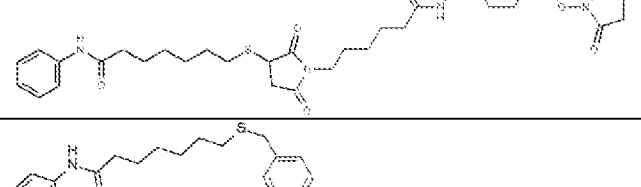
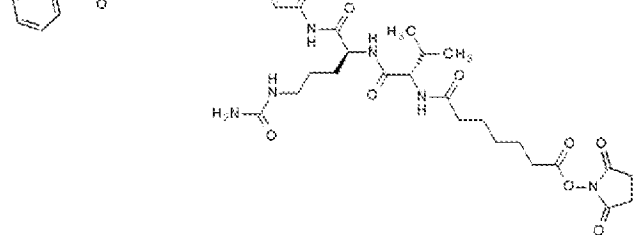
- 5 У конкретному варіанті, інгібітором гістондеацетилази є ST7464AA1, лікарський засіб відповідних проліків ST7612AA1, перорального інгібітору гістондеацетилази на основі тіолу.



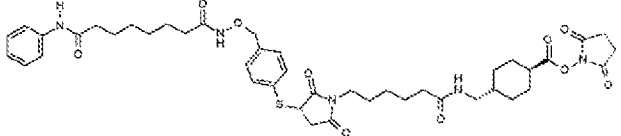
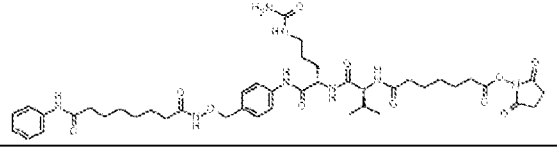
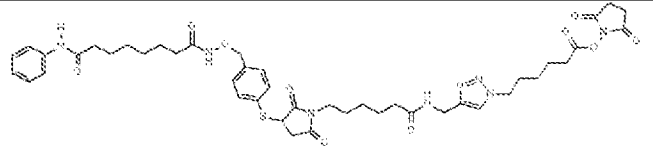
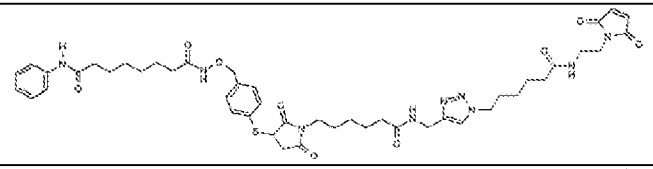
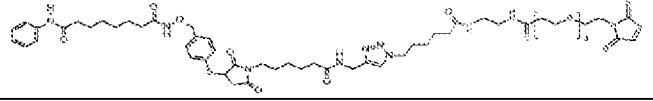
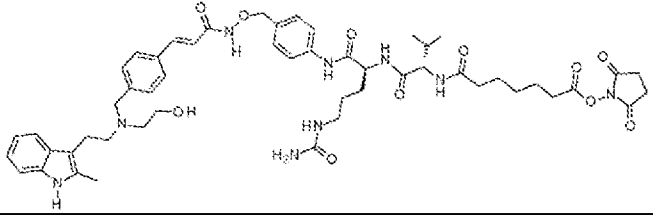
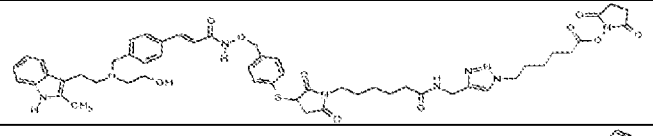
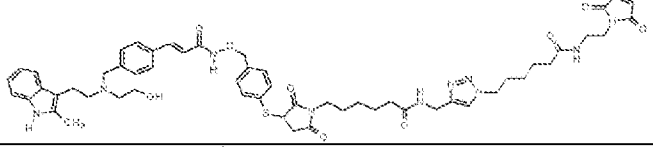
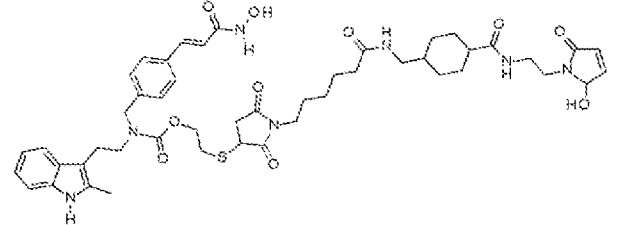
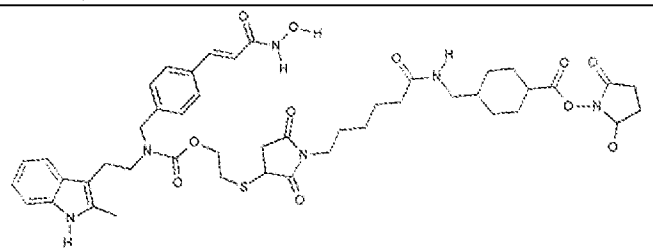
- 10 Корисне навантаження містить "відхідну групу", що належить до групи, яка може бути заміщена іншою групою в реакції заміщення. Такі відхідні групи добре відомі в даній галузі техніки і їх приклади включають, але не обмежені ними, галогеніди (фторид, хлорид, бромід і йодид), азиди, сульфонати (наприклад, необов'язково заміщений C1-C6 алкансульфонат, який як етансульфонат або трифторметансульфонат, або необов'язково заміщений C7-C12 алкілбензолсульфонат, такий як толуолсульфонат), сукцинімід-N-оксид, п-нітрофеноксид, пентафторфеноксид, тетрафторфеноксид, карбоксилати, амінокарбоксилати (карбамати) і алкоксикарбоксилати (карбонати). Для заміщення на насиченому атомі вуглецю, галогеніди й сульфонати є переважними відхідними групами. Для заміщення на карбонільному атомі вуглецю, галогенід, сукцинімід-N-оксид, п-нітрофеноксид, пентафторфеноксид, тетрафторфеноксид, карбоксилат або алкоксикарбоксилат (карбонат), наприклад, можуть застосовуватися як відхідна група. Термін "відхідна група" також стосується групи, яка відщеплюється в результаті реакції відщиплення, наприклад реакції електронного каскаду або реакції піроциклізації. У цьому випадку, галогенід, сульфонат, азид, амінокарбоксилат (карбамат) або алкоксикарбоксилат (карбонат), наприклад, можуть застосовуватися як відхідна група.

- 25 Фахівцю в даній галузі техніки відомо, що перетворення хімічної функціональної групи в іншу може вимагати, щоб один або більше реакційноздатних центрів у сполучі, що містить таку функціональну групу, обов'язково були заміщені для того, щоб уникнути небажаних побічних реакцій. Захист таких реакційноздатних центрів і наступне зняття захисту наприкінці синтетичних перетворень може здійснюватися стандартними методами, описаними в літературі (див, наприклад, Green Theodora W. and Wuts Peter G.M. - Protective Groups in Organic Synthesis, Third Edition, John Wiley & Sons Inc., New York (NY), 1999).

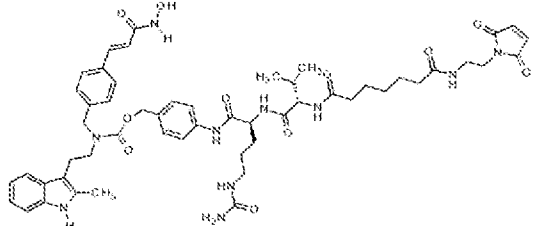
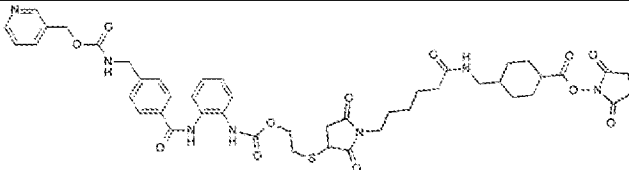
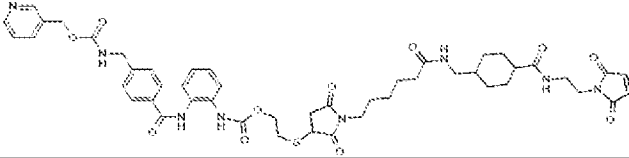
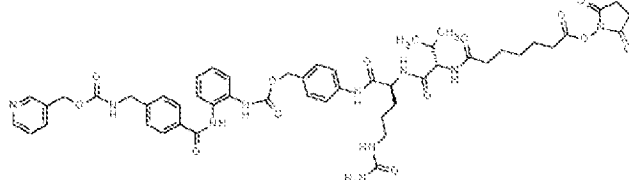
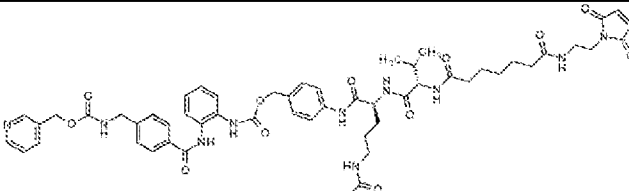
Корисні навантаження

Ід. №	Код ST	Хімічна структура	М.М.	Клас
(1)	8128AA1		810,9	NHS
(2)	8152AA1		836,0	Малеїмід
(3)	8132AA1		964,1	NHS
(4)	8190AA1		1030,2	Малеїмід
(5)	8189AA1		1044,2	Малеїмід
(6)	8191AA1		889,0	NHS
(7)	8197AA1		684,8	Малеїмід
(8)	8235AA1		838,0	NHS

Корисні навантаження

Ід. №	Код ST	Хімічна структура	М.М.	Клас
(9)	8217AA1		834,0	NHS
(10)	8201AA1		865,0	NHS
(11)	8215AA1		889,0	NHS
(12)	8216AA1		914,1	Малеїмід
(13)	8236AA1		1161,4	Малеїмід
(14)	8232AA1		994,1	Малеїмід
(15)	8233AA1		1018,2	NHS
(16)	8234AA1		1043,2	Малеїмід
(17)	8229AA1		928,1	Малеїмід
(18)	8230AA1		903,0	NHS

Корисні навантаження

Ід. №	Код ST	Хімічна структура	М.М.	Клас
(19)	8231AA1		1019,2	Малеїмід
(20)	8225AA1		928,0	NHS
(21)	8226AA1		953,1	Малеїмід
(22)	8227AA1		1021,1	NHS
(23)	8228AA1		1046,1	Малеїмід

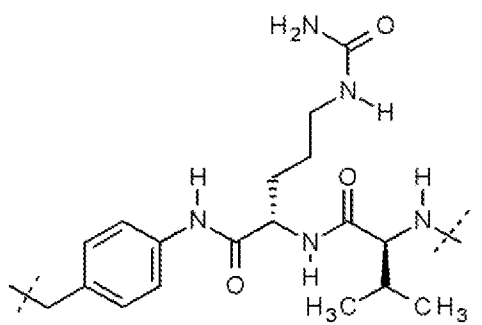
У конкретному переважному варіанті, інгібітором гістондеацетилази є сполука ST7612AA1, що є проліками сполуки ST7464AA1, як показано вище.

Інші приклади корисних навантажень, застосовуваних відповідно до даного винаходу, включають сполуки з таблиці 1 вище. Корисні навантаження зі специфічним лінкером, що містить N-гідроксисукцинімідну (NHS) групу (тобто ST8128AA1, ST8132AA1), здатні до ковалентного зв'язування, через амідний зв'язок, з бічним ланцюгом залишку Lys mAbs, що містить аміноспецифічний складний ефір NHS, який може взаємодіяти з лізинами антитіла. Корисні навантаження зі специфічним лінкером, що містить maleimide групу (тобто ST8152AA1, ST8189AA1), здатні до ковалентного зв'язування, через реакцію кон'югування maleimide-тіол, з Cys на mAbs, після їх відновлення.

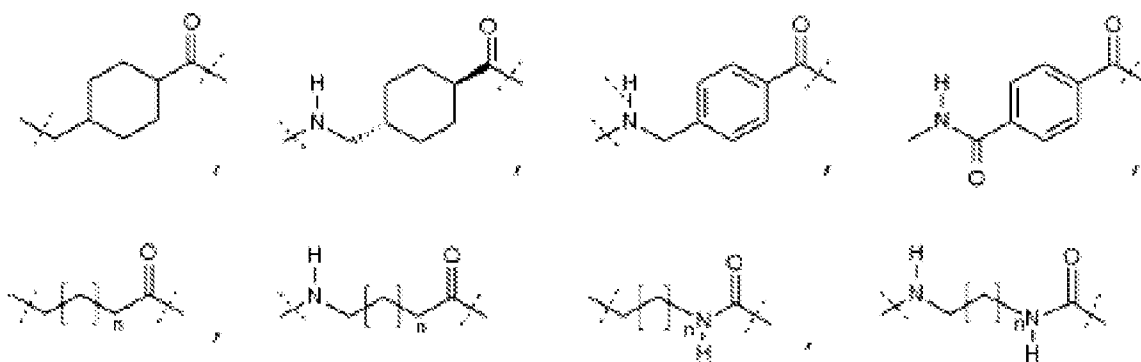
Кон'югати антитіло-лікарський засіб (КАЛС) відрізняються від корисних навантажень для сполучної групи (CG), де у корисних навантаженнях (CG)' вона є NHS або maleimide, а в кон'югатах антитіла (CG) відсутня, у КАЛС на основі NHS корисного навантаження, тоді як вона є сукцинімідильною групою в КАЛС на основі maleimide корисного навантаження.

Більше того, спейсер (S1), якщо присутній, може бути відщеплюваним або невідщеплюваним. Типовий спейсер, відщеплюваний протеазою, містить групу, що відрізняється швидким ферментним виділенням лікарського засобу в цільовій клітині, таку як валіновий-цитруліновий (Val-Cit) дипептид.

Прикладом відщеплюваного спейсера є



Прикладами невідщеплюваного спейсера є

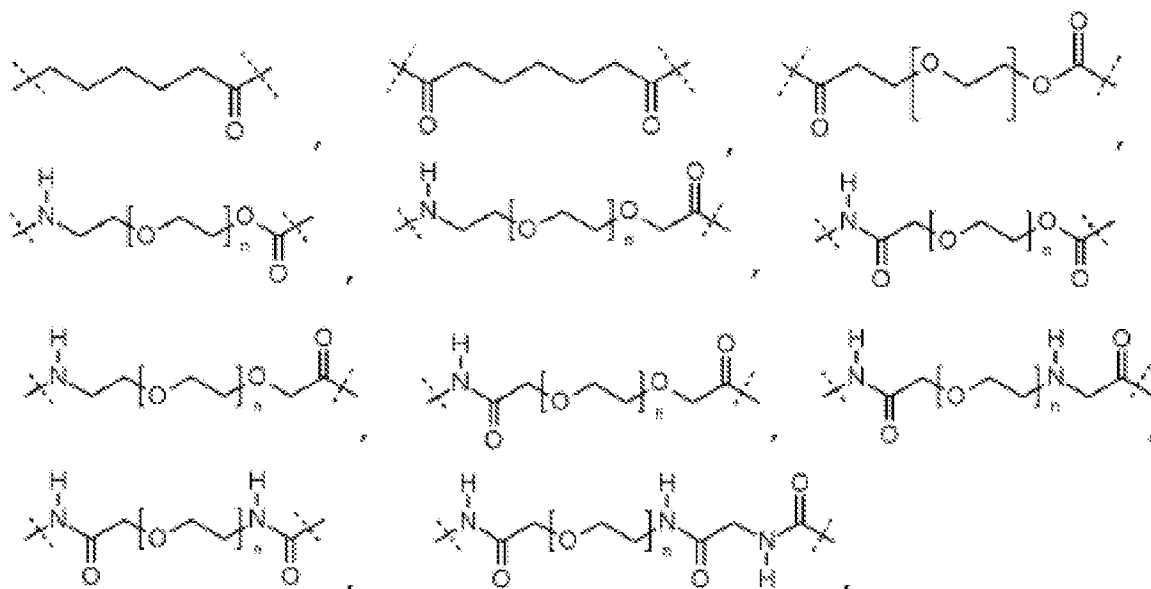


5

де $n=0-4$.

Заявлені кон'югати антитіло-лікарський засіб можуть також містити лінкер (L), яким може бути $(CH_2)_q-CO$, $NH-(CH_2)_r-(PEG)_s-(CH_2)_w-CO$, $NH-CO-(CH_2)_r-(PEG)_s-X-(CH_2)_w-CO$, де X може бути відсутній, є NH, O, q дорівнює 2-8, r відсутній або дорівнює 1-4, s відсутній або дорівнює 1-6, і w відсутній або дорівнює 1-2.

Приклади лінкера (L):



15

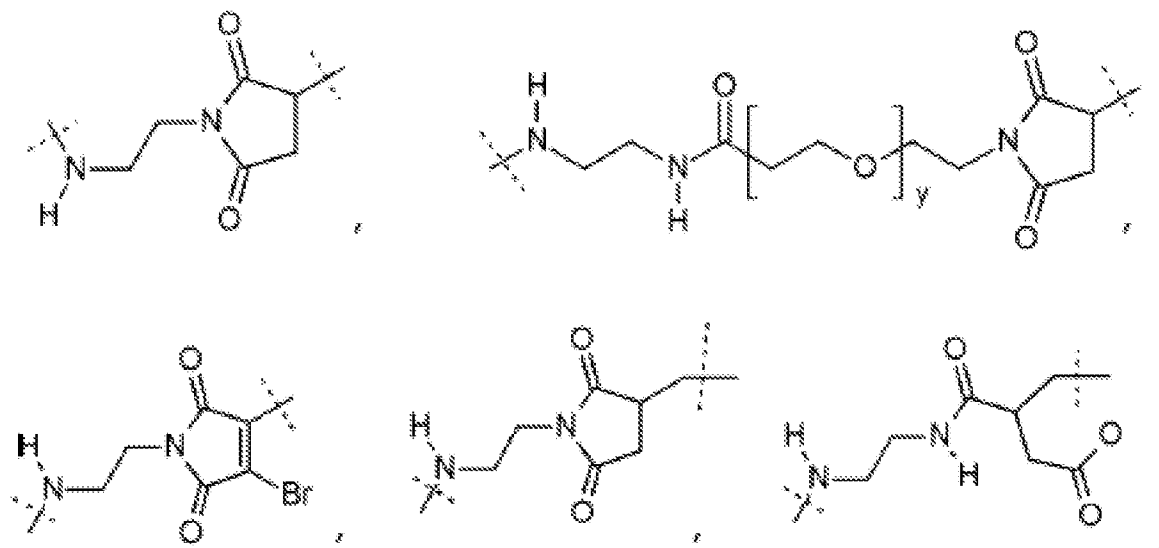
де $n=2-5$.

Заявлені кон'югати антитіло-лікарський засіб можуть також містити сполучну групу (CG), утворену після кон'югування з цистеїновою тіольною або лізиновою аміногрупою антитіл, яка може бути відсутня або є однією з наступних груп: NHS або активоване ацилпохідне (включаючи складний ефір 1-гідроксибензотриазолу, складний ефір етил-2-ціано-2-(гідроксііміно)ацетату, складний ефір N-етоксикарбоніл-2-етокси-1,2-дигідрохінолону, складний

20

ефір пентафторенілу, п-нітро й складний ефір 2,4-динітрофенолу, складний ефір динітрофенолу, складний ефір тіофенолу, ацилімідазол, ізобутилкарбонат, трихлорбензойний ангідрид, півалевий ангідрид, 3,5-диметокситриазин) або малеїмід- або 3-метиленсукцинімід, 3,4-диброммалеїмід або {амінокарбоніл}-3-бутенова кислота наступних формул:

5



де у дорівнює 0-8.

10 Описані тут імуноглобулінові вектори спрямовані проти сімейства рецепторів тирозинкінази (РТК). Воно є суперсімейством трансмембранних білків, які медіюють внутрішньоклітинні сигнали через фосфорилювання субстратних білків, залучених у проліферацію, виживання, диференціацію або міграцію клітини.

15 Зокрема, сімейство рецептора епідермального фактора росту людини (HER) належить до суперсімейства РТК і містить чотири члени: ErbB1/EGFR (рецептор епідермального фактора росту), ErbB2, ErbB3 і ErbB4. Фізіологічно ці рецептори активовані лігандами сімейства EGF.

EGFR відіграє причинну роль у розвитку й збереженні багатьох карцином людини, з мутацією й надекспресією, спостережуваною в множині типів пухлин (Burgess A.W., 2008, Growth Factors, 26:263-74).

20 EGFR стає клінічно підтвердженою цілью для антитіл, а також для інгібіторів тирозинкінази, які широко застосовуються при раку легені, голови й шиї, товстої кишки й підшлункової залози (Mendelsohn J., 2006, Semin. Oncol. 33:369-85; Feiner, 2016. Exp. Rev. Proteomics, Sep 13:817-32; Enrique A.A. 2012, Front Biosci. 4:12-22; Landi L., 2014, Expert Opin. Pharmacol. Ther. 15:2293-305).

25 Незважаючи на успіх цих інгібіторів, значна кількість пацієнтів з EGFR-позитивними пухлинами не реагує на сучасні EGFR-націлені терапевтичні засоби, тому що множина мутацій (наприклад, EGFR, KRAS, BRAF, PI3K і PTEN) може сприяти внутрішній або набутій резистентності (Chong C.R., 2013, Nat. Med. 19:1389-400).

30 КАЛС на основі інгібітору мікротрубочок, націлені на EGFR, є неоднозначною терапевтичною стратегією в тому, що вони можуть поліпшувати активність анти-EGFR антитіл через обхід резистентності, медійованої мутаціями низхідної подачі сигналу, але, через відому токсичність цих антитіл (тобто шкірний висип, діарея, запор, стоматит, стомлюваність і електролітні порушення) (Li T., 2009, Target. Oncol. 4:107-19), вони можуть мати обмежену застосовність. Було несподівано виявлено, що КАЛС, одержані кон'югуванням анти-білок сімейства EGFR антитіл з низькотоксичними іГДАЦ, є ефективними протираковими агентами.

35 Антитілом, застосовуваним у заявленому кон'югаті антитіло-лікарський засіб, зокрема, є антитіло, спрямоване проти білка сімейства EGFR. Більш конкретно, антитіло може бути спрямоване проти рецепторів ErbB1, ErbB2 або ErbB3. Ті ж корисні навантаження, кон'юговані з іншими антитілами, можуть бути спрямовані проти інших рецепторів, поглинених пухлинними клітинами для виділення іГДАЦ.

40 Наприклад, за аналогією з EGFR, c-Met, що залучений у ріст, виживання й поширення різних видів раку людини й надекспресується в різних солідних пухлинах, поглинається у відповідь на зв'язування з HGF (фактор росту гепатоцитів), що приводить до убіквітинування й розкладання c-Met (Mellman, 2013, Cold Spring Harb Perspect Biol. 5:a016949).

Крім того, інтегрини мають основні ролі у взаємодіях пухлина-строма, і аберантне рециркулювання 25 різних інтегринових гетеродимерів залучене в ріст, інвазію, метастази й евазію апоптозу пухлини (Mosesson, 2008, Nat. Rev. Cancer, 8:835-50).

В одному варіанті, антитіло вибирають з Трастузумабу, Цетуксимабу, Бевацизумабу, Панітумумабу, анти-CD4 або анти-CD30 антитіл і споріднених біоподібних антитіл.

Терміни антитіло або імуноглобулін можуть застосовуватися взаємозамінно в більш широкому розумінні й включають моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, виділені, інжинірингові або рекомбінантні антитіла, повнорозмірні або інтактні антитіла, мультивалентні або мультиспецифічні антитіла, такі як біспецифічні антитіла або фрагменти антитіл, доти, поки вони демонструють бажану біологічну дію. У випадку рекомбінантного антитіла, яке є результатом експресії рекомбінантної ДНК у живих клітинах, антитіло може бути одержане з будь-яких видів, і його переважно одержують з людини, щура, миші або кролика. Якщо антитіло одержане з видів, відмінних від людини, воно переважно є химерним або гуманізованим антитілом, одержаним методами, добре відомими в даній галузі техніки.

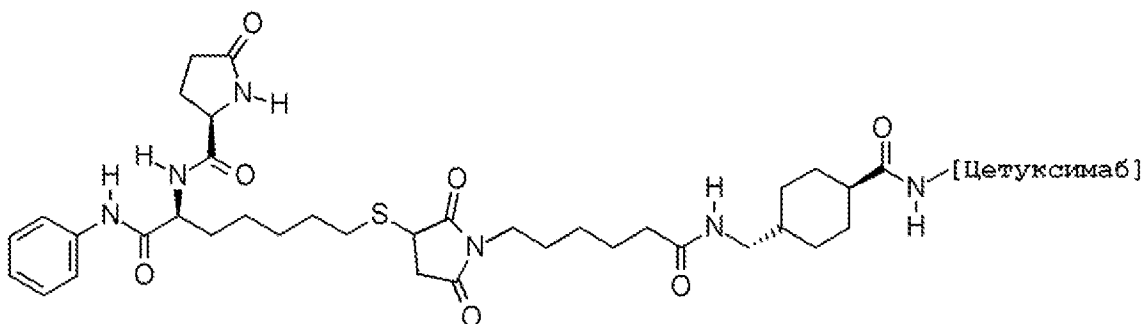
Антитілом також може бути хімічно синтезоване антитіло.

Антитіло може бути націлене на ракові або пухлинні клітини, про які йде мова, зокрема ракові або пухлинні клітини, експресуючі рецептори ErbB1, ErbB2 і/або ErbB3. Зокрема, антитіло має властивість розпізнавати зазначені ракові або пухлинні клітини, має властивість зв'язуватися з зазначеними раковими або пухлинними клітинами й властивість бути поглиненим зазначеними пухлинними або раковими клітинами.

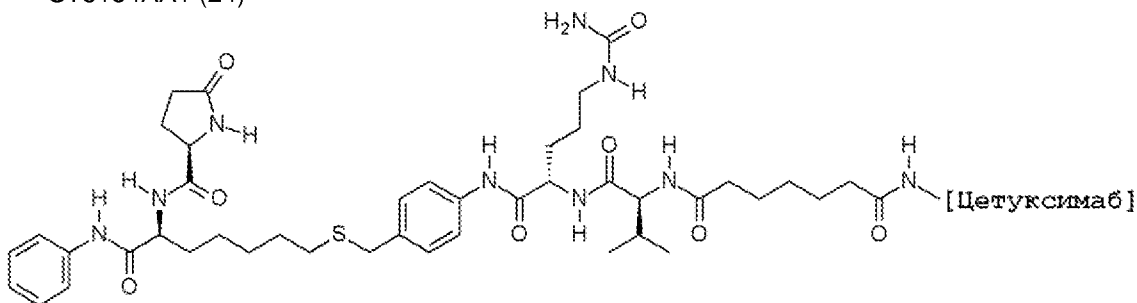
Способи одержання зазначених антитіл добре відомі в даній галузі техніки [тобто Chem. Soc. Rev., 2016, 45, 1691-1719; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 26 (2016), 1542-1545].

Замість антитіла, також може застосовуватися антигензв'язувальний фрагмент, який означає будь-який пептид, поліпептид або білок, що зберігає здатність зв'язуватися з ціллю (антигеном) антитіла. Приклади антигензв'язувальних фрагментів включають фрагменти Fv, ScFv (Sc означає одноланцюжковий), Fab, F(ab')₂, Fab', ScFv', Fc або діатіла або фрагменти, період напівжиття яких підвищується хімічною модифікацією, такою як, наприклад, ПЕГилування або введення в ліпосому.

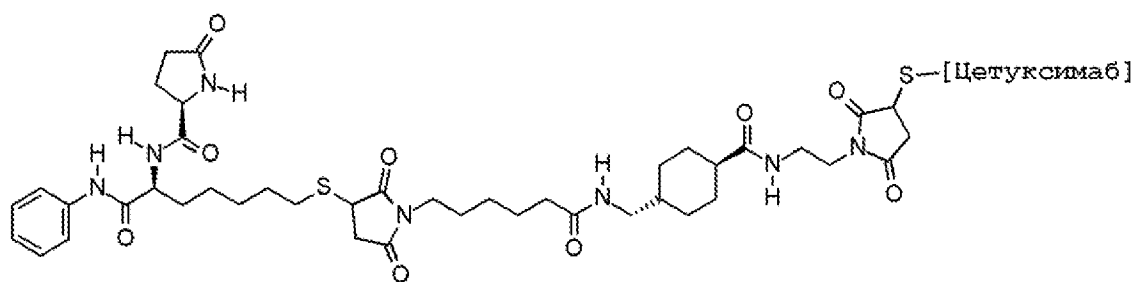
В одному варіанті, кон'югат антитіло-лікарський засіб (КАЛС) або його фармацевтично прийнятну сіль вибирають зі сполук, що мають формули:



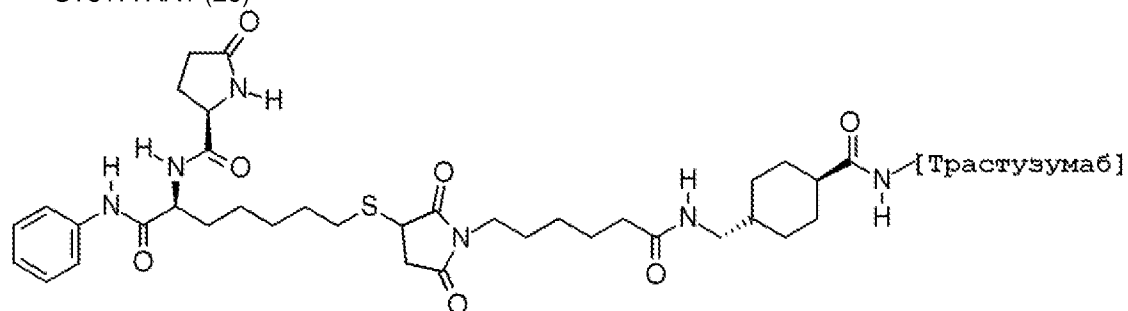
ST8154AA1 (24)



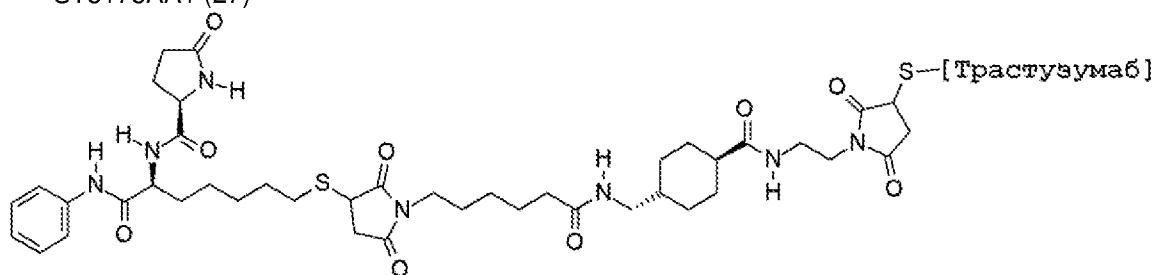
ST8155AA1 (25)



ST8177AA1 (26)

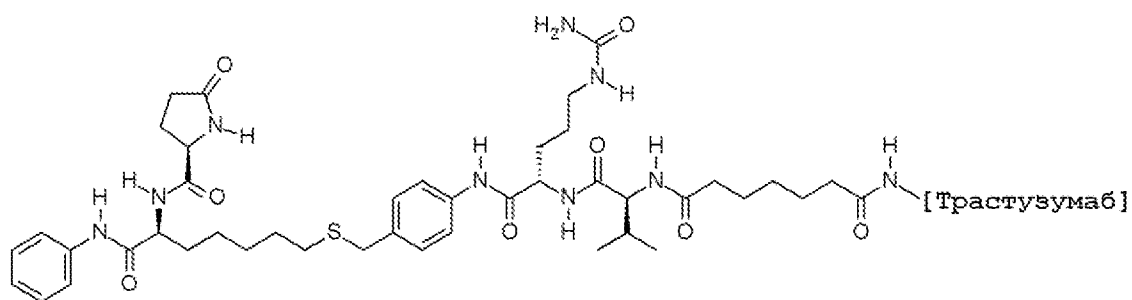


ST8178AA1 (27)

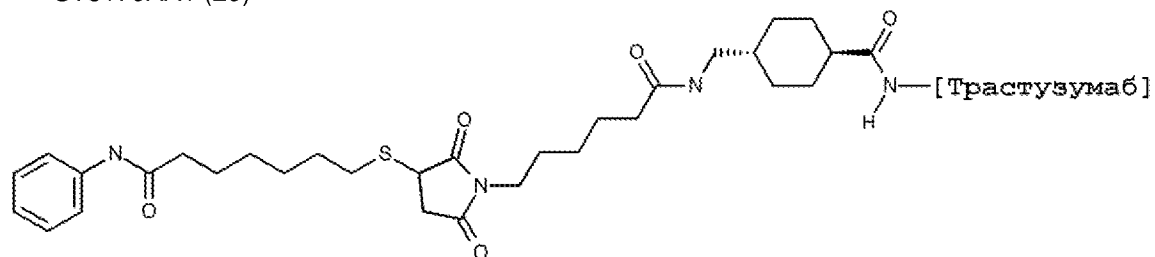


ST8176AA1 (28)

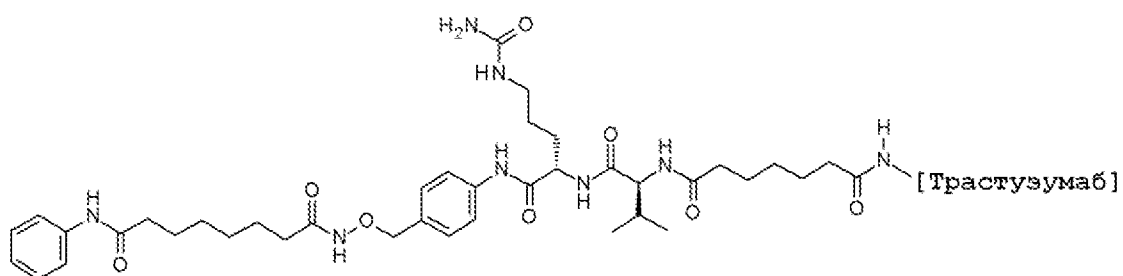
В іншому варіанті формули I представлена сполука, така як кон'югат антитіло-лікарський засіб (КАЛС) або його фармацевтично прийнятна сіль, формули (If):



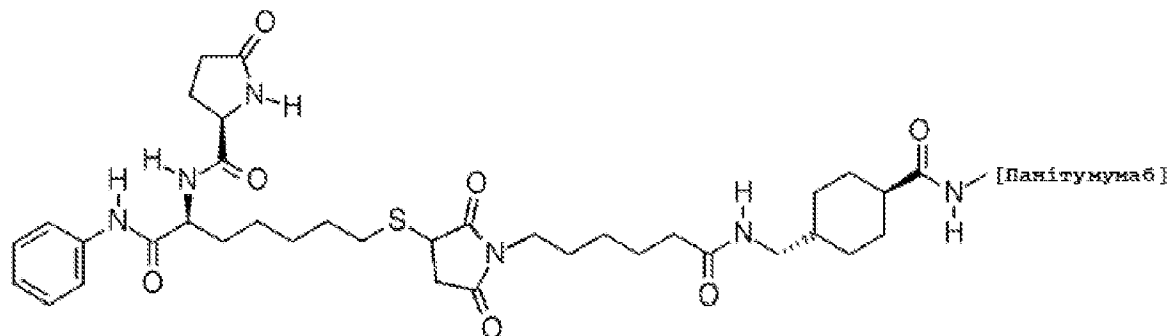
ST8179AA1 (29)



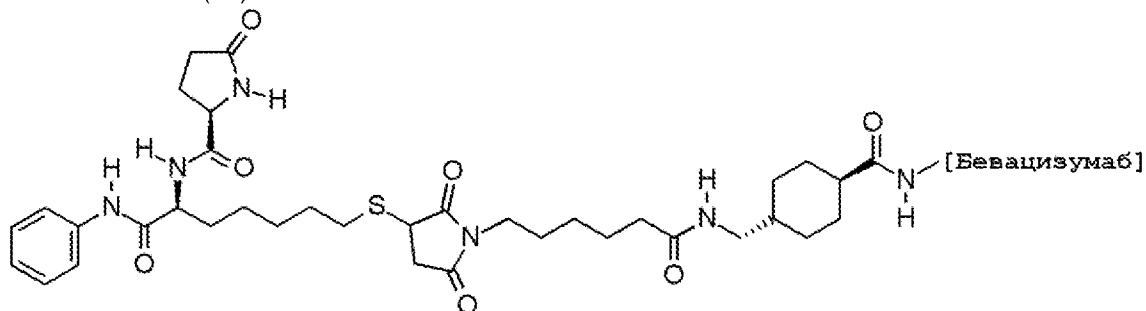
ST8205AA1 (30)



ST8202AA1 (31)

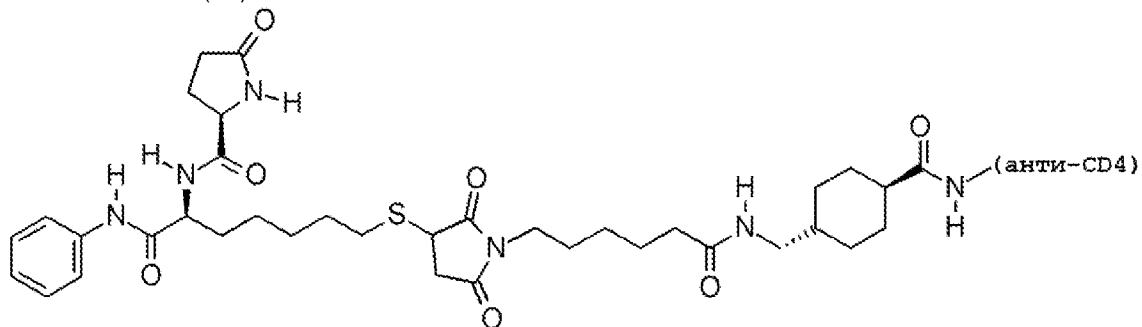


ST8193AA1 (32)

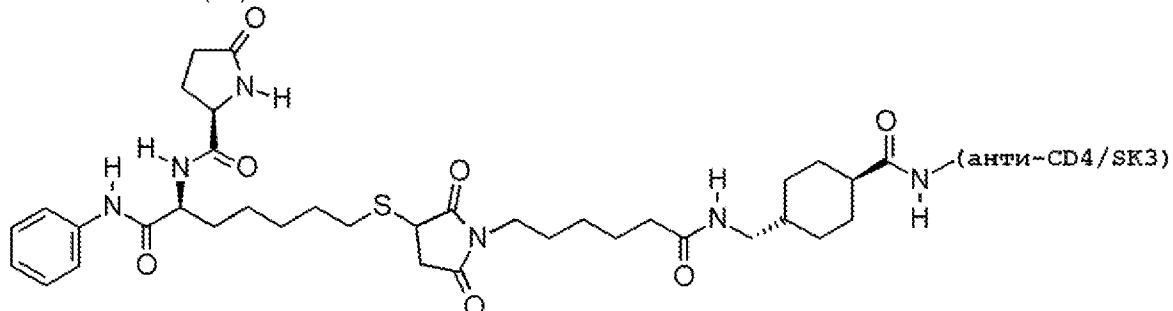


5

ST8194AA1 (33)

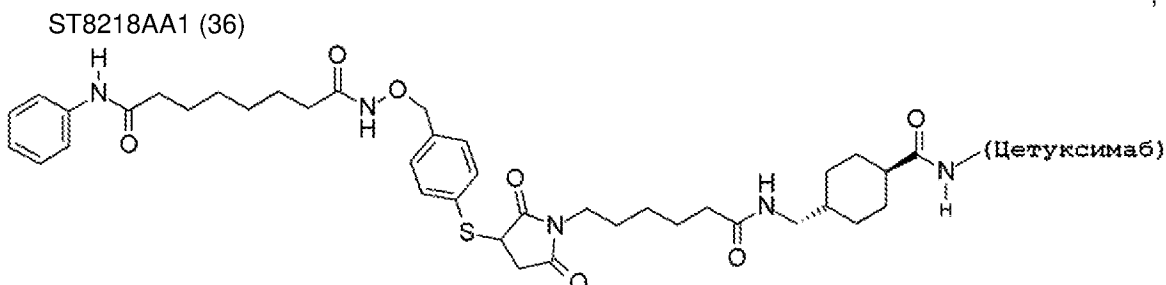
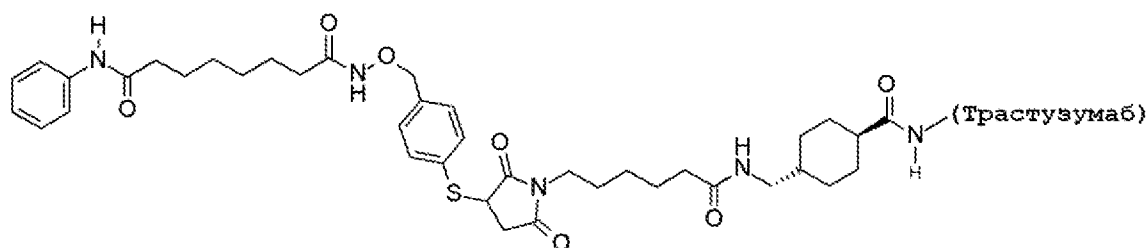


ST8212AA1 (34)



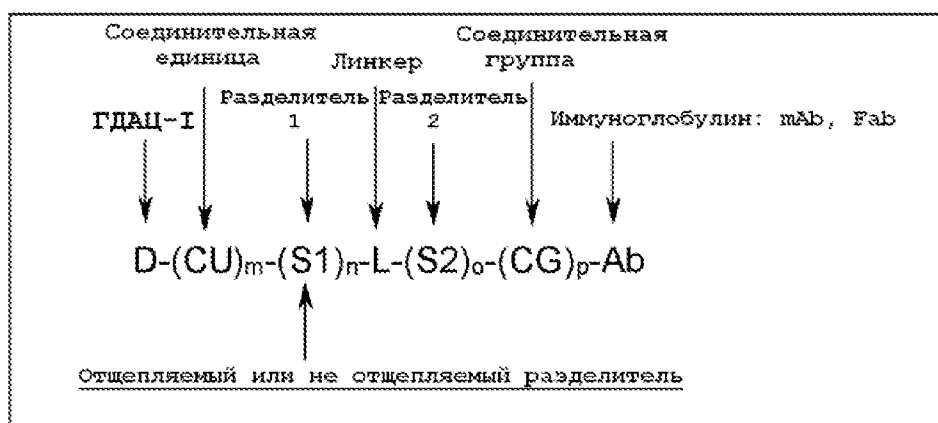
10

ST8213AA1 (35)



ST8219AA1 (37)

На наступній загальній схемі показані КАЛС на основі іГДАЦ. Активний лікарський засіб (D) представлений ST7464AA1, що відповідає активному лікарському засобу ST7612AA1. ST7464AA1 є одним з можливих лікарських засобів (D) КАЛС (формула I) і корисних навантажень (формула II), описаних у даному винаході.



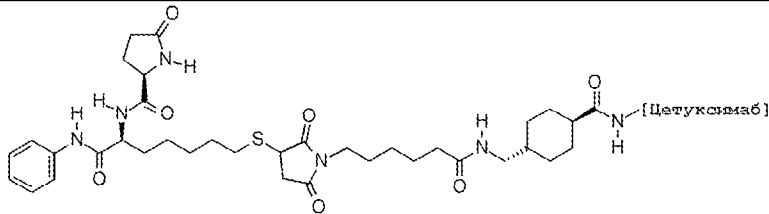
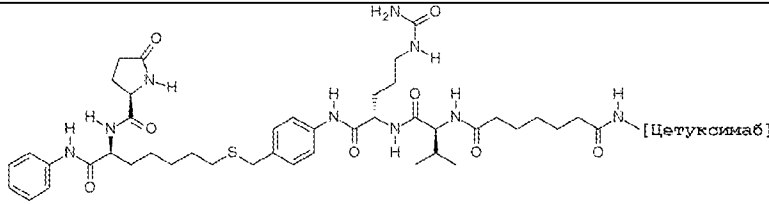
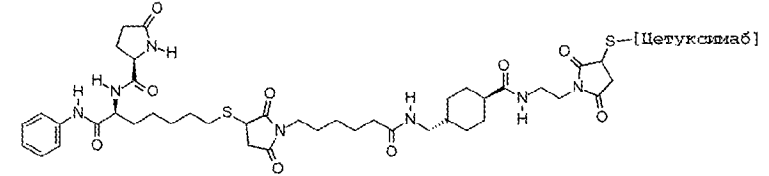
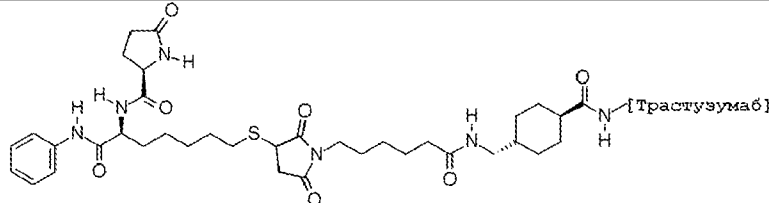
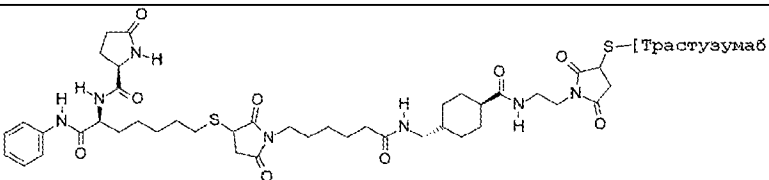
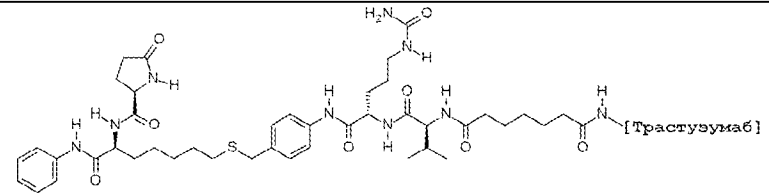
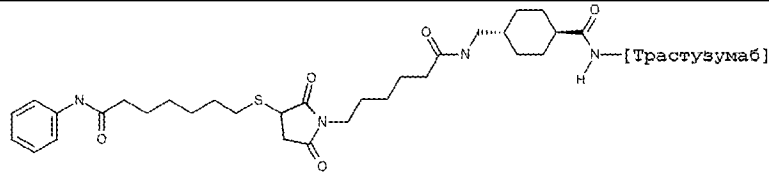
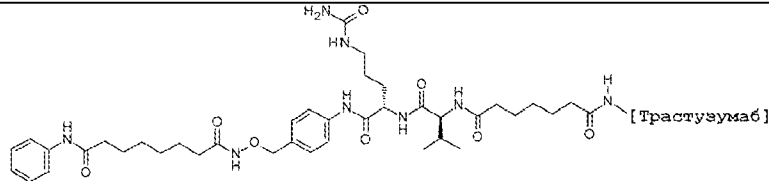
Вище представлена загальна схема типових кон'югатів антитіло-лікарський засіб (КАЛС) на основі інгібіторів ГДАЦ.

В іншому варіанті представлений спосіб одержання корисного навантаження, який включає введення тиольних, гідроксамінових або бензамідних залишків інгібітору ГДАЦ, придатної сполучної одиниці (CU), до якої приєднують інші компоненти корисного навантаження, якщо є. Спейсер (S1) - який може бути відщеплюваним (звичайно валіновий-цитруліновий дипептид (Val-Cit), субстрат ферменту катепсину) або не відщеплюваним - лінкер (L), другий спейсер (S2) і кінцева група (CG)', придатна для кон'югування з лізином або цистеїном антитіла.

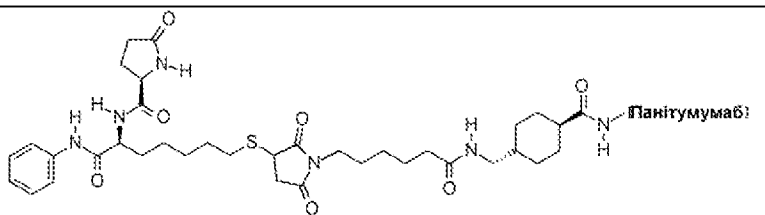
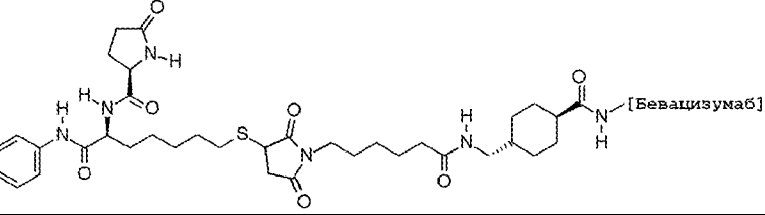
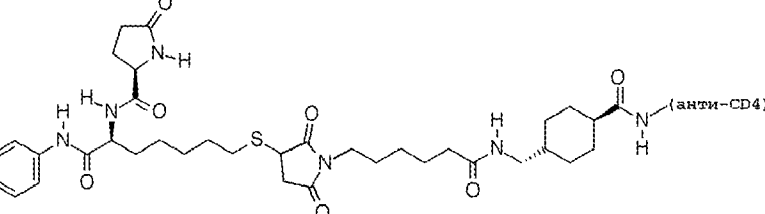
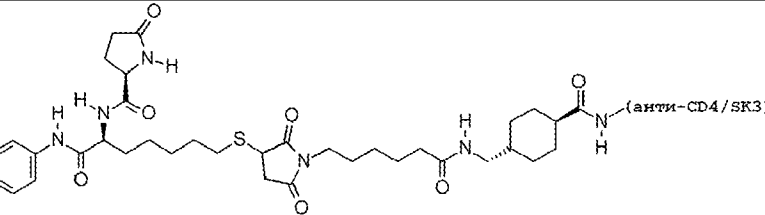
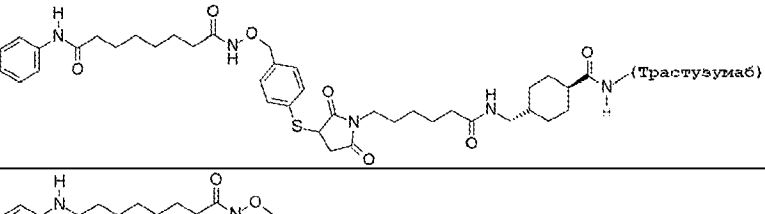
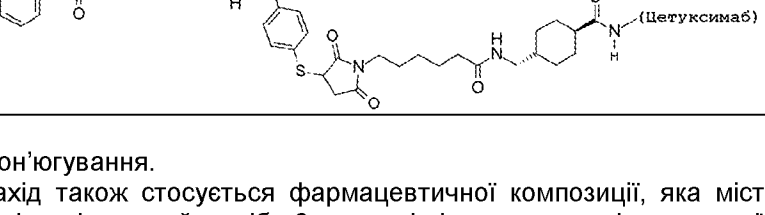
В іншому варіанті представлений спосіб одержання кон'югатів антитіло-лікарський засіб (КАЛС) на основі ГДАЦ, який звичайно включає реакцію кон'югування між залишком (CG)' частини молекули корисного навантаження й аміногрупою лізинового залишку імунoglobуліну (Ab). Для кон'югування з цистеїнами, S-S цистеїнові зв'язки імунoglobуліну повинні бути попередньо відновлені придатним відновним агентом. На сульфгідрильних групах (-SH) вільних цистеїнових залишків продовжують наступну реакцію кон'югування з корисним навантаженням, що має відповідну групу (CG)'.

Таблиця 2

КАЛС

Ід. № код ST	Хімічна структура	МК	ВЛА
(24) 8154AA1		Lys	8,0 (±1)
(25) 8155AA1		Lys	6,1 (±1)
(26) 8177AA1		Cys	4,0 (±0,7)
(27) 8178AA1		Lys	8,0 (±0,2)
(28) 8176AA1		Cys	4,5 (±0,5)
(29) 8179AA1		Lys	6,1 (±0,2)
(30) 8205AA1		Lys	6,2 (±0,2)
(31) 8202AA1		Lys	5,5 (±0,5)

КАЛС

Ід. № код ST	Хімічна структура	МК	ВЛА
(32) 8193AA1		Lys	9,0 (±2)
(33) 8194AA1		Lys	6,5 (±0,5)
(34) 8212AA1		Lys	8,0 (±0,2)
(35) 8213AA1		Lys	4,0 (±1)
(36) 8218AA1		Lys	5,0 (±0,5)
(37) 8219AA1		Lys	4,0 (±0,5)

МК: місце кон'югування.

Даний винахід також стосується фармацевтичної композиції, яка містить зазначені вище кон'югати антитіло-лікарський засіб. Зазначені фармацевтичні композиції містять принаймні експіцієнт і/або фармацевтично прийнятний носій. Активний інгредієнт може вводитися в стандартній формі введення в суміші зі звичайними фармацевтичними носіями тваринам або людині. Придатні стандартні форми включають форми для ентерального або парентерального введення, де ентеральне введення включає пероральний, аерозольний, ректальний або буквальний шляхи, і парентеральне введення включає підшкірний, внутрішньом'язовий або внутрішньовенний і черезшкірний шляхи.

Фармацевтична композиція може бути для ентерального або парентерального введення, де ентеральне введення включає пероральний, аерозольний, ректальний або буквальний шляхи, і парентеральне введення включає підшкірний, внутрішньом'язовий або внутрішньовенний і черезшкірний шляхи.

Тверда композиція для перорального введення може бути таблеткою, пігулкою, порошком, капсулою або гранулятом. У цих композиціях, кон'югат антитіло-лікарський засіб відповідно до даного винаходу змішують з одним або більше інертними розріджувачами, такими як крохмаль, целюлоза, сахароза, лактоза або двоокис кремнію. Ці композиції можуть також містити інші речовини, такі як мастильні агенти, такі як стеарат магнію або тальк, барвні агенти або агенти для покриття.

Стерильна композиція для парентерального введення може переважно бути водним або неводним розчином, суспензією або емульсією. Застосовуваний розчинник або носій може бути одержаний з води, пропіленгліколю або поліетиленгліколю, рослинних олій, органічних складних ефірів для ін'єкцій або інших придатних органічних розчинників. Ці композиції також можуть включати ад'юванти, зокрема змочувальні, ізотонічні, емульгуючі, диспергуючі й стабілізуючі агенти.

У даному винаході представлений *in vitro* аналіз проліферації клітин як демонстрація ефективності нових КАЛС.

Конкретним варіантом винаходу є склад, придатний для місцевої доставки розпиленням. У зв'язку з цим, кон'югати антитіло-лікарський засіб відповідно до даного винаходу особливо придатні для лікування захворювань, пов'язаних з легеньми або черевною порожниною, таких як рак легені або черевної порожнини, або раку яєчників, шийки матки-ендометрія, шлунка, товстої кишки, апендикса, псевдоміксоми очеревини, раку підшлункової залози, метастазів у печінці, рідкісних новоутворень (саркома черевної порожнини некишкових тканин).

У даному винаході також представлена сполука формули (I), як визначено вище, для застосування в способі лікування раку, розладів проліферації клітин і вірусних інфекцій.

Переважно, сполуку формули (I), як визначено вище, застосовують у способі лікування визначених типів раку, таких як, але не обмежених ними: карциноми, включаючи карциному сечового міхура, молочної залози, товстої кишки, нирок, печінки, легені, включаючи дрібноклітинний рак легені, стравоходу, жовчного міхура, яєчників, підшлункової залози, шлунка, шийки матки, щитовидної залози, простати й шкіри, включаючи плоскоклітинну карциному; гемопоетичні пухлини лімфатичних клітин, включаючи лейкоз, гострий лімфатичний лейкоз, гострий лімфобластний лейкоз, В-клітинну лімфому, Т-клітинну лімфому, ходжкінську лімфому, неходжкінську лімфому, волосатоклітинну лімфому і лімфому Беркітта; гемопоетичні пухлини мієлогенних клітин, включаючи гострий і хронічний мієлогенний лейкоз, мієлодиспластичний синдром і промієлоцитарний лейкоз; пухлини мезенхімального походження, включаючи фібросаркому й рабдоміосаркому; пухлини центральної й периферичної нервової системи, включаючи астроцитому, нейробластому, гліому й шваному; і інші пухлини, включаючи меланому, семіному, тератоканциному, остеосаркому, пігментарну ксеродермію, кератоксантому, фолікулярний рак щитовидної залози, саркому Капоші й мезотеліому.

У даному винаході представлений *in vitro* аналіз проліферації клітин як демонстрація ефективності нових КАЛС.

Сполуки відповідно до даного винаходу зв'язуються з рецептором порівнянним чином з вільними антитілами, і зв'язування КАЛС з ErbB1- і ErbB2-експресуючими пухлинними клітинами підтверджується аналізом FACS.

Аналіз флуоресценції демонструє, що сполуки відповідно до даного винаходу здатні поглинатися пухлинними клітинами порівнянним чином з їх природними аналоговими антитілами без зниження швидкості зв'язування. Більше того, усі КАЛС відповідно до даного винаходу взаємодіють з їх специфічним рецептором з ефективністю, порівнянною з ефективністю природних антитіл, пов'язаних з КАЛС, таких як, наприклад, Цетуксимаб або Трастузумаб.

КАЛС відповідно до даного винаходу зберігають свою цілісність при розпиленні, і тому вони можуть бути включені в композиції для розпилення, що є ефективним способом доставки mAbs при респіраторних захворюваннях. Цей спосіб є неінвазивним способом, придатним для націлювання лікарських засобів у легені, обмежуючи вплив на вторинні органи.

Сполуки відповідно до даного винаходу інгібують проліферацію пухлинних клітин зі значеннями IC₅₀ нижче, ніж значення тільки Цетуксимабу, при оцінці на клітинах аденокарциноми легенів, тим самим підтверджуючи їх протипухлинну ефективність.

Усі тестовані КАЛС викликають відповідне підвищення рівня ацетилювання α -тубуліну й гістону H3 у всіх тестованих колоніях пухлинних клітин, завдяки прямому ферментному інгібуванню ГДАЦ6 і ГДАЦ I класу, відповідно.

In vivo експеримент продемонстрував, що сполуки відповідно до даного винаходу є більш ефективними в інгібуванні росту пухлин легені, товстої кишки, підшлункової залози, яєчників, у

порівнянні з тільки Цетуксимабом і Трастузумабом.

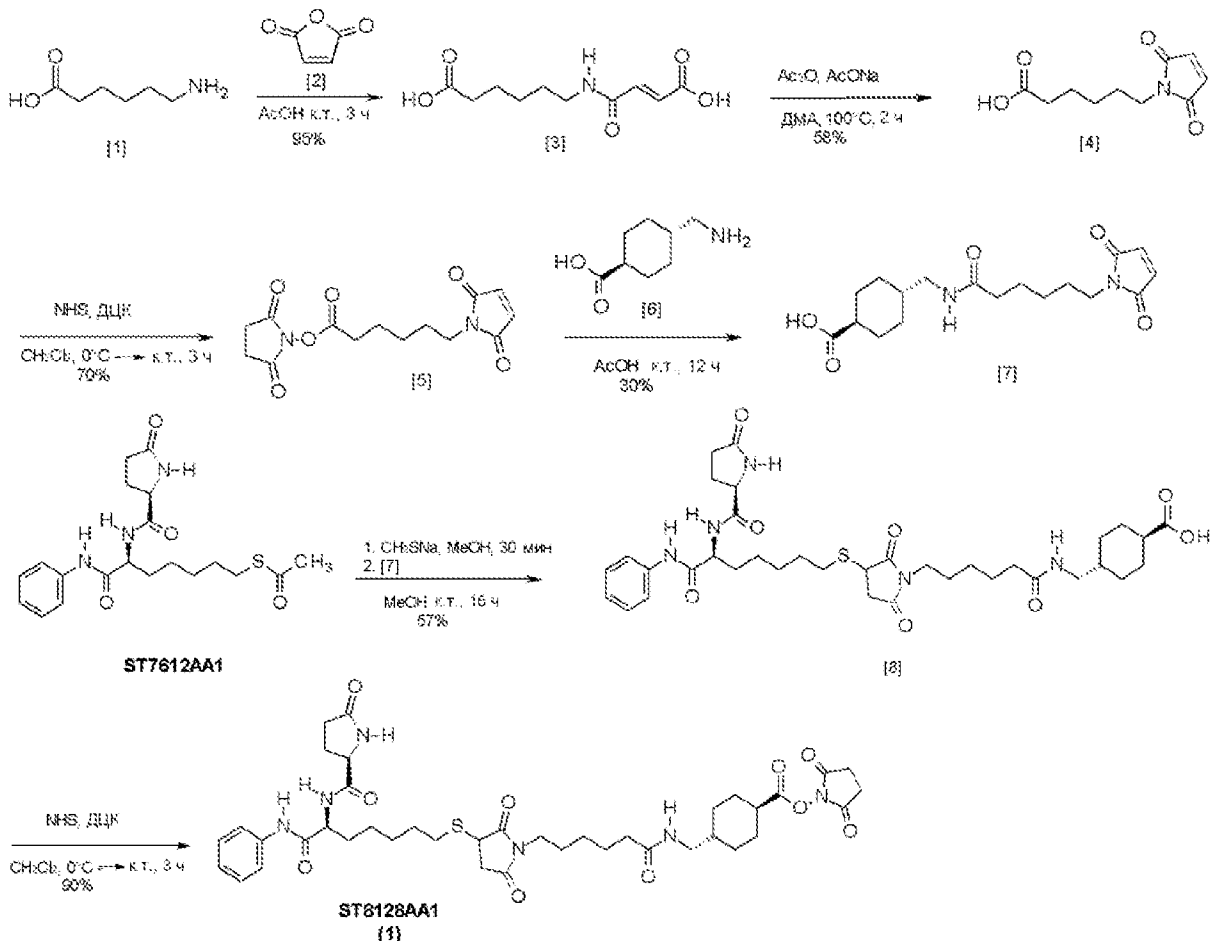
Нові КАЛС показують протипухлинну дію при введенні аерозолем і внутрішньоочеревинним шляхом на місцеву пухлину, застосовні для внутрішньоочеревинної аерозольної хіміотерапії під тиском (ВАХТ).

5 Приклади

Даний винахід далі описаний з посиланням на наступні приклади. Фахівець у даній галузі зрозуміє, що ці приклади призначені тільки для ілюстративних цілей і не повинні розглядатися як такі, що обмежують обсяг даного винаходу.

Приклад 1. Синтез і дослідження корисного навантаження (1), ST8128AA1

10



(E)-6-(3-карбоксіакриламід)гексанова кислота [3]

15 Розчин малеїнового ангідриду [2] (1,95 г, 19,9 ммоль) у льодяній оцтовій кислоті (10 мл) додають по краплях до перемішаного розчину 6-амінокапронової кислоти [1] (2,6 г, 19,9 ммоль) у льодяній оцтовій кислоті (10 мл). Суміш витримують при кімнатній температурі протягом 3 годин. Осад, що утворився протягом реакції, потім фільтрують, промивають діетиловим ефіром з одержанням сполуки [3] у вигляді білої твердої речовини, 4,3 г (95 % вихід). Яке-небудь інше очищення твердої речовини не потрібне.

20 ¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 9,10 (с, 1H), 6,35 (д, J=12,6 Гц, 1H), 6,18 (д, J=12,6 Гц, 1H), 3,12 (м, 2H), 2,15 (т, J=7,4 Гц, 2H), 1,44 (м, 4H), 1,33-1,12 (м, 2H).

¹³C-ЯМР (100 МГц, ДМСО) δ 174,8, 172,4, 165,8, 133,5, 132,2, 33,9, 28,5, 26,3, 24,5, 21,4.

6-(2,5-Діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанова кислота [4]

25 Оцтовий ангідрид (3,8 мл, 40,75 ммоль) і ацетат натрію (418 мг, 5,09 ммоль) додають при кімнатній температурі до розчину сполуки [3] (4,3 г, 20,37 ммоль) у диметилацетаміді (20 мл) при енергійному перемішуванні, і потім нагрівають до 100 °C протягом 2 годин. Потім суміш охолоджують до кімнатної температури, розбавляють дихлорметаном (35 мл) і промивають 5-6 разів НСІ 0,5М (6 порцій по 10 мл кожна) для видалення диметилацетаміду. Органічний шар сушать над безводним сульфатом натрію, фільтрують і розчинник видаляють у вакуумі з одержанням продукту [4] у вигляді безбарвного масла, 2,5 г (58 % вихід).

30 ¹H-ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 9,87 (шс, 1H), 6,76 (д, J=1,6 Гц, 2H), 3,54-3,38 (м, 2H), 2,52-2,39

(м, 1H), 2,30-2,26 (м, 1H), 1,70-1,46 (м, 4H), 1,39-1,19 (м, 2H).

¹³C-ЯМР (100 МГц, MeOD) δ 179,4, 171,1, 133,9, 36,9, 33,2, 29,2, 24,1, 23,3.

2,5-Діоксопіролідін-1-іл-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексаноат [5]

5 Дициклогексилкарбодіімід (2,68 г, 13,02 ммоль) і N-гідроксисукцинімід (1,36 г, 11,84 ммоль) додають при кімнатній температурі до перемішаного розчину сполуки [4] (2,5 г, 11,84 ммоль) у безводному дихлорметані (15 мл) і суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 3 годин. Білу тверду речовину фільтрують з дихлорметаном для видалення дициклогексилсечовини, органічну фазу промивають HCl 0,1N і водою, потім сушать над безводним сульфатом натрію й розчинник видаляють роторним випарюванням. Одержаний залишок піддають флеш-хроматографії на колонці в системі середнього тиску Sepacore® Buchi (силікагель; градієнт А: петролейний ефір/В: етилацетат; В % 0-80 за 15 хвилин) з одержанням активованої кислоти [5] у вигляді білої твердої речовини, 2,4 г (70 %). МС: m/z 309 [M+H]⁺.

¹H-ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 6,78 (с, 2H), 3,49-3,46 (м, 2H), 2,82 (с, 4H), 2,62-2,59 (м, 2H), 1,78-1,65 (м, 2H), 1,64-1,50 (м, 2H), 1,46-1,26 (м, 2H).

15 ¹³C-ЯМР (100 МГц, MeOD) δ 169,8, 169,0, 167,3, 132,5, 35,4, 28,6, 26,1, 23,8, 23,6, 22,3.

4-((6-(2,5-Діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-метил)циклогексанкарбонова кислота [7]

20 Транс-4-(амінометил)циклогексанкарбонову кислоту [6] (2,38 г, 15,17 ммоль) додають при кімнатній температурі до перемішаного розчину сполуки [5] (2,46 г, 7,98 ммоль) у льодяній оцтовій кислоті (20 мл), і реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 16 годин. Оцтову кислоту видаляють при зниженому тиску, залишок розбавляють дихлорметаном і промивають водою для видалення N-гідроксисукцинамиду. Органічний шар сушать над безводним сульфатом натрію, фільтрують і розчинник видаляють у вакуумі. Залишок піддають флеш-хроматографії на системі середнього тиску Sepacore® Buchi, силікагель з градієнтом 0-100 % етилацетату в петролейному ефірі за 7 хвилин, і 100 % етилацетату за 5 хвилин, з одержанням сполуки [7] у вигляді білої твердої речовини, 807 мг (30 % вихід). МС: m/z 349 [M-H]⁻.

¹H-ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 10,47 (шс, 1H), 7,81 (с, 1H), 6,66 (д, J=2,3 Гц, 2H), 3,35 (с, 2H), 2,88 (с, 2H), 2,04 (с, 2H), 1,86 (д, J=10,5 Гц, 2H), 1,68 (д, J=10,1 Гц, 2H), 1,47 (с, 2H), 1,36-1,03 (м, 8H), 0,85 (д, J=11,7 Гц, 2H).

30 ¹³C-ЯМР (100 МГц, MeOD) δ 176,8, 173,0, 169,5, 132,4, 43,4, 41,5, 35,9, 35,5, 33,8, 27,9, 26,6, 25,9, 24,4, 23,6.

4-((6-(2,5-Діоксо-3-((7-оксо-6-(5-оксопіролідін-2-карбоксамідо)-7-

(феніламіно)гептил)тіо)піролідін-1-іл)гексанамідо)метил)циклогексанкарбонова кислота [8]

35 Розчин тіометилату натрію 1M у дегазованому метанолі (17 мг, 0,25 ммоль, 0,250 мл) додають при кімнатній температурі до розчину ST7612AA1 (100 мг, 0,25 ммоль) у дегазованому метанолі. Перемішувану суміш витримують при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Реакційну суміш промивають N₂ протягом 5-10 хвилин для видалення MeSH і додають сполуку [7] (88 мг, 0,25 ммоль). Суміш зберігають при кімнатній температурі протягом 16 годин. Потім розчинник видаляють роторним випарюванням, і неочищений продукт очищують хроматографією на колонці з градієнтом 2-20 % метанол у дихлорметані. Сполуку [8] одержують у вигляді білої твердої речовини, 102 мг (57 %). МС: m/z 737 [M+Na]⁺.

40 ¹H-ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 9,97 (шс, с), 7,92 (м, 2H), 7,60 (м, 2H), 7,34 (м, 2H), 7,14 (м, 1H), 4,57 (м, 1H), 4,31 (м, 1H), 3,54 (м, 2H), 3,06 (д, J=4,7 Гц, 2H), 2,49-2,14 (м, 4H), 2,10-2,02 (м, 7H), 1,87-1,62 (м, 12H), 1,76-1,23 (м, 12H), 1,01 (д, J=12,4 Гц, 2H).

¹³C-ЯМР (100 МГц, MeOD) δ 179,6, 178,4, 177,0, 175,3, 174,7, 173,0, 170,7, 128,0 (2C), 123,7, 119,5 (2C), 77,6, 56,2, 53,5, 44,6 (2C), 42,7, 38,6, 37,7, 35,5, 35,0, 31,4, 30,3, 29,1 (2C), 28,9, 28,0 (3C), 27,4, 26,4, 25,5, 25,0, 24,6, 24,4.

50 2,5-Діоксопіролідін-1-іл-4-((6-(2,5-діоксо-3-((7-оксо-6-(5-оксопіролідін-2-карбоксамідо)-7-(феніламіно)гептил)тіо)-піролідін-1-іл)гексанамідо)метил)циклогексанкарбоксилат (1), ST8128AA1

55 В 50 мл колбі під N₂ сполуку [8] (102 мг, 0,14 ммоль) розчиняють у безводному дихлорметані (5 мл), що містить 0,1 мл сухого диметилформаміду. N-гідроксисукцинамід (24 мг, 0,21 ммоль) і дициклокарбодіімід (50 мг, 0,24 ммоль) додають при кімнатній температурі, і реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 16 годин. Розчинник видаляють, і залишок очищують флеш-хроматографією в 2-6 % метанолі в дихлорметані. Продукт ST8128AA1 одержують у вигляді безбарвної в'язкої рідини; 101 мг (90 % вихід). МС: m/z 811 [M+H]⁺; 833 [M+Na]⁺.

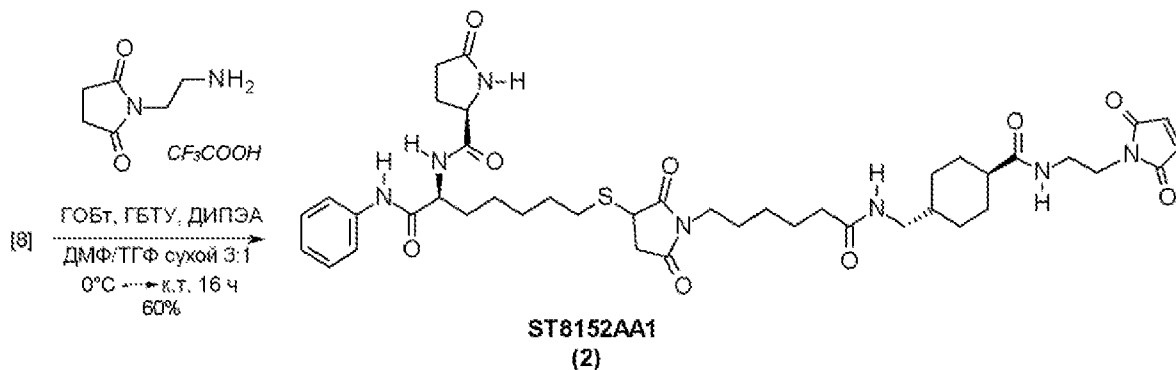
60 ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,43 (с, 1H), 7,78 (д, J=7,0 Гц, 1H), 7,54 (д, J=7,6 Гц, 2H), 7,35-7,14 (м, 2H), 7,08 (т, J=7,0 Гц, 1H), 6,12 (с, 1H), 4,67 (д, J=6,4 Гц, 1H), 4,23 (с, 1H), 3,69 (с, 1H), 3,48 (с,

2H), 3,17-2,93 (м, 3H), 2,83 (с, 5H), 2,26-2,03 (м, 9H), 1,97-1,71 (м, 8H), 1,71-1,18 (м, 16H), 1,02 (дд, J=24,0, 11,7 Гц, 2H).

¹³C-ЯМР (100 МГц, CDCl₃) δ 178,9, 176,7, 176,4, 174,4, 173,2, 172,7, 170,5, 170,3, 168,9, 137,4, 128,48 (2C), 124,06, 119,58 (2C), 53,9, 45,4, 45,1, 42,1, 39,2, 38,7, 38,3, 37,6, 37,3, 36,3, 32,1, 31,3 (4C), 29,9, 28,8, 28,2, 27,2, 26,2, 25,3, 18,6, 17,3, 12,0.

5

Приклад 2. Синтез і дослідження корисного навантаження (2), ST8152AA1



10

N-(7-((1-(6-(((4-((2-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)етил)карбамоїл)циклогексил)метил)аміно)-6-оксогексил)-2,5-діоксопіролідін-3-іл)тіо)-1-оксо-1-(феніламіно)гептан-2-іл)-5-оксопіролідін-2-карбоксамід (2), ST8152AA1

15

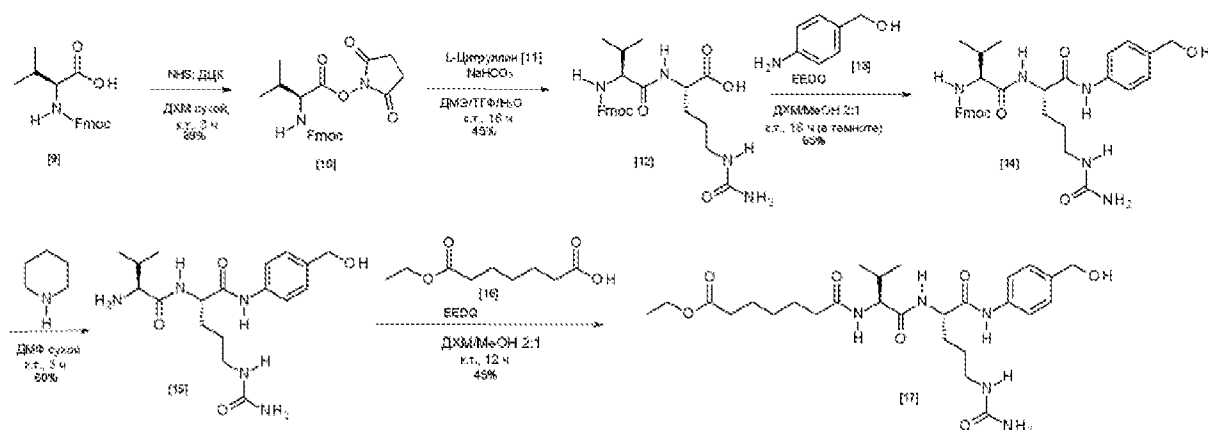
В 50 мл колбі під N₂ сполуку [8] (87 мг, 0,11 ммоль) розчиняють у суміші тетрагідрофурану/диметилформаміду 3:1 (4 мл) при 0 °С. Потім додають трифтороцтову сіль N-(2-аміноетил)малеїміду (33 мг, 0,13 ммоль), гідрат 1-гідроксибензотриазолу (22 мг, 0,16 ммоль), ГБТУ (61 мг, 0,16 ммоль) і N,N-діізопропілетиламін (0,048 мл, 0,27 ммоль), і суміш витримують при 0 °С протягом 30 хвилин, і потім при кімнатній температурі протягом 16 годин. Реакційну суміш розбавляють дихлорметаном і промивають два рази водою й два рази насиченим розчином солі, сушать над безводним сульфатом натрію й розчинник видаляють роторним випарюванням. Залишок очищають флеш-хроматографією на колонці 2-20 % метанолом у дихлорметані. Продукт ST8152AA1 одержують у вигляді безбарвної в'язкої рідини, 55 мг (60 % вихід). МС: m/z 859 [M+Na]⁺.

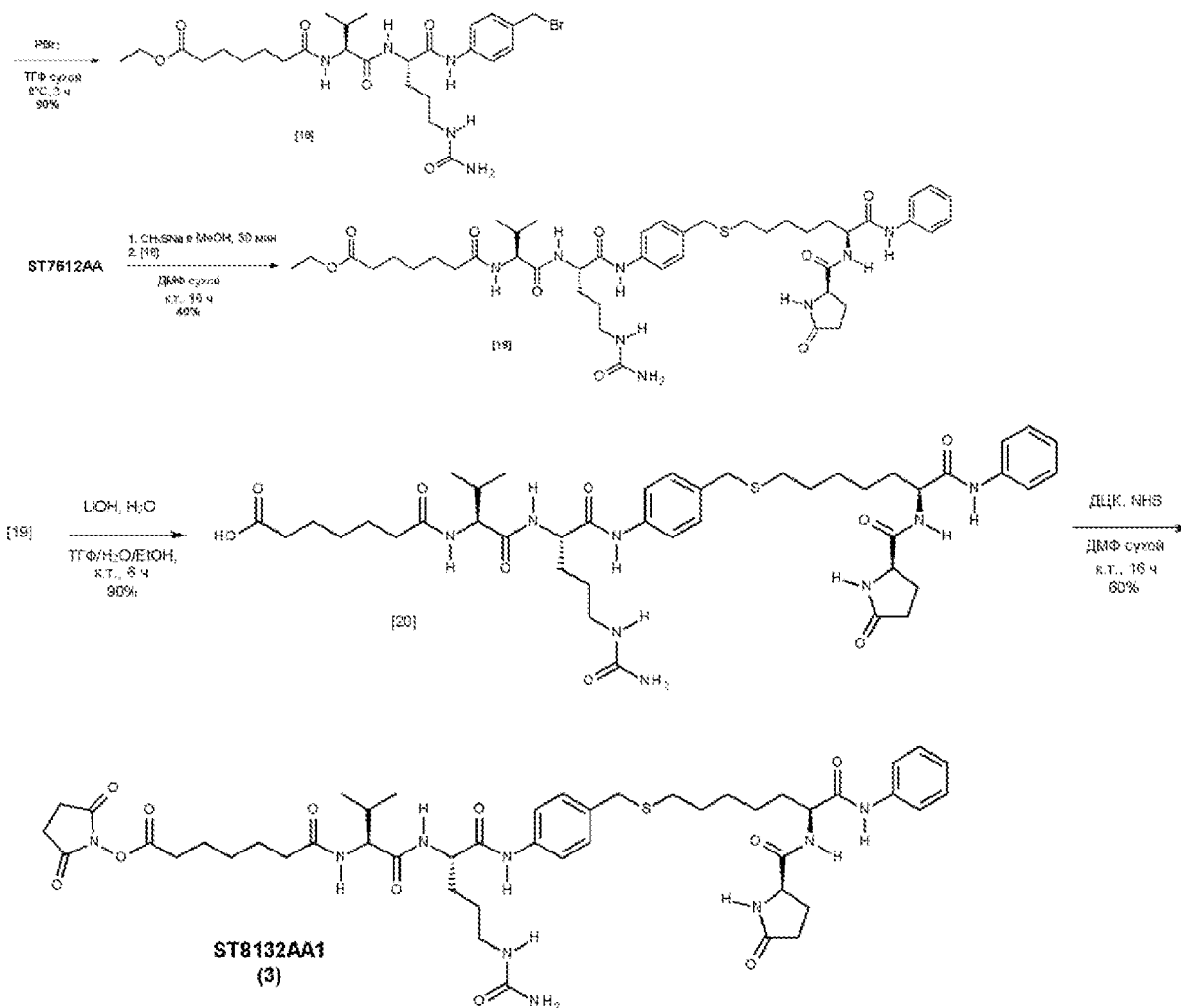
20

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,46 (шс, 1H), 7,60 (д, J=7,9 Гц, 2H), 7,36-7,23 (м, 2H), 7,09 (т, J=7,4 Гц, 1H), 6,72 (с, 2H), 6,49 (т, J=5,6 Гц, 1H), 6,32 (т, J=5,7 Гц, 1H), 4,65 (д, J=6,1 Гц, 1H), 4,37-4,24 (м, 1H), 3,83-3,60 (м, 2H), 3,60-3,37 (м, 5H), 3,25-2,97 (м, 4H), 2,89-2,61 (м, 2H), 2,60-2,11 (м, 4H), 2,00 (м, 5H), 1,90-1,72 (м, 13H), 1,72-1,15 (м, 8H), 0,94 (дд, J=24,3, 11,4 Гц, 2H).

25

Приклад 3. Синтез і дослідження корисного навантаження (3), ST8132AA1





(S)-2,5-діоксопіролідін-1-іл-2-((((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)-3-метилбутаноат [10]

5 Дициклокарбодіімід (1,55 г, 7,52 ммоль) і N-гідроксисукцинімід (762 мг, 6,63 ммоль) додають при кімнатній температурі до перемішаного розчину Fmoc-Val-OH [9] (1,5 г, 4,42 ммоль) у безводному дихлорметані (25 мл). Суміш витримують при кімнатній температурі протягом 3 годин. Білу тверду речовину, що утворилася в цій реакції, фільтрують з дихлорметаном для видалення дициклогексилсечовини, органічну фазу промивають HCl 0,1N і водою, потім сушать над безводним сульфатом натрію й розчинник видаляють роторним випарюванням. Залишок піддають флеш-хроматографії на колонці в 1 % метанолі в дихлорметані з одержанням продукту [10] у вигляді білої твердої речовини, 1,7 г (89 % вихід). МС: m/z 459 [M+Na]⁺.

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,80 (д, J=7,5 Гц, 2H), 7,68-7,55 (м, 2H), 7,43 (т, J=7,4 Гц, 2H), 7,34 (дд, J=15,9, 8,5 Гц, 2H), 4,70 (д, J=4,6 Гц, 1H), 4,56-4,40 (м, 3H), 4,28 (т, J=6,6 Гц, 1H), 2,85 (с, 4H), 2,37 (дд, J=12,3, 6,5 Гц, 1H), 1,08 (дд, J=11,0, 6,9 Гц, 6H).

15 (S)-2-((S)-2-((((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанова кислота [12]

20 Сполуку [10] (1,7 г, 3,9 ммоль) у диметоксітані (10 мл) додають до розчину L-цитруліну [11] (700 мг, 4 ммоль), розчиненого в суміші тетрагідрофурану й водного бікарбонату натрію (344 мг, 4 ммоль в 10 мл води). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 16 годин. Додають розчин лимонної кислоти 15 % у воді (50 мл), і суміш екстрагують 10 % ізопропіловим спиртом в етилацетаті (2x75 мл). Розчинник видаляють роторним випарюванням. Після додавання діетилового ефіру й опромінення ультразвуком утворюється тверда речовина. Фільтрація з наступним промиванням діетиловим ефіром дає сполуку [12] у вигляді білої твердої речовини, 870 мг (45 %). МС: m/z 495 [M-H]⁻.

25 ¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO) δ 8,19 (шм, 3H), 7,87 (т, J=25,1 Гц, 2H), 7,77 (т, J=6,8 Гц, 2H), 7,49-7,23 (м, 4H), 5,99 (с, 1H), 5,43 (с, 2H), 4,45-4,08 (м, 4H), 3,97 (т, J=7,5 Гц, 1H), 2,99 (д, J=5,1 Гц, 2H), 2,02 (д, J=6,1 Гц, 1H), 1,74 (с, 1H), 1,61 (д, J=7,5 Гц, 1H), 1,44 (с, 2H), 0,91 (дд, J=12,5, 6,3

Гц, 6H).

¹³C-ЯМР (101 МГц, ДМСО) δ 173,4, 171,3, 169,8, 167,8, 158,8, 156,0, 143,8, 140,7, 127,6, 127,0, 65,7, 59,8, 51,9, 46,7, 30,5, 26,6, 19,18 (2C).

5 (9H-флуорен-9-іл)метил-((S)-1-(((S)-1-((4-(гідроксиметил)-феніл)аміно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іл)аміно)-3-метил-1-оксобутан-2-іл)карбамат [14]

EEDQ (840 мг, 3,4 ммоль) додають до розчину, що містить сполуку [12] (870 мг, 1,7 ммоль) і р-амінобензиловий спирт (227 мг, 1,8 ммоль) у дихлорметані/метанолі 2:1 (15 мл). Реакційну суміш залишають у темряві при кімнатній температурі протягом 16 годин. Розчинники видаляють, і одержаний твердий залишок фільтрують з застосуванням діетилового ефіру з одержанням продукту [14] у вигляді білої твердої речовини, 660 мг (65 % вихід). МС: m/z 624 [M+Na]⁺.

¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 10,00 (шс, 1H), 8,13 (м, 4H), 7,92 (д, J=7,3 Гц, 2H), 7,76 (д, J=7,6 Гц, 2H), 7,58 (д, J=8,1 Гц, 2H), 7,51-7,10 (м, 2H), 6,02 (с, 1H), 5,43 (м, 4H), 5,13 (с, 1H), 4,47 (с, 3H), 4,31 (м, 4H), 3,13-2,74 (м, 2H), 2,03 (с, 1H), 1,83-1,55 (м, 2H), 1,43 (с, 2H), 0,90 (д, J=6,7 Гц, 6H).

¹³C-ЯМР (101 МГц, ДМСО) δ 171,2, 170,4, 158,93, 156,15, 144,6, 143,8, 140,7, 137,5, 127,6, 127,2 (2C), 125,3, 120,1 (2C), 118,9, 65,7, 62,6, 60,1, 53,0, 46,7, 31,0, 30,5, 26,7, 19,6, 18,7.

(S)-2-((S)-2-аміно-3-метилбутанамідо)-N-(4-(гідроксиметил)-феніл)-5-уреїдопентанамід [15]

20 Піперидин (2,2 мл) додають до розчину сполуки [14] (660 мг, 1,09 ммоль) у безводному диметилформаміді (5 мл), і реакційну суміш залишають при кімнатній температурі на 3 год. Розчинник видаляють у вакуумі, і залишок обробляють дихлорметаном з одержанням твердої речовини, яку фільтрують з одержанням продукту [15], 240 мг (60 % вихід). МС: m/z 380 [M+H]⁺.

¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 10,11 (с, 1H), 8,25 (с, 1H), 7,58 (д, J=8,2 Гц, 2H), 7,27 (д, J=8,2 Гц, 2H), 6,10 (с, 1H), 5,46 (с, 2H), 4,48 (м, 3H), 3,23-3,09 (м, 2H), 3,11-2,88 (м, 2H), 1,99 (дд, J=12,2, 6,4 Гц, 2H), 1,99 (дд, J=12,2, 6,4 Гц, 1H), 1,81-1,55 (м, 2H), 1,55-1,28 (м, 2H), 1,04-0,68 (м, 6H).

¹³C-ЯМР (101 МГц, ДМСО) δ 173,3, 170,4, 158,9, 137,5, 126,9 (2C), 125,3, 119,9 (2C), 62,6, 59,3, 52,6, 31,1, 29,9, 26,6, 19,3, 17,0 (2C).

Етил-7-(((S)-1-(((S)-1-((4-(гідроксиметил)феніл)аміно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іл)аміно)-3-метил-1-оксобутан-2-іл)аміно)-7-оксогептаноат [17]

30 EEDQ (311 мг, 1,26 ммоль) додають до розчину сполуки [15] (240 мг, 0,63 ммоль) і моноетилпімелату [16] (0,123 мл, 0,69 ммоль) у суміші дихлорметану/метанолу 2:1 (20 мл). Реакційну суміш залишають у темряві при кімнатній температурі на 12 годин. Розчинники видаляють, і залишок очищають хроматографією на колонці 2-20 % метанол у дихлорметані з одержанням продукту [17] у вигляді в'язкої твердої речовини, 170 мг (45 % вихід). МС: m/z 572 [M+Na]⁺.

¹H-ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,59 (д, J=8,3 Гц, 2H), 7,34 (д, J=8,3 Гц, 2H), 4,65-4,44 (м, 4H), 4,25 (д, J=7,4 Гц, 1H), 4,15 (дд, J=14,2, 7,1 Гц, 2H), 3,30-3,06 (м, 2H), 2,34 (дд, J=13,9, 6,7 Гц, 2H), 2,13 (д, J=6,9 Гц, 1H), 1,92 (дд, J=14,1, 6,2 Гц, 2H), 1,89-1,74 (м, 2H), 1,74-1,34 (м, 12H), 1,30 (дд, J=18,0, 10,9 Гц, 3H), 1,06-0,84 (м, 8H).

¹³C-ЯМР (101 МГц, MeOD) δ 174,5, 172,1, 171,7, 170,4, 158,9, 136,5, 126,8 (2C), 124,1, 120,9 (2C), 62,9, 59,5, 58,6, 53,0, 38,4, 34,7, 33,0, 29,8, 29,2, 27,9, 27,2, 25,0, 23,6, 17,5, 16,9, 12,7.

Етил-7-(((S)-1-(((S)-1-((4-(бромметил)феніл)аміно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іл)аміно)-3-метил-1-оксобутан-2-іл)аміно)-7-оксогептаноат [18]

45 Трибромід фосфору (0,043 мл, 0,46 ммоль) додають при 0 °C до розчину сполуки [17] (170 мг, 0,31 ммоль) у безводному тетрагідрофурані (5 мл). Суміш зберігають при 0 °C протягом 3 годин. Реакційну суміш переносять безпосередньо на колонку з силікагелем для очищення флеш-хроматографією, 1-6 % метанол у дихлорметані, з одержанням продукту [18] у вигляді білої твердої речовини, 170 мг (90 % вихід). МС: m/z 613[M+H]⁺; 635 [M+Na]⁺.

¹H-ЯМР (400 МГц, ацетон-d₆) δ 9,85 (д, J=6,1 Гц, 1H), 7,85 (дд, J=25,2, 8,1 Гц, 2H), 7,39 (дт, J=44,7, 22,3 Гц, 2H), 4,90-4,54 (м, 5H), 4,19-3,97 (м, 2H), 3,58 (т, J=6,6 Гц, 1H), 3,36 (д, J=20,6 Гц, 2H), 2,41 (дд, J=21,3, 6,3 Гц, 2H), 2,33-2,16 (м, 3H), 2,14-2,02 (м, 2H), 2,04-1,93 (м, 2H), 1,93-1,73 (м, 2H), 1,71-1,46 (м, 2H), 1,48-1,13 (м, 6H), 1,11-0,77 (м, 8H).

Етил-7-(((S)-3-метил-1-оксо-1-(((S)-1-оксо-1-((4-(((S)-7-оксо-6-((R)-5-оксопіролідин-2-карбоксамідо)-7-(феніламіно)-гептил)тіо)метил)феніл)аміно)-5-уреїдопентан-2-іл)аміно)-7-оксогептаноат [19]

60 ST7612AA1 (125 мг, 0,31 ммоль) розчиняють у дегазованому метанолі (8 мл) в 50 мл колбі в атмосфері N₂. Розчин тіометилату натрію 1M у дегазованому метанолі (22 мг, 0,31 ммоль) додають при кімнатній температурі до першого розчину. Перемішувану суміш витримують при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Розчин промивають N₂ протягом 5-10 хвилин для видалення MeSH, потім розчинник видаляють роторним випарюванням. Сполуку [18] (170 мг,

0,31 ммоль), розчинену в мінімальній кількості безводного диметилформаміду, додають до залишку, і суміш витримують при кімнатній температурі протягом 16 годин. Розчинник видаляють роторним випарюванням, і неочищений продукт очищають хроматографією на колонці, 1-40 % метанол у дихлорметані, з одержанням сполуки [19] у вигляді аморфної твердої речовини; 106 мг (40 % вихід). МС: m/z 896 $[M+H]^+$; 918 $[M+Na]^+$.

1H -ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,60 (с, 4H), 7,43-7,18 (м, 4H), 7,13 (с, 1H), 4,55 (м, 4H), 4,40 (м, 2H), 4,13 (м, 2H), 3,66 (м, 6H), 3,19 (с, 4H), 2,75 (с, 2H), 2,37 (м, 6H), 2,11 (с, 2H), 1,97 (с, 1H), 1,82 (с, 2H), 1,64 (с, 7H), 1,42 (с, 4H), 1,27 (с, 4H), 1,01 (с, 6H).

7-(((S)-3-метил-1-оксо-1-(((S)-1-оксо-1-((4-(((S)-7-оксо-6-((R)-5-оксопіролідін-2-карбоксамідо)-7-(феніламіно)гептил)тіо)метил)феніл)аміно)-5-уреїдопентан-2-іл)аміно)-7-оксогептанова кислота [20]

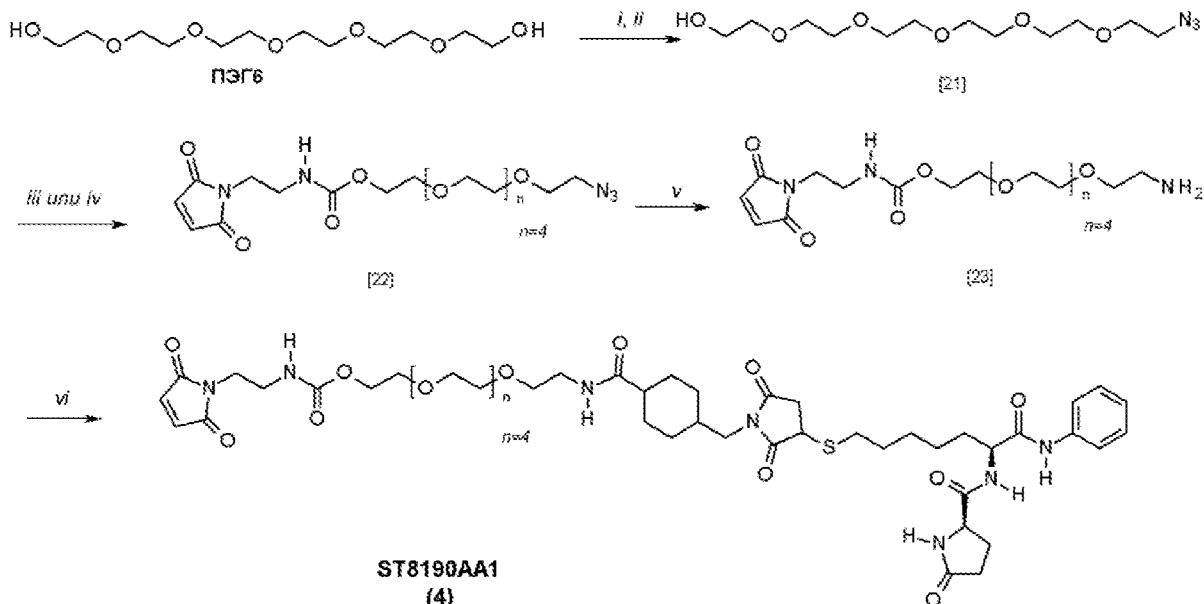
Моногідрат гідроксиду літію (42 мг, 1 ммоль) додають до розчину [19] (300 мг, 0,33 ммоль) у суміші тетрагідрофурану/води/етанолу 1:1:1 (12 мл). Реакційну суміш витримують при кімнатній температурі протягом 6 годин, потім її розбавляють етилацетатом і промивають HCl 1N. Неочищений продукт (180 мг) відразу застосовують на наступній стадії без очищення. МС: m/z 874 $[M+Li]^+$; 890 $[M+Na]^+$.

2,5-Діоксопіролідін-1-іл-7-(((S)-3-метил-1-оксо-1-(((S)-1-оксо-1-((4-(((S)-7-оксо-6-((R)-5-оксопіролідін-2-карбоксамідо)-7-(феніламіно)гептил)тіо)метил)феніл)аміно)-5-уреїдопентан-2-іл)аміно)-7-оксогептаноат (3), ST8132AA1

Дициклогексилкарбодіімід (70 мг, 0,35 ммоль) і N-гідроксисукцинімід (34 мг, 0,3 ммоль) додають при кімнатній температурі до перемішаного розчину сполуки [20] (180 мг, 0,20 ммоль) у безводному диметилформаміді (3 мл). Суміш витримують при кімнатній температурі протягом 16 годин. Білу тверду речовину, що утворилася в реакції, фільтрують для видалення дициклогексилсечовини, органічну фазу промивають HCl 0,1N і водою, потім сушать над безводним сульфатом натрію, і розчинник видаляють у вакуумі. Одержаний залишок піддають флеш-хроматографії на колонці 2-20 % метанол у дихлорметані з одержанням активованої кислоти (3) у вигляді білої в'язкої твердої речовини, 109 мг (60 % вихід). МС: m/z 987 $[M+Na]^+$.

1H -ЯМР (400 МГц, DMSO) δ 10,10 (с, 4H), 9,95 (с, 1H), 7,59 (м, 4H), 7,33 (т, $J=7,5$ Гц, 2H), 7,24 (д, $J=7,8$ Гц, 2H), 7,08 (т, $J=7,2$ Гц, 1H), 6,00 (с, 1H), 5,42 (с, 2H), 4,43 (д, $J=14,3$ Гц, 2H), 3,67 (с, 1H), 3,12-2,90 (м, 2H), 2,84 (с, 4H), 2,65 (м, 5H), 2,53 (с, 6H), 2,17 (м, 2H), 1,63 (м, 10H), 1,36 (с, 4H), 0,94-0,75 (м, 8H).

Приклад 4. Синтез і дослідження корисного навантаження (4), ST8190AA1



i) Тозил-Cl, TEA, ТГФ; ii) NaN₃, ДМФ; iii) п-нітрофенілхлорформіат, ДМАП, ДХМ; iv) трифторацетат N-(2-аміноетил)малеїмід, ДБУ, ДХМ; v) PPh₃, ТГФ; vi) 4-((2,5-діоксо-3-(((6S)-7-оксо-6-(5-оксопіролідін-2-карбоксамідо)-7-(феніламіно)гептил)тіо)піролідін-1-іл)метил)циклогексан-1-карбонова кислота, ГОБт, ГБТУ, ДІПЕА, ТГФ.

2-[2-(2-[2-(2-Гідроксіетоксі)етоксі]етоксі)етоксі)-етоксі]етилазид [21]

До розчину гексаетиленгліколю (50 г, 177 ммоль) і триетиламіну (14 мл, 100 ммоль) у ТГФ

(250 мл) додають паратолуолсульфонілхлорид (13 г, 70 ммоль) у ТГФ (250 мл), і розчин перемішують протягом ночі. Потім розчин розбавляють CH_2Cl_2 (200 мл) промивають 1N HCl (3×150 мл) і насиченим розчином солі (150 мл) і сушать над Na_2SO_4 . Після фільтрації й випарювання розчинників у вакуумі залишок очищають хроматографією на колонці (двоокис кремнію, 2 % метанол в CH_2Cl_2) з одержанням монотозильного похідного (24,4 г, 56 ммоль, 80 % у порівнянні з p-TsCl) у вигляді безбарвного масла. ТШХ (CH_2Cl_2 :MeOH 95:5): $R_f=0,32$.

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,79 (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 7,33 (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 4,09-4,07 (м, 2H), 3,74-3,56 (м, 22H), 2,97 (ш, 1H, OH), 2,44 (с, 3H).

^{13}C -ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ 145,0, 133,3, 130,0, 128,2, 72,7, 70,9-70,5, 69,5, 68,9, 61,9, 21,8.

МС: m/z 437 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Потім суміш тозильного похідного (20,4 г, 56 ммоль) і NaN_3 (3,7 г, 57 ммоль) у ДМФ (150 мл) перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. ДМФ випарюють у вакуумі, і залишок розчиняють в AcOEt і фільтрують над Celite®. AcOEt випарюють при зниженому тиску з одержанням чистої сполуки [21] (14,6 г, 48 ммоль, 85 %). ТШХ (CH_2Cl_2 :MeOH 94:6): $R_f=0,38$.

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 3,72-3,57 (м, 22H), 3,38-3,36 (м, 2H), 2,80 (шс, 1H).

^{13}C -ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ 72,8, 70,7-70,1, 61,8, 50,7.

17-Азидо-3,6,9,12,15-пентаоксагептадецил-(2-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)етил)карбамат [22]

До розчину сполуки [21] (500 мг, 1,63 ммоль) в CH_2Cl_2 (50 мл) і ДМАП (1 г, 9 ммоль) додають 4-нітрофенілхлорформіат (1,15 г, 5,7 ммоль) при 0 °С. Суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 2 год. Потім розчин розбавляють CH_2Cl_2 (50 мл), промивають 1N HCl (3×25 мл) і насиченим розчином солі (50 мл) і сушать над Na_2SO_4 сухим. Після фільтрації й випарювання розчинників у вакуумі залишок очищають хроматографією на колонці (CH_2Cl_2 :MeOH 95:5). Жовту тверду речовину відокремлюють (501 мг, 61 %): $R_f=0,75$.

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,23 (дд, $J=9,6$, 2,8 Гц, 2H), 7,35 (дд, $J=9,5$, 2,9 Гц, 2H), 4,43-4,35 (м, 2H), 3,81-3,74 (м, 2H), 3,74-3,52 (м, 24H), 3,34 (дд, $J=6,6$, 3,5 Гц, 2H). МС: m/z 471 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Паранітропохідне (501 мг, 1 ммоль) і ДБУ (1,5 мл, 10 ммоль) розчиняють в CH_2Cl_2 і додають трифторацетат N-(2-аміноетил)малеїміду (254 мг, 1 ммоль). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Розчин потім розбавляють CH_2Cl_2 (25 мл), промивають 1N HCl (3×10 мл) і насиченим розчином солі (20 мл) і сушать над сухим Na_2SO_4 . Після фільтрації й випарювання розчинників у вакуумі залишок очищають хроматографією на колонці (CH_2Cl_2 :MeOH 95:5) з одержанням білої твердої речовини (47 мг, 0,1 ммоль, 10 %).

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,80 (с, 1H), 3,92-3,50 (м, 24H), 3,38-3,36 (м, 4H).

^{13}C -ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ 171,2, 157,2, 135,6, 72,8, 70,7-70,1, 61,8, 50,7. МС: m/z 474 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

17-Аміно-3,6,9,12,15-пентаоксагептадецил-(2-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)етил)карбамат [23]

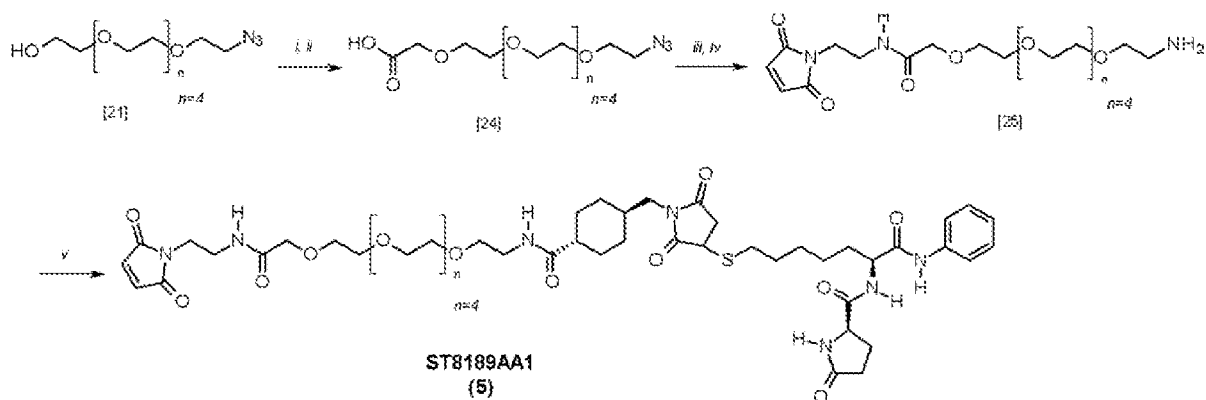
Розчин сполуки [22] (47 мг, 0,1 ммоль) у сухому ТГФ (10 мл) охолоджують до 0 °С. Додають трифенілфосфін (53 г, 0,2 ммоль), і суміш перемішують протягом 24 год. при кімнатній температурі. Потім додають H_2O (5 мл) для гідролізації проміжних фосфорних аддуктів, і розчин перемішують протягом ще 24 год. при кімнатній температурі. ТГФ випарюють, і твердий залишок суспендують у воді (10 мл). Нерозчинні солі фільтрують, і фільтрат промивають толуолом (5×5 мл) і випарюють з одержанням сполуки [23] (44 мг, 0,1 ммоль, 99 %) у вигляді блідо-жовтого масла, яке застосовують на наступній стадії без подальшого очищення.

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,80 (с, 1H), 3,92-3,50 (м, 22H), 3,38-3,36 (м, 4H) 3,01-3,11 (м, 2H), 1,81 (шс, 2H). МС: m/z 448 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1-(((1S,4R)-4-((2,5-діоксо-3-(((6S)-7-оксо-6-(5-оксопіролідін-2-карбоксамідо)-7-(феніламіно)гептил)тіо)-піролідін-1-іл)метил)циклогексил)-1-оксо-5,8,11,14,17-пентаокса-2-азанонадекан-19-іл-(2-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)етил)карбамат (4), ST8190AA1

4-((2,5-Діоксо-3-(((6S)-7-оксо-6-(5-оксопіролідін-2-карбоксамідо)-7-(феніламіно)гептил)тіо)піролідін-1-іл)метил)-циклогексан-1-карбонову кислоту (60 мг, 0,1 ммоль) розчиняють у сухому ТГФ (15 мл), і реакційну суміш охолоджують до 0 °С. Додають ГОБт (20 мг, 0,15 ммоль), ГБтУ (57 мг, 0,15 ммоль), сполуку [23] (44 мг, 0,1 ммоль) і ДІПЕА (48 мкл, 0,25 ммоль), і реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Розчин потім розбавляють AcOEt (15 мл) і екстрагують H_2O (3×10 мл). Органічні фази сушать над сухим Na_2SO_4 , і після фільтрації й випарювання розчинників у вакуумі залишок очищають хроматографією на колонці (CH_2Cl_2 :MeOH 98:2) з одержанням ST8190AA1 у вигляді безбарвного масла (31 мг, 0,03 ммоль, 10 %). МС: m/z 1031 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Приклад 5. Синтез і дослідження корисного навантаження (5), ST8189AA1



i) $\text{EtOCOCH}_2\text{Br}$, NaN , ТГФ; ii) LiOH , ТГФ, H_2O , EtOH ; iii) трифторацетат N-(2-аміноетил)maleїміду, ДБУ, ДХМ; iv) PPh_3 , ТГФ; v) 4-((2,5-діоксо-3-(((6S)-7-оксо-6-(5-оксопіролідін-2-карбоксамідо)-7-(феніламіно)гептил)тіо)-піролідін-1-іл)метил)-циклогексан-1-карбонова кислота, ГОБт, ГБтУ, ДІПЕА, ТГФ.

20-Азидо-3,6,9,12,15,18-гексаоксаейкозанова кислота [24]

NaN 60 % мас. у мінеральному маслі (29 мг, 0,39 ммоль) суспендують у сухому ТГФ (5 мл) і розчин сполуки [21] (100 мг, 0,32 ммоль) у сухому ТГФ (3 мл) повільно додають при 0 °С. Після перемішування протягом 20 хв. при 0 °С додають розчин етилбромацетату (53 мкл, 0,48 ммоль) у сухому ТГФ (3 мл), і суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Повільно додають H_2O (1 мл), і розчинник випарюють при зниженому тиску. Одержану тверду речовину очищують флеш-хроматографією ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 95:5) з одержанням біло-рожевого масла з кількісним виходом (51 мг, 0,13 ммоль).

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4,28 (с, 2H), 4,21 (кв, 2H), 3,92-3,50 (м, 22H), 3,38-3,36 (м, 4H), 2,05-1,98 (м, 2H), 1,23 (т, 3H). МС: m/z 394 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Етиловий ефір (51 мг, 0,13 ммоль) розчиняють в 1:1:1 суміші H_2O , ТГФ і EtOH (15 мл) і додають моногідрат LiOH (16 мг, 0,39 ммоль). Суміш перемішують при кипінні зі зворотним холодильником протягом 2 год., потім додають HCl до pH 7. Розчинники випарюють при зниженому тиску, і одержану тверду речовину промивають EtOH (2×10 мл). Розчин випарюють з одержанням безбарвного масла сполуки [24] (47 мг, 0,13 ммоль), відразу застосовують на наступній стадії. МС: m/z 364 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

20-Аміно-N-(2-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)етил)-3,6,9,12,15,18-гексаоксаейкозанамід [25]

Розчин сполуки [24] (47 мг, 0,13 ммоль) розчиняють у сухому ТГФ (15 мл) і реакційну суміш охолоджують до 0 °С. Додають ГОБт (26 мг, 0,2 ммоль), ГБтУ (76 мг, 0,2 ммоль), трифторацетат N-(2-аміноетил)maleїміду (33 мг, 0,13 ммоль) і ДІПЕА (63 мкл, 0,33 ммоль), і реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Потім розчин розбавляють AcOEt (15 мл) і екстрагують H_2O (3×10 мл). Органічні фази сушать над сухим Na_2SO_4 і, після фільтрації й випарювання розчинників у вакуумі, залишок очищують хроматографією на колонці ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 98:2) з одержанням безбарвного масла (49 мг, 0,10 ммоль). МС: m/z 488 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Одержане похідне азидо (49 мг, 0,10 ммоль) розчиняють у сухому ТГФ (10 мл) при 0 °С. Додають трифенілфосфін (53 г, 0,2 ммоль), і суміш перемішують протягом 24 год. при кімнатній температурі. Потім додають H_2O (5 мл) для гідролізу проміжних фосфорних аддуктів, і розчин перемішують протягом ще 24 год. при кімнатній температурі. ТГФ випарюють, і твердий залишок суспендують у воді (10 мл). Нерозчинні солі фільтрують, і фільтрат промивають толуолом (5×5 мл) і випарюють з одержанням сполуки [25] (46 мг, 0,1 ммоль, 99 %) у вигляді біло-жовтого масла, яке застосовують на наступній стадії без подальшого очищення.

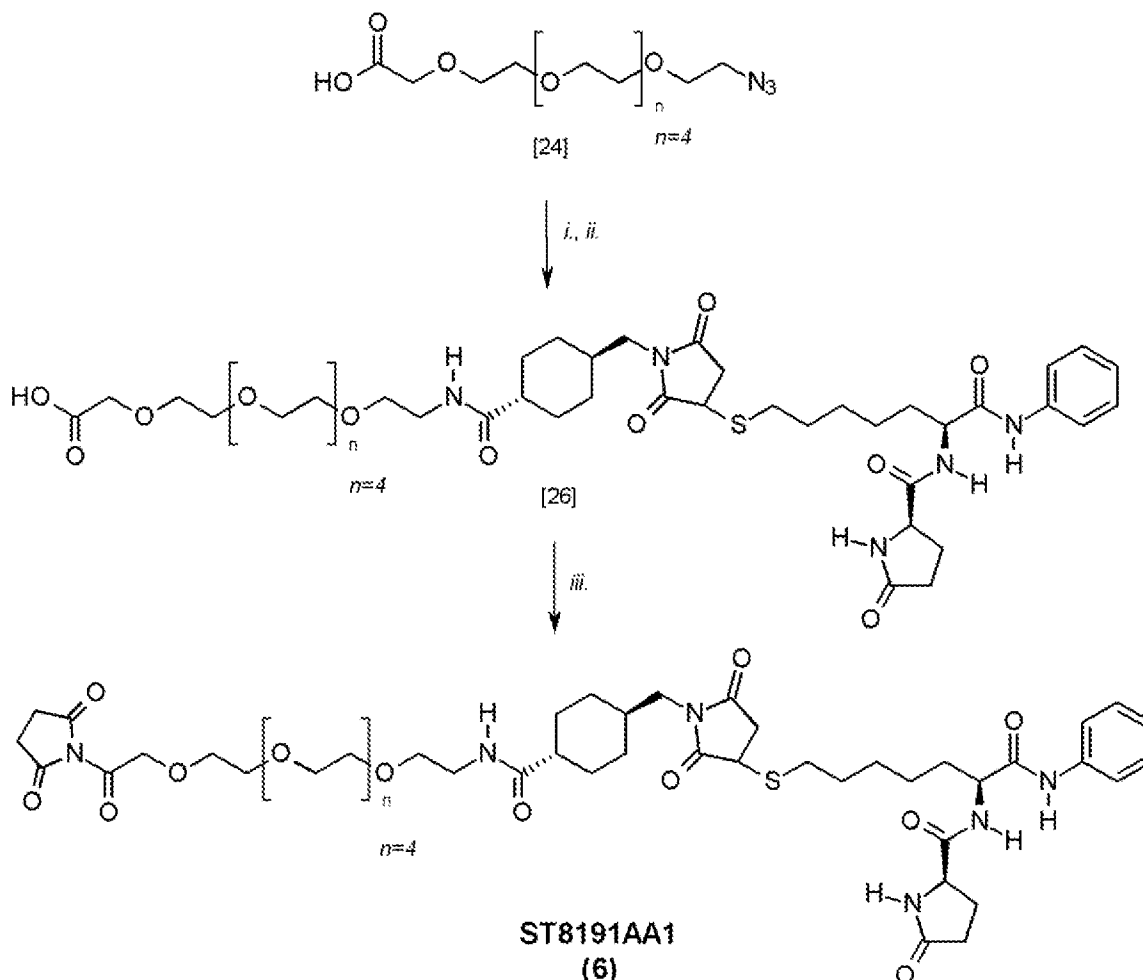
^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,03 (шс, 1H), 7,80 (с, 1H), 4,26 (с, 2H), 3,92-3,50 (м, 26H), 3,03-3,07 (м, 2H), 1,81 (шс, 2H). МС: m/z 462 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-((2S)-7-((1-((4-((1-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-4-оксо-6,9,12,15,18,21-гексаокса-3-азатрикозан-23-іл)карбамоїл)циклогексил)метил)-2,5-діоксопіролідін-3-іл)тіо)-1-оксо-1-(феніламіно)гептан-2-іл)-5-оксопіролідін-2-карбоксамід (5), ST8189AA1

4-((2,5-Діоксо-3-(((6S)-7-оксо-6-(5-оксопіролідін-2-карбоксамідо)-7-(феніламіно)гептил)тіо)піролідін-1-іл)метил)циклогексан-1-карбонову кислоту (60 мг, 0,1 ммоль) розчиняють у сухому ТГФ (15 мл), і реакційну суміш охолоджують до 0 °С. Додають ГОБт (20 мг, 0,15 ммоль), ГБтУ (57 мг, 0,15 ммоль), сполуку [25] (46 мг, 0,1 ммоль) і ДІПЕА (48 мкл, 0,25

ммоль), і реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом ночі. Розчин потім розбавляють AcOEt (15 мл) і екстрагують H₂O (3×10 мл). Органічні фази сушать над сухим Na₂SO₄ і, після фільтрації й випарювання розчинників у вакуумі, залишок очищують хроматографією на колонці (CH₂Cl₂:MeOH 98:2) з одержанням корисного навантаження ST8189AA1 у вигляді безбарвного масла (21 мг, 0,02 ммоль, 20 %). МС: m/z 1045 [M+H]⁺.

Приклад 6. Синтез і дослідження корисного навантаження (6), ST8191AA1



10

i) PPh₃, ТГФ; ii) 4-((2,5-діоксо-3-(((6S)-7-оксо-6-(5-оксопіролідін-2-карбоксамідо)-7-(феніламіно)гептил)тіо)-піролідін-1-іл)метил)циклогексан-1-карбонова кислота, ДЦК, NHS, ДХМ; iii) ДЦК, NHS, ДХМ.

15

1-(4-((2,5-Діоксо-3-(((6S)-7-оксо-6-(5-оксопіролідін-2-карбоксамідо)-7-(феніламіно)гептил)тіо)-піролідін-1-іл)метил)-циклогексил)-1-оксо-5,8,11,14,17,20-гексаокса-2-азадокозан-22-ова кислота [26]

20

Азид [24] (49 мг, 0,10 ммоль) розчиняють у сухому ТГФ (10 мл) при 0 °С. Додають трифенілфосфін (53 мг, 0,2 ммоль), і суміш перемішують протягом 24 год. при кімнатній температурі. Потім додають H₂O (5 мл) для гідролізу проміжних фосфорних аддуктів, і розчин перемішують протягом ще 24 год. при кімнатній температурі. ТГФ випарюють, і твердий залишок суспендують у воді (10 мл). Нерозчинні солі фільтрують, і фільтрат промивають толуолом (5×5 мл) і випарюють з одержанням 20-аміно-3,6,9,12,15,18-гексаоксаейкозанової кислоти (46 мг, 0,1 ммоль, 99 %) у вигляді блідо-жовтого масла, яке застосовують на наступній стадії без подальшого очищення.

25

¹H-ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ 12,0 (шс, 1H), 4,26 (с, 2H), 3,92-3,50 (м, 22H), 3,03-3,07 (м, 2H), 1,81 (шс, 2H). МС: m/z 340 [M+H]⁺.

30

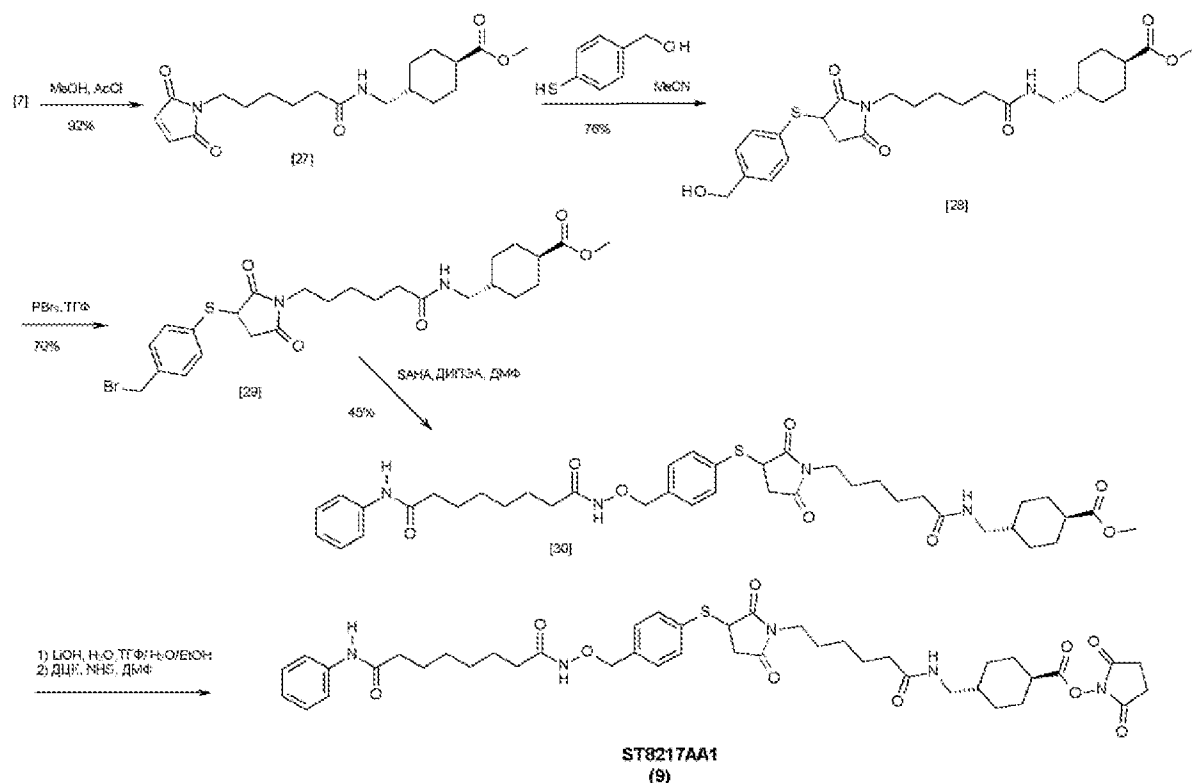
4-((2,5-Діоксо-3-(((6S)-7-оксо-6-(5-оксопіролідін-2-карбоксамідо)-7-(феніламіно)гептил)тіо)-піролідін-1-іл)метил)циклогексан-1-карбонову кислоту (80 мг, 0,11 ммоль) у сухому CH₂Cl₂ (5 мл) додають при кімнатній температурі до розчину, що містить дициклогексилкарбодіімід (0,11 ммоль) і N-гідроксисукцинімід (0,1 ммоль) у сухому CH₂Cl₂, і суміш перемішують при кімнатній

температурі протягом 3 годин. Білу тверду речовину фільтрують з дихлорметаном для видалення дициклогексилсечовини, органічну фазу промивають HCl 0,1N і H₂O, потім сушать над сухим сульфатом натрію й розчинник видаляють при зниженому тиску. Одержаний залишок очищають флеш-хроматографією на колонці з одержанням активованої кислоти у вигляді білого воскоподібного продукту (вихід 90 %), який розчиняють у диметоксіетані (5 мл) і обробляють 20-аміно-3,6,9,12,15,18-гексаоксаейкозановою кислотою (46 мг, 0,1 ммоль), розчиненою в суміші тетрагідрофурану й водного бікарбонату натрію (15 мг, 0,15 ммоль в 2 мл води). Реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 16 годин. Додають розчин лимонної кислоти 15 % у воді (2,5 мл), і суміш екстрагують 10 % ізопропіловим спиртом в етилацетаті (2×5 мл). Розчинник видаляють роторним випарюванням. Після додавання діетилового ефіру й опромінення ультразвуком утворюється тверда речовина. Фільтрація з наступним промиванням діетиловим ефіром дає сполуку [26] у вигляді білої твердої речовини, 65 мг (70 %). МС: m/z 918 [M-H].

2,5-Діокспіролідін-1-іл-1-(4-((2,5-діоксо-3-(((6S)-7-оксо-6-(5-окспіролідін-2-карбоксамідо)-7-(феніламіно)гептил)тіо)-піролідін-1-іл)метил)циклогексил)-1-оксо-5,8,11,14,17,20-гексаокса-2-азадоксан-22-оат (6), ST8191AA1

Сполуку [26] (65 мг, 0,07 ммоль) у сухому CH₂Cl₂ (5 мл) додають при кімнатній температурі до розчину дициклогексилкарбодііміду (0,1 ммоль) і N-гідроксисукциніміду (0,07 ммоль), і суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 3 годин. Білу тверду речовину фільтрують з дихлорметаном для видалення дициклогексилсечовини, органічну фазу промивають HCl 0,1N і H₂O, потім сушать над сухим сульфатом натрію й розчинник видаляють при зниженому тиску. Одержаний залишок очищають флеш-хроматографією на колонці з одержанням активованої кислоти у вигляді білої твердої речовини 61 мг (85 %). МС: m/z 1020 [M+H].

Приклад 7. Синтез і дослідження корисного навантаження (9), ST8217AA1



Метил-(1R,4R)-4-((6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)метил)циклогексан-1-карбоксилат [27]

Ацетилхлорид (1,01 мл, 14,26 ммоль) додають до розчину кислоти [7] (1,00 г, 2,85 ммоль) в MeOH (50 мл) у круглодонній колбі під N₂. Одержаний розчин перемішують при кімнатній температурі протягом 3 год., і потім розчин концентрують у вакуумі. Залишок розчиняють в CH₂Cl₂ (30 мл) і промивають насиченим розчином водного бікарбонату натрію (3×15 мл) і насиченим розчином солі (2×15 мл). Органічну фазу сушать над сульфатом натрію, фільтрують і концентрують у вакуумі з одержанням 950 мг (2,61 ммоль) сполуки [27] у вигляді білої твердої речовини (вихід 92 %).

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ ч/млн, J Гц) δ 6,65 (с, 2H), 3,62 (с, 3H), 3,50-3,46 (м, 2H), 3,07 (т, J=6,4, 2H), 2,23-2,11 (м, 3H), 1,97 (дд, J=13,6, 2,8, 2H), 1,78 (дд, J=12,8, 2,0, 2H), 1,66-1,55 (м, 4H), 1,44-1,26 (м, 5H), 0,99-0,92 (м, 2H). МС: m/z 365 [M+1]⁺; 387 [M+23]⁺. ТШХ R_f=0,75 (CH₂Cl₂:MeOH 9:1).

Метил-(1R,4R)-4-((6-(3-((4-(гідроксиметил)феніл)тіо)-2,5-діоксопіролідін-1-іл)гексанамідо)метил)циклогексан-1-карбоксилат [28]

(4-Меркаптофеніл)метанол [36] (548 мг, 3,91 ммоль) додають до розчину сполуки [27] (950 мг, 2,61 ммоль) в CH₃CN (20 мл) у круглодонній колбі в атмосфері N₂. Одержаний розчин перемішують при кімнатній температурі протягом 3 год., і потім розчин концентрують у вакуумі. Неочищену реакційну суміш очищають флеш-хроматографією на силікагелі (петролейний ефір:EtOAc 1:4) з одержанням 1024 мг (2,03 ммоль) сполуки [28] у вигляді біло-жовтого в'язкого масла (вихід 78 %).

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ ч/млн, J Гц) δ 7,46 (д, J=7,6, 2H), 7,31 (д, J=8,0, 2H), 5,81 (шс, 1H), 4,67 (с, 2H), 3,91-3,89 (м, 1H), 3,63 (с, 3H), 3,38-3,32 (м, 2H), 3,16-3,03 (м, 4H), 2,82 (шс, 1H), 2,21-1,96 (м, 5H), 1,77 (д, J=12,8, 2H), 1,50-1,23 (м, 9H), 1,02-0,92 (м, 2H). МС: m/z 527 [M+23]⁺; 543 [M+39]⁺. ТШХ R_f=0,3 (EtOAc).

Метил-(1R,4R)-4-((6-(3-((4-(бромметил)феніл)тіо)-2,5-діоксопіролідін-1-іл)гексанамідо)метил)циклогексан-1-карбоксилат [29]

PBr₃ (28 мкл, 0,30 ммоль) додають при 0 °С до розчину спирту [28] (100 мг, 0,20 ммоль) у сухому ТГФ (5 мл) у круглодонній колбі в атмосфері N₂. Одержаний розчин перемішують при 0 °С протягом 2 год., і потім нагрівають до кімнатної температури; після додавання CH₂Cl₂ (1 мл) розчин стає оранжевим, і його концентрують у вакуумі. Неочищену реакційну суміш очищають флеш-хроматографією на силікагелі (EtOAc 100 %) з одержанням 78 мг (0,14 ммоль) сполуки [29] у вигляді яскраво-оранжевого масла (вихід 70 %).

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ ч/млн, J Гц) δ 7,56 (д, J=8, 2H), 7,31 (д, J=8,0, 2H), 4,66 (с, 2H), 3,92-3,89 (м, 1H), 3,60 (с, 3H), 3,37-3,32 (м, 2H), 3,16-3,05 (м, 4H), 2,21-1,99 (м, 5H), 1,77 (д, J=12,4, 2H), 1,50-1,28 (м, 9H), 1,01-0,92 (м, 2H). МС: m/z 589,591 [M+23]⁺. ТШХ R_f=0,6 (EtOAc).

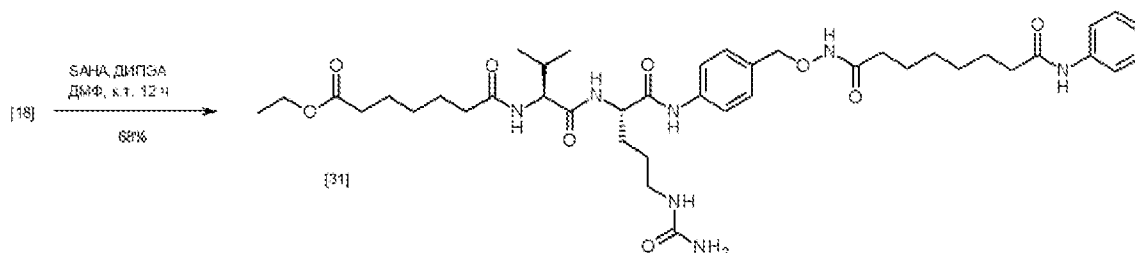
p-[[N-8-аніліно-8-оксооктаноїл(аміноокси)]метил}фенілтіо)-2,5-діоксо-1-піролідиніл]гексаноїламіно}метил)-циклогексанкарбоксилат [30]

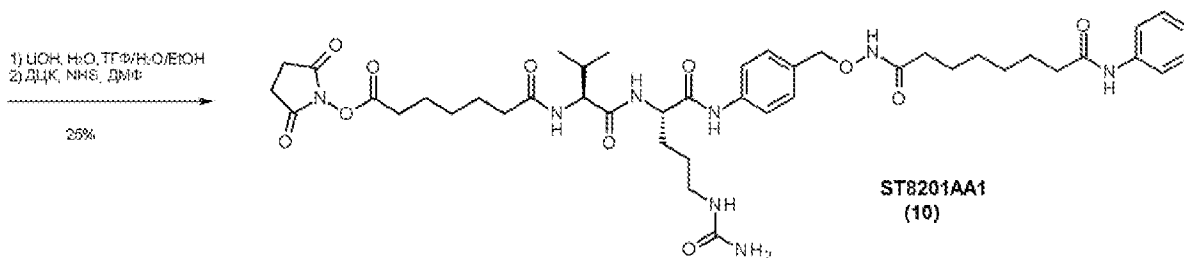
У пробірці в атмосфері N₂ бромід [29] (78 мг, 0,14 ммоль), SAHA (50 мг, 0,18 ммоль) і 1 мл сухого ДМФ змішують при кімнатній температурі. Свіжодистильований ДІПЕА (45 мг, 0,36 ммоль) додають по краплях, і розчин перемішують при кімнатній температурі протягом 12 год. Розчинник потім видаляють роторним випарюванням і високим вакуумом. Залишок очищають флеш-хроматографією на колонці з градієнтом 0-20 % метанол у дихлорметані з одержанням продукту [30] у вигляді білої твердої речовини, 48 мг, 45 % вихід. МС: m/z 751,4 [M+H]⁺.

2,5-Діоксо-1-піролідиніл-4-({6-[3-(p-[[N-8-аніліно-8-оксооктаноїл(аміноокси)]метил}фенілтіо)-2,5-діоксо-1-піролідиніл]гексаноїламіно}метил)циклогексанкарбоксилат (9), ST8217AA1

Моногідрат гідроксиду літію (8 мг, 0,18 ммоль) додають до розчину [30] (48 мг, 0,063 ммоль) у суміші тетрагідрофуран/вода/етанол 1:1:1 (6 мл). Реакційну суміш витримують при кімнатній температурі протягом 2 годин, потім її розбавляють етилацетатом і промивають HCl 1N. Неочищений продукт (25 мг) відразу застосовують на наступній стадії без подальшого очищення. Дициклокарбодіімід (11 мг, 0,05 ммоль) і N-гідроксисукцинімід (6 мг, 0,045 ммоль) додають при кімнатній температурі до перемішаного розчину одержаного раніше неочищеного продукту (25 мг, 0,034 ммоль) у сухому ДМФ (0,80 мл). Суміш витримують при кімнатній температурі протягом 16 годин. Білу тверду речовину, одержану в цій реакції, фільтрують з дихлорметаном для видалення дициклогексилсечовини, органічну фазу промивають HCl 0,1N і водою, потім сушать над безводним сульфатом натрію, і розчинник видаляють роторним випарюванням. Одержаний залишок піддають флеш-хроматографії на колонці з градієнтом 0-2 % метанол у дихлорметані з одержанням активованої кислоти ST8217AA1 у вигляді білої в'язкої твердої речовини. МС: m/z 856,4 [M+Na]⁺.

Приклад 8. Синтез і дослідження корисного навантаження (10), ST8201AA1





Етил-7-(((S)-3-метил-1-оксо-1-(((S)-1-оксо-1-((4-(((8-оксо-8-
(феніламіно)октанамідо)окси)метил)феніл)аміно)-5-уреїдопентан-2-іл)аміно)бутан-2-іл)аміно)-7-
5 оксогептаноат [31]

У пробірці в атмосфері N₂ бромід [18] (60 мг, 0,09 ммоль), SAHA (28 мг, 0,10 ммоль) і 1 мл
сухого ДМФ змішують при кімнатній температурі. Свіжодистильований ДІПЕА (25 мг, 0,20
ммоль) додають по краплях, і розчин перемішують при кімнатній температурі протягом 12 год.
10 Розчинник потім видаляють роторним випарюванням і у високому вакуумі. Залишок очищають
флеш-хроматографією на колонці з градієнтом 0-20 % метанол у дихлорметані з одержанням
продукту [31] у вигляді білої твердої речовини 48 мг, 68 % вихід. МС: m/z 795,9 [M+H]⁺, 818,0
[M+Na]⁺.

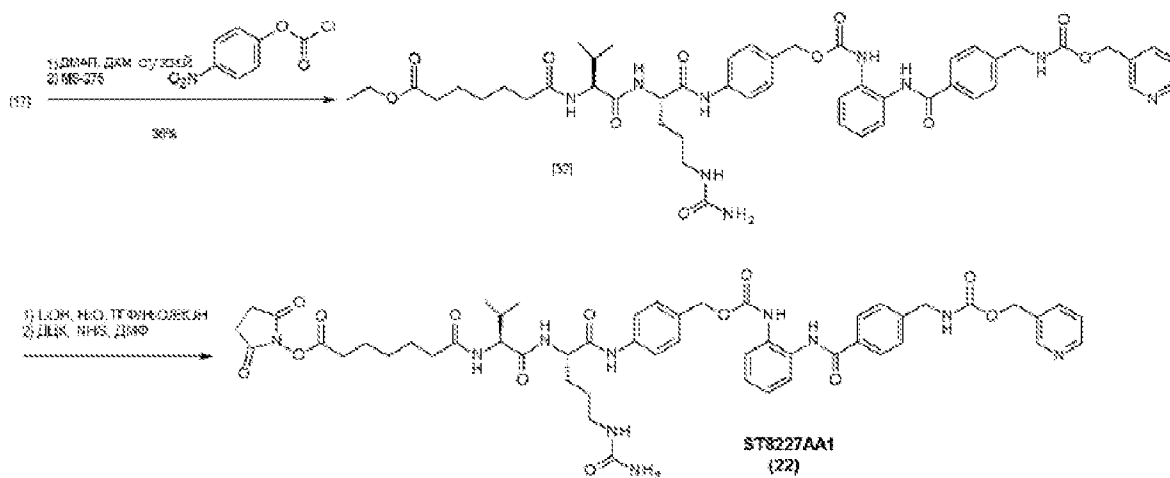
¹H-ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 7,63-7,598 (м, 2H), 7,57 (д, J=8 Гц, 2H), 7,39 (д, J=8,4 Гц, 2H),
7,313 (т, J=8 Гц, 2H), 7,09 (т, J=8, 1H), 4,89 (с, 2H), 4,58 (с, 2H), 4,20 (д, J=7,2, 1H), 4,14 (т, J=7,2
15 Гц, 2H), 4,10 (т, J=7,4 Гц, 1H), 3,56-3,45 (м, 1H), 3,34 (д, J=7,8 Гц, 2H), 2,41-2,37 (м, 1H), 2,34-2,30
(м, 2H), 2,13-2,06 (м, 2H), 1,79-1,60 (м, 4H), 1,42-1,36 (м, 4H), 1,28-1,24 (м, 3H), 1,01-0,97 (м, 6H).

2,5-Діокспіролідін-1-іл-7-(((S)-3-метил-1-оксо-1-(((S)-1-оксо-1-((4-(((S)-7-оксо-6-((R)-5-
окспіролідін-2-карбоксамідо)-7-(феніламіно)гептил)тіо)метил)феніл)аміно)-5-уреїдопентан-2-
іл)аміно)бутан-2-іл)аміно)-7-оксогептаноат (10), ST8201AA1

Моногідрат гідроксиду літію (8 мг, 0,18 ммоль) додають до розчину сполуки [40] (48 мг, 0,06
ммоль) у суміші тетрагідрофурану/води/етанолу 1:1:1 (6 мл). Реакційну суміш витримують при
кімнатній температурі протягом 6 годин, потім розбавляють етилацетатом і промивають HCl 1N.
Неочищений продукт (25 мг) застосовують на наступній стадії без очищення. МС: m/z 765,7 [M-
H]⁻.

Дициклокарбодіімід (11 мг, 0,05 ммоль) і N-гідроксисукцинімід (6 мг, 0,045 ммоль) додають
при кімнатній температурі до перемішаного розчину одержаного раніше неочищеного
продукту (25 мг, 0,03 ммоль) у сухому ДМФ (0,80 мл). Суміш витримують при кімнатній
температурі протягом 16 годин. Білу тверду речовину, одержану в цій реакції, фільтрують з
дихлорметаном для видалення дициклогексилсечовини, органічну фазу промивають HCl 0,1N і
30 водою, потім сушать над безводним сульфатом натрію й розчинник видаляють роторним
випарюванням. Одержаний залишок піддають флеш-хроматографії на колонці з градієнтом 0-2
% метанол у дихлорметані з одержанням активованої кислоти ST8201AA1 у вигляді білої в'язкої
твердої речовини. МС: m/z 887,2 [M+Na]⁺.

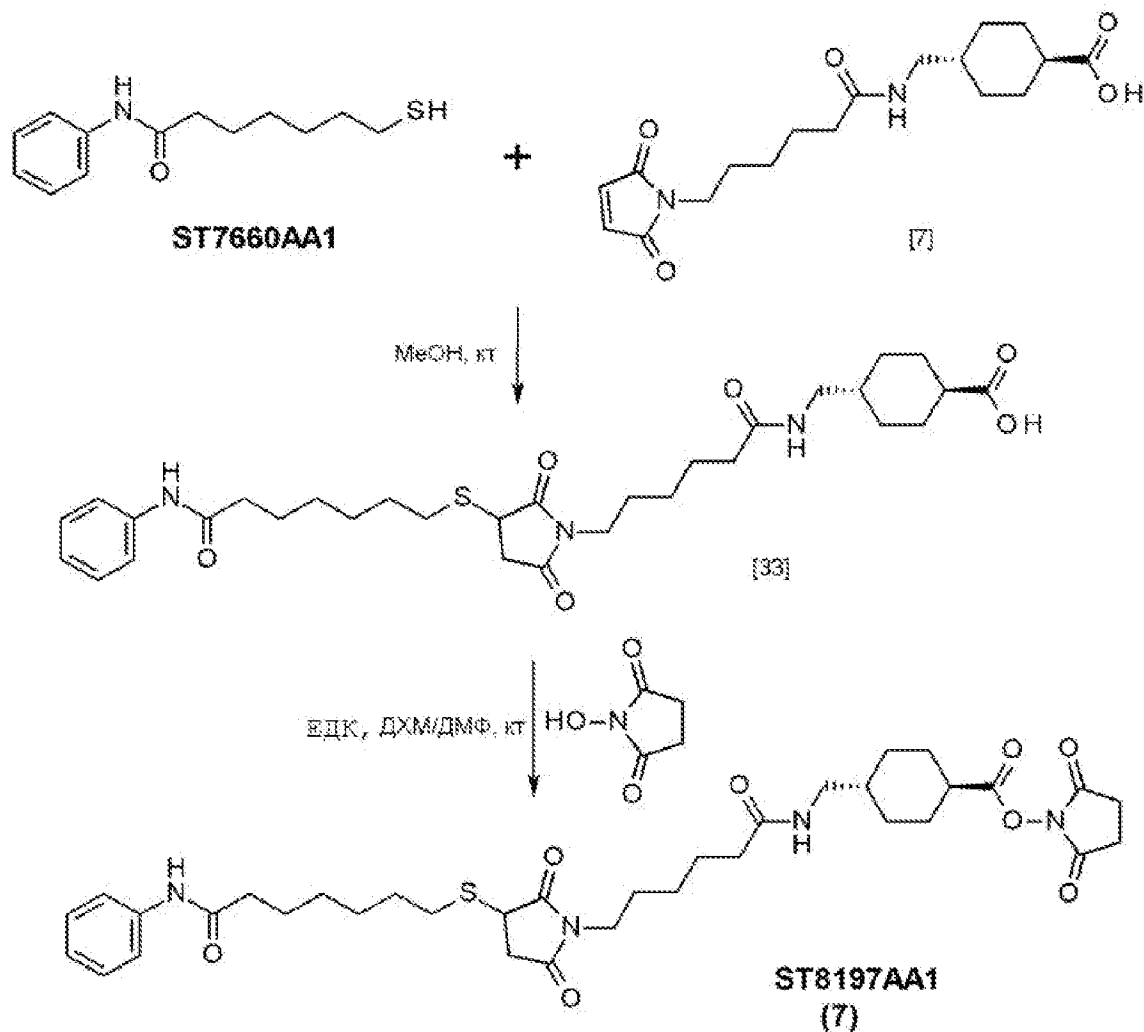
Приклад 9. Синтез і дослідження корисного навантаження (22), ST8227AA1



Синтез і дослідження корисного навантаження (22), ST8227AA1

У пробірці, охолодженій до 0 °С, в атмосфері N₂ сполуку [17] (50 мг, 0,09 ммоль) і 4-нітрофенілхлорформіат (62 мг, 0,3 ммоль), 3 мл сухого ДХМ (з 1 краплею сухого ДМФ) і 4-диметиламінопіридин (60 мг, 0,49 ммоль) змішують. Потім суміш перемішують при кімнатній температурі й відслідковують ТШХ. Коли перетворення сполуки [17] завершується, додають MC275 (40 мг, 0,10 ммоль) і реакційну суміш перемішують протягом ще 12 год. при кімнатній температурі. Потім суміш розбавляють дихлорметаном і промивають HCl 1N, сушать над безводним сульфатом натрію й розчинник видаляють роторним випарюванням. Неочищений складний ефір розчиняють в 1:1:1 суміші H₂O, ТГФ і EtOH (5 мл) і додають моногідрат LiOH (8,2 мг, 0,2 ммоль). Суміш перемішують при кипінні зі зворотним холодильником протягом 2 год., потім додають HCl до pH 7. Розчинники випарюють при зниженому тиску, і одержану тверду речовину промивають EtOH (2×10 мл). Розчин випарюють з одержанням безбарвного масла. Неочищений складний ефір розчиняють в 1:1:1 суміші H₂O, ТГФ і EtOH (5 мл) і додають моногідрат LiOH (8,2 мг, 0,2 ммоль). Суміш перемішують при кипінні зі зворотним холодильником протягом 2 год., потім додають HCl до pH 7. Розчинники випарюють при зниженому тиску, і одержану тверду речовину промивають EtOH (2×2 мл). Залишок очищають флеш-хроматографією на колонці з градієнтом 0-20 % метанол у дихлорметані з одержанням продукту ST8227AA1 у вигляді твердої речовини (12 мг, 13 % вихід). МС: m/z 1044,3 [M+Na]⁺.

Приклад 10. Синтез і дослідження корисного навантаження (7), ST8197AA1



N-феніл-7-сульфанілгептанамід (ST7660AA1) (60 мг, 0,25 ммоль) суспендують у дегазованому метанолі (1 мл); сполуку [7] (84 мг, 0,24 ммоль) додають при кімнатній температурі до перемішуваної суміші, і через декілька хвилин одержують прозорий розчин. Розчин перемішують при кімнатній температурі протягом 20 годин доти, поки відстеження ТШХ

не покаже повне перетворення сполуки [7]. Розчинник потім видаляють роторним випарюванням, і неочищений продукт очищають хроматографією на колонці з градієнтом 2-10 % метанол у дихлорметані. Сполуку [33] одержують у вигляді білої твердої речовини, 115 мг (81 % вихід). МС: m/z 610 $[M+Na]^+$.

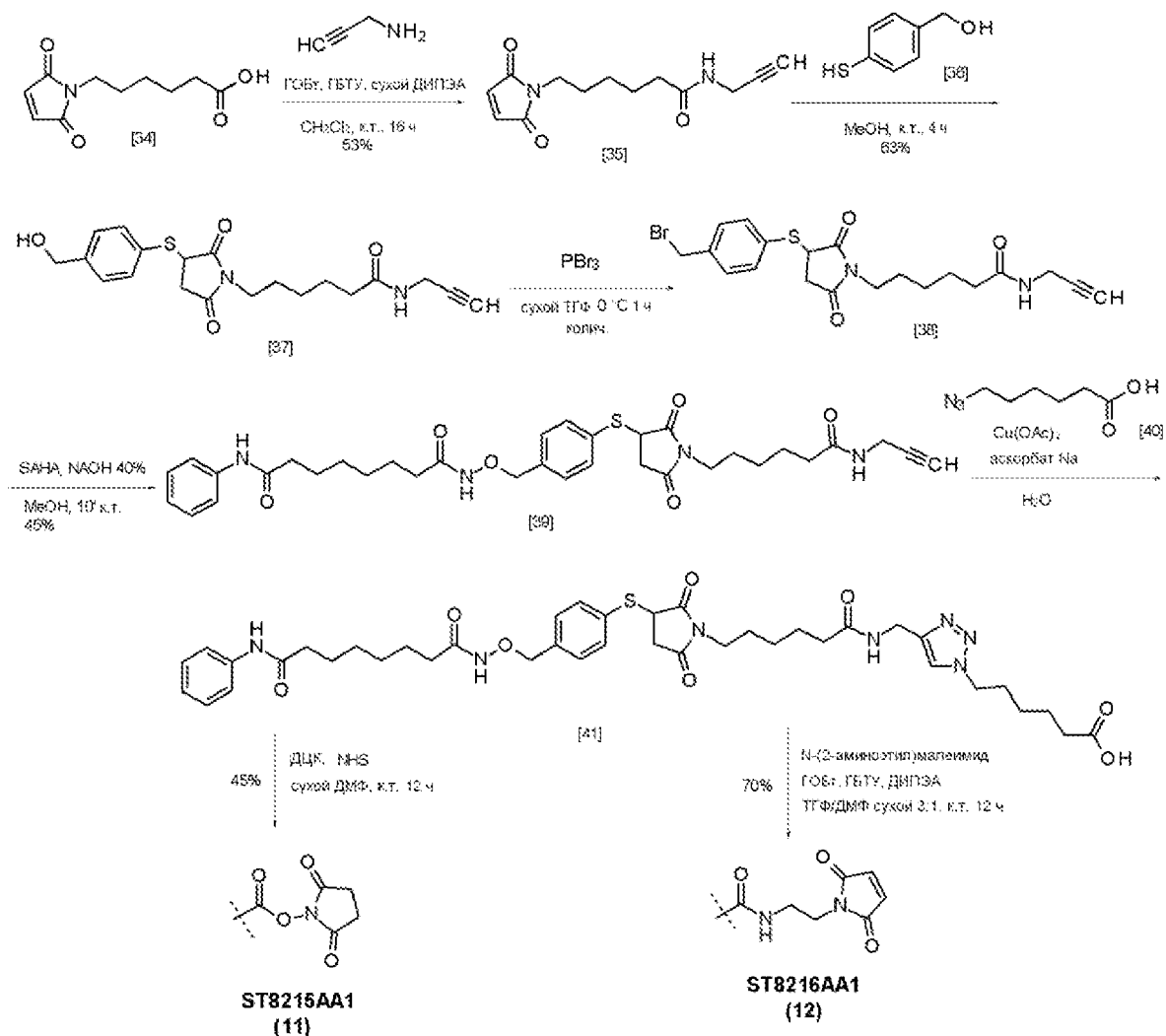
5 1H -ЯМР (500 МГц, $DMCO-d_6$) δ 11,97 (шс, 1H), 9,85 (с, 1H), 7,72 (т, $J=5,6$ Гц, 1H), 7,59 (д, $J=7,8$ Гц, 2H), 7,28 (т, $J=7,8$ Гц, 2H), 7,02 (т, $J=7,3$ Гц, 1H), 3,93 (дд, $J=9,0$, 3,7 Гц, 1H), 3,35 (т, $J=6,8$ Гц, 2H), 3,18 (дд, $J=18,3$, 9,0, 1H), 2,88 (т, $J=6,3$ Гц, 2H), 2,79-2,63 (м, 2H), 2,30 (т, $J=7,3$ Гц, 2H), 2,14-2,05 (м, 1H), 2,04 (т, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,92-1,84 (м, 2H), 1,74-1,67 (м, 2H), 1,63-1,15 (м, 18H), 0,94-0,83 (м, 2H).

10 Сполуку [33] (110 мг, 0,19 ммоль) суспендують у безводному дихлорметані (5,5 мл), що містить 0,12 мл сухого диметилформаміду. N-гідроксисукцинімід (33 мг, 0,28 ммоль) і гідрохлорид N-(3-диметиламінопропіл)-N'-етилкарбодііміду (61 мг, 0,32 ммоль) додають при кімнатній температурі, і реакційну суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 24 годин. Суміш розбавляють дихлорметаном (70 мл) і промивають водою (40 мл) і насиченим розчином солі (30 мл). Органічну фазу сушать над Na_2SO_4 , фільтрують і концентрують роторним випарюванням. Неочищений продукт очищають флеш-хроматографією в 2-6 % метанолі в дихлорметані. Продукт ST8197AA1 одержують у вигляді білої твердої речовини, 97 мг (76 % вихід). МС: m/z 707 $[M+Na]^+$.

20 1H -ЯМР (500 МГц, $DMCO-d_6$) δ 9,83 (с, 1H), 7,73 (т, $J=5,4$ Гц, 1H), 7,59 (д, $J=7,8$ Гц, 2H), 7,28 (т, $J=7,3$ Гц, 2H), 7,02 (т, $J=7,3$ Гц, 1H), 3,94 (дд, $J=8,8$, 3,4 Гц, 1H), 3,36 (т, $J=6,8$ Гц, 2H), 3,18 (дд, $J=18,3$, 8,8, 1H), 2,91 (т, $J=6,0$ Гц, 2H), 2,81 (с, 4H), 2,80-2,62 (м, 3H), 2,30 (т, $J=7,3$ Гц, 2H), 2,18-1,97 (м, 4H), 1,80-1,72 (м, 2H), 1,64-1,27 (м, 16H), 1,27-1,15 (м, 2H), 1,06-0,94 (м, 2H).

25 ^{13}C -ЯМР (500 МГц, $DMCO-d_6$) δ 177,2, 175,6, 172,3, 171,6, 171,4, 170,7, 139,8, 129,1, 123,4, 119,5, 44,8, 39,6, 38,5, 37,1, 36,8, 36,3, 35,6, 30,8, 29,3 (4C), 29,0, 28,7, 28,6, 28,4, 27,3, 26,3, 25,9, 25,4, 25,3.

Приклад 11. Синтез і дослідження корисних навантажень (11) і (12), ST8215AA1 і ST8216AA1, відповідно



6-(2,5-Діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-N-(проп-2-ін-1-іл)гексанамід [35]

У колбу, що містить розчин сполуки [34] (500 мг, 2,37 ммоль) у сухому CH_2Cl_2 (25 мл), в атмосфері N_2 , додають пропаргіламін (162 мкл, 2,37 ммоль), ГОБТ H_2O (435 мг, 2,84 ммоль), ГБУ (1077 мг, 2,84 ммоль) і ДІПЕА (1,24 мл, 7,10 ммоль) при 0 °C, і суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 16 год. Після завершення реакції суміш розбавляють дихлорметаном і промивають водою, HCl 1N і насиченим розчином солі. Органічний шар збирають, сушать над безводним сульфатом натрію, і розчинник видаляють роторним випарюванням. Одержаний залишок очищують флеш-хроматографією на колонці в системі середнього тиску Sepacore® Buchi (сілікагель; градієнт петролейний ефір/етилацетат В % 0-65 за 4 хвилини, 65-65 за 7 хвилин, 65-100 за 2 хвилини) з одержанням сполуки [35] (312 мг, вихід 53 %) у вигляді білої твердої речовини. МС: m/z 270,8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 6,64 (с, 2H), 5,95 (с, 1H), 3,98 (дд, $J=4$, 4 Гц, 2H), 3,45 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 2,16 (дт, $J=15,0$, 4,9 Гц, 2H), 1,68-1,47 (м, 4H), 1,31-1,19 (м, 2H).

(4-Меркаптофеніл)метанол [36]

До перемішаного розчину 4-меркаптобензойної кислоти (2,0 г, 13 ммоль) у сухому ТГФ (25 мл) у тригорлій колбі в атмосфері N_2 додають LiAlH_4 1M у ТГФ (39 мл, 39 ммоль) при 0 °C протягом 30 хвилин. Суміш перемішують при к.т. протягом 12 годин. Потім реакційну суміш охолоджують при 0 °C, гасять 3 мл води й підкисляють до pH 2 додаванням HCl 1M. Додають етилацетат, і органічний шар промивають H_2O і насиченим розчином солі, сушать над безводним сульфатом натрію, фільтрують, і розчинник видаляють роторним випарюванням. Одержаний залишок очищують флеш-хроматографією на колонці в системі середнього тиску Sepacore® Buchi (сілікагель; градієнт петролейний ефір/етилацетат В % 0-25 за 3 хвилини, 25-25 за 6 хвилин, 25-100 за 3 хвилини) з одержанням спирту [36] (1,2 мг, вихід 66 %) у вигляді жовтої твердої речовини. МС: m/z 141,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,25-7,06 (м, 4H), 4,43 (с, 2H), 3,72 (с, 1H), 3,48 (с, 1H).

6-(3-((4-(Гідроксиметил)феніл)тіо)-2,5-діоксопіролідин-1-іл)-N-(проп-2-ін-1-іл)гексанамід [37]

До перемішаного розчину малеїміду [35] (200 мг, 0,8 ммоль) у сухому MeCN (8 мл) додають тіол [36] (135 мг, 0,96 ммоль), і реакційну суміш перемішують під N₂ при кімнатній температурі протягом 4 годин. Після завершення реакції розчинник видаляють роторним випарюванням і залишок очищають флеш-хроматографією на колонці в системі середнього тиску Sepacore® Buchi (силікагель; градієнт петролейний ефір/етилацетат В % 0-80 за 5 хвилин, 80-90 за 8 хвилин, 90-100 за 1 хвилину) з одержанням сполуки [37] (134 мг, вихід 43 %) у вигляді жовтого масла. МС: m/z 410,8 [M+Na]⁺, 426,9[M+K]⁺.

¹H-ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,58 (дд, J=16,5, 8,1 Гц, 2H), 7,44 (дд, J=14,6, 8,1 Гц, 2H), 4,68 (с, 2H), 4,24 (дд, J=9,1, 3,7 Гц, 1H), 4,01 (д, J=4 Гц, 2H), 3,42 (дд, J=15,1, 7,9 Гц, 2H), 3,29 (дд, J=18,7, 9,1 Гц, 1H), 2,72 (дд, J=18,7, 3,7 Гц, 1H), 2,23 (т, J=7,5 Гц, 3H), 1,68-1,60 (м, 3H), 1,53-1,44 (м, 3H), 1,31-1,16 (м, 2H).

6-(3-((4-(Бромметил)феніл)тіо)-2,5-діоксопіролідин-1-іл)-N-(проп-2-ін-1-іл)гексанамід [38]

PBr₃ (76 мкл, 0,81 ммоль) додають при 0 °C до розчину сполуки [37] (210 мг, 0,54 ммоль) у сухому ТГФ (3 мл), і суміш витримують при 0 °C протягом 3 год. Після випарювання розчинника неочищений продукт очищають флеш-хроматографією з градієнтом 0-60 % етилацетат у петролейному ефірі з одержанням продукту [38] (245 мг, вихід >99 %) у вигляді оранжевої твердої речовини. МС: m/z 472,8 [M+Na]⁺; 488,9 [M+K]⁺.

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,49 (д, J=8,1 Гц, 2H), 7,36 (д, J=8,1 Гц, 2H), 4,46 (с, 2H), 4,04 (с, 2H), 3,58-3,34 (м, 4H), 3,16 (дд, J=18,7, 9,2 Гц, 1H), 2,69 (дд, J=18,8, 4,0 Гц, 1H), 2,30-2,12 (м, 3H), 1,74-1,58 (м, 3H), 1,56-1,43 (м, 3H), 1,27 (дд, J=16,0, 8 Гц, 2H).

N1-((4-((2,5-діоксо-1-(6-оксо-6-(проп-2-ін-1-іламіно)-гексил)піролідин-3-іл)тіо)бензил)окси)-N8-фенілоктандіамід [39]

SAHA (96 мг, 0,36 ммоль) розчиняють в 6 мл MeOH і додають NaOH 40 % розчин (76 мкл, 0,76 ммоль). Через 10 хв. розчин перемішують в атмосфері N₂ у колбі, що містить бромід [38] (245 мг, 0,54 ммоль). Відразу ж розчин стає пурпурним, і через 5-10 хвилин ТШХ показує утворення продукту [39]. Метанол швидко концентрують, і неочищену реакційну суміш розбавляють дихлорметаном і промивають HCl 1N для нейтралізації основи. Органічний шар сушать над безводним сульфатом натрію, фільтрують і розчинник видаляють роторним випарюванням. Залишок очищають флеш-хроматографією на колонці з градієнтом 0-80 % етилацетат у петролейному ефірі з одержанням продукту [39] (90 мг, вихід 40 %) у вигляді білої твердої речовини. МС: m/z 656,8 [M+Na]⁺.

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,16 (с, 2H), 7,50 (д, J=4 Гц, 2H), 7,41 (д, J=4 Гц, 2H), 7,33-7,23 (м, 3H), 7,03 (д, J=4 Гц, 2H), 4,84 (с, 2H), 3,95 (с, 2H), 3,40-3,31 (м, 2H), 3,10 (дд, J=20, 8 Гц, 1H), 2,64 (дд, J=18,8, 4,0 Гц, 1H), 2,29 (с, 2H), 2,19 (с, 2H), 2,11 (с, 2H), 1,64-1,57 (м, 6H), 1,29-1,22 (м, 8H), 1,10 (с, 2H), 0,83 (д, J=8,4 Гц, 1H).

¹³C-ЯМР (100 МГц, CDCl₃) δ 175,02 (с), 174,58 (д, J=89,2 Гц), 172,58 (с), 171,55 (с), 137,86 (с), 137,84 (с), 134,37-127,29 (м), 127,98-127,29 (м), 123,66 (с), 119,52 (с), 79,30 (с), 71,03 (с), 43,28 (с), 36,62 (дд, J=207,0, 92,0 Гц), 35,71 (с), 35,59 (д, J=25,1 Гц), 35,46 (с), 29,24 (с), 28,20 (дд, J=148,7, 99,9 Гц), 26,74-26,34 (м), 26,34-24,48 (м), 24,49 (с), 24,49 (с).

6-Азидогексанова кислота [40]

6-Бромгексанову кислоту (200 мг, 1,02 ммоль) і азид натрію (333 мг, 5,12 ммоль) в 5 мл диметилформаміду нагрівають при 100 °C протягом 16 годин у герметично закритій пробірці. Після охолодження реакційну суміш розбавляють етилацетатом і промивають KHSO₄ 1M, H₂O і насиченим розчином солі. Органічний шар збирають і сушать над безводним сульфатом натрію, і розчинник видаляють роторним випарюванням. Продукт [40] (158 мг, 99 %) одержують чистим у вигляді коричневого масла. МС: m/z 155,8 [M-H]⁻.

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 10,49 (с, 1H), 3,21-3,18 (м, 2H), 2,28 (т, J=7,4 Гц, 2H), 1,84-1,45 (м, 4H), 1,38-1,31 (м, 2H).

6-(4-((6-(2,5-Діоксо-3-((4-(((8-оксо-8-(феніламіно)-октанамідо)окси)метил)феніл)тіо)піролідин-1-іл)гексанамідо)-метил)-1H-1,2,3-триазол-1-іл)гексанова кислота [41]

Перемішуваний розчин сполуки [40] (17 мг, 0,11 ммоль) і сполуки [39] (90 мг, 0,14 ммоль) у сухому ДМФ (11 мл) дегазують при кімнатній температурі аргоновими/вакуумними циклами (3×). До цього розчину додають свіжоприготовлену водну суміш (5,5 мл) Cu(OAc)₂ (7 мг, 0,03 ммоль) і аскорбату натрію (13 мг, 0,07 ммоль), раніше дегазовану аргоновими/вакуумними циклами. Реакційну суміш знову дегазують і залишають під аргоном при кімнатній температурі протягом 72 годин. Після завершення реакції, неочищений продукт концентрують, і розчинник видаляють роторним випарюванням. Одержаний залишок піддають флеш-хроматографії на колонці з градієнтом 0-16 % метанол у дихлорметані з одержанням триазолу [41] (55 мг, вихід 62 %) у вигляді оранжевої твердої речовини. МС: m/z 813,8 [M+Na]⁺.

¹H-ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,86 (с, 2H), 7,59-7,46 (м, 4H), 7,37 (д, J=7,2 Гц, 2H), 7,26 (д, J=7,2 Гц, 3H), 7,04 (д, J=7,1 Гц, 1H), 4,37 (с, 2H), 4,21 (с, 2H), 3,33 (дд, J=12,9, 4,9 Гц, 4H), 3,18 (дд, J=20, 8 Гц, 1H), 2,60 (дд, J=18,8, 4,0 Гц, 1H), 2,42-2,12 (м, 5H), 2,02 (с, 2H), 1,88 (с, 2H), 1,76-1,47 (м, 8H), 1,49-1,23 (м, 10H), 1,17 (с, 2H), 0,86 (с, 1H).

5 ¹³C-ЯМР (100 МГц, MeOD) δ 140,29-139,14 (м), 139,14-134,26 (м), 132,86 (с), 139,14-108,94 (м), 107,34 (с), 76,31 (с), 35,28 (с), 28,04 (с), 25,16 (д, J=61,4 Гц), 24,57 (с).

2,5-Діоксопіролідин-1-іл-6-(4-((6-(2,5-діоксо-3-((4-(((8-оксо-8-(феніламіно)октанаїдо)окси)метил)феніл)тіо)піролідин-1-іл)гексанаїдо)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-іл)гексаноат (11), ST8215AA1

10 Дициклогексилкарбодіїмід (21 мг, 0,10 ммоль) і N-гідроксисукцинімід (10 мг, 0,09 ммоль) додають при кімнатній температурі до перемішаного розчину сполуки [41] (55 мг, 0,06 ммоль) у безводному диметилформаміді (0,80 мл). Суміш витримують при кімнатній температурі протягом 16 годин. Білу тверду речовину, що утворилася в цій реакції, фільтрують з дихлорметаном, і органічну фазу промивають водою, потім сушать над безводним сульфатом натрію, фільтрують і розчинник видаляють роторним випарюванням. Одержаний залишок

15 піддають флеш-хроматографії на колонці з градієнтом 0-8 % метанол у дихлорметані з одержанням активованої кислоти ST8215AA1 у вигляді білої в'язкої твердої речовини (24 мг, 45 %). МС: m/z 910,8 [M+Na]⁺.

20 ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,07 (с, 2H), 7,52 (с, 2H), 7,44 (с, 2H), 7,32 (с, 2H), 7,23 (с, 3H), 7,04 (с, 1H), 4,87 (с, 2H), 4,45 (с, 2H), 4,31 (с, 2H), 3,32 (с, 2H), 3,13 (с, 1H), 2,79 (с, 4H), 2,65 (с, 2H), 2,55 (с, 2H), 2,29 (с, 2H), 2,12 (с, 2H), 1,89 (с, 2H), 1,78-1,48 (м, 8H), 1,47-1,12 (м, 10H), 1,07 (с, 2H), 0,83 (с, 1H).

25 ¹³C-ЯМР (100 МГц, CDCl₃) δ 134,50 (с), 129,24 (с), 128,49 (с), 124,47-123,71 (м), 121,49 (д, J=420,4 Гц), 49,89 (с), 43,30 (с), 38,48 (с), 36,87 (с), 35,65 (с), 34,39 (с), 32,54 (с), 30,25 (с), 29,25 (с), 28,04 (с), 26,23 (д, J=107,2 Гц), 24,84 (с), 25,38-23,33 (м), 24,55 (с), 24,96-23,33 (м), 23,47 (с).

N1-((4-(((1-(6-(((1-(6-((2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)етил)аміно)-6-оксогексил)-1H-1,2,3-триазол-4-іл)метил)-аміно)-6-оксогексил)-2,5-діоксопіролідин-3-іл)тіо)бензил)окси)-N8-фенілоктандіамід (12), ST8216AA1

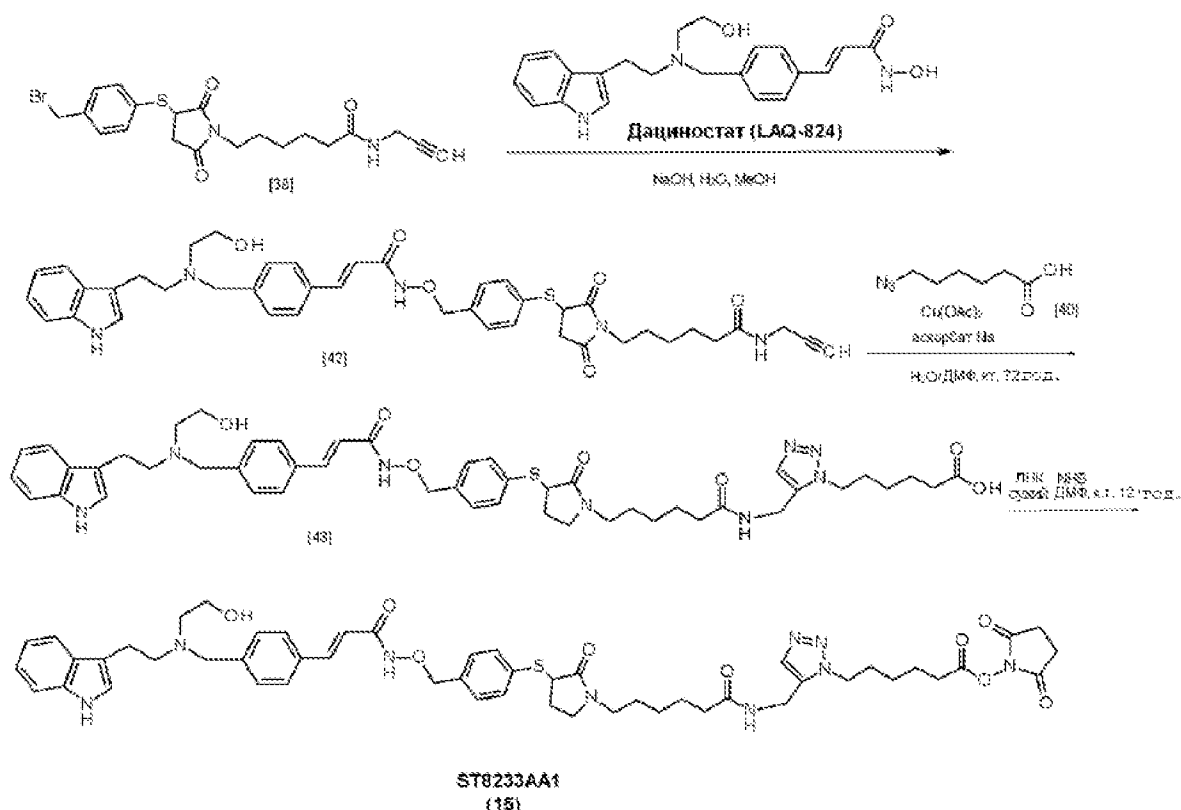
30 До перемішаного розчину сполуки [41] (15 мг, 0,02 ммоль) у суміші сухого ТГФ/ДМФ 3:1 (1,33 мл) в атмосфері N₂ додають N-(2-аміноетил)малеїмід (3,3 мг, 0,02 ммоль), ГОБт Н₂О (4 мг, 0,03 ммоль), ГБтУ (11 мг, 0,03 ммоль) і ДІПЕА (7 мкл, 0,05 ммоль) при 0 °С. Після додавання суміш витримують при кімнатній температурі протягом 12 годин, потім розбавляють дихлорметаном і промивають водою. Органічну фазу потім сушать над безводним сульфатом натрію, фільтрують і розчинник видаляють роторним випарюванням. Одержаний залишок

35 піддають флеш-хроматографії на колонці з градієнтом 0-8 % метанол у дихлорметані з одержанням продукту ST8216AA1 (13 мг, вихід 72 %) у вигляді білої в'язкої твердої речовини. МС: m/z 936,6 [M+Na]⁺.

40 ¹H-ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,86 (с, 3H), 7,60-7,42 (м, 5H), 7,38-7,35 (м, 2H), 7,25 (т, J=7,9 Гц, 2H), 7,03 (т, J=7,4 Гц, 1H), 6,77 (с, 2H), 4,86 (с, 2H), 4,35 (дд, J=15,7, 8,7 Гц, 4H), 3,69 (т, J=4 Гц, 2H), 3,56 (т, J=4 Гц, 2H), 3,43-3,28 (м, 5H), 3,24-3,13 (м, 2H), 2,32 (т, J=8 Гц, 2H), 2,15 (дд, J=14,9, 7,5 Гц, 2H), 2,04 (дд, J=13,3, 6,0 Гц, 2H), 1,92-1,77 (м, 2H), 1,77-1,50 (м, 8H), 1,50-1,12 (м, 10H), 0,86 (с, 1H).

Приклад 12. Загальна методика синтезу корисних навантажень на основі панобіностату й даціностату

45 Синтез і дослідження корисного навантаження на основі даціностату (15), ST8233AA1



3-(p-([N-(E)-3-[p-((2-гідроксіетил)[2-(1H-індол-3-
іл)етил]аміно}метил)феніл]акрилоїл(аміноокси)]метил}фенілтіо)-1-[6-оксо-6-(2-
пропініламіно)гексил]-2,5-піролідиндіон [42]

Дацинонат (100 мг, 0,29 ммоль) розчиняють в 6 мл MeOH, що містить NaOH (40 % у воді, 40
мкл, 0,4 ммоль). Після перемішування 15 хв. при к.т. розчин додають у пробірку, що містить
бромід [38] (181 мг, 0,40 ммоль). Через 5-10 хвилин перемішування при к.т. аналіз ТШХ показав
утворення продукту. Метанол швидко випарюють, і неочищену реакційну суміш розбавляють
дихлорметаном і промивають HCl 1N для нейтралізації основи, сушать над безводним
сульфатом натрію, фільтрують і розчинник видаляють роторним випарюванням. Залишок
очищають флеш-хроматографією на колонці з градієнтом 0-80 % етилацетат у петролейному
ефірі з одержанням продукту [42] (95 мг, вихід 44 %) у вигляді білої твердої речовини. МС: m/z
772,6 [M+Na]⁺.

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ, 7,83-7,72 (м, 2H), 7,65-7,30 (м, 10H), 7,25-7,07 (м, 2H), 7,13-7,05
(м, 1H), 6,81 (м, 1H), 6,64 (т-подібний, 1H), 4,80 (м, 1H), 4,69-4,54 (м, 2H), 4,34-4,18 (м, 2H), 4,05
(м, 1H), 3,91-3,45 (м, 7H), 3,32-2,77 (м, 8H), 2,66 (м, 1H), 2,36-2,12 (м, 4H), 1,76-1,26 (м, 8H).

6-[4-((6-[3-(p-([N-(E)-3-[p-((2-гідроксіетил)[2-(1H-індол-3-
іл)етил]аміно}метил)феніл]акрилоїл(аміноокси)]метил}фенілтіо)-2,5-діоксо-1-
піролідиніл]гексаноїламіно}метил)-1H-1,2,3-триазол-1-іл]гексанова кислота [43]

Перемішуваний розчин сполуки [42] (40 мг, 0,05 ммоль) і 6-азидогексанової кислоти (16 мг,
0,10 ммоль) у сухому ДМФ (10 мл) дегазують при кімнатній температурі аргоновими/вакуумними
циклами (3×). До цього розчину додають свіжоприготовлену водну суміш (5,5 мл) Cu(OAc)₂ (7 мг,
0,03 ммоль) і аскорбату натрію (13 мг, 0,07 ммоль), раніше дегазовану аргоновими/вакуумними
циклами (3×). Реакційну суміш знову дегазують і залишають під аргонем при кімнатній
температурі протягом 72 годин. Після завершення реакції, неочищений продукт концентрують, і
розчинник видаляють роторним випарюванням. Одержаний залишок піддають флеш-
хроматографії на колонці з градієнтом 0-16 % метанол у дихлорметані з одержанням триазолу
[43] (35 мг, вихід 77 %) у вигляді твердої речовини. МС: m/z 930,7 [M+Na]⁺.

Синтез корисного навантаження (15), ST8233AA1

Дидиклогексилкарбодіімід (16 мг, 0,08 ммоль) і N-гідроксисукцинімід (7,7 мг, 0,07 ммоль)
додають при кімнатній температурі до перемішуваного розчину сполуки [43] (35 мг, 0,04 ммоль)
у безводному ДМФ (0,80 мл). Суміш витримують при кімнатній температурі протягом 16 год.
Білу тверду речовину, утворену в цій реакції, фільтрують з дихлорметаном, і органічну фазу
промивають водою, потім сушать над безводним сульфатом натрію, фільтрують, і розчинник

видаляють роторним випарюванням. Одержаний залишок піддають флеш-хроматографії на колонці з градієнтом 0-8 % метанол у дихлорметані з одержанням активованої кислоти ST8233AA1 у вигляді білої в'язкої твердої речовини (14 мг, 35 %). МС: m/z 1026,4 $[M+Na]^+$.

1H -ЯМР (400 МГц, $DMCO-d_6$) δ 9,94 (шс, 1H), 8,92 (шс, 1H), 7,90 (шс, 1H), 7,61-7,47 (м, 1H), 7,50-7,37 (м, 1H), 7,33 (м, 2H), 7,20 (м, 1H), 7,15-6,86 (м, 1H), 6,69 (м, 1H), 4,80 (м, 1H), 4,69-4,54 (м, 1H), 4,49-4,12 (м, 2H), 3,84 (м, 1H), 3,69-3,52 (м, 1H), 3,43-2,87 (м, 3H), 2,88-2,35 (м, 3H), 2,35-2,08 (м, 1H), 2,02-1,23 (м, 5H).

Приклад 13. Синтез і дослідження КАЛС кон'югуванням з ϵ -аміногрупами лізинових залишків з N-гідроксисукцинімідом (NHS)

Як приклад, КАЛС, одержані з ГДАЦ, кон'югують з чотирма різними антитілами (Трастузумаб Herceptin® Roche; Цетуксимаб Erbitux® Merck; Бевацизумаб Avastin® Genentech/Roche; Панітумумаб Vectibix® Amgen) і двома мишачими анти-людськими CD4 антитілами, комерційно доступними, клон SK3 (також відомий як Leu3a) і клон RPA-T4. Більш конкретно, схваленими антитілами є Трастузумаб, що розпізнає ErbB2, Цетуксимаб і Панітумумаб, що розпізнають ErbB1, Бевацизумаб, що розпізнає VEGFR.

Антитіла піддають буферному обміну із застосуванням 10 кДа відсікаючої діалізної мембрани з одержанням розчину антитіл у ФРФБ, рН 7,4, і для видалення консерванту, що заважає. Концентрацію після діалізу визначають вимірюванням OD_{280} і значення абсорбції зразка ділять на 1,36.

10 мМ вихідного розчину, що містить амін-реакційноздатне N-гідроксисукцинімідне (складний ефір NHS) корисне навантаження, приготують у ДМСО, і 20-кратний молярний надлишок корисного навантаження додають у кожний розчин антитіл.

Реакції інкубують при кімнатній температурі при обережному безперервному перемішуванні, і через 1 годину їх гасять додаванням 20 мМ водного розчину гліцину.

Кінцеві продукти потім діалізують у ФРФБ протягом ночі при 4 °C із застосуванням 10 кДа відсікаючої мембрани для видалення надлишку корисного навантаження, що не прореагувало.

ВЛА (відношення лікарський засіб-антитіло) визначають мас спектрометрією MALDI із застосуванням мас-спектрометра Ultraflex III (Bruker, GmbH), що працює в позитивному лінійному режимі.

Коротко, 100 мкл некон'югованих антитіл і одержаних КАЛС знесолюють із застосуванням PD спінової пастки G25 (GE Healthcare), елюючи у воді.

10 мг/мл s-DHB MALDI матричного розчину приготують в 0,1 % ТФК, розчиненої в $H_2O:ACN$ (50:50, об./об.). 2 мкл розчину зразків (антитіл або КАЛС) наносять на ціль MALDI із застосуванням способу осадження зразків подвійним шаром. Мас-спектр одержують у діапазоні маси до заряду від 50 до 180 кДа.

Різницю мас між некон'югованими й кон'югованими антитілами застосовують для визначення ВЛА.

Антитіла Трастузумаб, Цетуксимаб, Панітумумаб, Бевацизумаб, а також два мишачі анти-людські CD4 антитіла застосовують у реакціях кон'югування в експериментальних умовах, описаних вище. Одержують КАЛС з ВЛА 3-9.

Усі синтезовані КАЛС досліджують за допомогою мас-спектрів MALDI. Приклад КАЛС на основі лізину й приклад КАЛС на основі цистеїну представлені на фігурах 1-2.

Тільки як приклад, представлений мас-спектр MALDI для КАЛС (24), ST8154AA1 (Фіг. 1).

Приклад 14. Синтез і дослідження КАЛС, одержаних кон'югуванням на цистеїновому залишку з малеїмідними корисними навантаженнями

Антитіла піддають буферному обміну із застосуванням 10 кДа відсікаючої діалізної мембрани з одержанням розчину антитіл у ФРФБ, рН 7,4, і для видалення консерванту, що заважає. Концентрацію після діалізу визначають вимірюванням OD_{280} і значення абсорбції зразка ділять на 1,36.

М'яке відновлення міжланцюжкових дисульфідів в антитілах дає денатуровані цистеїни у відновленій формі, придатні для кон'югування зі звичайними малеїмідними лінкерами з одержанням гомогенних КАЛС з 2-6 лікарськими засобами/антитілами.

Для цього, 1 мМ ТСЕР-HCl вихідного розчину приготують у воді, і 5-кратний молярний надлишок додають у розчини антитіл. Реакції витримують при 37 °C протягом 2 годин при обережному безперервному перемішуванні. Реакції охолоджують.

Оскільки ТСЕР є сполукою, що не містить тиол, видалення надлишку відновлення не є необхідним, і 20-кратний молярний надлишок 10 мМ вихідного розчину корисного навантаження на основі малеїмиду, одержаного в ДМСО, додають у кожний відновлений розчин антитіла.

Реакції інкубують при кімнатній температурі при обережному безперервному перемішуванні, і через 1 годину їх гасять додаванням 20 мМ водного розчину цистеїну.

Кінцеві продукти потім діалізують екстенсивно у ФРФБ протягом ночі при 4 °С із застосуванням 10 кДа відсікаючої мембрани для видалення надлишку корисного навантаження, що не прореагувало.

ВЛА (відношення лікарський засіб-антитіло) визначають гідрофобною хроматографією із застосуванням колонки MabPac HIC-Butyl 100×4,6 мм, 5 мкм (Thermo Fisher Scientific). Рухомою фазою А є 1,5 сульфат амонію, 50 мМ фосфат натрію, рН 7, і ізопропанол (95:5; об./об.), і рухомою фазою В є 50 мМ фосфат натрію, рН 7, і ізопропанол (80:20; об./об.).

Рухому фазу А зберігають 100 % протягом 1 хвилини після упорскування, і потім рухому фазу В підвищують до 100 % за 30 хвилин і зберігають протягом 5 хвилин.

УФ-профілі реєструють при 220 і 280 нм. Усі антитіла, такі як Трастузумаб і Цетуксимаб, відповідно до даного винаходу, приготують способом, який включає реакції кон'югування в експериментальних умовах, описаних вище. Одержують КАЛС з середнім ВЛА 3,5-4,6.

Тільки як приклад, представлена HIC-хроматограма КАЛС (28), ST8176AA1 (Фіг. 2). ВЛА розраховують з урахуванням площ піків і із застосуванням наступної формули:

$$ВЛА = \frac{\sum_{n=0}^8 n \cdot AreaDA_{Rn}}{\sum_{n=0}^8 n \cdot AreaDA_{Rn}}$$

Приклад 15. Визначення зв'язування КАЛС з рецепторами ErbB1 і ErbB2 на пухлинних клітинах

Зв'язування КАЛС з ErbB1- і ErbB2-експресуючими пухлинними клітинами підтверджують аналізом FACS. Різні колонії пухлинних клітин з різними рівнями експресії EGFR і ErbB2, включаючи колонії клітин раку легені (A549, H1975), молочної залози (SKBR3), товстої кишки (LS174T), яєчників (SKOV3), підшлункової залози (CAPAN1 і MIAPACA-2) і шлунка (N87), застосовують в експериментах. Дебрис інкубують протягом 1 години при 4 °С з 10 мкг/мл антитілами або КАЛС у ФРФБ, і потім, після двох промивань у ФРФБ, забарвлюють протягом 1 години при 4 °С мишачими анти-людськими FITC-кон'югованими IgG (BD Pharmingen). Після двох наступних промивань додають йодид пропідію (PI) і проводять аналіз асоційованої з клітиною люмінесценції за допомогою FACScalibur (Becton Dickinson). Усі сполуки показали зв'язування з рецепторами, порівнянне з таким для вільних антитіл, Цетуксимабу й Трастузумабу (див. таблицю 3 і фігури 3 і 4).

Таблиця 3

Зв'язування КАЛС з рецепторами ErbB1 і ErbB2 й поглинання

Ід. №	Код №	Лікарський засіб	Корисне навантаження	mAb	ВЛА	Зв'язування (аналіз FACS)	Поглинання (зображення ОБА)
(24)	ST8154AA1	ST7464AA1	ST8128AA1	Cet	5,0-9,0	++	++
(25)	ST8155AA1	ST7464AA1	ST8132AA1	Cet	6,1-6,2	++	++
(26)	ST8177AA1	ST7464AA1	ST8152AA1	Cet	3,2-4,6	++	++
(27)	ST8178AA1	ST7464AA1	ST8128AA1	Tras	7,9	++	++
(28)	ST8176AA1	ST7464AA1	ST8152AA1	Tras	4,1-4,5	++	++
(29)	ST8179AA1	ST7464AA1	ST8132AA1	Tras	6,3	++	++
(30)	ST8205AA1	ST7660AA1	ST8197AA1	Tras	6,2	++	++
(36)	ST8218AA1	Вориностат	ST8217AA1	Tras	5,0	++	++
(37)	ST8219AA1	Вориностат	ST8217AA1	Cet	4,0	++	++
				Cet		++	++
				Tras		++	++

++ є оцінкою, що представляє високий ступінь зв'язування або поглинання.

Cet=Цетуксимаб; Tras=Трастузумаб.

Приклад 16. Визначення поглинання пухлинними клітинами

Здатність КАЛС бути поглиненими пухлинними клітинами після їх зв'язування зі

спорідненими рецепторами оцінюють за допомогою одержання зображень флуоресценції ОБА через систему Operetta (Perkin Elmer). Тестують декілька типів пухлинних клітин, включаючи колонії клітин раку легені (A549, H1975), молочної залози (SKBR3), товстої кишки (LS174T), яєчників (SKOV3), підшлункової залози (CAPAN1) і шлунка (N87). Клітини висівають в 96-ямкові титрувальні мікропланшети ($0,5 \times 10^4$ /ямку) і потім інкубують з 5 мкг/мл антитіл у культуральному середовищі протягом 3 годин при 37 °C. Після двох промивань клітини фіксують 4 % формальдегідом у ФРФБ, пермеабілізують ФРФБ 0,2 % Tween-20 (ФРФБ-Т) і блокують 2 % АБС у ФРФБ-Т, і, в остаточному підсумку, забарвлюють мишачими анти-людськими FITC-кон'югованими IgG (BD Pharmingen). Флуоресценцію записують і аналізують за допомогою системи одночасного багатопараметричного аналізу (ОБА) Operetta (Perkin Elmer). Клітини забарвлюють барвником Draq5 (Cell Signaling).

Усі КАЛС зв'язуються зі спорідненими рецепторами й поглинаються цільовими клітинами порівнянним чином з таким для природних відповідних антитіл, Цетуксимабу й Трастузумабу (див. таблицю 3).

Приклад 17. Визначення зв'язування КАЛС на рецепторах за допомогою ELISA і Biacore
Імунореактивність КАЛС тестують антиген-специфічним ELISA. Коротко, 96-ямкові планшети Immuno MAXISORP (Nunc) покривають протягом ночі при 4 °C 50 нг/ямку химерою рекомбінантного людського EGF-R/ErbB1 Fc (R&D) або білком рекомбінантного людського ErbB2/HER2 (Sino Biological Inc.). Після промивання розчином ФРФБ/0,1 % Tween (PT) планшети блокують протягом 2 годин при кімнатній температурі (к.т.) з розчином PT, що містить 1 % АБС (PTB), і потім інкубують з серійними розведеннями антитіл 1 год. при кімнатній температурі. Після додаткових промивань додають антитіло, кон'юговане з анти-людським К легким ланцюгом пероксидази хрому (HRP) (Sigma Aldrich), розведене 1:1000 у блокувальному розчині, протягом 1 год. при кімнатній температурі. Після чотирьох промивань розчином PT додають 200 мкл/ямку субстрату TMB (Sigma Aldrich), і планшети інкубують 30 хв. при 37 °C. Реакцію блокують додаванням 100 мкл/ямку 0,5M розчину H_2SO_4 , і оптичну густину при 450 нм вимірюють ELISA спектрофотометром.

Усі тестовані КАЛС показали взаємодію з їх специфічним рецептором з ефективністю, порівнянню з ефективністю природних антитіл Цетуксимабу й Трастузумабу (фігури 5A і 5B).

Спорідненість зв'язування Цетуксимабу і його відповідних КАЛС, ST8155AA1 і ST8154AA1, з EGFR/ErbB1 Fc химерним білком вимірюють за допомогою аналізу поверхневим плазмонним резонансом (ППР) на біодатчику Biacore T200 (GE). Коротко, EGFR/ErbB1 Fc химерний білок об'єднують з карбоксиметильованим декстрановим сенсорним чипом високої чистоти (CM5, Biacore) із застосуванням набору для амінового сполучення, що постачається виробником. Кінетичний аналіз проводять із застосуванням однократного аналізу кінетики, для того, щоб уникнути екстенсивного застосування методики регенерації, що завдає шкоди ліганду (регенерація виявилася необхідною, тому що антитіла не дисоціюють наприкінці кожного циклу). Антитіла й КАЛС впорскують у концентрації 6,25-100 нМ у ФРФБ електродний буфер при pH 7,2. Сполуки впорскують від низької до високої концентрації з часом контакту 180 с і часом дисоціації 600 с між ними. Ін'єкції проводять при 25 °C зі швидкістю потоку 30 мкл/хв. Поверхню сенсорного чипа регенерують 10 mM гліцину/HCl, pH 2,5, протягом 12-20 с. Усі експерименти проводять двічі. Представлені значення K_{on} і K_{off} є середніми для значень, одержаних у двох експериментах. $K_D = K_{off}/K_{on}$ (див. таблицю 4).

Таблиця 4

Аналіз Biacore для ST8154AA1 (24) і ST8155AA1 (25)

	k_{on} (1/Mc)	k_{off} (1/c)	K_D (M)
Цетуксимаб	$1,59 \times 10^5$	$4,54 \times 10^{-4}$	$2,85 \times 10^{-9}$
ST8154AA1	$1,77 \times 10^5$	$4,24 \times 10^{-4}$	$2,40 \times 10^{-9}$
ST8155AA1	$6,82 \times 10^4$	$3,51 \times 10^{-4}$	$5,15 \times 10^{-9}$

Приклад 18. Визначення цілісності КАЛС після процесу розпилення

Нещодавно було показано, що розпилення є багатообіцяючим способом доставки mAbs у респіраторних захворюваннях, представляючи неінвазивний спосіб, придатний для націленої доставки лікарських засобів безпосередньо в легені, обмежуючи вплив на вторинні органи.

Згідно з цим припущенням автори даного винаходу намагалися оцінити за допомогою аналізу ВЕРХ відновлення й цілісність КАЛС після розпилення. Коротко, розчини 300 мкг/мл (у ФРФБ) КАЛС і їх вихідних антитіл, Цетуксимабу й Трастузумабу, розпиляють протягом 5 хвилин через

звичайний струминний розпилювач (система AirFamily, Pic indolor). Потім розпилені лікарські засоби збирають, переміщуючи аерозоль у пробірки falcon, і 100 мкл конденсованого розчину аналізують ексклюзійною ВЕРХ (колонка TSKgel G3000 SWXL, TOSOH Bioscience) у порівнянні з попередньо розпиленими зразками.

- 5 Відсоток відновлення після розпилення розраховують вимірюванням площі кожного відповідного піка відносно попередньо розпилених зразків, і ранжують від 50 до 30 % і від 40 до 20 % для КАЛС на основі Цетуксимабу й Трастузумабу, відповідно. Цілісність і частоту агрегації також оцінюють для кожного розпиленого КАЛС, згідно з профілем кожної хроматограми, і порівнюють з не розпиленими зразками (див. таблицю 5).

10

Таблиця 5

Дослідження КАЛС за допомогою ВЕРХ після розпилення

Код №		Цілісність (%)	Агрегати (%)	Розклада- ння (%)	Відновлення основного піка (%)
Цетуксимаб	Перед розп.	100	0	0	72
	розп.	100	0	0	
ST8154AA1 (24)	Перед розп.	98	2	0	47
	розп.	76	24	0	
ST8155AA1 (25)	Перед розп.	95	4	1	33
	розп.	69	30	1	
ST8177AA1 (26)	Перед розп.	84	1	15	30
	розп.	82	5	13	
Трастузумаб	Перед розп.	100	0	0	58
	розп.	100	0	0	
ST8178AA1 (27)	Перед розп.	98	2	0	20
	розп.	85	15	0	
ST8176AA1 (28)	Перед розп.	83	5	12	21
	розп.	76	11	13	
ST8179AA1 (29)	Перед розп.	97	3	0	27
	розп.	76	24	0	

Приклад 19. Визначення ефективності КАЛС в інгібуванні проліферації пухлинних клітин

- Дію КАЛС на проліферацію клітин оцінюють на двох колоніях клітин раку легені (NCI-H1975 і Calu-3). Більш докладно, пухлинні клітини NCI-H1975 досліджують через надекспресію гена ErbB1 з подвійною мутацією (L858R, T790M), а Calu-3 експресує дику форму EGFR, але мутантний ген K-Ras (G13D), а також мутантні гени TP53 і CDKN2A.

- Клітини висівають (3000-5000 клітин/ямку) в 96-ямкові планшети в повному культуральному середовищі, і потім інкубують протягом 6 днів, чотири рази, зі скалярними концентраціями КАЛС, ранжуючи від 500 до 6,25 нМ. Інгібування проліферації клітин вимірюють аналізом CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega), через люмінометр Veritas (Promega). Дані показують як середній ($\pm$ CB) відсоток інгібування з двох незалежних експериментів. Значення IC₅₀ в результаті розраховують із застосуванням програми GraphPad Prism 5,0. Результати показали, що КАЛС ST8154AA1 значно інгібує проліферацію клітин в обох колоніях пухлинних клітин (зі значеннями IC₅₀ 250 і 450 нМ, на клітинах NCI-H1975 і Calu-3, відповідно) у порівнянні з тільки Цетуксимабом, який, навпаки, був неефективний (IC₅₀>500 нМ) (фігури 6-7).

- Приклад 20. Визначення активності КАЛС по ацетилюванню гістону H3 і α -тубуліну в пухлинних клітинах

- Дію КАЛС на ацетилювання типових субстратів ГДАЦ, тобто гістону H3 і білка α -тубуліну, оцінюють за допомогою одержання зображень флуоресценції ОБА на різних пухлинних клітинах. Тестують декілька колоній пухлинних клітин, експресуючих різні рівні рецепторів EGFR і HER2, включаючи колонії клітин раку легені (A549, H1975), молочної залози (SKBR3), товстої кишки (LS174T), яєчників (SKOV3), підшлункової залози (CAPAN1 і MIAPACA-2) і шлунка (N87). Клітини висівають в 96-ямкові титрувальні мікропланшети (0,5-1×10⁴/ямку) у повному культуральному середовищі, і через день інкубують з 5 мкг/мл антитілами або КАЛС протягом 3 або 24 годин при 37 °C. Після двох промивань ФРФБ клітини фіксують з 4 % формальдегідом у ФРФБ, пермеабілізують з ФРФБ 0,2 % Tween-20 (ФРФБ-Т) і блокують з 2 % АБС у ФРФБ-Т.

Потім додають мишачий анти-ацетильований α -тубулін IgG (клон 6-11B-1, від Sigma Aldrich) або кролячий анти-ацетильований гістон H3 IgG (від Active Motif) у ФРФБ-Т, і клітини інкубують протягом 1 години при кімнатній температурі. Після двох промивань ФРФБ клітини, в остаточному підсумку, забарвлюють протягом ще 1 додаткової години FITC-кон'югованим козячим анти-мишачим або анти-кролячим IgG (BD Pharmingen), відповідно до первинного застосовуваного антитіла. Флуоресценцію оцінюють і аналізують за допомогою системи одночасного багатопараметричного аналізу (ОБА) Operetta (Perkin Elmer). Клітини забарвлюють барвником Draq5 (подача клітинних сигналів).

Усі тестовані КАЛС викликають релевантне підвищення рівня ацетилування обох α -тубуліну й гістону H3 у всіх тестованих колоніях клітин, у результаті прямого ферментного інгібування ГДАЦ6 і ГДАЦ I класу, відповідно (фігури 8-11). Цей результат узгоджується зі здатністю КАЛС бути поглиненими й розкладатися для виділення групи ST7464AA1.

Підвищене ацетилування α -тубуліну й гістону H4 також спостерігається за допомогою вестерн-блотингу на білкових лізатах різних пухлинних клітин. Коротко, за день до початку експерименту пухлинні клітини висівають в 6-ямкові чашки в повному культуральному середовищі. Потім клітини обробляють протягом 3 годин при 37 °C 20 мкг/мл тестованих антитіл. Після обробки клітини двічі промивають льодяним ФРФБ і потім повний лізат клітин приготують інкубуванням протягом 10 хв. на льоду з 1X лізисним буфером (Cell Signaling) з додаванням інгібіторів протеази. Клітинні лізати піддають обробці ультразвуком до центрифугування при 14000×g, протягом 10 хв. при 4 °C, для видалення клітинного дебрису. Вмісти білка визначають класичним колориметричним методом Бредфорда (набір для дослідження білка Coomassie Bradford; Pierce) згідно з інструкцією виробника. Для оцінки ступеня ацетилування, рівні кількості білків для кожного зразка розділяють SDS-PAGE і переносять на нітроцелюлозну мембрану (Hybond-C extra, Amersham-GE Healthcare). Молекулярні маси оцінюють на основі відносної міграції з білковими маркерами молекулярної маси (Prestained Kaleidoscope Standards; Bio-Rad). Місця неспецифічного зв'язування потім блокують інкубуванням мембран з 5 % нежирним сухим молоком в TBS протягом ночі при 4 °C. Специфічні первинні антитіла (кроляче анти-ацетил-гістон H4 антитіло від Santa Cruz; мишаче анти-гістон H4 моноклональне антитіло від Cell Signaling; мишаче анти-ацетильоване α -тубулінове моноклональне антитіло від Sigma Aldrich, кроляче анти- α -тубулінове антитіло від абсам) додають до мембран при оптимальному розведенні в 5 % нежирному сухому молоці/TBST протягом ночі при 4 °C. Після чотирьох промивань в TBST, мембрани інкубують протягом 1 год. з HRP-кон'югованими вторинними антитілами в 5 % нежирному сухому молоці/TBST. Імунореакційні смуги нарешті візуалізують посиленням хемілюмінесценції з визначальним реагентом для ECLplus вестерн-блотингу (GE Healthcare), і аналізують системою формування зображення на фосфорному покритті (STORM, Molecular Dynamics). Типові блоти представлено на фігурі 12.

Приклад 21. Визначення in vivo протипухлинної дії ST8154AA1 і ST8155AA1 на клітини недрібноклітинного раку легенів NCI-H1975

Голим мишам Nu/Nu (від Charles River, Italy) роблять одну підшкірну ін'єкцію 5×10^6 клітин недрібноклітинного раку легенів NCI-H1975, суспендованих в 100 мкл клітинного культурального середовища RPMI з додаванням 10 % ФТС. Цетуксимаб і ST8154AA1 і ST8155AA1 дають внутрішньоочеревинно кожні 4 дні протягом 4 днів (q4dx4) у дозі 50 мг/кг, а ST7612AA1 вводять внутрішньоочеревинно в дозі 120 мг/кг за схемою q4dx4. Групу носія обробляють ФРФБ. Ріст пухлини вимірюють циркулем, і об'єм пухлини розраховують із застосуванням формули довжина (мм) $\times$ ширина² (мм)/2. Інгібування пухлини розраховують за рівнянням: %TVI=100-(середній об'єм пухлини лікованої групи/середній об'єм пухлини контрольної групи) $\times$ 100. Токсичність оцінюють на основі зниження маси тіла.

Тварин умертвляють інгаляцією CO₂, коли пухлини досягають об'єму близько 1200 мм³.

Усі процедури, прийняті для утримання й поводження з тваринами, строго відповідають італійським і європейським керівним принципам з утримання лабораторних тварин.

Результати показали, що КАЛС були значно більш ефективними, ніж Цетуксимаб (P<0,001 і P<0,01). Зокрема, ST8155AA1 має більшу здатність інгібувати об'єм пухлини в порівнянні з Цетуксимабом на 77 % (фігура 13, таблиця 6), а ST8154AA1 здатний знижувати ріст пухлини на 95 % відносно Цетуксимабу (фігура 13, таблиця 7). ST7612AA1, проліки завантаженого токсину ST7464, при введенні окремо в дозі 120 мг/кг, в.о., q4dx4, були повністю неактивними, тому що оптимальною схемою для інгібітору ГДАЦ є щоденне введення (qdx5/w) (фігура 13).

Цікаво, що включена доза лікарського засобу ST8154AA1 і ST8155AA1 на mAb на mAb Цетуксимаб становила близько 0,1 мг/кг.

Таблиця 6

Протипухлинна ефективність ST8155AA1 до Цетуксимабу проти НДКРЛ NCI-H1975

Гістотип пухлини	Імплантація пухлини	Доставка лікарських засобів	Інгібування пухлини або метастазів (%) ST8155AA1 до Цетуксимабу на 47 день, значення P до Цетуксимабу
НДКРЛ NCI-H1975	п.ш.	в.о., q4dx4	77, P<0,01

Таблиця 7

Протипухлинна й антиметастазна ефективність ST8154AA1 до Цетуксимабу на моделях різних пухлин

Гістотип пухлини	Імплантація пухлини	Доставка лікарського засобу	Інгібування пухлини або метастазів (%) ST8154AA1 і Цетуксимабу до носія, значення P до Цетуксимабу
НДКРЛ NCI-H1975	п.ш.	в.о., q4dx4	95 (до Цетуксимабу, тому що на день 90), P<0,001
НДКРЛ A549	п.ш.	в.о., q4dx4	60 до 34, P<0,05
НДКРЛ A549	в.в.	Аерозоль, q7dx4	90 до 50, P<0,01
Рак підшлункової залози CAPAN-1	Ортотопічна в підшлункову залозу	в.о., q4dx4	84 до 49 і CR 6/10 до 2/10, P<0,05
ОПК раку підшлункової залози PA5363	п.ш.	в.о., q4dx5	50 до 25, P<0,05

Приклад 22. Визначення *in vivo* протипухлинної дії ST8154AA1 проти недрібноклітинного раку легені A549

- 5 Голим мишам роблять підшкірну ін'єкцію 5×10^6 клітин недрібноклітинного раку легенів A549, суспендованих в 100 мкл клітинного культурального середовища RPMI з додаванням 10 % ФТС. Цетуксимаб і ST8154AA1 вводять внутрішньоочеревинно кожні 4 дні протягом 4 днів (q4dx4) у дозі 50 мг/кг. Вимірювання пухлини й даних такі, як у прикладі 21.

Лікування показало, що ST8154AA1 є значно більш ефективним, ніж Цетуксимаб (P<0,05) (фігура 14, таблиця 7).

10 Приклад 23. Визначення *in vivo* протипухлинної дії ST8154AA1, що доставляється аерозолем, проти метастатичного недрібноклітинного раку легенів A549

15 Метастатичний рак легенів установлюють введенням 5×10^6 клітин A549-luc-c8 (A549luc) у хвостову вену імунodefіцитних мишей SCID/beige. Через 1 тиждень мишей довільно ділять і обробляють усе тіло аерозолем (за допомогою системи AirFamily, Pic indolor) КАЛС або Цетуксимабом (3,5 мл розчину 100 мкг/мл). Обробку повторюють за схемою q7dx4. Зображення біоломінесценції пухлини (ЗБЛ) записують у різні моменти часу на системі Xenogen IVIS Imaging System 200 (Perkin Elmer) через 15 хв. після в.о. введення люциферину (150 мкг/мишу). Оцінка біоломінесценції показала, що КАЛС здатні значно інгібувати метастази пухлини з високою ефективністю в порівнянні з Цетуксимабом і в різні моменти збирання пухлини (P<0,01 і P<0,05) (фігура 15, таблиця 7).

20 Приклад 24. Визначення *in vivo* протипухлинної дії ST8154AA1, що вводиться в.о., проти раку підшлункової залози CAPAN-1

25 Порівняння ST8154AA1 (40 мг/кг, в.о., q4dx4), ST7612AA1 (200 мг/кг, в.о., q4dx4) і Цетуксимабу (40 мг/кг, в.о., q4dx4) оцінюють в ортотопічній мишачій моделі раку підшлункової залози CAPAN-1. Клітини Capan-1 (1×10^6) вводять безпосередньо в підшлункову залозу експериментальних груп. Обробку ST8154AA1, ST7612AA1 і Цетуксимабом починають через 6 днів після інокулювання пухлини й, через 90 днів після ін'єкції пухлини, мишей умертвляють для аналізу маси пухлини. ST8154AA1 показав інгібування росту пухлини на 84 % у 6 з 10 мишей з повними реакціями, а Цетуксимаб дає 49 % інгібування росту пухлини у 2 з 10 мишей з повними реакціями. Тільки ST7612AA1 показав більш низьку активність на ріст пухлини (32 %), тому що схема q4dx4 не є оптимальною для інгібітору ГДАЦ. Масу пухлини оцінюють через 90 днів після ін'єкції пухлини й виражають як середня й СПС, P<0,05 до Ctx) (фігура 16, таблиця 7).

Приклад 25. Визначення *in vivo* протипухлинної дії ST8154AA1, що вводиться в.о., проти ОПК (одержаного у пацієнта ксенотрансплантата) раку підшлункової залози

Мишам NOD-SCID (від Jackson Laboratories) роблять одну підшкірну ін'єкцію клітин пацієнта RA5363 P2 у кількості 51000 клітин/100 мкл, ресуспендованих у рівному об'ємі Cultrex 10× сфероїдної формації ECM.

Цетуксимаб і ST8154AA1 вводять внутрішньоочеревинно кожні 4 дні протягом 5 днів (q4dx5) у дозі 40 мг/10 мл/кг. Вимірювання росту пухлини й даних такі, як у прикладі 20.

Обробка показала, що ST8154AA1 значно більш ефективний, ніж Цетуксимаб ($P < 0,05$) (фігура 17, таблиця 7).

Приклад 26. Визначення *in vivo* протипухлинної дії ST8178AA1 і ST8176AA1, введених в.о., проти раку яєчників SKOV-3

Самкам голих мишей Nu/Nu (від Charles River, Italy) роблять одну підшкірну ін'єкцію 5×10^6 клітин раку яєчників SKOV-3, суспендованих в 100 мкл клітинного культурального середовища RPMI з додаванням 10 % ФТС.

Мишей кожної експериментальної групи обробляють в.о. кожні чотири дні, 4 обробки (q4dx4) в дозі 15 мг/10 мл/кг. Результати показали, що ST8178AA1 і ST8176AA1 значно більш ефективні, ніж Трастузумаб ($P < 0,05$) (фігури 18-19, таблиці 8 і 9). Вимірювання пухлини й даних такі, як у прикладі 20. Ці дані дозволяють передбачити подвійний ефект КАЛС у порівнянні з Трастузумабом на ріст пухлини.

Таблиця 8

Протипухлинна дія ST8178AA1 до Трастузумабу проти раку яєчників SKOV-3

Гістотип пухлини	Імплантація пухлини	Доставка лікарського засобу	Інгібування пухлини або метастазів (%) ST8176 і Трастузумабу до носія, значення P до Трастузумабу
Рак яєчників SKOV-3	п.ш.	в.о., q4dx4	65 до 40, $P < 0,05$

Приклад 27. Визначення *in vivo* протипухлинної дії ST8176AA1, введеного в.о., проти ортотопічно імплантованого раку яєчників SKOV-3

Самкам голих мишей Nu/Nu (від Charles River, Italy) роблять одну внутрішньоочеревинну ін'єкцію 10×10^6 клітин раку яєчників SKOV-3, суспендованих в 200 мкл клітинного культурального середовища RPMI з додаванням 10 % ФТС.

Мишам вводять в.о. ST8176AA1, Трастузумаб (4 дози 15 мг/кг один раз кожні 4 дні) або носій (ФРФБ), починаючи через 3 дні після ін'єкції пухлини. Трастузумаб або ST8176AA1 були ефективними, але КАЛС також показав видужання 4 з 9 мишей через 90 днів після імплантації пухлини (фігура 20, таблиця 9).

Таблиця 9

Протипухлинна й антиметастатична дія ST8176AA1 до Трастузумабу в різних моделях пухлини

Гістотип пухлини	Імплантація пухлини	Доставка лікарського засобу	Інгібування пухлини (%) ST8176 і Трастузумабу до носія, значення P до Трастузумабу
Рак яєчників SKOV-3	п.ш.	в.о., q4dx4	65 до 40, $P < 0,05$
Рак яєчників SKOV-3	ортотопічна	в.о., q4dx4	підвищення тривалості життя 95 до 72, $P < 0,05$
Рак товстої кишки LS174T	п.ш.	в.о., q4dx4	25 до 0, $P < 0,05$
Рак товстої кишки LS174T	ортотопічна	в.о., q4dx4	підвищення тривалості життя 35 до 0, $P < 0,05$
ОПК раку підшлункової залози RA5363	п.ш.	в.о., q4dx5	35 до 0, $P < 0,05$

Приклад 28. Визначення *in vivo* протипухлинної дії ST8176AA1, введеного в.о., проти

внутрішньоочеревинного раку товстої кишки LS174T

КАЛС також оцінюють проти внутрішньоочеревинного раку, такого як рак товстої кишки, моделі ксенотрансплантата агресивної пухлини.

Метою цього дослідження є демонстрація того, що КАЛС може також застосовуватися для місцевого введення для лікування захворювань, таких як карциноматоз черевної порожнини. Для демонстрації такої активності клітини раку товстої кишки LS174T вводять в.о. Клітини збирають і промивають два рази ФРФБ. Десять мільйонів клітин суспендують в 0,2 мл середовища ЕМЕМ, що містить 20 % Matrigel™, і вводять у черевну порожнину кожної миші. Усі обробки КАЛС проводять в.о. ін'єкцією в об'ємі 200 мкл через 3 дні після ін'єкції пухлини, за схемою q4dx4.

Щодня відслідковують смертність мишей, масу записують два рази на тиждень. Тварин, що показують ознаки дискомфорту, дистресу або у стані вмирання, досліджують ветеринари або авторизований персонал і, при необхідності, гуманно умиряють для мінімізації болю або страждань.

Дані смертності обробляють найбільш придатним методом статистичного аналізу для визначення підвищення тривалості життя серед лікованих груп і для одержання графіка Каплана-Мейєра. Увесь статистичний аналіз проводять із застосуванням програми GraphPad-Prism6.

Результати показали середній час виживання (СЧВ) 37 днів у групах обробки носієм і Трастузумабом. Навпаки, КАЛС ST8176AA1 показав значне збільшення середнього часу виживання до 50 днів ($P < 0,05$) (фігура 21, таблиця 9).

На даний час традиційне лікування раку черевної порожнини включає системну хіміотерапію, з або без паліативної хірургії, яка малоефективна з точки зору результатів і наявних фармакологічних обмежень щодо поганого розподілу лікарського засобу в черевній порожнині й проникнення в очеревинні вузли (Ouais A., 2014, Zentralbl. Chir. 141:421-4).

Навпаки, нещодавній інноваційний спосіб місцевої доставки, називаний PIPAC (внутрішньоочеревинна аерозольна терапія під тиском), показав поліпшення ефективності внутрішньоочеревинної терапії (Solass W., 2014, Ann. Surg. Oncol. 21:553-9) і ця методика виявилася безпечною, без ниркової або печінкової токсичності після лікування (Blanco, 2014, 20:2311-6; Solass, 2013, Ann. Surg. Oncol. 20:3504-11).

Оскільки нові КАЛС показали протипухлинну дію на місцеву пухлину при введенні аерозолем і внутрішньоочеревинно, ці дані стимулюють до застосування в PIPAC описаних тут КАЛС на доповнення до стандартного парентерального введення.

PIPAC (внутрішньоочеревинна аерозольна терапія під тиском) є інноваційним способом місцевої доставки, який поліпшує ефективність внутрішньоочеревинної терапії (Solass W., 2014, Ann. Surg. Oncol. 21:553-9).

Ця методика є безпечною, без ниркової або печінкової токсичності після лікування (Blanco, 2014, 20:2311-6; Solass et al., 2013, Ann. Surg. Oncol. 20:3504-11).

Навпаки, традиційне лікування раку черевної порожнини включає системну хіміотерапію, з або без паліативної хірургії, яка малоефективна з точки зору результатів. Іншою проблемою є фармакологічні обмеження щодо поганого розподілу лікарського засобу в черевній порожнині й проникнення в очеревинні вузли (Ouais A. et al., 2014, Zentralbl. Chir. 141:421-4). На основі біохімічного аналізу, що підтверджує стабільність КАЛС, описаних тут, після розпилення і даних про ефективність внутрішньоочеревинної доставки застосування КАЛС в PIPAC також виправдане.

Приклад 29. Визначення in vivo протипухлинної дії ST8176AA1, введеного в.о., проти раку товстої кишки LS174T

Пухлини вирощують у мишей Nu/Nu протягом 6 днів після п.ш. ін'єкції 5×10^6 клітин раку товстої кишки LS174T. Розвиток осередку й реакцію на лікування антитілом відслідковують із застосуванням цифрового циркуля. Мишам вводять в.о. ST8176AA1, Трастузумаб (4 дози 15 мг/кг один раз кожні 4 дні) або носій (ФРФБ). КАЛС ST8176AA1 значно інгібує ріст пухлини раку товстої кишки ($P < 0,05$ до Трастузумабу) (фігура 22, таблиця 9).

Приклад 30. Визначення in vivo протипухлинної дії ST8176AA1, введеного в.о., проти ОПК раку підшлункової залози

Мишам NOD-SCID (від Jackson Laboratories) вводять одну підшкірну ін'єкцію клітин пацієнта PA5363 P2 у кількості 77000 клітин/100 мкл, ресуспендованих у рівному об'ємі Cultrex $10 \times$ сфероїдної формації ECM.

Трастузумаб і ST8176AA1 вводять внутрішньоочеревинно кожні 4 дні протягом 5 днів (q4dx5) у дозі 15 мг/кг в експериментальних групах по 10 мишей у кожній групі. Вимірювання пухлини й даних такі, як у прикладі 20.

Лікування показало, що ST8176AA1 значно більш ефективний, ніж Трастузумаб ($P < 0,05$) та оброблена носієм група ($P < 0,05$) (фігура 23, таблиця 9).

Приклад 31. Визначення *in vivo* протипухлинної дії комбінації Цетуксимабу з низькою дозою ST7612AA1, відповідною введеній дозі mAb, проти раку легені A549

Протипухлинна дія КАЛС ST8154AA1 у порівнянні з еквімолярним сполученням або Цетуксимабом і ST7612AA1 також оцінюють проти моделі недрібноклітинного раку легені A549. Оптимальні дози ST7612AA1 або Цетуксимабу також досліджують.

Клітини раку легені людини A549 культивують у придатному повному середовищі. У день введення пухлини клітини збирають з субконфлюентних культур трипсинізацією, промивають ФРФБ, суспендують у ФРФБ і підшкірно вводять у правий бік імунодефіцитних мишей ($5 \times 10^6/100$ мкл). Лікування починають, коли розмір пухлини становить близько 80 мм³, і мишей довільно ділять на експериментальні групи (10 мишей/групу).

Введення ST8154AA1 q4dx4, в.о., викликає інгібування росту пухлини, що оцінюють калібруванням під час дослідження й посмертною масою пухлини, хоча еквімолярна суміш компонентів КАЛС, Цетуксимабу (40 мг/кг, в.о., q4dx4) і іГДАЦ (0,1 мг/кг, в.о., q4dx4) не була ефективною (таблиця 10).

У цьому експерименті тільки Цетуксимаб (40 мг/кг, в.о., q4dx4) не показує протипухлинну дію.

Асоціація оптимальних доз Цетуксимабу (40 мг/кг, в.о., q4dx4) з ST7612AA1 (40 мг/кг, п.о., qdx5/wx3w) показала порівнянну протипухлинну дію тільки з ST7612AA1 (40 мг/кг, п.о., qdx5/wx3w).

ST7612AA1 у дозі 40 мг/кг, п.о., qdx5/wx3w показав подібну протипухлинну дію до дії КАЛС ST8154AA1, де ST7612AA1 у дозі 0,1 мг/кг, в.о., q4dx4 не був ефективним (таблиця 10).

Таблиця 10

Протипухлинна дія комбінації ST7612AA1 з Цетуксимабом проти НДКРЛ A549

Група	Доза (мг/кг), спосіб, схема	TVI на 50 день, значення Р до носія	TVI на 56 день, значення Р до носія
Носій	0	-	-
Цетуксимаб	40, в.о., q4dx4	0, $P=0,91$	0, $P=0,79$
ST7612AA1	40, п.о., qdx5/wx3w	33, $P=0,007$	35, $P=0,0009$
Цет+ST7612AA1	40 в.о.+40 п.о.	20, $P=0,11$	27, $P=0,07$
ST7612AA1	0,1, в.о., q4dx4	0, $P=0,95$	0, $P=0,88$
Цет+ST7612AA1	40 в.о.+0,1 в.о.	9, $P=0,22$	8, $P=0,55$
ST8154AA1	40, q4dx4	21, $P=0,05$	20, $P=0,04$

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Кон'югат антитіло-лікарський засіб формули (I)

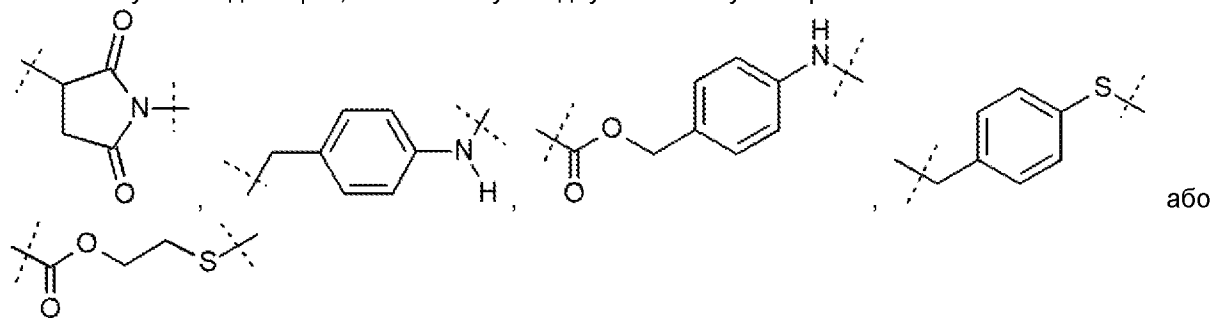
$D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)_o-(CG)_p-Ab$

(формула I)

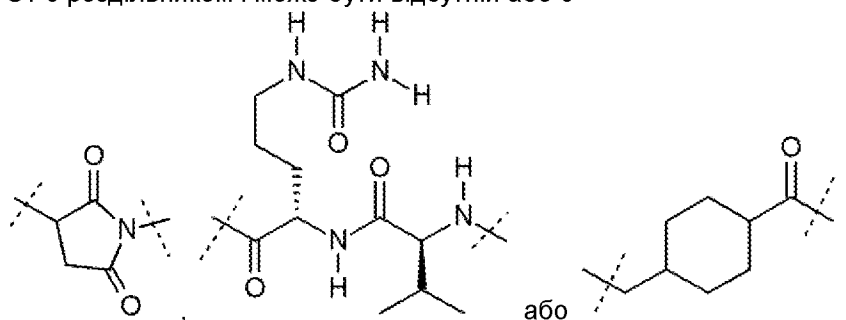
або його фармацевтично прийнятна сіль, де

D є лікарським інгібітором гістондеацетилази, вибраним з інгібіторів гістондеацетилази на основі тіолу, інгібіторів гістондеацетилази на основі гідроксамінової кислоти або інгібіторів гістондеацетилази на основі бензаміду,

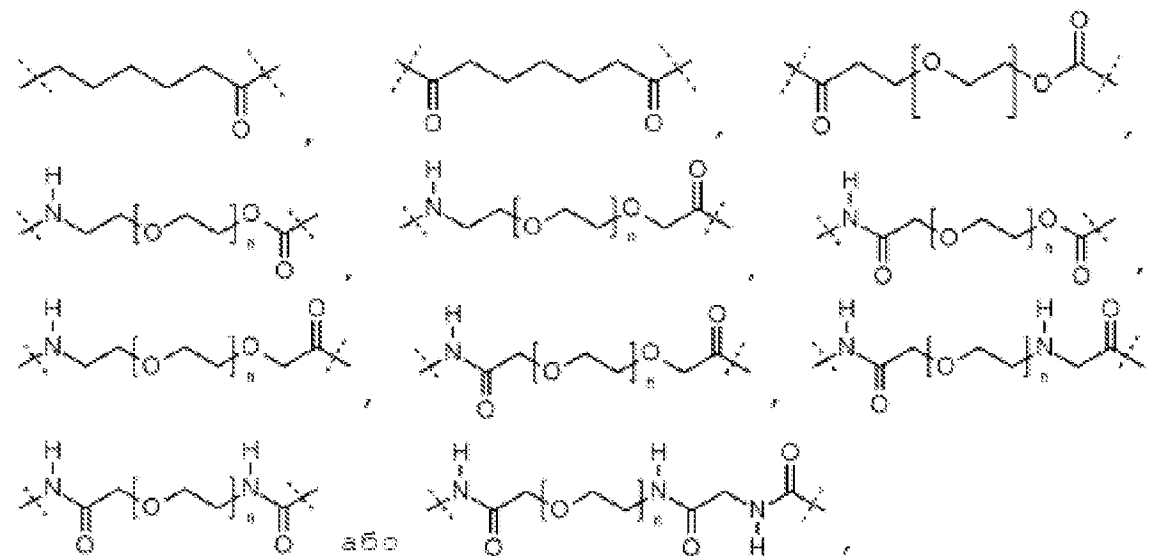
CU є сполучною одиницею, яка може бути відсутня або яку вибирають з:



S1 є роздільником і може бути відсутній або є



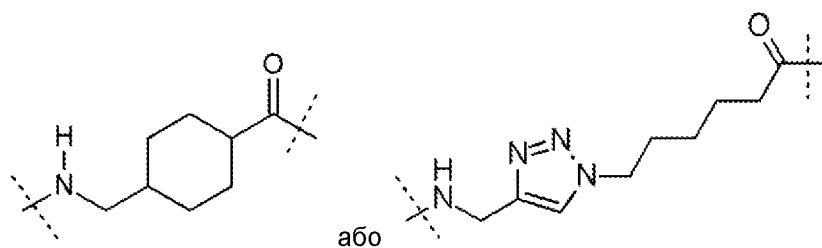
L є лінкером, який вибирають з:



5

де n є цілим числом від 2 до 5;

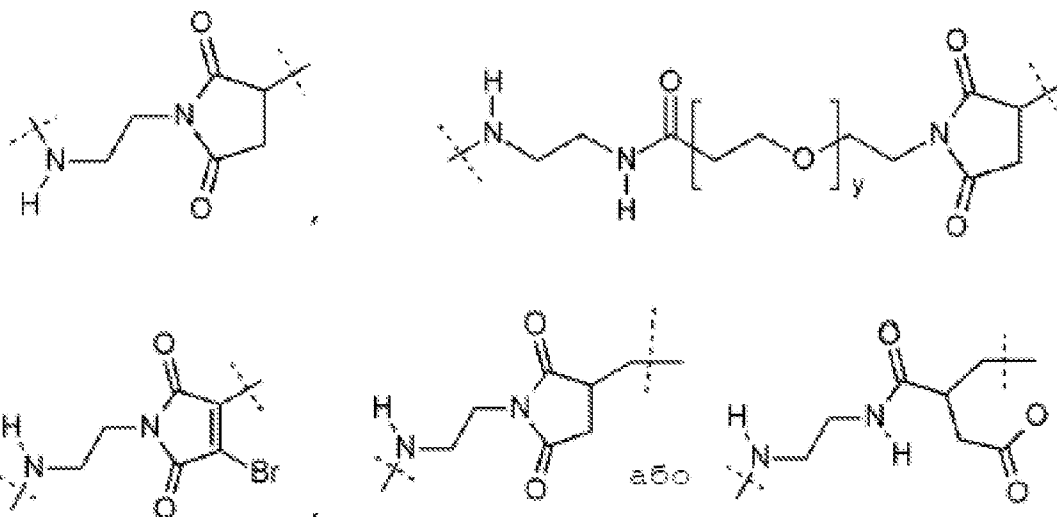
S2 є роздільником і може бути відсутній або є



10

CG є сполучною групою, одержаною після кон'югування з цистеїнтіол- або лізінаміногрупами антитілу, яка може бути відсутня або є однією з наступних груп:

або



де y є цілим числом від 0 до 8,

Ab є антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, і

5 m , n , o і p є цілими числами 0 або 1.

2. Кон'югат антитіло-лікарський засіб формули (I)

$D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)_o-(CG)_p-Ab$

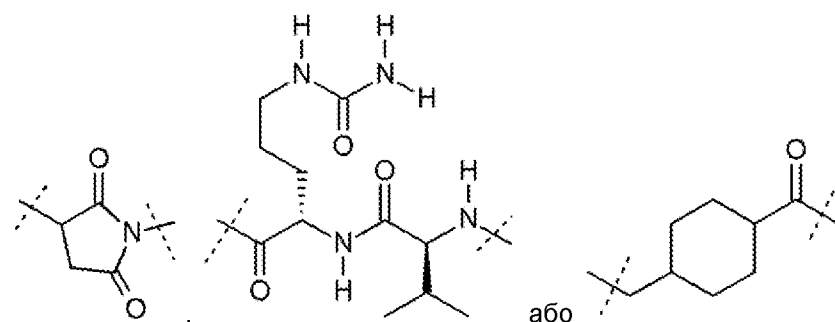
(формула I)

або його фармацевтично прийнятна сіль, де

10 D є лікарським інгібітором гістондеацетилази,

CU є сполучною одиницею, яка може бути відсутня,

S1 є роздільником і може бути відсутній,



15

L є лінкером,

S2 є роздільником і може бути відсутній,

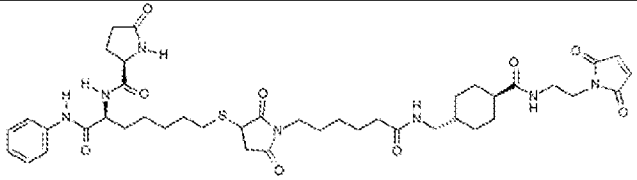
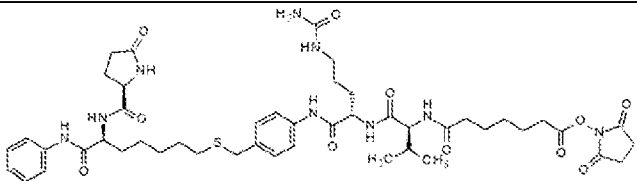
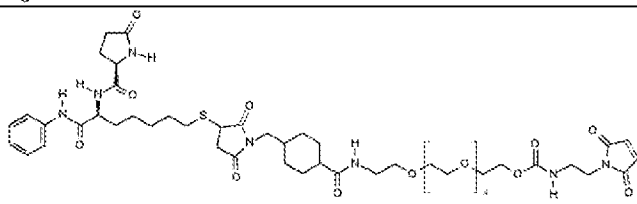
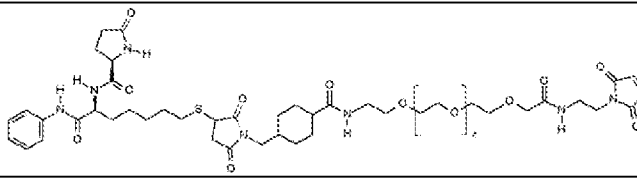
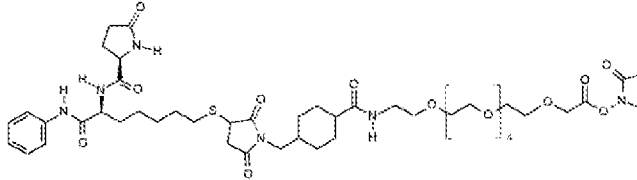
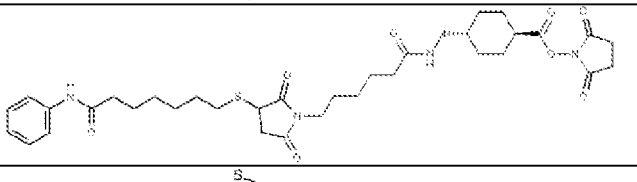
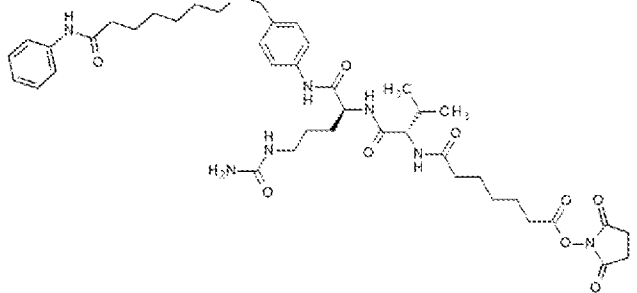
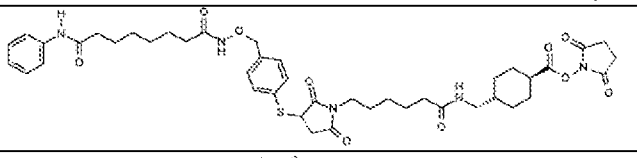
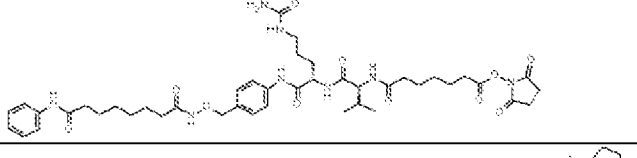
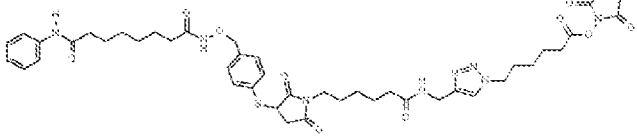
CG є сполучною групою, одержаною після кон'югування з цистеїніол- або лізінаміногрупами антитіла, яка може бути відсутня,

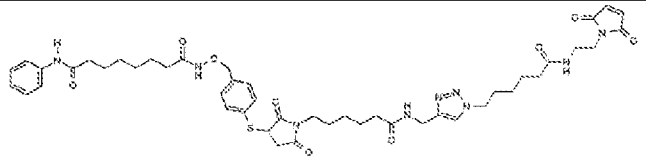
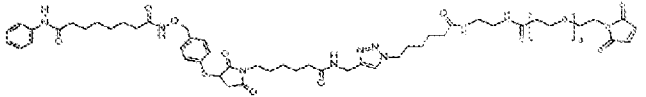
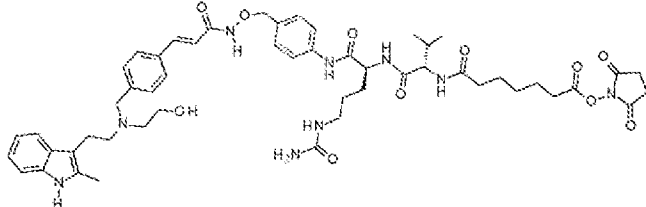
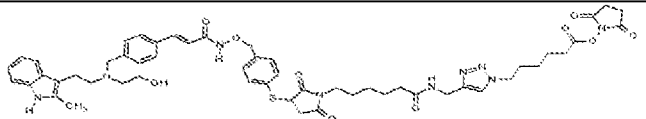
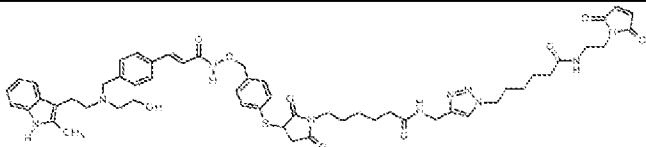
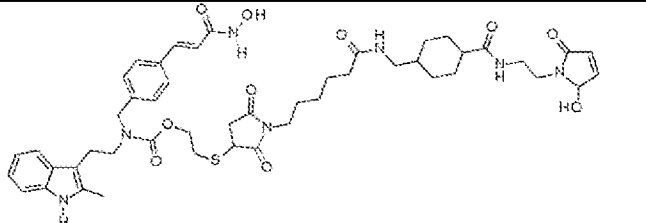
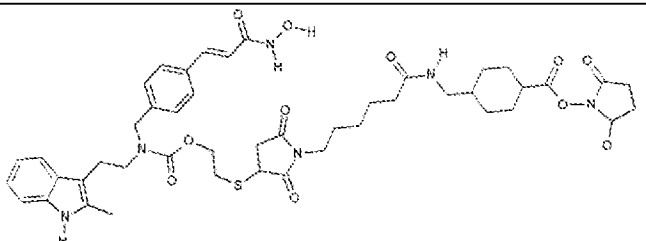
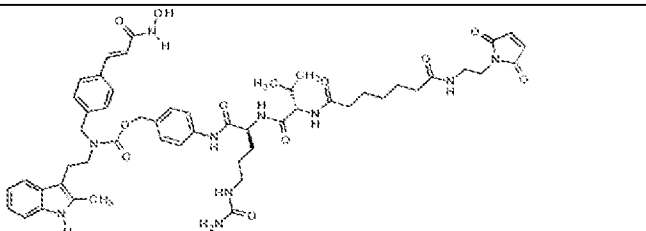
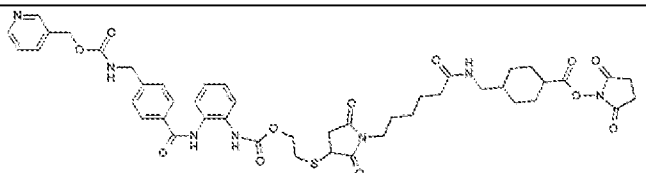
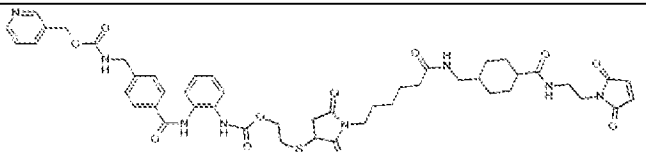
20 Ab є антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом, і

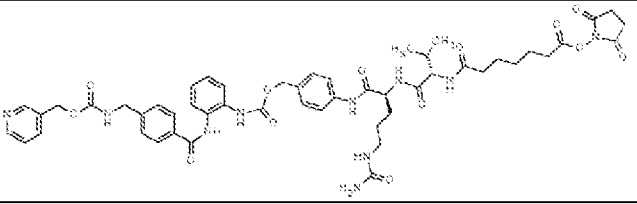
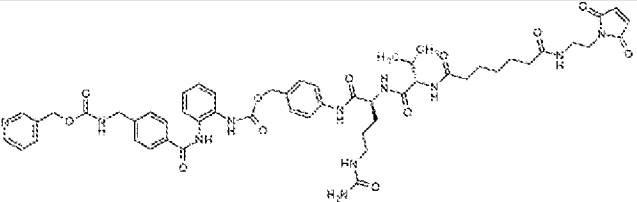
m , n , o і p є цілими числами 0 або 1,

де лікарський інгібітор гістондеацетилази й корисне навантаження, що містить структуру D- $(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)_o-(CG)_p$ формули I, є сполукою, вибраною з:

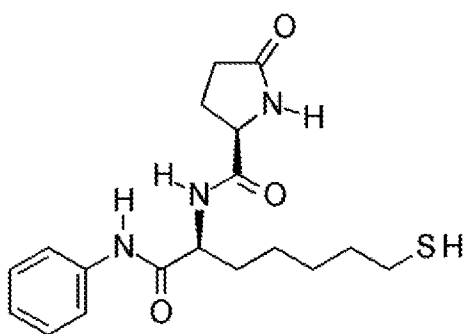
Ід. №	Код ST	Хімічна структура	М.М.	Клас
(1)	8128AA1		810,9	NHS

(2)	8152AA1		836,0	Малеїмід
(3)	8132AA1		964,1	NHS
(4)	8190AA1		1030,2	Малеїмід
(5)	8189AA1		1044,2	Малеїмід
(6)	8191AA1		889,0	NHS
(7)	8197AA1		684,8	Малеїмід
(8)	8235AA1		838,0	NHS
(9)	8217AA1		834,0	NHS
(10)	8201AA1		865,0	NHS
(11)	8215AA1		889,0	NHS

(12)	8216AA1		914,1	Малеїмід
(13)	8236AA1		1161,4	Малеїмід
(14)	8232AA1		994,1	Малеїмід
(15)	8233AA1		1018,2	NHS
(16)	8234AA1		1043,2	Малеїмід
(17)	8229AA1		928,1	Малеїмід
(18)	8230AA1		903,0	NHS
(19)	8231AA1		1019,2	Малеїмід
(20)	8225AA1		928,0	NHS
(21)	8226AA1		953,1	Малеїмід

(22)	8227AA1		1021,1	NHS
(23)	8228AA1		1046,1	Малеїмід

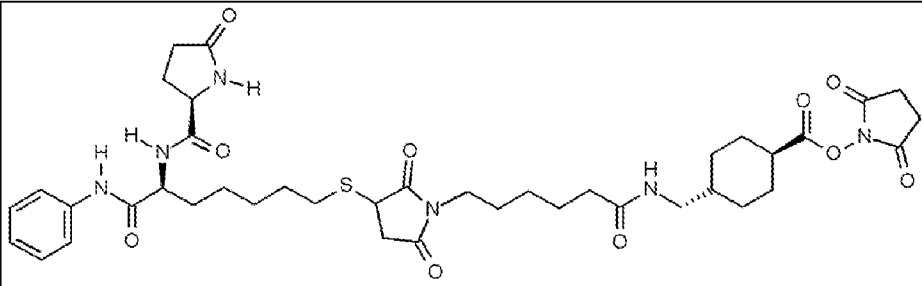
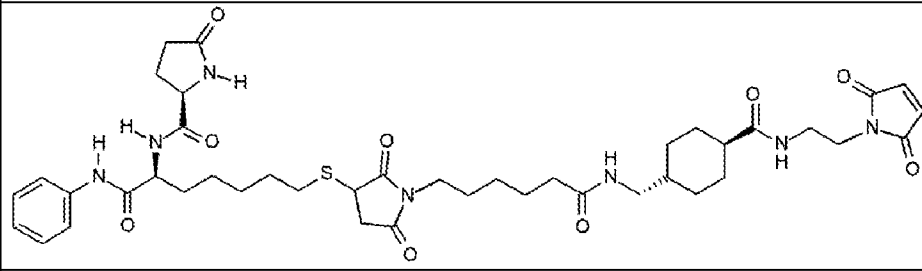
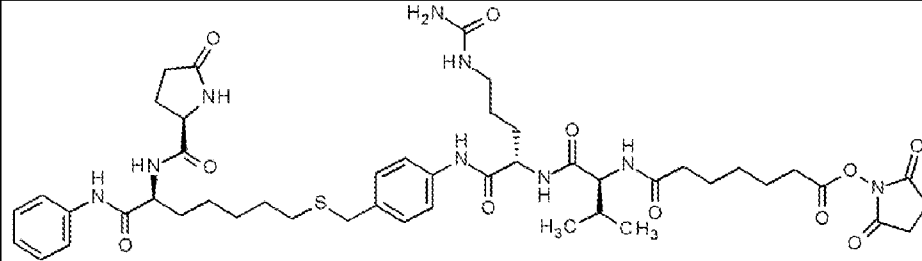
3. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 2, де лікарський інгібітор гістондеацетилази на основі тіолу ST7464AA1 має наступну формулу:

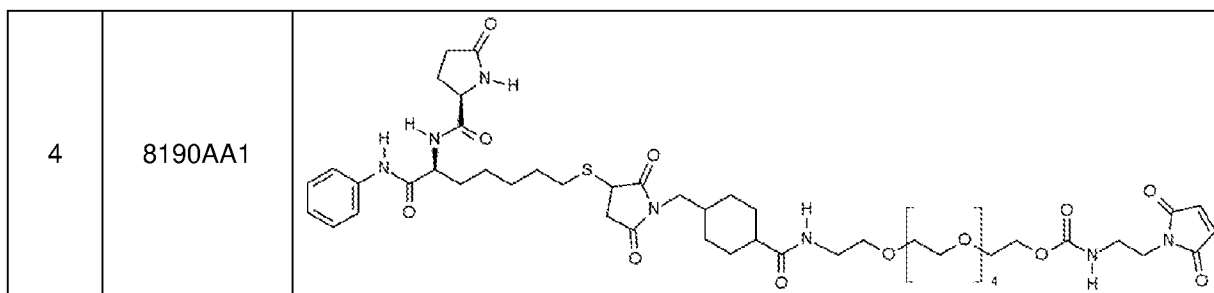


ST7464AA1

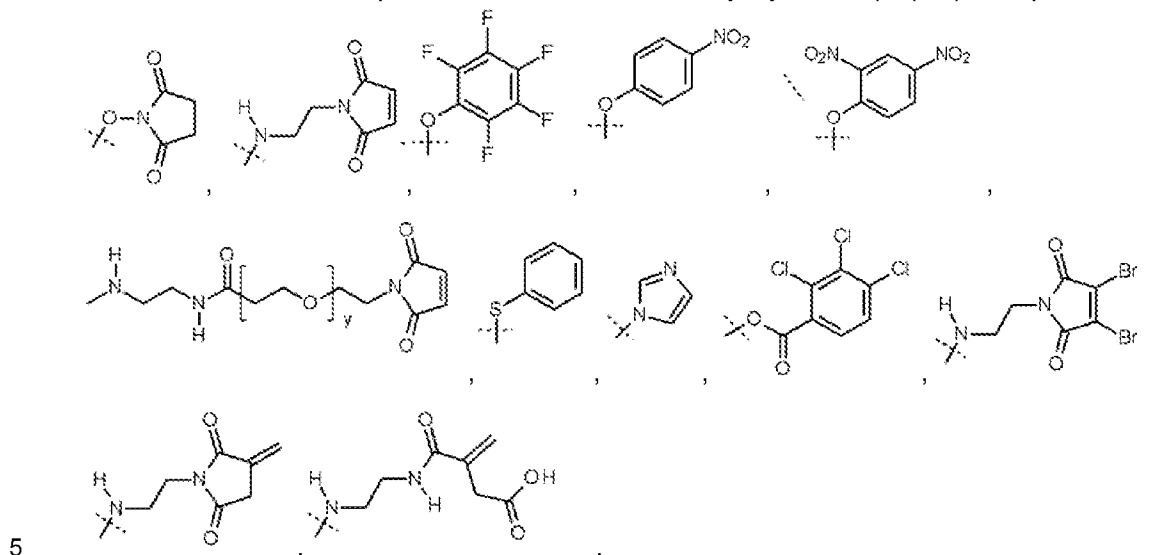
5

і корисним навантаженням є сполука, очевидна з наступної таблиці:

1	8128AA1	
2	8152AA1	
3	8132AA1	



4. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 2, де сполучну одиницю (CG) вибирають з:



5. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за одним з пп. 1-4, де антитіло спрямоване проти інгібітору гістондеацетилази або проти рецептора, поглиненого пухлинними клітинами з виділенням інгібітору гістондеацетилази, такого як рецептори c-met або інтегрину.

10 6. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за одним з пп. 1-5, де антитілом є антитіло білка сімейства анти-EGFR.

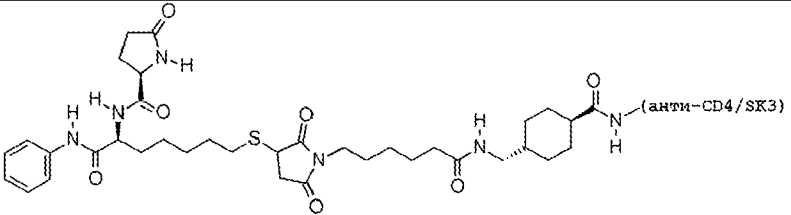
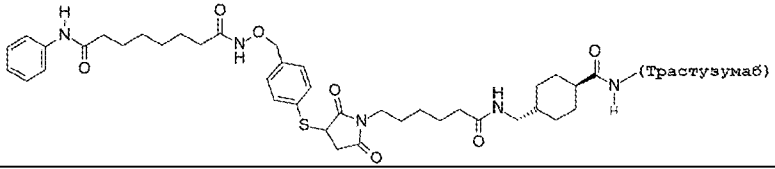
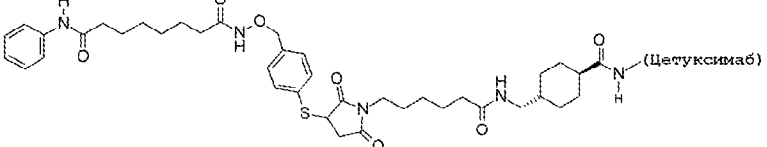
7. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за одним з пп. 1-6, де антитіло вибирають з Трастузумабу, Цетуксимабу, Бевацизумабу, Панітумумабу або споріднених біоподібних препаратів.

8. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 7, який має формулу, вибрану з

15

Ід. № код ST	Хімічна структура	МК	ВЛА
(24) 8154AA1		Lys	8,0 (±1)
(25) 8155AA1		Lys	6,1 (±1)

(26) 8177AA1		Cys	4,0 ($\pm 0,7$)
(27) 8178AA1		Lys	8,0 ($\pm 0,2$)
(28) 8176AA1		Cys	4,5 ($\pm 0,5$)
(29) 8179AA1		Lys	6,1 ($\pm 0,2$)
(30) 8205AA1		Lys	6,2 ($\pm 0,2$)
(31) 8202AA1		Lys	5,5 ($\pm 0,5$)
(32) 8193AA1		Lys	9,0 (± 2)
(33) 8194AA1		Lys	6,5 ($\pm 0,5$)
(34) 8212AA1		Lys	8,0 ($\pm 0,2$)

(35) 8213AA1		Lys	4,0 (±1)
(36) 8218AA1		Lys	5,0 (±0,5)
(37) 8219AA1		Lys	4,0 (±0,5)

9. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за одним з пп. 1-8 для застосування як лікарського засобу.

10. Фармацевтична композиція, яка містить ефективну кількість кон'югата антитіло-лікарський засіб за одним з пп. 1-8 і фармацевтично прийнятний ексципієнт.

5 11. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за одним з пп. 1-8 для застосування в лікуванні раку або пухлини, експресуючої рецептор, вибраний з ErbB1, ErbB2 або ErbB3.

12. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за одним з пп. 1-8 для застосування за п. 11, де рак вибирають з раку легені, черевної порожнини, молочної залози, товстої кишки, мозку, голови й шиї, ендометрія, шийки матки-ендометрія, нирок, підшлункової залози, шлунка, товстої кишки, апендикса, стравоходу й простати; або з лейкозу, псевдоміксом очеревини, раку підшлункової залози, метастазів у печінці й саркоми черевної порожнини некишкових тканин.

13. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за одним з пп. 1-8 для застосування як терапевтичного ад'юванту в лікуванні ВІЛ.

14. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за одним з пп. 1-12 в складі, придатному для місцевої доставки розпиленням.

15 15. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 14 для застосування в лікуванні раку легені, молочної залози, товстої кишки, мозку, голови й шиї, раку ендометрія, раку нирок, раку підшлункової залози, раку шлунка, раку стравоходу, раку яєчників і простати і лейкозу.

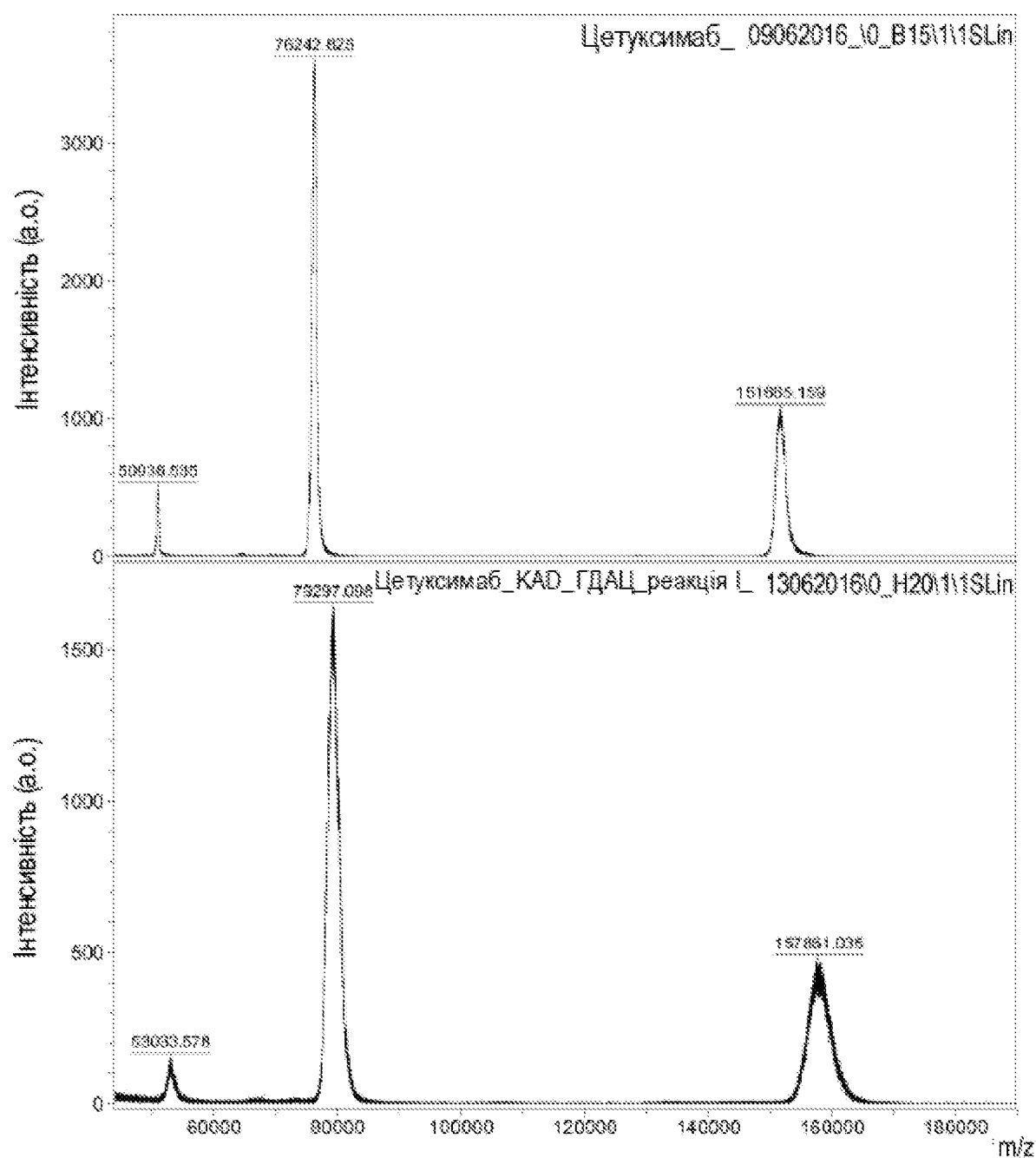
16. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування в лікуванні раку або пухлини, яка експресує рецептор, вибраний з ErbB1, ErbB2 або ErbB3.

17. Фармацевтична композиція для застосування за п. 16, де рак вибирають з раку легені, черевної порожнини, молочної залози, товстої кишки, мозку, голови й шиї, ендометрія, шийки матки-ендометрія, нирок, підшлункової залози, шлунка, товстої кишки, апендикса, стравоходу і простати; або з лейкозу, псевдоміксом очеревини, раку підшлункової залози, метастазів у печінці і саркоми черевної порожнини некишкових тканин.

18. Фармацевтична композиція за п. 10 для застосування як терапевтичного ад'юванту в лікуванні ВІЛ.

19. Фармацевтична композиція за п. 10 в складі, придатному для місцевої доставки розпиленням.

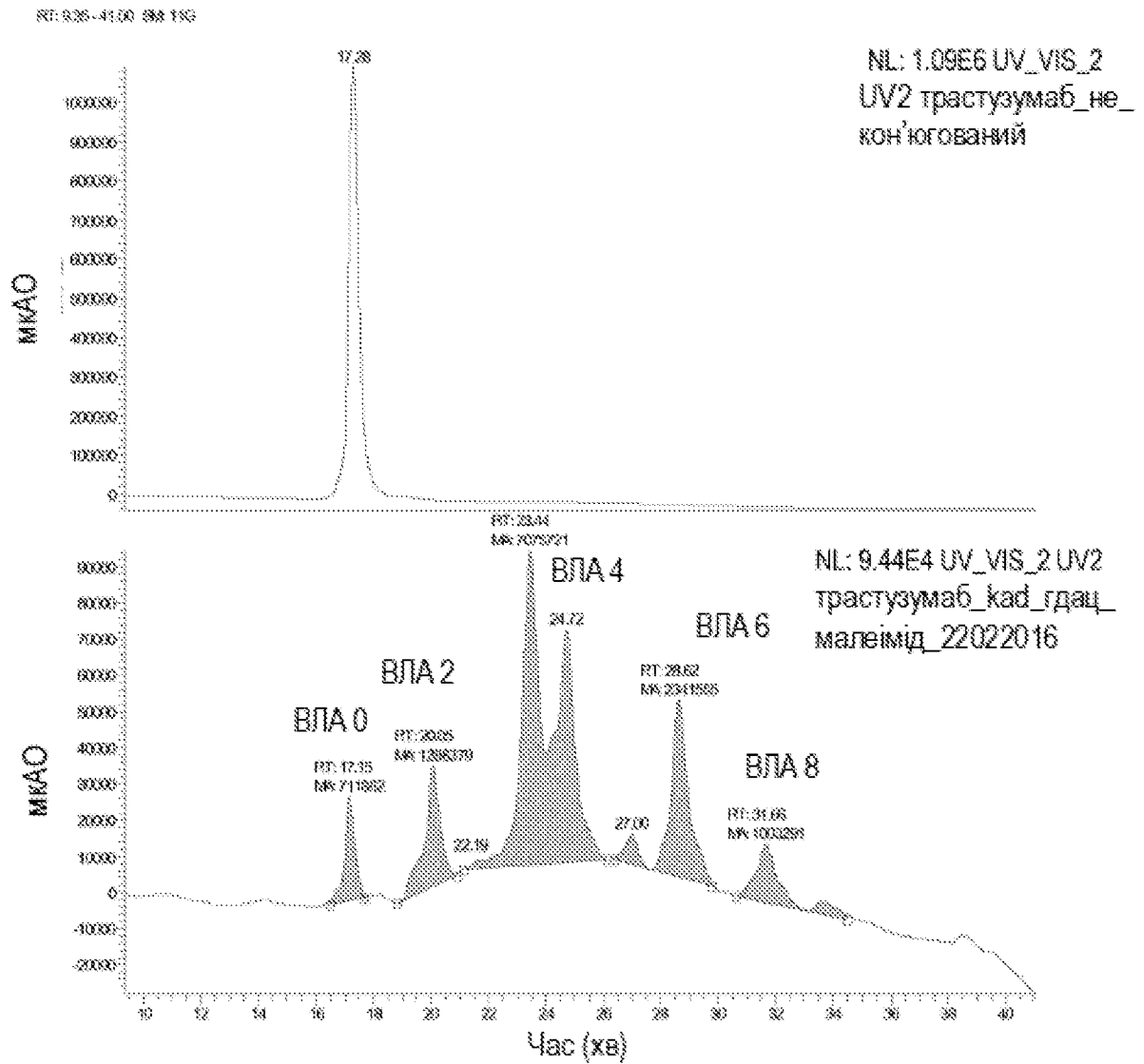
20. Фармацевтична композиція за п. 19 для застосування в лікуванні раку легені, молочної залози, товстої кишки, мозку, голови й шиї, раку ендометрія, раку нирок, раку підшлункової залози, раку шлунка, раку стравоходу, раку яєчників і простати і лейкозу.



Фіг. 1

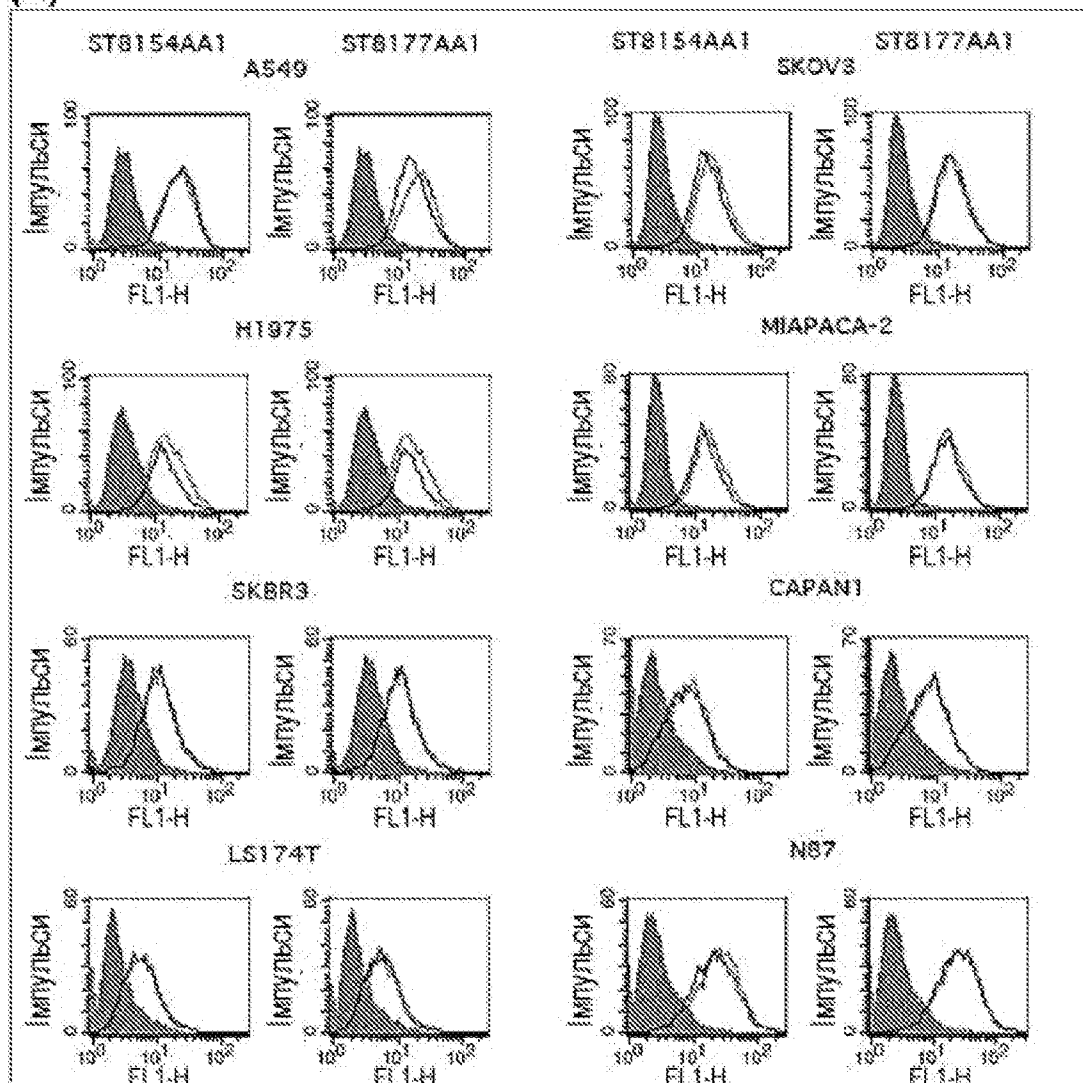
трастузумаб_kad_гдац_малеїмід_22022016

2/22/2016 12:35:28 PM



Фіг. 2

(A)



(B)

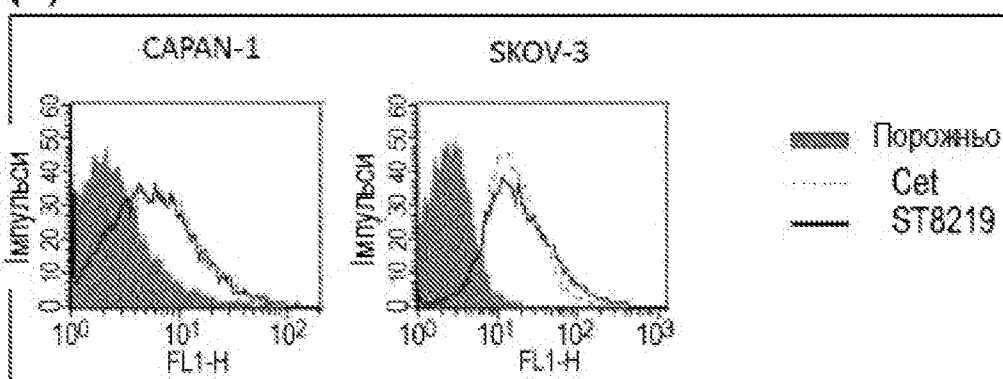
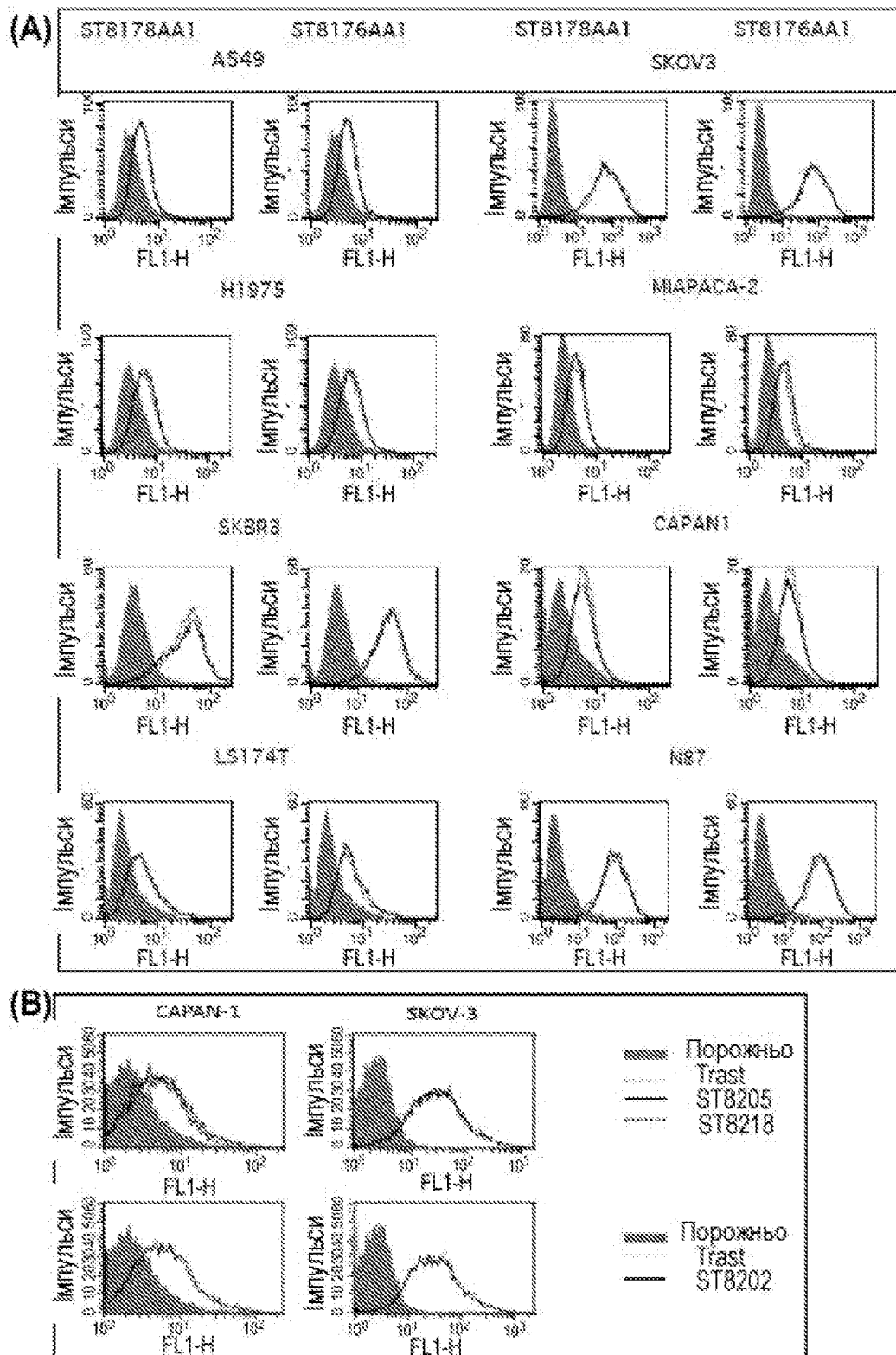
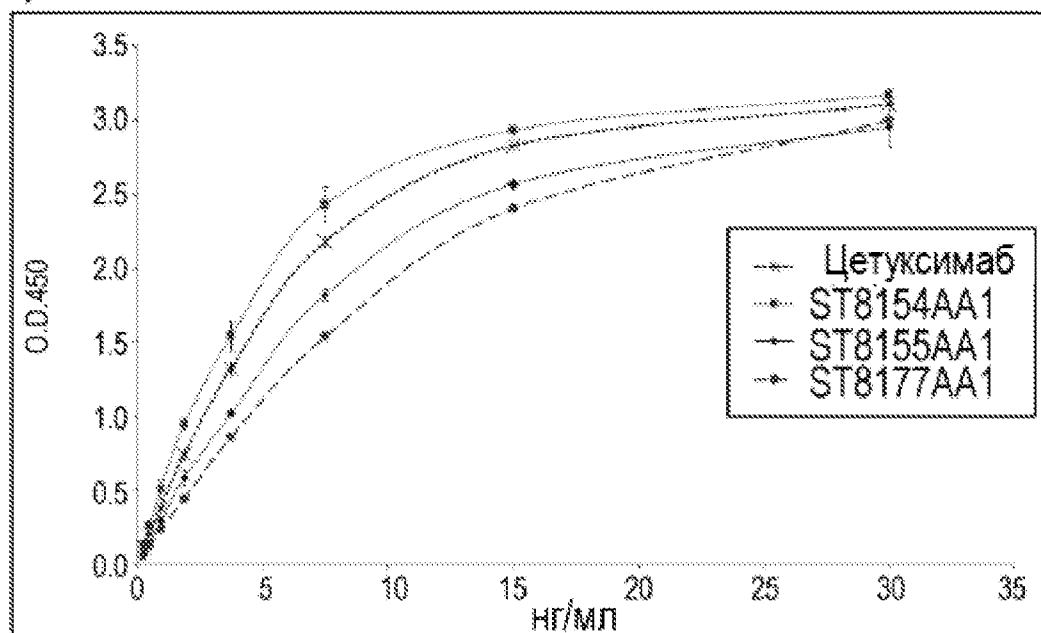


Fig. 3



Фіг. 4

(A)



(B)

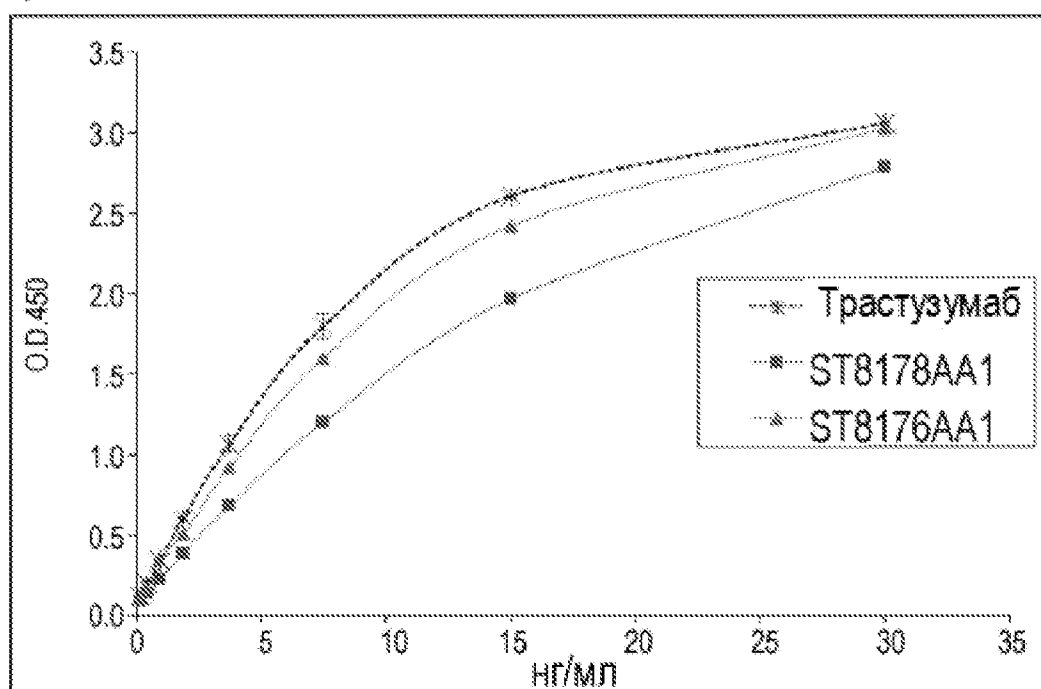
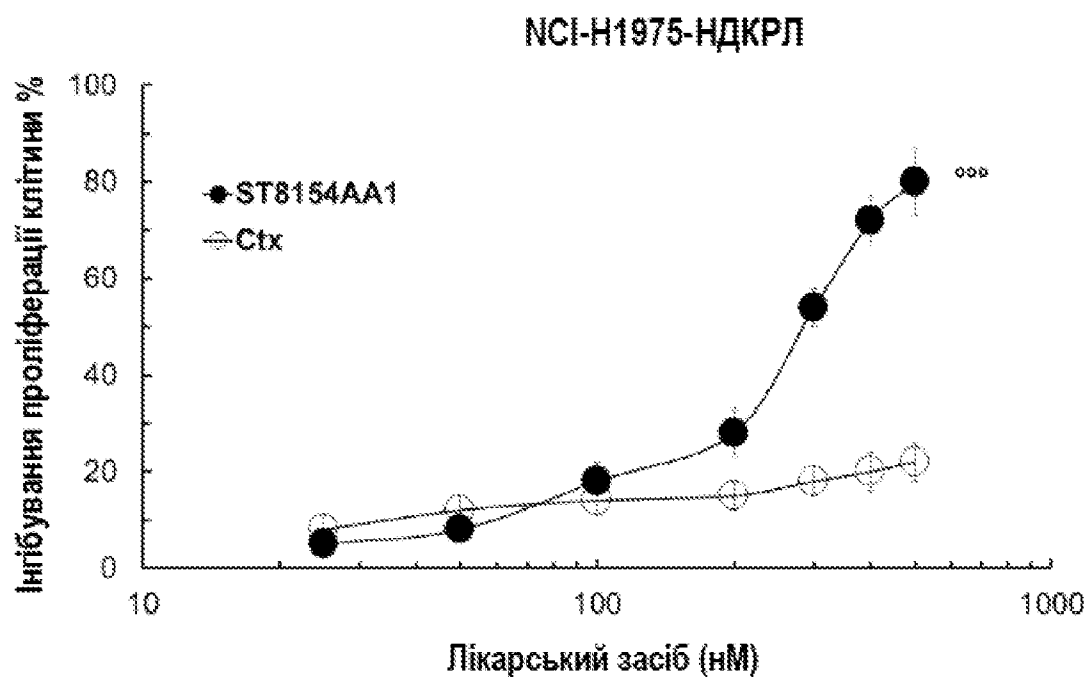
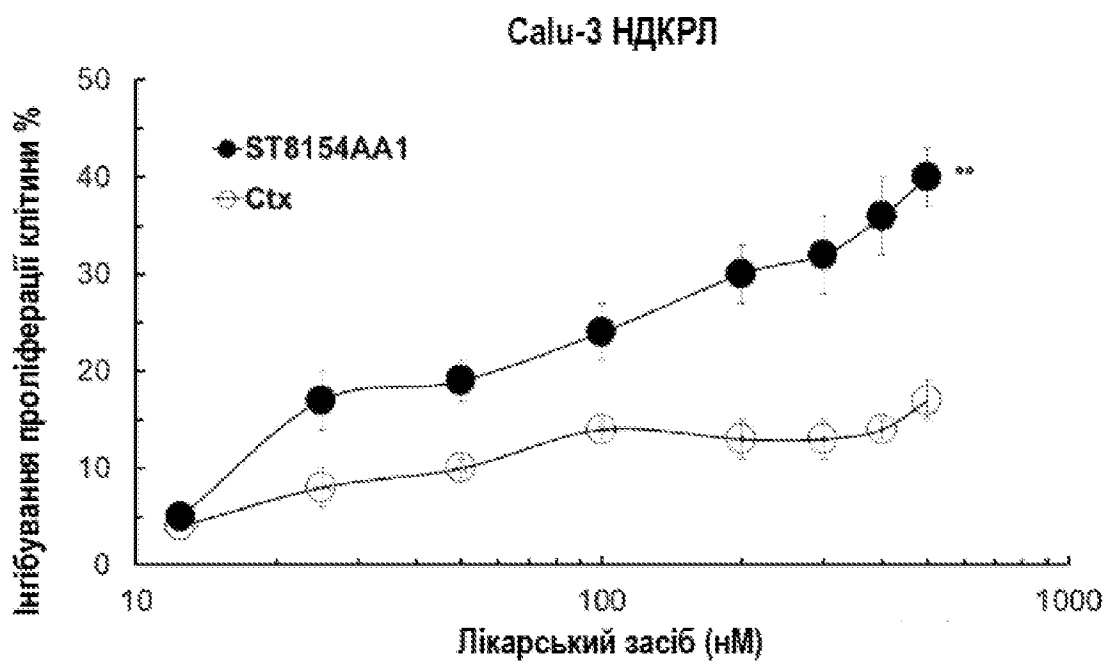


Fig. 5



Фіг. 6



Фіг. 7

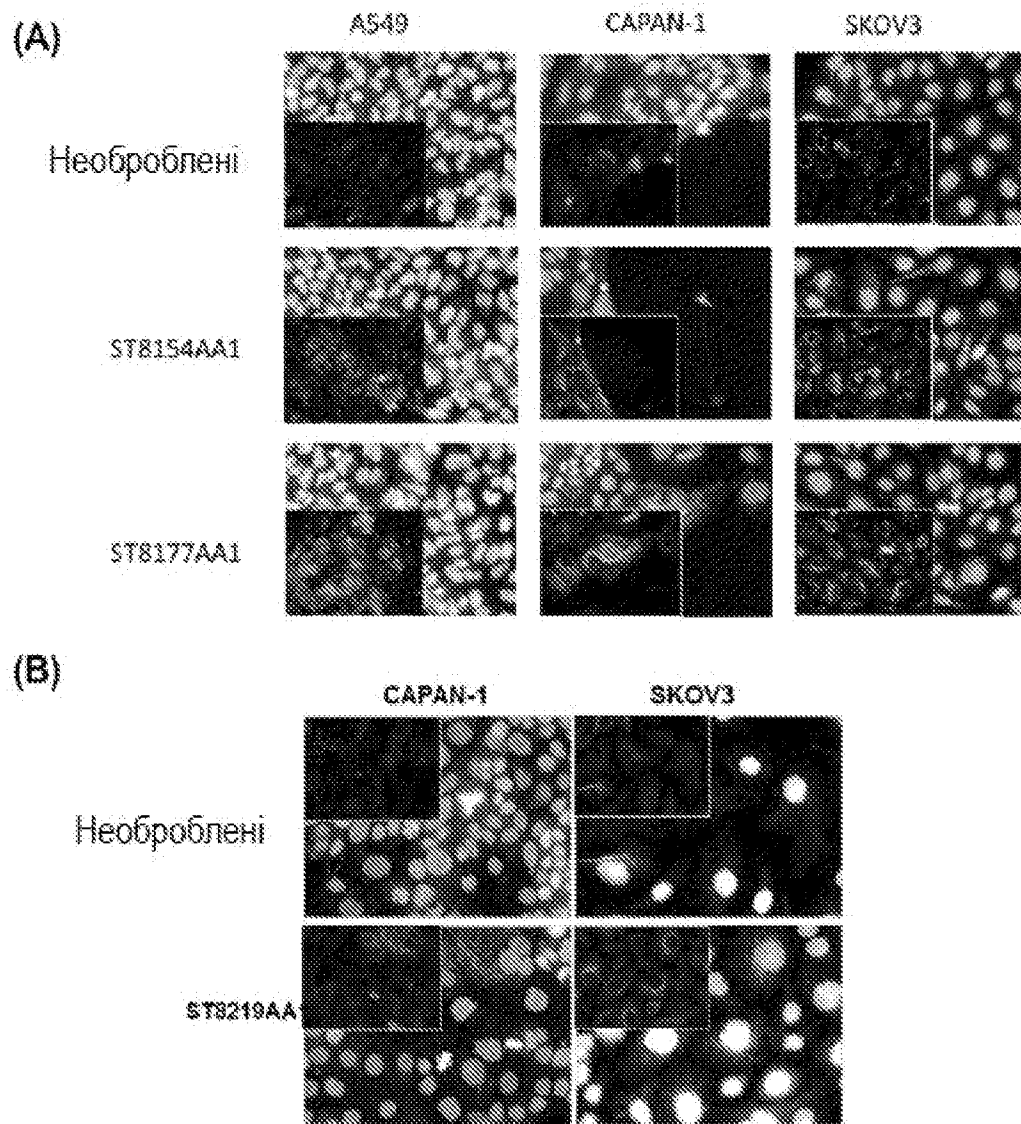


Fig. 8

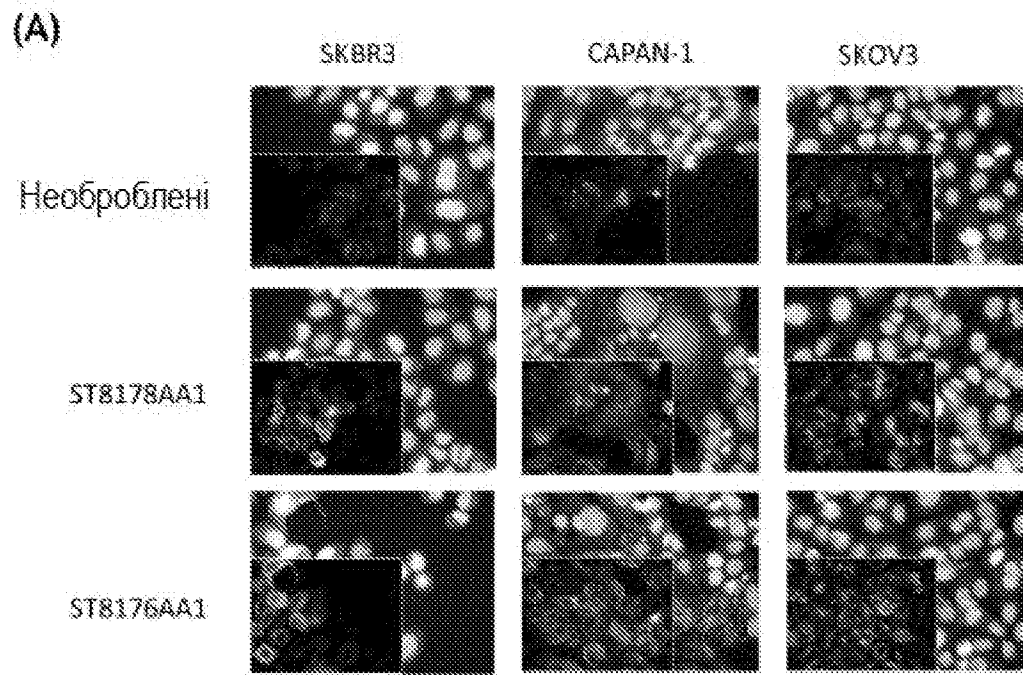
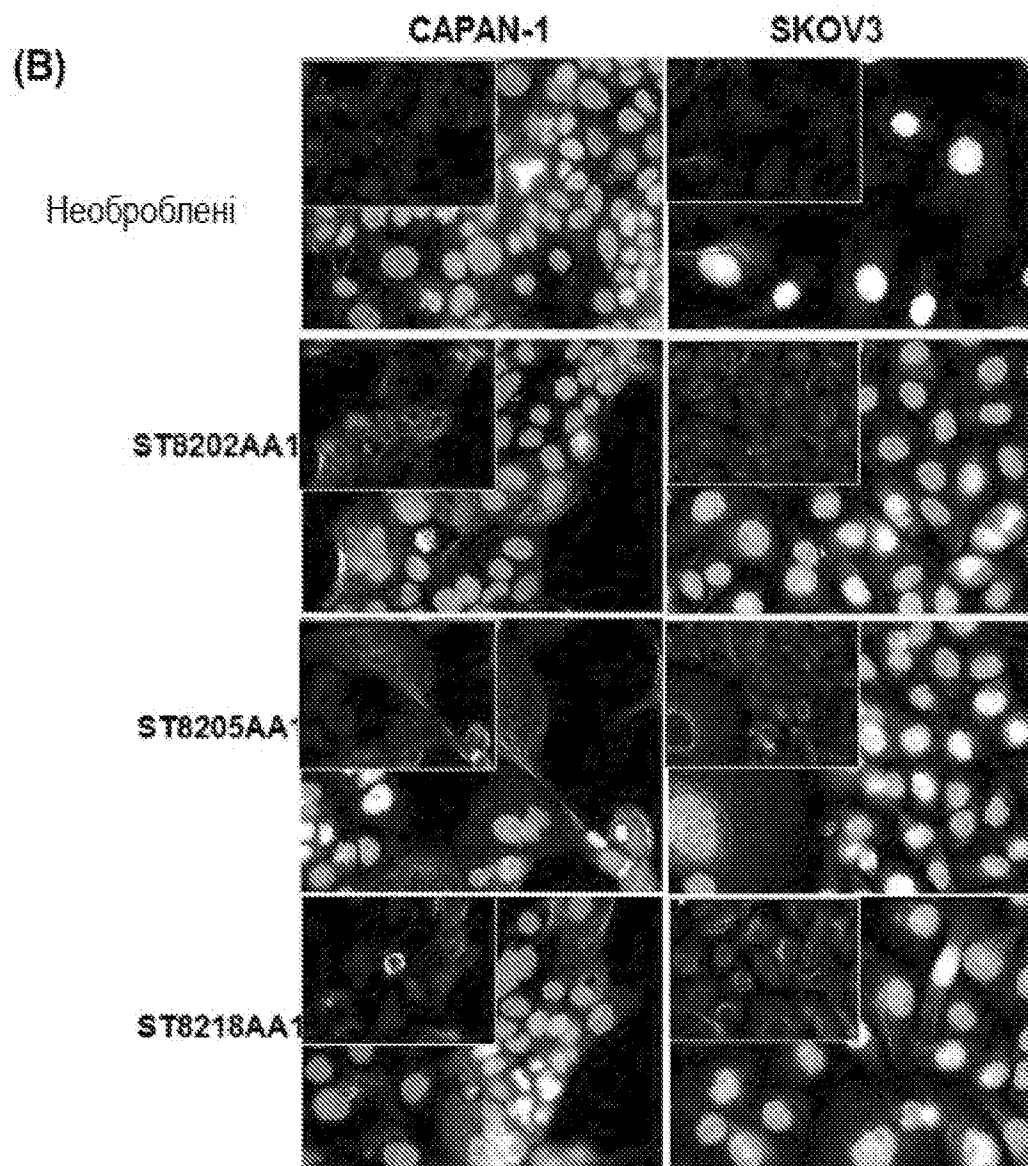
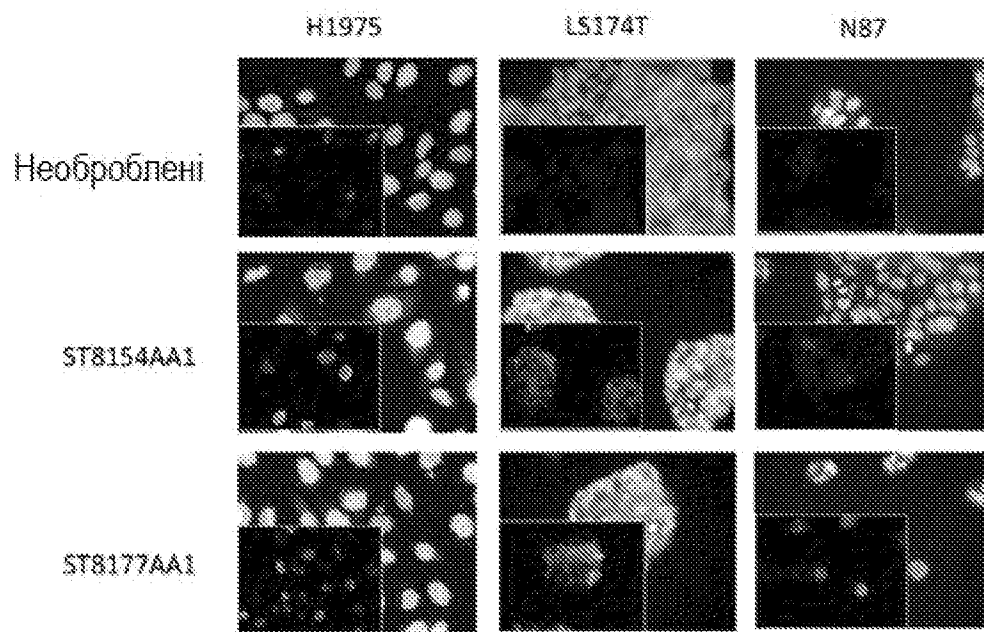


Fig. 9A



Фіг. 9B

(A)



(B)

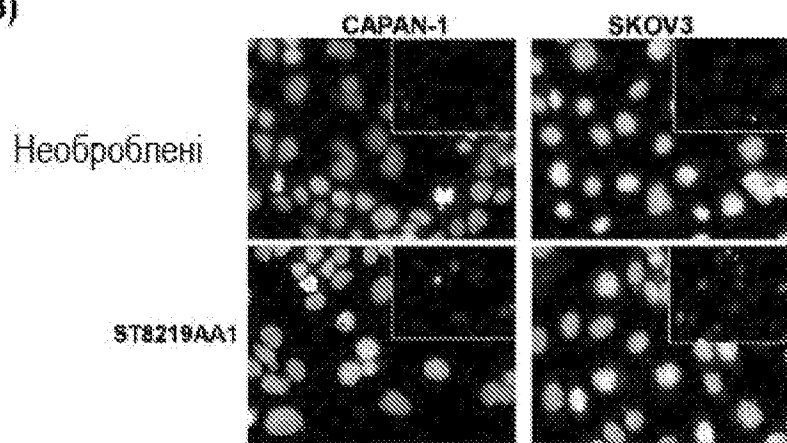


Fig. 10

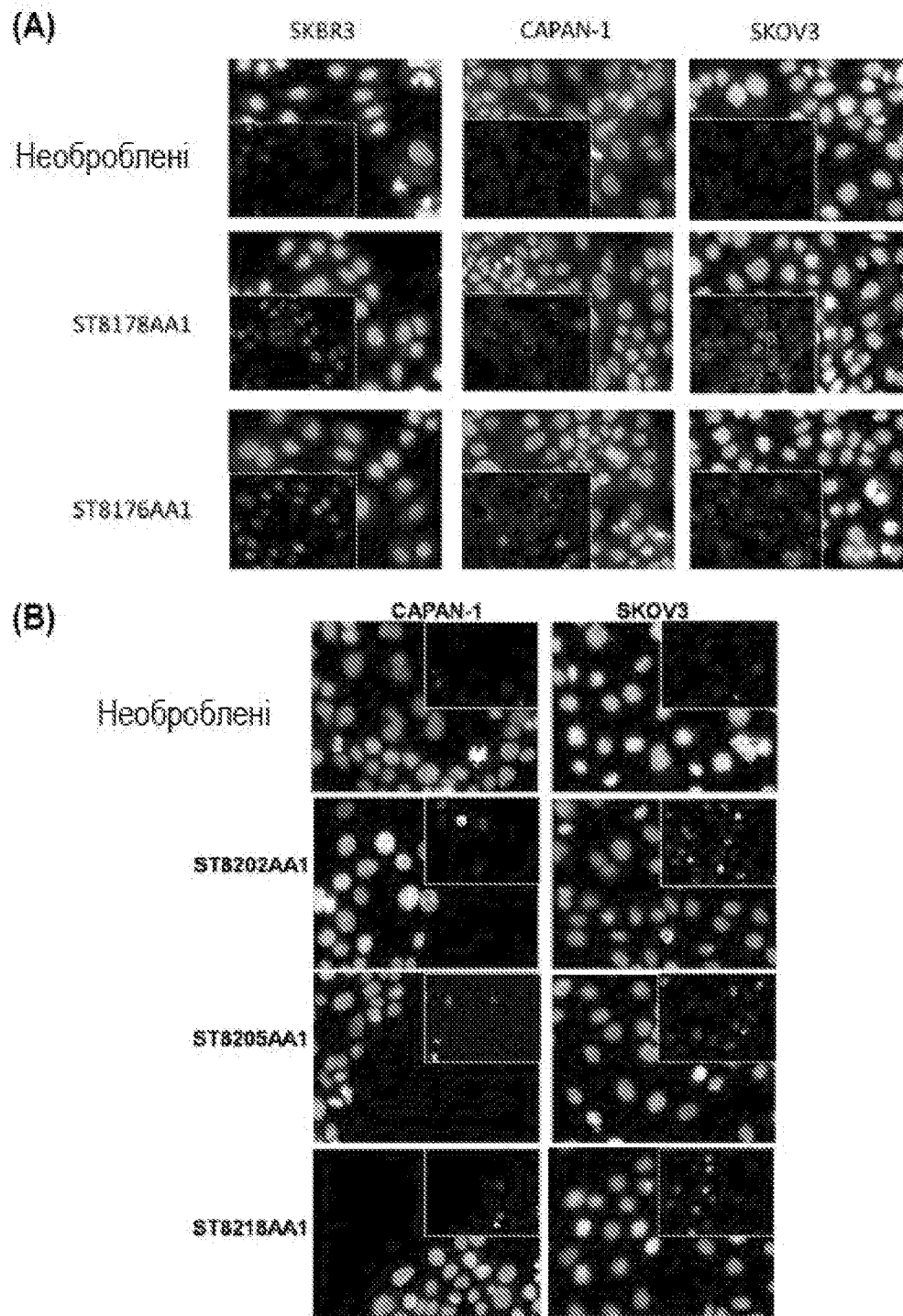
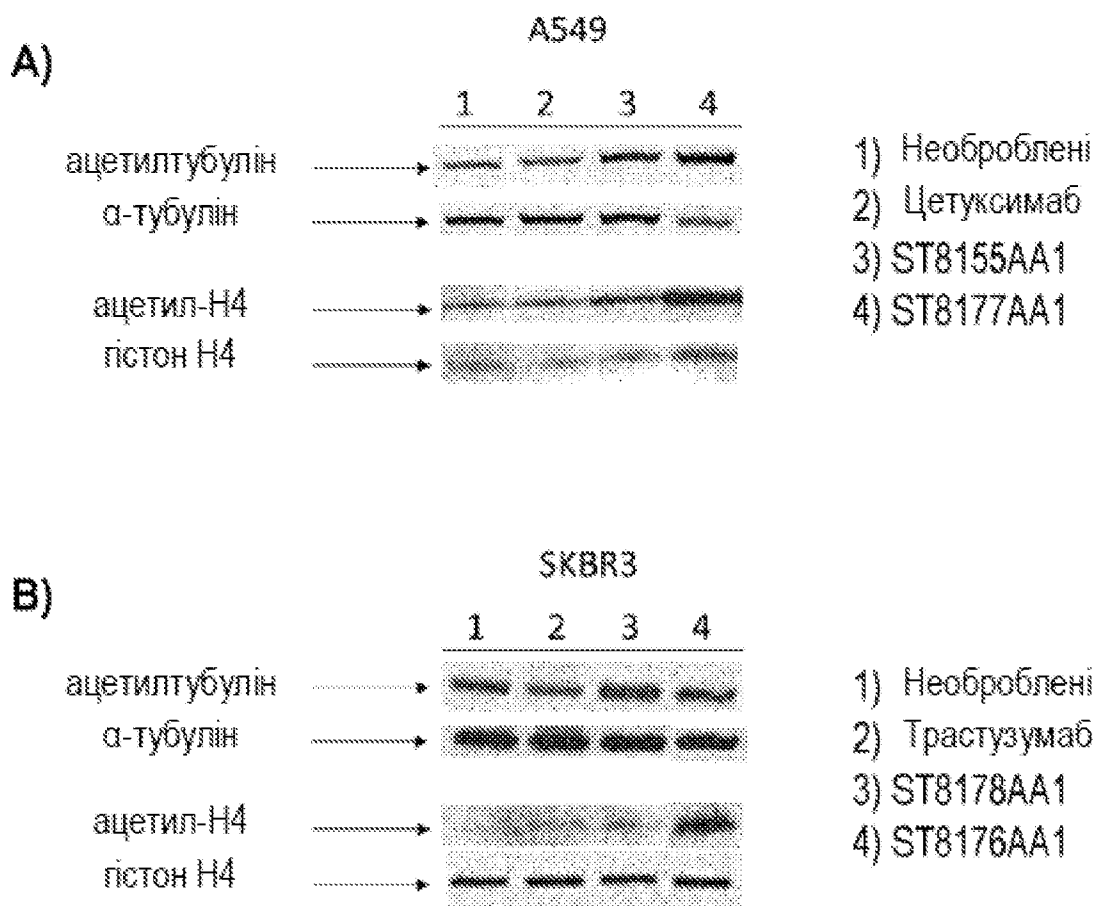
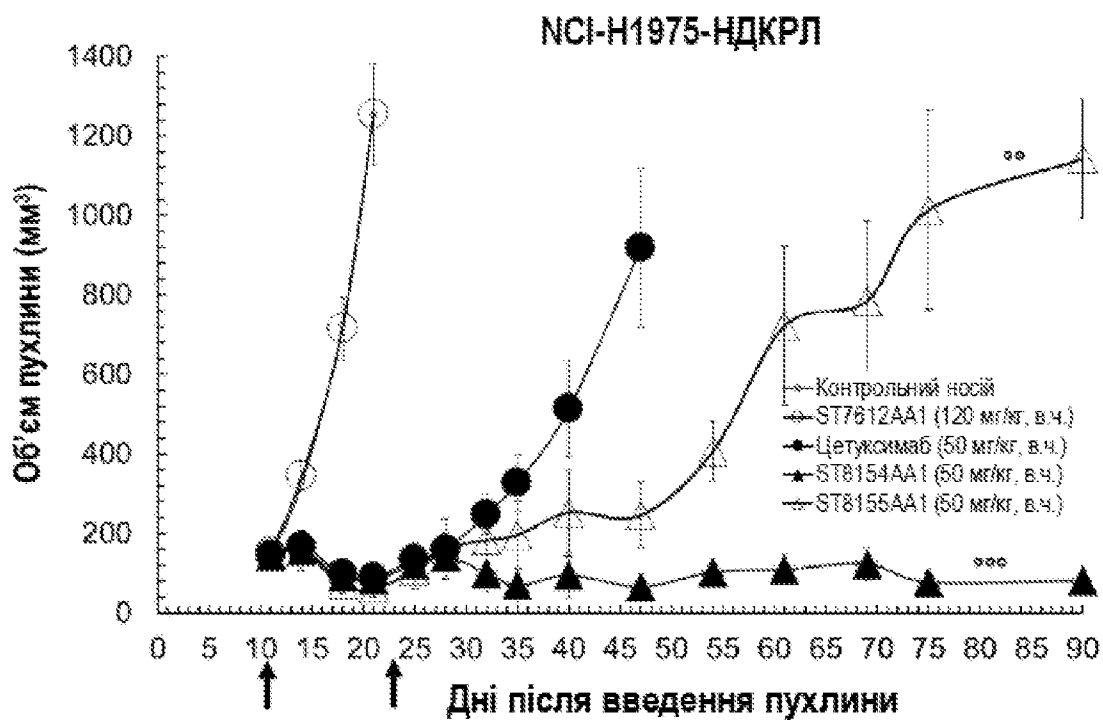


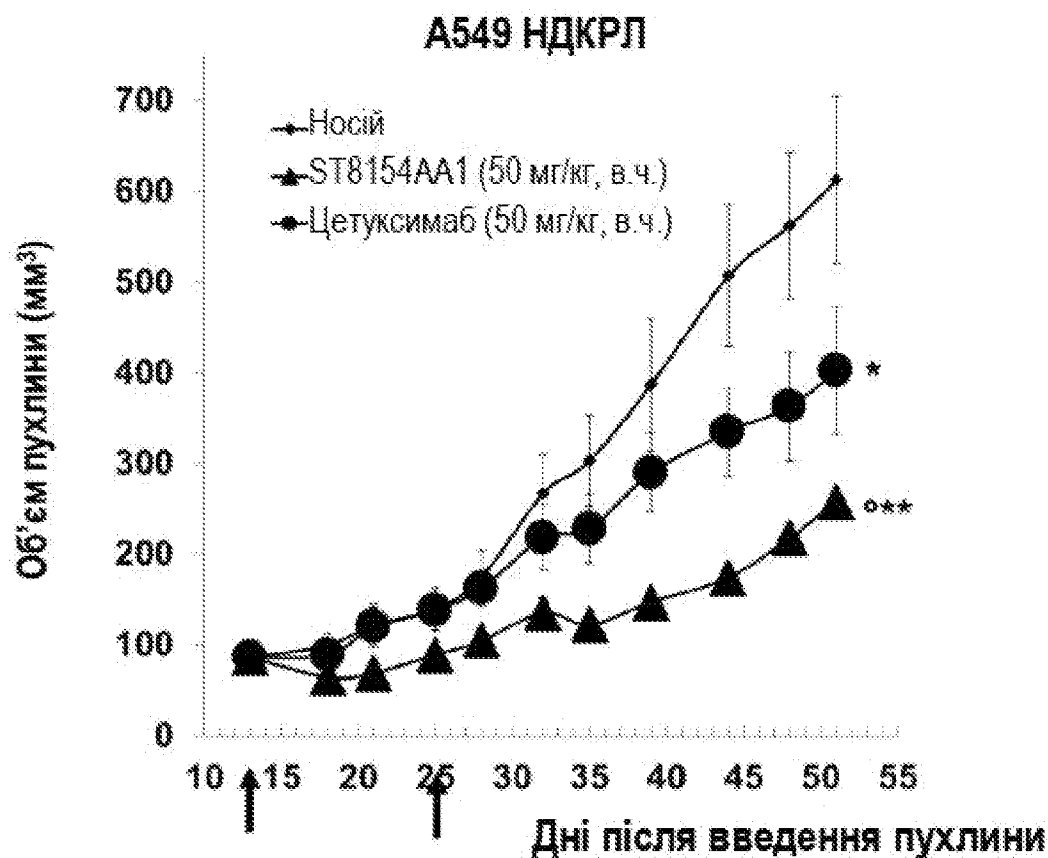
Fig. 11



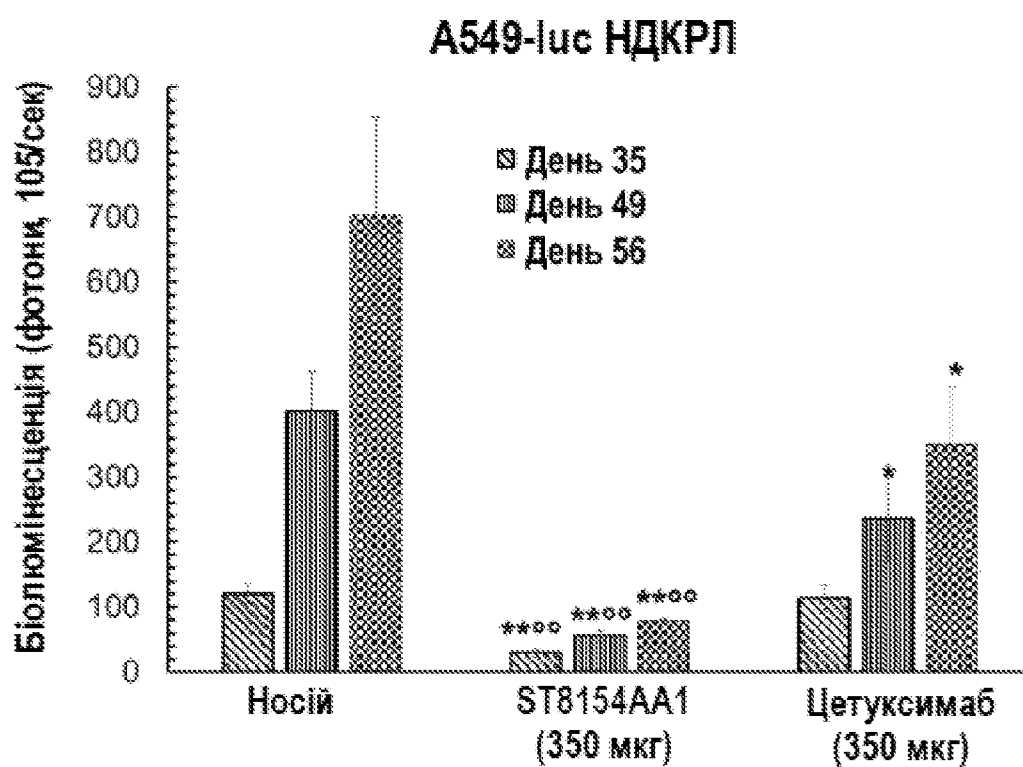
Фіг. 12



Фіг. 13

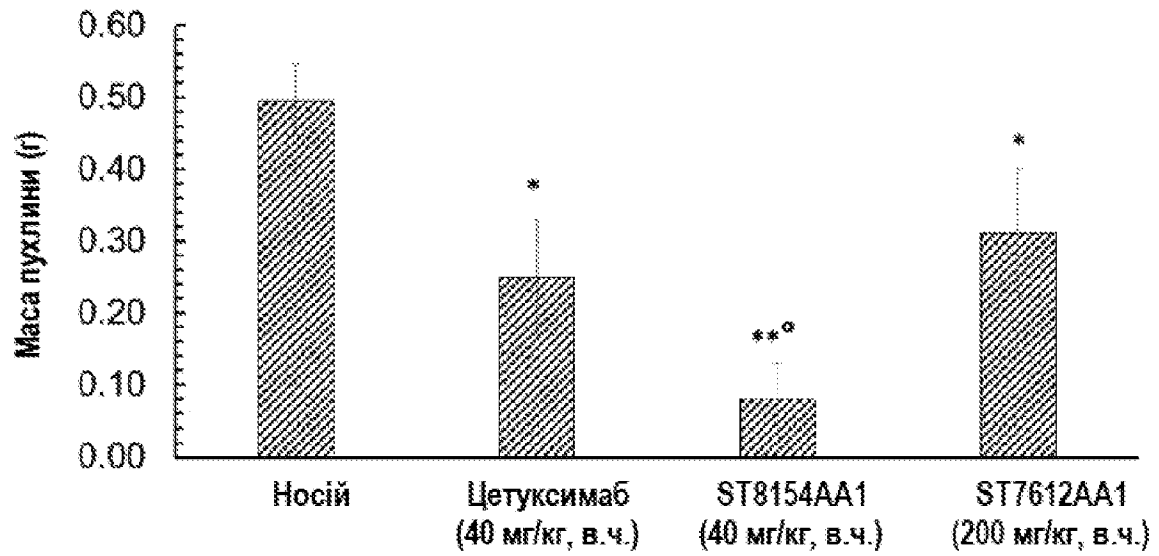


Фіг. 14



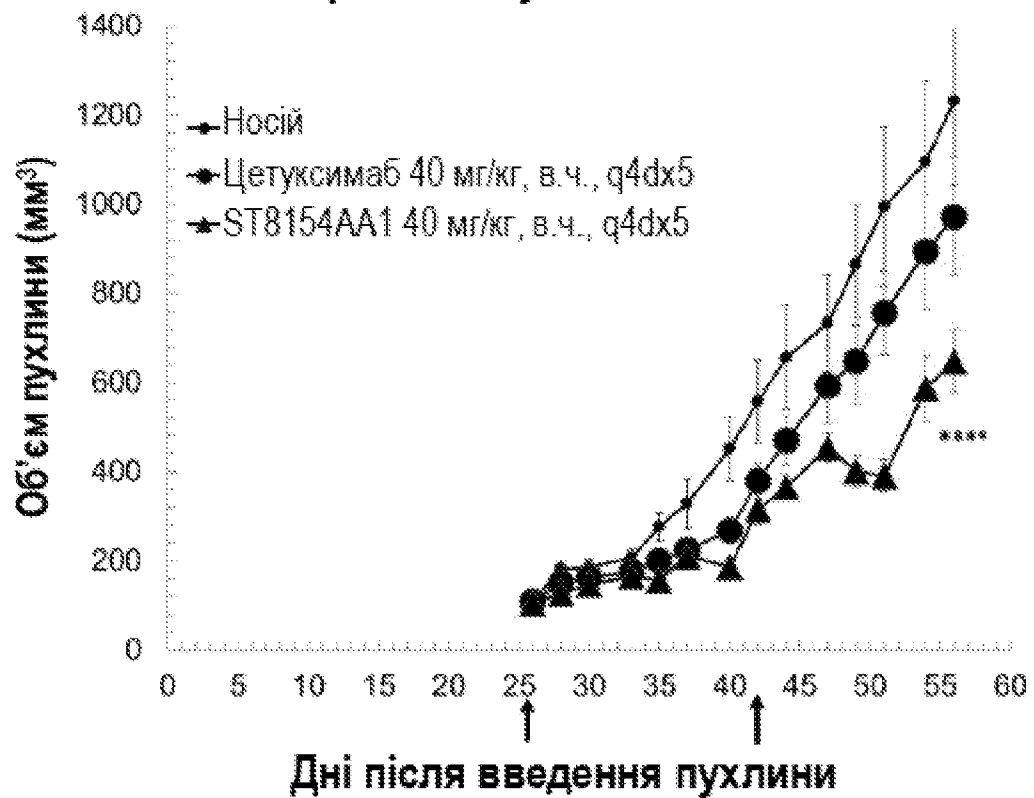
Фіг. 15

CAPAN-1 ортотопічний рак підшлункової залози

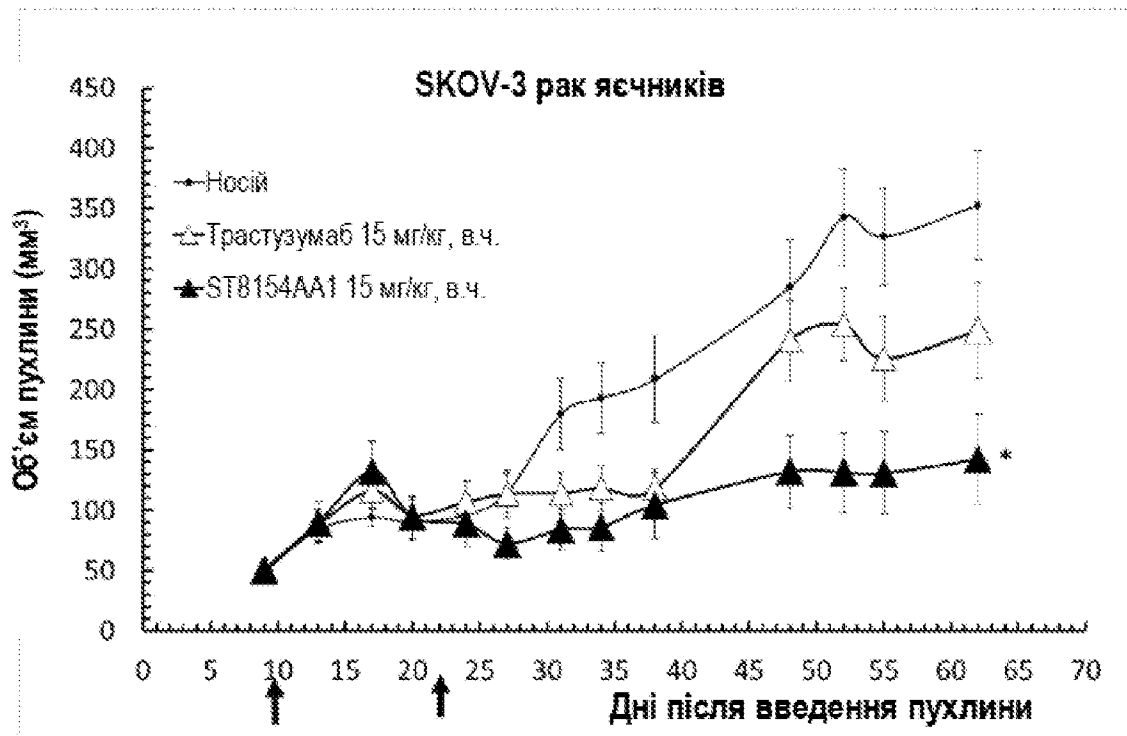


Фіг. 16

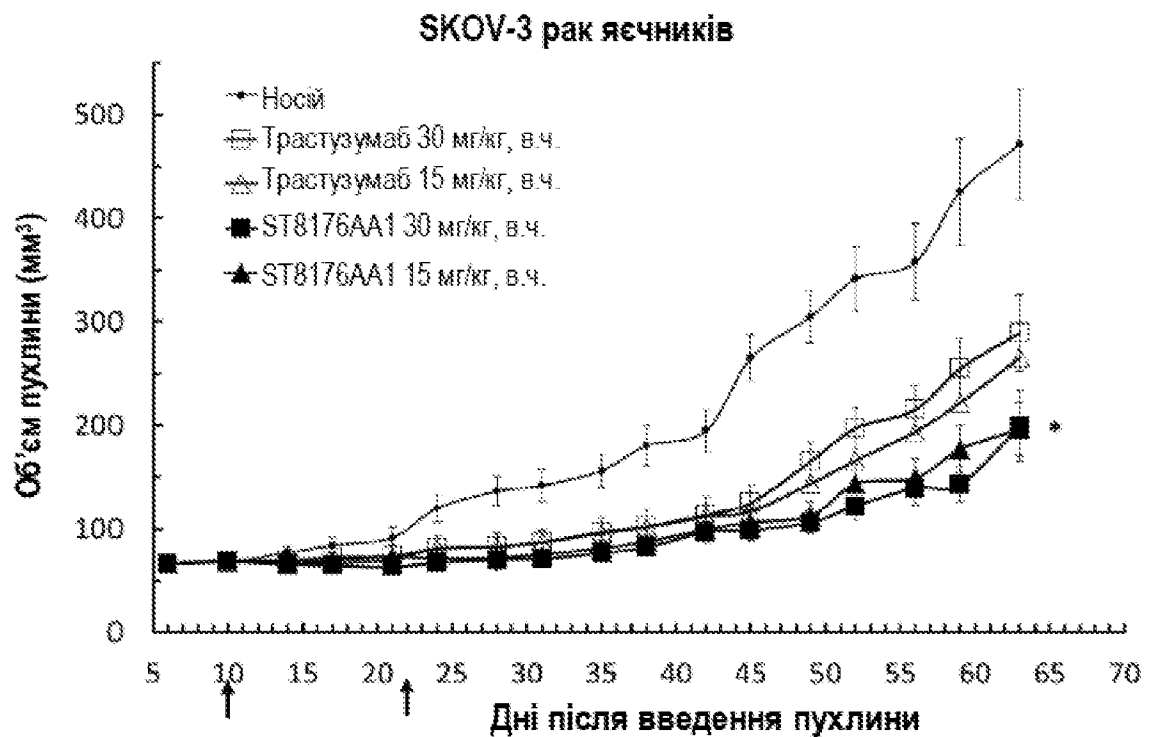
PDX рак підшлункової залози PA5363



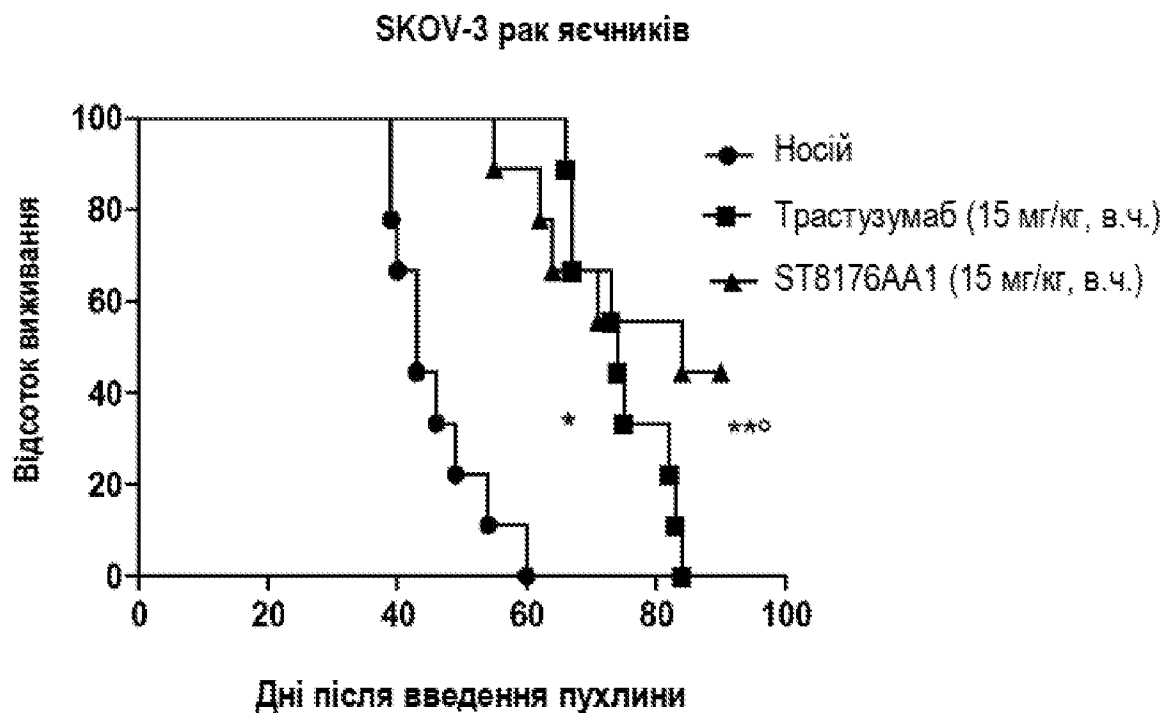
Фіг. 17



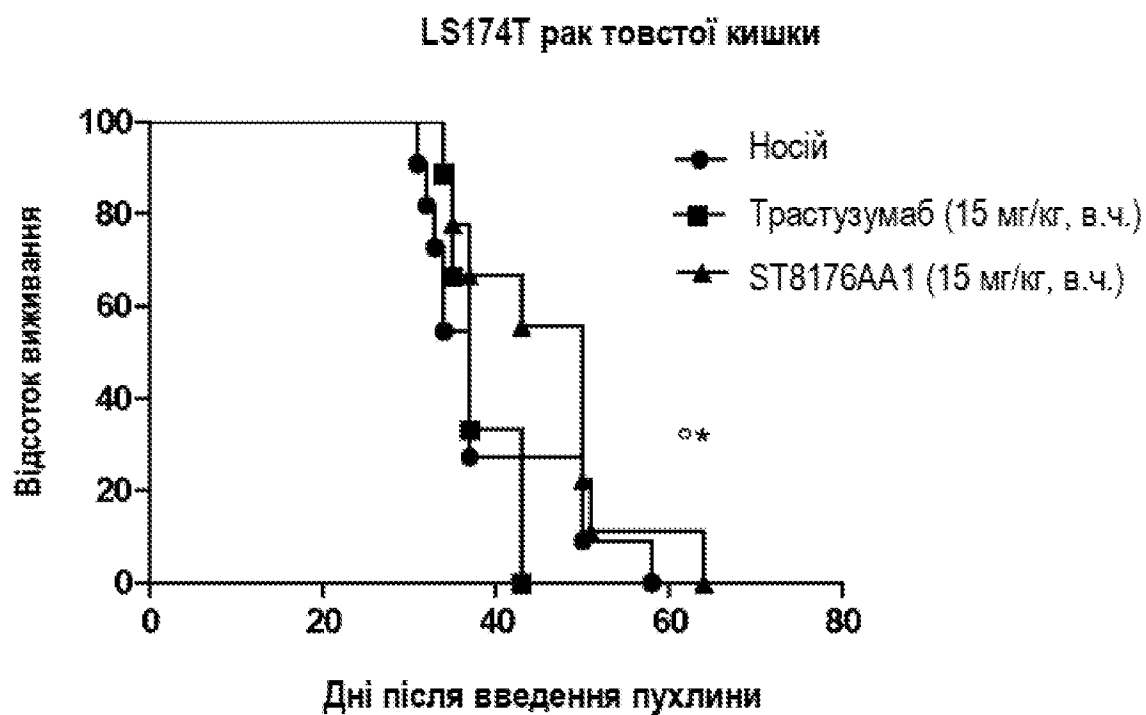
Фіг. 18



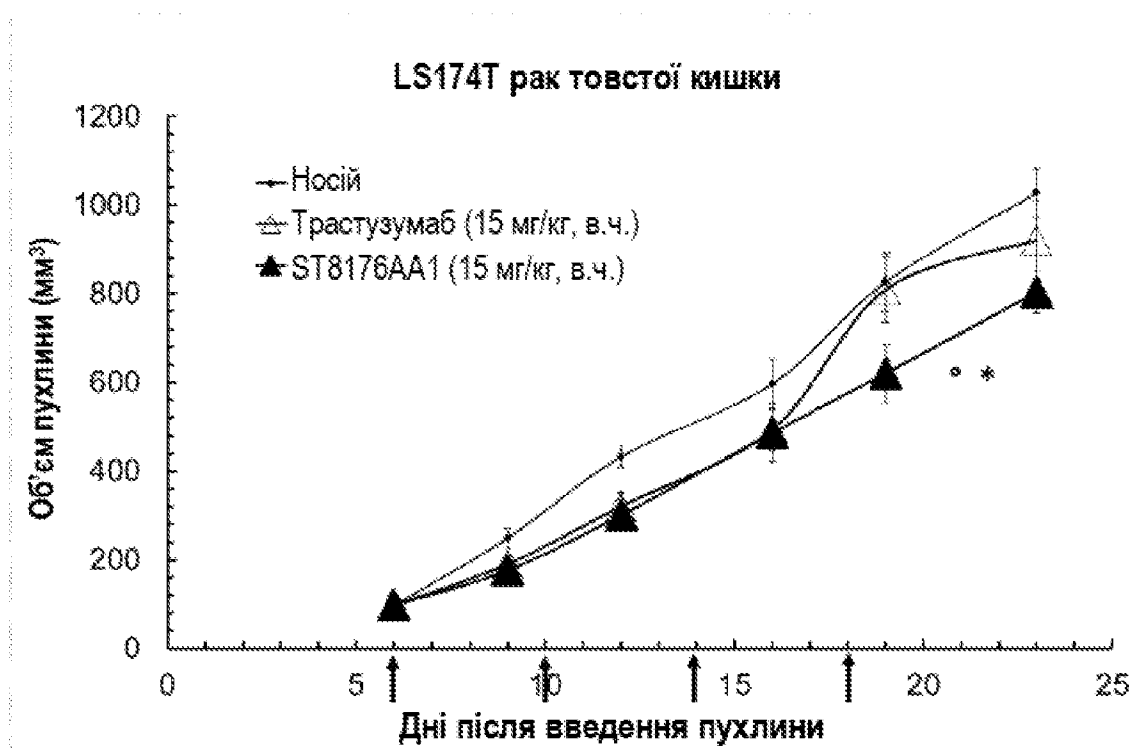
Фіг. 19



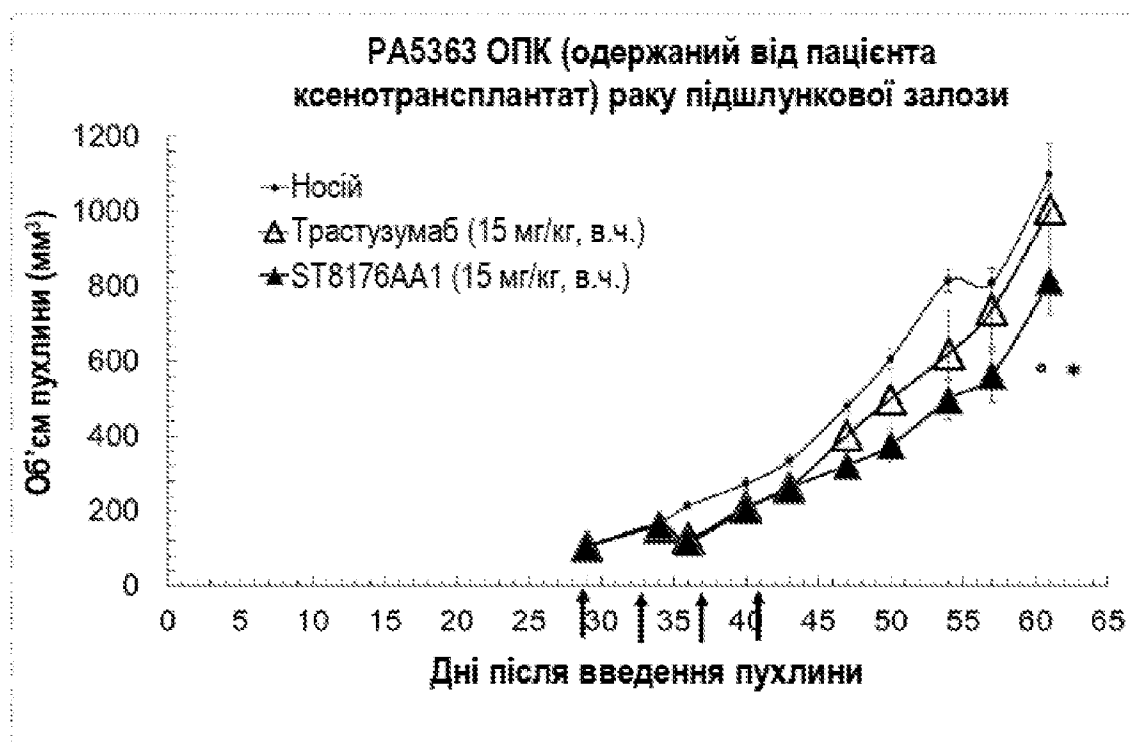
Фіг. 20



Фіг. 21



Фіг. 22



Фіг. 23