



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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.10.30**

**(21)** Номер заявки  
**202091672**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.01.08**

**(51)** Int. Cl. **A61K 47/68** (2017.01)  
**C07J 71/00** (2006.01)

**(54) СТЕРОИДЫ И ИХ АНТИТЕЛО-КОНЬЮГАТЫ**

**(31)** **62/614,905**

**(32)** **2018.01.08**

**(33)** **US**

**(43)** **2021.02.01**

**(86)** **PCT/US2019/012786**

**(87)** **WO 2019/136487 2019.07.11**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Хан Эми (US)**

**(74)** Представитель:  
**Безрукова О.М. (RU)**

**(56)** **WO-A2-2018089373**  
**WO-A1-2018213077**

JEFFREY C. KERN ET AL.: "Discovery of Pyrophosphate Diesters as Tunable, Soluble, and Bioorthogonal Linkers for Site-Specific Antibody-Drug Conjugates", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 138, no. 4, 25 January 2016 (2016-01-25), pages 1430-1445, XP055577573, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/jacs.5b12547, abstract, page 1433, page 1435, figures, table 1

**EP-A1-2407476**

**WO-A1-9415947**

JEFFREY C KERN ET AL.: "Novel Phosphate Modified Cathepsin B Linkers: Improving Aqueous Solubility and Enhancing Payload Scope of ADCs", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 27, no. 9, 28 July 2016 (2016-07-28), pages 2081-2088, XP055557206, ISSN: 1043-1802, DOI:10.1021/acs.bioconjchem.6b00337, abstract

**WO-A2-2017132103**

**WO-A1-2017210471**

**WO-A1-2009002993**

PIA SVENDSEN ET AL.: "Antibody-Directed Glucocorticoid Targeting to CD163 in M2-type Macrophages Attenuates Fructose-Induced Liver Inflammatory Changes", MOLECULAR THERAPY - METHODS & CLINICAL DEVELOP, vol. 4, March 2017 (2017-03), pages 50-61, XP055578466, ISSN: 2329-0501, DOI:10.1016/j.omtm.2016.11.004, abstract, page 51 - page 54

JONAS H GRAVERSEN ET AL.: "Targeting the Hemoglobin Scavenger receptor CD163 in Macrophages Highly Increases the Anti-inflammatory Potency of Dexamethasone", MOLECULAR THERAPY, vol. 20, no. 8, August 2012 (2012-08), pages 1550-1558, XP055567958, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2012.103, abstract, page 1551; figure 1

**GB-A-1292269**

**WO-A1-9741144**

**CN-A-101397328**

**DE-B-1165595**

**GB-A-889766**

**WO-A1-2010132743**

AHERNE G W ET AL.: "A sensitive radioimmunoassay for budesonide in plasma", JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY, vol. 17, no. 5, November 1982 (1982-11), pages 559-565, XP023414072, ISSN: 0022-4731, DOI:10.1016/0022-4731(82)90016-4 [retrieved on 1982-11-01], abstract, figure 1, page 560, right-hand column - page 561, left-hand column; tables

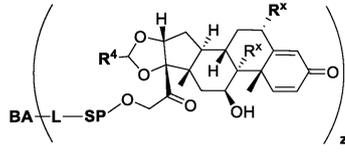
KRONKVIST K ET AL.: "DETERMINATION OF DRUGS IN BIOSAMPLES AT PICOMOLAR CONCENTRATIONS USING COMPETITIVE ELISA WITH ELECTROCHEMICAL DETECTION: APPLICATION TO STEROIDS", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, vol. 11, no. 6, 1993, pages 459-463, XP000972921, ISSN: 0731-7085, DOI:10.1016/0731-7085(93)80158-W, abstract, page 460, right-hand column, page 461; figure 1

**US-A1-2016279054**

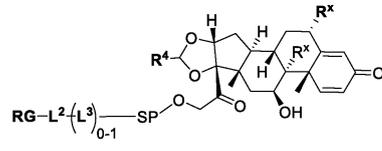
**WO-A1-9422898**

**(57)** В изобретении описаны белковые стероидные конъюгаты, которые являются полезными, например, для направленной доставки глюкокортикоидов (ГК) к клеткам, представленные формулами:

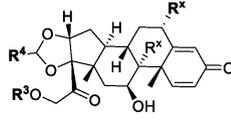
045111 B1



(III);



(II);



(I).

045111 B1

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Для заявки на настоящий патент испрашивается приоритет относительно предварительной патентной заявки США № 62/614,905, с названием "Стероиды и их антитело-конъюгаты", которая была подана 8 января 2018 г. Содержание этой предварительной патентной заявки включается в настоящий документ полностью посредством ссылки для любых целей.

### Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был предоставлен в формате ASCII посредством EFS-Web и включается в настоящий документ полностью посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 3 января 2019 года, названа 114581\_00228\_ST25.txt и имеет размер 11186 байт.

### Область

В настоящем документе представлены стероиды, их белковые конъюгаты (например, антитело-конъюгаты), а также способы лечения заболеваний, нарушений и состояний, включающие введение стероидов и конъюгатов.

### Известный уровень техники

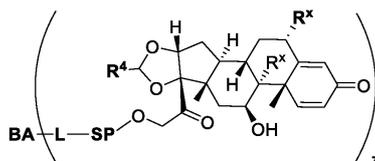
Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) представляет собой антитела, которые ковалентно связаны с биологически активными низкомолекулярными лекарственными средствами, объединяя таким образом направленную специфичность антител с механизмом действия и активностью низкомолекулярных лекарственных средств. Терапевтическая полезность ADC была подтверждена в лечении рака и в настоящее время является важным объектом исследований. ADCETRIS® (брентуксимаб ведотин) и KADCYLA® (адо-трастузумаб эмтанзин) представляет собой два ADC, разрешенные для лечения определенных типов рака, и в настоящее время несколько других ADC проходят клинические испытания.

Глюкокортикоиды (ГК) представляет собой низкомолекулярные стероиды, которые связываются с глюкокортикоидными рецепторами (ГР) и применяются в противовоспалительной и иммуносуппресивной терапии. Тем не менее, ввиду повсеместной экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в клетках многих типов недостатком глюкокортикоидной терапии является токсичность для большинства систем органов. Таким образом, существует необходимость в новых глюкокортикоидах и новых видах терапии, которые уменьшают побочные эффекты, связанные с введением глюкокортикоидов, особенно тех, которые связаны с активацией глюкокортикоидных рецепторов в нецелевых клетках. В настоящем описании изобретения приводятся решения для упомянутых выше задач, а также других невыполненных задач в области техники, к которой относится данное изобретение. В настоящее описание изобретения включаются конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие глюкокортикоидные нагрузки.

### Краткое изложение сущности изобретения

Здесь представлены соединения и способы, полезные для лечения различных заболеваний, нарушений или состояний.

Первый аспект направлен на соединение формулы (III)



(III);

или его фармацевтически приемлемая соль или стереоизомер, где:

R<sup>4</sup> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил;

оба R<sup>x</sup> представляют собой водород или оба R<sup>x</sup> представляют собой фтор; и

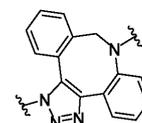
SP представляет собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-NR<sup>50</sup>C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-NR<sup>50a</sup>-, где терминальный NR<sup>50a</sup> присоединяется к L;

R<sup>50</sup> и R<sup>50a</sup> представляют собой независимо водород или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил;

z представляет собой целое число, выбранное от 1 до 30 включительно;

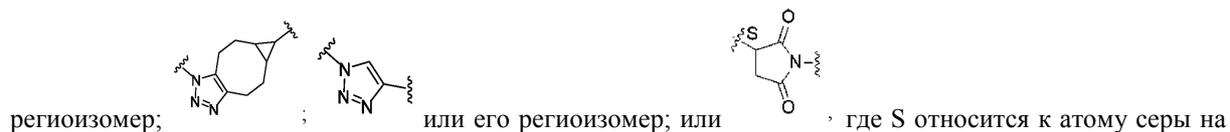
L представляет собой линкер формулы -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-(L<sup>3</sup>)<sub>0-1</sub>-;

где L<sup>1</sup> присоединен к BA и L<sup>3</sup> присоединен к SP;



L<sup>1</sup> представляет собой остаток реакционноспособной группы, выбранный из

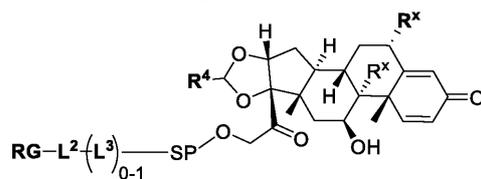
или его



остатке цистеина, через который остаток реакционноспособной группы присоединяется к ВА, и  , где N относится к атому азота на остатке лизина, через который остаток реакционноспособной группы соединяется с ВА; L<sup>2</sup> является связующим линкером;

L<sup>3</sup>, если присутствует, представляет собой саморасщепляющийся линкер; и ВА представляет собой антитело, фрагмент антитела, или его антиген-связывающий фрагмент.

Второй аспект направлен на соединение формулы (II):



(II);

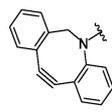
или его фармацевтически приемлемая соль, или стереоизомер, где:

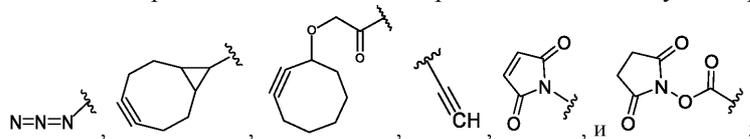
R<sup>4</sup> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил;

оба R<sup>x</sup> представляют собой водород или оба R<sup>x</sup> представляют собой фтор;

SP представляет собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-NR<sup>50</sup>C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-NR<sup>50a</sup>-, где терминальный NR<sup>50a</sup> присоединяется к (L<sup>3</sup>)<sub>0-1</sub>;

R<sup>50</sup> и R<sup>50a</sup> представляет собой независимо водород или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил;

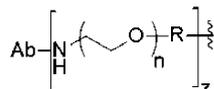
RG представляет собой реакционноспособную группу, выбранную из  ,



L<sup>2</sup> представляет собой соединительный линкер; и

L<sup>3</sup>, если имеется, представляет собой саморасщепляющийся линкер.

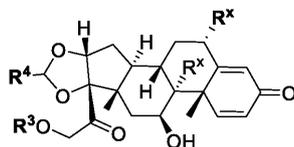
Соединение формулы (III), где ВА содержит антитело, имеющее следующую структуру



где Ab представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, фрагмент антитела или биспецифическое антитело; R представляет собой C<sub>2-4</sub>-алкилен; и n представляет собой целое число, выбранное от 2 до 4 включительно.

Соединение формулы (III), где ВА содержит антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который связывает сквенджер-рецептор макрофагов 1 (MSR1).

Третий аспект направлен на соединение формулы (I):



(I);

или его фармацевтически приемлемая соль, или стереоизомер,

где R<sup>4</sup> представляет собой -C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил;

а) оба R<sup>x</sup> представляют собой водород; и

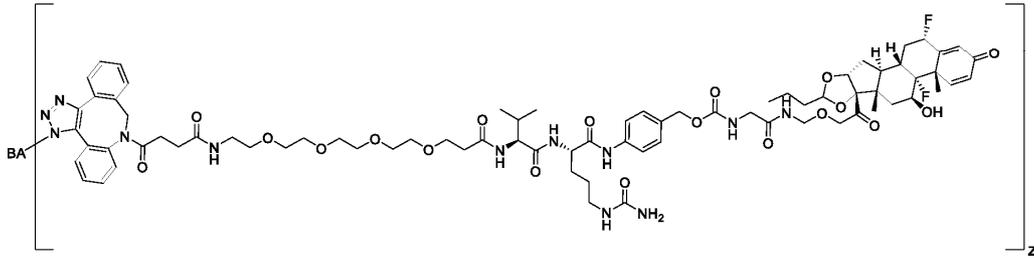
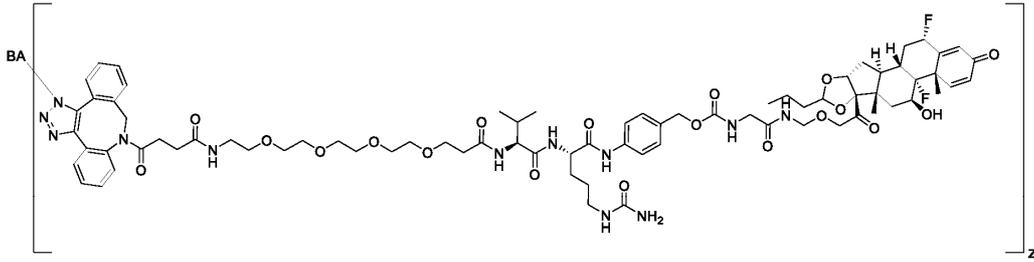
R<sup>3</sup> представляет собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-NR<sup>50</sup>C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)NR<sup>50a</sup>R<sup>50b</sup>; или

б) оба R<sup>x</sup> представляют собой фтор; и

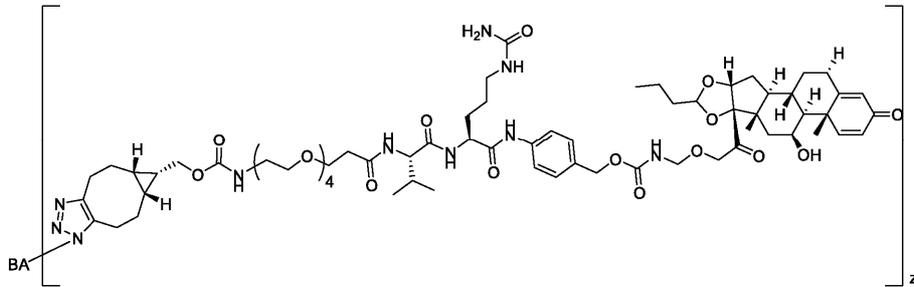
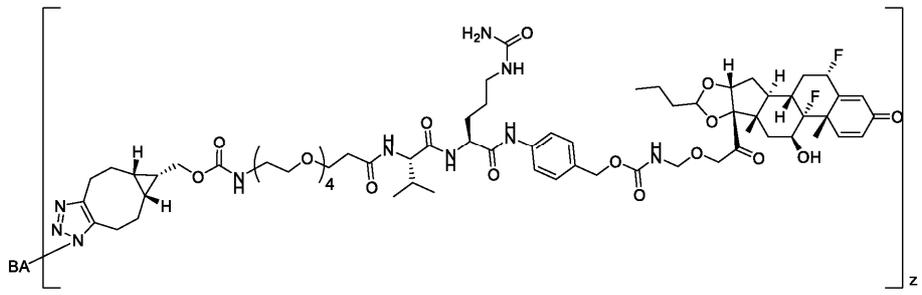
R<sup>3</sup> представляет собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-NR<sup>50</sup>C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-NR<sup>50a</sup>R<sup>50b</sup>; и

в каждом случае R<sup>50</sup>, R<sup>50a</sup> и R<sup>50b</sup> представляет собой независимо водород или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил.

Также представлено соединение одной из следующих формул:



или их смесь;



Другой аспект направлен на способ лечения заболевания, нарушения или состояния, связанного с сигнализацией глюкокортикоидного рецептора, включающий введение пациенту с упомянутым заболеванием, нарушением или состоянием терапевтически эффективного количества соединения формулы (III).

#### Краткие описания фигур

На фиг. 1 A, 1B и 1C и 2 показана ГР активация стероидных конъюгатов ADC, как описано в примере 7.

На фиг. 3 показана схема 1. Синтез спейсер-будесонида 1c-1e, 1g-1i и 1j-1l.

#### Подробное описание

##### A. Определения.

В контексте настоящего документа "алкил" означает одновалентный и насыщенный углеводородный радикальный фрагмент. Если не указано иное, алкил является незамещенным и может быть линейным, разветвленным или циклическим, т.е. циклоалкилом. Алкил включает, помимо прочего, алкилы, имеющие 1-20 атомов углерода, т.е. C<sub>1-20</sub>алкил; 1-12 атомов углерода, т.е. C<sub>1-12</sub>алкил; 1-8 атомов углерода, т.е. C<sub>1-8</sub>алкил; 1-6 атомов углерода, т.е. C<sub>1-6</sub>алкил; и 1-3 атома углерода, т.е. C<sub>1-3</sub>алкил. Циклоалкил, который является подгруппой алкилов, включает, помимо прочего, группы, имеющие 3-20 атомов углерода, т.е. C<sub>3-20</sub>алкил; 3-12 атомов углерода, т.е. C<sub>3-12</sub>алкил; 3-10 атомов углерода, т.е. C<sub>3-10</sub>алкил; 3-8 атомов углерода, т.е. C<sub>3-8</sub>алкил; и 3-6 атомов углерода, т.е. C<sub>3-6</sub>алкил. Примеры алкильных фрагментов

включают, помимо прочего, метил, этил, n-пропил, i-пропил, n-бутил, s-бутил, t-бутил, i-бутил, пентильный фрагмент, гексильный фрагмент, циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил.

В контексте настоящего документа "алкилен" означает двухвалентный алкил.

В контексте настоящего документа "аминоалкил" означает алкильную группу, замещенную одной или двумя  $-NH_2$  группами.

В контексте настоящего документа "алкенил" означает моновалентный углеводородный радикальный фрагмент, содержащий минимум два атома углерода и одну или несколько неароматических углерод-углеродных двойных связей. Алкенил является незамещенным, если не указано иное, и может быть линейным, разветвленным или циклическим. Алкенил включает, помимо прочего, алкенилы, имеющие 2-20 атомов углерода, т.е.  $C_{2-20}$ алкенил; 2-12 атомов углерода, т.е.  $C_{2-12}$ алкенил; 2-8 атомов углерода, т.е.  $C_{2-8}$ алкенил; 2-6 атомов углерода, т.е.  $C_{2-6}$ алкенил; и 2-4 атома углерода, т.е.  $C_{2-4}$ алкенил. Циклоалкенил, который является подгруппой алкенилов, включает, помимо прочего, группы, имеющие 3-20 атомов углерода, т.е.  $C_{3-20}$ алкенил; 3-12 атомов углерода, т.е.  $C_{3-12}$ алкенил; 3-10 атомов углерода, т.е.  $C_{3-10}$ алкенил; 3-8 атомов углерода, т.е.  $C_{3-8}$ алкенил; и 3-6 атомов углерода, т.е.  $C_{3-6}$ алкенил. Примеры алкенильных фрагментов включают, помимо прочего, винил, пропенил, бутенил и циклогексенил.

В контексте настоящего документа "алкенилен" означает двухвалентный алкенил.

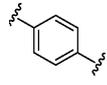
В контексте настоящего документа "алкинил" означает моновалентный углеводородный радикальный фрагмент, содержащий минимум два атома углерода и одну или несколько углерод-углеродных тройных связей. Алкинил является незамещенным, если не указано иное, и может быть линейным, разветвленным или циклическим. Алкинил включает, помимо прочего, алкинилы, имеющие 2-20 атомов углерода, т.е.  $C_{2-20}$ алкинил; 2-12 атомов углерода, т.е.  $C_{2-12}$ алкинил; 2-8 атомов углерода, т.е.  $C_{2-8}$ алкинил; 2-6 атомов углерода, т.е.  $C_{2-6}$ алкинил; и 2-4 атома углерода, т.е.  $C_{2-4}$ алкинил. Циклоалкинил, который является подгруппой алкинилов, включает, помимо прочего, группы, имеющие 3-20 атомов углерода, т.е.  $C_{3-20}$ алкинил; 3-12 атомов углерода, т.е.  $C_{3-12}$ алкинил; 3-10 атомов углерода, т.е.  $C_{3-10}$ алкинил; 3-8 атомов углерода, т.е.  $C_{3-8}$ алкинил; и 3-6 атомов углерода, т.е.  $C_{3-6}$ алкинил. Примеры алкинильных фрагментов включают, помимо прочего, этинил, пропилил и бутинил.

В контексте настоящего документа "алкинилен" означает двухвалентный алкинил.

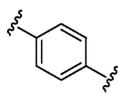
В контексте настоящего документа "алкокси" означает моновалентный и насыщенный углеводородный радикальный фрагмент, в котором углеводород включает одинарную связь с атомом кислорода и в котором радикал локализован на атоме кислорода, например,  $CH_3CH_2-O$  для этокси. Заместители алкокси связываются с соединением, которое они замещают, через этот атом кислорода заместителя алкокси. Алкокси является незамещенным, если не указано иное, и может быть линейным, разветвленным или циклическим, например, циклоалкокси. Алкокси включает, помимо прочего, алкокси, имеющие 1-20 атомов углерода, т.е.  $C_{1-20}$ алкокси; 1-12 атомов углерода, т.е.  $C_{1-12}$ алкокси; 1-8 атомов углерода, т.е.  $C_{1-8}$ алкокси; 1-6 атомов углерода, т.е.  $C_{1-6}$ алкокси; и 1-3 атома углерода, т.е.  $C_{1-3}$ алкокси. Циклоалкокси, который является подгруппой алкокси, включает, помимо прочего, группы, имеющие 3-20 атомов углерода, т.е.  $C_{3-20}$ алкокси; 3-12 атомов углерода, т.е.  $C_{3-12}$ алкокси; 3-10 атомов углерода, т.е.  $C_{3-10}$ алкокси; 3-8 атомов углерода, т.е.  $C_{3-8}$ алкокси; и 3-6 атомов углерода, т.е.  $C_{3-6}$ алкокси. Примеры фрагментов алкокси включают, помимо прочего, метокси, этокси, n-пропокси, i-пропокси, n-бутокси, s-бутокси, t-бутокси, i-бутокси, фрагмент пентилокси, фрагмент гексилокси, циклопропилокси, циклобутилокси, циклопентилокси и циклогексилокси.

В контексте настоящего документа "арил" означает моновалентный фрагмент, являющийся радикалом моноциклической или полициклической кольцевой системы, содержащей минимум одно ароматическое кольцо, где атомами кольца являются атомы углерода. Арил опционально замещается. Если арил является моноциклическим, арилом является фенил. Если арил является полициклическим, например, бициклическим или трициклическим, минимум одно из колец является ароматическим, а другие кольца могут быть ароматическими или частично ненасыщенными. Примеры арильных фрагментов включают, помимо прочего, те, которые содержат от 6 до 20 атомов углерода кольца, т.е.  $C_{6-20}$ арил; от 6 до 15 атомов углерода кольца, т.е.  $C_{6-15}$ арил, и от 6 до 10 атомов углерода кольца, т.е.  $C_{6-10}$ арил. Примеры арильных фрагментов включают, помимо прочего, фенил, нафтил, тетрагидронафтил, флуоренил, азуленил, антрил, фенантрил и пиренил.

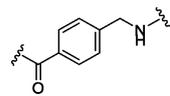
В контексте настоящего документа "арилен" означает двухвалентную арильную группу, определение которой дается в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления арилен опционально замещается на одном из углеродов, что не дает точку присоединения для остальной части молекулы. В некоторых вариантах осуществления арилен опционально не замещается. В некоторых вариантах осуществления ариленом является фенилен. В некоторых вариантах осуществления ариленом является



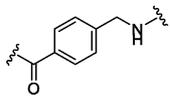
, который опционально замещается. В некоторых вариантах осуществления ариленом является



, который опционально не замещается. В некоторых вариантах осуществления фенилен в



опционально замещается. В некоторых вариантах осуществления фенилен в



опционально не замещается.

В контексте настоящего документа "арилалкил" означает моновалентный фрагмент, который является радикалом алкильного соединения, в котором алкильное соединение замещается арильным заместителем, т.е. ароматическое соединение включает одинарную связь с алкильной группой, где радикал локализуется на алкильной группе. Арилалкильная группа связывается с показанной структурой посредством алкильной группы. В некоторых вариантах осуществления арилалкил включает биензил, фенилет-1-ил и фенилет-2-ил и подобные. Если не указано иное, арилалкил является незамещенным. Тем не менее, если арилалкил является замещенным, арилалкил, т.е. арильная группа и/или алкильная группа, замещается так, как описано в настоящем документе. Примеры арилалкила включают, помимо прочего, бензил.

В контексте настоящего документа "галоалкил" означает алкил, определение которому дается в настоящем документе, где алкил включает минимум одного заместителя, выбранного из галогена, например, F, Cl, Br и I. В некоторых вариантах осуществления алкил замещается 1, 2, 3 или 4 гало атомами, которые независимо выбираются.

В контексте настоящего документа "галоалкокси" означает алкокси, определение которому дано в настоящем документе, где алкокси включает минимум одного заместителя, выбранного из галогена, например, F, Cl, Br или I.

В контексте настоящего документа "гетероалкил" означает алкил, в котором один или несколько атомов углерода замещаются гетероатомами. В контексте настоящего документа "гетероалкенил" означает алкенил, в котором один или несколько атомов углерода замещаются гетероатомами. В контексте настоящего документа "гетероалкинил" означает алкинил, в котором один или несколько атомов углерода замещаются гетероатомами. Подходящие гетероатомы включают, помимо прочего, атомы азота, кислорода и серы, которые выбираются независимым образом. Гетероалкил является незамещенным, если не указано иное. Примеры гетероалкильных фрагментов включают, помимо прочего, аминоалкил, сульфониалкил, сульфинилалкил. Примеры гетероалкильных фрагментов также включают, помимо прочего, метиламино, метилсульфонил и метилсульфинил.

В контексте настоящего документа "гетероарил" означает моновалентный фрагмент, который является радикалом ароматического соединения, где атомы кольца содержат атомы углерода и минимум один атом кислорода, серы, азота или фосфора. Гетероарил включает моноциклические, конденсированные бициклические или конденсированные трициклические радикалы, где кольцо, содержащее моноциклический радикал, является ароматическим и где минимум одно из конденсированных колец, содержащих бициклический или трициклический радикал, является ароматическим. Конденсированный бициклический радикал включает мостиковые кольцевые системы. Примеры гетероарильных фрагментов включают, помимо прочего, те, которые имеют от 5 до 20 атомов кольца; от 5 до 15 атомов кольца; и от 5 до 10 атомов кольца. Гетероарил является опционально незамещенным. В некоторых вариантах осуществления гетероарильное кольцо содержит 1, 2, 3 или 4 (в некоторых вариантах осуществления 1, 2 или 3; в некоторых вариантах осуществления 1 или 2; в некоторых вариантах осуществления 1) атомов кислорода, серы, азота и и/или фосфора, которые выбираются независимым образом. В некоторых вариантах осуществления гетероарилом является 1,2,4-триазол, 1,3,5-триазол, фталимид, пиридин, пиррол, имидазол, тиен, фуран, индол, 2,3-дигидро-1H-индол (включая, помимо прочего, 2,3-дигидро-1H-индол-2-ил или 2,3-дигидро-1H-индол-5-ил и подобные), изоиндол, индолин, изоиндолин, бензимидазол, бензодиоксол-4-ил, бензофуран, циннолин, индолизин, нафтиридин-3-ил, фталазин-3-ил, фталазин-4-ил, птеридин, пурин, хиназолин, хиноксалин, тетразол, пирозол, пиразин, пиримидин, пиридазин, оксазол, изооксазол, оксадиазол, бензоксазол, хиолин, изохиолин, тетрагидроизохиолин (включая, например, тетрагидроизохиолин-4-ил или тетрагидроизохиолин-6-ил и подобные), пирроло[3,2-c]пиридин (включая, например, пирроло[3,2-c]пиридин-2-ил или пирроло[3,2-c]пиридин-7-ил и подобные), бензопиран, тиазол, изотиазол, триадиазол, бензотиазол, бензотиен.

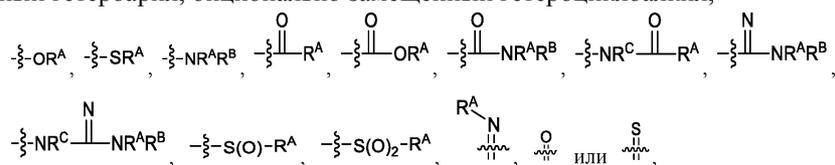
В контексте настоящего документа "гетероарилен" означает двухвалентный гетероарил, определение которому дается в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления гетероарилен опционально замещается на одном из углеродов или замещаемых азотов, что не дает точку присоединения для остальной части молекулы. В некоторых вариантах осуществления гетероарилена опционально не замещается. В некоторых вариантах осуществления гетероарилена является пиридин-диил.

В контексте настоящего документа "гетероциклоалкил" означает циклоалкил, определение которому дано выше в пункте "алкил", в котором один или несколько атомов углерода замещаются гетероатомами, которые выбираются независимым образом. Подходящие гетероатомы включают, помимо прочего, атомы азота, кислорода и серы. Если не указано иное, гетероциклоалкил является незамещенным. Примеры гетероциклоалкильных фрагментов включают, помимо прочего, морфолинил, пиперидинил, тетрагидропиранил, пирролидинил, имидазолидинил, оксазолидинил, тиазолидинил, диоксоланил, дитиоланил, оксанил или тианил.

В контексте настоящего документа "гидроксиалкилен" означает алкилен, определение которому дано в настоящем документе, где алкилен включает минимум одну гидроксильную группу. В некоторых вариантах осуществления алкилен замещается 1, 2, 3 или 4 атомами гидроксильных групп.

В контексте настоящего документа "N-содержащий гетероциклоалкил" означает циклоалкил, определение которому дано выше в пункте "алкил", в котором один или несколько атомов углерода замещаются гетероатомами и в котором минимум один гетероатом представляет собой атом азота. Подходящие гетероатомы, которые выбираются независимым образом, в дополнение к азоту, включают, помимо прочего, атомы кислорода и серы. N-содержащий гетероциклоалкил является опционально замещенным. Примеры N-содержащих гетероциклоалкильных фрагментов включают, помимо прочего, морфолинил, пиперидинил, пирролидинил, имидазолидинил, оксазолидинил или тиазолидинил.

В контексте настоящего документа термин "опционально замещенный", используемый для описания радикального фрагмента (например, опционально замещенный арилен, опционально замещенный гетероарил, опционально замещенный арил, опционально замещенный гетероарил, опционально замещенный алкил и опционально замещенный арилалкил), означает, что такой фрагмент опционально связан с одним или несколькими заместителями на любом замещаемом атоме в этом фрагменте. Примеры таких заместителей включают, помимо прочего, гало, циано, нитро, галоалкил, азидо, эпокси, опционально замещенный гетероарил, опционально замещенный гетероциклоалкил,



где  $R^A$ ,  $R^B$  и  $R^C$  гетероциклоалкил или  $R^A$  и  $R^B$ , вместе с атомами, с которыми они связываются, образуют насыщенное или ненасыщенное гетероциклическое кольцо (т.е. гетероциклоалкил или гетероарил), где кольцо является опционально замещенным и где, в дополнение к атому азота кольца, один или несколько атомов кольца опционально являются гетероатомом, независимым образом выбранным из азота, кислорода, серы и фосфора. В некоторых вариантах осуществления, когда радикальный фрагмент опционально замещается опционально замещенным гетероарилом, опционально замещенным гетероциклоалкилом или опционально замещенным насыщенным или ненасыщенным гетероциклическим кольцом (гетероциклоалкилом или гетероарилом), заместители на опционально замещенном гетероариле, опционально замещенном гетероциклоалкиле или опционально замещенном насыщенном или ненасыщенном гетероциклическом кольце (гетероциклоалкиле или гетероариле), если они являются замещенными, не замещаются заместителями, которые далее опционально замещаются дополнительными заместителями. В некоторых вариантах осуществления, где описанная здесь группа является опционально замещенной, заместитель, связанный с этой группой, является незамещенным, если не указано иное, т.е. опционально замещенный арилен в качестве заместителя далее не замещается замещенным ариленом.

В контексте настоящего документа "связующий агент" означает любую молекулу на основе белка или пептида, способную связываться со специфичностью с указанным партнером по связыванию. В некоторых вариантах осуществления связующим агентом является антитело или его антиген-связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления связующий агент не является альбумином.

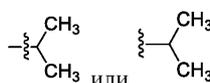
В контексте настоящего документа термин "условия синтеза амида" означает условия реакции, подходящие для содействия образованию амида, например, посредством реакции карбоновой кислоты, активированной карбоновой кислоты или ацилгалоида с амином. В некоторых вариантах осуществления "условия синтеза амида" означают условия реакции, подходящие для образования амидной связи между карбоновой кислотой и амином. В некоторых из этих вариантов осуществления карбоновая кислота сначала преобразуется в активированную карбоновую кислоту, прежде чем активированная карбоновая кислота вступает в реакцию с амином, в результате чего образуется амид. Подходящие условия для образования амида включают, помимо прочего, условия, при которых применяются реактивы для содействия реакции между карбоновой кислотой и амином, включая, помимо прочего, дициклогексилкарбодиимид (DCC), диизопропилкарбодиимид (DIC), (бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфония гексафторфосфат (BOP), (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфония гексафторфосфат (PyBOP), (7-азабензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфония гексафторфосфат (PyAOP), бромтрипирролидинофосфония гексафторфосфат (PyBrOP), O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфат (HBTU), O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония тетрафторборат (TBTU), 1-

[бис(диметиламино)метилен]1Н-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиния 3-оксида гексафторфосфат (НАТУ), 2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохиолин (EEDQ), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), 2-хлор-1,3-диметилимидазолидиния гексафторфосфат (CIP), 2-хлор-4,6-диметокси-1,3,5-триазин (CDMT) и карбонилдимидазол (CDI). В некоторых вариантах осуществления карбоновая кислота сначала преобразуется в активированный эфир карбоновой кислоты перед реакцией с амином, в результате чего образуется амидная связь. В определенных вариантах осуществления карбоновая кислота вступает в реакцию с реактивом. Этот реактив активирует карбоновую кислоту посредством депротонизации карбоновой кислоты и последующего образования комплекса продукта с депротонированной карбоновой кислотой в результате нуклеофильной атаки депротонированной карбоновой кислоты на протонированный реактив. Для определенных карбоновых кислот такой активированный эфир в последующем является более восприимчивым к нуклеофильной атаке амином по сравнению с карбоновой кислотой до ее преобразования. Это приводит к образованию амидной связи. В связи с этим карбоновая кислота описывается как активированная. Примерами реактивов являются DCC и DIC.

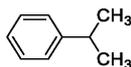
В контексте настоящего документа "терапевтически эффективное количество" означает количество (соединения), которое является достаточным для оказания терапевтического воздействия на пациента при лечении или контроле заболевания или нарушения либо откладывания или уменьшения одного или нескольких симптомов, ассоциируемых с этим заболеванием или нарушением.

В контексте настоящего документа "фармацевтически приемлемая соль" означает любую соль, подходящую для введения пациенту. Подходящие соли включают, помимо прочего, соли, описанные в работе Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci., 1977, 66:1, содержание которой включается в настоящий документ посредством ссылки. Примеры солей включают, помимо прочего, соли, полученные от кислот, соли, полученные от оснований, органические, неорганические соли, соли амина и соли щелочных и щелочноземельных металлов, включая, помимо прочего, кальциевые соли, магниевые соли, калиевые соли, натриевые соли, соли соляной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты, азотной кислоты, фосфорной кислоты, уксусной кислоты, пропионовой кислоты, гликолиевой кислоты, пировиноградной кислоты, шавелевой кислоты, малеиновой кислоты, малоновой кислоты, янтарной кислоты, фумаровой кислоты, винной кислоты, лимонной кислоты, бензойной кислоты, коричной кислоты, миндальной кислоты, метансульфоновой кислоты, этансульфоновой кислоты, *p*-толуолсульфоновой кислоты и салициловой кислоты и подобные.

Определенные группы, фрагменты, заместители и атомы изображаются с волнистой линией, которая пересекает или покрывает связь или связи для указания атома, через который связываются группы, фрагменты, заместители, атомы. Например, фенильная группа, замещаемая пропильной группой, которая изображается следующим образом:

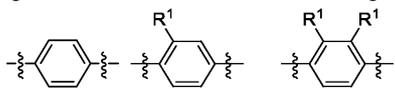


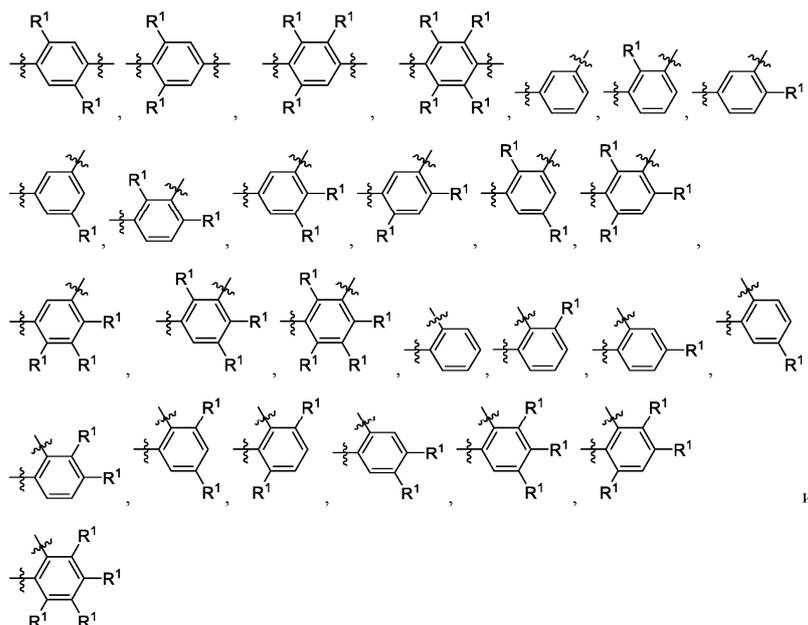
имеет следующую структуру:



В контексте настоящего документа иллюстрации, изображающие заместителей, связанных с циклической группой (например, ароматическим, гетероароматическим, конденсированным кольцом и насыщенным или ненасыщенным циклоалкилом или гетероциклоалкилом) посредством связи между атомами кольца, показывают, если не указано иное, что эта циклическая группа может быть замещена таким заместителем в любом положении кольца в циклической группе или на любом кольце в группе конденсированного кольца, в соответствии с методами, изложенными в настоящем документе или известными в

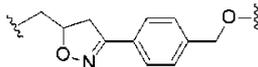
области, к которой относится данное описание изобретения. Например, группа , в которой нижний индекс *q* представляет собой целое число, выбранное из 0 представляет собой 4, включительно, и в которой позиции заместителя  $R^1$  описываются в общем, т.е. без прямого присоединения к любой вершине линейной структуры связи, т.е. определенному атому углерода кольца, включает следующие неограничивающие примеры групп, в которых заместитель  $R^1$  связан с определенным атомом углерода кольца:





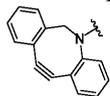
В случаях, когда название и структура соединения конфликтуют или являются несовместимыми, структура имеет преимущественное значение, за исключением случаев, когда контекст, например, характеристизационные данные ЯМР, может указывать на иное.

В контексте настоящего документа фраза "реактивная группа" ("RG") означает функциональную группу или фрагмент, которые вступают в реакцию с реактивной частью антитела, модифицированного антитела или его антиген-связывающим фрагментом. В определенных вариантах осуществления "реактивная группа" представляет собой это функциональная группа или фрагмент (например, малеимид или эфир NHS), которые вступают в реакцию с цистеиновым или лизиновым остатком антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных вариантах осуществления "реактивная группа" представляет собой это функциональная группа или фрагмент, способные вступать в реакцию клик-химии. В некоторых вариантах осуществления указанной реакции клик-химии реактивная группа содержит алкин, который способен вступать в реакцию 1,3 циклоприсоединения с азидом. Такие подходящие реактивные группы включают, помимо прочего, напряженные алкины, например, те, которые подходят для промотированных напряжением алкин-азидных циклоприсоединений (SPAAC), циклоалкины, например, циклооктины, бензаннелированные алкины и алкины, способные вступать в реакции 1,3 циклоприсоединения с азидом в отсутствие катализаторов на основе меди. Подходящие алкины также включают, помимо прочего, DIBAC (где  $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$  часть DIBAC фрагмента накрывается  $L^2$ ), DIBO (где  $-O-$  часть



DIBO фрагмента накрывается  $L^2$ ), VARAC (где часть VARAC фрагмента накрывается  $L^2$ ), DIFO (где  $-O-$  часть накрывается  $L^2$ ), замещенные алкины, например, фторированные алкины, аза-циклоалкины, BCN и их производные. Линкер-нагрузки, содержащие такие реактивные группы, полезны для конъюгирования антител, которые были функционализированы с азидогруппами. Такие функционализированные антитела включают антитела, функционализированные с азидо-полиэтиленгликольными группами. В определенных вариантах осуществления такое функционализированное антитело получают посредством реакции антитела, содержащего минимум один глутаминовый остаток, например, тяжелую цепь Q295 (номенклатура EU), и соединения в соответствии с формулой  $H_2N-LL-N_3$ , где LL представляет собой двухвалентная полиэтиленгликольная группа, в присутствии фермента транслгутаминазы.

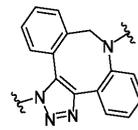
В некоторых вариантах осуществления реактивная группа (RG) представляет собой алкин, например,

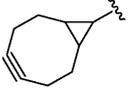
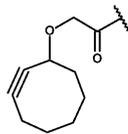


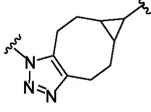
мер, который может вступать в реакцию посредством клик-химии с азидом, например,



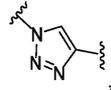
в результате чего образуется продукт клик-химии, например, его региоизомер или их смесь. В некоторых вариантах осуществления реактивная группа представляет собой алкин, например,



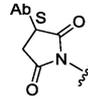
мер,  или  (где  $L^2$  охватывает  $-OCH_2C(O)-$ ), который может вступать в реакцию посредством клик-химии с азидом, например,  $N=N=N$  в результате чего образуется продукт клик-химии,

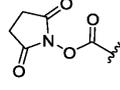
например, . В некоторых вариантах осуществления реактивная группа представляет собой

алкин, например, , который может вступать в реакцию посредством клик-химии с азидом, напри-

мер,  $N=N=N$ , в результате чего образуется продукт клик-химии, например, , его региоизомер или их смесь. В некоторых вариантах осуществления реактивная группа представляет собой функцио-

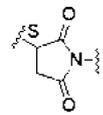
нальная группа, например, , которая вступает в реакцию с цистеиновым остатком на антителе или

его антигенсвязывающем фрагменте, в результате чего образуется связь с ним, например, , где Ab означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а S означает S атом на цистеиновом остатке, через который функциональная группа связывается с Ab. В некоторых вариантах осуществления ре-

активная группа представляет собой функциональная группа, например, , которая вступает в реакцию с лизиновым остатком на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, в результате чего

образуется связь с ним, например, , где Ab означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а N означает N атом на лизиновом остатке, через который функциональная группа связывается с Ab.

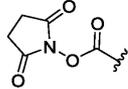
В контексте настоящего документа фраза "остаток реактивной группы" ( $-L^1-$ ) означает продукт реакции функциональной группы в линкерном фрагменте с реактивной частью связующего агента (ВА), включая продукт клик-химии. Остаток реактивной группы образуется посредством реакции реактивной группы на аминокислоту связующего агента и присоединяется к связующему агенту (например, антителу) и к соединительному линкеру. В некоторых вариантах осуществления остаток реактивной группы представляет собой группа, которая содержит 1,2,3-тетразол, т.е. образуется посредством реакции алкина с азидом. В некоторых вариантах осуществления остаток реактивной группы представляет собой



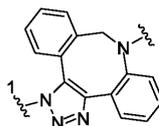
(а), где S означает S атом на цистеиновом остатке, через который (а) связывается с Ab, и кото-

рый образуется посредством реакции  с цистеиновым остатком на антителе или его антигенсвязыва-

ющем фрагменте. В некоторых вариантах осуществления остаток реактивной группы , где N означает N атом на лизиновом остатке и который образуется посредством реакции функциональной

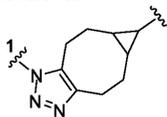
группы, например, , с лизиновым остатком на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте.

В некоторых вариантах осуществления линкер  $-L-$  содержит и  $L^1$  представляет собой остаток реак-

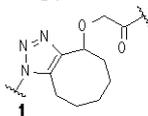


тивной группы в соответствии со следующим фрагментом:

смесь, где представляет собой связь со связующим агентом. В некоторых вариантах осуществления линкер -L- содержит и  $L^1$  представляет собой остаток реактивной группы в соответствии со следующим фрагментом:



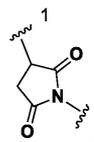
, его региоизомер или их смесь, где представляет собой связь со связующим агентом. В некоторых вариантах осуществления линкер -L- содержит и  $L^1$  представляет собой остаток реактивной группы в соответствии со следующим фрагментом:



где  $-OCH_2C(O)-$  охватывается  $L^2$ , его региоизомером или их смесью, где представляет собой связь со связующим агентом. В некоторых вариантах осуществления линкер -L- содержит и  $L^1$  представляет собой остаток реактивной группы в соответствии со следующим фрагментом:



, его региоизомер или их смесь, где представляет собой связь со связующим агентом. В некоторых вариантах осуществления линкер -L- содержит и  $L^1$  представляет собой остаток реактивной группы в соответствии со следующим фрагментом:



где представляет собой связь с цистеином антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления линкер -L- содержит и  $L^1$  представляет собой остаток реактивной группы в соответствии со следующим фрагментом:

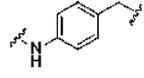


где представляет собой связь с лизином антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В этих примерах связь со связующим агентом прямая или посредством линкера. В конкретных вариантах осуществления связующий агент модифицируется азидом для содействия связи с линкером -L- или  $L^1$ , в результате чего образуется остаток реактивной группы.

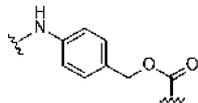
В контексте настоящего документа "соединительный линкер" ( $L^2$ ) означает двухвалентные группы, которые являются расщепляемыми или нерасщепляемыми. Расщепляемые линкеры представляют собой линкеры, которые расщепляются посредством внутриклеточного метаболизма после интернализации, например, расщепления через гидролиз, восстановление или ферментной реакции. Нерасщепляемые линкеры представляют собой линкеры, которые высвобождают присоединенную нагрузку через лизосомную деградацию антитела после интернализации. Подходящие соединительные линкеры включают, помимо прочего, кислотолабильные линкеры, гидролизлабильные линкеры, расщепляемые под воздействием ферментов линкеры, редукционно-лабильные линкеры и нерасщепляемые линкеры. Подходящие линкеры также включают, помимо прочего, линкеры, которые представляют собой или содержат глюкуроны, сукцинимид-тиоэферы, полиэтиленгликольные (PEG) звенья, гидразоны, мал-капроильные звенья, дисульфидные звенья (например,  $-S-S-$ ,  $-S-C(R^{1b}R^{2b})-$ , где  $R^{1b}$  и  $R^{2b}$  представляет собой независимо водород или гидрокарбил), карбаматные звенья, пара-амино-бензильные звенья (РАВ), фосфатные звенья, например, моно-, бис- или трис-фосфатные звенья и пептидные звенья, например, пептидные звенья, содержащие два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или более аминокислотных остатков, включая, помимо прочего, звенья остатка валин-цитруллина. В контексте настоящего документа "капроил" означает  $-(CH_2)_5-C(O)-$  группу. В некоторых вариантах осуществления  $L^2$  содержит циклодекстрин (CD). В некоторых вариантах осуществления  $L^2$  содержит  $-C(O)CH_2CH_2C(O)-$ ,  $-C(O)CH_2CH_2CH_2C(O)-$ ,  $-OCH_2C(O)-$ ,

-O- или .

В контексте настоящего документа "саморасщепляющийся линкер" в ( $L^3$ ) означает любую такую

группу, известную специалистам в данной области. В конкретных вариантах осуществления саморасщепляющаяся группа представляет собой *p*-аминобензил (PAB), т.е.  или его производное. По-

лезные производные включают *p*-аминобензилокси, т.е.



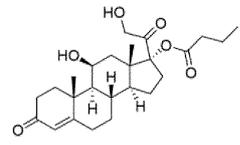
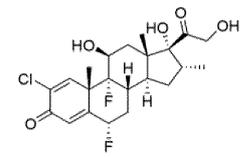
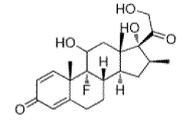
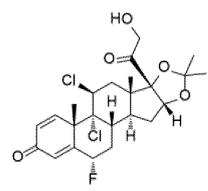
(PABO), т.е.

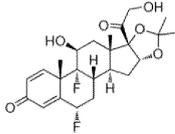
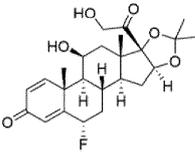
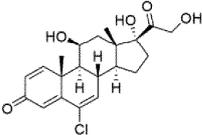
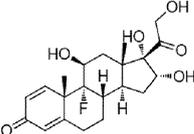
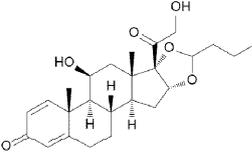
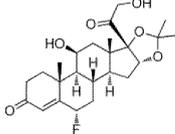
. Специалистам в данной области известно, что саморасщепляющаяся группа способна к проведению химической реакции, в ходе которой высвобождаются оставшиеся атомы линкера от нагрузки.

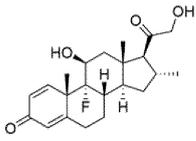
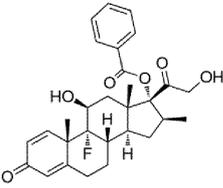
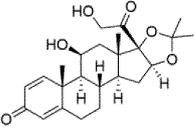
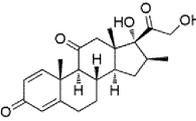
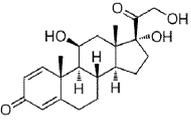
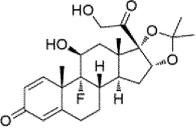
В. Стероидные нагрузки.

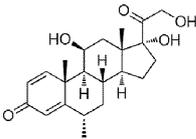
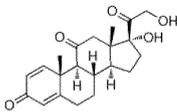
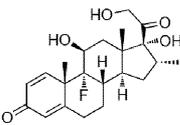
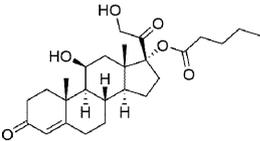
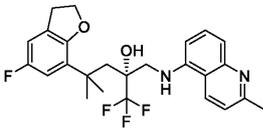
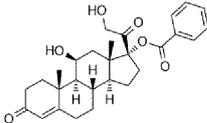
Стероиды, подходящие для описанных здесь конъюгатов, включают будесонид и его пролекарства, аналоги или производные будесонида (включая фторированные аналоги и производные) и их пролекарства, и стероиды, указанные в табл. А, и их пролекарства. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты антитело-лекарственное средство высвобождают будесонид, пролекарство будесонида, аналог или производное будесонида (включая фторированные аналоги и производные), пролекарство аналога или производного будесонида (включая фторированные аналоги и производные), стероид в табл. А или пролекарство стероида в табл. А после связывания с целевым антигеном антитела. В табл. А следующие соединения соединяются с ВА соединения формулы (III), формулы (III-Р), формулы III-Р-1 или (3000) через гидроксигруппы  $-C(O)CH_2OH$  группы, т.е. посредством  $-C(O)CH_2-O-SP-L-$ , или через гидроксигруппы Мапракората, т.е. посредством  $-O-SP-L-$ ; или связываются с RG соединения формулы (II), формулы (II-Р), формулы II-Р-1 или (2000) через гидроксигруппы  $-C(O)CH_2OH$  группы, т.е. посредством  $-C(O)CH_2-O-SP-(L^3)_{0-1}-L^2-$  или через гидроксигруппы Мапракората, т.е. посредством  $-O-SP-(L^3)_{0-1}-L^2-$ .

Таблица А

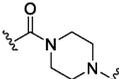
Торговое название	Структура
Гидрокортизона бутират Locoid®	
Галометазон Sicorten®/ (C-48401-Ba)	
Бетаметазон Celestone®/Rinderon®/Diprosone® (NSC-39470; Sch-4831)	
Флуклоролон ацетонид Cutanit®/Topicon® (RS-2252)	

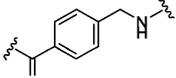
<p>Флуоцинолон ацетонид          Flucort®/Fluonid®/Iluvien®/Retisert®/Synalar®/Synalar-HP®/Synemol®          (NSC-92339; DF-277)</p>	
<p>Флунизолид          (RS-3999; RS-1320)</p>	
<p>Клопреднол          (RS-4691)</p>	
<p>Триамцинолон          Aristocort®/Kenacort®</p>	
<p>Будесонид</p>	
<p>Флурандренолид          Cordran®</p>	

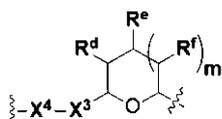
<p>Дезоксиметазон Topicort® (DSXS)</p>	
<p>Бетаметазон бензоат Uticort® (W-5975)</p>	
<p>Дезонид Desonate® (D-2083)</p>	
<p>Мепреднизон (NSC-527579; Sch-4358)</p>	
<p>Преднизолон Delta-Cortef® (NCS-9120)</p>	
<p>Триамцинолон ацетонид</p>	

<p>Метилпреднизолон Depo-Medrol; Medrol; Urbason® (NSC-19987)</p>	
<p>Преднизон Decortin®/Deltasone®/Lodotra®/Meticorten®/Rayos® (NSC-10023)</p>	
<p>Дексаметазон Decadron® (FT-4145; ENV-1105; IBI-10090; ISV-305; OTO-104)</p>	
<p>Гидрокортизон валерат Westcort®</p>	
<p>Мапракорат (BOL-242X; BOL-303242-X; ZK-245186; BAY-865319; BOL-303242-X)</p>	
<p>Бензодрокортизон</p>	

В некоторых или любых вариантах осуществления соединение формулы (3000) или формулы (2000) содержит пролекарство стероида в табл. А, где SP представляет собой  $-C(O)-C_1-C_{10}$ -алкилен- $C(O)-$ ,  $-C(O)-N(C_{1-6}$ -алкил)- $C_1-C_{10}$ -алкилен- $X^{1b}$ -, где  $X^{1b}$  присоединен к L в формуле (3000) или  $(L^3)_{0-1}$  в формуле (2000),  $-C(O)-N(H)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $X^{1b}$ -, где  $X^{1b}$  присоединен к L в формуле (3000) или  $(L^3)_{0-1}$  в формуле

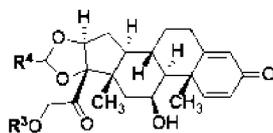
(2000),  где точка присоединения на правой стороне (т.е. на N) представляет собой к L в формуле (3000) или  $(L^3)_{0-1}$  в формуле (2000),  $-CH_2-NH-$ , где N присоединяется к L в формуле (3000) или

 где N присоединяется к L в формуле (3000) или  $(L^3)_{0-1}$  в формуле (2000),  $-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50a}$ -, где  $NR^{50a}$  присоединяется к L в формуле (3000) или  $(L^3)_{0-1}$  в формуле (2000),  $-C(O)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50a}$ -, где  $NR^{50a}$  присоединяется к L в формуле (3000) или  $(L^3)_{0-1}$  в формуле (2000) и где в каждом случае  $C_1-C_{10}$ -алкилен независимо и опционально замещается одной или несколькими гидрокси-,  $-C(O)-N(R^3)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $C(O)NH-X^2$ -, где  $X^2$  присоединяется к L в формуле (3000) или  $(L^3)_{0-1}$  в формуле (2000), или



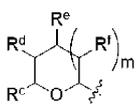
, где  $X^4$  присоединяется к L в формуле (3000) или  $(L^3)_{0-1}$  в формуле (2000).

В некоторых вариантах осуществления соединение в соответствии с формулой (I-P):



(I-P);

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомер или производное, где  $R^4$  представляет собой алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил;



$R^3$  представляет собой  $-C(O)R^Z$  или

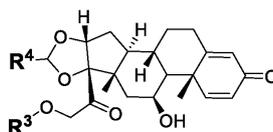
$R^Z$  представляет собой  $-C_{4-10}$ -алкилен- $C(O)OH$  или  $NR^{15}R^{15a}$ ;

$R^{15}$  представляет собой H или алкил и  $R^{15a}$  представляет собой  $-(C_{1-6}$ -алкилен)- $C(O)NHNH_2$ ;

один из  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  и  $R^f$  представляет собой  $-CH_2OR^g$ , а другие представляют собой независимо -H, -OH, гидроксиалкил,  $-C(O)OH$  или  $-CH_2OR^g$ , где в каждом случае  $R^g$  представляет собой независимо  $-(C_{1-6}$ -алкилен)- $C(O)OH$  или  $-(C_{1-6}$ -алкилен)- $C(O)O$ (алкил); или один из  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  и  $R^f$  представляет собой гидроксиалкил, а другие представляют собой -H; и

m представляет собой 0 или 1.

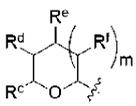
В некоторых вариантах осуществления соединение в соответствии с формулой (I-P-1):



(I-P-1);

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомер или производное, где:

$R^4$  представляет собой алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил;



$R^3$  представляет собой  $-C(O)R^Z$  или

$R^Z$  представляет собой  $-C_{4-10}$ -алкилен- $C(O)OH$  или  $NR^5R^{5a}$ ;

$R^{15}$  представляет собой H или алкил и  $R^{15a}$  представляет собой  $-(C_{1-6}$ -алкилен)- $C(O)NHNH_2$ ;

один из  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  и  $R^f$  представляет собой  $-CH_2OR^g$ , а другие представляют собой независимо -H, -OH, гидроксиалкил,  $-C(O)OH$  или  $-CH_2OR^g$ , где в каждом случае  $R^g$  представляет собой независимо  $-(C_{1-6}$ -алкилен)- $C(O)OH$  или  $-(C_{1-6}$ -алкилен)- $C(O)O$ (алкил); или

один из  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  и  $R^f$  представляет собой гидроксиалкил, а другие представляют собой -H; и

m представляет собой 0 или 1.

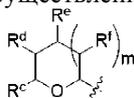
В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (I), формулы (I-P) или формулы (I-P-1), где  $R^4$  представляет собой алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой не циклоалкил. В некоторых из этих вариантов осуществления  $R^4$  представляет собой линейный или разветвленный алкил. В некоторых из этих вариантов осуществления  $R^4$  представляет собой арил. В некоторых из этих вариантов осуществления  $R^4$  представляет собой арилалкил. В некоторых из этих вариантов осуществления  $R^4$  представляет собой N-содержащий гетероциклоалкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой алкил, такой как, помимо прочего, метил, этил, пропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил или нонил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой метил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой этил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой n-пропил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой i-пропил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой n-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой i-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой t-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой втор-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой пентил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой гексил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой гептил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой октил или нонил. В некоторых вариантах





формулы (I)  $R^3$  представляет собой -(линейный  $C_1$ - $C_3$ -алкилен)- $NR^{50}C(O)$ -(линейный  $C_1$ - $C_3$ -алкилен)- $NR^{50a}R^{50b}$ .

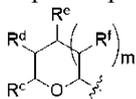
В некоторых вариантах осуществления формулы (I), (I-P) или (I-P-1) оба  $R^x$  представляют собой во-



дород и  $R^3$  представляет собой

В некоторых вариантах осуществления формулы (I), (I-P) или (I-P-1)  $m$  представляет собой 0. В некоторых вариантах осуществления формулы (I), (I-P) или (I-P-1)  $m$  представляет собой 1. В некоторых вариантах осуществления формулы (I), (I-P) или (I-P-1)  $m$  представляет собой 1 и  $R^f$  представляет собой -H или -OH. В некоторых вариантах осуществления формулы (I), (I-P) или (I-P-1)  $m$  представляет собой 1 и  $R^f$  представляет собой 1 и один из  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  и  $R^f$  представляет собой  $-CH_2OR^g$ , а другие представляют собой независимо -H, -OH, гидроксиалкил,  $-C(O)OH$  или  $-CH_2OR^g$ , где в каждом случае  $R^g$  представляет собой независимо  $-(C_{1-6}$ -алкилен)- $C(O)OH$  или  $-(C_{1-6}$ -алкилен)- $C(O)O$ (алкил). В некоторых вариантах осуществления формулы (I), (I-P) или (I-P-1)  $m$  представляет собой 1 и  $R^c$  представляет собой  $-CH_2OR^g$ , а другие представляют собой независимо -H, -OH или гидроксиалкил. В некоторых вариантах осуществления формулы (I), (I-P) или (I-P-1)  $m$  представляет собой 1 и один из  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  и  $R^f$  представляет собой гидроксиалкил, а другие -H. В некоторых вариантах осуществления формулы (I), (I-P) или (I-P-1)  $m$  представляет собой 1 и  $R^c$  представляет собой гидроксиалкил и  $R^d$ ,  $R^e$  и  $R^f$  представляет собой -H.

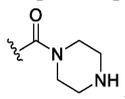
В некоторых вариантах осуществления формулы (I) оба  $R^x$  представляют собой фтор и  $R^3$  представ-



ляет собой

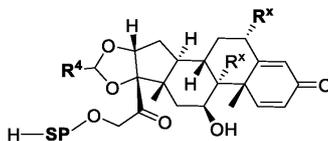
В некоторых вариантах осуществления формулы (I)  $m$  представляет собой 0. В некоторых вариантах осуществления формулы (I)  $m$  представляет собой 1. В некоторых вариантах осуществления формулы (I)  $m$  представляет собой 1 и  $R^f$  представляет собой -H или -OH. В некоторых вариантах осуществления формулы (I)  $m$  представляет собой 1 и один из  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  и  $R^f$  представляет собой  $-CH_2OR^g$ , а другие представляют собой независимо -H, -OH, гидроксиалкил,  $-C(O)OH$  или  $-CH_2OR^g$ , где в каждом случае  $R^g$  представляет собой независимо  $-(C_{1-6}$ -алкилен)- $C(O)OH$  или  $-(C_{1-6}$ -алкилен)- $C(O)O$ (алкил). В некоторых вариантах осуществления формулы (I)  $m$  представляет собой 1 и  $R^c$  представляет собой  $-CH_2OR^g$ , а другие представляют собой независимо -H, -OH или гидроксиалкил. В некоторых вариантах осуществления формулы (I)  $m$  представляет собой 1 и один из  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  и  $R^f$  представляет собой гидроксиалкил, а другие представляют собой -H. В некоторых вариантах осуществления формулы (I)  $m$  представляет собой 1 и  $R^c$  представляет собой гидроксиалкил и  $R^d$ ,  $R^e$  и  $R^f$  представляет собой -H.

В некоторых вариантах осуществления формулы (I) оба  $R^x$  представляют собой фтор и  $R^3$  представ-



ляет собой

В некоторых или любых вариантах осуществления соединение с формулой (Z):

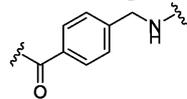


(Z)

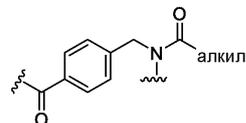
где  $R^4$  представляет собой алкил, арил, ариалкил или N-содержащий гетероциклоалкил;

оба  $R^x$  представляют собой водород или оба  $R^x$  представляют собой фтор; и

SP представляет собой  $-CH_2NH-$ , где NH соединяется с H или SP представляет собой

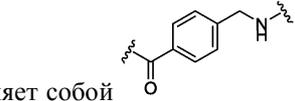


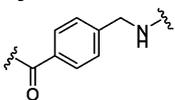
, где NH от SP соединяется с H в формуле (Z), или SP представляет собой

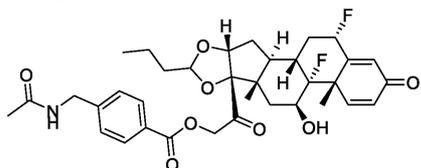


, где N от SP соединяется с H в формуле (Z). В некоторых или любых вариантах осуществления оба  $R^x$  представляют собой водород. В некоторых или любых вариантах осуществления

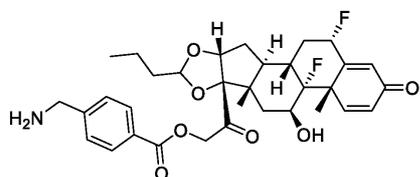
оба  $R^x$  представляют собой фтор. В некоторых или любых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой алкил. В некоторых из этих вариантов осуществления  $R^4$  представляет собой линейный алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой алкил, такой как, помимо прочего, метил, этил, пропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил или нонил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой метил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой этил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  -n-пропил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой i-пропил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой n-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой i-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой t-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой втор-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой пентил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой гексил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой гептил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой октил или нонил. В некоторых или любых вариантах осуществления SP представляет собой  $-CH_2NH-$ , где NH соединяется с H. В некоторых или

любых вариантах осуществления SP представляет собой , где NH соединяется с H в формуле (Z). В некоторых или любых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой алкил, оба  $R^x$  пред-

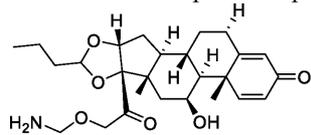
ставляют собой фтор и SP представляет собой , где NH соединяется с H в формуле (Z). В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (Z) представляет собой



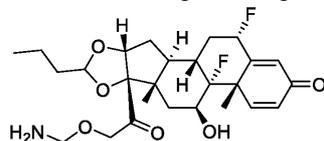
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (Z) представляет собой



В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (Z) представляет собой



В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (Z) представляет собой

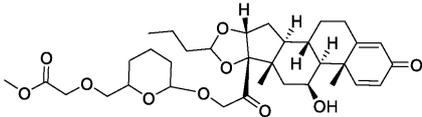
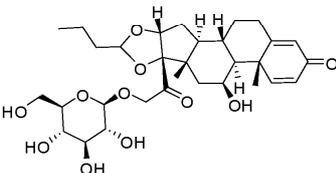
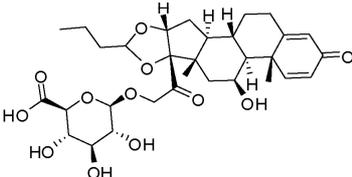
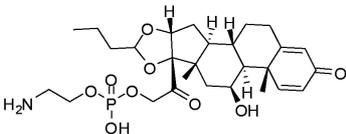
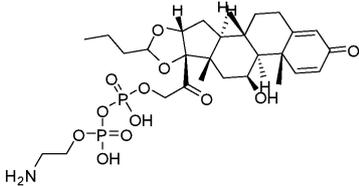
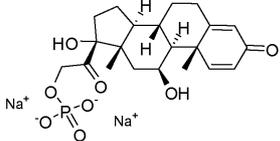


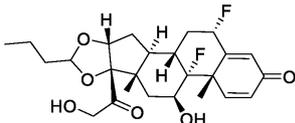
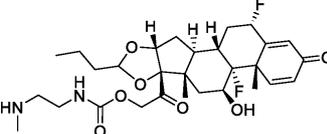
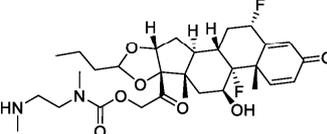
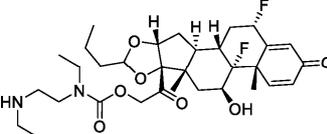
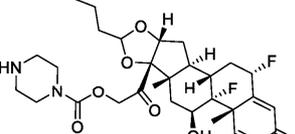
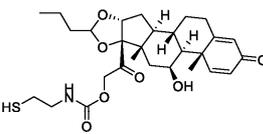
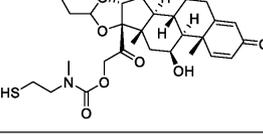
Подходящие стероиды для описанных здесь конъюгатов включают стероиды в следующей таблице.

Таблица 1  
Будесонид-спейсер (Будесонид-SP)

№ соединения	Структура
1a (Будесонид)	The structure shows the budesonide molecule, which consists of a steroid nucleus with a 20-one ketone group, a 3-hydroxyl group, and a 14-hydroxyl group. At the 11-position, there is a butyrate ester group. At the 13-position, there is a propyl ether group.
1c	The structure is similar to budesonide but features a propyl ether group at the 13-position and a 2-(2-hydroxyethyl)acetate ester group at the 11-position.
1d	The structure is similar to budesonide but features a propyl ether group at the 13-position and a 2-(dimethylamino)ethyl acetate ester group at the 11-position.
1e	The structure is similar to budesonide but features a propyl ether group at the 13-position and a 2-(2-aminoethyl)acetate ester group at the 11-position.
1g	The structure is similar to budesonide but features a propyl ether group at the 13-position and a 2-(2-hydroxyethyl)acetate ester group at the 11-position, which is identical to structure 1c.

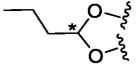
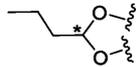
045111

<b>1q</b>	
<b>1i</b>	
<b>1j</b>	
<b>1k</b>	
<b>1l</b>	
<b>1m</b>	

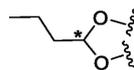
100	
101a	
101b	
101c	
101d	
102c	
102d	

102e	
102f	
103a	
103b	
104a	
104b	
105a	
106a	
107a	

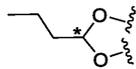
или стереоизомер или смесь стереоизомеров; и опционально его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомер.

В некоторых случаях п-пропил  в каждой из вышеуказанных структур представляет собой в R-конфигурации, т.е. на углероде, показанном звездочкой. В некоторых случаях п-пропил  в каждой из вышеуказанных структур представляет собой в S-конфигурации, т.е. на углеро-

де, показанном звездочкой. В некоторых случаях n-пропил



структур представляет собой смесь R- и S-конфигураций, т.е. на углероде, показанном звездочкой. В некоторых случаях n-пропил



в каждой из вышеуказанных структур представляет собой смесь R- и S-конфигураций, т.е. на углероде, показанном звездочкой, где отношение R:S составляет около 1:1, около 2:1, около 3:1, около 4:1, около 5:1, около 6:1, около 7:1, около 8:1, около 9:1 или около 10:1.

В некоторых вариантах осуществления формулы (I) представлено соединение формулы 1d, 1e, 1g, 1h, 101a, 101b, 101c, 101d, 102c, 102d, 102e, 102f, 103a, 103b, 104a или 104b, или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомер. В некоторых вариантах осуществления формулы (I) представлено соединение формулы 1d, 1e, 1g, или 1h или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомер. В некоторых вариантах осуществления n-пропил соединений формулы 1d, 1e, 1g, 1h, 101a, 101b, 101c, 101d, 102c, 102d, 102e, 102f, 103a, 103b, 104a и 104b представляет собой в R-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления n-пропил соединений формулы 1d, 1e, 1g, 1h, 101a, 101b, 101c, 101d, 102c, 102d, 102e, 102f, 103a, 103b, 104a и 104b представляет собой в S-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления n-пропил соединений формулы 1d, 1e, 1g, 1h, 101a, 101b, 101c, 101d, 102c, 102d, 102e, 102f, 103a, 103b, 104a и 104b представляет собой смесь R- и S-конфигураций. В некоторых вариантах осуществления n-пропил соединений формулы 1d, 1e, 1g, 1h, 101a, 101b, 101c, 101d, 102c, 102d, 102e, 102f, 103a, 103b, 104a и 104b представляет собой смесь R- и S-конфигураций, где отношение R:S составляет около 1:1, около 2:1, около 3:1, около 4:1, около 5:1, около 6:1, около 7:1, около 8:1, около 9:1 или около 10:1.

В объем настоящего описания изобретения входят фармацевтически приемлемые соли, сольваты, кристаллические формы, аморфные формы, полиморфные формы, региоизомеры, стереоизомеры, метаболиты и физиологические аддукты описанных здесь стероидных нагрузок.

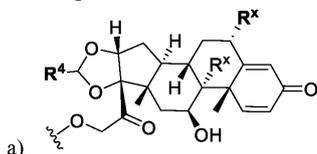
С. Белковые стероидные конъюгаты.

Здесь представлены белковые конъюгаты описанных здесь стероидов. Такие конъюгаты включают белки, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые ковалентно соединены, например, посредством -L- и -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-(L<sup>3</sup>)<sub>0-1</sub>-, описанных в настоящем документе, с соединениями, описанными выше в разделе В.

В некоторых или любых вариантах осуществления представлено соединение формулы (3000):

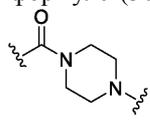


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомер или производное, где D выбирается из

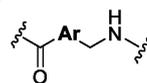


формулы (а), где оба R<sup>x</sup> в формуле (а) представляет собой водород; R<sup>4</sup> представляет собой алкил, арил, ариалкил или N-содержащий гетероциклоалкил; и SP представляет собой -C(O)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен-C(O)-, -C(O)-N(C<sub>1-6</sub>алкил)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен-X<sup>1</sup>-, где X<sup>1</sup> присоединяется к L в формуле (3000), -C(O)-N(H)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-S-, где S присоединяется к L в формуле (3000), -C(O)-N(C<sub>1-6</sub>алкил)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-S-, где S присоединяется к L в формуле (3000),

где N присоединяется к L в формуле (3000), -CH<sub>2</sub>-NH-,

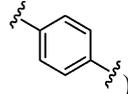


где точка присоединения на правой стороне (т.е. на N) представляет собой к L в формуле (3000),

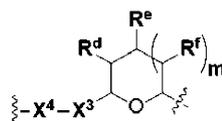


где N присоединяется к L в формуле (3000),

где Ar представляет собой опционально замещенный арилен (в некоторых вариантах осуществле-



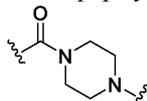
ния) или опционально замещенный гетероарилен, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-NR<sup>50</sup>C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-NR<sup>50a</sup>-, где NR<sup>50a</sup> присоединяется к L в формуле (3000), -C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-NR<sup>50</sup>C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-NR<sup>50a</sup>-, где NR<sup>50a</sup> присоединяется к L в формуле (3000) и где в каждом случае C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен независимо и опционально замещается одной или несколькими гидроксильными группами, -C(O)-N(R<sup>5</sup>)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен-C(O)NH-X<sup>2</sup>-,



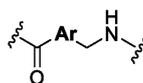
где  $X^2$  присоединяется к L в формуле (3000) или формуле(3000); или

где оба  $R^x$  в формуле (a) представляет собой фтор;  $R^4$  представляет собой алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил; и SP представляет собой  $-C(O)-C_1-C_{10}$ -алкилен- $C(O)-$ ,  $-C(O)-N(C_{1-6}$ алкил)- $C_1-C_{10}$ -алкилен- $X^{1b}$ -

где  $X^{1b}$  присоединяется к L в формуле (3000),  $-C(O)-N(H)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $X^{1b}$ -, где  $X^{1b}$  присоеди-

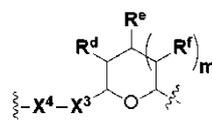


няется к L в формуле (3000), где точка присоединения на правой стороне (т.е. На N) представляет собой к L в формуле (3000),  $-CH_2-NH-$ ,



где N присоединяется к L в формуле (3000), где N присоединяется к L в формуле (3000) и где Ag представляет собой опционально замещенный арилен (в некоторых вариантах осуществ-

ления или опционально замещенный гетероарилен,  $-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50a}$ -, где  $NR^{50a}$  присоединяется к L в формуле (3000),  $-C(O)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50a}$ -, где  $NR^{50a}$  присоединяется к L в формуле (3000) и где в каждом случае  $C_1-C_{10}$ -алкилен независимо и опционально замещается одной или несколькими гидрокси-,  $-C(O)-N(R^5)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $C(O)NH-X^2$ -



где  $X^2$  присоединяется к L в формуле (3000) или формуле (3000); и

b) соединения в вышеприведенной табл. А, где соединения в табл. А соединены с ВА Соединения формулы (3000) через гидрокси  $-C(O)CH_2OH$  группы, т.е. посредством  $-C(O)CH_2-O-SP-L-$  или через гидрокси Мапракората, т.е. посредством  $-O-SP-L-$ :

$X^1$  представляет собой  $-N(C_{1-6}$ алкил)-;

$X^{1b}$  представляет собой  $-S-$ ,  $-NH-$  или  $-N(C_{1-6}$ алкил)-;

$X^2$  представляет собой  $-NH-$ ;

$X^3$  представляет собой  $-CH_2-$ ,  $X^3$  представляет собой  $-CH_2-O-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $C(O)-$ , где  $C(O)$  присоединяется к  $X^4$  или  $X^3$  представляет собой  $-C(O)-$ ;  $X^4$  представляет собой  $-O-$ ;

$R^5$  представляет собой H,  $-OH$ ,  $-OCH_3$  или  $C_{1-6}$ алкил;

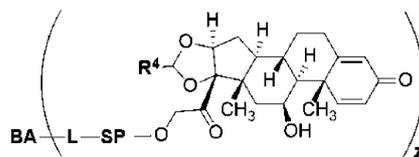
$R^{50}$  и  $R^{50a}$  представляет собой независимо водород или  $C_1-C_6$ -алкил;

$R^d$ ,  $R^e$  и  $R^f$  представляет собой независимо  $-H$ ,  $-OH$ , гидроксиалкил, алкоксикарбонил,  $-C(O)OH$  или  $-CH_2OR^g$ , где в каждом случае  $R^g$  представляет собой независимо  $-CH_2C(O)OH$  или  $-CH_2C(O)O$ (алкил); и m представляет собой 0 или 1;

z представляет собой целое число, выбранное из 1-30, включительно;

L представляет собой линкер; и ВА представляет собой связующий агент.

В некоторых или любых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III-P):

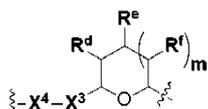


(III-P);

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомер или производное, где

$R^4$  представляет собой алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил;

SP представляет собой  $-C(O)-C_1-C_{10}$ -алкилен- $C(O)-$ ,  $-C(O)-N(C_{1-3}$ алкил)- $C_1-C_{10}$ -алкилен- $X^1$ -, где  $X^1$  присоединяется к L в формуле (III),  $-C(O)-N(R^5)-C_1-C_{10}$ -алкилен- $C(O)NH-X^2$ -, где  $X^2$  присоединяется к L

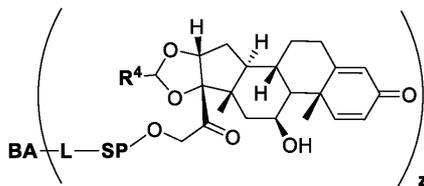


в формуле (III) или  $\text{---X}^4\text{---X}^3$ , где  $\text{X}^4$  присоединяется к L в формуле (III);  $\text{X}^1$  представляет собой  $-\text{N}(\text{C}_{1-3}\text{алкил})-$ ;  $\text{X}^2$  представляет собой  $-\text{NH}-$ ;  $\text{X}^3$  представляет собой  $-\text{CH}_2-$ ,  $\text{X}^3$  представляет собой  $-\text{CH}_2-\text{O}-$  ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ -алкилен)- $\text{C}(\text{O})-$ , где  $\text{C}(\text{O})$  присоединяется к  $\text{X}^4$  или  $\text{X}^3$  представляет собой  $-\text{C}(\text{O})-$ ;  $\text{X}^4$  представляет собой  $-\text{O}-$ ;

$\text{R}^5$  представляет собой H,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_3$  или алкил;  $\text{R}^d$ ,  $\text{R}^e$  и  $\text{R}^f$  представляет собой независимо  $-\text{H}$ ,  $-\text{OH}$ , гидроксиалкил, алкоксикарбонил,  $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$  или  $-\text{CH}_2\text{OR}^g$ , где в каждом случае  $\text{R}^g$  представляет собой независимо  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OH}$  или  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{алкил})$ ; и m представляет собой 0 или 1;

z представляет собой целое число, выбранное из 1-30, включительно; L представляет собой линкер; и BA представляет собой связующий агент.

В некоторых или любых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III-P-1):

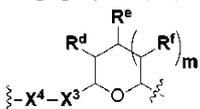


(III-P-1);

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомер или производное, где:

$\text{R}^4$  представляет собой алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил;

SP представляет собой  $-\text{C}(\text{O})-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ -алкилен- $\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{C}_{1-3}\text{алкил})-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ -алкилен- $\text{X}^1-$ , где  $\text{X}^1$  присоединяется к L в формуле (III),  $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{R}^5)-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ -алкилен- $\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{X}^2-$ , где  $\text{X}^2$  присоединяется к L



в формуле (III) или  $\text{---X}^4\text{---X}^3$ , где  $\text{X}^4$  присоединяется к L в формуле (III);

$\text{X}^1$  представляет собой  $-\text{N}(\text{C}_{1-3}\text{алкил})-$ ;

$\text{X}^2$  представляет собой  $-\text{NH}-$ ;

$\text{X}^3$  представляет собой  $-\text{CH}_2-$ ,  $\text{X}^3$  представляет собой  $-\text{CH}_2-\text{O}-$  ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ -алкилен)- $\text{C}(\text{O})-$ , где  $\text{C}(\text{O})$  присоединяется к  $\text{X}^4$ , или  $\text{X}^3$  представляет собой  $-\text{C}(\text{O})-$ ;

$\text{X}^4$  представляет собой  $-\text{O}-$ ;

$\text{R}^5$  представляет собой H,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_3$  или алкил;

$\text{R}^d$ ,  $\text{R}^e$  и  $\text{R}^f$  представляет собой независимо  $-\text{H}$ ,  $-\text{OH}$ , гидроксиалкил, алкоксикарбонил,  $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$  или  $-\text{CH}_2\text{OR}^g$ , где в каждом случае  $\text{R}^g$  представляет собой независимо  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OH}$  или  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{алкил})$ ; и m представляет собой 0 или 1;

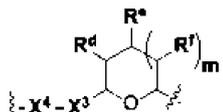
z представляет собой целое число, выбранное из 1-30, включительно; L представляет собой линкер; и BA представляет собой связующий агент.

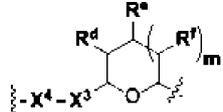
В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где  $\text{R}^4$  представляет собой алкил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой не циклоалкил. В некоторых из этих вариантов осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой линейный или разветвленный алкил. В некоторых из этих вариантов осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой арил. В некоторых из этих вариантов осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой арилалкил. В некоторых из этих вариантов осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой N-содержащий гетероциклоалкил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой алкил, такой как, помимо прочего, метил, этил, пропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил или нонил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой метил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой этил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой n-пропил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой i-пропил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой n-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой i-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой t-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой втор-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой пентил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой гексил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой гептил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой октил или нонил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой арил, такой как, помимо прочего, фенил, фенол или нафтил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой фенил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой нафтил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой гетероарил - такой как, помимо прочего, тиенил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой арилалкил - такой как, помимо прочего, бензил. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^4$  представляет собой N-



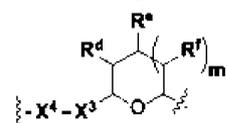




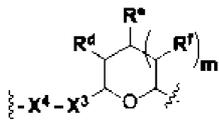
ставлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где SP представляет собой  и X<sup>3</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-C(O)-, где C(O) присоединяется к X<sup>4</sup>. В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где SP представ-

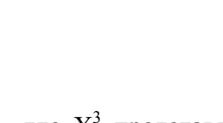
ляет собой  и X<sup>3</sup> представляет собой -C(O)-. В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где R<sup>d</sup>, R<sup>e</sup> и R<sup>f</sup> представляет собой независимо -H, -OH, гидроксиалкил, алкоксикарбонил, -C(O)OH или -CH<sub>2</sub>OR<sup>8</sup>, где в каждом случае R<sup>8</sup> независимо -CH<sub>2</sub>C(O)OH или -CH<sub>2</sub>C(O)O(алкил). В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где R<sup>d</sup> и R<sup>e</sup> представляет собой независимо -H или -OH. В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где m представляет собой 0. В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где m представляет собой 1. В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где m представляет собой 1 и R<sup>f</sup> представляет собой -H или -OH.

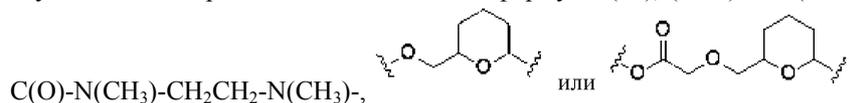
В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где оба R<sup>x</sup> представляют собой водород и SP представляет собой -C(O)-N(C<sub>1-3</sub>-алкил)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен-X<sup>1</sup>-, где X<sup>1</sup> присоединяется к L<sup>3</sup> в формуле (III), (III-P) или (III-P-1); SP представляет собой



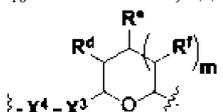
, где X<sup>3</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>-, m равно 1, и R<sup>d</sup>, R<sup>e</sup> и R<sup>f</sup> представляет собой -H;

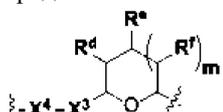


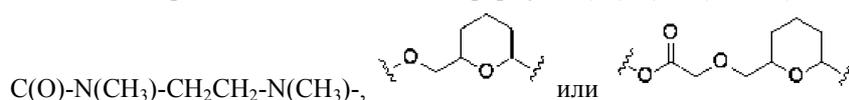
или SP представляет собой , где X<sup>3</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-C(O)-, где C(O) присоединяется к X<sup>4</sup>, m представляет собой 1, и R<sup>d</sup>, R<sup>e</sup> и R<sup>f</sup> -H. В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где SP представляет собой -



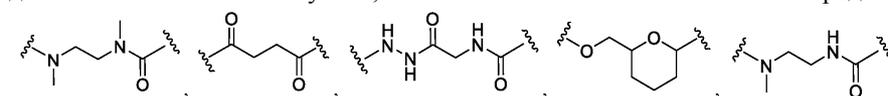
В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где оба R<sup>x</sup> представляют собой фтор и SP представляет собой -C(O)-N(C<sub>1-3</sub>-алкил)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен-X<sup>1</sup>-, где

X<sup>1</sup> присоединяется к L<sup>3</sup> в формуле (III), (III-P) или (III-P-1); SP представляет собой , где X<sup>3</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>-, m равно 1, и R<sup>d</sup>, R<sup>e</sup> и R<sup>f</sup> представляет собой -H; или SP представляет

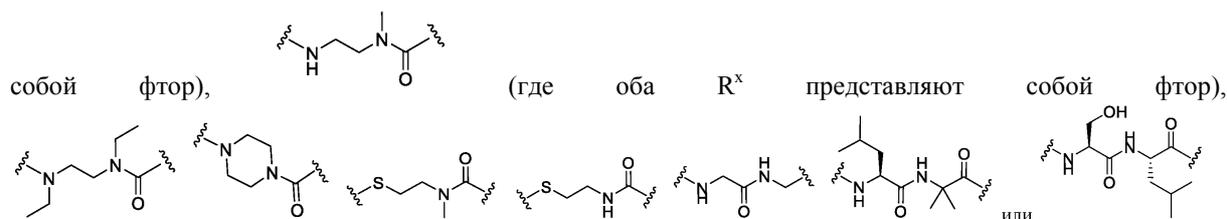
собой , где X<sup>3</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-C(O)-, где C(O) присоединяется к X<sup>4</sup>, m представляет собой 1, и R<sup>d</sup>, R<sup>e</sup> и R<sup>f</sup> представляет собой -H. В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где SP представляет собой -



В некоторых вариантах осуществления представлено соединение с формулой (III), где оба R<sup>x</sup> представляют собой фтор или оба R<sup>x</sup> представляют собой водород или R<sup>x</sup> соответствует тому, что описано в данном пункте; SP представляет собой



(где оба R<sup>x</sup> представляют

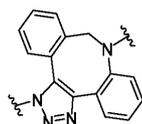


В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где  $z$  представляет собой 1. В определенных вариантах осуществления  $z$  равен 2. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 3. В определенных вариантах осуществления  $z$  равен 4. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 5. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 6. В определенных вариантах осуществления  $z$  равен 7. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 8. В определенных вариантах осуществления  $z$  равен 9. В некоторых вариантах осуществления  $z$  равен 10. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 11. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 12. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 13. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 14. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  представляет собой 15. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 16. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 17. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 18. В определенных вариантах осуществления  $z$  равен 19. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  представляет собой 20. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 21. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 22. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 23. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 24. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 25. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 26. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 27. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 28. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 29. В некоторых других вариантах осуществления  $z$  равен 30. В некоторых вариантах осуществления  $z$  представляет собой целое число, выбранное из 1-15, включительно. В определенных вариантах осуществления  $z$  выбирается из 1-10. В определенных вариантах осуществления  $z$  выбирается из 1-5. В определенных вариантах осуществления  $z$  выбирается из 2-4.

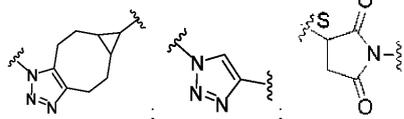
В некоторых вариантах осуществления  $-L-$  или  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}-$  в формуле (III), (III-P) или (III-P-1) означает любую двухвалентную группу или фрагмент, который связывается или соединяется со связующим агентом (например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом) с соединением-нагрузкой, представленным в настоящем документе (например, стероидом). В общем, подходящие  $-L-$  и  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}-$  для описанных здесь конъюгатов антител представляет собой те, которые являются достаточно стабильными для использования периода полужизни в кровотоке антитела и в то же время способными высвобождать свою нагрузку после антиген-опосредованной интернализации конъюгата. Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Расщепляемые линкеры представляет собой линкеры, которые расщепляются посредством внутриклеточного метаболизма после интернализации, например, расщепления через гидролиз, восстановления или ферментной реакции. Нерасщепляемые линкеры представляет собой линкеры, которые высвобождают присоединенную нагрузку через лизосомную деградацию антитела после интернализации. Подходящие линкеры включают, помимо прочего, кислотолabile линкеры, гидролизлабильные линкеры, расщепляемые под воздействием ферментов линкеры, редукционно-лабильные линкеры, саморасщепляющиеся линкеры и нерасщепляемые линкеры. Подходящие линкеры также включают, помимо прочего, линкеры, которые представляют собой или содержат глюкурониды, сукцинимид-тиоэфиры, полиэтиленгликольные (PEG) звенья, гидразоны, мал-капроильные звенья, дисульфидные звенья (например,  $-S-S-$ ,  $-S-C(R^{1b}R^{2b})-$ , где  $R^{1b}$  и  $R^{2b}$  представляет собой независимо водород или гидрокарбил), карбаматные звенья, пара-амино-бензильные звенья (PAB), фосфатные звенья, например, моно-, бис- или трис-фосфатные звенья, пептиды, например, пептидные звенья, содержащие два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или более аминокислотных звеньев, включая, помимо прочего, звенья валин-цитруллина, звенья валин-аланина, звенья валин-аргинина, звенья валин-лизина, звенья лизин-валин-цитруллина и звенья лизин-валин-аланина. В некоторых вариантах осуществления  $-L-$  и  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}-$  получают от реакции "реактивной группы" (RG) с формулой (II) (и ее вариантами осуществления) с реактивной частью антитела. Соединительной группой является любой двухвалентный фрагмент, который соединяет ВА с нагрузкой. Соединительной группой также может быть любой трехвалентный фрагмент, который соединяет ВА, нагрузку и циклодекстриновый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления  $-L-$  и  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}-$  являются трехвалентными и включают циклодекстриновый фрагмент, связанный с трехвалентной группой (например, лизиновым остатком) в соединительной группе.  $-L-$  и  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}-$  содержат остаток реактивной группы, который является функциональной группой или фрагментом, который вступает в реакцию с реактивной частью антитела, модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1),

где L и  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ - содержат



или региоизомер или смесь его изомеров;

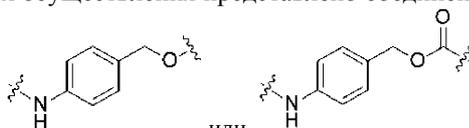


или стереоизомер или смесь его стереоизомеров, где S означает S атом

на цистеиновом остатке, через который остаток реактивной группы присоединяется к ВА; или где N означает N атом на лизиновом остатке, через который остаток реактивной группы присоединяется к ВА.

В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1),

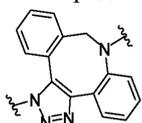
где L и  $-L^1-L^2-L^3$ - содержат



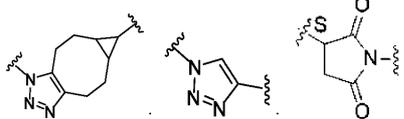
или

В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1),

где L и  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ - содержат

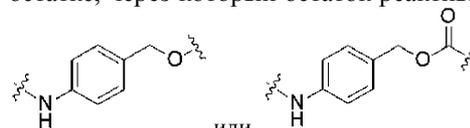


или региоизомер или смесь его изомеров;



или стереоизомер или смесь его стереоизомеров, где S означает S атом на цистеиновом остатке, через который остаток реактивной группы присоединяется к ВА; или

где N означает N атом на лизиновом остатке, через который остаток реактивной группы присоединяется к ВА; и L и  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ - содержат

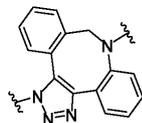


или

В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где L представляет собой  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ . В некоторых вариантах осуществления  $L^3$  присутствует. В некоторых вариантах осуществления  $L^3$  отсутствует.

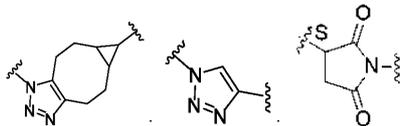
В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1),

где L представляет собой  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ - и  $L^1$  выбирается из



или региоизомера или смеси его

изомеров;

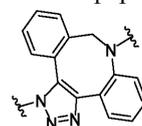


или стереоизомера или смеси его стереоизомеров, где S

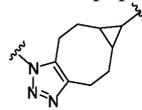
означает S атом на цистеиновом остатке, через который остаток реактивной группы присоединяется к

ВА; и где N означает N атом на лизиновом остатке, через который остаток реактивной группы присоединяется к ВА. В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III),

(III-P) или (III-P-1), где L представляет собой  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ - и  $L^1$  представляет собой

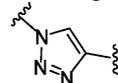


В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1),



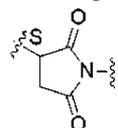
где L представляет собой  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ - и  $L^1$  представляет собой

В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1),



где L представляет собой  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ - и  $L^1$  представляет собой

В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1),



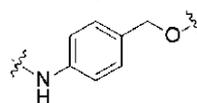
где L представляет собой  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ - и  $L^1$  представляет собой

В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1),

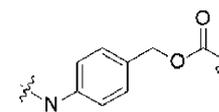


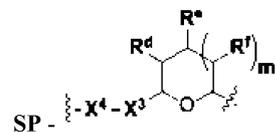
где L представляет собой  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ - и  $L^1$  представляет собой

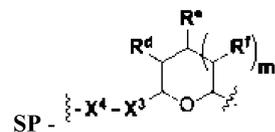
В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1),

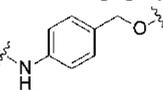


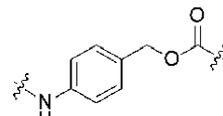
где L представляет собой  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ - и  $L^3$  представляет собой , где NH группа присоединяется к  $L^2$ , когда SP представляет собой  $-C(O)-C_1-C_{10}$ -алкилен- $C(O)-$ ; или  $L^3$  представляет собой

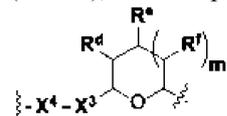
, где NH группа присоединяется к  $L^2$ , когда SP представляет собой  $-C(O)-N(C_{1-3}\text{алкил})-C_1-C_{10}$ -алкилен- $X^1$ - или  $-C(O)-N(R^5)-C_1-C_{10}$ -алкилен- $C(O)NH-X^2$ -; или  $L^3$  не присутствует, когда



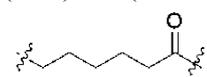
SP - . В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III),

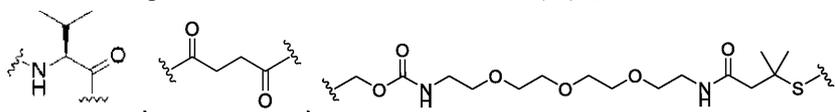
(III-P) или (III-P-1), где L представляет собой  $-L^1-L^2-(L^3)$ - и  $L^3$  представляет собой , где NH группа присоединяется к  $L^2$ , когда SP представляет собой  $-C(O)-C_1-C_{10}$ -алкилен- $C(O)-$ . В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где L представляет

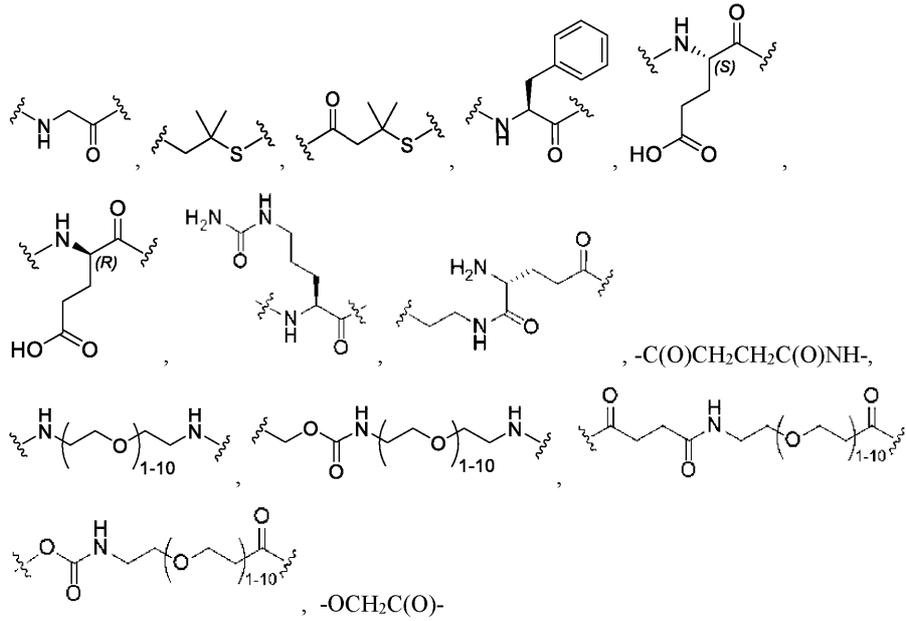
собой  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ - и  $L^3$  представляет собой , где NH группа присоединяется к  $L^2$ , когда SP представляет собой  $-C(O)-N(C_{1-3}\text{алкил})-C_1-C_{10}$ -алкилен- $X^1$ -или  $-C(O)-N(R^5)-C_1-C_{10}$ -алкилен- $C(O)NH-X^2$ -. В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где L представляет собой  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ - и  $L^3$  не присутствует, когда SP представляет собой



В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1),

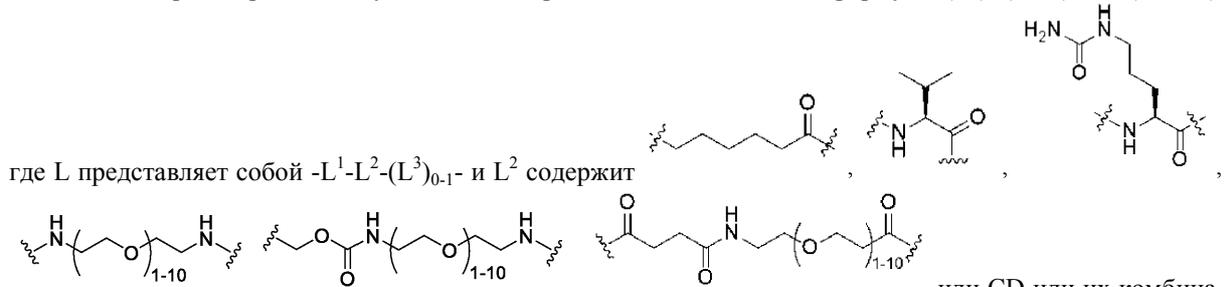
где L представляет собой  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ - и  $L^2$  содержит ,





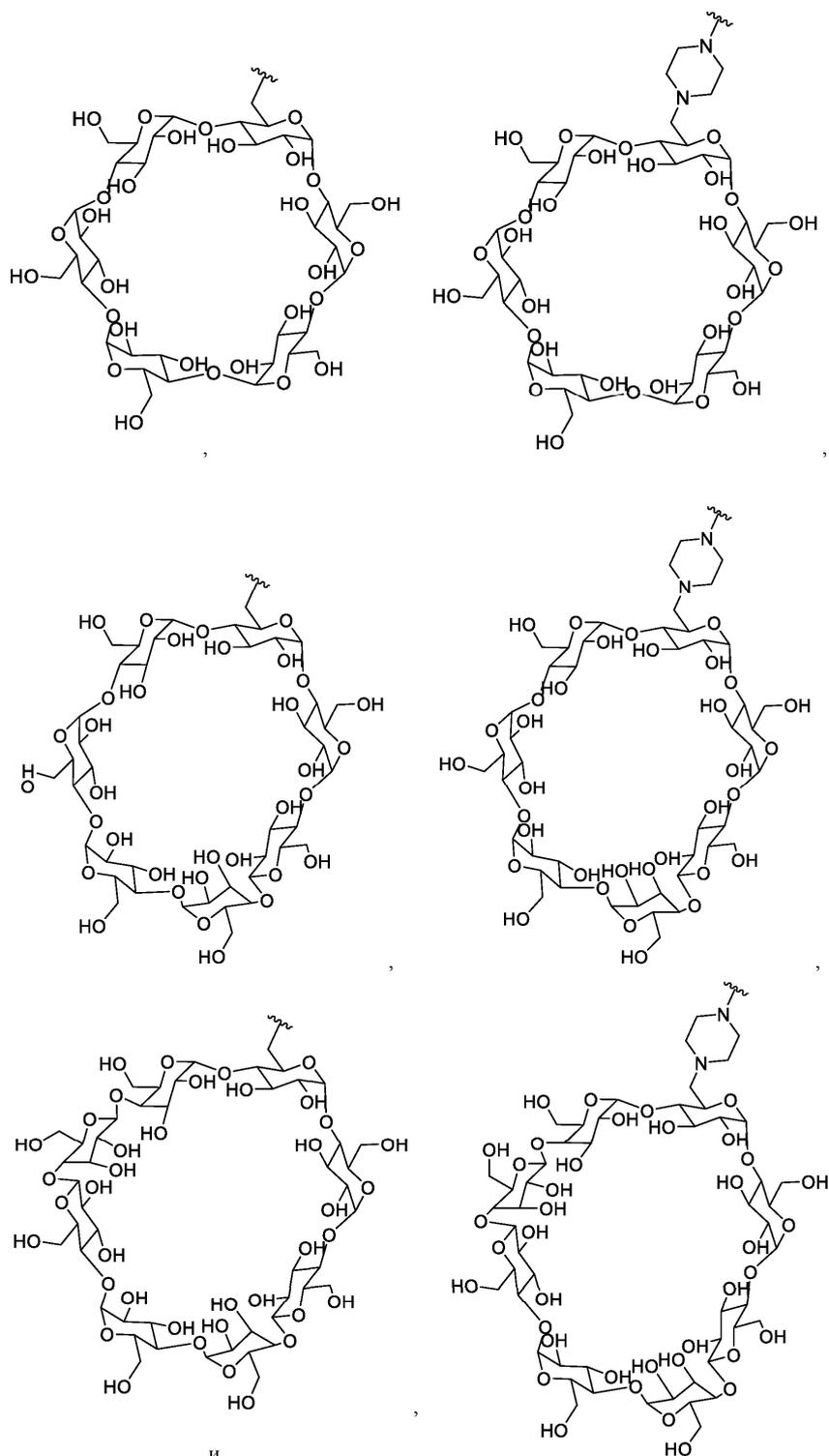
или циклодекстриновый остаток (CD); или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1),



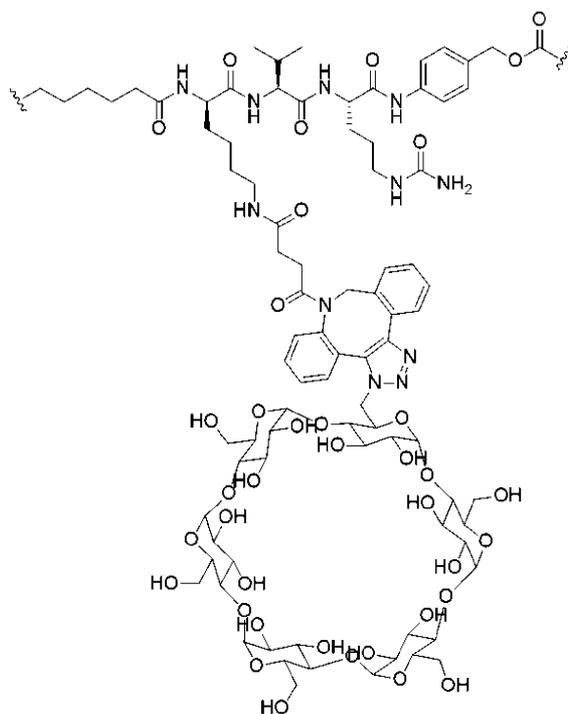
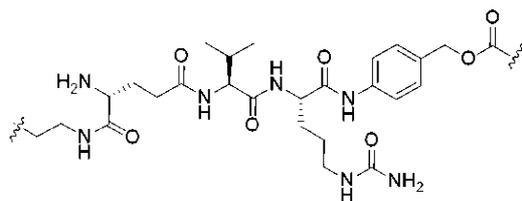
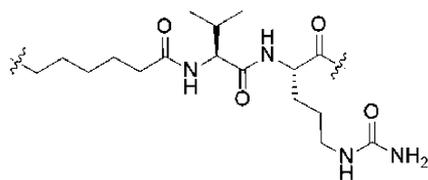
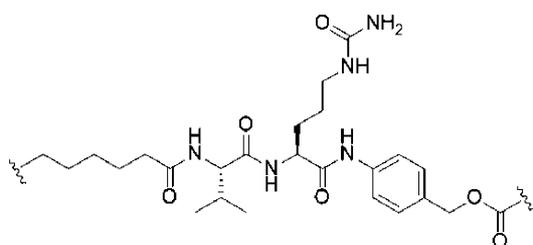
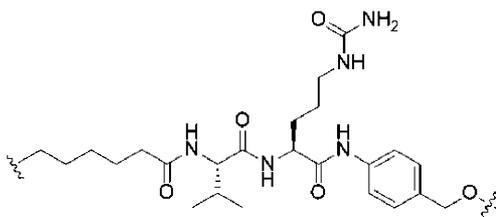
где L представляет собой  $-\text{L}^1-\text{L}^2-(\text{L}^3)_{0-1}-$  и  $\text{L}^2$  содержит

или CD или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где L представляет собой  $-\text{L}^1-\text{L}^2-(\text{L}^3)_{0-1}-$  и  $\text{L}^2$  содержит CD, где CD выбирается из группы, состоящей из

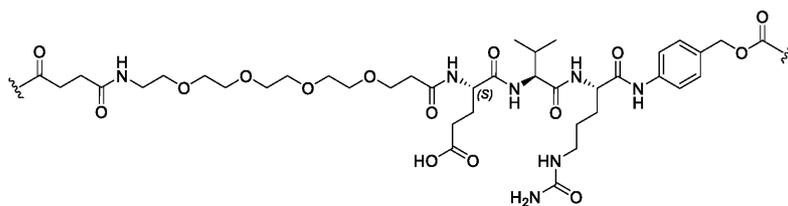
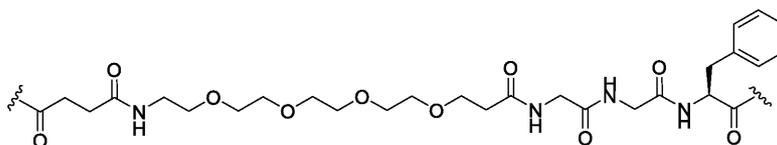
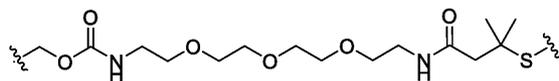
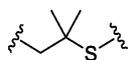
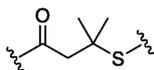
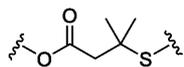
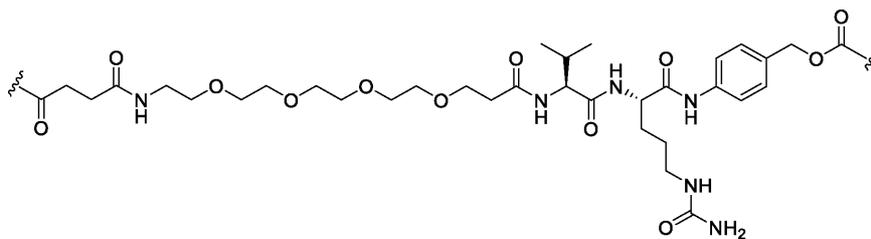


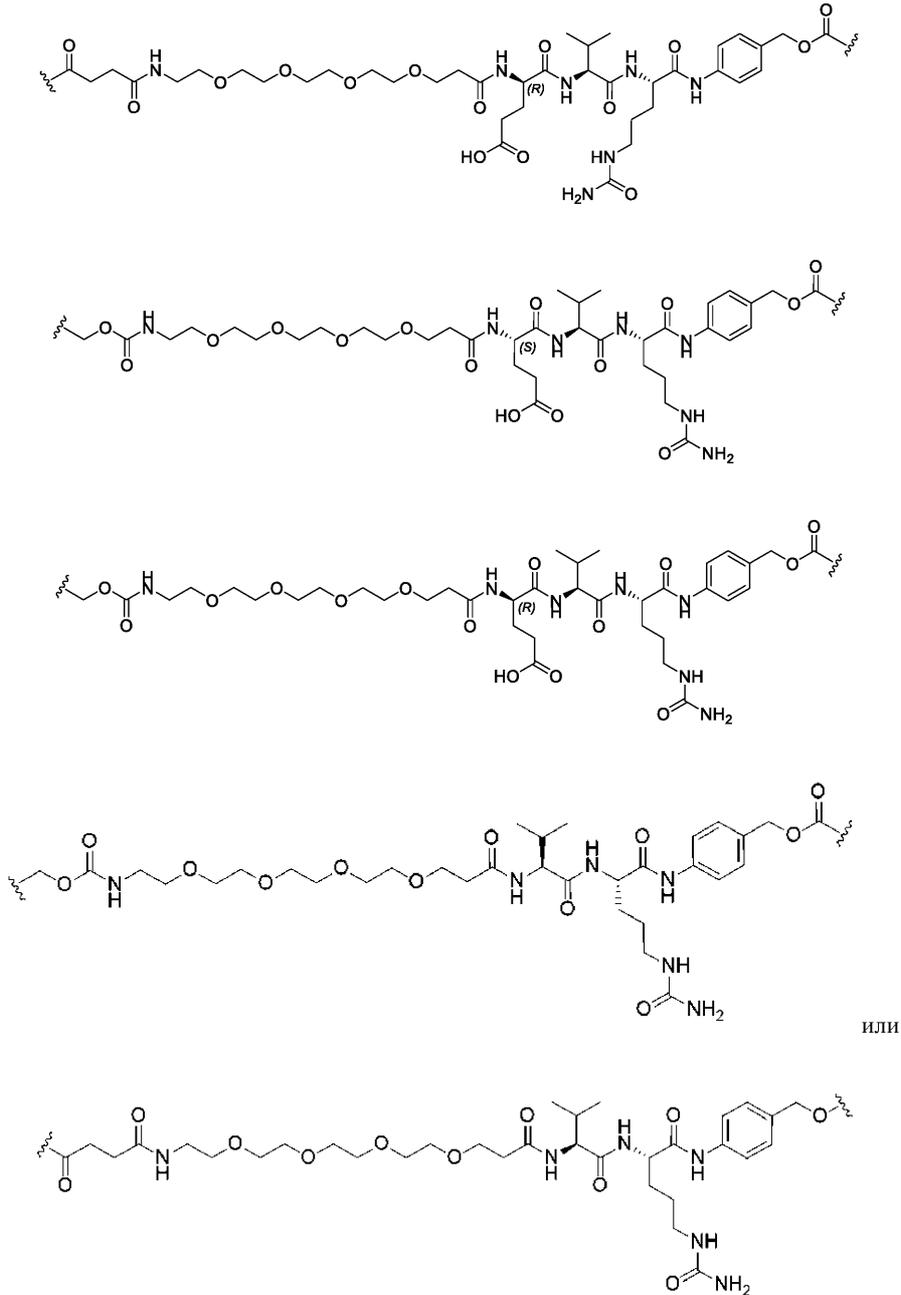
и  
 В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1), где L представляет собой  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}-$  и  $-L^2-(L^3)_{0-1}-$  содержат

045111

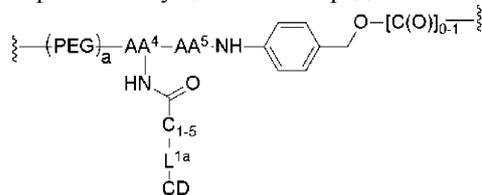


045111





В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (III), (III-P) или (III-P-1),

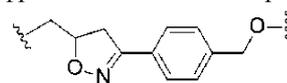


где  $L^2$  содержит ;  $L^{1a}$  представляет собой остаток реактивной группы; CD представляет собой циклодекстрин;  $AA^4$  представляет собой трехвалентный линкер;  $AA^5$  представляет собой пептидный остаток; PEG представляет собой полиэтиленгликоль;  $a$  представляет собой целое число, которые выбирается от 0 до 5, включительно.

В некоторых вариантах осуществления  $AA^4$  представляет собой аминокислотный остаток;  $AA^5$  представляет собой дипептидный остаток, трипептидный остаток, тетрапептидный остаток или пентапептидный остаток; PEG представляет собой полиэтиленгликольный остаток; где обозначает атом, через который указанная химическая группа связывается с примыкающими группами в формуле, CD, независимо в каждом случае, отсутствует или является циклодекстриновым остатком, где присутствует минимум один CD, индекс  $a$  представляет собой целое число, которые выбирается от 0 до 5, включительно; в этих примерах индекс  $a$  равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления индекс

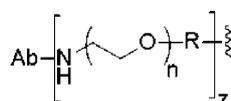
а равен 0. В некоторых вариантах осуществления индекс а равен 1. В некоторых вариантах осуществления индекс а равен 2. В некоторых вариантах осуществления индекс а равен 3. В некоторых вариантах осуществления индекс а равен 4. В некоторых вариантах осуществления индекс а равен 5. В некоторых вариантах осуществления любой из AA<sup>4</sup> или AA<sup>5</sup> содержит, независимо в каждом случае, аминокислоту, которая выбирается из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, триптофана, фенилаланина, пролина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина или цитруллина, их производного или их комбинации. В определенных вариантах осуществления AA<sup>4</sup> представляет собой аминокислота, которая выбирается из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, триптофана, фенилаланина, пролина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина или цитруллина, их производного или их комбинации. В определенных вариантах осуществления AA<sup>4</sup> представляет собой лизин или производное лизина. В определенных вариантах осуществления AA<sup>4</sup> представляет собой D-лизин. В определенных вариантах осуществления AA<sup>4</sup> представляет собой L-лизин. В определенных вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой дипептидный остаток. В определенных вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой валин-глицин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой глицин-валин. В определенных вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой трипептидный остаток. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой глутамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой глутамин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой лизин-валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой лизин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой глутамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой тетрапептидный остаток. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой глицин-глицин-фенилаланин-глицин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой тетрапептидный остаток. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой глицин-глицин-глицин-глицин-глицин.

В определенных вариантах осуществления остаток реактивной группы получают от реакции RG с цистеиновым или лизиновым остатком антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных вариантах осуществления остаток реактивной группы получают от реакции клик-химии. В некоторых вариантах осуществления указанной реакции клик-химии L<sup>1</sup> получают от реакции 1,3 циклоприсоединения между алкином и азидом. Неограничивающие примеры такого остатка реактивной группы включают остатки, полученные от напряженных алкинов, например, остатки, подходящие для промотированных напряжением алкин-азидных циклоприсоединений (SPAAC), циклоалкинов, например, циклооктинов, бензанилированных алкинов и алкинов, способных вступать в реакции 1,3 циклоприсоединения с азидами в отсутствие катализаторов на основе меди. Подходящие L<sup>1</sup> также включают, помимо прочего, фрагменты, полученные от DIBAC (где -C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)- часть фрагмента DIBAC накрывается



L<sup>2</sup>), DIBO (где -O- часть фрагмента DIBO накрывается L<sup>2</sup>), BARAC (где часть фрагмента BARAC накрывается L<sup>2</sup>), замещенных алкинов, например, фторированных алкинов, азациклоалкинов, BCN и их производных. Конъюгаты, содержащие такие остатки реактивной группы, могут быть получены от антител, которые были функционализированы с азидогруппами. Такие функционализированные антитела включают антитела, функционализированные с азидо-полиэтиленгликольными группами. В определенных вариантах осуществления такое функционализированное антитело получают от реакции антитела, содержащего минимум один глутаминовый остаток, с соединением с формулой H<sub>2</sub>N-LL-N<sub>3</sub>, где LL представляет собой двухвалентная полиэтиленгликольная группа, в присутствии фермента трансглутаминазы, например, микробной трансглутаминазы. Подходящие глутаминовые остатки антитела включают Q295 или те, которые получают посредством инсерции или мутации, например, мутации N297Q.

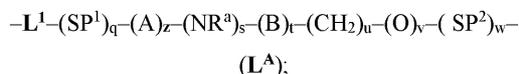
В некоторых вариантах осуществления ВА описанных здесь конъюгатов представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления описанные здесь конъюгаты получают от азидо-функционализированных антител. В определенных вариантах осуществления ВА описанных здесь конъюгатов представляет собой:



где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, n представляет собой целое число, которое выбирают от 1 до 10, включительно, z представляет собой число линкер-нагрузок и

ξ представляет собой связь с L или  $-L^1-L^2-(L^3)_{0,1}$ -, например, связь с фрагментом, полученным от реакции 1,3-циклоприсоединения между алкином и азидом. В определенных вариантах осуществления z представляет собой 3. В определенных вариантах осуществления z представляет собой 2 или 4, т.е. конъюгат содержит 2 или 4 линкер-нагрузки.

В некоторых вариантах осуществления  $-L-$  и  $-L^1-L^2-L^3-$  представляет собой двухвалентный фрагмент формулы (L<sup>A</sup>)



где L<sup>1</sup> соответствует приведенному здесь определению;

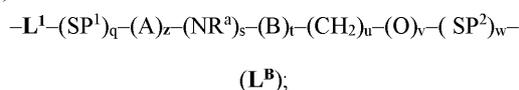
A представляет собой аминокислота или пептид;

R<sup>a</sup> представляет собой H или алкил;

B представляет собой арил, гетероарил или гетероциклоалкил, где арил, гетероарил или гетероциклоалкил опционально замещается алкилом, -OH или  $-NR^aR^b$ ;

SP<sup>1</sup> и SP<sup>2</sup> независимо являются спейсерными группами; и q, z, s, t, u, v и w, независимо в каждом случае, 0 или 1.

В некоторых других вариантах осуществления  $-L-$  и  $-L^1-L^2-(L^3)_{0,1}$ - представляет собой трехвалентный фрагмент с формулой (L<sup>B</sup>)



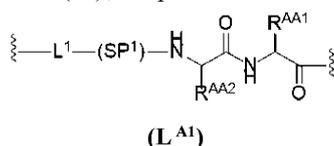
где L<sup>1</sup> соответствует приведенному здесь определению; A представляет собой трипептид или тетрапептид, где минимум одна из аминокислот в трипептиде или тетрапептиде связывается напрямую или опосредованно с циклодекстриновым фрагментом; R<sup>a</sup> представляет собой H или алкил;

B представляет собой арил, гетероарил или гетероциклоалкил, где арил, гетероарил или гетероциклоалкил опционально замещается алкилом, -OH или  $-NR^aR^b$ ; SP<sup>1</sup> и SP<sup>2</sup> независимо являются спейсерными группами; и q, z, s, t, u, v и w, независимо в каждом случае, 0 или 1.

В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин (CD) связывается напрямую с аминокислотным остатком, таким как остаток аминокислоты лизина. Это означает, что CD находится на расстоянии одной связи от ковалентного линкера аминокислоты лизина. В некоторых из этих вариантов осуществления ковалентный линкер также напрямую связывается с нагрузкой. Это означает, что ковалентный линкер находится на расстоянии одной связи от нагрузки, такой как, помимо прочего, описанная здесь стероидная нагрузка. В некоторых из этих вариантов осуществления ковалентный линкер также напрямую связывается с CD. Это означает, что ковалентный линкер на расстоянии одной связи от CD, например, описанных здесь CD. В некоторых из этих вариантов осуществления ковалентный линкер представляет собой аминокислота лизин или ее производное.

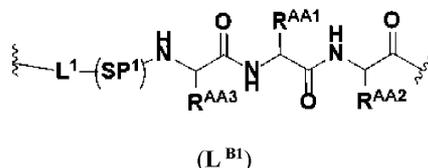
В некоторых вариантах осуществления CD опосредованно связывается с ковалентным линкером в соединительной группе (например, L,  $-L^2-(L^3)_{0,1}$ - и  $-L^1-L^2-(L^3)_{0,1}$ ). Это означает, что CD находится на расстоянии более чем одной связи от ковалентного линкера. Это также означает, что CD связывается через другой фрагмент с ковалентным линкером. Например, CD может связываться с малеимидной группой, которая связывается с полиэтиленгликольной группой, которая связывается с ковалентным линкером. В некоторых из этих вариантов осуществления ковалентный линкер также опосредованно связывается с нагрузкой. Это означает, что ковалентный линкер находится на расстоянии более чем одной связи от нагрузки, такой как, помимо прочего, описанная здесь стероидная нагрузка. Это также означает, что ковалентный линкер связывается через другой фрагмент с нагрузкой. Например, ковалентный линкер может быть связан с дипептидом, таким как, помимо прочего, Val-Ala или Val-Cit, который может быть связан с пара-амино бензоилом, который может быть связан с нагрузкой. В некоторых из этих вариантов осуществления ковалентный линкер также опосредованно связывается с циклодекстрином. Это означает, что ковалентный линкер находится на расстоянии более чем одной связи от циклодекстрина, например, описанных здесь циклодекстринов. Это также означает, что ковалентный линкер связывается через другой фрагмент с циклодекстрином. Например, ковалентный линкер может быть связан с полиэтиленгликольной группой, которая может быть связана с реактивной группой с циклодекстрином. В некоторых из этих вариантов осуществления ковалентный линкер представляет собой аминокислота лизин или ее производное.

В некоторых вариантах осуществления  $-L-$  и  $-L^1-L^2-(L^3)_{0,1}$ - представляет собой  $-L^1-(SP^1)_q-(A)_z-$ . В некоторых вариантах осуществления  $-L-$  и  $-L^1-L^2-(L^3)_{0,1}$ - представляет собой  $-L^1-(SP^1)_q-(A)_z-$ . В некоторых вариантах осуществления  $-L-$  и  $-L^1-L^2-(L^3)_{0,1}$ - представляет собой фрагмент с формулой (L<sup>A1</sup>)



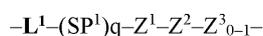
где  $R^{AA1}$  и  $R^{AA2}$  представляет собой в каждом случае, независимо, аминокислотные боковые цепи. В некоторых вариантах осуществления формулы  $L^{A1}$ ,  $SP^1$  представляет собой двухвалентная полиэтиленгликольная группа и  $L^1$  представляет собой продукт реакции 1,3-циклоприсоединения между алкином и азидом.

В некоторых вариантах осуществления  $-L-$  и  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}-$  представляет собой  $-L^1-(SP^1)_q-(A)_z-$ . В некоторых вариантах осуществления  $-L-$  и  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}-$  представляет собой  $-L^1-(SP^1)_q-(A)_2-$ . В некоторых вариантах осуществления  $-L-$  и  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}-$  представляет собой фрагмент с формулой  $(L^{B1})$



где  $R^{AA1}$  и  $R^{AA2}$  представляет собой в каждом случае, независимо, аминокислотные боковые цепи.  $R^{AA3}$  представляет собой аминокислотная боковая цепь, которая связана напрямую или опосредованно с циклодекстрином. В некоторых вариантах осуществления формулы  $L^{B1}$ ,  $SP^1$  представляет собой двухвалентная полиэтиленгликольная группа и  $L^1$  представляет собой продукт реакции 1,3-циклоприсоединения между алкином и азидом.

В некоторых вариантах осуществления  $-L-$  или  $-L^1-L^2-L^3-$  имеет следующую структуру:



где  $L^1$ ,  $SP^1$  соответствуют приведенным здесь определениям;

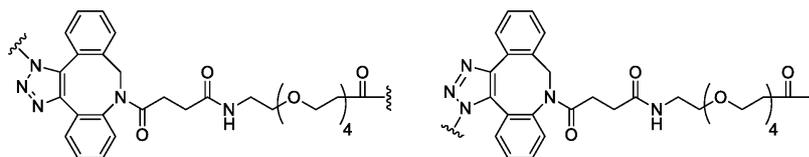
$q$  представляет собой 0 или 1;

$Z^1$  представляет собой полиэтиленгликольная или капроильная группа;

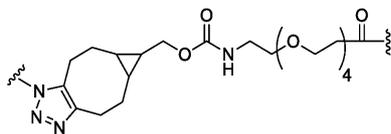
$Z^2$  представляет собой дипептид, трипептид или тетрапептид; и

$Z^3$  представляет собой PAB группа.

В определенных вариантах осуществления  $L^1$  получают от реактивной группы клик-химии и  $Z^1$  представляет собой полиэтиленгликольная группа. В определенных вариантах осуществления  $L^1-(SP^1)_q-$



$Z^1-$  представляет собой это:

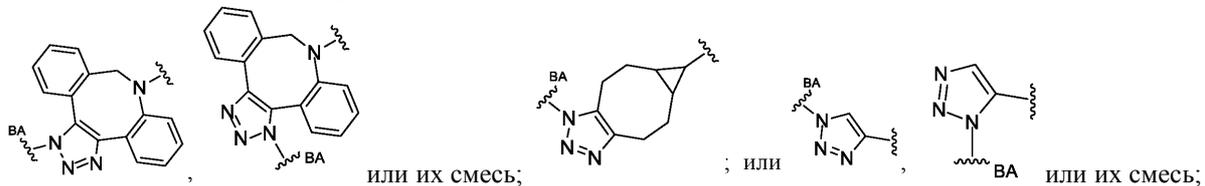


или

их смесь; или

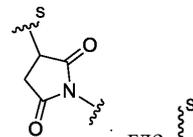
В некоторых вариантах осуществления дипептид представляет собой валин-цитруллин или валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления трипептид представляет собой глутамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления тетрапептид представляет собой глицин-глицин-фенилаланин-глицин.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе  $L^1$  получают от реактивной группы клик-химии. В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  представляет собой:



где  $BA$  представляет собой связь со связывающим агентом.

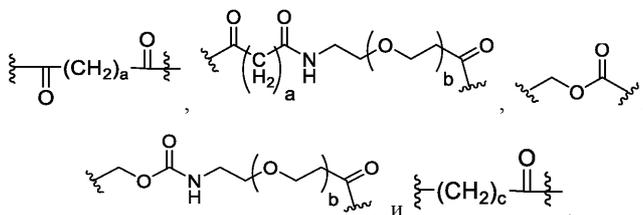
В некоторых других примерах в настоящем документе  $L^1$  выбирают из группы, которая вступает в реакцию с цистеиновым или лизиновым остатком на антителе или на его антигенсвязывающем фрагмен-

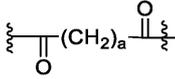


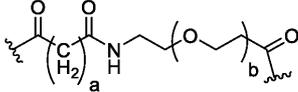
те. В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  представляет собой ; где  $S$  представляет собой связь с цистеином связующего агента, например, антитела. В некоторых вариантах осуществления  $L^1$

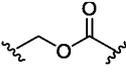
представляет собой 

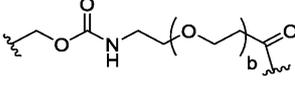
В некоторых вариантах осуществления  $SP^1$  выбирается из:

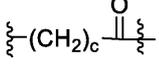


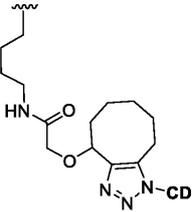
В некоторых вариантах осуществления  $SP^1$  представляет собой . В некоторых дру-

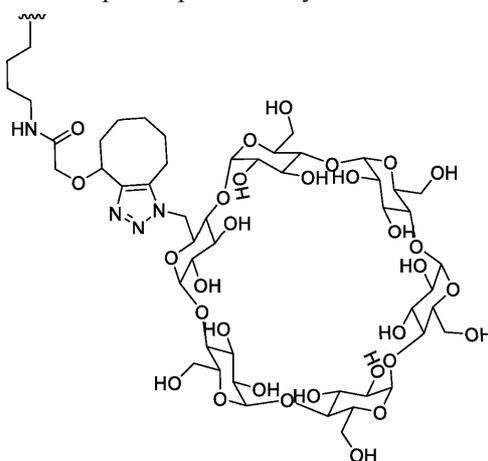
гих примерах  $SP^1$  представляет собой 

В других примерах  $SP^1$  представляет собой 

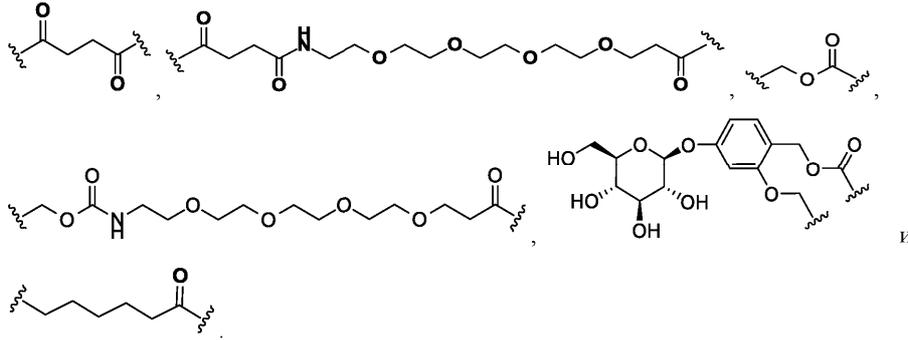
В других примерах  $SP^1$  представляет собой 

В некоторых других примерах  $SP^1$  - . В любых из приведенных выше примеров индексы a, b и c независимо, в каждом случае, являются целым числом, которое выбирается от 1 до 20, включительно.

В некоторых вариантах осуществления  $R^{AA3}$  выбирается из , где CD представляет собой циклодекстриновый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления  $R^{AA3}$  выбирается из

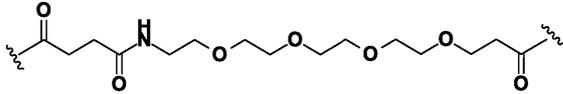


В некоторых вариантах осуществления  $SP^1$  выбирается из:



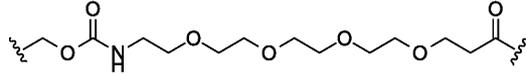
В некоторых вариантах осуществления SP<sup>1</sup> представляет собой

В некоторых вариантах осуществления SP<sup>1</sup> представляет собой

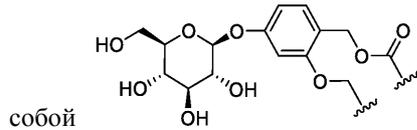


. В некоторых вариантах осуществления SP<sup>1</sup> представ-

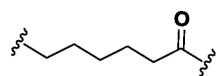
ляет собой В некоторых вариантах осуществления SP<sup>1</sup> представляет собой



. В некоторых вариантах осуществления SP<sup>1</sup> представляет

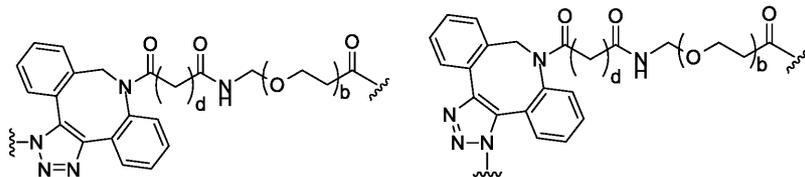


собой . В некоторых вариантах осуществления SP<sup>1</sup> представляет собой

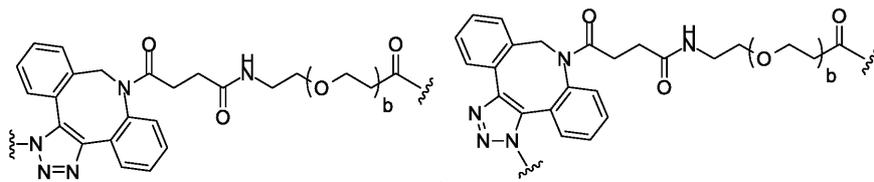


В некоторых вариантах осуществления SP<sup>1</sup> представляет собой

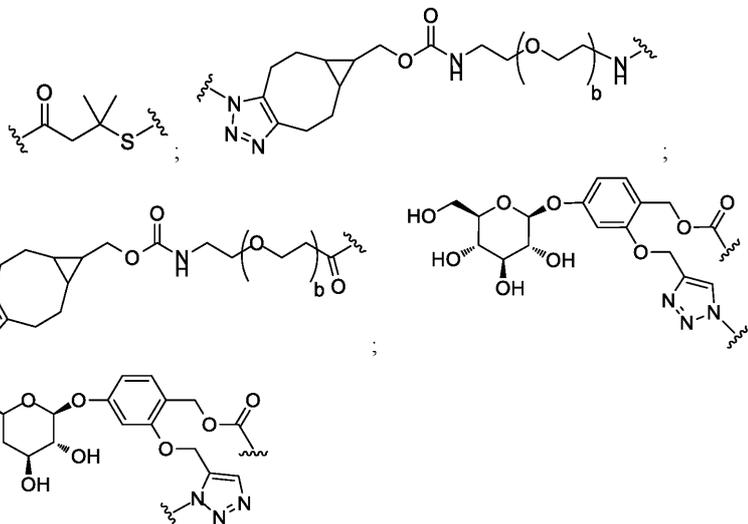
В некоторых вариантах осуществления -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>- содержат:



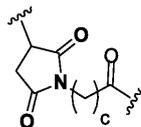
или их смесь;



или их смесь;

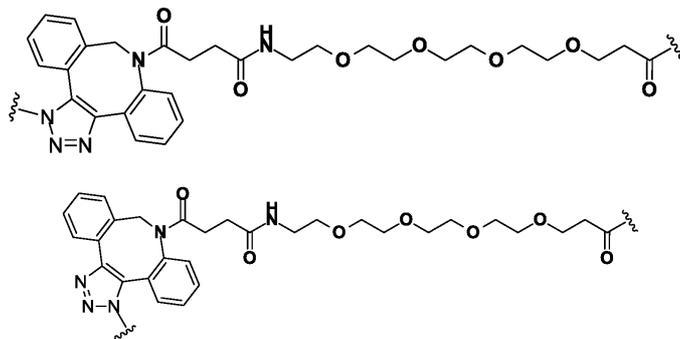


или их смесь; или

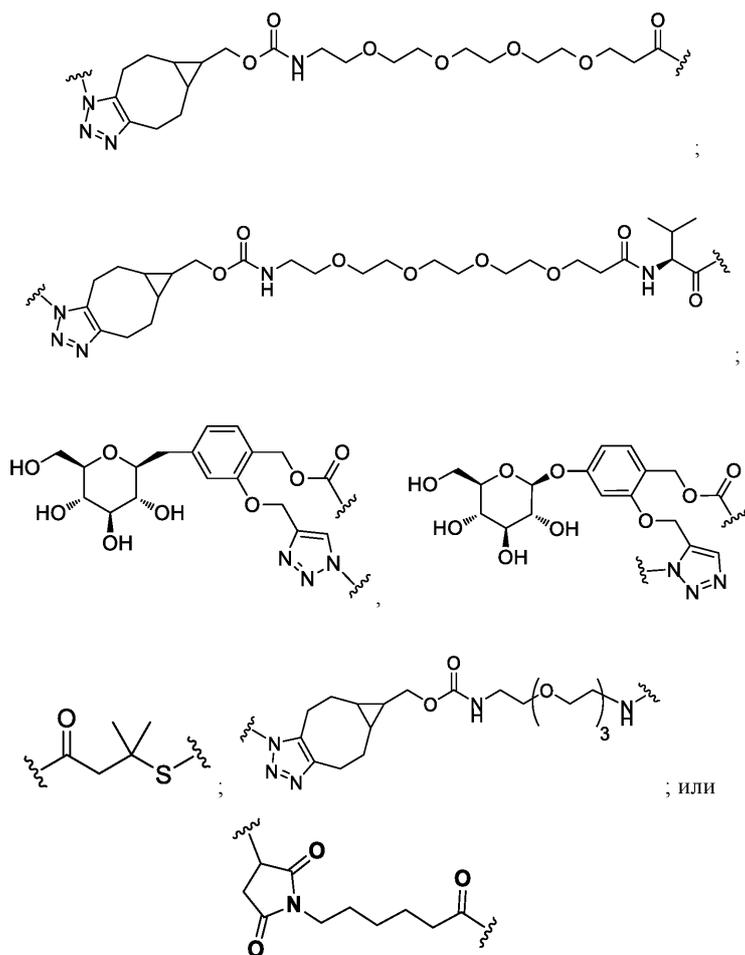


, где  $b$ ,  $c$  и  $d$  независимо, в каждом случае, целое число, которое выбирается от 1 до 20, включительно. В некоторых из этих вариантов осуществления индексы  $b$ ,  $c$  и  $d$  независимо, в каждом случае, являются целым числом, которое выбирается от 1 до 6, включительно.

В некоторых вариантах осуществления  $-SP^1$  выбирается из:



или их смеси;



В некоторых вариантах осуществления А представляет собой пептид, который выбирается из валин-цитруллина, цитруллин-валина, лизин-фенилаланина, фенилаланин-лизина, валин-аспарагина, аспарагин-валина, треонин-аспарагина, аспарагин-треонина, серин-аспарагина, аспарагин-серина, фенилаланин-аспарагина, аспарагин-фенилаланина, лейцин-аспарагина, аспарагин-лейцина, изолейцин-аспарагина, аспарагин-изолейцина, глицин-аспарагина, аспарагин-глицина, глутаминовая кислота-аспарагина, аспарагин-глутаминовой кислоты, цитруллин-аспарагина, аспарагин-цитруллина, аланин-аспарагина или аспарагин-аланина.

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой валин-цитруллин или цитруллин-валин.

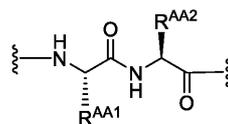
В некоторых вариантах осуществления А представляет собой валин-аланин или аланин-валин.

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой лизин-валин-аланин или аланин-валин-лизин.

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой лизин-валин-цитруллин или цитруллин-валин-лизин.

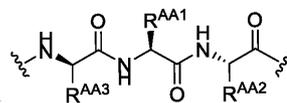
В некоторых вариантах осуществления А представляет собой глутамат-валин-цитруллин или цитруллин-валин- глутамат.

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой валин. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой аланин. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой цитруллин.



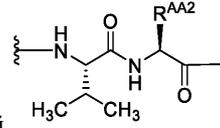
В некоторых вариантах осуществления А представляет собой

В некоторых из этих вариантов осуществления  $R^{AA1}$  представляет собой аминокислотная боковая цепь и где  $R^{AA2}$  представляет собой аминокислотная боковая цепь.

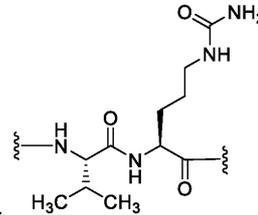


В некоторых вариантах осуществления А представляет собой

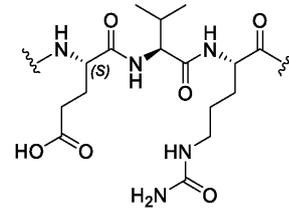
В некоторых вариантах осуществления  $R^{AA1}$  представляет собой аминокислотная боковая цепь,  $R^{AA2}$  представляет собой аминокислотная боковая цепь и  $R^{AA3}$  представляет собой аминокислотная боковая цепь, которая связывается напрямую или опосредованно с циклодекстриновым фрагментом.



В некоторых вариантах осуществления А представляет собой

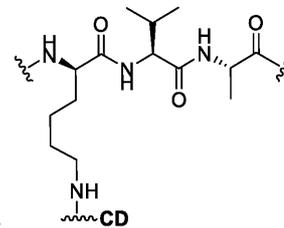
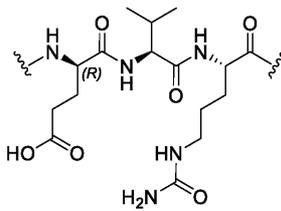


В некоторых вариантах осуществления А представляет собой



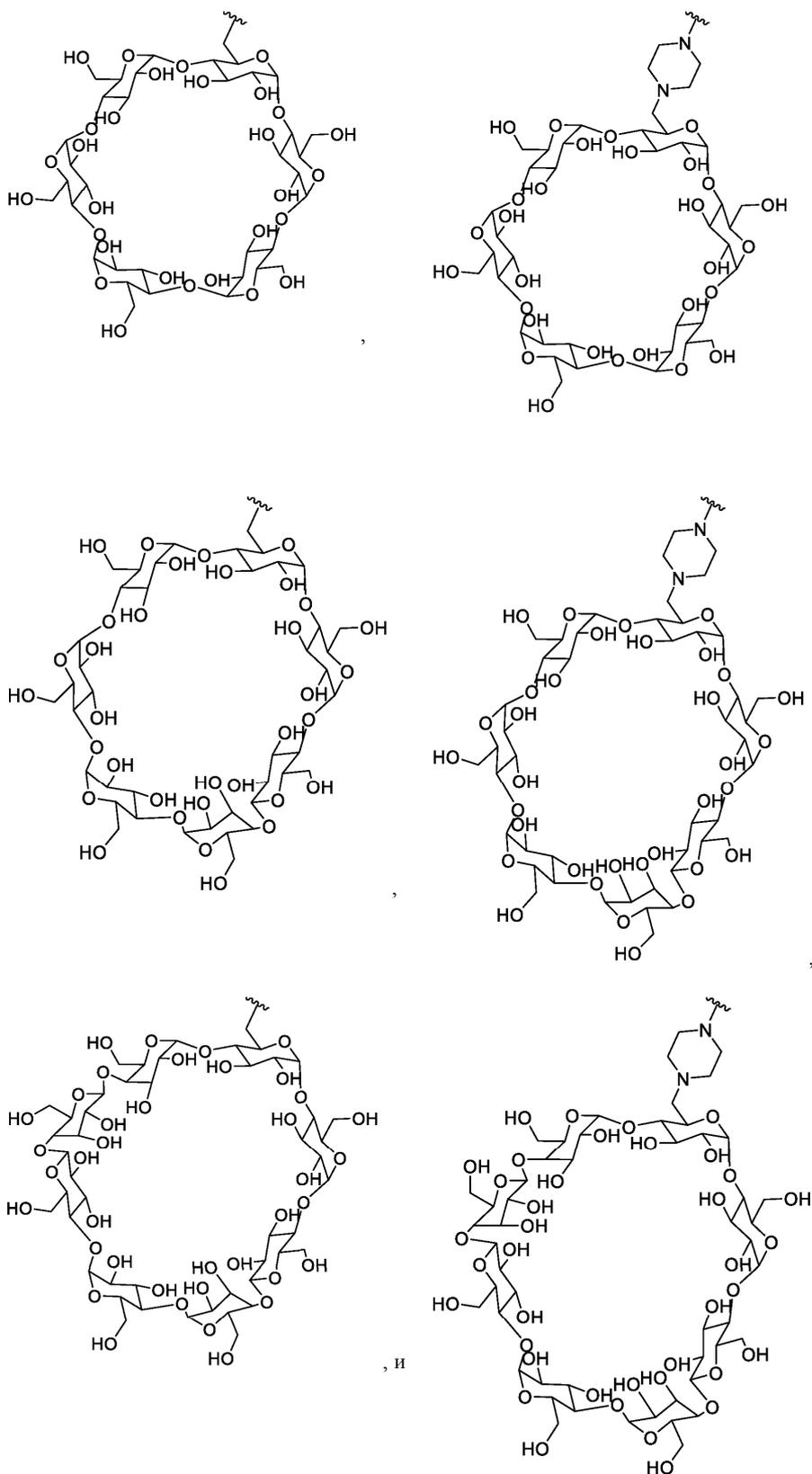
В некоторых вариантах осуществления А представляет собой

или

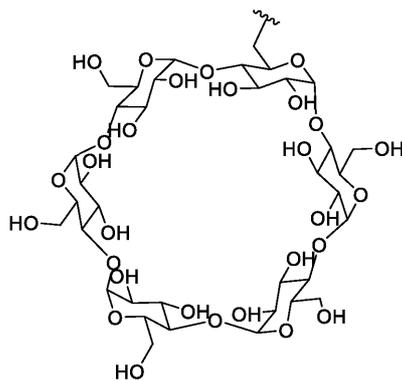


В некоторых вариантах осуществления А представляет собой  $CD$ , где  $CD$  представляет прямую или опосредованную связь с циклодекстриновым фрагментом.

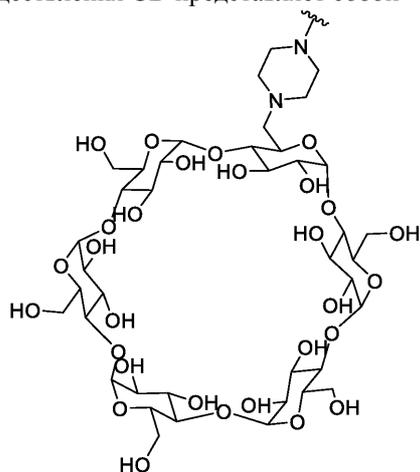
В некоторых вариантах осуществления, включая любые из указанных выше,  $CD$ , независимо в каждом случае, выбирается из



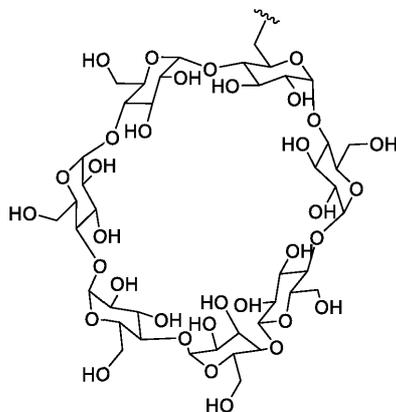
В некоторых вариантах осуществления CD представляет собой



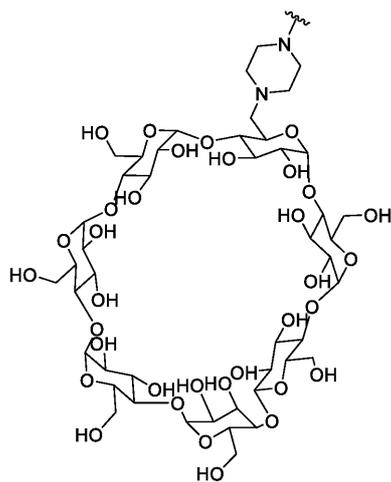
В некоторых вариантах осуществления CD представляет собой



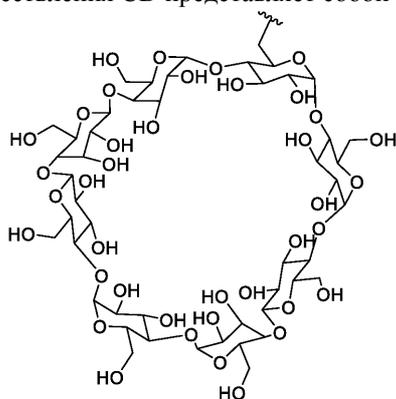
В некоторых вариантах осуществления CD представляет собой



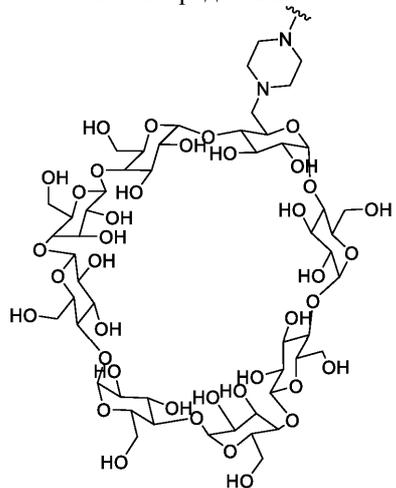
В некоторых вариантах осуществления CD представляет собой



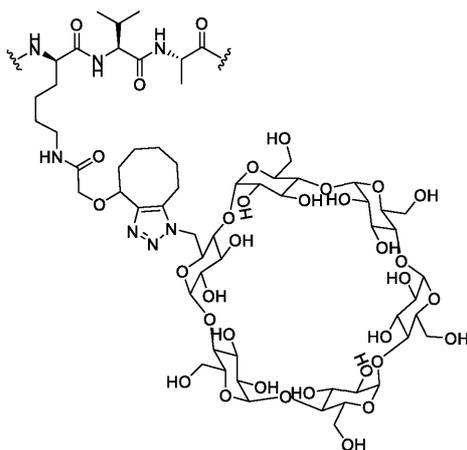
В некоторых вариантах осуществления CD представляет собой



В некоторых вариантах осуществления CD представляет собой



В некоторых вариантах осуществления А представляет собой



или его изомер.

В некоторых вариантах осуществления  $R^a$  представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления  $R^a$  представляет собой алкил.

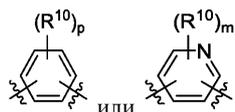
В некоторых вариантах осуществления  $R^a$  представляет собой метил, этил, n-пропил, i-пропил, n-бутил, t-бутил, i-бутил или пентил.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой арил.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой фенил.

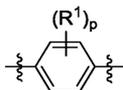
В некоторых вариантах осуществления В представляет собой фенил или пиридинил.

В некоторых вариантах осуществления здесь В представляет собой это:



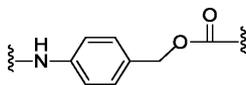
В этих примерах  $R^{10}$  представляет собой алкил, алкенил, алкинил, алкокси, арил, алкиларил, арилалкил, гало, галоалкил, галоалкокси, гетероарил, гетероциклоалкил, гидроксил, циано, нитро,  $-\text{OR}^A$ ,  $-\text{SO}_2\text{R}^A$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^A$ ,  $\text{NR}^a\text{R}^b$  или азидо. В этих примерах индексы p и m независимо, в каждом случае, выбираются из целого числа, которое выбирается от 0 до 4, включительно.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе В представляет собой:



В этих примерах p представляет собой 0, 1, 2, 3 или 4. В некоторых из этих вариантов осуществления  $R^1$ , независимо в каждом случае, алкил, алкокси, галоалкил или гало. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой алкокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой галоалкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой гало.

В некоторых вариантах осуществления формулы  $(L^A)_s-(B)_t-(CH_2)_u-(O)_v-(SP^2)_w$  представляет собой это:



В любых вариантах осуществления L или  $L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ , описанных в настоящих документах, одна или несколько усиливающих групп могут быть соединены с боковой цепью любой аминокислоты в L или  $L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ . Полезные аминокислоты для соединения усиливающих групп включают лизин, аспаргин, аспарат, глутамин, глутамат и цитруллин. Связь с усиливающей группой может быть прямой связью с аминокислотной боковой цепью, или связь может быть опосредованной посредством спейсерной и/или реактивной группы. Полезные спейсеры и реактивные группы включают любые описанные здесь. Усиливающей группой может быть любая группа, которая считается полезной специалистами в данной области. Например, усиливающей группой может быть любая группа, которая оказывает благотворное воздействие на соединение, нагрузку, линкер-нагрузку или конъюгат антитела, включая, помимо прочего, биологическое, биохимическое, синтетическое воздействие, воздействие в плане растворимости, визуализации, определяемости и реактивности и подобные воздействия. В определенных вариантах осуществления усиливающей группой является гидрофильная группа. В определенных вариантах осуществления усиливающей группой является циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления усили-

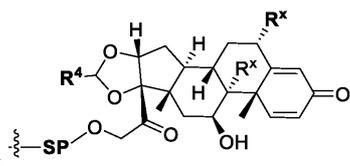
вающей группой является алкил, гетероалкил, алкиленил, гетероалкиленил-сульфокислота, гетероалкиленил таурин, гетероалкиленил фосфорная кислота или фосфат, гетероалкиленил амин (например, четвертичное аммониевое соединение) или гетероалкиленильный сахар. В определенных вариантах осуществления сахара включают, без ограничений, моносахариды, дисахариды и полисахариды. Примеры моносахаридов включают глюкозу, рибозу, дезоксирибозу, ксилозу, арабинозу, маннозу, галактозу, фруктозу и подобные. В определенных вариантах осуществления сахара включают сахарные кислоты, такие как глюкуроновая кислота, которые далее включают конъюгированные формы, такие как глюкурониды (т.е. посредством глюкуронирования). Примеры дисахаридов включают мальтозу, сукрозу, лактозу, лактулозу, трегалозу и подобные. Примеры полисахаридов включают амилозу, амилопектин, гликоген, инулин, целлюлозу и подобные. Циклодекстрином может быть любой циклодекстрин, известный специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления циклодекстрином является альфа циклодекстрин, бета циклодекстрин или гамма циклодекстрин или их смеси. В определенных вариантах осуществления циклодекстрином является альфа циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления циклодекстрином является бета циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления циклодекстрином является гамма циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления усиливающая группа способна улучшать растворимость оставшейся части конъюгата.

В определенных вариантах осуществления усиливающей группой является алкил, гетероалкил, алкиленил, гетероалкиленил-сульфокислота, гетероалкиленил таурин, гетероалкиленил фосфорная кислота или фосфат, гетероалкиленил амин (например, четвертичное аммониевое соединение) или гетероалкиленильный сахар. В определенных вариантах осуществления сахара включают, без ограничений, моносахариды, дисахариды и полисахариды. Примеры моносахаридов включают глюкозу, рибозу, дезоксирибозу, ксилозу, арабинозу, маннозу, галактозу, фруктозу и подобные. В определенных вариантах осуществления сахара включают сахарные кислоты, такие как глюкуроновая кислота, которые далее включают конъюгированные формы, такие как глюкурониды (т.е. посредством глюкуронирования). Примеры дисахаридов включают мальтозу, сукрозу, лактозу, лактулозу, трегалозу и подобные. Примеры полисахаридов включают амилозу, амилопектин, гликоген, инулин, целлюлозу и подобные. Циклодекстрином может быть любой циклодекстрин, известный специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления циклодекстрином является альфа циклодекстрин, бета циклодекстрин или гамма циклодекстрин или их смеси. В определенных вариантах осуществления циклодекстрином является альфа циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления циклодекстрином является бета циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления циклодекстрином является гамма циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления усиливающая группа способна улучшать растворимость оставшейся части конъюгата. В определенных вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил сульфокислота является замещенной или незамещенной. В определенных вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил сульфокислота представляет собой  $-(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{-NH}-(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{-C(O)NH}-(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{-C(O)NH}-(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{-N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C(O)NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_n\text{-C(O)N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C(O)NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$  или  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{-C(O)N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C(O)NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$ , где  $n$  представляет собой 1, 2, 3, 4 или 5, и  $m$  представляет собой 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил или алкиленил сульфокислота представляет собой  $-(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H}$ . В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленил сульфокислота представляет собой  $-(\text{CH}_2)_n\text{-NH}-(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H}$ , где  $n$  представляет собой 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил сульфокислота представляет собой  $-(\text{CH}_2)_n\text{-C(O)NH}-(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H}$ , где  $n$  представляет собой 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил сульфокислота представляет собой  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{-C(O)NH}-(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H}$ , где  $m$  представляет собой 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил сульфокислота представляет собой  $-(\text{CH}_2)_n\text{-N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C(O)NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$ , где  $n$  представляет собой 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил сульфокислота представляет собой  $-(\text{CH}_2)_n\text{-C(O)N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C(O)NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$ , где  $n$  представляет собой 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил сульфокислота представляет собой  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{-C(O)N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C(O)NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$ , где  $m$  представляет собой 1, 2, 3, 4 или 5.

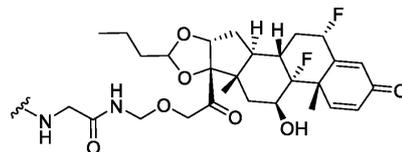
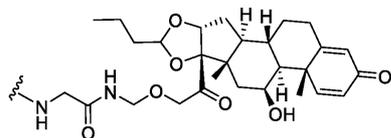
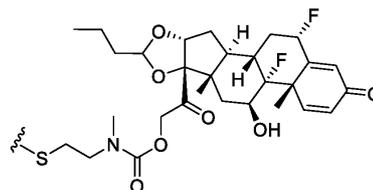
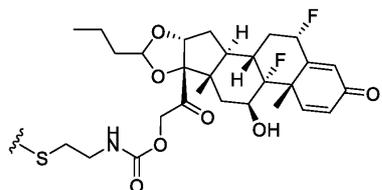
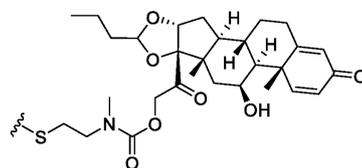
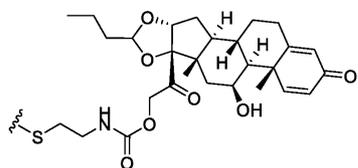
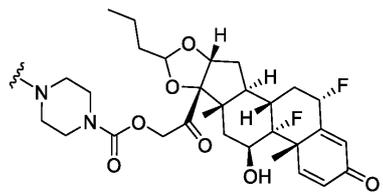
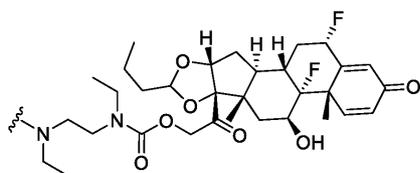
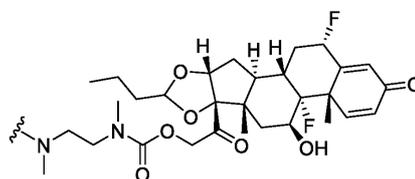
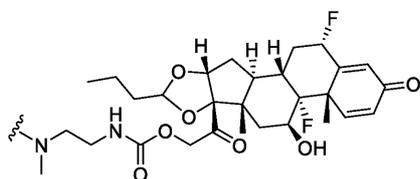
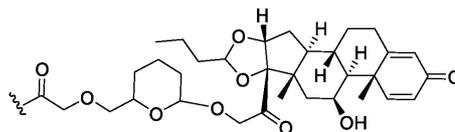
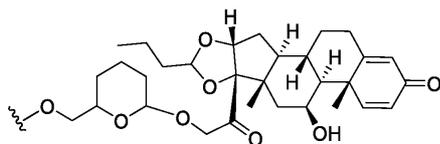
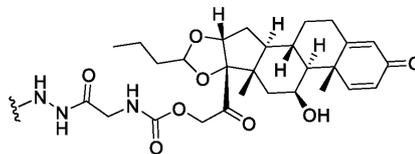
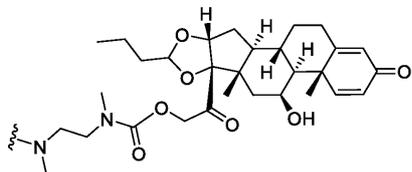
Здесь представлены конъюгаты антители-лекарственное средство, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с соединением, выбранным из табл. 1. В некоторых вариантах осуществления соединение имеет формулу 1d, 1e, 1g или 1h.

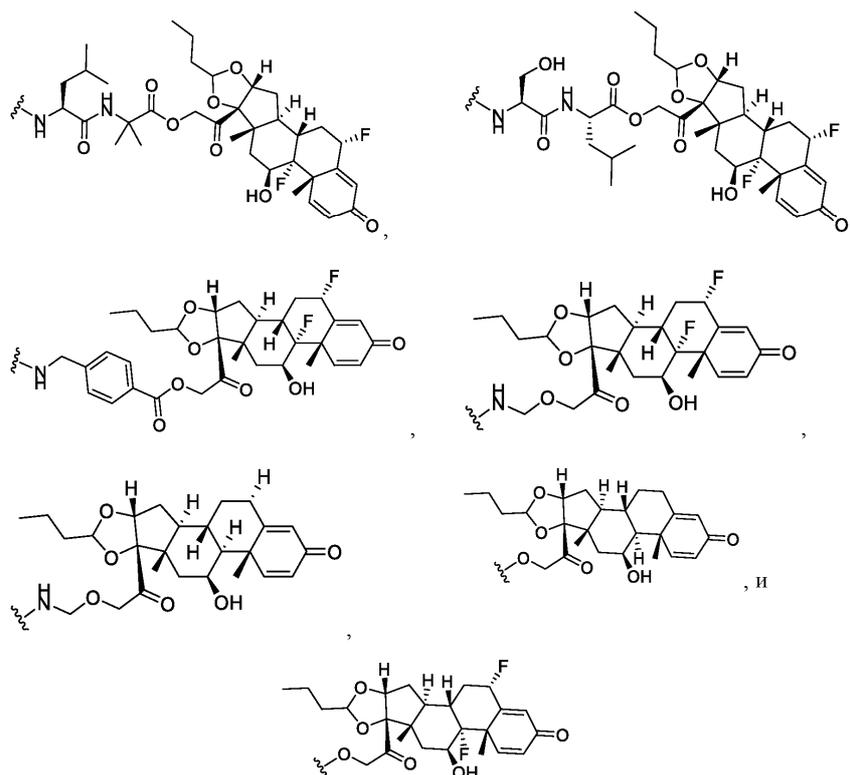
Здесь также представлены конъюгаты антители-лекарственное средство формулы Ab-L-SP-D или BA-L-SP-D, где D представляет собой пролекарство будесонида или пролекарство аналога или производного будесонида (включая фторированные аналоги и производные), и где Ab, BA, L и SP соответствуют определениям в любом описанном здесь варианте осуществления. В некоторых вариантах осуществ-

вления D Ab-L-SP-D и BA-L-SP-D и



формулы (II) и (III) выбирается из:

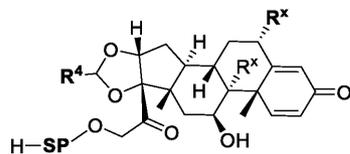




В некоторых вариантах осуществления Ab-L-SP-D, BA-L-SP-D и формулы (III), SP i-фрагмент, спо-

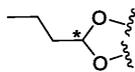
собный высвобождать D или

В некоторых вариантах осуществления в физиологических условиях связь между L и SP расщепляется, в результате чего высвобождается стероидное пролекарство, т.е. H-SP-D или



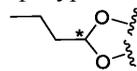
и связь между SP и D или между SP и последующем расщепляется, в результате чего высвобождается биологически активный стероид. В неко-

торых вариантах осуществления n-пропил

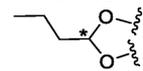


в каждой из приведенных выше структур представляет собой в R-конфигурации, т.е. на углероде, показанном звездочкой. В некоторых вариантах осу-

ществления n-пропил

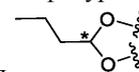


в каждой из приведенных выше структур представляет собой в S-конфигурации, т.е. на углероде, показанном звездочкой. В некоторых вариантах осуществления n-пропил



в каждой из приведенных выше структур представляет собой смесь R- и S-конфигураций,

т.е. на углероде, показанном звездочкой. В некоторых вариантах осуществления n-пропил

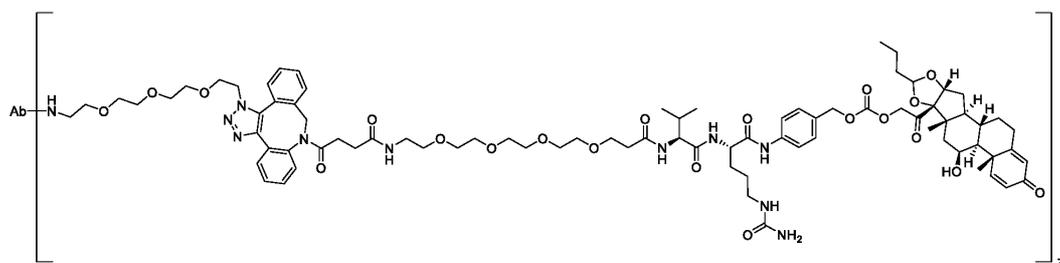
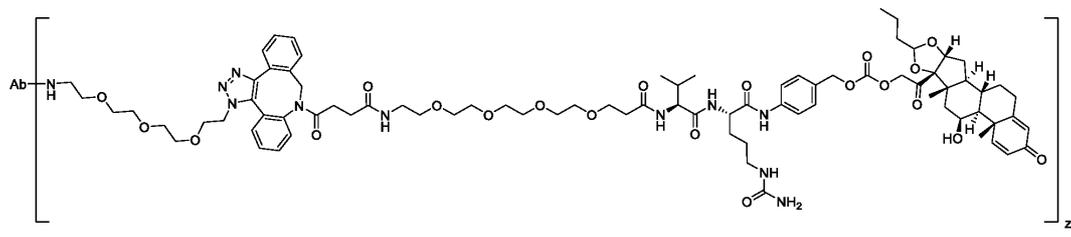


в каждой из приведенных выше структур представляет собой смесь R- и S-конфигураций, т.е. на углероде, показанном звездочкой, где соотношение R:S представляет собой около 1:1, около 2:1, около 3:1, около 4:1, около 5:1, около 6:1, около 7:1, около 8:1, около 9:1 или около 10:1.

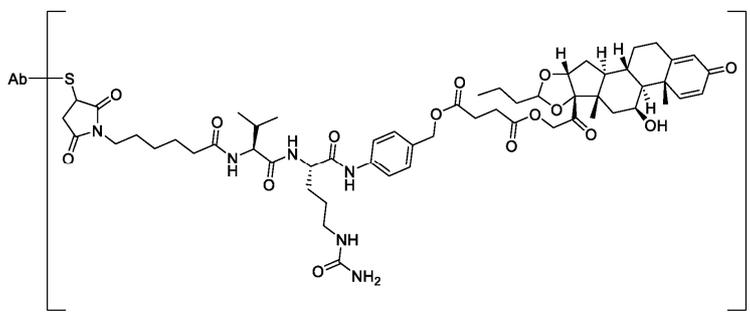
Таблица 3

## Конъюгаты антитело-лекарственное средство

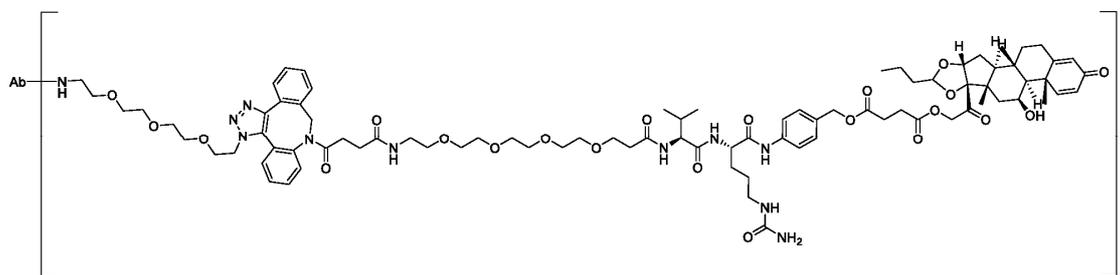
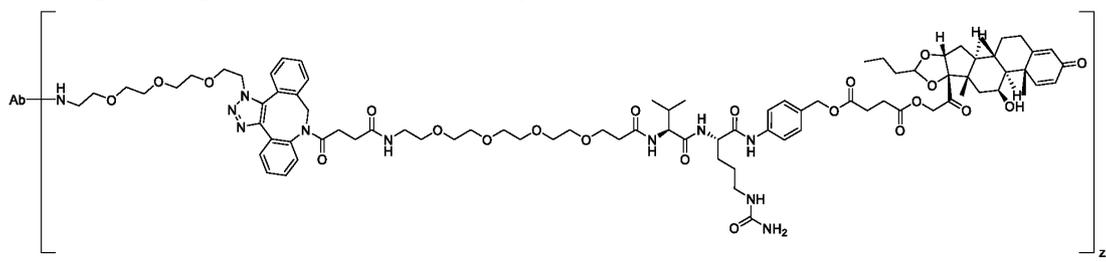
Здесь также представлены конъюгаты антитело-стероид, имеющие следующие формулы:



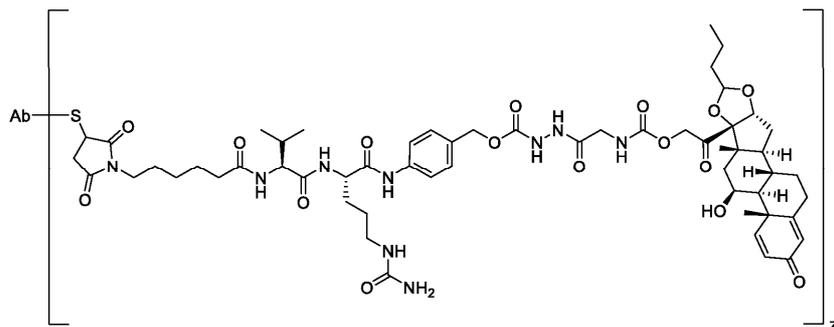
или их смесь;



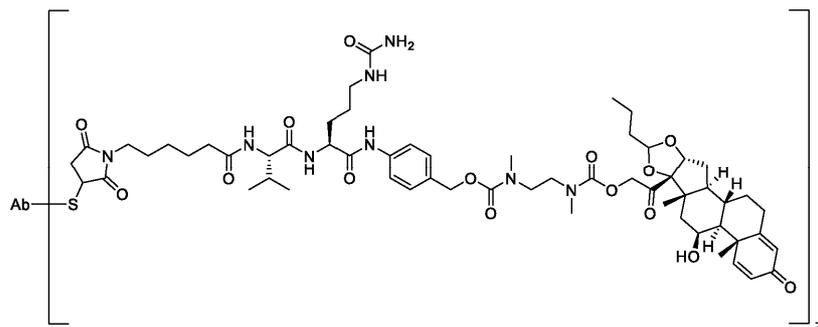
или стереоизомер или смесь их стереоизомеров;



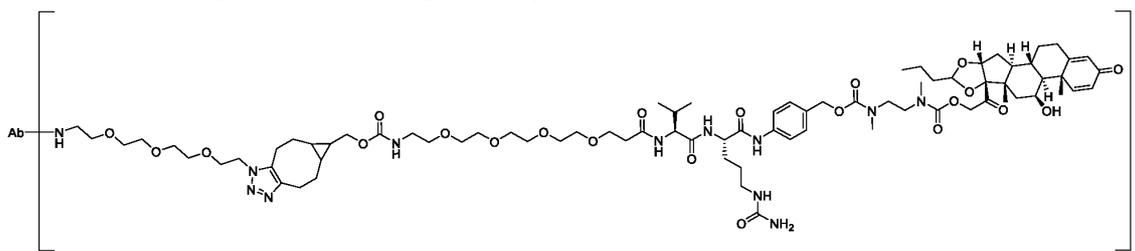
или их смесь;

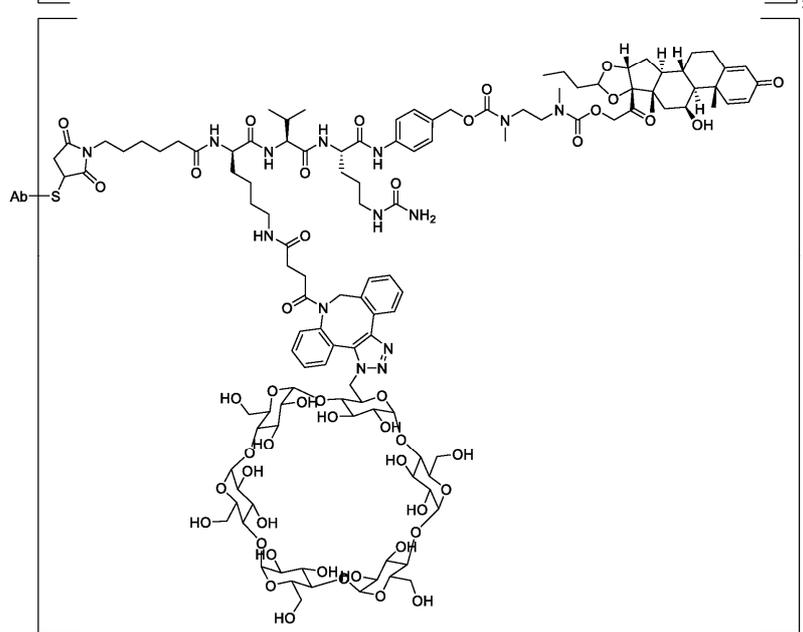
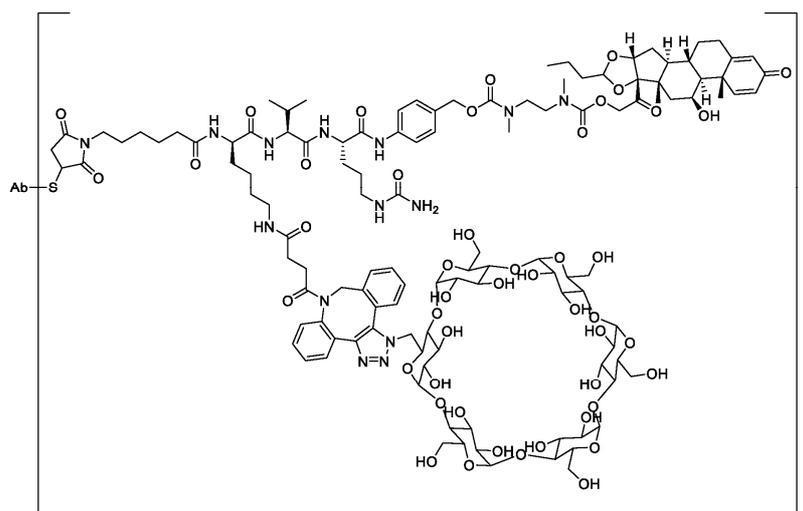


или стереоизомер или смесь их стереоизомеров;

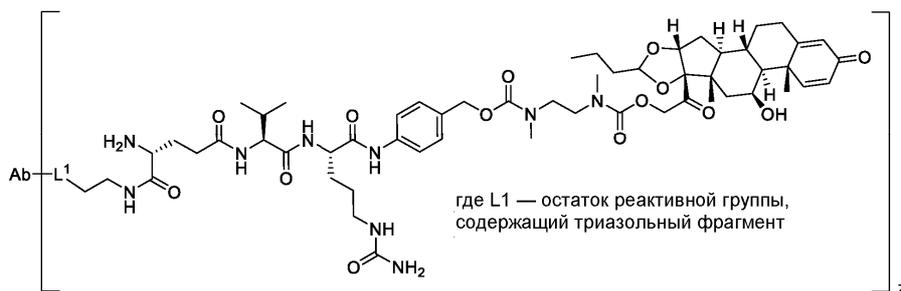


или стереоизомер или смесь их стереоизомеров;

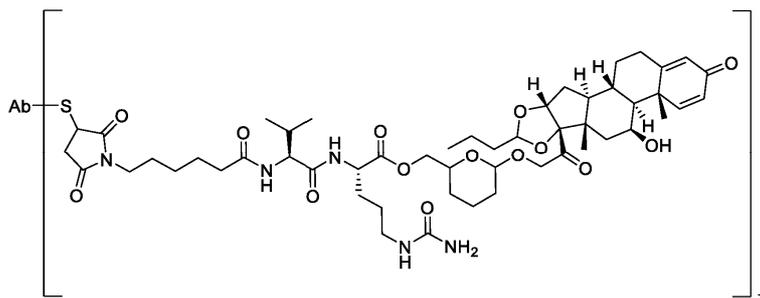




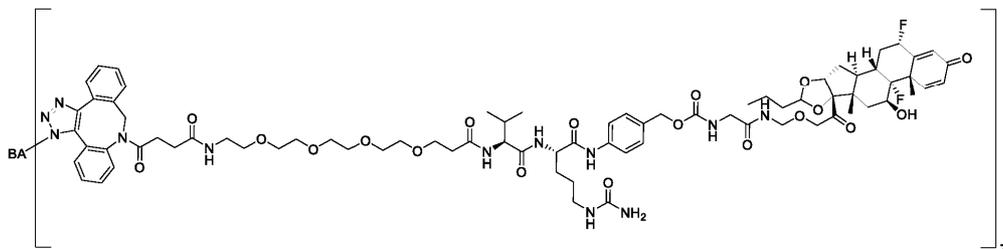
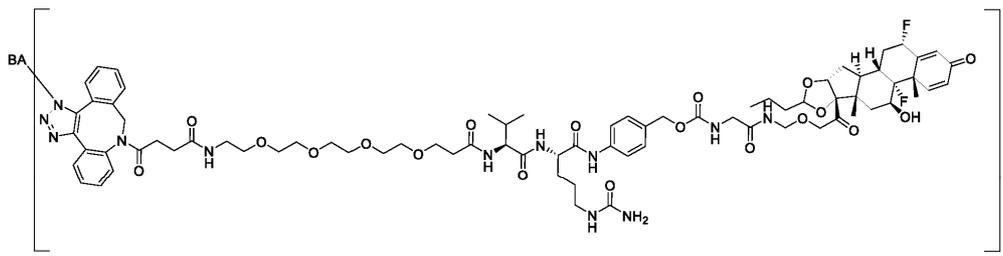
ИЛИ ИХ СМЕСЬ;



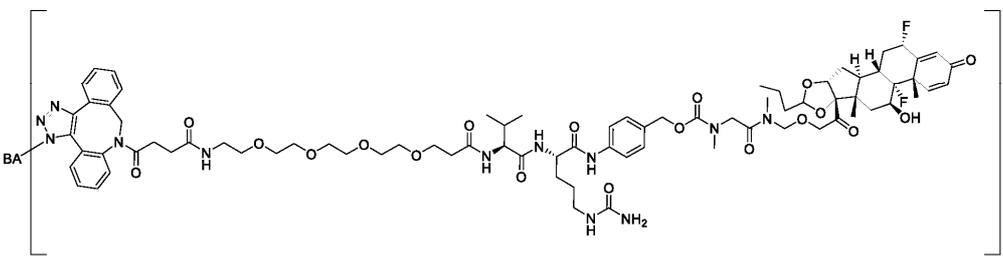
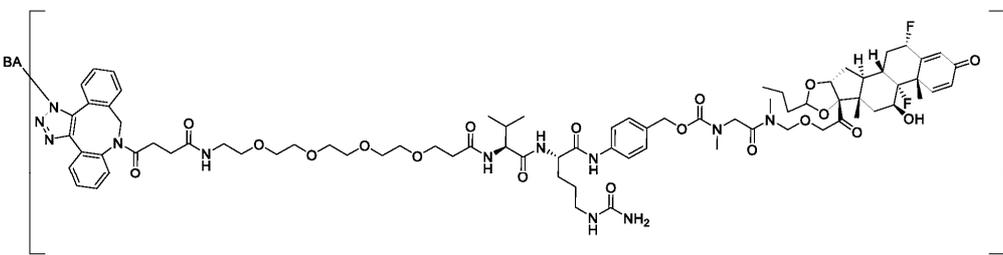
ИЛИ ИХ СМЕСЬ;



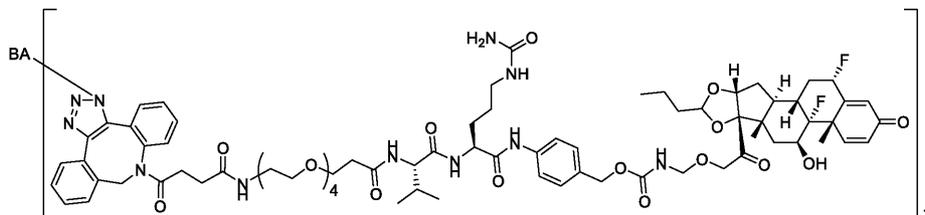
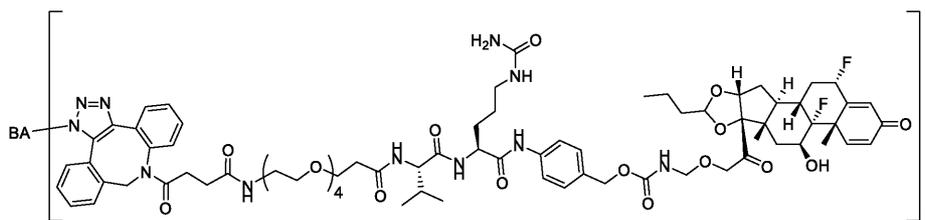
или стереоизомер или смесь их стереоизомеров;



или их смесь;

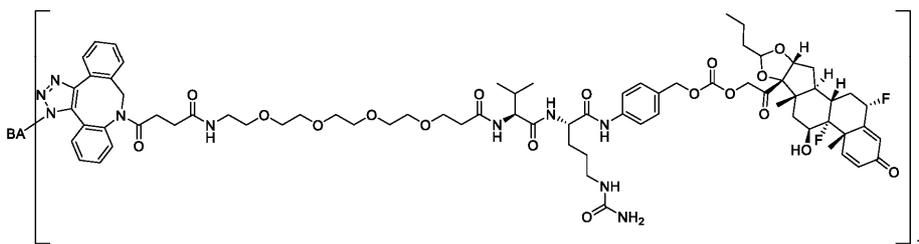
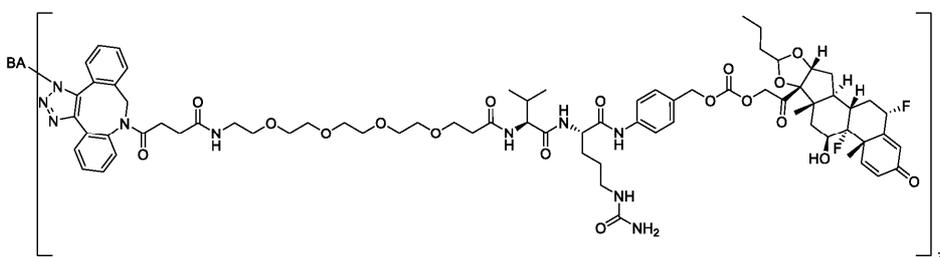
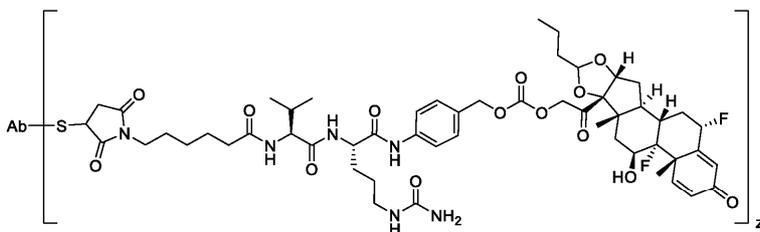
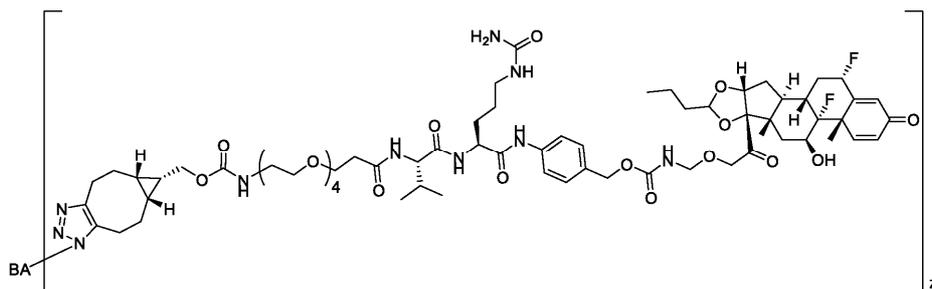


или их смесь;

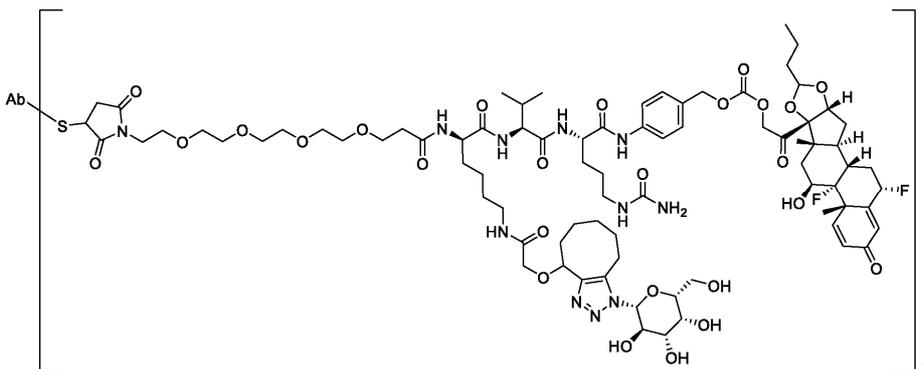


или их смесь;

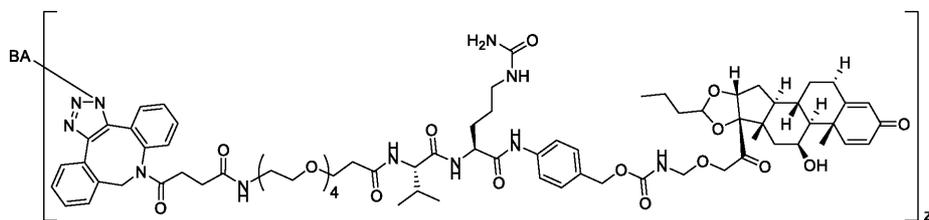
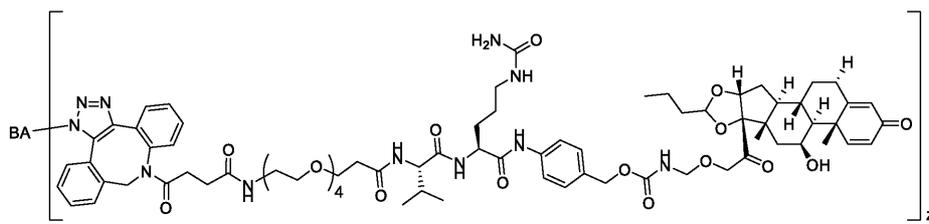
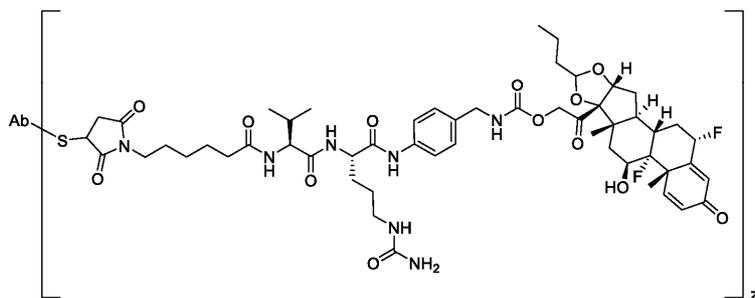
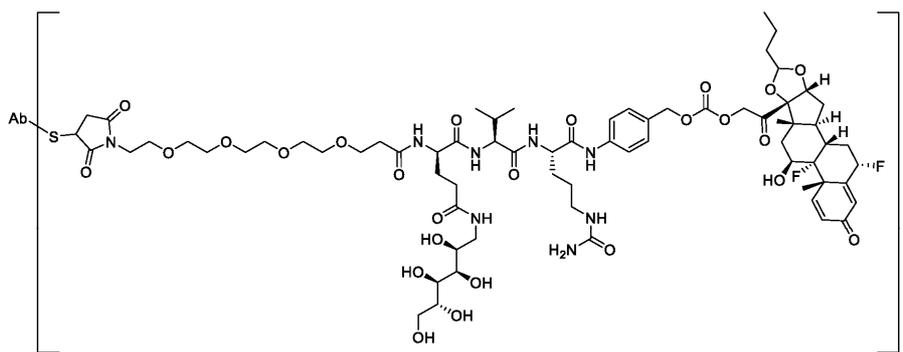
045111



ИЛИ ИХ СМЕСЬ;

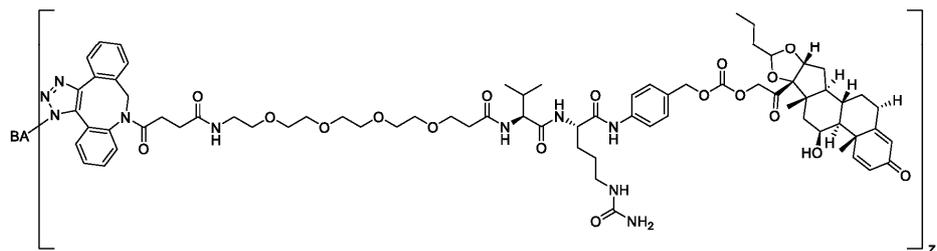
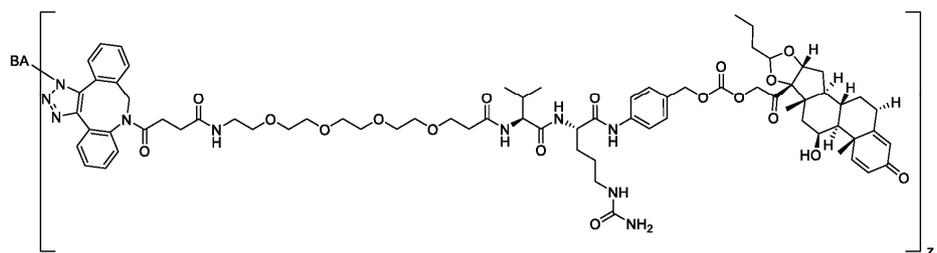
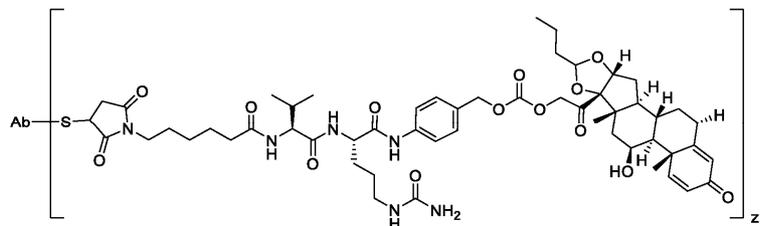
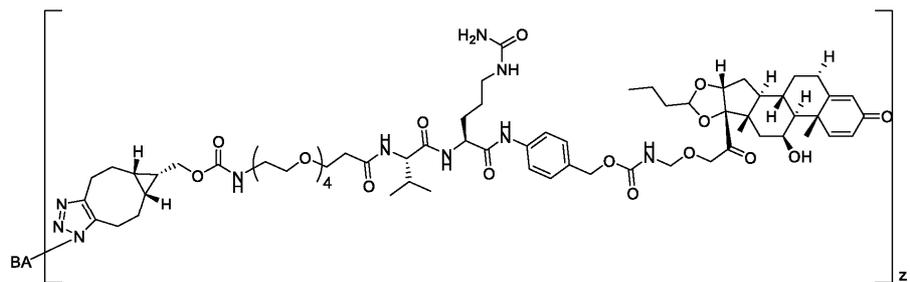


045111

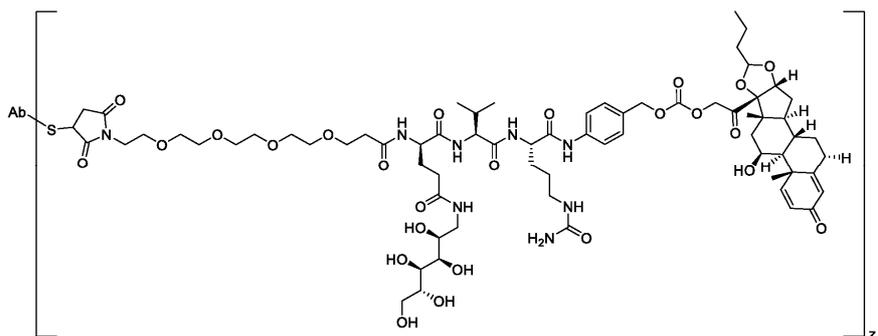
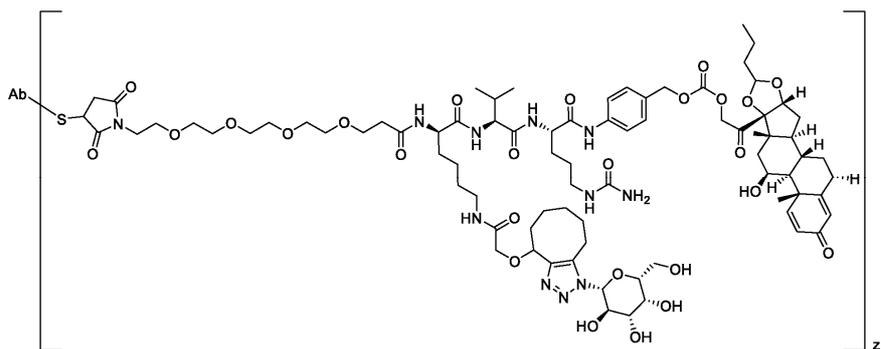


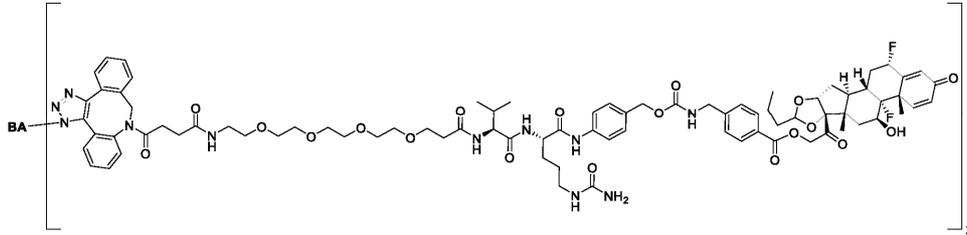
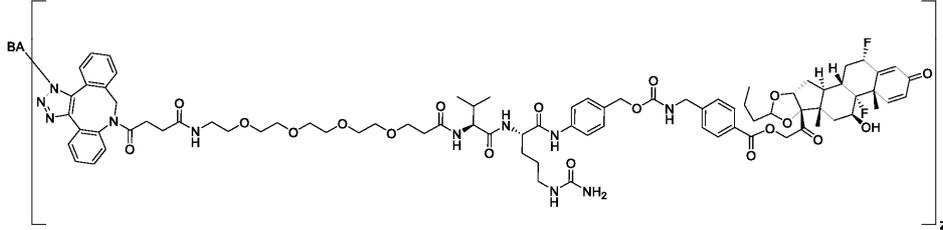
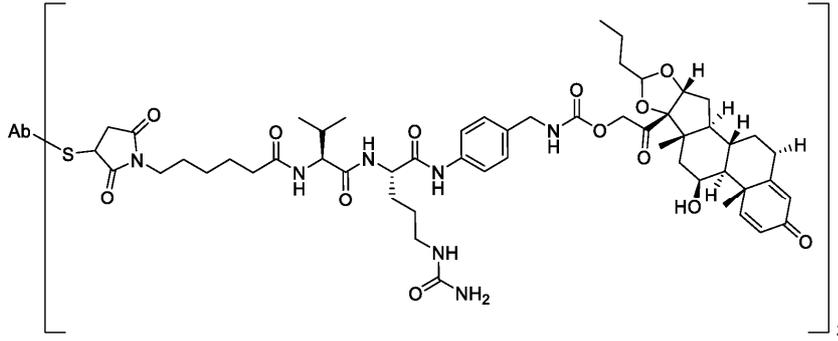
ИЛИ ИХ СМЕСЬ;

045111

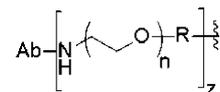
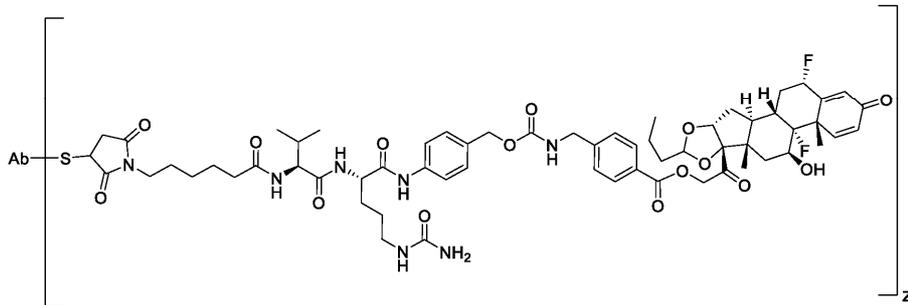
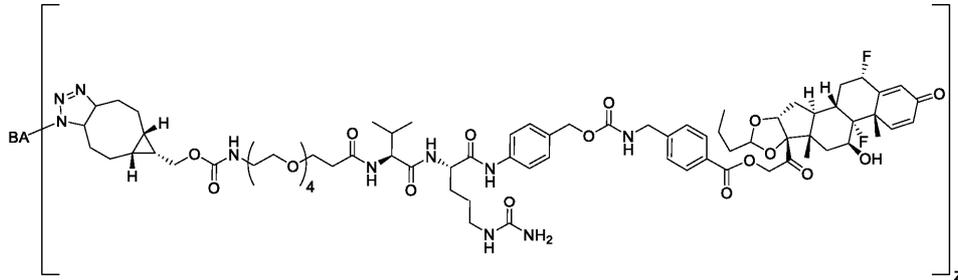


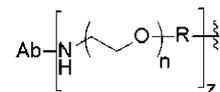
или их смесь;

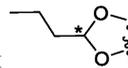




или их смесь;



где BA содержит антитело, имеющее следующую структуру , где Ab-моноклональное антитело, поликлональное антитело, фрагмент антитела или биспецифическое антитело; R представляет собой C<sub>2,4</sub>-алкилен; и n представляет собой целое число, которое выбирается от 2 до 4, включительно.

В некоторых вариантах осуществления n-пропил  в каждой из приведенных выше структур представляет собой в R-конфигурации, т.е. на углероде, показанном звездочкой. В некоторых вари-

антах осуществления n-пропил в каждой из приведенных выше структур представляет собой в S-конфигурации, т.е. на углероде, показанном звездочкой. В некоторых вариантах осуществления n-

пропил в каждой из приведенных выше структур представляет собой смесь R- и S-конфигураций, т.е. на углероде, показанном звездочкой. В некоторых вариантах осуществления n-пропил

в каждой из приведенных выше структур представляет собой смесь R- и S-конфигураций, т.е. на углероде, показанном звездочкой, где соотношение R:S представляет собой около 1:1, около 2:1, около 3:1, около 4:1, около 5:1, около 6:1, около 7:1, около 8:1, около 9:1 или около 10:1.

В конкретных вариантах осуществления ВА представляет собой антитело и z представляет собой целое число, которое выбирается от 1-30, включительно. В некоторых вариантах осуществления z представляет собой целое число, которое выбирается от 1 до 4, включительно. В некоторых вариантах осуществления z представляет собой 4. В некоторых вариантах осуществления z представляет собой 2.

В настоящем документе также представлены конъюгаты связующего агента будесонида, пролекарства будесонида, аналога или производного будесонида (включая фторированные аналоги и производные) или пролекарства аналога или производного будесонида (включая фторированные аналоги и производные).

Подходящие связующие агенты для любых из конъюгатов, представленных в настоящем описании изобретения, включают, помимо прочего, антитела, лимфокины, гормоны, факторы роста, вирусные рецепторы, интерлейкины или любые другие клеточно-связывающие или пептид-связывающие молекулы или субстанции.

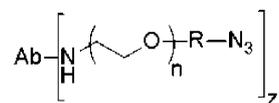
В некоторых вариантах осуществления связующим агентом является антитело. Термин "антитело" в контексте настоящего документа означает любую антиген-связывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий минимум одну определяющую комплементарность область (CDR), которые специфически связываются с конкретным антигеном или взаимодействуют с ним. Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (которая сокращается здесь как HCVR или  $V_H$ ) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ . Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (которая сокращается здесь как LCVR или  $V_L$ ) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен ( $V_L1$ ).  $V_H$  и  $V_L$  области могут быть далее разделены на области гипервариабельности, обозначаемые как определяющие комплементарность области (CDR), перемежающиеся с областями, которые более консервативны, обозначаемыми каркасными областями (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, организованных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В некоторых вариантах осуществления FR антитела (или его антиген-связывающей части) могут быть идентичны человеческим последовательностям зародышевого типа или могут быть естественным или искусственным образом модифицированными. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основании параллельного анализа двух или более CDR.

Термин "антитело" в контексте настоящего документа также включает антиген-связывающие фрагменты полных молекул антител. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и подобные, в контексте настоящего документа, включают любой природный, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном, в результате чего образуется комплекс. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, от полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной генетической инженерии, включающие манипуляции и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и опционально константные домены антител. Такая ДНК известна, и/или ее можно легко получить, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител) либо их можно синтезировать. ДНК можно секвенировать или изменять химически или при помощи методов молекулярной биологии, например, организовывать один или несколько вариабельных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или вводить кодоны, создавать цистеиновые остатки, изменять, добавлять или удалять аминокислоты и т.д.

Аминокислотная последовательность антитела может быть пронумерована с использованием любых известных схем нумерации, включая схемы, описанные Кабатом и др., (номенклатура Кабата); Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948 (номенклатура Чотиа); MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol. 262:732-745 (номенклатура Contact); Lefranc et al., Dev. Ctr. Immunol, 2003, 27:55-77 (номенклатура ЯмгТ); и Honegge and Plückthun, J. Mol. Biol., 2001, 309:657-70 (номенклатура АНо). Если не указано

иное, используемая в настоящем документе номенклатура представляет собой номенклатура Кабата. Номенклатура EU обычно применяется в отношении остатка в константной области тяжелой цепи антитела (например, как указывается в Kabat et al., supra). Тем не менее, выбор номенклатуры не предполагает наличие различий в последовательностях в случаях, когда они не существуют, и специалист в данной области может легко определить положение последовательности изучением аминокислотной последовательности одного или более антител.

В некоторых вариантах осуществления антитело ВА представляет собой функционализованное антитело, имеющее следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления R представляет собой алкилен, алкенилен или алкинилен. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой алкилен. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой C<sub>2-4</sub>-алкилен. В определенных вариантах осуществления R представляет собой этилен. В определенных вариантах осуществления n представляет собой 3. В определенных вариантах осуществления z представляет собой 2 или 4.

В некоторых вариантах осуществления антитело ВА не является антителом против ПСМА (PSMA) или антителом против CD70.

Неограничивающие примеры антиген-связывающих фрагментов ВА включают: (i) Fab фрагменты; (ii) F(ab')<sub>2</sub> фрагменты; (iii) Fd фрагменты; (iv) Fv фрагменты; (v) одноцепочечные Fv (scFv) молекулы; (vi) dAb фрагменты; и (vii) минимальные рекогниционные единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, изолированную CDR, такую, как CDR3 пептид) или FR3-CDR3-FR4 пептид с ограниченной конформационной свободой. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, верблужьи антитела (фрагменты VhH), антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитой CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, одновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMTP) и вариабельные домены IgNAR акулы, также включаются в выражение "антиген-связывающий фрагмент" в контексте настоящего документа.

Антиген-связывающий фрагмент антитела обычно содержит минимум один вариабельный домен. Этот вариабельный домен может быть любого размера и может иметь любой аминокислотный состав и обычно содержит минимум одну CDR, которая расположена рядом с одной или несколькими каркасными последовательностями или в рамке с ними. В антиген-связывающих фрагментах с V<sub>H</sub> доменом, связанным с V<sub>L</sub> доменом, V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> домены могут быть расположены относительно друг друга любым подходящим образом. Например, вариабельный участок может быть димерным и может содержать V<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>, V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> или V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub> димеры. В другом варианте антиген-связывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> домен.

В определенных вариантах осуществления антиген-связывающий фрагмент антитела может содержать минимум один вариабельный домен, ковалентно соединенный минимум с одним константным доменом. Неограничивающие типовые конфигурации вариабельных и константных доменов, которые могут находиться в антиген-связывающем фрагменте антитела настоящего изобретения, включают: (i) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1; (ii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2; (iii) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>3; (iv) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (v) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vi) V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (vii) V<sub>H</sub>-C<sub>L</sub>; (viii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1; (ix) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2; (x) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>3; (xi) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2; (xii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>1-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; (xiii) V<sub>L</sub>-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3; и (xiv) V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>. В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, включая любую из указанных выше типовых конфигураций, вариабельные и константные домены могут быть либо напрямую соединены друг с другом или могут быть соединены полным или частичным шарниром или участком линкера. Шарнир может состоять из минимум 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, в результате чего образуется гибкая или полугибкая связь между рядом расположенными вариабельными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антиген-связывающий фрагмент антитела настоящего описания изобретения может содержать гомо-димер или гетеро-димер (или другой мультимер) любой из конфигураций вариабельного и константного домена, описанных выше, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или более мономерным V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> доменом (например, дисульфидной связью (связями)).

Как и в случае с молекулами полного антитела, антиген-связывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антиген-связывающий фрагмент антитела обычно содержит минимум два различных вариабельных домена, при этом каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на том же самом антигене. Любой мультиспецифический формат антитела, включая описанные здесь биспецифические форматы антитела, могут быть адаптированы для использования в контексте антиген-связывающего фрагмента антитела настоящего изобретения при использовании применяемых в данной области стандартных методов.

Антитела настоящего описания изобретения могут функционировать через комплементзависимую цитотоксичность (CDC) или антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC). "Комплементзависимая цитотоксичность" (CDC) означает лизис антиген-экспрессирующих клеток антителом настоящего описания изобретения в присутствии комплемента. "Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность" (ADCC) означает клеточноопосредованную реакцию, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc рецепторы (FcR) (например, естественные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), определяют связанное антитело на целевой клетке, приводя, таким образом, к лизису целевой клетки. CDC и ADCC могут быть измерены посредством видов анализа, которые хорошо известны и доступны в данной области. (См., например, патенты США

№ 5,500,362 и 5,821,337, и Clynes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656). Константная область антитела важна для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточнозависимую цитотоксичность. Таким образом, изотоп антитела может выбираться на основании того, желательнее ли, чтобы антитело опосредовало цитотоксичность.

Антитела, полезные для описанных здесь соединений, включают антитела человека. Предполагается, что термин "антитело человека" в контексте настоящего документа включает антитела, имеющие вариабельные и константные области, полученные от последовательностей иммуноглобулина человека зародышевого типа. Антитела человека могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человека зародышевого типа (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Тем не менее, предполагается, что термин "антитело человека" в контексте настоящего документа не включает антитела, в которых CDR последовательности, полученные от зародышевой линии другого вида млекопитающего, например, мыши, были привиты к каркасным последовательностям человека. Термин "антитело человека" не включает молекулы естественного происхождения, которые обычно существуют без модификаций или вмешательства/манипуляций человека в немодифицированном живом организме, встречающемся в природе.

Антитела настоящего изобретения в некоторых вариантах осуществления могут быть рекомбинантными антителами человека. Предполагается, что термин "рекомбинантное антитело человека" в контексте настоящего документа включает все антитела человека, которые приготавливаются, экспрессируются, создаются или выделяются рекомбинантными способами, такие как антитела, экспрессированные при помощи рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (описано далее), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека (описано далее), антитела, выделенные из животного (например, мыши), трансгенного для генов иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, которые приготавливаются, экспрессируются, создаются или изолируются любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют вариабельные и константные области, полученные от последовательностей иммуноглобулина человека зародышевого типа. В некоторых вариантах осуществления, тем не менее, такие рекомбинантные антитела человека подвергаются *in vitro* мутагенезу (или, когда используется животное, трансгенное для последовательностей Ig человека, *in vivo* соматическому мутагенезу) и, таким образом, аминокислотные последовательности участков V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, если они получены от V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> последовательностей зародышевой линии человека или родственны им, не могут естественным образом существовать в зародышевом наборе антител человека *in vivo*.

Антитела человека могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе с помощью межцепочечной дисульфидной связи между тяжелыми цепями. Во второй форме димеры не связаны между собой через межцепочечные дисульфидные связи, и образуется молекула около 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легких и тяжелых цепей (полуантитело). Эти формы чрезвычайно трудно отделить, даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы в различных изотипах интактных IgG обусловлена, помимо прочего, структурными различиями, связанными с изотипом шарнирного участка антитела. Единичная аминокислотная замена в шарнирном участке шарнира IgG4 человека может значительно уменьшить появление второй формы (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнира IgG1 человека. Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие одну или несколько мутаций в шарнире, C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3 участке, что может оказаться желательным, например, в производстве для повышения выхода требуемой формы антитела.

Антителами, полезными для описанных здесь соединений, могут быть выделенные антитела. "Выделенное антитело" в контексте настоящего документа означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или получено, по меньшей мере, от одного компонента его окружающей среды. Например, антитело, которое было отделено или удалено, по меньшей мере, из одного компонента орга-

низма или из ткани или клетки, в которой антитело существует естественным образом или образуется естественным образом, является "выделенным антителом" для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* внутри рекомбинантной клетки. Выделенными антителами являются антитела, которые подверглись, по меньшей мере, одной стадии очистки или выделения. В соответствии с определенными вариантами осуществления выделенное антитело может быть в существенной степени свободно от другого клеточного материала и/или химических веществ.

Антитела, полезные для описанных здесь соединений, могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасном и/или CDR участках переменных доменов тяжелой и легкой цепи, по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которой антитела были получены. Такие мутации могут быть легко установлены путем сравнения аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе, с последовательностями зародышевой линии, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и его антиген-связывающие фрагменты, которые получены от любой из аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе, где одна или несколько аминокислот в пределах одного или нескольких каркасных и/или CDR участков мутируют в соответствующий остаток (остатки) последовательности зародышевой линии, из которой антитело было получено, или соответствующий остаток (остатки) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка (остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательности называются в настоящем документе в совокупности "герминативные мутации"). Специалист в данной области, начиная с последовательностей переменных участков тяжелой и легкой цепи, описанных в настоящем документе, может получить множество антител и антиген-связывающих фрагментов, которые содержат одну или несколько отдельных герминативных мутаций или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все каркасные и/или CDR остатки в  $V_H$  и/или  $V_L$  доменах мутируют обратно в остатки, обнаруживаемые в исходной герминативной последовательности, от которой антитело было получено. В других вариантах осуществления только определенные остатки мутируют обратно в исходную терминальную последовательность, например, только мутированные остатки, обнаруживаемые в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только мутированные остатки, обнаруживаемые в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или несколько каркасных и/или CDR остатков (остаток) мутируют в соответствующие остатки (остаток) другой герминативной последовательности (т.е. герминативной последовательности, которая отличается от герминативной последовательности, от которой антитело было получено изначально). Более того, антитела настоящего изобретения могут содержать любую комбинацию из двух или более герминативных мутаций в пределах каркасного и/или CDR участка, например, где определенные индивидуальные остатки мутируют в соответствующий остаток определенной герминативной последовательности, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной герминативной последовательности, сохраняются или мутируют в соответствующий остаток другой герминативной последовательности. После их получения антитела и антиген-связывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько герминативных мутаций, можно проверить на одно или более необходимых свойств, например, на улучшение специфичности связывания, увеличение аффинности связывания, улучшение или усиление антагонистических или агонистических биологических свойств (в зависимости от обстоятельств), снижение иммуногенности и т.д.

В некоторых вариантах осуществления антителом является моноклональное антитело, поликлональное антитело, фрагмент антитела (Fab, Fab' и F(ab)<sub>2</sub>, минитело, диатело, триотело и подобные) или биспецифическое антитело. Описанные здесь антитела могут быть гуманизированными с использованием методов, описанных в Патенте США № 6,596,541 и Публикации США № 2012/0096572, содержание которых включается в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Когда связующим агентом является антитело, оно связывается с антиген-связывающим партнером, который является полипептидом и может быть трансмембранной молекулой (например, рецептором) или фактором роста, который может быть гликозилированным или фосфорилированным.

Подходящие мишени, с которыми связывается связующий агент, включают любую мишень/антиген, для которой желательна избирательная доставка стероида. В некоторых вариантах осуществления связующим агентом является антитело, модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с мишенью, выбираемой из: AXL, BAFFR, BCMA, компонентов списка



неза с целью включения глутаминового остатка в сайт без "отключения" функции антитела или связывания. Например, в любом из вышеприведенных вариантов осуществления антитело против PRLR может содержать Asn297Gln (N297Q) мутацию. Такие антитела, имеющие N297Q мутацию, также могут содержать одну или более дополнительных природных глутаминовых остатков в их переменных областях, которые могут быть доступны для трансглутаминазы и, следовательно, способны к конъюгации с нагрузкой или линкер-нагрузкой (табл. В).

Таблица В

Последовательности иллюстративного антитела H1H6958N (против PRLR)

SEQ ID NO:	Молекула / Антитело	Область	Последовательность
17	H1H6958N	HCVR	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCGASGFTFRNYGMQWVRQGP GKGLEWVTLISFDGNDKYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQM NSLRTEDTAVYYCARGGDFDYWGQGLVTVSS
18	H1H6958N	HCDR1	GFTRNYG
19	H1H6958N	HCDR2	ISFDGNDK
20	H1H6958N	HCDR3	ARGGDFDY
21	H1H6958N	LCVR	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRKDLGWYQQKPGK APKRLIYAASSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATY YCLQHNSYPMYTFGQGTKLEIK
22	H1H6958N	LCDR1	QDIRKD
23	H1H6958N	LCDR2	AAS
24	H1H6958N	LCDR3	LQHNSYPMYT
25	hPRLR ecto- MMH		MHRPRRRGTRPPLALLAALLAARGADAQLPPGKPEIFKCR SPNKETFTCWWRPGTDGGLPTNYSPTYHREGETLMHECPDYI TGGPNSCHFQYKQYTSMWRTYIMMVNATNQMGSSFSDELYV DVTYIVQDPPELEAVEVKQPEDRKPYLWIKWSPPTLIDLKTG WFTLLYEIRLKPKEAAEWEIHFAGQQTEFKILSLHPGQKYLQV VRCKPDHGYWSAWSPATFIQIPSDFTMNDEQKLISEEDLGG QKLISEEDLHHNNHH

В любом из представленных вариантов осуществления соединения или конъюгата ВА представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые связываются с PRLR. В любом из представленных вариантов осуществления соединения или конъюгата ВА представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и конъюгация осуществляется минимум через один остаток Q295. В любом из представленных вариантов осуществления соединения или конъюгата ВА представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и конъюгация осуществляется через два остатка Q295. В любом из представленных вариантов осуществления соединения или конъюгата ВА представляет собой антитело N297Q или его антиген-связывающий фрагмент. В любом из представленных вариантов осуществления соединения или конъюгата ВА представляет собой антитело N297Q или его антиген-связывающий фрагмент, и конъюгация осуществляется минимум через один остаток Q295 и минимум один остаток Q297. В любом из представленных вариантов осуществления соединения или конъюгата ВА представляет собой антитело N297Q или его антиген-связывающий фрагмент, и конъюгация осуществляется через два остатка Q295 и два остатка Q297. В конкретных вариантах осуществления номенклатура соответствует номенклатуре EU.

В любом из вышеприведенных вариантов осуществления ВА представляет собой антитело против MSR1. В определенных вариантах осуществления ВА представляет собой антитело против MSR1 H1H21234N. В определенных вариантах осуществления ВА представляет собой антитело против MSR1 H1H21234N N297Q. В определенных вариантах осуществления ВА представляет собой антитело против MSR1, содержащее HCVR в соответствии с SEQ ID NO: 2 и LCVR в соответствии с SEQ ID NO: 10. В определенных вариантах осуществления ВА представляет собой антитело против MSR1, содержащее одну, две, три, четыре, пять или шесть HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в соответствии с SEQ ID NOS: 4, 6, 8, 12, 14 и 16, соответственно. В определенных вариантах осуществления HCVR кодируется SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления LCVR кодируется SEQ ID NO: 9. В определенных вариантах осуществления одна, две, три, четыре, пять или шесть HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 кодируются полинуклеотидными последовательностями SEQ ID NOS: 3, 5, 7, 11, 13 и 15, соответственно. N297Q показывает, что один или более остатков 297 мутированные из аспарагина (N) в глутамин (Q). Предпочтительно, каждый остаток 297 мутированный в Q. В предпочтительных вариантах осуществления номенклатура соответствует номенклатуре EU. В определенных вариантах осуществления данного пункта z представляет собой от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления z представляет собой 1, 2, 3 или 4. В определенных вариантах осуществления z представляет

собой 2. В определенных вариантах осуществления z представляет собой 4.

SEQ ID NO:	Молекула / Антителу	Область	Последовательность
1			caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctccggagac cctgtccctc acctgcactg tcaactggtg cccatcagt aggaactact ggagtggat ccggcagccc ccagggaagg gactggaatg gattggatat atctattaca gtgggagtat cgactacaat cctccctca agagtcgagt caccatata tagacacgt ccaagaacca gtctccctg aagctgagt ctatgaccg tgcggacacg gccgtatact actgtgcgag agatcgtgg aactggaat acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggatcagc ctcgtca
2			Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Gly Ser Ile Ser Arg Asn Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ile Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Met Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Trp Asn Trp Lys Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
3			ggtggctcca tcagtaggaa ctac
4			Gly Gly Ser Ile Ser Arg Asn Tyr
5			atctattaca gtgggagtat c
6			Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Ile
7			gcgagagatc ggtggaactg gaaatacggc atggacgctc
8			Ala Arg Asp Arg Trp Asn Trp Lys Tyr Gly Met Asp Val
9			gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtcttgt ctccagggga aagagccacc ctctcctgca gggccagtca gactgttaga aacaactact tagcctggtg ccaccagaaa cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcaggccac tggcatcca gacaggttca gtggcagtg gtctgggaca gactcactc tcaccatcag cagactggag cctgaagatt ttacagtgtg ttactgtcac cagtatggtg actcacctg gacgttggc caagggacca aatggaat caaacga
10			Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Val Arg Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Thr Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Asn Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Met Glu Ile Lys Arg
11			cagactgta gaaacaacta c
12			Gln Thr Val Arg Asn Asn Tyr
13			ggtgcatcc
14			Gly Ala Ser
15			caccagtatg gtaactacc ttggacg
16			His Gln Tyr Gly Asn Ser Pro Trp Thr

Связующий агент, например, антитело или антиген-связывающая молекула, может содержать линкер, связанный со связывающим агентом через присоединение на определенной аминокислоте в пределах антитела или антиген-связывающей молекулы. Иллюстративные аминокислотные присоединения, которые могут использоваться в контексте данного аспекта настоящего описания изобретения, включают, например, лизин (см., например, US 5,208,020; US 2010/0129314; Hollander et al., Bioconjugate Chem., 2008, 19:358-361; WO 2005/089808; US 5,714,586; US 2013/0101546; и US 2012/0585592), цистеин (см., например, US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; и US 7,750,116), селеноцистеин (см., например, WO 2008/122039; и Hofer et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2008, 705:12451-12456), формил глицин (см., например, Carrico et al., Nat. Chem. Biol., 2007, 3:321-322; Agarwal et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2013, 770:46-51, и Rabuka et al., Nat. Protocols, 2012, 70:1052-1067), неприродные аминокислоты (см., например, WO 2013/068874 и WO 2012/166559), и кислые аминокислоты (см., например, WO 2012/05982). Линкеры могут быть конъюгированы через глутамин через хемо-ферментную конъюгацию на основе транслгутаминазы (см., например, Dennler et al., Bioconjugate Chem. 2014, 25, 569-578). Линкеры также могут быть конъюгированы с антиген-связывающим белком через присоединение к углеводам (см., например, US 2008/0305497, WO 2014/065661 и Ryan et al., Food & Agriculture Immunol, 2001, 73:127-130) и дисульфидным линкерам (см., например, WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611, WO 2014/197854 и Shaunak et al., Nat. Chem. Biol, 2006, 2:312-313). В некоторых вариантах осуществления связующим агентом является анти-

тело, и антитело связывается с линкером через лизиновый остаток. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с линкером через цистеиновый остаток.

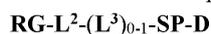
В любом из вышеприведенных вариантов осуществления ВА представляет собой антитело против PRLR. В определенных вариантах осуществления ВА представляет собой антитело против PRLR H1H6958N. В определенных вариантах осуществления ВА представляет собой антитело против PRLR H1H6958N N297Q. В определенных вариантах осуществления ВА представляет собой антитело против PRLR, содержащее HCVR в соответствии с SEQ ID NO: 17 и LCVR в соответствии с SEQ ID NO: 21. В определенных вариантах осуществления ВА представляет собой антитело против PRLR, содержащее одну, две, три, четыре, пять или шесть HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в соответствии с SEQ ID NOS: 18, 19, 20, 22, 23 и 24, соответственно. N297Q показывает, что один или более остатков 297 мутированы из аспарагина (N) в глутамин (Q). Предпочтительно, каждый остаток 297 мутирован в Q. В предпочтительных вариантах осуществления номенклатура соответствует номенклатуре EU. В определенных вариантах осуществления данного пункта k представляет собой от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления k представляет собой 1, 2, 3 или 4. В определенных вариантах осуществления k представляет собой 4.

#### D. Способы приготовления соединений.

Описанные здесь конъюгаты могут быть синтезированы посредством связи с линкер-нагрузками, описанными здесь, со связующим агентом, например, антителом в стандартных условиях конъюгации (см., например, Drug Deliv. 2016 Jun; 23(5):1662-6; AAPS Journal, Vol. 17, No. 2, March 2015; и Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 561, содержания которых включены в настоящий документ полностью посредством ссылки). Линкер-нагрузки представляет собой синтетические промежуточные компоненты, содержащие представляющую интерес нагрузку и соединительный фрагмент, который в конечном итоге служит фрагментом (или его частью), который соединяет связующий агент с нагрузкой. Линкер-нагрузки содержат реактивную группу, которая вступает в реакцию со связующим агентом, в результате чего образуются описанные здесь конъюгаты. Когда связующим агентом является антитело, это антитело может быть связано с линкер-нагрузкой посредством одного или более цистеиновых, лизиновых или других остатков антитела. Линкер-нагрузки могут быть соединены с цистеиновыми остатками, например, посредством воздействия на антитело восстанавливающим агентом, например, дитиотреитолом, чтобы расщепить дисульфидные связи антитела, опционально очищая восстановленное антитело, например, посредством гель-фильтрации, и впоследствии подвергая антитело реакции с линкер-нагрузкой, содержащей реактивный фрагмент, например, малеимидо группу. Подходящие растворители включают, помимо прочего, воду, DMA, DMF и DMSO. Линкер-нагрузки, содержащие реактивную группу, например, активированный эфир или галоидангидридную группу, могут быть связаны с лизиновыми остатками. Подходящие растворители включают, помимо прочего, воду, DMA, DMF и DMSO. Конъюгаты могут быть очищены с использованием известных белковых методов, включая, например, эксклюзионную хроматографию по размеру, диализ и ультрафильтрацию/диафильтрацию.

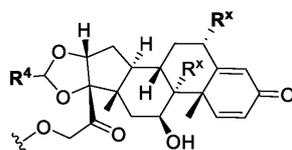
Линкер-стероидные промежуточные соединения.

Здесь представлены линкер-стероиды в соответствии с формулой (2000),



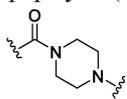
или их фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомер или производное, которые полезны в приготовлении конъюгатов антитело-лекарственное средство, где D выбирается из

a)

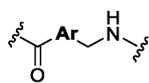


формулы (a),

где оба  $R^x$  в формуле (a) представляет собой водород;  $R^4$  представляет собой алкил, арил, ариалкил или N-содержащий гетероциклоалкил; и SP представляет собой  $-\text{C}(\text{O})-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ -алкилен- $\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{C}_{1-6}\text{алкил})-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ -алкилен- $\text{X}^1-$ , где  $\text{X}^1$  присоединяется к  $(L^3)_{0-1}$  в формуле (2000),  $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{H})-(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{-алкилен})-\text{S}-$ , где S присоединяется к  $(L^3)_{0-1}$  в формуле (2000),  $-\text{C}(\text{O})-\text{N}(\text{C}_{1-6}\text{алкил})-(\text{C}_1-\text{C}_{10}\text{-алкилен})-\text{S}-$ ,



где S присоединяется к  $(L^3)_{0-1}$  в формуле (2000), где точка присоединения на правой стороне (т.е. на N) представляет собой к  $(L^3)_{0-1}$  в формуле (2000),  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ , где N присоединяется к  $(L^3)_{0-1}$  в формуле (2000),

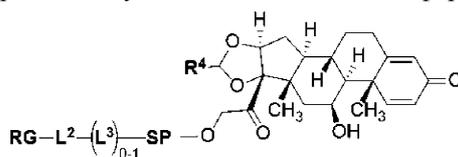


муле (2000), где N присоединяется к  $(L^3)_{0-1}$  в формуле (2000) и где Ar представляет собой



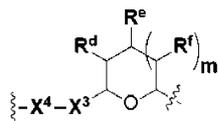
RG, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup>, SP, R<sup>4</sup> и R<sup>x</sup> соответствуют приведенным здесь определениям.

В некоторых или любых вариантах осуществления соединение формулы (II-P) представлено ниже:



(II-P);

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомер или производное, где R<sup>4</sup> представляет собой алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил; SP представляет собой -C(O)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен-C(O)-, -C(O)-N(C<sub>1-3</sub>алкил)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен-X<sup>1</sup>-, где X<sup>1</sup> присоединяется к L<sup>3</sup> в формуле (II), -C(O)-N(R<sup>5</sup>)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен-C(O)NH-X<sup>2</sup>-, где X<sup>2</sup> присоединяется к L<sup>3</sup> в формуле (II) или



, где X<sup>4</sup> присоединяется к L<sup>3</sup> в формуле (II);

X<sup>1</sup> представляет собой -N(C<sub>1-3</sub>алкил)-; X<sup>2</sup> представляет собой -NH-;

X<sup>3</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>-, X<sup>3</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-C(O)-, где C(O) присоединяется к X<sup>4</sup> или X<sup>3</sup> представляет собой -C(O)-;

X<sup>4</sup> представляет собой -O-;

R<sup>5</sup> представляет собой H, -OH, -OCH<sub>3</sub> или алкил; R<sup>d</sup>, R<sup>e</sup> и R<sup>f</sup> представляет собой независимо -H, -OH, гидроксиалкил, алкоксикарбонил, -C(O)OH или -CH<sub>2</sub>OR<sup>g</sup>, где в каждом случае R<sup>g</sup> представляет собой независимо -CH<sub>2</sub>C(O)OH или -CH<sub>2</sub>C(O)O(алкил); и

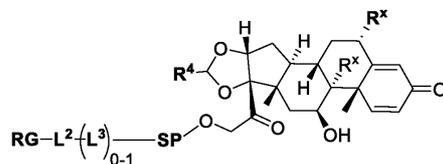
m представляет собой 0 или 1;

RG представляет собой реактивная группа;

L<sup>2</sup> представляет собой соединительный линкер; и

L<sup>3</sup>, если имеется, представляет собой саморасщепляющийся линкер.

В некоторых или любых вариантах осуществления соединение формулы (II-P-1) представлено ниже:

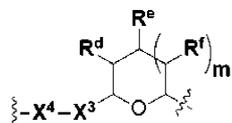


(II-P-1);

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват, стереоизомер или производное, где

R<sup>4</sup> представляет собой алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил;

SP представляет собой -C(O)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен-C(O)-, -C(O)-N(C<sub>1-3</sub>алкил)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен-X<sup>1</sup>-, где X<sup>1</sup> присоединяется к L<sup>3</sup> в формуле (II), -C(O)-N(R<sup>5</sup>)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен-C(O)NH-X<sup>2</sup>-, где X<sup>2</sup> присоединяется к L<sup>3</sup>

в формуле (II) или , где X<sup>4</sup> присоединяется к L<sup>3</sup> в формуле (II);

X<sup>1</sup> представляет собой -N(C<sub>1-3</sub>алкил)-;

X<sup>2</sup> представляет собой -NH-;

X<sup>3</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>-, X<sup>3</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-C(O)-, где C(O) присоединяется к X<sup>4</sup> или X<sup>3</sup> представляет собой -C(O)-;

X<sup>4</sup> представляет собой -O-;

R<sup>5</sup> представляет собой H, -OH, -OCH<sub>3</sub> или алкил;

R<sup>d</sup>, R<sup>e</sup> и R<sup>f</sup> представляет собой независимо -H, -OH, гидроксиалкил, алкоксикарбонил, -C(O)OH или -CH<sub>2</sub>OR<sup>g</sup>, где в каждом случае R<sup>g</sup> представляет собой независимо -CH<sub>2</sub>C(O)OH или -CH<sub>2</sub>C(O)O(алкил); и m представляет собой 0 или 1;

RG представляет собой реактивная группа;

L<sup>2</sup> представляет собой соединительный линкер; и

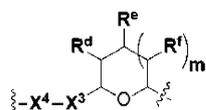
L<sup>3</sup>, если имеется, представляет собой саморасщепляющийся линкер.

В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), где оба R<sup>x</sup> представляют собой водород. В некоторых или любых вариантах осуществления оба R<sup>x</sup> представляют собой фтор.

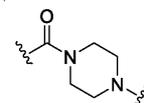
В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) и (II-P-

1), где  $R^4$  представляет собой алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой не циклоалкил. В некоторых из этих вариантов осуществления  $R^4$  представляет собой линейный или разветвленный алкил. В некоторых из этих вариантов осуществления  $R^4$  представляет собой арил. В некоторых из этих вариантов осуществления  $R^4$  представляет собой арилалкил. В некоторых из этих вариантов осуществления  $R^4$  представляет собой N-содержащий гетероциклоалкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой алкил, такой как, помимо прочего, метил, этил, пропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил или нонил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой метил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой этил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой n-пропил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой i-пропил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой n-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой i-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой t-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой втор-бутил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой пентил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой гептил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой октил или нонил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой арил, такой как, помимо прочего, фенил, фенол или нафтил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой фенил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой нафтил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой гетероарил - такой как, помимо прочего, тиенил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой арилалкил - такой как, помимо прочего, бензил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой N-содержащий гетероциклоалкил, такой как, помимо прочего, пиперидинил. В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), где оба  $R^x$  представляют собой водород. В некоторых или любых вариантах осуществления оба  $R^x$  представляют собой фтор. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой в R-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой в S-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой смесь R- и S-конфигураций. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой смесь R- и S-конфигураций, где отношение R:S составляет около 1:1, около 2:1, около 3:1, около 4:1, около 5:1, около 6:1, около 7:1, около 8:1, около 9:1 или около 10:1.

В некоторых вариантах осуществления, представлено соединение формулы (II), где оба  $R^x$  представляют собой водород; и SP представляет собой  $-C(O)-C_1-C_{10}$ -алкилен- $C(O)-$ ,  $-C(O)-N(C_{1-6}$ алкил)- $C_1-C_{10}$ -алкилен- $X^1-$ , где  $X^1$  присоединяется к L в формуле (II),  $-C(O)-N(H)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)-S-, где S присоединяется к L в формуле (II),  $-C(O)-N(C_{1-6}$ алкил)- $(C_1-C_{10}$ -алкилен)-S-, где S присоединяется к L в формуле (II),  $-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50a}$ -, где  $NR^{50a}$  присоединяется к L в формуле (II),  $-C(O)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50a}$ -, где  $NR^{50a}$  присоединяется к L в формуле (II) и где в каждом случае  $C_1-C_{10}$ -алкилен независимо и опционально замещается одной или несколькими гидроксильными группами,  $-C(O)-N(R^5)-C_1-C_{10}$ -алкилен- $C(O)NH-X^2-$ , где  $X^2$  присоединяется к L в формуле (II) или



где  $X^4$  присоединяется к L в формуле (II); или оба  $R^x$  представляют собой фтор; и SP представляет собой  $-C(O)-N(C_{1-6}$ алкил)- $C_1-C_{10}$ -алкилен- $X^{1b}$ -, где  $X^{1b}$  присоединяется к L в формуле (II),



$-C(O)-N(H)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $X^{1b}$ -, где  $X^{1b}$  присоединяется к L в формуле (II), где точка присоединения на правой стороне (т.е. на N) представляет собой к L в формуле (II),  $-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50a}$ -, где  $NR^{50a}$  присоединяется к L в формуле (II),  $-C(O)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50a}$ -, где  $NR^{50a}$  присоединяется к L в формуле (III) и где в каждом случае  $C_1-C_{10}$ -алкилен независимо и опционально замещается одной или несколькими гидроксильными группами или  $-C(O)-N(R^5)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $C(O)NH-X^2-$ , где  $X^2$  присоединяется к L в формуле (II).

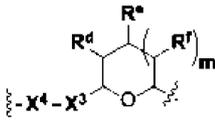
В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где оба  $R^x$  представляют собой водород и SP представляет собой  $-C(O)-C_1-C_{10}$ -алкилен- $C(O)-$ . В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где SP представляет собой  $-C(O)-C_2-C_5$ -алкилен- $C(O)-$ . В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где SP представляет собой  $-C(O)-CH_2CH_2-C(O)-$ .

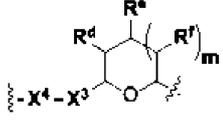
В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где оба  $R^x$  представляют собой фтор и SP представляет собой  $-C(O)-C_1-C_{10}$ -алкилен- $C(O)-$ . В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где SP представляет собой  $-C(O)-C_2-C_5$ -алкилен- $C(O)-$ . В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где SP представляет собой  $-C(O)-CH_2CH_2-C(O)-$ .

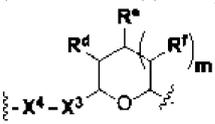
В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где оба  $R^x$  представляют собой водород и SP представляет собой  $-C(O)-N(C_{1-6}$ алкил)- $C_1-C_{10}$ -

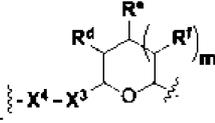


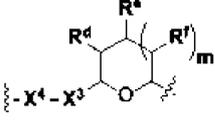


P-1), где оба  $R^x$  представляют собой водород и SP представляет собой , где  $X^4$  присоединяется к  $L^3$  в формуле (II), (II-P) или (II-P-1). В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где оба  $R^x$  представляют собой фтор и SP представляет

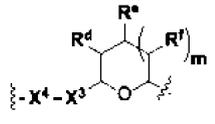
собой , где  $X^4$  присоединяется к  $L^3$  в формуле (II), (II-P) или (II-P-1). В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где SP пред-

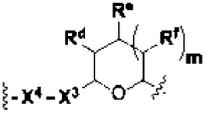
ставляет собой  и  $X^3$  представляет собой  $-CH_2-$ . В некоторых вариантах осуществления

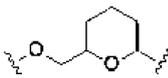
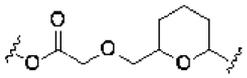
здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где SP-  и  $X^3$  представляет собой  $-CH_2-O-(C_1-C_{10}-алкилен)-C(O)-$ , где C(O) присоединяется к  $X^4$ . В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где SP представляет собой

 и  $X^3$  представляет собой  $-C(O)-$ . В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где  $R^d$ ,  $R^e$  и  $R^f$  представляет собой независимо -H, -OH, гидроксиалкил, алкоксикарбонил,  $-C(O)OH$  или  $-CH_2OR^g$ , где в каждом случае  $R^g$  представляет собой независимо  $-CH_2C(O)OH$  или  $-CH_2C(O)O(алкил)$ . В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где  $R^d$  и  $R^e$  представляет собой независимо -H или -OH. В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где  $m$  равно 0. В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где  $m$  равно 1. В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где  $m$  представляет собой 1 и  $R^f$  представляет собой -H или -OH.

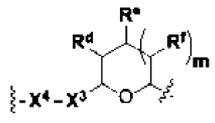
В некоторых вариантах осуществления, представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где оба  $R^x$  представляют собой водород и SP представляет собой  $-C(O)-N(C_{1-3}алкил)-C_1-C_{10}-алкилен-X^1-$ ,

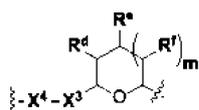
где  $X^1$  присоединяется к  $L^3$  в формуле (II), (II-P) или (II-P-1); SP представляет собой , где  $X^3$  представляет собой  $-CH_2-$ ,  $m$  равно 1, и  $R^d$ ,  $R^e$  и  $R^f$  представляет собой -H; или SP представляет

собой , где  $X^3$  представляет собой  $-CH_2-O-(C_1-C_{10}-алкилен)-C(O)-$ , где C(O) присоединяется к  $X^4$ ,  $m$  представляет собой 1, и  $R^d$ ,  $R^e$  и  $R^f$  представляет собой -H. В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где SP представляет собой  $-C(O)-$

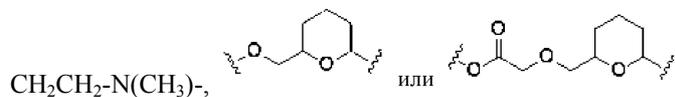
$N(CH_3)-CH_2CH_2-N(CH_3)-$ ,  или .

В некоторых вариантах осуществления, представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где оба  $R^x$  представляют собой фтор и SP представляет собой  $-C(O)-N(C_{1-3}алкил)-C_1-C_{10}-алкилен-X^1-$ , где

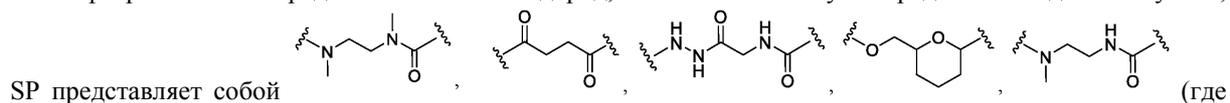
$X^1$  присоединяется к  $L^3$  в формуле (II), (II-P) или (II-P-1); SP представляет собой , где  $X^3$  представляет собой  $-CH_2-$ ,  $m$  равно 1, и  $R^d$ ,  $R^e$ , и  $R^f$  представляет собой -H; или SP представляет собой



где  $X^3$  представляет собой  $-\text{CH}_2\text{-O-(C}_1\text{-C}_{10}\text{-алкилен)-C(O)-}$ , где  $\text{C(O)}$  присоединяется к  $X^4$ ,  $m$  представляет собой 1, и  $R^d$ ,  $R^e$  и  $R^f$  представляет собой  $-\text{H}$ . В некоторых вариантах осуществления, представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где  $\text{SP}$  представляет собой  $-\text{C(O)-N(CH}_3\text{)-}$

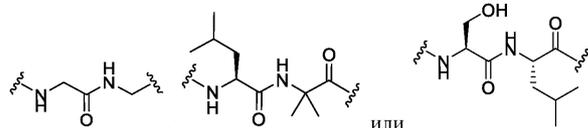
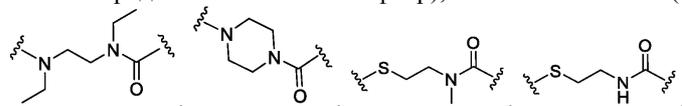


$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-}$ , В некоторых вариантах осуществления, представлено соединение формулы (II), где оба  $R^x$  представляют собой фтор или оба  $R^x$  представляют собой водород, или  $R^x$  соответствует определению в данном пункте;

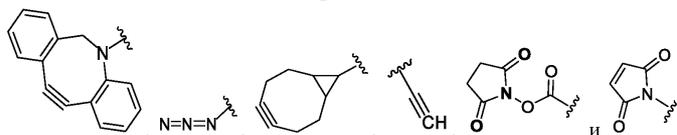


$\text{SP}$  представляет собой

оба  $R^x$  представляют собой фтор), (где оба  $R^x$  представляют собой фтор),



В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где  $\text{RG}$  представляет собой активную группу, выбираемую из



В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где  $\text{RG}$  представляет собой

В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где  $\text{RG}$  представляет собой

В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где  $\text{RG}$  представляет собой

В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где  $\text{RG}$  представляет собой

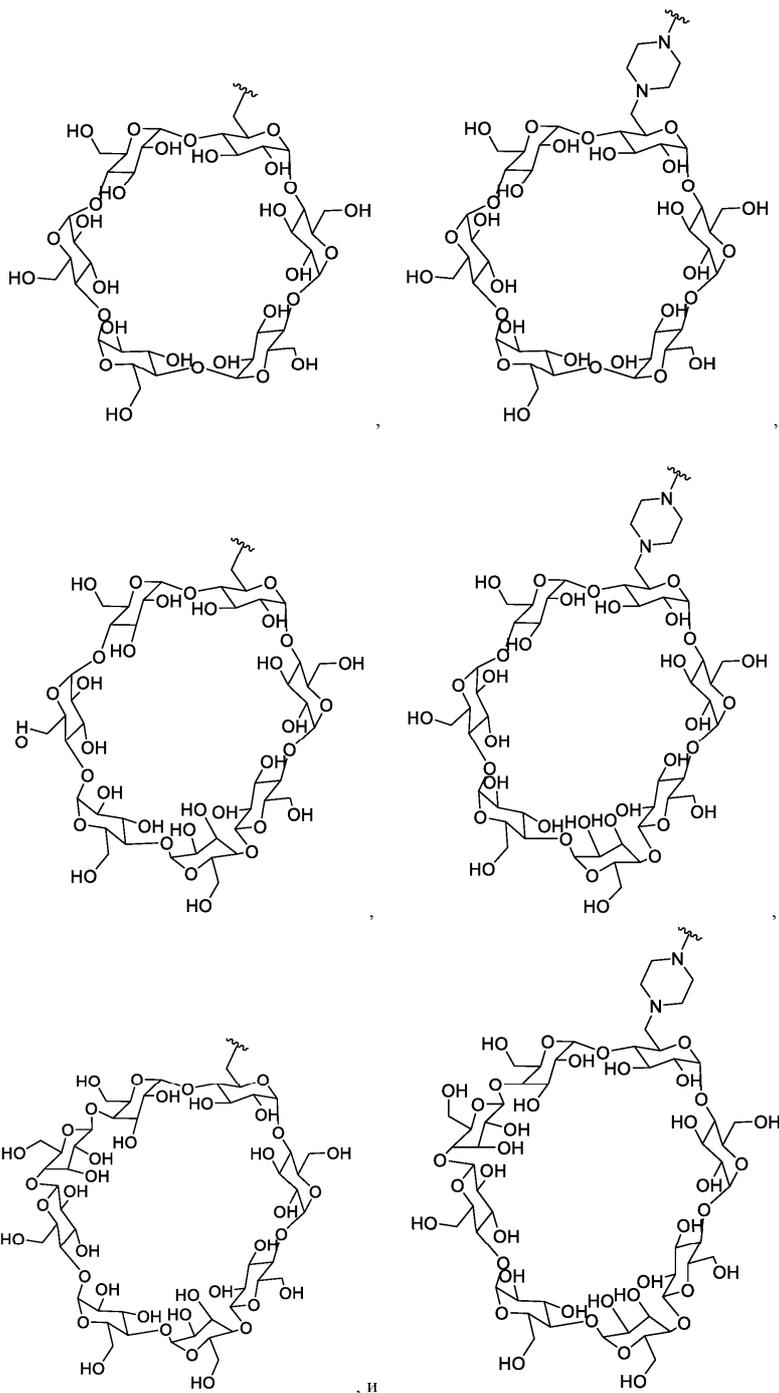
В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где  $\text{RG}$  представляет собой

В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где  $\text{RG}$  представляет собой

В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где  $\text{RG}$  представляет собой

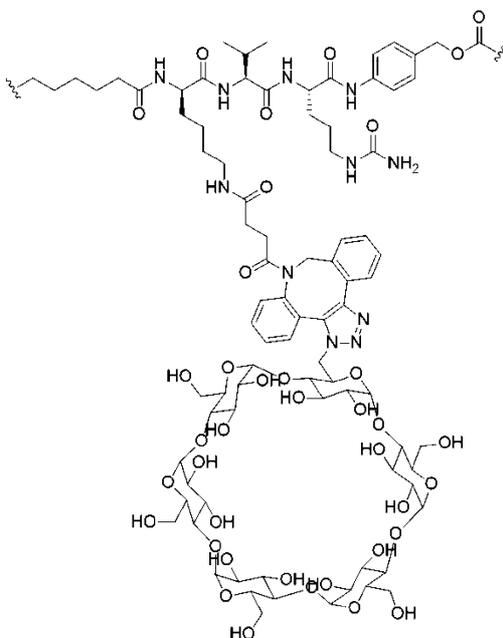
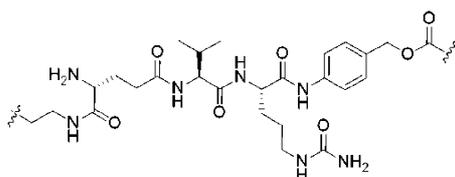
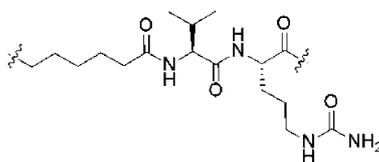
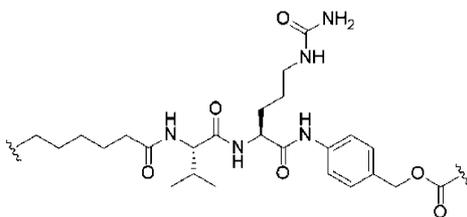
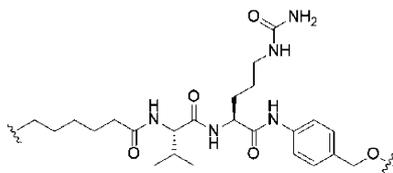
В некоторых вариантах осуществления  $-\text{L}^2\text{-(L}^3\text{)}_{0-1}$  в формуле (II), (II-P) или (II-P-1) означает любую двухвалентную группу или фрагмент, который соединяет или связывает реактивную группу ( $\text{RG}$  в формуле (II), (II-P) или (II-P-1) с соединением-нагрузкой, представленным здесь (например, стероидом). В общем, подходящие  $-\text{L}^2\text{-(L}^3\text{)}_{0-1}$  представляет собой те, которые являются достаточно стабильными для использования периода полужизни в кровотоке антитела и в то же время способными высвободить свою нагрузку после антиген-опосредованной интернализации конъюгата. представляет собой  $\text{L}^2\text{-(L}^3\text{)}_{0-1}$  могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми линкерами. Расщепляемые линкеры представляет собой линкеры, которые расщепляются посредством внутриклеточного метаболизма после интернализации, например, расщепления через гидролиз, восстановления или ферментной реакции. Нерасщепляемые

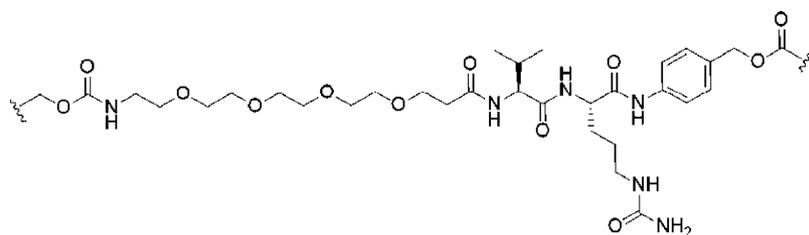
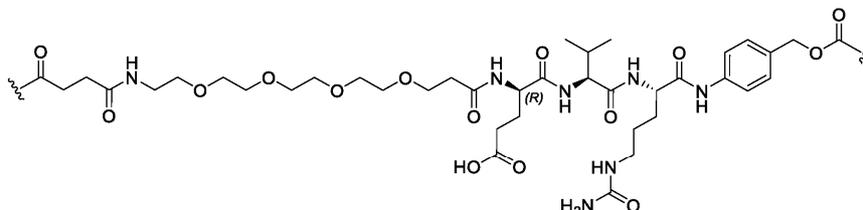
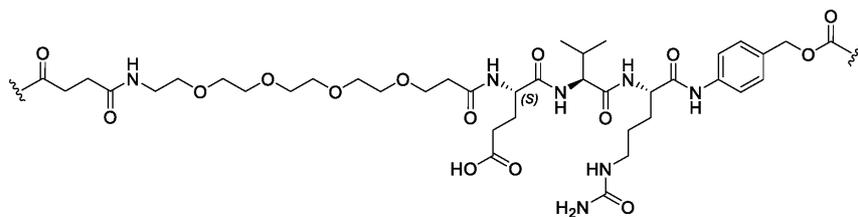




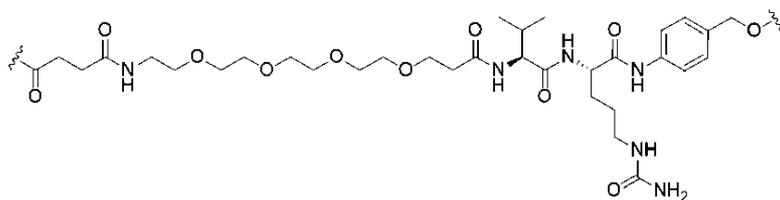
В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где  $-L^2-(L^3)_{0,1}-$  содержит

045111

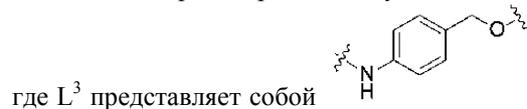




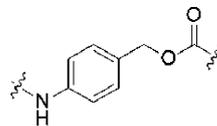
или



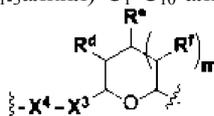
В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (II), (II-Р) или (II-Р-1),



где NH группа присоединяется к  $L^2$ , когда SP представляет

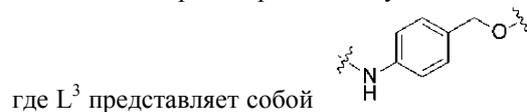


собой  $-C(O)-C_1-C_{10}$ -алкилен- $C(O)-$ ; или  $L^3$  представляет собой , где NH группа присоединяется к  $L^2$ , когда SP представляет собой  $-C(O)-N(C_{1-3}\text{алкил})-C_1-C_{10}$ -алкилен- $X^1$ -или  $-C(O)-N(R^5)-$

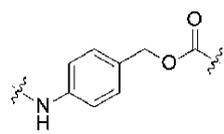


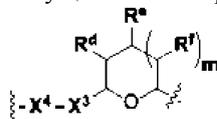
$C_1-C_{10}$ -алкилен- $C(O)NH-X^2-$ ; или  $L^3$  отсутствует, когда SP -

В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (II), (II-Р) или (II-Р-1),



, где NH группа присоединяется к  $L^2$ , когда SP представляет собой  $-C(O)-C_1-C_{10}$ -алкилен- $C(O)-$ . В некоторых вариантах осуществления, представлено соединение

формулы (II), (II-P) или (II-P-1), где  $L^3$  представляет собой  где NH группа присоединяется к  $L^2$ , когда SP представляет собой  $-C(O)-N(C_{1-3}\text{алкил})-C_1-C_{10}\text{-алкилен-}X^1-$  или  $-C(O)-N(R^5)-C_1-C_{10}\text{-алкилен-}C(O)NH-X^2-$ . В некоторых вариантах осуществления представлено соединение формулы (II), (II-

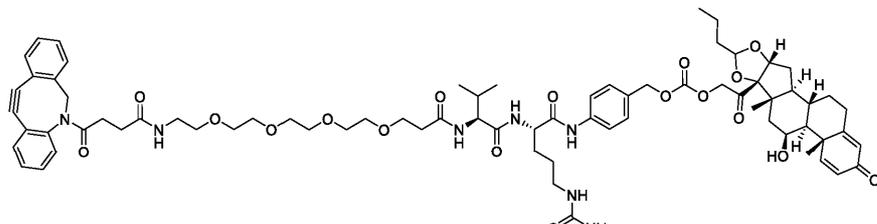
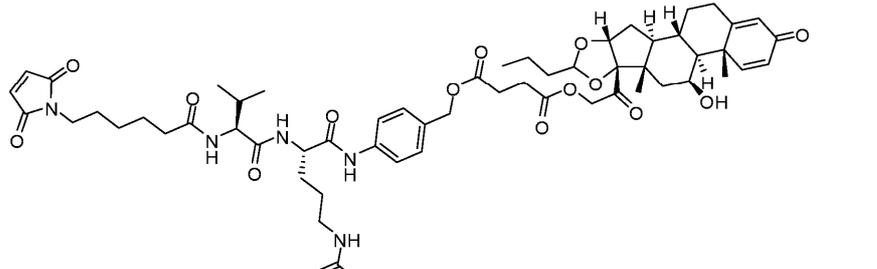
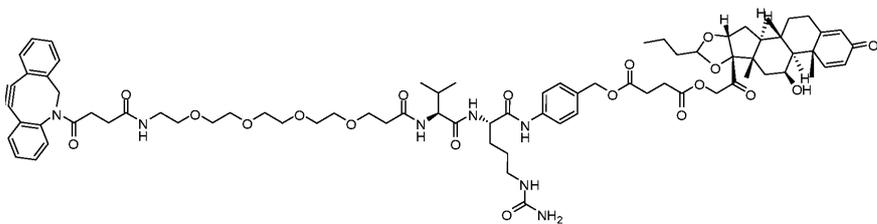
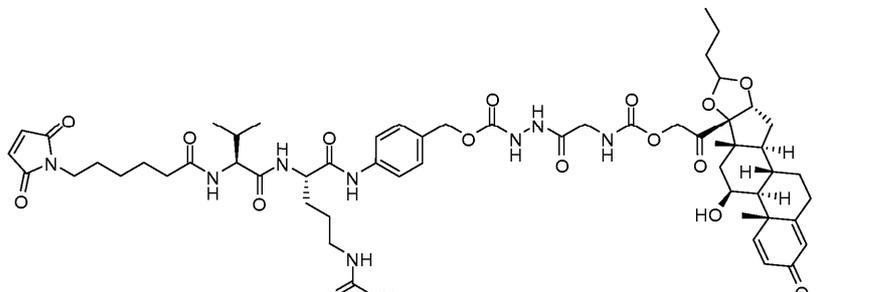


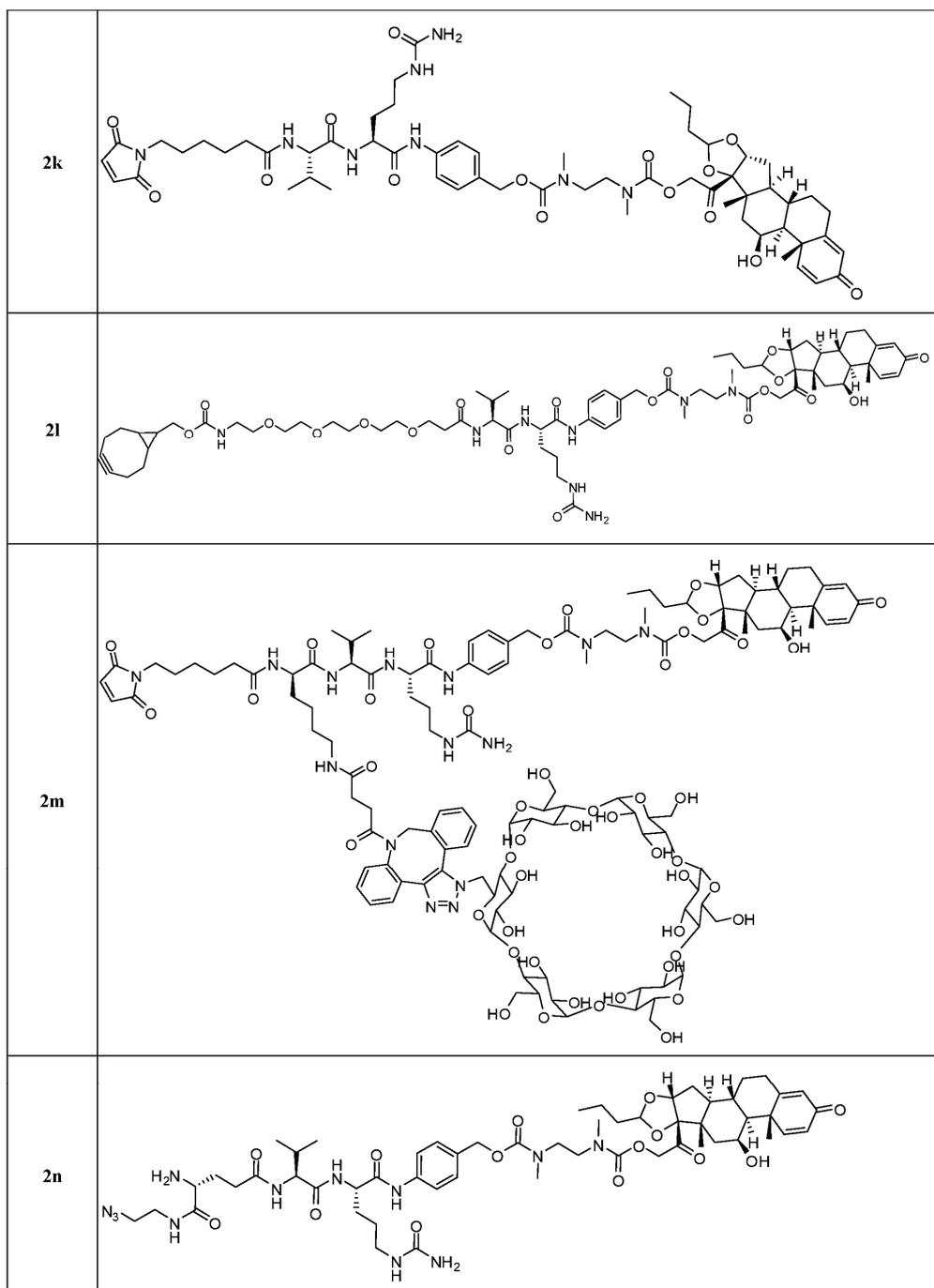
P) или (II-P-1), где  $L^3$  отсутствует, когда SP -

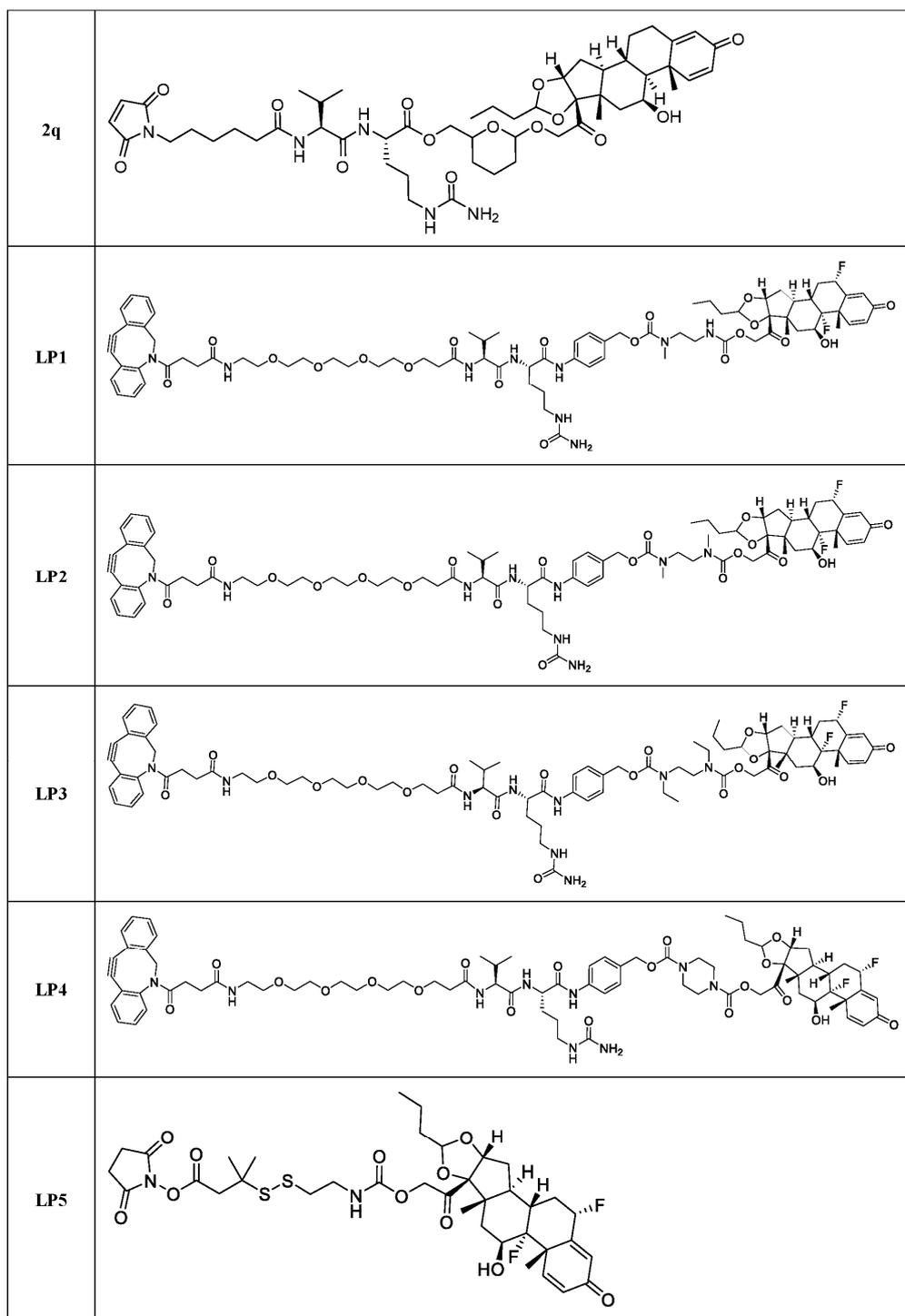
Здесь также представлены соединения, имеющие следующие структуры.

Таблица 2

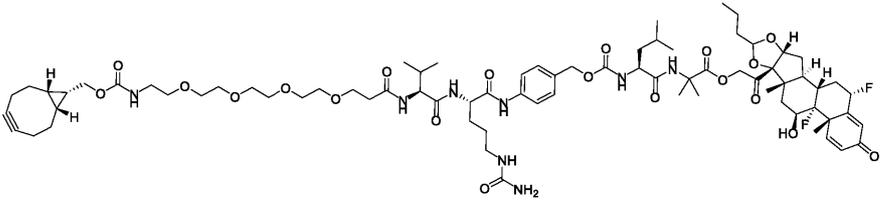
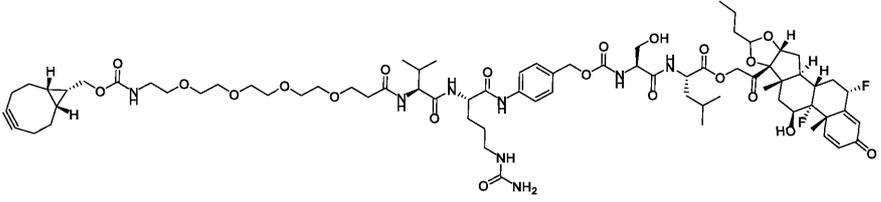
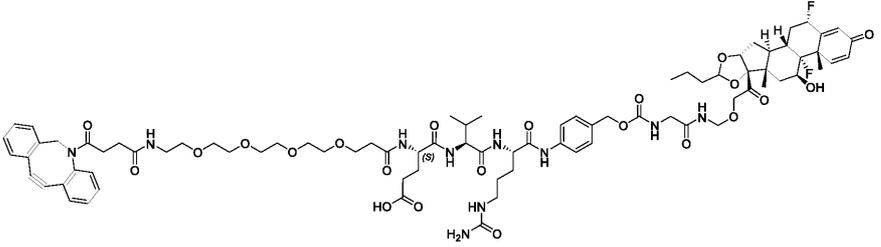
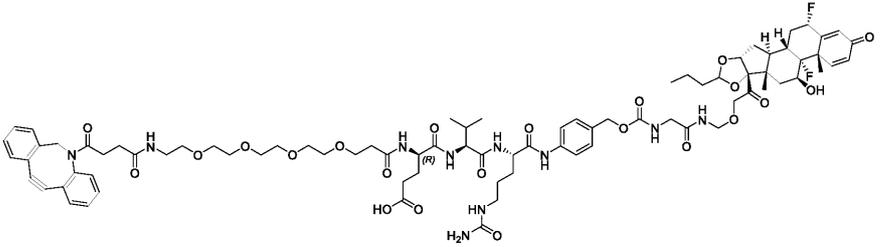
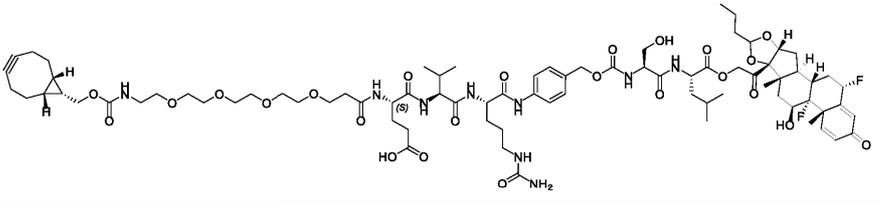
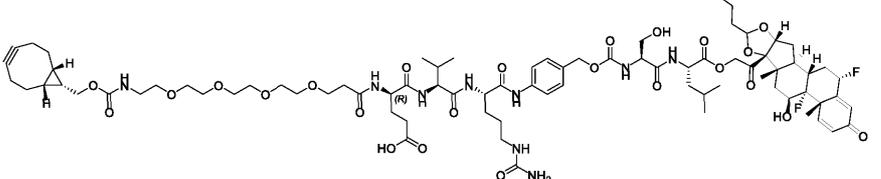
Будесонид-спейсер-линкер-реактивная группа

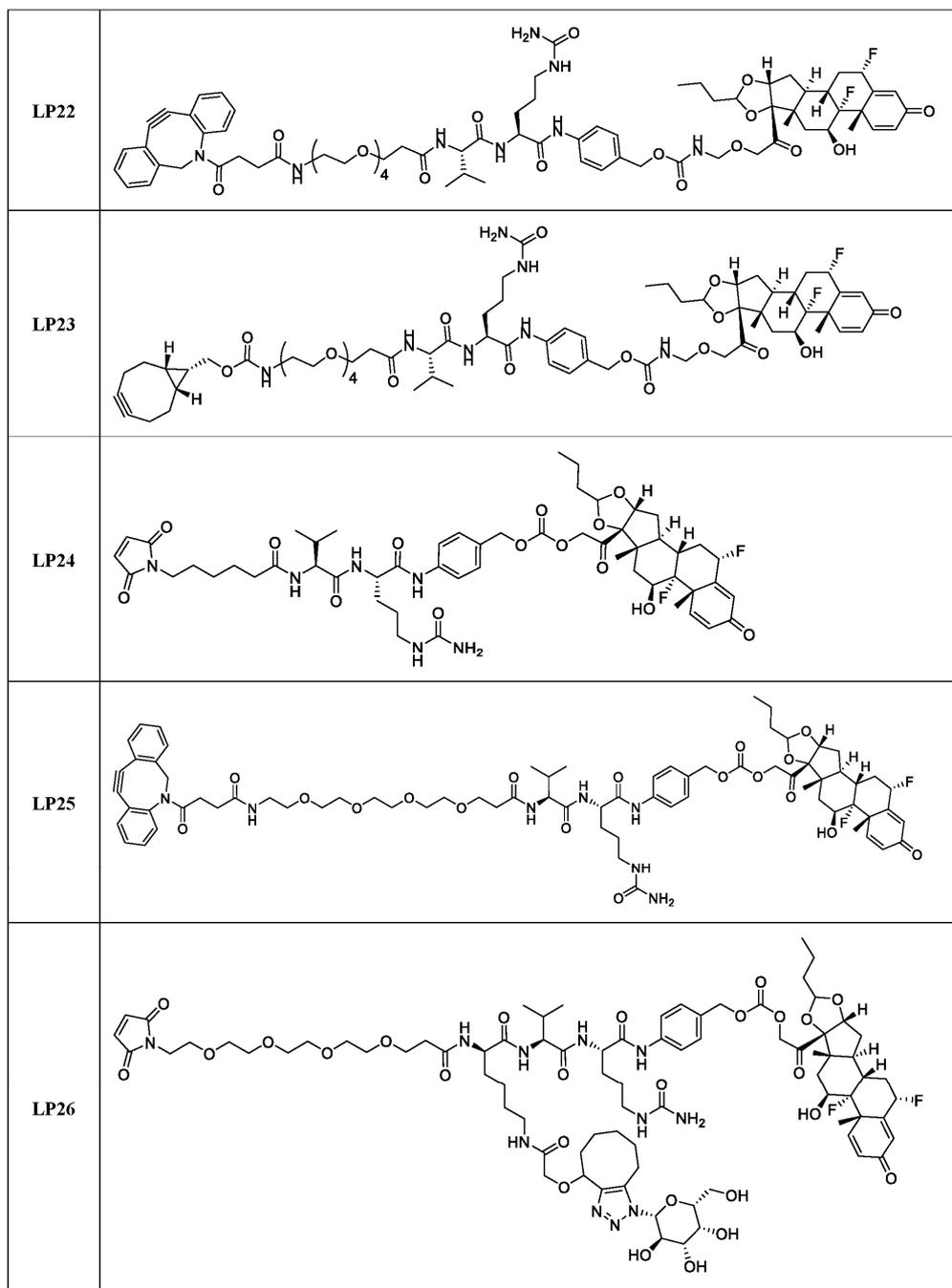
2b	
2f	
2g	
2j	

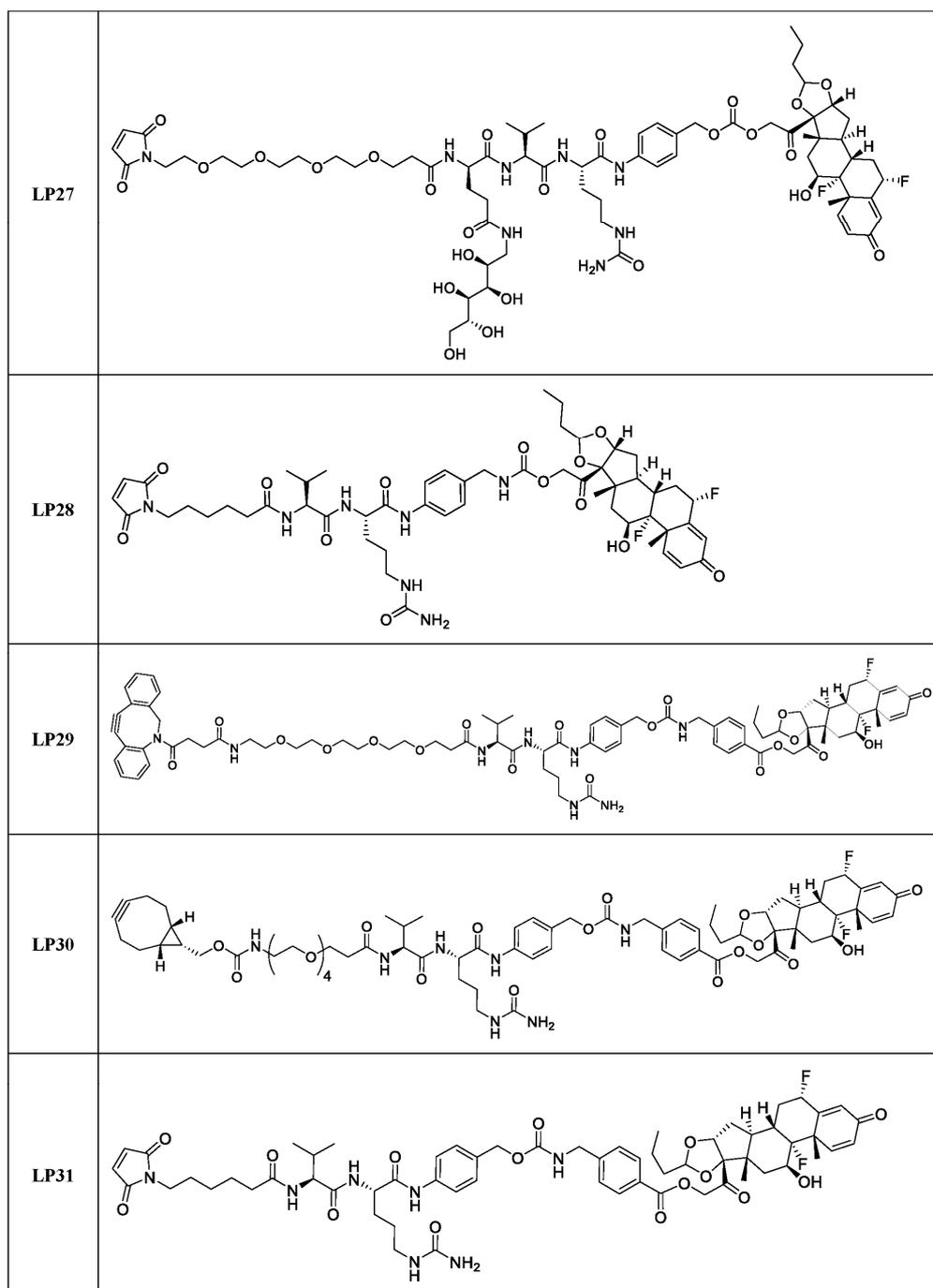




LP6	
LP7	
LP8	
LP9	
LP10	
LP11	

LP12	 <p>Chemical structure of LP12, a complex molecule featuring a bicyclic core, a long polyether chain, and a fluorinated aromatic ring system.</p>
LP13	 <p>Chemical structure of LP13, similar to LP12 but with a different configuration at the chiral center of the polyether chain.</p>
LP18	 <p>Chemical structure of LP18, featuring a bicyclic core, a long polyether chain, and a fluorinated aromatic ring system, with a different configuration at the chiral center of the polyether chain.</p>
LP19	 <p>Chemical structure of LP19, similar to LP18 but with a different configuration at the chiral center of the polyether chain.</p>
LP20	 <p>Chemical structure of LP20, featuring a bicyclic core, a long polyether chain, and a fluorinated aromatic ring system, with a different configuration at the chiral center of the polyether chain.</p>
LP21	 <p>Chemical structure of LP21, similar to LP20 but with a different configuration at the chiral center of the polyether chain.</p>





Связующие агенты, например, антитела, также могут быть конъюгированы посредством реакции клик-химии. В некоторых вариантах осуществления упомянутой реакции клик-химии линкер-нагрузка содержит реактивную группу, например, алкин, который способен вступать в реакцию 1,3 циклоприсоединения с азидом. Такие подходящие реактивные группы включают, помимо прочего, напряженные алкины, например, те, которые подходят для промотированных напряжением алкин-азидных циклоприсоединений (SPAAC), циклоалкины, например, циклооктины, бензаннелированные алкины и алкины, способные вступать в реакции 1,3 циклоприсоединения с азидами в отсутствие катализаторов на основе меди. Подходящие алкины также включают, помимо прочего, DIBAC, DIBO, BARAC, DIFO, замещенные алкины, например, фторированные алкины, аза-циклоалкины, BCN. Линкер-нагрузки, содержащие такие реактивные группы, полезны для конъюгирования антител, которые были функционализированы с азидо-группами. Такие функционализированные антитела включают антитела, функционализированные с азидо-полиэтиленгликольными группами. В определенных вариантах осуществления такое функционализированное антитело получают посредством реакции антитела, содержащего минимум один глутаминовый остаток, например, тяжелую цепь Q295, и соединения по формуле  $H_2N-LL-N_3$ , где LL представляет собой двухвалентную полиэтиленгликольную группу, в присутствии фермента транслгутаминазы. Для удобства, в определенных представленных здесь формулах антитело Ab представляет собой модифицированное антитело с одной или несколькими ковалентно связанными  $-LL-N_3$  группами или их остатками. Предпоч-

тительно, в каждом случае  $-LL-N_3$  ковалентно связан с аминокислотной боковой цепью глутаминового остатка антитела. Также предпочтительно,  $-LL-N_3$  вступает или может вступить в реакцию с реактивной группой RG, в результате чего образуется ковалентная связь с линкер-нагрузкой. Опять же для удобства, в определенных представленных здесь формулах  $-LL-N_3$  группы представлены в явно выраженной форме.

Здесь представлены способы синтеза конъюгатов, включающие контакт между связующим агентом, например, антителом, и описанной здесь линкер-нагрузкой. В определенных вариантах осуществления линкер-нагрузка включает циклодекстриновый фрагмент.

Соединения формулы (II), (II-P) или (II-P-1) представляет собой линкер-нагрузки, которые являются полезными для синтетических промежуточных соединений в синтезе описанных здесь конъюгатов. Эти линкер-нагрузки содержат реактивную группу, которая вступает в реакцию с антителом, в результате чего образуются описанные здесь конъюгаты.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II), (II-P) или (II-P-1)  $R^4$  представляет собой алкил. В некоторых вариантах осуществления формулы (II), (II-P) или (II-P-1),  $R^4$  представляет собой метил, этил, n-пропил, i-пропил, n-бутил, s-бутил, t-бутил, i-бутил, пентильный фрагмент, гексильный фрагмент, циклопропил, циклобутил, циклопентил или циклогексил. В некоторых вариантах осуществления формулы (II), (II-P) или (II-P-1)  $R^4$  представляет собой алкил. В некоторых вариантах осуществления формулы (II), (II-P) или (II-P-1)  $R^4$  представляет собой метил, этил, n-пропил, i-пропил, n-бутил, s-бутил, t-бутил, i-бутил, пентильный фрагмент или гексильный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления формулы (II), (II-P) или (II-P-1)  $R^4$  представляет собой n-пропил.

В определенных вариантах осуществления  $RG-L^2-(L^3)_{0-1}$  представляет собой

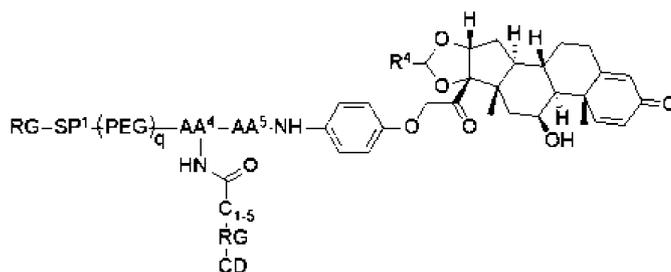
$$RG-SP^1-\left(PEG\right)_q-SP^2-AA^1-AA^2-\left(A\right)-CH_2O-\left\{ \right. \quad ; \quad \left. \left(A\right) \right.$$

представляет собой арил или гетероарил; RG представляет собой реактивная группа, определение которой дано ниже;  $SP^1$  и  $SP^2$  в каждом случае, независимо в каждом примере, отсутствует или является остатком спейсерной группы, и где  $SP^1$  содержит трехвалентный линкер;  $AA^1$  представляет собой трехвалентный линкер, содержащий аминокислотный остаток;  $AA^2$  представляет собой пептидный остаток; PEG представляет собой полиэтиленгликольный

остаток; где  обозначает атом, через который указанная химическая группа связывается с соседними группами в формуле, CD представляет собой независимо в каждом случае, отсутствует или является циклодекстриновым остатком, где присутствует минимум один CD, индекс q представляет собой целое число, которое выбирается от 0 до 5, включительно. В этих примерах индекс q равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления индекс q равен 0. В некоторых вариантах осуществления индекс q равен 1. В некоторых вариантах осуществления индекс q равен 2. В некоторых вариантах осуществления индекс q равен 3. В некоторых вариантах осуществления индекс q равен 4. В некоторых вариантах осуществления индекс q равен 5. В некоторых вариантах осуществления любой из  $AA^1$  или  $AA^2$  содержит, независимо в каждом случае, аминокислоту, которая выбирается из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, триптофана, фенилаланина, пролина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина или цитруллина, их производного или их комбинации. В определенных вариантах осуществления  $AA^1$  представляет собой аминокислота, которая выбирается из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, триптофана, фенилаланина, пролина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина или цитруллина, их производного или их комбинации. В определенных вариантах осуществления  $AA^1$  представляет собой лизин или производное лизина. В определенных вариантах осуществления  $AA^1$  представляет собой лизин. В определенных вариантах осуществления  $AA^1$  представляет собой D-лизин. В определенных вариантах осуществления  $AA^1$  представляет собой L-лизин. В определенных вариантах осуществления  $AA^2$  представляет собой дипептидный остаток, трипептидный остаток, тетра-пептидный остаток или пента-пептидный остаток. В определенных вариантах осуществления  $AA^2$  представляет собой дипептидный остаток. В определенных вариантах осуществления  $AA^2$  представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления  $AA^2$  представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах осуществления  $AA^2$  представляет собой валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления  $AA^2$  представляет собой аланин-валин. В некоторых вариантах осуществления  $AA^2$  представляет собой валин-глицин. В некоторых вариантах осуществления  $AA^2$  представляет собой глицин-валин. В определенных вариантах осуществления  $AA^2$  представляет собой трипептидный остаток. В некоторых вариантах осуществления  $AA^2$  представляет собой глутамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления  $AA^2$  представляет собой глутамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления  $AA^2$  представляет собой лизин-валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления  $AA^2$  представляет собой лизин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления  $AA^2$  представляет собой глутамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления  $AA^2$  представляет собой тетрапептидный остаток. В некоторых вариантах осуществления  $AA^2$  представляет собой глицин-глицин-фенилаланин-глицин. В некоторых вариантах осуществ-

ления AA<sup>2</sup> представляет собой пентапептидный остаток. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>2</sup> представляет собой глицин-глицин-глицин-глицин-глицин. В некоторых вариантах осуществления SP<sup>1</sup> независимо в каждом случае выбирается из группы, состоящей из C<sub>1-6</sub>алкилена, -NH-, -C(O)-, (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>e</sub>, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-C(O)-, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, -C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>v</sub>- и их комбинаций, где индекс e представляет собой целое число, которое выбирается от 0 до 4, включительно, индекс u представляет собой целое число, которое выбирается от 1 до 8, включительно, и индекс v представляет собой целое число, которое выбирается от 1 до 8, включительно. В некоторых вариантах осуществления SP<sup>2</sup> независимо в каждом случае выбирается из группы, состоящей из C<sub>1-6</sub>алкилена, -NH-, -C(O)-, (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>e</sub>, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-C(O)-, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, -C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>v</sub>- и их комбинаций, где индекс e представляет собой целое число, которое выбирается от 0 до 4, включительно, индекс u представляет собой целое число, которое выбирается от 1 до 8, включительно, и индекс v представляет собой целое число, которое выбирается от 1 до 8, включительно.

В определенных вариантах осуществления здесь представлено соединение, имеющее структуру формулы (IIIc-R):



Формула (IIIc-R)

RG представляет собой реактивная группа;

CD представляет собой циклодекстрин;

SP<sup>1</sup> представляет собой спейсерная группа;

AA<sup>4</sup> представляет собой аминокислотный остаток;

AA<sup>5</sup> представляет собой дипептидный остаток;

PEG представляет собой полиэтиленгликоль;

q представляет собой целое число, которое выбирается от 0 до 5, включительно;

x целое число, которое выбирается от 0 до 30, включительно;

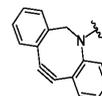
R<sup>4</sup> соответствует приведенному здесь определению;

SP<sup>1</sup> и SP<sup>2</sup> независимо в каждом случае отсутствуют или являются остатком спейсерной группы и где SP<sup>1</sup> содержит трехвалентный линкер; AA<sup>4</sup> представляет собой трехвалентный линкер, содержащий аминокислотный остаток; AA<sup>5</sup> представляет собой дипептидный остаток; PEG представляет собой поли-

этиленгликольный остаток; где  обозначает атом, через который указанная химическая группа связывается с соседними группами в формуле, CD независимо в каждом случае отсутствует или является циклодекстриновым остатком, где присутствует минимум один CD, индекс q представляет собой целое число, которое выбирается от 0 до 5, включительно; в этих примерах индекс q равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления индекс q равен 0. В некоторых вариантах осуществления индекс q равен 1. В некоторых вариантах осуществления индекс q равен 2. В некоторых вариантах осуществления индекс q равен 3. В некоторых вариантах осуществления индекс q равен 4. В некоторых вариантах осуществления индекс q равен 5. В некоторых вариантах осуществления любой из AA<sup>4</sup> или AA<sup>5</sup> содержит, независимо в каждом случае, аминокислоту, которая выбирается из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, триптофана, фенилаланина, пролина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина или цитруллина, их производного или их комбинации. В определенных вариантах осуществления AA<sup>4</sup> представляет собой аминокислота, которая выбирается из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, триптофана, фенилаланина, пролина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина или цитруллина, их производного или их комбинации. В определенных вариантах осуществления AA<sup>4</sup> представляет собой лизин. В определенных вариантах осуществления AA<sup>4</sup> представляет собой лизин или производное лизина. В определенных вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой аланин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой валин-глицин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой глутамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой ли-

зин-валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой лизин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA<sup>5</sup> представляет собой глутамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления SP<sup>1</sup> независимо в каждом случае выбирается из группы, состоящей из C<sub>1-6</sub>алкилена, -NH-, -C(O)-, (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>e</sub>, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-C(O)-, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, -C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>v</sub>- и их комбинаций, где индекс e представляет собой целое число, которое выбирается от 0 до 4, включительно, индекс u представляет собой целое число, которое выбирается от 1 до 8, включительно, и индекс v представляет собой целое число, которое выбирается от 1 до 8, включительно. В некоторых вариантах осуществления SP<sup>2</sup> независимо в каждом случае выбирается из группы, состоящей из C<sub>1-6</sub>алкилена, -NH-, -C(O)-, (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>e</sub>, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-C(O)-, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, -C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>v</sub>- и их комбинаций, где индекс e представляет собой целое число, которое выбирается от 0 до 4, включительно, индекс u представляет собой целое число, которое выбирается от 1 до 8, включительно, и индекс v представляет собой целое число, которое выбирается от 1 до 8, включительно. Реактивная группа (RG) представляет собой функциональная группа или фрагмент, которые вступают в реакцию с реактивной частью антитела, модифицированного антитела или его антиген-связывающим фрагментом. В определенных вариантах осуществления "реактивная группа" представляет собой это функциональная группа или фрагмент (например, малеимид или эфир NHS), которые вступают в реакцию с цистеиновым или лизиновым остатком антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных вариантах осуществления "реактивная группа" представляет собой это функциональная группа или фрагмент, способные вступить в реакцию клик-химии. В некоторых вариантах осуществления указанной реакции клик-химии реактивная группа содержит алкин, который способен вступать в реакцию 1,3 циклоприсоединения с азидом. Такие подходящие реактивные группы включают, помимо прочего, напряженные алкины, например, те, которые подходят для промотированных напряжением алкин-азидных циклоприсоединений (SPAAC), циклоалкины, например, циклооктины, бензаннелированные алкины и алкины, способные вступать в реакции 1,3 циклоприсоединения с азидом в отсутствие катализаторов на основе меди. Подходящие алкины также включают, помимо прочего, DIBAC, DIBO, BARAC, DIFO, замещенные алкины, например, фторированные алкины, аза-циклоалкины, BCN. Линкер-нагрузки, содержащие такие реактивные группы, полезны для конъюгирования антител, которые были функционализованы с азидогруппами. Такие функционализованные антитела включают антитела, функционализованные с азидо-полиэтиленгликольными группами. В определенных вариантах осуществления такое функционализированное антитело получают посредством реакции антитела, содержащего минимум один глутаминовый остаток, например, тяжелую цепь Q295, и соединения по формуле H<sub>2</sub>N-LL-N<sub>3</sub>, где LL представляет собой трехвалентная полиэтиленгликольная группа, которая включает полиэтиленгликоль и циклодекстриновый фрагмент, в присутствии фермента трансглутаминазы. В некоторых вариантах осу-

ществления реактивная группа представляет собой алкин, например,



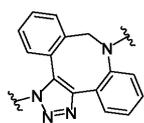
, который может вступать

в реакцию посредством клик-химии с азидом, например,



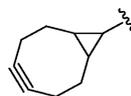
в результате чего образуется продукт

клик-химии, например,



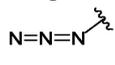
, его региоизомер или их смесь. В некоторых вариантах осуществле-

ния реактивная группа представляет собой алкин, например,



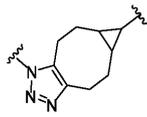
, который может вступать в ре-

акцию посредством клик-химии с азидом, например,



в результате чего образуется продукт

клик-химии, например,

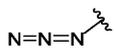


ставляет собой алкин, например,

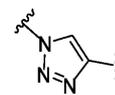


, который может вступать в реакцию посредством клик-химии с

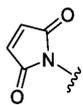
азидом, например,



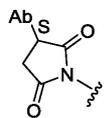
в результате чего образуется продукт клик-химии, например,



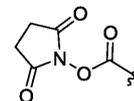
, его региоизомер или их смесь. В некоторых вариантах осуществления реактивная группа представляет собой



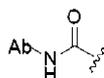
функциональная группа, например, , которая вступает в реакцию с цистеиновым остатком на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, в результате чего образуется связь с ним, например,



, где Ab означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а S означает S атом на цистеиновом остатке, через который функциональная группа связывается с Ab. В некоторых вариантах осу-



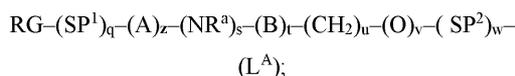
ществления реактивная группа представляет собой функциональная группа, например, , которая вступает в реакцию с лизиновым остатком на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, в



результате чего образуется связь с ним, например, , где Ab означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а N означает N атом на лизиновом остатке, через который функциональная группа связывается с Ab. В некоторых вариантах осуществления этот N атом на лизиновом остатке, через который связывается функциональная группа, обозначается здесь как буква N над связью, например,



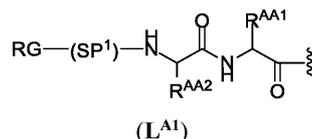
В некоторых вариантах осуществления  $RG-L^2-(L^3)_{0-1}$ - моновалентный фрагмент формулы ( $L^A$ );



где RG представляет собой реактивная группа; A представляет собой аминокислота или пептид;  $R^a$  представляет собой H или алкил;

V представляет собой арил, гетероарил или гетероциклоалкил, где арил, гетероарил или гетероциклоалкил опционально замещается алкилом, -OH или -N- $R^aR^b$ ;  $SP^1$  и  $SP^2$  независимо являются спейсерными группами; и q, z, s, t, u, v и w, независимо в каждом случае, 0 или 1.

В некоторых вариантах осуществления  $RG-L^2-(L^3)_{0-1}$ - представляет собой  $RG-(SP^1)_q-(A)_z$ . В некоторых вариантах осуществления  $RG-L^2-(L^3)_{0-1}$ - представляет собой  $RG-(SP^1)_q-(A)_2$ . В некоторых вариантах осуществления  $RG-L^2-(L^3)_{0-1}$ - фрагмент формулы ( $L^{A1}$ )



где  $R^{AA1}$  и  $R^{AA2}$  представляет собой в каждом случае, независимо, аминокислотные боковые цепи. В некоторых вариантах осуществления формулы  $L^{A1}$   $SP^1$  представляет собой двухвалентная полиэтиленгликольная группа и RG представляет собой группа, содержащая алкин, который способен вступать в реакцию 1,3-циклоприсоединения с азидом.

В некоторых вариантах осуществления  $RG-L^2-(L^3)_{0-1}$ - имеет следующую структуру:  $RG-(SP^1)_q-Z^1-Z^2-Z^3_{0-1}$ , где

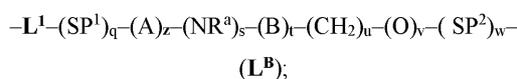
$RG$ ,  $SP^1$  и q представляет собой соответствуют приведенным здесь определениям;

$Z^1$  представляет собой полиэтиленгликольная или капроильная группа;

$Z^2$  представляет собой дипептид; и

$Z^3$  представляет собой PAB группа.

В некоторых других вариантах осуществления  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}$ - представляет собой трехвалентный фрагмент с формулой ( $L^B$ );



где  $L^1$  соответствует приведенному здесь определению;

A представляет собой трипептид или тетрапептид, где минимум одна из аминокислот в трипептиде или тетрапептиде связывается напрямую или опосредованно с циклодекстриновым фрагментом;

$R^a$  представляет собой H или алкил;

V представляет собой арил, гетероарил или гетероциклоалкил, при этом арил, гетероарил или гете-

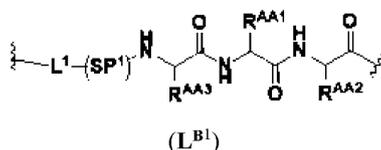
роциклоалкил опционально замещается алкилом, -ОН или -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>;

SP<sup>1</sup> и SP<sup>2</sup> представляет собой независимо спейсерные группы; и в формуле L<sup>B</sup>, q, z, s, t, u, v и w, независимо в каждом случае представляет собой 0 или 1.

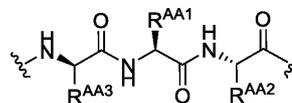
В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин (CD) связывается напрямую с аминокислотным остатком, таким как остаток аминокислоты лизина. Это означает, что CD находится на расстоянии одной связи от ковалентного линкера аминокислоты лизина. В некоторых из этих вариантов осуществления ковалентный линкер также напрямую связывается с нагрузкой. Это означает, что ковалентный линкер находится на расстоянии одной связи от нагрузки, такой как, помимо прочего, описанная здесь стероидная нагрузка. В некоторых из этих вариантов осуществления ковалентный линкер также напрямую связывается с CD. Это означает, что ковалентный линкер на расстоянии одной связи от CD, например, описанных здесь CD. В некоторых из этих вариантов осуществления ковалентный линкер представляет собой аминокислота лизин или ее производное.

В некоторых вариантах осуществления CD опосредованно связывается с ковалентным линкером в соединительной группе (например, L, -L<sup>2</sup>-(L<sup>3</sup>)<sub>0-1</sub>- и -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-(L<sup>3</sup>)<sub>0-1</sub>). Это означает, что CD находится на расстоянии более чем одной связи от ковалентного линкера. Это также означает, что CD связывается через другой фрагмент с ковалентным линкером. Например, CD может связываться с малеимидной группой, которая связывается с полиэтиленгликольной группой, которая связывается с ковалентным линкером. В некоторых из этих вариантов осуществления ковалентный линкер также опосредованно связывается с нагрузкой. Это означает, что ковалентный линкер находится на расстоянии более чем одной связи от нагрузки, такой как, помимо прочего, описанная здесь стероидная нагрузка. Это также означает, что ковалентный линкер связывается через другой фрагмент с нагрузкой. Например, ковалентный линкер может быть связан с дипептидом, таким как, помимо прочего, Val-Ala или Val-Cit, который может быть связан с пара-амино бензоилом, который может быть связан с нагрузкой. В некоторых из этих вариантов осуществления ковалентный линкер также опосредованно связывается с циклодекстрином. Это означает, что ковалентный линкер находится на расстоянии более чем одной связи от циклодекстрина, например, описанных здесь циклодекстринов. Это также означает, что ковалентный линкер связывается через другой фрагмент с циклодекстрином. Например, ковалентный линкер может быть связан с полиэтиленгликольной группой, которая может быть связана с реактивной группой с циклодекстрином. В некоторых из этих вариантов осуществления ковалентный линкер представляет собой аминокислота лизин или ее производное.

В некоторых вариантах осуществления -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-(L<sup>3</sup>)<sub>0-1</sub>- представляет собой -L<sup>1</sup>-(SP<sup>1</sup>)<sub>q</sub>-(A)<sub>z</sub>-. В некоторых вариантах осуществления -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-(L<sup>3</sup>)<sub>0-1</sub>- представляет собой -L<sup>1</sup>-(SP<sup>1</sup>)<sub>q</sub>-(A)<sub>2</sub>-. В некоторых вариантах осуществления -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-(L<sup>3</sup>)<sub>0-1</sub>-представляет собой фрагмент формулы (L<sup>B1</sup>)

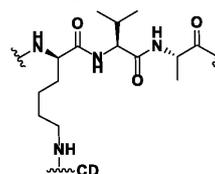


где R<sup>AA1</sup> и R<sup>AA2</sup> представляет собой в каждом случае, независимо, аминокислотные боковые цепи. R<sup>AA3</sup> представляет собой аминокислотная боковая цепь, которая связана напрямую или опосредованно с циклодекстрином. В некоторых вариантах осуществления формулы L<sup>B1</sup>, SP<sup>1</sup> представляет собой двухвалентная полиэтиленгликольная группа и L<sup>1</sup> представляет собой продукт реакции 1,3-циклоприсоединения между алкином и азидом.



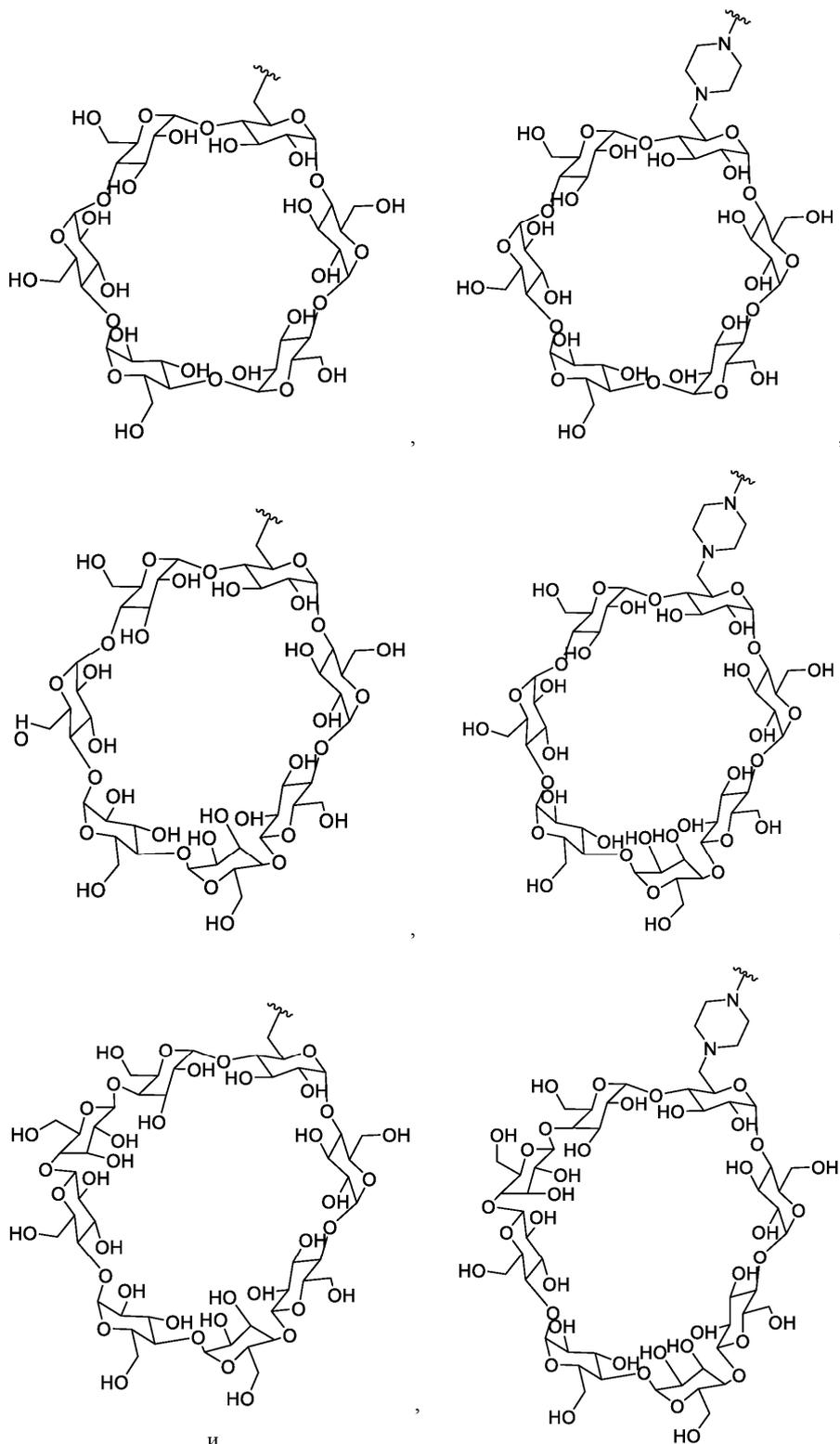
В некоторых вариантах осуществления A представляет собой

В некоторых вариантах осуществления R<sup>AA1</sup> представляет собой аминокислотная боковая цепь, R<sup>AA2</sup> представляет собой аминокислотная боковая цепь и R<sup>AA3</sup> представляет собой аминокислотная боковая цепь, которая связывается напрямую или опосредованно с циклодекстриновым фрагментом.

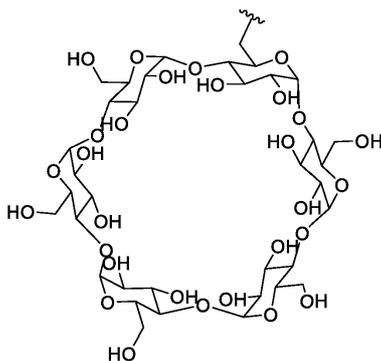


В некоторых вариантах осуществления A представляет собой  где  CD представляет собой прямую или опосредованную связь с циклодекстриновым фрагментом.

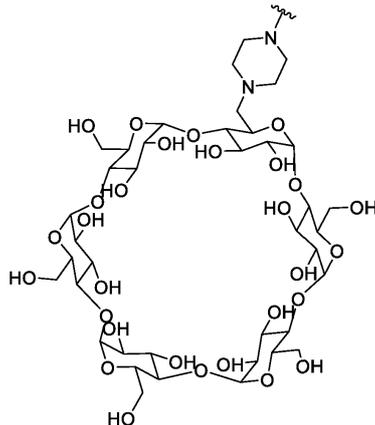
В некоторых вариантах осуществления, включая любые из указанных выше, CD, независимо в каждом случае, выбирается из



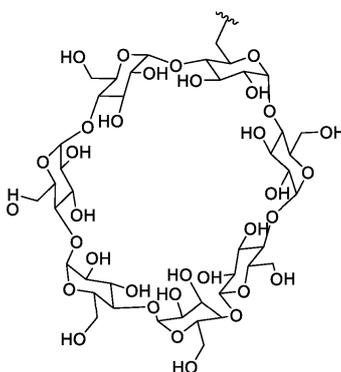
В некоторых вариантах осуществления CD представляет собой



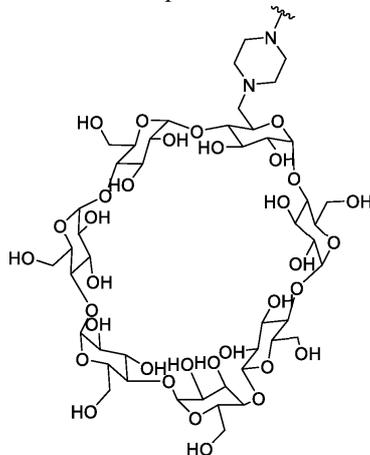
В некоторых вариантах осуществления CD представляет собой



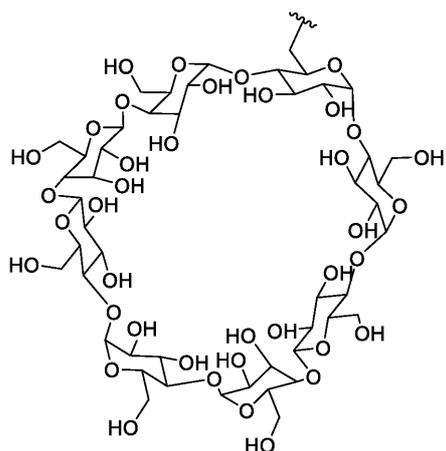
В некоторых вариантах осуществления CD представляет собой



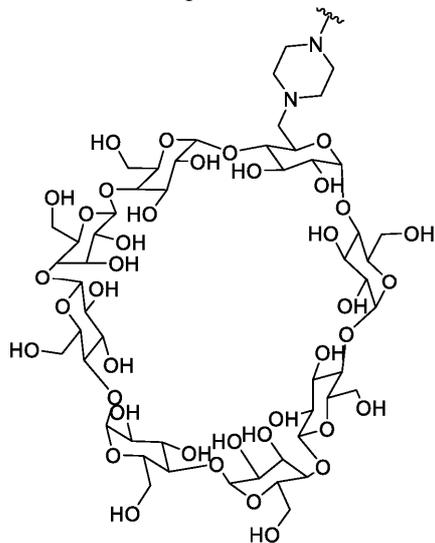
В некоторых вариантах осуществления CD представляет собой



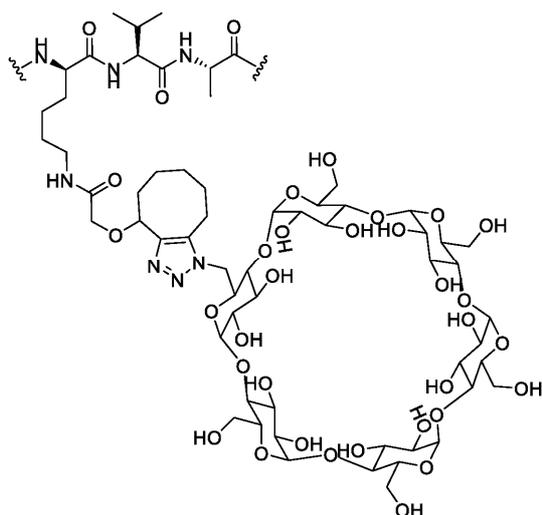
В некоторых вариантах осуществления CD представляет собой



В некоторых вариантах осуществления CD представляет собой



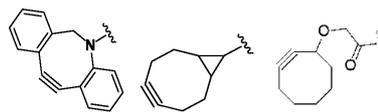
В некоторых вариантах осуществления А представляет собой



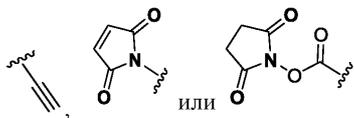
В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе RG выбирается из реактивной группы клик-химии.

В некоторых других примерах в настоящем документе RG выбирают из группы, которая вступает в реакцию с цистеиновым или лизиновым остатком на антителе или на его антигенсвязывающем фрагменте.

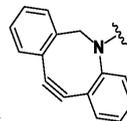
В некоторых вариантах осуществления RG представляет собой



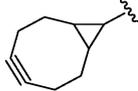
(где  $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})-$  охватывается  $-\text{L}^2-$ ),



В некоторых вариантах осуществления RG представляет собой



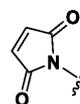
В других примерах RG представляет собой



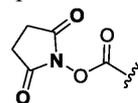
В некоторых других примерах RG представляет собой



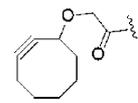
В некоторых вариантах осуществления RG представляет собой



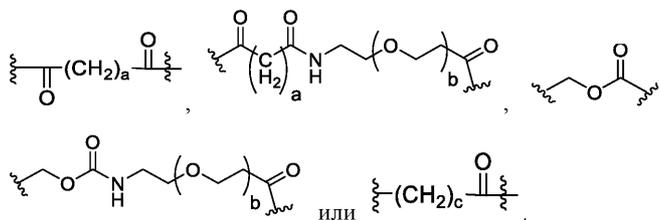
В других примерах RG представляет собой



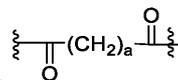
В других примерах RG представляет собой



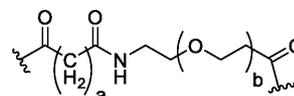
В некоторых вариантах осуществления  $\text{SP}^1$  охватывается  $-\text{L}^2-$ . В некоторых вариантах осуществления  $\text{SP}^1$  можно выбрать из:



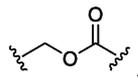
В некоторых вариантах осуществления  $\text{SP}^1$  представляет собой



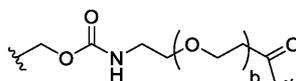
В некоторых других примерах  $\text{SP}^1$  представляет собой



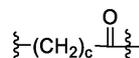
В других примерах  $\text{SP}^1$  представляет собой



В других примерах  $\text{SP}^1$  представляет собой



В некоторых других примерах  $\text{SP}^1$  представляет собой



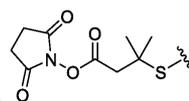
В любых из приведенных выше примеров индексы a, b и c независимо, в каждом случае, являются целым числом, которое выбирается от 1 до 20, включительно.

В некоторых вариантах осуществления  $\text{SP}^1$  охватывается  $-\text{L}^2-$ . В любом из соединений  $\text{SP}^1$

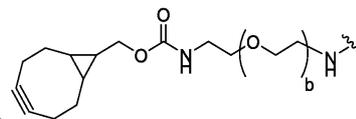




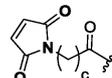
В некоторых вариантах осуществления RG-SP<sup>1</sup> представляет собой



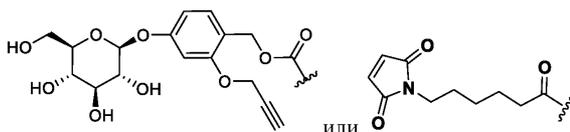
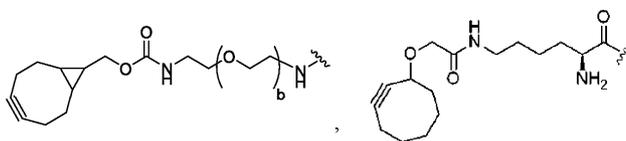
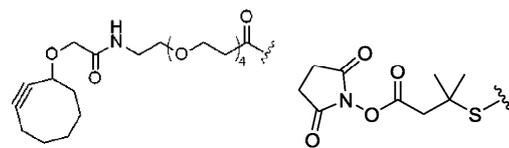
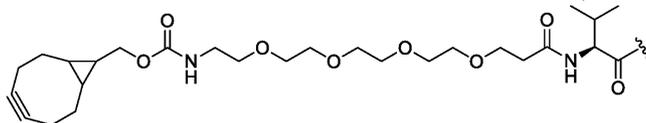
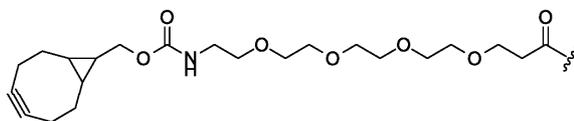
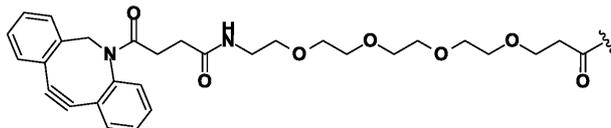
В некоторых вариантах осуществления RG-SP<sup>1</sup> представляет собой



в некоторых вариантах осуществления RG-SP<sup>1</sup> представляет собой



В любом из соединений RG-SP<sup>1</sup>:-



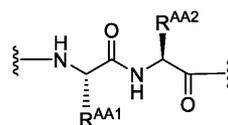
В некоторых вариантах осуществления А представляет собой пептид, который выбирается из валин-цитруллина, цитруллин-валина, лизин-фенилаланина, фенилаланин-лизина, валин-аспарагина, аспарагин-валина, треонин-аспарагина, аспарагин-треонина, серин-аспарагина, аспарагин-серина, фенилаланин-аспарагина, аспарагин-фенилаланина, лейцин-аспарагина, аспарагин-лейцина, изолейцин-аспарагина, аспарагин-изолейцина, глицин-аспарагина, аспарагин-глицина, глутаминовая кислота-аспарагина, аспарагин-глутаминовой кислоты, цитруллин-аспарагина, аспарагин-цитруллина, аланин-аспарагина или аспарагин-аланина.

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой валин-цитруллин или цитруллин-валин.

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой валин-аланин или аланин-валин.

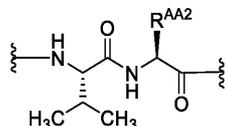
В некоторых вариантах осуществления А представляет собой глутамат-валин-цитруллин или цитруллин-валин-глутамат.

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой валин. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой аланин. В некоторых вариантах осуществления А представляет собой цитруллин.

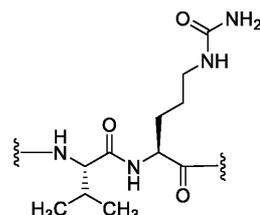


В некоторых вариантах осуществления А представляет собой

В некоторых из этих вариантов осуществления  $R^{AA1}$  представляет собой аминокислотная боковая цепь и где  $R^{AA2}$  представляет собой аминокислотная боковая цепь.



В некоторых вариантах осуществления А представляет собой



В некоторых вариантах осуществления А представляет собой

В некоторых вариантах осуществления  $R^a$  представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления  $R^a$  представляет собой алкил.

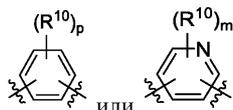
В некоторых вариантах осуществления  $R^a$  представляет собой метил, этил, n-пропил, i-пропил, n-бутил, t-бутил, i-бутил или пентил.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой арил.

В некоторых вариантах осуществления В представляет собой фенил.

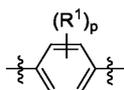
В некоторых вариантах осуществления В представляет собой фенил или пиридинил.

В некоторых вариантах осуществления здесь В представляет собой это:



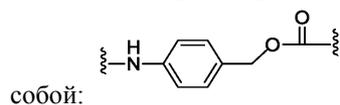
В этих примерах  $R^{10}$  представляет собой алкил, алкенил, алкинил, алкокси, арил, алкиларил, арилалкил, гало, галоалкил, галоалкокси, гетероарил, гетероциклоалкил, гидроксил, циано, нитро,

$-\xi-OR^A$ ,  $-\xi-SO_2R^A$ ,  $-\xi-C(=O)R^A$ ,  $NR^aR^b$  или азидо. В этих примерах индексы р и m независимо, в каждом случае, выбираются из целого числа, которое выбирается от 0 до 4, включительно. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе В представляет собой это:

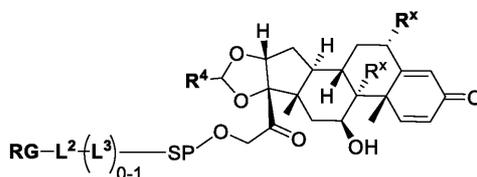


В этих примерах р представляет собой 0, 1, 2, 3 или 4. В некоторых из этих вариантов осуществления  $R^1$ , независимо в каждом случае, алкил, алкокси, галоалкил или гало. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой алкокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой галоалкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой гало.

В некоторых вариантах осуществления формулы  $(L^A)$ ,  $-(NR^a)_s-(B)_t-(CH_2)_u-(O)_v-(SP^2)_w$  представляет



В настоящем документе также представлены линкер-нагрузки будесонида, пролекарства будесонида, аналога или производного будесонида (включая фторированные аналоги и производные) или пролекарства аналога или производного будесонида (включая фторированные аналоги и производные). В некоторых вариантах осуществления здесь представлена линкер-нагрузка со следующей структурой:



где RG, R<sup>4</sup>, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup> и SP соответствуют приведенным здесь определениям.

Е. Фармацевтические композиции и способы лечения.

В настоящем описании изобретения представлены способы лечения заболеваний, состояний или нарушений, например, воспалительных заболеваний и аутоиммунных нарушений, или контроля их симптомов, включающие введение терапевтически эффективного количества одного или более представленных здесь соединений. Включаются любые заболевания, нарушения или состояния, ассоциируемые с глюкокортикоидным рецептором, глюкокортикоидным связыванием и/или сигнализацией глюкокортикоидного рецептора. Такие способы включают введение стероидной нагрузки или ее белкового конъюгата, представленного здесь, пациенту. Таким образом, в настоящее описание изобретения включаются способы лечения заболевания, нарушения или состояния, связанного с глюкокортикоидным рецептором, включающие введение соединения формулы (I), формулы I-P, формулы I-P-1, формулы (III-P), формулы III-P-1, формулы (3000) или (III) пациенту, у которого имеется упомянутое заболевание, нарушение или состояние.

Настоящее описание изобретения включает способы профилактики определенных заболеваний или состояний, включающие введение терапевтически эффективного количества одного или более представленных здесь соединений (т.е. профилактическое применение). Примеры включают, помимо прочего, профилактику синдрома высвобождения цитокинов для CD3 биспецифических соединений и адоптивную клеточную терапию, такую как Т-клетки с CAR, систематическое введение IL-2, профилактики реакции "трансплантат против хозяина" и послеоперационной тошноты и рвоты. Примеры также включают, помимо прочего, терапевтические антитела, такие как алемтузумаб, муромонаб, ритуксимаб, тоситузумаб и агонистические Ab, где иммунная стимуляция может быть частью необходимого механизма действия.

В некоторых вариантах осуществления таким заболеванием, нарушением или состоянием является аллергическое состояние, включая, помимо прочего, астму, атопический дерматит, контактный дерматит, аллергический дерматит, гиперчувствительность к лекарственному препарату, анафилактический ринит, круглогодичный или сезонный аллергический ринит и сывороточную болезнь; дерматологические заболевания и состояния, включая, помимо прочего, кожный зуд, себорейный дерматит, нейродерматит, экзему, герпетический буллезный дерматит, эксфолиативную эритродермию, фунгоидный микоз, пемфигус и серьезную многоформную эритему (синдром Стивенса-Джонсона); эндокринные нарушения, включая, помимо прочего, первичную или вторичную адренокортикальную недостаточность, врожденную гиперплазию надпочечников, гиперкальцемию, ассоциируемую с раком, и гранулематозный зоб Де Кервена; желудочно-кишечные заболевания; гематологические нарушения, включая, помимо прочего, приобретенную (аутоиммунную) гемолитическую анемию, врожденную (эритроидную) гипопластическую анемию (анемию Даймонда-Блекфана), идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру у взрослых, истинную эритроцитарную аплазию и вторичную тромбоцитопению; трихинеллез; туберкулезный менингит с субарахноидальным блоком или развивающимся блоком; неопластические заболевания, включая, помимо прочего, лейкемии и лимфомы; нарушения нервной системы, включая, помимо прочего, выраженные обострения рассеянного склероза, отек головного мозга, связанный с первичной или метастатической опухолью головного мозга, краниотомию или травму головы; офтальмологические заболевания, включая, помимо прочего, симпатическую офтальмию, височный артериит, увеит, ксерофтальмию, и воспалительные состояния глаз, не поддающиеся лечению местными кортикостероидами; заболевания почек, включая, помимо прочего, для индуцирования диуреза или ремиссии протеинурии при идиопатическом нефротическом синдроме или обусловленном эритематозной волчанкой; респираторные заболевания, включая, помимо прочего, бериллиоз, прогрессирующий или диссеминированный туберкулез легких при одновременном применении с соответствующей противотуберкулезной химиотерапией, идиопатическую эозинофильную пневмонию, симптоматический саркоидоз; и ревматические нарушения, включая, помимо прочего, применение в качестве дополнительной терапии для краткосрочного введения (для преодоления острого эпизода или обострения у пациента) при остром подагрическом артрите, остром ревматическом кардите, анкилозирующем спондилоартрите, псориатическом артрите, ревматоидном артрите, включая ювенильный ревматоидный артрит, и для применения при дерматомиозите, полимиозите, стоматите и системной красной волчанке.

В некоторых вариантах осуществления здесь представлен способ лечения заболевания, нарушения или состояния, которые выбираются из следующих: аутоиммунное заболевание, аллергия, артрит, астма, расстройство дыхания, заболевание крови, рак, коллагеновая болезнь, нарушения со стороны соединительной ткани, дерматологическое заболевание, заболевание глаз, эндокринное нарушение, иммунологическое заболевание, воспалительное заболевание, кишечные нарушения, заболевание желудочно-кишечного тракта, неврологическое нарушение, состояния при трансплантации, ревматоидное нарушение, кожное заболевание, состояние отечности, состояние заживления раны и их комбинации, включающий введение стероидной нагрузки или представленного здесь конъюгата.

В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное нарушение выбирается из рассеянного склероза, аутоиммунного гепатита, опоясывающего лишая, системной красной волчанки (т.е. волчанки), миастении гравис, миодистрофии Дюшенна и саркоидоза. В некоторых вариантах осуществления расстрой-

ство дыхания выбирается из астмы, хронического респираторного заболевания, хронической обструктивной болезни легких, воспаления бронхов и острого бронхита. В некоторых вариантах осуществления рак выбирается из лейкемии, лимфобластической лейкемии, острой лимфобластической лейкемии, хронической лимфобластической лейкемии, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы (NHL) и множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления коллагеновой болезнью является системная красная волчанка. В некоторых вариантах осуществления заболеванием глаз является кератит. В некоторых вариантах осуществления эндокринное нарушение выбирается из Аддисоновой болезни, недостаточности надпочечников, дисфункции коры надпочечников, адренокортикальной гиперплазии и врожденной гиперплазии надпочечников. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание выбирается из воспаления после операции по удалению катаракты, воспаления сустава, иммунного воспаления, воспаления связок, бурсита, эпикондилита, болезни Крона, воспалительного заболевания кишечника, липоидного пневмонита, тиреоидита, крапивницы, перикардита, нефротического синдрома и увеита. В некоторых вариантах осуществления кишечное нарушение выбирается из коллагенозного колита, язвенного колита, болезни Крона и воспалительного заболевания кишечника. В некоторых вариантах осуществления ревматоидное нарушение выбирается из ревматоидного артрита, ревматической полимиалгии, псориатического артрита, анкилозирующего спондилита и системной красной волчанки. В некоторых вариантах осуществления кожное заболевание выбирается из псориаза, экземы и дерматита в результате контакта с ядовитым плющом. В некоторых вариантах осуществления неврологическим нарушением является хроническая воспалительная демиелинизирующая полирадикулонейропатия.

В некоторых вариантах осуществления описанные здесь соединения вводятся пациенту для лечения острого воспалительного события, включая, помимо прочего, шок, отек головного мозга и реакцию "трансплантат против хозяина". В некоторых вариантах осуществления описанные здесь соединения вводятся для лечения лимфолитических эффектов, включая, помимо прочего, эффекты, связанные с гематологическими злокачественными опухолями, например, лейкемиями, лимфомами и миеломами.

В некоторых вариантах осуществления здесь представлен способ уменьшения воспаления у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества стероида или его описанного здесь конъюгата. В некоторых вариантах осуществления здесь представлен способ модуляции иммунной системы у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества стероида или его описанного здесь конъюгата. В некоторых вариантах осуществления здесь представлен способ модуляции уровней кортизола у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества стероида или его описанного здесь конъюгата. В некоторых вариантах осуществления здесь представлен способ уменьшения миграции лимфоцитов у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества стероида или его описанного здесь конъюгата. В некоторых вариантах осуществления здесь представлен способ лечения гиперкальцемии, развившейся вследствие рака, синдрома Меньера, мигрени, кластерной головной боли, тяжелой афтозной язвы, ларингита, тяжелого туберкулеза, реакции Герксхаймера на сифилис, декомпенсированной сердечной недостаточности, аллергического ринита или полипов носовой полости, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества стероида или его описанного здесь конъюгата. В некоторых вариантах осуществления представленные здесь соединения можно использовать для лечения воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона или язвенного колита. В некоторых вариантах осуществления упомянутым заболеванием, нарушением или состоянием является хроническое воспалительное состояние, включая, помимо прочего, астму, кожные инфекции и глазные инфекции. В некоторых вариантах осуществления представленные здесь соединения используются для иммуносупрессии у пациентов, проходящих трансплантацию органов.

В некоторых вариантах осуществления стероидные нагрузки и их конъюгаты, описанные в настоящем документе, вводятся пациенту для лечения заболевания нервной системы, связанного с сигнализацией ГР, включая, помимо прочего, психиатрические нарушения, такие как шизофрения, наркотическая зависимость, посттравматическое нервно-психическое расстройство и расстройства настроения, злоупотребление алкоголем или психоактивными веществами, стресс и беспокойство.

В некоторых вариантах осуществления стероидные нагрузки и их конъюгаты, описанные в настоящем документе, вводятся пациенту для лечения нарушения зрительной системы, включая, помимо прочего, глазное воспаление (например, конъюнктивит, кератит, увеит), макулярный отек и макулярную дегенерацию. В некоторых вариантах осуществления стероидные нагрузки и их конъюгаты, описанные в настоящем документе, вводятся пациенту для лечения сердечно-сосудистого заболевания. В некоторых вариантах осуществления стероидные нагрузки и их конъюгаты, описанные в настоящем документе, вводятся пациенту для лечения нарушения в плане содержания глюкозы и/или нарушения метаболизма печени. В некоторых вариантах осуществления стероидные нагрузки и их конъюгаты, описанные в настоящем документе, вводятся пациенту для лечения заболевания скелетно-мышечной системы. В некоторых вариантах осуществления стероидные нагрузки и их конъюгаты, описанные в настоящем документе, вводятся пациенту для лечения кожного воспаления, такого как экзема и псориаз.

Описанные здесь белковые конъюгаты являются средством для направленной доставки стероидной нагрузки к конкретным клеткам или системам органов, что позволяет уменьшать или предотвращать побочные действия, связанные с введением свободной неконъюгированной стероидной нагрузки. Примеры таких потенциальных побочных действий, которые требуется уменьшить или предотвратить, включают действия, указанные в инструкции по применению разрешенного препарата для Decadron® (дексаметазона), содержание которой включается в настоящий документ полностью посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления побочное действие, которое требуется уменьшить или предотвратить, выбирается из повышения артериального давления; задержки натрия; задержки воды/жидкости (отек, ангиоэдема, отек легких); повышенного выведения калия; обратимой супрессии гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы; потенциальной кортикостероидной недостаточности после завершения лечения; восприимчивости к инфекциям; обострения системных грибковых инфекций; повышения тяжести ветряной оспы у пациентов детского возраста и взрослых; повышения тяжести кори у пациентов детского возраста и взрослых; задней субкапсулярной катаракты; глаукомы с возможным повреждением зрительных нервов; усиления проявления вторичных глазных инфекций, обусловленных воздействием бактерий, грибов или вирусов; увеличения новых эпизодов неврита зрительного нерва; саркомы Капоши; индуцированной лекарственными препаратами вторичной адренкортикальной недостаточности; повышенного риска перфорации при наличии активной или скрытой пептической язвы, дивертикулита, новой энтероэнтеростомии и неспецифического язвенного колита; перитонеального раздражения после желудочно-кишечной перфорации; уменьшенного остеогенеза; повышенной резорбции кости; ингибирования функции остеобластов; ингибирования роста кости у пациентов детского возраста; развития остеопороза в любом возрасте; острой миопатии (возможно, затрагивающей мышцы зрительной или дыхательной системы и, возможно, приводящей к квадрипарезу); повышения креатинин-киназы; психических нарушений, варьирующихся от эйфории, бессоницы, перемен настроения, изменений личности и тяжелой депрессии до выраженных манифестаций психоза; ухудшения существующей эмоциональной нестабильности или психотических тенденций; повышенного внутриглазного давления; брадикардии; остановки сердечной деятельности; сердечных аритмий; увеличения сердца; сосудистого коллапса; хронической сердечной недостаточности; жировой эмболии; гипертензии; гипертрофической кардиомиопатии у недоношенных новорожденных; перфорации миокарда после недавно перенесенного инфаркта миокарда; синкопы; тахикардии; тромбоза эмболии; тромбоза флебита; васкулита; акне; аллергического дерматита; сухих шелушащихся высыпаний; экхимоз и петехий; эритемы; нарушенного заживления ран; повышенного потоотделения; сыпи; стрий; подавления реакций на кожные тесты; сниженного тургора кожных тканей; поредения волос на голове; крапивницы; снижения толерантности к углеводам и глюкозе; развития кушингоидного состояния; гипергликемии; гликозурии; гирсутизма; гипертрихоза; повышенной потребности в инсулине или пероральных антидиабетических средств при диабете (резистентность к инсулину); проявлений латентного сахарного диабета; нарушений менструального цикла; вторичной адренкортикальной и гипофизарной невосприимчивости (особенно при стрессе; как при травме; операции или заболевании); задержки роста у пациентов детского возраста; хронической сердечной недостаточности у восприимчивых пациентов; задержки жидкости; гипокалиемического алкалоза; снижения уровня калия; задержки натрия; вздутия живота; повышения в уровнях печеночного фермента в сыворотке (обычно обратимого при прекращении приема); гепатомегалии; повышенного аппетита; тошноты; панкреатита; пептической язвы с возможной перфорацией и кровоизлиянием; перфорации тонкой и толстой кишки (особенно у пациентов с воспалительным заболеванием кишечника); язвенного эзофагита; отрицательного азотистого баланса ввиду катаболизма белка; асептического некроза головок бедренной и плечевой костей; потери мышечной массы; мышечной слабости; остеопороза; патологического перелома длинных костей; стероидной миопатии; разрыва сухожилия; компрессионных переломов позвоночника; конвульсий; депрессии; эмоциональной нестабильности; эйфории; головной боли; повышенного внутричерепного давления с отеком диска зрительного нерва (доброкачественной внутричерепной гипертензией) обычно после прекращения лечения; бессонницы; перемен настроения; неврита; нейропатии; парестезии; изменений личности; психиатрических нарушений; вертиго; экзофтальма; глаукомы; повышенного внутриглазного давления; задних субкапсулярных катаракт; аномальных жировых отложений; пониженной резистентности к инфекции; икоты; повышенной или пониженной подвижности и числа сперматозоидов; общего недомогания; лунообразного лица и прибавке в весе; а также побочных действий, связанных с межлекарственными взаимодействиями. В некоторых вариантах осуществления побочными действиями, которые требуется уменьшить или предотвратить, являются действия, связанные с межлекарственными взаимодействиями. В некоторых вариантах осуществления побочное действие, которое требуется уменьшить или предотвратить, ассоциируется с межлекарственными взаимодействиями от использования кортикостероида с аминоглутетимидом, включая уменьшение угнетения функции надпочечников кортикостероидами; инъекцией амфотерицина В и калий-несберегающими средствами, включая развитие гипокалиемии, увеличение сердца и хроническую сердечную недостаточность; антибиотиков, включая значительное снижение в кортикостероидном клиренсе; антихолинэстеразных средств, включая развитие сильной слабости у пациентов с миастенией гравис; антикоагулянтов для перорального применения, включая ингибирование ответа на варфарин; противодиабетических средств, включая повышенные кон-

центрации глюкозы в крови; противотуберкулезных препаратов, включая пониженные концентрации в сыворотке изониазида; холестирамина, включая повышенный клиренс кортикостероидов; циклоспорина, включая повышенную активность и циклоспорина, и кортикостероидов и частоту конвульсий; влиянием теста подавления дексаметазона, включая ложно-отрицательные результаты у пациентов, получающих лечение индометацином; дигиталисными гликозидами, включая повышенный риск аритмий из-за гипокalemии; эфедрина, включая увеличение метаболического клиренса кортикостероидов, которое приводит к пониженным уровням в крови и снижению физиологической активности; эстрогенов, включая пероральные контрацептивы, включая пониженный печеночный метаболизм определенных кортикостероидов и соответствующее повышение их воздействия; индукторов, ингибиторов и субстратов печеночного фермента (лекарственных препаратов, которые индуцируют ферментную активность цитохрома P450 3A4 (CYP 3A4), например, барбитуратов, фенитоина, карбамазепина, рифампина), включая усиление метаболизма кортикостероидов; лекарственных препаратов, которые ингибируют CYP 3A4 (например, кетоконазола, макролидных антибиотиков, таких как эритромицин), включая возможность повышения концентраций кортикостероидов в плазме; лекарственных препаратов, которые метаболизируются CYP 3A4 (например, индинавира, эритромицина), включая повышение в их клиренсе, которое приводит к пониженной концентрации в плазме; кетоконазола, включая сниженный метаболизм определенных кортикостероидов до 60%, который приводит к повышенному риску побочных действий кортикостероидов, и ингибирование синтеза адреналовых кортикостероидов, что может вызвать недостаточность надпочечников во время отмены кортикостероидов; нестероидных противовоспалительных средств (NSAIDs), включая повышенный риск желудочно-кишечных побочных действий и повышенный клиренс салицилатов; фенитоина, включая повышение или снижение уровня фенитоина, изменение контроля судорог; кожных тестов, включая подавление реакций на кожные тесты; талидомида, включая токсический эпидермальный некролиз; и вакцин, включая пониженный ответ на токсиды и живые или неактивированные вакцины из-за ингибирования ответа антител или потенциации репликации некоторых организмов, содержащихся в живых аттенюированных вакцинах).

Таким образом, здесь представлены способы лечения заболевания, нарушения или состояния, связанных с глюкокортикоидным рецептором, включающие введение конъюгата формулы (III) пациенту с упомянутым заболеванием, нарушением или состоянием, при которых побочные действия, связанные с введением свободной стероидной нагрузки упомянутого конъюгата, уменьшаются. Более того, здесь представлены способы доставки соединения формулы (III-P), формулы III-P-1, формулы (3000) или формулы (III) в клетку, включающие воздействие на упомянутую клетку белковым конъюгатом соединения формулы (III-P), формулы III-P-1, формулы (3000) или формулы (III), когда белковый конъюгат содержит антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который связывается с поверхностным антигеном упомянутой клетки.

Описанные здесь соединения могут быть введены по-отдельности или вместе с одним или несколькими дополнительными лекарственными препаратами. Такие один или несколько лекарственных препаратов могут вводиться непосредственно до, одновременно или вскоре после введения описанных здесь соединений. Настоящее описание изобретения включает фармацевтические композиции, содержащие любое из описанных здесь соединений в сочетании с одним или несколькими лекарственными препаратами, и способы лечения, включающие введение таких комбинаций нуждающимся в них субъектам.

Подходящие дополнительные лекарственные препараты включают, помимо прочего: второй глюкокортикоид, аутоиммунный лекарственный препарат, гормон, биологический препарат или моноклональное антитело. Подходящие лекарственные препараты также включают, помимо прочего, любые фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные указанного здесь соединения.

Описанные здесь соединения также могут вводиться и/или комбинироваться с противовирусными препаратами, антибиотиками, обезболивающими средствами, кортикостероидами, стероидами, кислородом, антиоксидантами, ингибиторами ЦОГ, кардиопротективными средствами, металлохелаторами, ИФН-гамма и и/или нестероидными противовоспалительными препаратами.

В некоторых вариантах осуществления описанных здесь способов несколько доз описанного здесь соединения (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию описанного здесь соединения и любого из упомянутых здесь дополнительных лекарственных средств) могут быть введены субъекту в течение определенного периода времени. В соответствии с данным аспектом изобретения такие способы включают последовательное введение субъекту нескольких доз описанного здесь соединения. В контексте настоящего документа "последовательное введение" означает, что каждая доза соединения вводится субъекту в разные моменты времени, например, в различные дни, разделенные заранее установленным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту одной первоначальной дозы описанного здесь соединения, а затем одной или нескольких вторичных доз соединения и далее необязательно одной или нескольких третичных доз соединения.

Термины "первоначальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" означают временную последовательность введения описанных здесь соединений. Так, "первоначальная доза" представляет собой эту дозу, которая вводится в начале курса лечения (также называемая "базовая доза"); "вторичные дозы"

представляет собой это дозы, которые вводятся после первоначальной дозы; а "третичные дозы" представляет собой это дозы, которые вводятся после вторичных доз. Первоначальная, вторичные и третичные дозы все могут включать одинаковое количество описанного здесь соединения, но, как правило, отличаются друг от друга в плане частоты введения. В некоторых вариантах осуществления количество соединения, включенного в первичную, вторичные и/или третичные дозы различается (например, увеличивается или уменьшается в соответствии с обстоятельствами) в ходе лечения. В некоторых вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводятся в начале курса лечения как "ударные дозы", а за ними идут последующие дозы, которые вводятся с меньшей частотой (например, "поддерживающие дозы").

В определенных иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения каждая вторичная и/или третичная доза вводится через 1 представляет собой 26 (например, 1, 1<sup>1/2</sup>, 2, 2<sup>1/2</sup>, 3, 3<sup>1/2</sup>, 4, 4<sup>1/2</sup>, 5, 5<sup>1/2</sup>, 6, 6<sup>1/2</sup>, 7, 7<sup>1/2</sup>, 8, 8<sup>1/2</sup>, 9, 9<sup>1/2</sup>, 10, 10<sup>1/2</sup>, 11, 11<sup>1/2</sup>, 12, 12<sup>1/2</sup>, 13, 13<sup>1/2</sup>, 14, 14<sup>1/2</sup>, 15, 15<sup>1/2</sup>, 16, 16<sup>1/2</sup>, 17, 17<sup>1/2</sup>, 18, 18<sup>1/2</sup>, 19, 19<sup>1/2</sup>, 20, 20<sup>1/2</sup>, 21, 21<sup>1/2</sup>, 22, 22<sup>1/2</sup>, 23, 23<sup>1/2</sup>, 24, 24<sup>1/2</sup>, 25, 25<sup>1/2</sup>, 26, 26<sup>1/2</sup> или более) недель после непосредственно предшествующей ей дозе. Фраза "непосредственно предшествующая доза" в контексте настоящего документа означает, в последовательности нескольких введений, дозу соединения, которая вводится пациенту перед введением следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы в соответствии с данным аспектом изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз соединения. Например, в некоторых вариантах осуществления пациенту вводится только одна вторичная доза. В других вариантах осуществления пациенту вводятся две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления пациенту вводится только одна третичная доза. В других вариантах осуществления пациенту вводятся две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз. Режим введения может выполняться неопределенный период времени на протяжении жизни определенного субъекта либо до тех пор, пока такое лечение более не потребуется в терапевтическом плане либо не будет приносить пользу.

В вариантах осуществления, включающих несколько вторичных доз, каждая вторичная доза может вводиться с такой же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может вводиться пациенту через 1-2 недели либо 1-2 месяца после непосредственно предшествующей дозы. Аналогичным образом, в вариантах осуществления, включающих третичные дозы, каждая третичная доза может вводиться с такой же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту через 2-12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводятся пациенту, могут различаться на протяжении курса лечения. Частота введения также может регулироваться на протяжении лечения врачом в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического осмотра.

Настоящее изобретение включает режимы введения, в которых пациенту вводятся от 2 до 6 ударных доз с первой частотой (например, раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в месяц, раз в два месяца и т.д.), после чего пациенту вводятся две или более поддерживающих доз с меньшей частотой. Например, в соответствии с данным аспектом изобретения, если ударные дозы вводятся с частотой раз в месяц, тогда пациенту могут вводиться поддерживающие дозы раз в шесть недель, раз в два месяца, раз в три месяца и т.д.

Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции и/или конъюгаты, описанные в настоящем изобретении, например, соединения формулы (I), формулы I-P, формулы I-P-1, формулы (III-P), формулы III-P-1, формулы (3000) и формулы (III), например, композиции, содержащие описанное здесь соединение, его соль, стереоизомер, полиморф, а также фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или вспомогательное вещество. Примеры подходящих носителей, разбавителей и вспомогательных веществ включают, помимо прочего, буферы для поддержания надлежащего pH композиции (например, цитратные буферы, сукцинатные буферы, ацетатные буферы, фосфатные буферы, лактатные буферы, оксалатные буферы и подобные им), белки-носители (например, человеческий сывороточный альбумин), физиологический раствор, полиолы (например, трегалозу, сахарозу, ксилит, сорбит и подобные им), поверхностно-активные вещества (например, полисорбат 20, полисорбат 80, полиоксолат и подобные им), противомикробные препараты и антиоксиданты.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе изложен способ лечения заболевания, нарушения или состояния, выключающий введение пациенту с указанным нарушением терапевтически эффективного количества соединения формулы (I), формулы I-P, формулы I-P-1, формулы (III-P), формулы III-P-1, формулы (3000) или формулы (III) или его фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе изложен способ лечения заболевания, нарушения или состояния, выключающий введение пациенту с указанным нарушением терапевтически эффективного количества представленного здесь соединения формулы или его фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе изложен способ лечения заболева-



него эталонного тетраметилсилана.

Измерения HPLC-MS (ВЭЖХ-МС) проводились на системе Agilent 1200 HPLC/6100 SQ System с использованием следующих условий:

Способ А для измерения ВЭЖХ-МС включал, в качестве подвижной фазы: А: Воду (0.01% трифторуксусная кислота (TFA)) и В: ацетонитрил (0.01% TFA). Градиентной фазой являлся 5% В, который увеличили до 95% В за временной период в 15 мин и с расходом в 1.0 мл/мин. В качестве колонки использовали SunFire C18, 4.6×50 мм, 3.5 мкм. Температурой колонки была 50°C. Детекторы включали испарительный детектор светорассеяния АЦП (в дальнейшем именуемый "ADC ELSD"), DAD (детектор на диодной матрице, 214 нм и 254 нм) и ионизацию электрораспылением-ионизацию при атмосферном давлении (ES-API).

Способ В для измерений HPLC-MS включал, в качестве подвижной фазы: А: Воду (10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) и В: ацетонитрил. Градиентной фазой являлся 5% В, который увеличили до 95% В за временной период в 15 мин и с расходом в 1.0 мл/мин. В качестве колонки использовали XBridge C18, 4.6×50 мм, 3.5 мкм. Температурой колонки была 50°C. Детекторы включали ADC ELSD, DAD (214 нм и 254 нм) и масс-селективный детектор (MSD ES-API).

ЖХ-МС измерения проводились на системе Agilent 1200 HPLC/6100 SQ System с использованием следующих условий:

Способ А для измерений LC-MS был реализован с использованием прибора WATERS 2767. Колонкой была Shimadzu Shim-Pack, PRC-ODS, 20×250 мм, 15 мкм, две, соединенные последовательно. Подвижной фазой была А: Вода (0.01% TFA) и В: ацетонитрил (0.01% TFA). Градиентной фазой являлся 5% В, который увеличили до 95% В за временной период в 3 мин и с расходом в 1.8-2.3 мл/мин. В качестве колонки использовали SunFire C18, 4.6×50 мм, 3.5 мкм. Температурой колонки была 50°C. Детекторы включали ADC ELSD (испарительный детектор светорассеяния), DAD (детектор на диодной матрице) (214 нм и 254 нм) и ES-API.

Способ В для измерений LC-MS был реализован с использованием прибора Gilson GX-281. В качестве колонки использовали Xbridge Prep C18 10 μm OBD, 19×250 мм. Подвижной фазой была А: Вода (10 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) и В: Ацетонитрил. Градиентной фазой являлся 5% В, который увеличили до 95% В за временной период в 3 мин и с расходом в 1.8-2.3 мл/мин. В качестве колонки использовали XBridge C18, 4.6×50 мм, 3.5 мкм. Температурой колонки была 50°C. Детекторы включали ADC ELSD, DAD (214 нм и 254 нм) и масс-селективный детектор (MSD) (ES-API).

Препаративную жидкостную хроматографию высокого давления (Prep-HPLC) провели с использованием прибора Gilson GX-281. Применили две системы растворителей, одну кислую и одну основную. Система кислого растворителя включала колонку Waters SunFire 10 мкм C18 (100 Å, 250×19 мм). Растворителем А для prep-HPLC была 0.05% TFA в воде, а растворителем В был ацетонитрил. Условием элюирования был линейный градиент, который повышал растворитель В от 5% до 100% за период времени в 20 мин и при расходе в 30 мл/мин. Система основного растворителя включала колонку Waters Xbridge 10 мкм C18 (100 Å, 250×19 мм). Растворителем А для prep-HPLC был 10 мМ бикарбонат аммония (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) в воде, а растворителем В был ацетонитрил. Условием элюирования был линейный градиент, который повышал растворитель В от 5% до 100% за период времени в 20 мин и при расходе в 30 мл/мин.

Флэш-хроматографию провели с использованием прибора Biotage, с кварцевой флэш-колонкой Agela Flash Column silica-CS. Обратенно-фазовую флэш-хроматографию провели с использованием прибора Biotage, с Boston ODS или Agela C18, если явным образом не указано иное.

Следующие сокращения используются в примерах и во всем тексте описания изобретения:

Сокращение	Термин
ADC	Конъюгат антитело-лекарственное средство
Агликозилированное антитело	Антитело, у которого нет гликанов
вод.	Водный
BARAC	Биарилазациклооктин
BCN	(1 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> )-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил
Вос	N-трет-бутоксикарбонил
ВурН™	Thermo Scientific Prod# 28372, с содержанием 100 мМ фосфата натрия и 150 мМ хлорида натрия, без калия, рН откорректировали с 7.2 до 7.6-7.8 MQ, если не указано иное.
CD	Циклодекстрин
COT	Циклооктинол
Да	Дальтон
DAR	Отношение лекарственное средство-антитело.
DCM	Дихлорометан
DIBAC	Дибенз[ <i>b,f</i> ]азоцин, 11,12-дидегидро-5,6-дигидро-; дибензоциклооктин; или дибенз[ <i>b,f</i> ]азоцин-5(6H)-бутановая кислота, 11,12-дидегидро
DIBAC-Suc	Дибенз[ <i>b,f</i> ]азоцин-5(6H)-бутановая кислота, 11,12-дидегидро
DIBACT	3 <i>H</i> -Бензо[ <i>c</i> ]-1,2,3-триазоло[4,5- <i>e</i> ][1]бензазоцин, 8,9-дигидро-
DIBO	Дибензоциклооктин
DIFO	Двуфтористый циклооктин
DIPEA	Диизопропилэтиламин
DMA	N,N-диметилацетамид
DMAP	4-Di-метиламинопиридин
DMF	N,N-диметилформаид
DMSO	Диметилсульфоксид
ESI	Ионизация электрораспылением
г	грамм
HATU	2-(7-Аза-1 <i>H</i> -бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат

HC	Тяжелая цепь иммуноглобулина
HEK	Эмбриональные клетки почки человека
HPLC	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ч	час
LC	Легкая цепь иммуноглобулина
LC	Жидкостная хроматография
MC	Малеимидакапроил
мг	миллиграмм
мин	минута
мл	миллилитр
мМ	миллимоляр
MMAE	Монометил ауристатин E
MS	Масс-спектрометрия
MsCl	Метансульфонил хлорид
MSD	Масс-селективный детектор
MTG	Микробная трансглутаминаза
MB	Молекулярный вес
pcADC	Нецитотоксичный конъюгат антитело-лекарственное средство
NHS	N-гидрокси сукцинимид
нМ	нанолярный
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс
NOESY	Спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера
PAB	Пара-аминобезилокси(карбонил)
PBS	10 mM натрий-фосфатный буфер и 150 mM хлорид натрия
PBSg	10 mM фосфат, 150 mM хлорид натрия, 5% глицерин
PEG	Полиэтиленгликоль
PNP	p-нитрофенол
ppm	Частей на миллион (химический сдвиг)
RP	Обращенная фаза
КТ	Комнатная температура
SDS-PAGE	Электрофорез в полиакриламидном геле с использованием додецилсульфата натрия

SEC	Эксклюзионная хроматография по размеру
Suc	Янтарная кислота
ТСЕР	Трис(2-карбокситил)фосфин гидрохлорид
TEA	Триэтиламин
TFA	Трифторуксусная кислота
TG	Трансглутаминаза
THF	Тetraгидрофуран
ВП	Время пролета
UPLC	Сверхпроизводительная жидкостная хроматография
УФ	Ультрафиолет
VA	Валин-анилин
VC	Валин-цитруллин
мкл	микролитр
мкМ	микромолярный

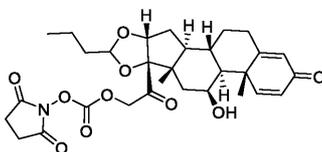
### Способы приготовления

#### Пример 1.

На схеме 1 на фиг. 3 показан синтез будесонид-спейсеров, содержащих реактивные группы, янтарную кислоту (соединение 1c), аналоги карбамата (1d, 1e), аналоги ТНР (1g и 1h), аналоги глюкозы (1i и 1j), аналоги фосфата (1k и 1l) и коммерческий аналог фосфата (1m)

Промежуточное соединение 3a.

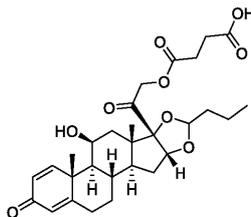
1-[(2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси)карбонил]окси]пирролидин-2,5-дион (3a)



К раствору будесонида 1a (0.10 г, 0.26 ммоль) в DCM (1 мл) добавили бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил) карбонат (71 мг, 0.30 ммоль), триэтиламин (47 мг, 0.52 ммоль) и DMAP (3.0 мг, кат.). Реакционную смесь перемешивали при 15-25°C на протяжении 12 ч до разрушения будесонида, что контролировали посредством LCMS. Затем реакционную смесь разбавили DCM и промыли водой. Органический раствор высушили над сульфатом натрия. После фильтрации раствор сконцентрировали *in vacuo* и остаток (сырой 3a) использовали для следующего этапа сразу же без очистки. (93 мг, выход 71%). ESI m/z: 572.2 (M+H)<sup>+</sup>.

#### Пример 1с.

4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}-4-оксобутановая кислота (1c)



См. WO2015005459; WO2013074988; Research in Pharmaceutical Science, 2011, 6(2), 107-116; и International Journal of Pharmaceutics, 2009, 365(1-2), 69-76.

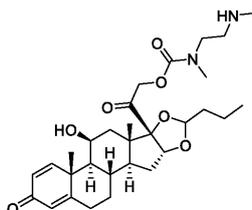
К раствору будесонида (1a, 0.10 г, 0.26 ммоль) в DCM (1 мл) добавили янтарный ангидрид (30 мг, 0.30 ммоль), триэтиламин (47 мг, 0.52 ммоль) и DMAP (3 мг, катализатор, 0.02 ммоль). Смесь перемешивали при КТ на протяжении 12 ч до разрушения будесонида, что контролировали посредством TLC и

LCMS. Затем реакционную смесь разбавили DCM и промыли водой. Органический раствор высушили над сульфатом натрия. После фильтрации раствор сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством *prep*-HPLC, в результате чего получили титульное соединение 1c (22 мг, выход 18%) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 531.3 (M+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ7.48 (d, J=10 Гц, 1H), 6.28-6.26 (m, 1H), 6.04-6.02 (m, 1H), 5.23-5.11 (m, 1H), 5.06-4.99 (m, 1H), 4.83-4.68 (m, 1H), 4.45-4.43 (m, 1H), 2.76-2.63 (m, 5H), 2.41-2.39 (m, 1H), 2.26-2.12 (m, 2H), 1.99-1.66 (m, 6H), 1.57-1.38 (m, 6H), 1.32 (s, 1H), 1.16-0.94 (m, 8H) ppm.

Пример 1d.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-метил-N-[2-(метиламино)этил]карбамат (1d)

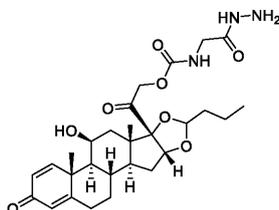


К раствору сырого промежуточного вещества 3a (63 мг, 0.11 ммоль) в DCM (5 мл) добавили N,N'-диметилаэтан-1,2-диамин (28 мг, 0.32 ммоль) и триэтиламин (38 мг, 0.38 ммоль) при КТ. Полученную смесь перемешивали при КТ на протяжении 2 ч до разрушения большей части 3a, что контролировали посредством LCMS. Летучие соединения удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством *prep*-HPLC (способ В), в результате чего получили 1d (4 мг, выход 4.5%) в виде твердого белого вещества. ESI *m/z*: 545.3 (M+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ7.32-7.30 (m, 1H), 6.28-6.25 (m, 1H), 6.02-6.01 (m, 1H), 4.42 (br s, 1H), 3.50-3.23 (m, 3H), 3.10-3.02 (m, 3H), 2.82-2.71 (m, 3H), 2.57-2.55 (m, 1H), 2.35-2.33 (m, 1H), 2.15-2.06 (m, 2H), 1.96-1.79 (m, 12H), 1.60-1.56 (m, 3H), 1.46 (m, 3H), 1.37-1.33 (m, 2H), 1.23-1.04 (m, 4H), 0.92-0.86 (m, 3H) ppm.

Пример 1e.

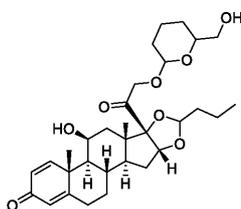
2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-[(гидразинкарбонил)метил]карбамат (1e)



К смеси сырого соединения 3a (0.16 г, 0.28 ммоль) в DMF (3 мл) добавили Вос-2-(2-аминоацетил)гидразин (80 мг, 0.42 ммоль) и триэтиламин (85 мг, 0.84 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 25 °С на протяжении 16 ч до разрушения промежуточного соединения 3a, что контролировали посредством LCMS. Затем смесь охладили водой и экстрагировали этилацетатом. Комбинированный органический раствор высушили над безводным сульфатом натрия. После фильтрации раствор сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (30-50% этилацетат в петролейном эфире) и получили Вос-1e (70 мг) в виде белого твердого вещества (ESI *m/z*: 646 (M+H)<sup>+</sup>), которое растворили в DCM (2 мл). К раствору добавили по каплям TFA (1 мл) при 0 °С. Смесь перемешивали при 25 °С в течение 2 ч до разрушения Вос-1e, что контролировали посредством LCMS. Летучие соединения удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством *prep*-HPLC и получили титульное соединение 1e (7 мг, выход 12%) в виде твердого белого вещества. ESI *m/z*: 546 (M+H)<sup>+</sup>.

Пример 1g.

(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-8-(2-[[6-(гидроксиметил)оксан-2-ил]окси]ацетил)-9,13-диметил-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]]икоса-14,17-диен-16-он (1g)

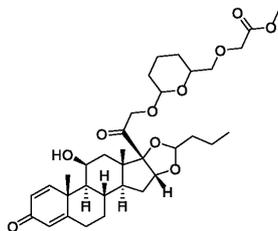


К раствору будесонида (1a, 50 мг, 0.12 ммоль) в безводном DCM (4 мл) добавили (3,4-дигидро-2Н-

пиран-2-ил)метанол (0.11 г, 0.93 ммоль) и *p*-толуолсульфоновую кислоту (31 мг, 0.18 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 дней, что контролировали посредством LCMS. Летучие вещества удалили *in vacuo* и остаток растворили в DMF и разделили посредством *rp*er-HPLC (способ B) и получили титульное соединение 1g (13 мг, выход 20%) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 545 (M+H)<sup>+</sup>.

Пример 1h.

Метил 2-[(6-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}оксан-2-ил)метокси]ацетат (1h)



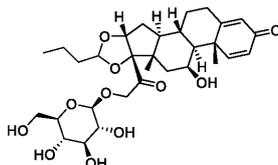
К раствору (3,4-дигидро-2H-пиран-2-ил)метанола (2.0 г, 18 ммоль) в THF (30 мл) добавили гидрид натрия (60% в минеральном масле, 0.88 г, 22 ммоль) частями при 0°C в защитной атмосфере азота. Суспензию перемешивали при 0°C до окончания выделения водорода. Затем к полученной смеси добавили раствор этил 2-бromoацетата (4.0 г, 26 ммоль) в THF (18 мл). Смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи до практически полного разрушения исходного материала согласно LCMS. После охлаждения до 0°C реакционную смесь охладил водой в защитной атмосфере азота и экстрагировали этилацетатом. Комбинированный органический раствор промыли водой и рассолом, высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством флэш-хроматографии (0-8% этилацетат в петролейном эфире) для получения этил 2-((3,4-дигидро-2H-пиран-2-ил)метокси)ацетат (0.70 г, 21% выход) в виде бесцветного масла.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 6.36 (d, J=6.0 Гц, 1H), 4.67 (m, 1H), 4.16 (s, 2H), 3.92 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.57 (d, J=5.5 Гц, 2H), 2.50-1.99 (m, 1H), 1.93-1.82 (m, 1H), 1.80 (m, 1H), 1.60 (m, 1H) ppm.

К раствору будесонида (1a, 0.11 г, 0.25 ммоль) в безводном DCM (8 мл) добавили этил 2-((3,4-дигидро-2H-пиран-2-ил)метокси)ацетат (0.35 г, 1.9 ммоль), полученный способом, описанным выше, и *p*-толуолсульфоновую кислоту (66 мг, 0.35 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 часов, что контролировали посредством LCMS. Летучие вещества удалили *in vacuo* и остаток растворили в DMF и разделили посредством *rp*er-HPLC (способ A) и получили титульное соединение 1h (46 мг, выход 29%) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 617 (M+H)<sup>+</sup>.

Пример 1i.

(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-6-пропил-8-(2-((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)оксан-2-ил)окси)ацетил)-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]]икоса-14,17-диен-16-он (1i, с эписмерами)



К смеси будесонида (1a, 0.22 г, 0.50 ммоль) и ацетобромо-α-D-глюкозы (0.33 г, 0.80 ммоль) в DCM (15 мл) добавили 4 Å молекулярные сита (1.0 г) и смесь перемешивали при КТ в течение получаса, а затем добавили трифторметансульфонат серебра (0.19 г, 0.75 ммоль) при 0°C. Суспензию перемешивали в темноте при КТ на протяжении выходных (72 ч) в защитной атмосфере азота. Смесь отфильтровали через целит и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством *rp*er-HPLC (способ B) и получили Ас-1i (25 мг, выход 9.2%) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 761 (M+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 МГц) (с эписмерами) δ 7.34-7.30 (m, 1H), 6.19-6.14 (m, 1H), 5.91 (s, 1H), 5.29 (t, J=9.2 Гц, 1H), 5.17-5.15 (m, 0.5H), 5.03-5.01 (m, 0.5H), 4.96-4.90 (m, 1H), 4.85-4.74 (m, 3H), 4.70-4.67 (m, 1H), 4.64-4.63 (m, 0.5H), 4.59-4.56 (m, 0.5H), 4.39-4.28 (m, 2H), 4.20-4.16 (m, 1H), 4.05-3.99 (m, 2H), 2.56-2.40 (m, 1H), 2.32-2.26 (m, 1H), 2.13-1.89 (m, 14H), 1.83-1.63 (m, 3H), 1.59-1.48 (m, 3H), 1.44-1.21 (m, 6H), 1.15-0.91 (m, 2H), 0.86-0.81 (m, 6H) ppm.

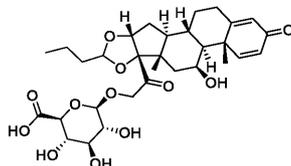
К раствору соединения Ас-1i (30 мг, 39 мкмоль), полученному выше, в воде (1 мл) и метанола (3 мл) добавили моногидрат гидроокиси лития (17 мг, 0.40 ммоль) при 0°C. После перемешивания при 0°C в течение одного часа смесь очистили напрямую посредством *rp*er-HPLC (способ B) и получили 1i (24 мг, 98% выход) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 593 (M+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (MeOD-d<sub>4</sub>, 400 МГц) (с эписмерами) δ 7.46 (t, J=10.4 Гц, 1H), 6.26 (dt, J=10.0 и 2.0 Гц, 1H),

6.02 (s, 1H), 5.21 и 4.64 (t, J=4.8 Гц, 1H), 5.16 (t, J=7.2 Гц, 0.5H), 4.94-4.80 (m, 2.5H), 4.57-4.47 (m, 1H), 4.44-4.41 (m, 1H), 4.34-4.31 (m, 1H), 3.90-3.87 (m, 1H), 3.70-3.64 (m, 1H), 3.39-3.24 (m, 4H), 2.70-2.62 (m, 1H), 2.41-2.36 (m, 1H), 2.27-2.08 (m, 2H), 2.00-1.93 (m, 1H), 1.88-1.81 (m, 1H), 1.74-1.32 (m, 9H), 1.22-0.90 (m, 8H) ppm.

Пример 1j.

(2S,3S,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6- $\{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11$ -гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.00<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]*жикоса*-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси} оксан-2-карбоновая кислота (1j, с эписмерами)

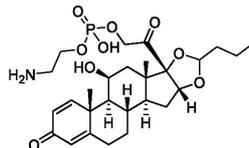


После аналогичных процедур, что и для 1i, за исключением замены ацетобромо- $\alpha$ -D-глюкуроновой кислоты метиловым эфиром ацетобромо- $\alpha$ -D-глюкозы, получили соединение 1j (24 мг, 9.2% выход за 2 этапа) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 607 (M+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (MeOD-d<sub>4</sub>, 400 МГц)  $\delta$  7.48 (t, J=10.0 Гц, 1H), 6.28-6.24 (m, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.22-5.15 (m, 1H), 4.98-4.81 (m, 2.5H), 4.65-4.56 (m, 1.5H), 4.45-4.39 (m, 2H), 3.62-3.59 (m, 1H), 3.52-3.46 (m, 1H), 3.41 (t, J=8.8 Гц, 1H), 3.30-3.28 (m, 1H), 2.70-2.62 (m, 1H), 2.40-2.36 (m, 1H), 2.27-2.10 (m, 2H), 1.95-1.92 (m, 2H), 1.75-1.54 (m, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.51-1.32 (m, 3H), 1.12-0.90 (m, 8H) ppm.

Пример 1k.

(2, 2113этокси)( $\{2$  1H)S,2S,4R,SS,9S,11S,12S,13R)13окси( $\{2$  1H), 3.30-3.28 (m, 1H), 2.70-2.62 (m, 1H), 2.40-2.36 (m, 1H)<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]*жикоса*)( $\{2$  1H), 3.30-3.28 оксоэтокси} фосфиновая кислота (1k)



К раствору триэтиламина (0.67 г, 6.6 ммоль) в хлороформе (4 мл) добавили оксихлорид фосфора (0.51 мг, 3.3 ммоль) при 0°C, а затем добавили раствор будесонида (1а, 1.3 г, 3.0 ммоль) в хлороформе (4 мл). После перемешивания при 20°C в течение 2 ч смесь охладил до 0°C и добавили раствор Вос-этанолamina (0.41 мг, 2.6 ммоль) в хлороформе (4 мл) и пиридине (3 мл). После перемешивания при 20°C в течение одного часа до завершения реакции согласно LCMS, реакционную смесь охладил добавлением воды (2 мл) при 0°C. Смесь перемешивали при 20°C на протяжении ночи. Летучие вещества удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством *prep*-HPLC (способ B) и получили сырой Вос-1k (330 мг, 17%) в виде желтой пленки. ESI m/z: 676 (M+Na)<sup>+</sup>.

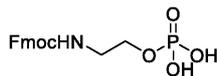
К раствору Вос-1k (0.18 г, 0.28 ммоль) в DCM (5 мл) добавили трифторукусную кислоту (0.5 мл) при 0°C. Полученную смесь перемешивали при 23°C на протяжении 2 ч до полного удаления Вос согласно LCMS. Летучие вещества удалили *in vacuo*. Остаток очистили посредством *prep*-HPLC (способ B) и получили 1k в виде белого твердого вещества (90 мг, 59% выход). ESI m/z: 554 (M+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, MeOD-d<sub>4</sub>)  $\delta$  7.49 (d, J=10.1 Гц, 1H), 6.28 (d, J=10.1 Гц, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.24-5.15 (m, 1H), 4.87-4.62 (m, 3H), 4.45 (d, J=6.1 Гц, 1H), 4.18-4.15 (m, 2H), 3.22-3.20 (m, 2H), 2.71-2.64 (m, 1H), 2.40 (d, J=13.4 Гц, 1H), 2.29-1.71 (m, 6H), 1.65-1.32 (m, 9H), 1.22-0.91 (m, 7H) ppm. Анал. HPLC: > 99.9%, время удерживания: 3.90 мин (способ B).

Пример 1l.

(2- $\{[(9H$ -флуорен-9-илметокси)карбонил]аминоэтокси} фосфонозная кислота.

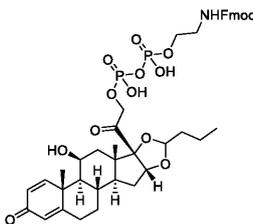
См. J. Am. Chem. Soc, 2016, 138(4), 1430-1445; WO2015153401; и Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements, 2000, 165, 83-90.



К смеси Fmoc-этанолamina (1.1 г, 3.9 ммоль) в THF (16 мл) добавили дифосфорил хлорид (2.2 г, 8.8 ммоль) шприцом при -40°C. После перемешивания при -40°C в течение одного часа до полного разрушения исходного материала, что контролировали посредством LCMS, реакционную смесь охладил водой (1 мл) при -40°C, воздействовали на нее насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (200 мл) и выдержали при 10-20°C на протяжении ночи. Полученную смесь подкислили конц. HCl до pH 2 и затем экстрагировали этилацетатом. Комбинированный органический раствор высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали и получили сырое титульное соединение (1.6 г, сырое) в виде белого твердого вещества, которое использовали для следующего этапа без очистки. ESI m/z: 364 (M+H)<sup>+</sup>.

(2- $\{[(9H$ -флуорен-9-илметокси)карбонил]аминоэтокси}( $\{$ гидрокси( $\{2$ -

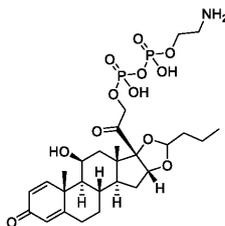
[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло-[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси)фосфорил]окси)фосфиновая кислота (Fмос-11)



В соответствии с описанной выше процедурой, за исключением замены будесонидом (1а, 0.86 г, 20 ммоль) Fмос-этанолamina, получили фосфоноевое промежуточное соединение будесонида 1а-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> (1.1 г, сырой) в виде белого твердого вещества (ESI m/z: 551 (M+H)<sup>+</sup>).

К раствору сырой (2-{{(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил}амино}этокси)фосфоновой кислоты (0.29 г, 0.80 ммоль) в DMF (5 мл) добавили триэтиламин (81 мг, 0.80 ммоль) и 1,1'-карбонилдимидазол (CDI, 0.32 г, 2.0 ммоль) при 10°C. Смесь перемешивали при 10-20°C на протяжении 30 мин и затем добавили полученное выше фосфоноевое промежуточное вещество 1а-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> (0.41 г, 0.80 ммоль) и хлорид цинка (0.87 г, 6.4 ммоль) к реакционной смеси. Полученную смесь перемешивали при 10-20°C на протяжении ночи и исходный материал был полностью разрушен согласно LCMS. Затем реакционную смесь охладили разбавленной вод. HCl (1 N, 50 мл) и экстрагировали этилацетатом. Комбинированный органический раствор сконцентрировали и остаток очистили посредством ргеп-НPLC (способ В) и получили Fмос-11 (0.32 г, выход 47%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 856 (M+H)<sup>+</sup>.

(2-аминоэтокси)({[гидрокси({2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси)фосфорил]окси})фосфиновая кислота (11)



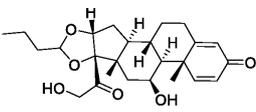
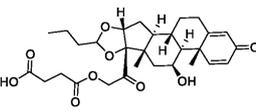
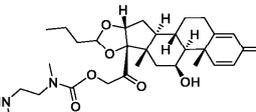
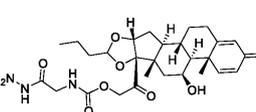
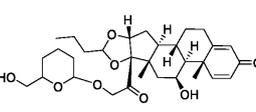
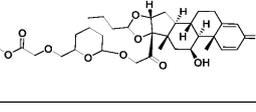
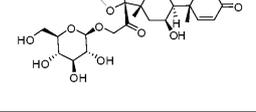
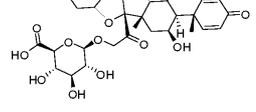
См. WO2015153401.

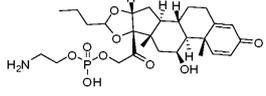
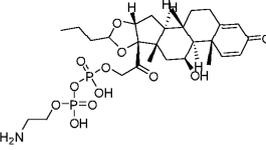
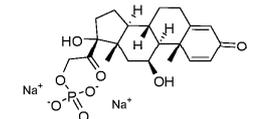
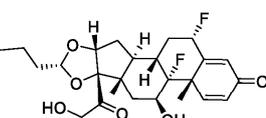
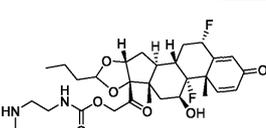
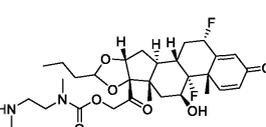
К раствору Fмос-11 (0.10 г, 0.12 ммоль) в DCM (2 мл) добавили пиперидин (67 мг, 0.79 ммоль) при 10°C. Реакционную смесь перемешивали при 10-20°C на протяжении 16 ч. Соединение Fмос-11 было полностью разрушено согласно LCMS. Летучие соединения удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством ргеп-НPLC (способ В) и получили 11 (50 мг, выход 68%) в виде твердого белого вещества. ESI m/z: 634 (M+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, MeOD-d<sub>4</sub>) δ 7.50 (d, J=10.0 Гц, 1H), 6.28 (d, J=9.9 Гц, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.23-5.16 (m, 1H), 5.02-4.97 (m, 1H), 4.88-4.67 (m, 1H), 4.45 (d, J=3.4 Гц, 1H), 4.23 (s, 2H), 3.24 (s, 2H), 2.67(dd, J=13.5, 8.3 Гц, 1H), 2.40 (d, J=11.3 Гц, 1H), 2.28-1.32 (m, 15H), 1.23-0.92 (m, 8H) ppm. Анал. HPLC: > 99.9%, время удерживания: 2.74 мин (способ В).

В приведенной далее табл. 1а представлены стероиды, полученные с использованием описанных здесь способов.

Таблица 1а  
Структура и химико-физические свойства соединений

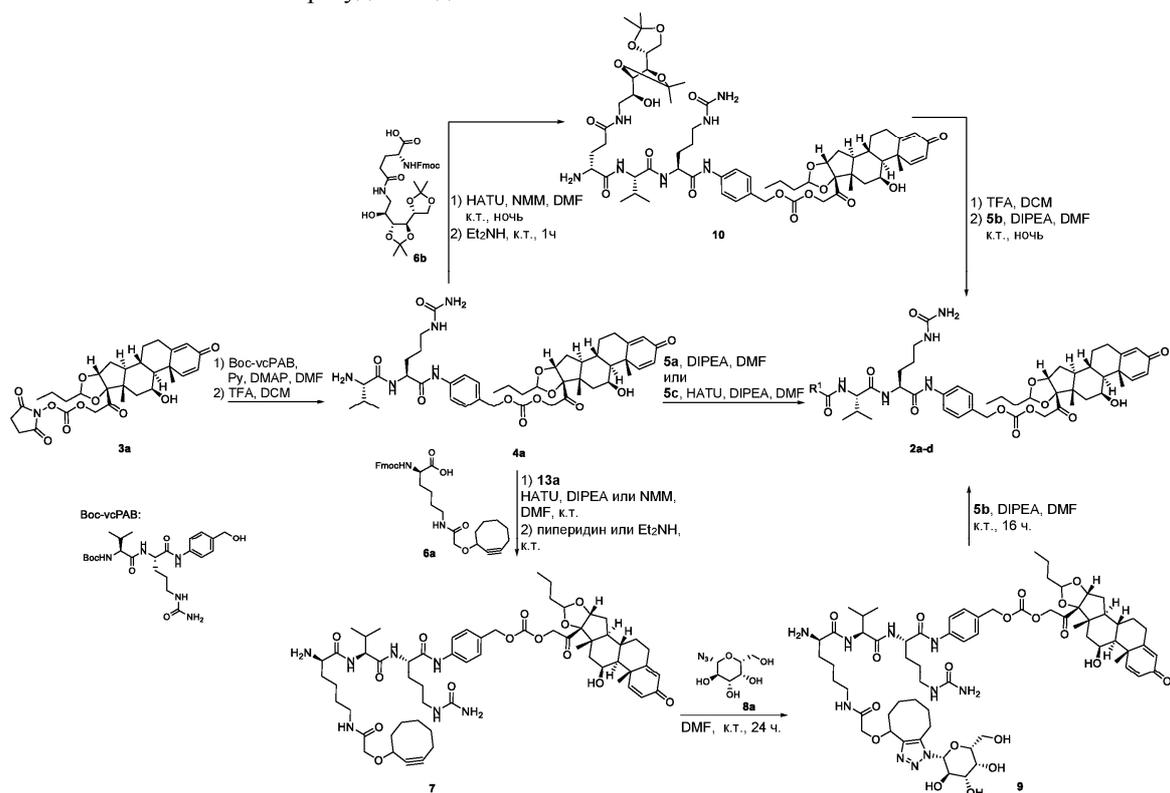
№	Структура	Чистота HPLC	cLogP	MF	MB (Кал.)	MS (M+H)
1a		95	2.73	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	430.55	431.3
1c		98	3.00	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>9</sub>	530.25	531.2
1d		93	2.92	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	544.69	545.3
1e		100	1.44	C <sub>28</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	545.62	546.2
1g		92	3.65	C <sub>31</sub> H <sub>44</sub> O <sub>8</sub>	544.68	545.3
1ч		98	3.19	C <sub>34</sub> H <sub>48</sub> O <sub>10</sub>	616.32	616.32
1i		100	0.96	C <sub>31</sub> H <sub>44</sub> O <sub>11</sub>	592.67	593.4
1j		98	1.28	C <sub>31</sub> H <sub>42</sub> O <sub>12</sub>	606.66	607.3

<b>1k</b>		100	1.18	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> NO <sub>9</sub> P	553.58	554.1
<b>1l</b>		100	0.55	C <sub>27</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>12</sub> P <sub>2</sub>	633.56	634.0
<b>1m</b>		100	1.15	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> P	484.39	590.3
<b>100</b>		100	2.44	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> F <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	466.51	467
<b>101a</b>		>95	2.40	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> . C <sub>2</sub> HF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	663.66	567
<b>101b</b>		>95	2.63	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> . C <sub>2</sub> HF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	678.69	581

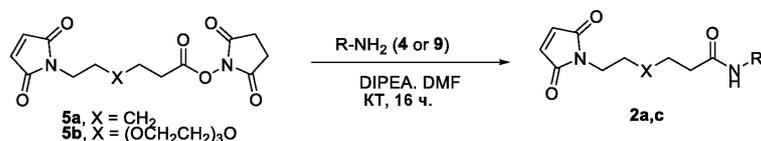
101c		100	3.34	$C_{32}H_{46}F_2N_2O_7$ $C_2HF_3O_2$	722.74	609
101d		100	2.46	$C_{30}H_{40}F_2N_2O_7$	578.64	579
102c		>95	3.47	$C_{28}H_{39}NO_7S$	533.68	531
102d		>95	3.69	$C_{29}H_{41}NO_7S$	547.71	548
102e		>95	3.17	$C_{28}H_{37}F_2NO_7S$	569.66	570
102f		>95	3.40	$C_{29}H_{39}F_2NO_7S$	583.69	584
103a		98	1.58	$C_{28}H_{40}N_2O_7$	516.64	517
103b		98	1.29	$C_{28}H_{38}F_2N_2O_7$	552.62	553
104a		>90	3.67	$C_{35}H_{50}F_2N_2O_8$	664.79	665
104b		>95	2.19	$C_{34}H_{48}F_2N_2O_9$	666.76	667

## Схема 2

## Синтез VC-РАВ спейсер-будесонида



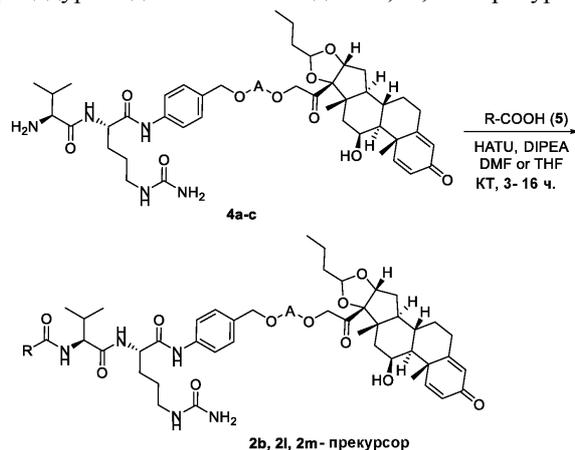
## Общая процедура А для синтеза МС-спейсер-будесонида (2a и 2c)



К раствору vcPAB-будесонида (4a A=CO, 1.0 экв.) или амина 9 (1.0 экв.) по схеме 2 в DMF (са. 1 мл на 10 мг амина) добавили активированный эфир NHS 5 (1.5-3.0 экв.) в представленной далее таблице и DIPEA (2.0 экв.) при КТ. Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи, пока эфир NHS и большая часть амина не были разрушены согласно спектрам LCMS. После фильтрации реакционный раствор напрямую очистили посредством rprep-HPLC или обращенно-фазовой флэш-хроматографии и получили необходимый амид 2 (са. 17% выход) в виде белого твердого вещества.

Амины		Активированный эфир 5	База/реактивы	Растворитель	Время (ч)	Очистка	Продукт 2	
4a <sup>c</sup>	50 мг, 56 мкмоль	5a	28 мг, 91 мкмоль	DIPEA (23 мг, 0.18 ммоль)	DMF (3 мл)	16	Prep-HPLC (способ А)	2a (10 мг, 17%)
реакционный раствор 9		5b	8.8 мг, 20 мкмоль	DIPEA (4.0 мг, 31 мкмоль)	DMF (1 мл)	16	Prep-HPLC (способ А)	2c (3.5 мг, 4%)

с. Соль TFA Общая процедура В для синтеза амидов 2b, 2l, 2m-прекурсора от кислоты



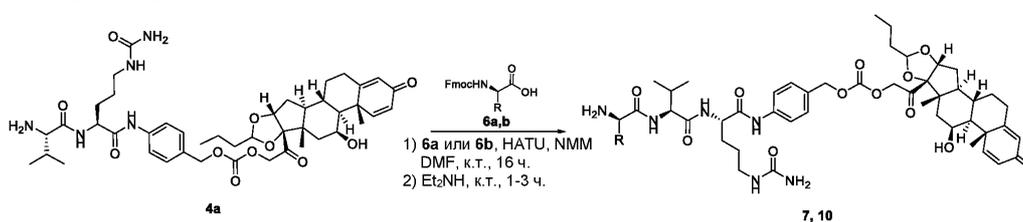
Продукты	Амины	Кислоты	A	R
<b>2b</b>	<b>4a</b>	<b>5c</b>		
<b>2l</b>	<b>4c</b>	<b>5d</b>		
<b>2m представляет собой прекурсор</b>	<b>4c</b>	<b>5e</b>		

К раствору кислоты 5 (1.0-1.5 экв.) в DMF или DCM или THF (1 мл на 5 мг 5) добавили DIPEA (2.0-5.0 экв.) и HATU (1.4-2.2 экв.) при КТ. Полученную смесь перемешивали при данной температуре в течение 0.5-1 ч, а затем добавили vsPAВ-будесонид (4, 1.0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 3-16 ч до полного разрушения амина, что контролировали посредством LCMS. Реакционную смесь отфильтровали через мембрану и затем фильтрат разделили посредством prep-HPLC или обращенно-фазовой флэш-хроматографии, в результате чего получили амид 2 (21-54% выход) в виде белого твердого вещества. В нижеприведенной таблице дана дополнительная информация.

Амины		кислота		База/ реактивы	Растворитель	Время (ч)	Очистка	Продукт 2
<b>4b</b>	10 мг, 11 мкмоль	<b>5c</b>	10 мг, 18 мкмоль	DIPEA (6.2 мг, 48 мкмоль) HATU (9.0 мг, 24 мкмоль)	DMF (1 мл)	16	Prep-HPLC (способ B)	<b>2b</b> (3.0 мг, 21%)

4c	58 мг, 61 мкмоль	5c	37 мг, 67 мкмоль	DIPEA (15 мг, 0.12 ммоль) НАТУ (34 мг, 89 мкмоль)	DMF (5 мл)	3	Преп-НPLC (способ B)	2i (21 мг, 24%)
4c	8.9 мг, 9.4 мкмоль	5d	6.3 мг, 14 мкмоль	DIPEA (3.6 мг, 27 мкмоль) НАТУ (8.0 мг, 20 мкмоль)	DMF (1 мл)	16	Преп-НPLC (способ B)	2l (7 мг, 54%)
4c	20 мг, 21 мкмоль	5e	13 мг, 21 мкмоль	DIPEA (8.0 мг, 62 мкмоль) НАТУ (12 мг, 31 мкмоль)	THF (5 мл)	16	Преп-НPLC (способ A)	2m представляет собой прекурсор (5 мг)

Общая процедура С для синтеза промежуточного соединения 7 и 10

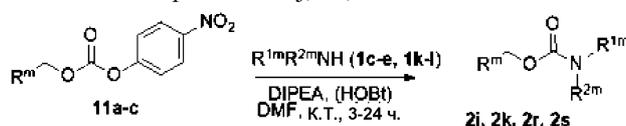


Фмос-аминокислота 6	Продукт	R
6a	7	
6b	10	

К раствору промежуточного соединения 6 (1.2-1.4 экв.) в DMF добавили HATU (1.5-1.7 экв.) при КТ. Полученный раствор перемешивали при КТ на протяжении часа. К данной суспензии добавили раствор *vc*РАВ-будесонида (4a, 1.0 экв.) в DMF (0.10 мл на мг of 4a) и затем NMM (2.3-3.0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 16 ч, пока она не стала прозрачной. Реакцию контролировали посредством LCMS до полного разрушения соединения 4a. К реакционной смеси затем добавили диэтиламин (излишек) и затем полученную смесь перемешивали при КТ на протяжении 1-3 ч до удаления Фмос согласно LCMS. Летучие вещества удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством *prer*-HPLC (способ А), в результате чего получили соединение 7 (18% выход от соединения 4a), или очистили посредством *prer*-HPLC (способ В), в результате чего получили соединение 10 (5%- выход) в виде белого твердого вещества. В нижеприведенной таблице дана дополнительная информация.

Амины		Промежуточное соединение 6		База /реактивы	Растворитель	Время (ч)	Очистка	Продукт
4a	60 мг, 64 мкмоль	6a	46 мг, 86 мкмоль	NMM (15 мг, 0.15 ммоль)	DMF (3 мл)	16 ч затем 3 ч	Преп- HPLC (способ А)	7 (13 мг, 18%)
	HATU (41 мг, 0.11 ммоль)			затем Et <sub>2</sub> NH (0.5 мл)				
4a	0.19 г, 0.20 ммоль	6b	0.15 г, 0.24 ммоль	NMM (61 мг, 0.60 ммоль)	DMF (5 мл)	16 ч затем 1 ч	Преп- HPLC (способ В)	10 (13 мг, 5%)
				HATU (0.11 г, 0.29 ммоль)				
				затем Et <sub>2</sub> NH (1 мл)				

Общая процедура D для синтеза карбаматов 2j, 2k, 2г и 2s



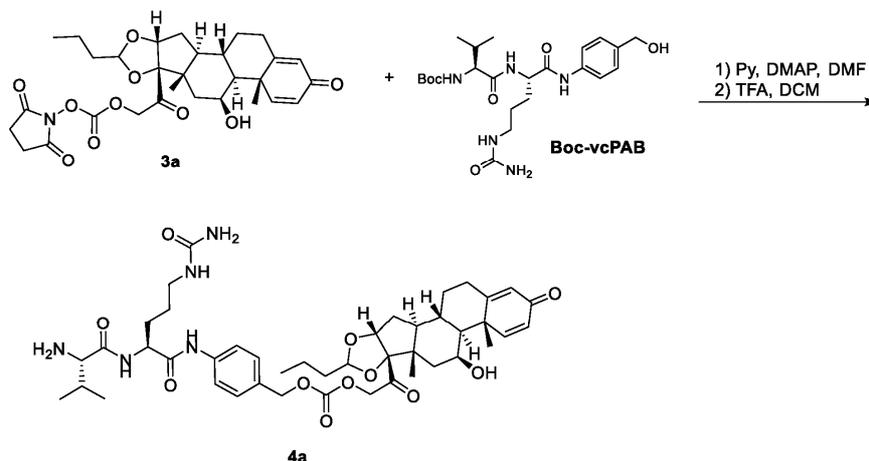
Смесь перемешивали при КТ на протяжении 3-24 ч до полного разрушения PNP активированного эфира, что контролировали посредством LCMS. Реакционную смесь отфильтровали через мембрану и фильтрат разделили напрямую посредством преп-HPLC, в результате чего получили соединение 2 (с диастереоизомерами или без них, 11-63% выход) в виде белого твердого вещества. В нижеприведенной таблице дана дополнительная информация.

Спейсер-будесонид 21		Активированный эфир 23		База/реактивы	Растворитель	Время (ч)	Очистка	Продукт 2
1e	15 мг, 28 мкмоль	11a	15 мг, 20 мкмоль	DIPEA (12 мг, 93 мкмоль)	DMF (1 мл)	12	Преп- HPLC (способ А)	2j (3.0 мг, 13%)
				HOBT (4.0 мг, 30 мкмоль)				
1d	20 мг, 37 мкмоль	11a	22 мг, 30 мкмоль	DIPEA (12 мг, 93 мкмоль)	DMF (1 мл)	12	Преп- HPLC (способ А)	2k-A (3.3 мг, 10%) 2k-B (4.1 мг, 12%)
				HOBT (6.0 мг, 44 мкмоль)				
1k	50 мг, 90 мкмоль	11c	30 мг, 95 мкмоль	DIPEA (50 мг, 0.39 ммоль)	DMF (1 мл)	3	Преп- HPLC (способ В)	2г (40 мг, выход 61%)

Синтез 2a-d.

Будесонид-линкеры 2a-d приготовили в соответствии с тремя подходами согласно схеме 2. Первый подход заключался непосредственно в реакциях связывания амидов от всРАВ-будесонида (4a), который получили от активированного эфира будесонида 3a с линкерами 5. Второй подход был через первоначальные реакции связывания амидов от всРАВ-будесонида (4a) с промежуточным соединением 6a, в результате чего получили будесонид-линкеры 7, за этим последовала 3+2 циклизация с галактоза-азидом (8a), в результате чего получили промежуточные соединения 9, за чем последовали вторичные реакции связывания амидов с 5. Третий подход осуществлялся через первые реакции связывания амидов 4 с промежуточным соединением 6b, затем последовало образование амидов 5b и последовательное снятие защиты с ацетона, в результате чего получили 2d.

## Промежуточное соединение 4а

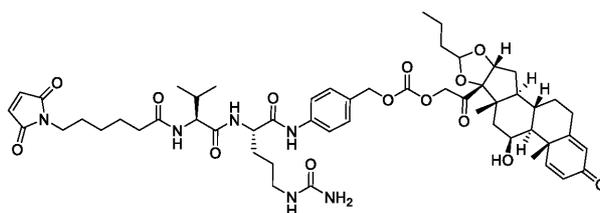


В сухом (1.4 ммоль) DMF (10 мл) добавили Boc-vc-PAB (12a) [WO2008/34124 A2] (0.59 г, 1.2 ммоль), DMAP (0.30 г, 2.4 ммоль) и пиридин (0.29 г, 3.7 ммоль). Смесь перемешивали при КТ на протяжении 16 ч до полного разрушения 3а согласно LCMS. Реакционную смесь напрямую очистили при обращенно-фазовой флэш-хроматографии (50-80% ацетонитрил в воде), в результате чего получили промежуточное соединение Вос-4а (0.74 г, выход 38%, ESI m/z: 936 (M+H)<sup>+</sup>) в виде белого твердого вещества, которое растворили в DCM (40 мл). К 5 мл раствора DCM (содержащего 94 мг Вос-4а) добавили TFA (0.5 мл) по каплям при 0°C. После перемешивания при КТ на протяжении 1.5 часов до разрушения Вос-4а, что контролировали посредством LCMS, полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и получили сырой титульный продукт 4а (83 мг, выход 34% из будесонида) как соль TFA в виде бесцветного масла, что можно использовать без очистки для синтеза следующего этапа. 20 мг сырого продукта 4а очистили при ргер-HPLC (способ В) и получили чистый продукт 4а (8 мг) в виде свободного основания для теста на стабильность в плазме. ESI m/z: 836 (M+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.17 (s, 1H), 8.12 (br s, 1H), 7.62 (d, J=8.5 Гц, 2H), 7.31 (d, J=10.2 Гц, 3H), 6.17 (d, J=10.1 Гц, 1H), 5.97 (t, J=5.7 Гц, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.22-5.01 (m, 4H), 4.89-4.62 (m, 3H), 4.53-4.40 (m, 1H), 4.30 (s, 1H), 3.09-2.87 (m, 3H), 2.36-2.22 (m, 1H), 2.14-1.87 (m, 4H), 1.81 (d, J=5.6 Гц, 2H), 1.75 (s, 2H), 1.62-1.52 (m, 4H), 1.51-1.41 (m, 2H), 1.40-1.19 (m, 8H), 1.18-0.92 (m, 2H), 0.92-0.82 (m, 9H), 0.78 (d, J=6.8 Гц, 3H) ppm.

## Пример 2а.

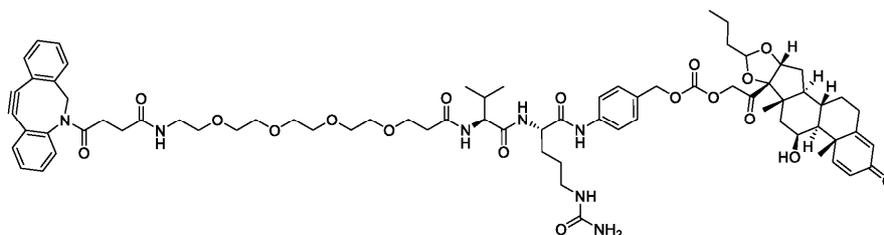
N-[(1S)-1-{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[(2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси} карбонил)окси]метил} фенил)карбамоил]бутил]карбамоил]-2-метилпропил]-6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамида (2а)



В соответствии с общей процедурой А получили титульное соединение 2а (10 мг, 17% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 1029 (M+H)<sup>+</sup>. Анал. HPLC: 92.5%, время удерживания: 7.66 мин (способ А).

## Пример 2b.

1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанам-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-идо)-N-[(1S)-1-{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{[(2-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси} карбонил)окси]метил} фенил)карбамоил]бутил]карбамоил]-2-метилпропил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (2b)

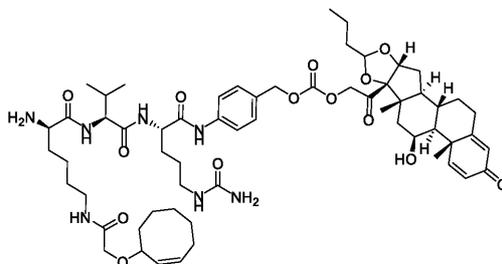


В соответствии с общей процедурой В получили титульное соединение 2b (3.0 мг, 21% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 686 (M/2+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.05 (s, 1H), 8.15 (d, J=7.5 Гц, 1H), 7.88 (d, J=8.8 Гц, 1H), 7.77 (t, J=5.7 Гц, 1H), 7.71-7.66 (m, 1H), 7.66-7.59 (m, 3H), 7.52-7.27 (m, 9H), 6.17 (d, J=10.0 Гц, 1H), 6.03-5.95 (m, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.79-5.74 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.22-4.99 (m, 6H), 4.88-4.84 (m, 1H), 4.84-4.60 (m, 2H), 4.42-4.34 (m, 1H), 4.33-4.26 (m, 1H), 4.26-4.20 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.48-3.44 (m, 12H), 3.32-3.26 (m, 2H), 3.12-2.91 (m, 4H), 2.63-2.54 (m, 1H), 2.41-2.19 (m, 3H), 2.03-1.94 (m, 4H), 1.84-1.78 (m, 2H), 1.63-1.22 (m, 14H), 1.03-0.82 (m, 15H) ppm. Анал. HPLC: 96.9%, время удерживания: 8.10 мин (способ В).

Пример 2с.

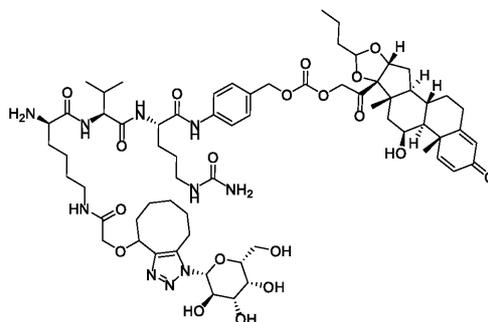
(2R)-2-амино-N-[(1S)-1-{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{{(2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси} карбонил)окси]метил} фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]гексанамида (7)



ESI m/z: 565 (M/2+H)<sup>+</sup>.

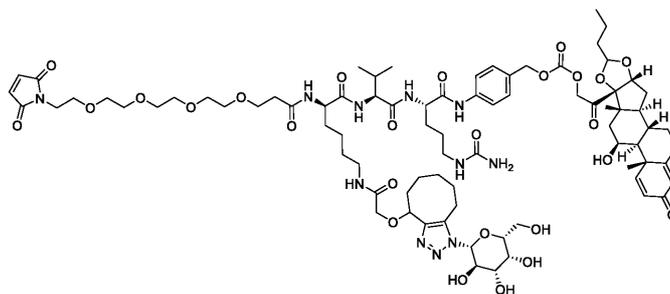
<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.17-10.00 (m, 1H), 8.47-7.73 (m, 2H), 7.69-7.57 (m, 3H), 7.38-7.26 (m, 3H), 6.17 (d, J=10.0 Гц, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.23-5.01 (m, 4H), 4.88-4.61 (m, 3.4H), 4.43-4.16 (m, 4.6H), 3.85 (d, J=14.7 Гц, 1H), 3.73 (d, J=14.5 Гц, 1H), 3.23-3.18 (m, 1H), 3.09-2.90 (m, 4H), 2.33-2.18 (m, 3H), 2.18-2.04 (m, 3H), 2.03-1.66 (m, 10H), 1.64-1.50 (m, 7H), 1.49-1.22 (m, 13H), 1.17-0.90 (m, 4H), 0.90-0.79 (m, 12H) ppm.

(2R)-2-амино-N-[(1S)-1-{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{{(2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси} карбонил)окси]метил} фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-6-[2-(1-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)оксан-2-ил]-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил}окси)ацетамидо]гексанамида (9)



После фильтрации полученный раствор 9 использовали напрямую для следующего этапа. ESI m/z: 667 (M/2+H)<sup>+</sup>.

N-[(1R)-1-{(1S)-1-{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{{(2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси} карбонил)окси]метил} фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил]-5-[2-(1-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)оксан-2-ил]-4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил}окси)ацетамидо]пентил]-1-(2,5-диоксопиррол-1-ил)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (Mc-PEG<sub>4</sub>-N(сахар-COT)Lys-vc-PAВ-будесонид) (2с)

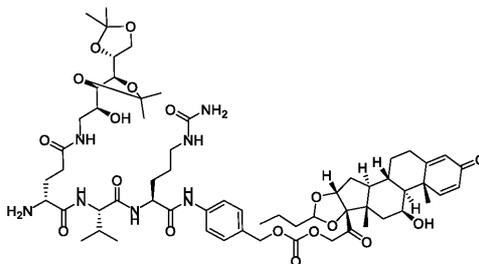


ESI m/z: 831 (M/2 + H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.73 (s, 1H), 8.21-8.07 (m, 3H), 7.94-7.82 (m, 1H), 7.71-7.59 (m, 3H), 7.39-7.26 (m, 4H), 7.02 (s, 1H), 6.17 (d, J=10.0 Гц, 1H), 6.09-5.98 (m, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.56-5.28 (m, 4H), 5.25-5.01 (m, 4H), 4.90-4.62 (m, 5H), 4.39-4.13 (m, 5H), 3.84-3.69 (m, 4H), 3.59-3.40 (m, 16H), 3.17-2.79 (m, 9H), 2.43-1.71 (m, 13H), 1.71-1.42 (m, 15H), 1.40-1.19 (m, 11H), 1.04-0.77 (m, 15H) ppm. Анал. HPLC: 97.6%, время удерживания: 7.63 мин (способ А).

Пример 2d.

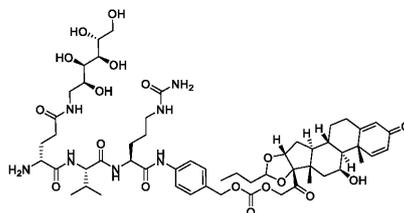
(2R)-2-амино-N-[(1S)-1-{{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{{(2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)окси}метил}фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-N'-[(2S)-2-[(4R,5R)-5-[(4R)-2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-ил]-2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-ил]-2-гидроксиэтил]пентандиаמיד (10)



В соответствии с общей процедурой С соединение 10 (13 мг, 5% выход) получили в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 605 (M/2 + H)<sup>+</sup>.

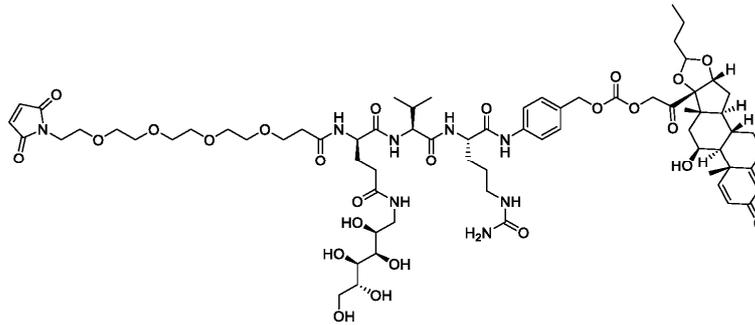
<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.08 (s, 1H), 8.34-8.17 (m, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.93-7.81 (m, 1H), 7.62 (d, J=8.4 Гц, 2H), 7.42-7.26 (m, 3H), 6.17 (d, J=10.1 Гц, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.23-5.01 (m, 4H), 4.91-4.61 (m, 4H), 4.43-4.20 (m, 3H), 4.10-3.72 (m, 6H), 3.60-3.54 (m, 1H), 3.24-3.09 (m, 2H), 3.07-2.91 (m, 2H), 2.32-2.25 (m, 1H), 2.22-2.10 (m, 2H), 2.04-1.93 (m, 2H), 1.88-1.67 (m, 5H), 1.64-1.22 (m, 27H), 1.17-0.93 (m, 3H), 0.91-0.81 (m, 12H) ppm.

(2R)-2-амино-N-[(1S)-1-{{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{{(2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)окси}метил}фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-N'-[(2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-пентагидроксигексил]пентандиаמיד (10A)



К смеси соединения 10 (13 мг, 11 мкмоль) в DCM (1 мл) добавили TFA (1 мл) по каплям. Смесь перемешивали при КТ на протяжении часа, что контролировали посредством LCMS. Летучие вещества удалили in vacuo и получили сырой продукт со снятием защиты 10A (13 мг) в виде светло-желтого масла, который использовали для следующего этапа без дальнейшей очистки. ESI m/z: 565 (M/2+H)<sup>+</sup>.

(2R)-N-[(1S)-1-{{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{{(2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}карбонил)окси}метил}фенил)карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-2-[1-(2,5-диоксопиррол-1-ил)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-N'-[(2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-пентагидроксигексил]пентандиаמיד (2d)

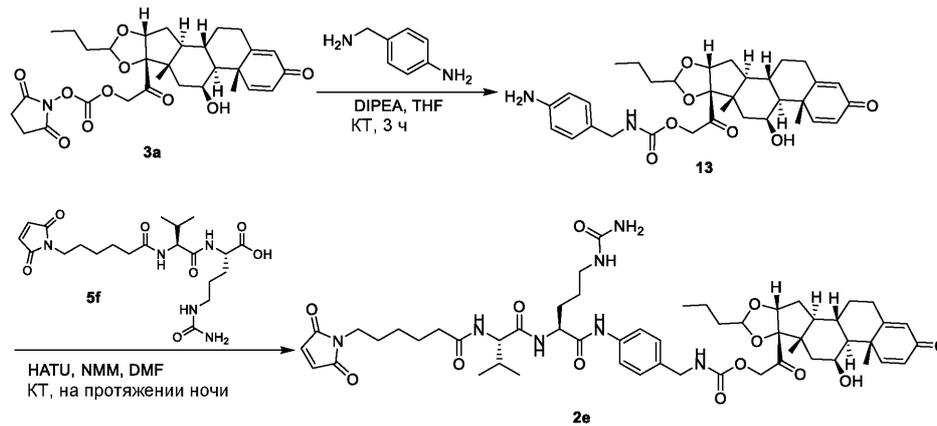


В соответствии с общей процедурой А получили титульное соединение 2d (3.5 мг, 1% общий выход от 4a) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 829.7 (M/2+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.10 (s, 0.25H), 9.79 (s, 0.75H), 8.22 (d, J=7.1 Гц, 1H), 8.12 (d, J=7.5 Гц, 1H), 8.07 (d, J=7.8 Гц, 1H), 7.79-7.71 (m, 1H), 7.69-7.60 (m, 2H), 7.38-7.27 (m, 4H), 7.02 (d, J=1.4 Гц, 2H), 6.17 (dt, J=7.6, 1.6 Гц, 1H), 6.03-5.97 (m, 1H), 5.92 (s, 1H), 5.46-5.40 (m, 2H), 5.35-5.02 (m, 4H), 4.89-4.61 (m, 4H), 4.50-4.45 (m, 1H), 4.40-4.16 (m, 7H), 3.65-3.37 (m, 21H), 3.07-2.90 (m, 3H), 2.44-2.23 (m, 4H), 2.17-1.93 (m, 6H), 1.90-1.71 (m, 4H), 1.62-1.20 (m, 15H), 1.06-0.76 (m, 15H) ppm. Анал. HPLC: >99%, время удерживания: 6.40 мин (способ А).

### Схема 3

#### Синтез 2e

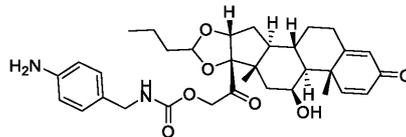


#### Пример 2e.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил

N-[(4-

аминофенил)метил]карбамат (13)



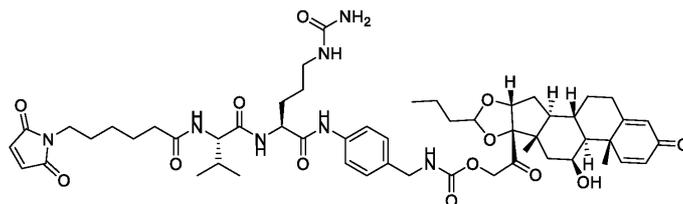
К раствору 4-аминобензиламина (9.7 мг, 79 мкмоль) и DIPEA (12 мг, 93 мкмоль) в THF (10 мл) добавили раствор 3a (24 мг, 44 мкмоль) в THF (5.0 мл) по каплям при КТ. Смесь перемешивали при КТ на протяжении 3 ч до полного разрушения 3a, что контролировали посредством LCMS. Летучие соединения удалили *in vacuo* и остаток очистили при *prep*-HPLC (способ В) и получили соединение 13 (5.6 мг, выход 22%) в виде твердого белого вещества. ESI m/z: 579.2 (M+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, MeOD-d<sub>4</sub>) δ 7.48-7.45 (m, 3H), 7.31-7.28 (m, 2H), 6.27-6.24 (m, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.22 (m, 1H), 5.12-5.11 (m, 1H), 4.96 (m, 1H), 4.86-4.81 (m, 2H), 4.66 (m, 1H), 4.44-4.35 (m, 3H), 2.66-2.65 (m, 1H), 2.40-2.36 (m, 1H), 2.15-2.10 (m, 2H), 1.97-1.60 (m, 6H), 1.53-1.36 (m, 6H), 1.09-0.92 (m, 7H) ppm.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил

N-[(4-[(2S)-5-

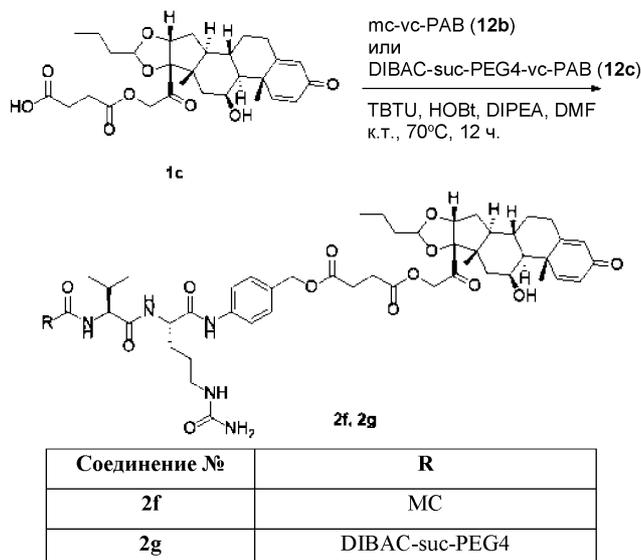
(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]фенил]метил]карбамат (2e)



К смеси MC-VC-OH 5f (WO2014/191578 A1) (5.7 мг, 12 мкмоль) в сухом DMF (1.5 мл) добавили HATU (4.6 мг, 12 мкмоль) и NMM (4.0 мг, 40 мкмоль) при КТ. Смесь перемешивали при КТ на протяжении 10 мин, после чего соединение 13 (4.7 мг, 8.1 мкмоль) добавили в реакционную смесь. Полученную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи. Соединение 13 было полностью разрушено и детекцию желаемого продукта проводили как детекцию главного продукта согласно LCMS. Смесь очистили напрямую при rgr-HPLC и получили соединение 2e (2.9 мг, выход 35%) в виде белого твердого вещества. ES m/z: 1029.1 (M+H)<sup>+</sup>, 514.7 (M/2+H)<sup>+</sup>. Анал. HPLC: >99%, время удерживания: 7.54 мин (способ А).

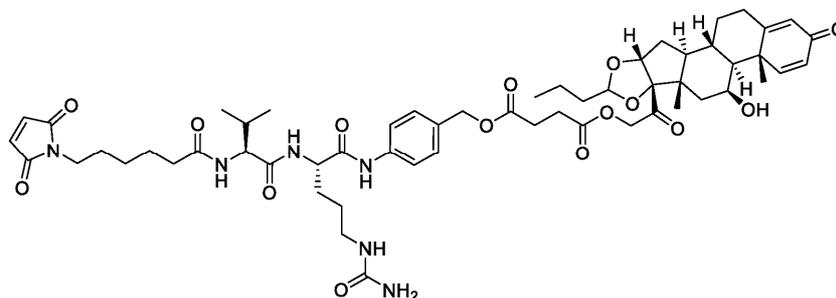
#### Схема 4

Синтез линкер-спейсер-будесонида (через эфир) 2f и 2g



Пример 2f.

1-{4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]фенил}метил 4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил}бутандиоат (2f)



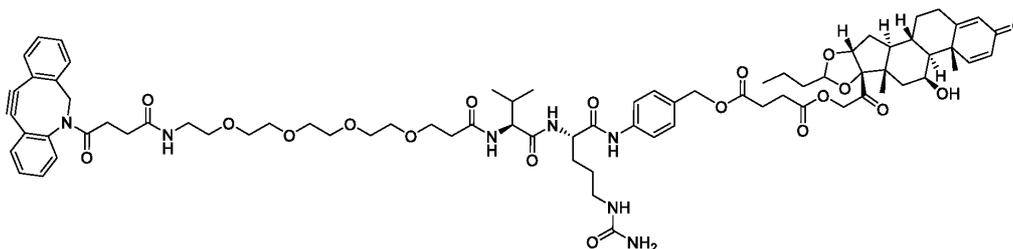
К раствору 1c (20 мг, 38 мкмоль) bDMF (2 мл) добавили MC-VCPAB (12b, 0.11 г, 0.19 ммоль), TBUTU (63 мг, 0.19 ммоль), HOBT (26 мг, 0.19 ммоль) и DIPEA (41 мг, 0.19 ммоль) при КТ. Полученную смесь перемешивали при 70°C на протяжении 12 ч. Более продукта 2f не образовалось, что контролировали посредством LCMS. Реакционную смесь очистили напрямую при rgr-HPLC и получили титульное соединение 2f (2.6 мг, выход 6%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 1085.3 (M+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ7.55-7.52 (m, 1H), 7.34-7.30 (m, 1H), 6.67 (br s, 1H), 6.30-6.27 (m, 1H), 6.03 (br s, 1H), 5.16-5.11 (m, 2H), 5.09-4.87 (m, 2H), 4.80-4.61 (m, 1H), 4.60-4.30 (m, 2H), 3.47-3.44 (m, 1H), 3.21-3.10 (m, 1H), 3.03-2.96 (m, 2H), 2.79-2.55 (m, 4H), 2.35-1.73 (m, 28H), 1.71-1.32 (m, 15H), 1.29-1.07 (m, 4H), 0.99-0.85 (m, 9H) ppm.

Пример 2g.

1-{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил]-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-

(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил 4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]-икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил}бутандиоат (2g)

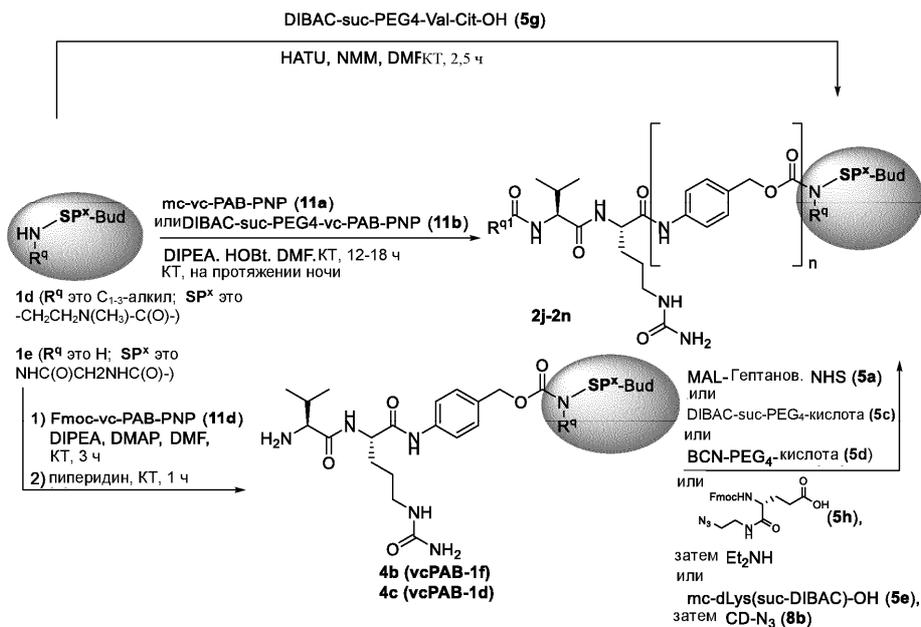


В соответствии с процедурами примера 2f, за исключением использования DIBAC-suc-PEG<sub>4</sub>-vc-PAB (12c) вместо 12b, было получено соединение 2g (15 мг, выход 19%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 714 (M/2+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, MeOD-d<sub>4</sub>) δ 7.67-7.60 (m, 4H), 7.48-7.46 (m, 4H), 7.38-7.32 (m, 4H), 7.26 (d, J=6.8 Гц, 1H), 6.27 (d, J=10.0 Гц, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.24-5.10 (m, 4H), 5.02-4.97 (m, 1H), 4.85-4.66 (m, 2H), 4.61 (s, 1H), 4.53 (dd, J=9.1, 4.9 Гц, 1H), 4.45-4.43 (m, 1H), 4.22 (dd, J=6.7, 4.7 Гц, 1H), 3.78-3.69 (m, 3H), 3.60-3.55 (m, 11H), 3.47-3.40 (m, 2H), 3.26-3.10 (m, 4H), 2.78-2.54 (m, 8H), 2.41-2.35 (m, 2H), 2.25-2.11 (m, 4H), 2.02-1.31 (m, 17H), 1.21-0.92 (m, 14H) ppm. Анал. HPLC: 99.5%, время удерживания: 7.86 мин (способ В).

### Схема 5

Синтез линкер-спейсер-будесонида 2j-2n (через амид или карбамат)



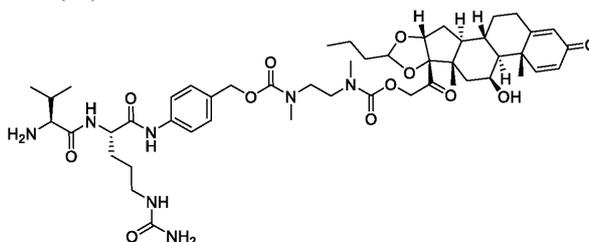
В схеме 5 Bud означает будесонид.

Большинство будесонид-линкеров (2), имеющих фрагмент VC-PAB, были синтезированы с применением трех подходов через амид или карбамат (схема 5). Соединения 1d, 1e были отдельно конъюгированы с линкерами посредством связывания амидов, и был получен амид или карбамат (схема 5). В нижеприведенной таблице дана дополнительная информация.

№ соединения	R <sup>q1</sup> in 2j, 2k, 2l, 2m, 2n	n in 2j-n	R <sup>q1</sup> -NH-спейсер-будесонид
2j		1	1e
2k		1	1d
2l		1	1d
2m		1	1d
2n		1	1d

Промежуточное соединение 4с.

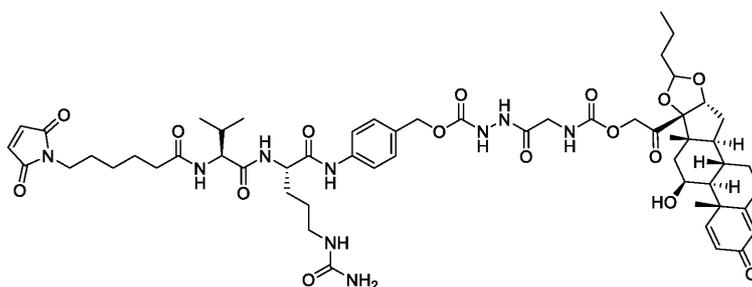
2-(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-(2-[(4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил](метил-амино)этил)-N-метилкарбамат (4с)



К раствору соединения 1d (40 мг, 73 мкмоль) в DMF (3 мл) добавили Fmoc-vcPAB-PNP (11d, 60 мг, 78 мкмоль), DMAP (9.0 мг, 74 мкмоль) и DIPEA (20 мг, 0.16 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении 3 ч до разрушения большей части исходного материала, что контролировали посредством LCMS. Затем к реакционной смеси добавили пиперидин (1 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение часа до завершения реакции de-Fmoc, что контролировали посредством LCMS, реакционную смесь напрямую очистили при rper-HPLC (способ В) и получили соединение 4с (9.0 мг, выход 13%, 2<sup>он</sup> пик в LC) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 951 (M+H)<sup>+</sup>, 973 (M+Na)<sup>+</sup>.

Пример 2j.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-({N'-[(4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]гидразинкарбонил}метил)карбамат (2j)

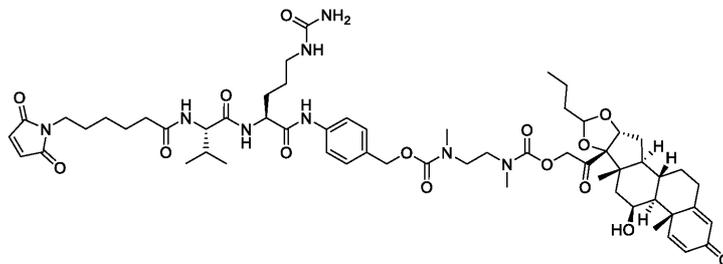


ESI m/z: 1144.3 (M+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.02 (s, 1H), 9.77 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 8.12(d, J=7.2 Гц, 1H), 7.83 (d, J=8.4 Гц, 1H), 7.73-7.70 (m, 1H), 7.61-7.59 (m, 2H), 7.32-7.29 (m, 3H), 7.01 (s, 2H), 6.19-6.16 (m, 1H), 6.00-5.92 (m, 2H), 5.05-5.00 (m, 2H), 4.95-4.85 (m, 2H), 4.71-4.62 (m, 2H), 4.40-4.17 (m, 3H), 3.71-3.58 (m, 2H), 3.45-3.39 (m, 2H), 3.06-2.89 (m, 3H), 2.33-2.28 (m, 2H), 2.20-2.07 (m, 3H), 2.02-1.91 (m, 3H), 1.81-1.75 (m, 2H), 1.75-1.62 (m, 2H), 1.60-1.44 (m, 11H), 1.42-1.20 (m, 6H), 1.19-1.12 (m, 4H), 1.00-0.92 (m, 2H), 0.88-0.81 (m, 10H) ppm.

Пример 2к.

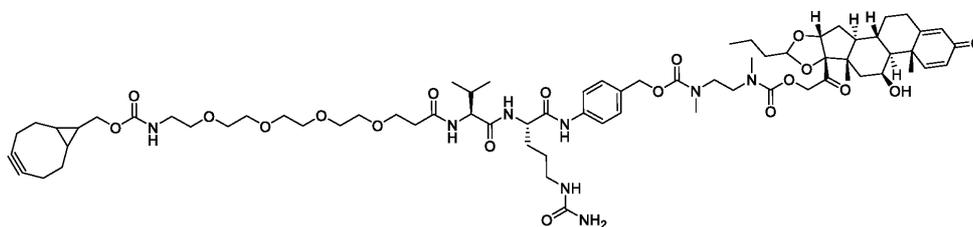
2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-(2-[[[4-(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил]метокси]карбонил](метил)амино]этил)-N-метилкарбамат (2к-А и 2к-В)



В соответствии с общей процедурой D были получены титульные соединения 2к-А (3.3 мг, выход 10%, второй пик в LC) и 2к-В (4.1 мг, выход 12%, первый пик в LC) как диастереоизомеры в виде белых твердых веществ. 2к-А: ESI m/z: 1143.4 (M+H)<sup>+</sup>, время удерживания 1.70 мин (способ А). 2к-В: ESI m/z: 1143.4 (M+H)<sup>+</sup>, время удерживания: 1.65 мин (способ А).

Пример 2л.

Бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметил N-(14-[[[1S)-1-[[[1S)-4-(карбамоиламино)-1-[[4-[[[2-[[[2-[[[1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси]карбонил](метил)амино]-этил]](метил)карбамоил]окси]метил]]фенил]карбамоил]бутил]карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил]-3,6,9,12-тетраоксатетрадекан-1-ил]карбамат (2л)



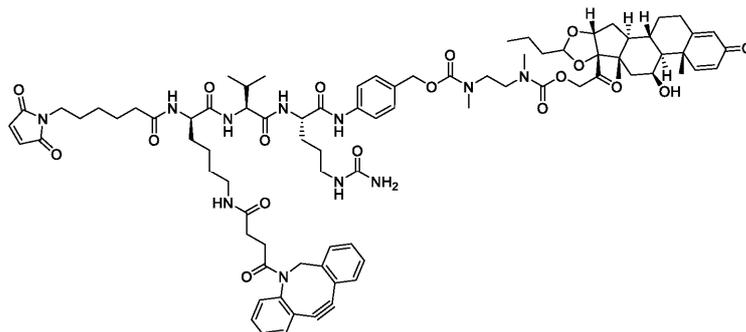
ESI m/z: 687.5 (M/2+H)<sup>+</sup>, 1396.8 (M+Na)<sup>+</sup> (50%),

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, MeOD-d<sub>4</sub>) δ 7.66 (d, J=7.5 Гц, 2H), 7.50 (d, J=10.0 Гц, 1H), 7.36 (d, J=7.0 Гц, 2H), 6.28 (d, J=10.0 Гц, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.15-5.05 (m, 2H), 4.87-4.62 (m, 4H), 4.53(s, 1H), 4.46(s, 1H), 4.21 (d, J=6.5 Гц, 1H), 4.16 (d, J=8.0 Гц, 2H), 3.83-3.72 (m, 2H), 3.66-3.60 (m, 12H), 3.56-3.52 (m, 3H), 3.49-3.42 (m, 1H), 3.30 (s, 3H), 3.25-3.09 (m, 3H), 3.02-2.96 (m, 4H), 2.87 (dd, J=16.6, 4.8 Гц, 2H), 2.72-2.64 (m, 1H), 2.58 (t, J=6.0 Гц, 2H), 2.40 (d, J=13.1 Гц, 1H), 2.31-2.10 (m, 9H), 2.01-1.91 (m, 3H), 1.81-1.70 (m, 2H), 1.63 (s, 7H), 1.51 (s, 3H), 1.48-1.30 (m, 4H), 1.11 (s, 1H), 1.02-0.91 (m, 15H) ppm. Анал. HPLC: > 99.9%, время удерживания: 9.40 мин (способ А).

Пример 2м.

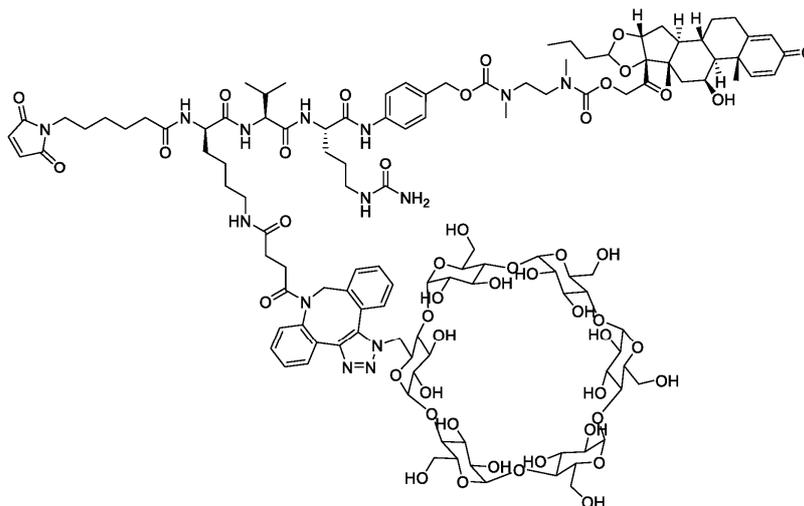
2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-(2-[[[4-(2S)-2-[(2R)-6-(4-[[2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил]-4-оксобутанамидо)-2-

[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо]гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил](метил)амино}этил)-N-метилкарбамат (2m-прекурсор)



В соответствии с общей процедурой В получили сырое соединение 2m-прекурсор (прекурсор 2m) (5 мг) в виде светло-желтого масла, которое напрямую использовали для следующего этапа. ESI m/z: 780 (M/2+H)<sup>+</sup>.

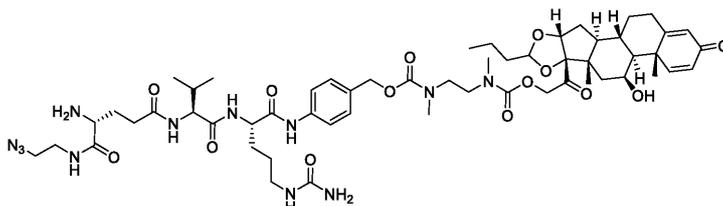
2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-(2-{{(4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо]-6-[4-(3-{31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2<sup>3,6</sup>.2<sup>8,11</sup>.2<sup>13,16</sup>.2<sup>18,21</sup>.2<sup>23,26</sup>]дотетраоктан-5-ил]метил}-3,4,5,13-тетраазатетрацикло[13.4.0.0<sup>2,6</sup>.0<sup>7,1</sup>]нонадека-1(15),2(6),4,7(12),8,10,16,18-октаен-13-ил)-4-оксобутанамидо]гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]-(метил)амино}этил)-N-метилкарбамат (2m)



К раствору сырого продукта 2т (5 мг) в DMF (1 мл) добавили CD-N3 (8b, 63 мг, 63 мкмоль). Полученную смесь перемешивали при КТ на протяжении 72 ч, что контролировали посредством LCMS. Полученную смесь сразу же очистили при rper-HPLC (способ А) и получили соединение 2m (2 мг, 4% выход от 4с) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 1278.8 (M/2+H)<sup>+</sup>. Анал. HPLC: 97.9%, время удерживания: 6.49 мин (способ А).

Пример 2п.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-(2-{{(4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(4R)-4-амино-4-[(2-азидоэтил)карбамоил]бутанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил](метил)амино}этил)-N-метилкарбамат (2п)

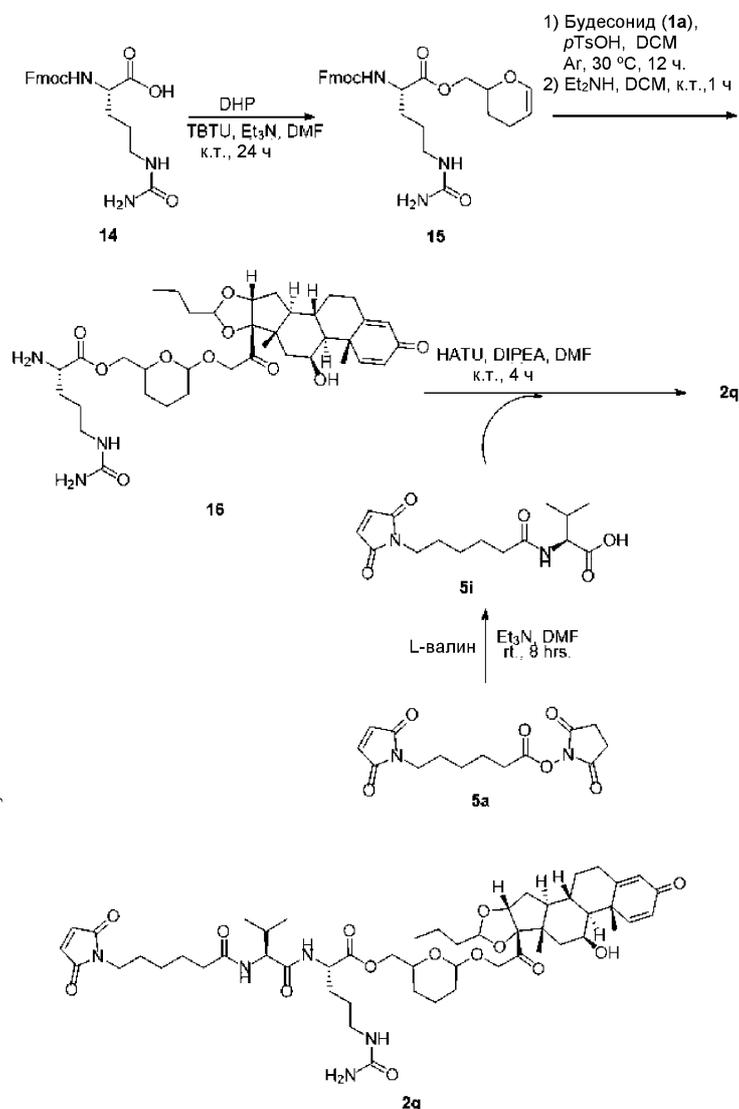


Затем реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи. Соединение 4с было полностью разрушено согласно LCMS. Смесь разделили при rper-HPLC (способ А) и после лиофилизации по-

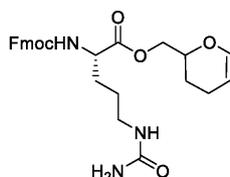
лучили соединение Fmoc-2n (20 мг), которое затем растворили в DMF (2 мл). К раствору DMF добавили диэтиламин (4 капли, см. 0.08 мл). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 2 ч до завершения реакции de-Fmoc, что контролировали посредством LCMS. Смесь отфильтровали через фильтровочную мембрану и раствор очистили при rгer-HPLC (способ А) и получили титруемое соединение 2n (10 мг, выход 8.4%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 1147 (M+H)<sup>+</sup>. Анал. HPLC: 99.6%, время удерживания: 5.67 мин (способ А); 7.72 мин (способ В).

## Схема 6

Синтез линкер-будесонида 2q (THP аналог)

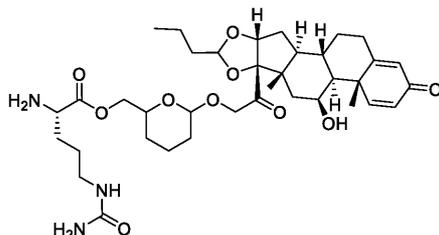


Пример 2q.  
(2S)-(3,4-дигидро-2H-пиран-2-ил)метил уреидопентаноат (15)      2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбониламино)-5-



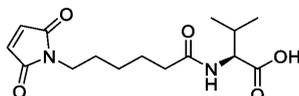
К смеси Fmoc-Cit-OH (14, 0.29 г, 0.73 ммоль) в DMF (5 мл) добавили DHP (0.10 мг, 0.88 ммоль), TBTU (0.70 г, 2.2 ммоль) и триэтиламин (0.37 г, 3.7 ммоль) при КТ. Полученую смесь перемешивали при КТ в течение 24 ч. Детекцию 15% необходимой массы осуществили посредством LCMS. Реакционную смесь охладили водой (30 мл) и экстрагировали этилацетатом (10 мл×3). Комбинированный органический раствор промыли водой и рассолом, высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали in vacuo. Сырой продукт очистили при обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде) и получили соединение 15 (110 мг, выход 30%) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 494 (M+H)<sup>+</sup>.

(6-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}оксан-2-ил)метил (2S)-2-амино-5-(карбамоиламино)пентаноат (16)



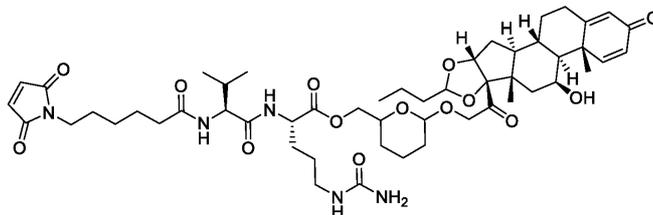
К раствору соединения 15 (80 мг, 0.16 ммоль) в безводном DCM (3 мл) добавили раствор будесонида (1a, 70 мг, 0.16 ммоль) и *p*-толуолсульфоновую кислоту (42 мг, 0.24 ммоль) в безводном DCM (2 мл) шприцом в защитной атмосфере аргона при КТ. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в защитной атмосфере аргона на протяжении 12 ч. Большая часть соединения 15 была разрушена согласно LCMS. Реакционную смесь охладили до КТ и к реакционной смеси добавили диэтиламин (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 1 ч до завершения реакции *de*-Fmoc, что контролировали посредством LCMS. Летучие соединения удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством *rpre*-HPLC (способ В) и получили титруемое соединение 16 (17 мг, выход 31%) в виде твердого белого вещества. ESI *m/z*: 702 (M+H)<sup>+</sup>.

(S)-2-(6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо)-3-метилбутановая кислота (5i)



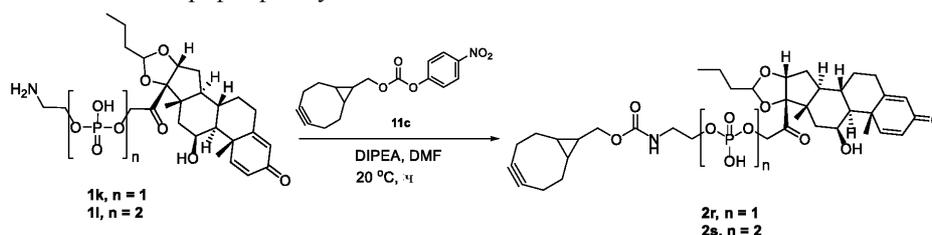
К раствору L-валина (0.12 г, 1.0 ммоль) в безводном DMF (2 мл) добавили соединение 5a (0.31 г, 1.0 ммоль) и триэтиламин (0.51 г, 5.0 ммоль) при КТ. Смесь перемешивали при КТ на протяжении 8 ч до полного разрушения соединения 5a, что контролировали посредством LCMS. Реакционную смесь отфильтровали через фильтрационную мембрану и фильтрат сразу же очистили при *rpre*-HPLC (способ А) и получили титруемое соединение 5i (0.14 г, выход 46%) в виде бесцветного масла. ESI *m/z*: 311 (M+H)<sup>+</sup>.

6-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}оксан-2-ил)метил (2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пентаноат (2q)



К раствору соединения 5i (5.8 мг, 19 мкмоль) в DMF (1 мл) добавили HATU (10 мг, 26 мкмоль) и DIPEA (6.6 мг, 51 мкмоль) при КТ. Смесь перемешивали при КТ на протяжении 15 мин и затем к раствору добавили соединение 16 (12 мг, 17 мкмоль) при КТ. Полученную смесь перемешивали при КТ на протяжении 4 ч до полного разрушения соединения 5i, что контролировали посредством LCMS. Реакционную смесь затем отфильтровали через фильтрующую мембрану и фильтрат очистили напрямую при *rpre*-HPLC (способ А) дважды и получили титруемое соединение 2q (2 мг, выход 12%) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 995.3 (M+H)<sup>+</sup>. Анал. HPLC: 83.5%, время удерживания: 10.36 мин (способ В).

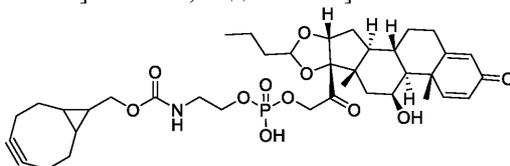
Схема 7. Синтез линкер-фосфат-будесонида 2r и 2s



Фосфат-будесониды связали с BCN-PNP (11c) и получили BCN-фосфат-будесониды (соединение 2r и 2s) (схема 7).

Пример 2г.

{2-[({бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси}карбонил)амино]этоксипропан-2-ил}({2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтоксипропан-2-ил}фосфиновой кислоты) (2г)

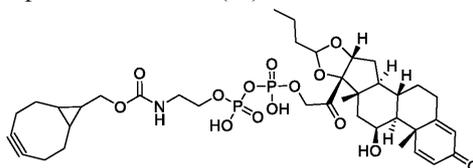


В соответствии с общей процедурой D соединение 2г (40 мг, 61% выход) получили в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 730 (M+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, MeOD-d<sub>4</sub>) δ 7.49 (d, J=10.1 Гц, 1H), 6.29-6.26 (m, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.23-5.16 (m, 1H), 4.88-4.64 (m, 3H), 4.45 (dd, J=8.0, 3.1 Гц, 1H), 4.23-4.13 (m, 2H), 3.97 (dd, J=11.9, 5.7 Гц, 2H), 3.36 (t, J=4.7 Гц, 2H), 2.67 (td, J=13.4, 5.3 Гц, 1H), 2.40 (d, J=9.6 Гц, 1H), 2.30-1.34 (m, 23H), 1.21-0.92 (m, 10H) ppm. Анал. HPLC: > 99.9%, время удерживания: 5.26 мин (способ B).

Пример 2с.

{2-[({бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси}карбонил)амино]этоксипропан-2-ил}({[гидрокси({2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтоксипропан-2-ил}фосфорил)окси]фосфиновой кислоты) (2с)



ESI m/z: 810 (M+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, MeOD-d<sub>4</sub>) δ 7.51 (d, J=10.1 Гц, 1H), 6.28 (d, J=10.0 Гц, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.22-5.16 (m, 1H), 4.98-4.66 (m, 3H), 4.46 (s, 1H), 4.12 (dt, J=45.0, 13.0 Гц, 4H), 3.39 (t, J=11.9 Гц, 2H), 2.67 (dd, J=13.3, 8.0 Гц, 1H), 2.40 (d, J=11.2 Гц, 1H), 2.30-1.32 (m, 23H), 1.22-0.92 (m, 10H) ppm.

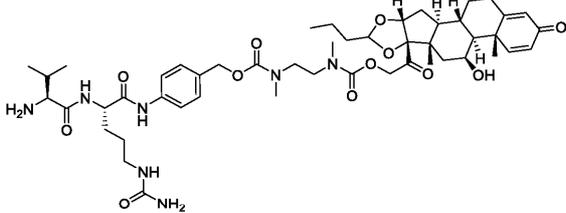
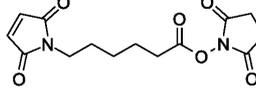
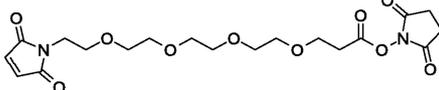
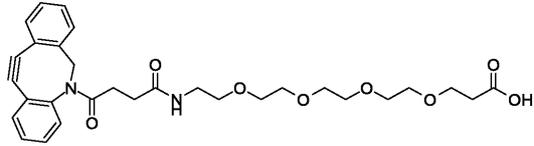
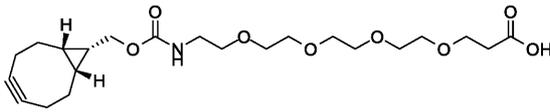
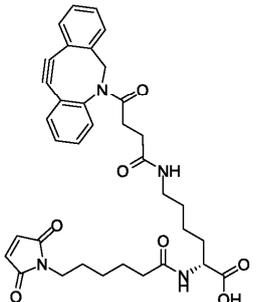
Анал. HPLC: > 99.9%, время удерживания: 4.03 мин (способ B).

#### Экспериментальные процедуры для промежуточных соединений

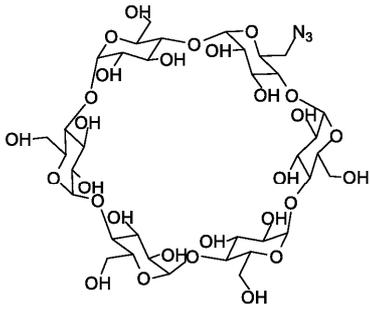
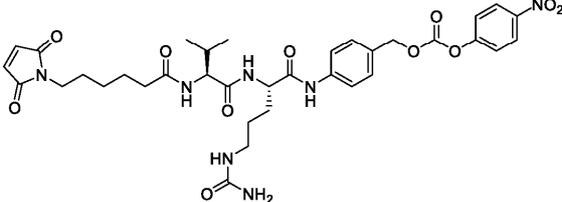
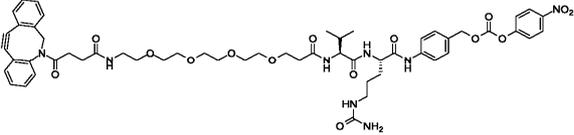
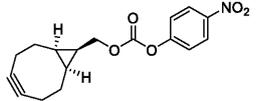
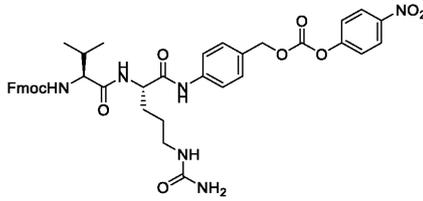
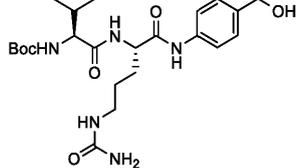
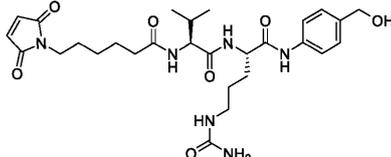
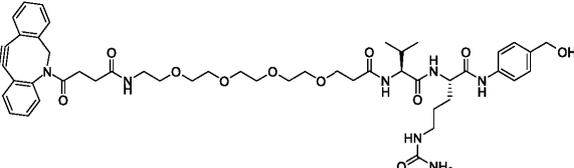
Таблица 4

Ключевые промежуточные соединения и исходные материалы

Структуры	Промежуточное соединение	Ссылки или синтез
	1a (будесонид)	Имеется в продаже (51333-22-3)
	4a (vcPAВ-будесонид)	См. схему 2

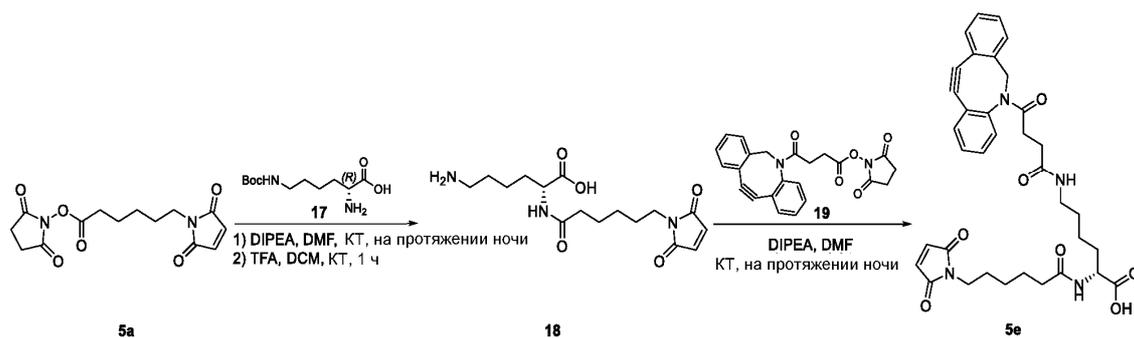
	<b>4c (vcPAB-1d)</b>	См. схему 5
	<b>5a (mc-NHS)</b>	Имеется в продаже (55750-63-5)
	<b>5b (MAL-PEG4-NHS)</b>	Имеется в продаже (1325208-25-0)
	<b>5c</b> (DIBAC-сук- PEG4- кислота)	Имеется в продаже (1537170-85-6)
	<b>5d (BCN-PEG4-кислота)</b>	Имеется в продаже (1421932-54-8)
	<b>5e</b>	Схема 8



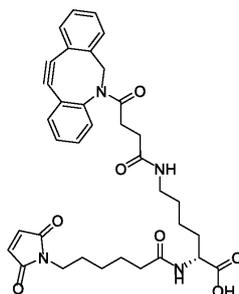
	<p><b>8b</b></p>	<p><i>Synth. Commun.</i>, <b>2002</b>, 32(21), 3367-3372</p> <p><i>J. Am. Chem. Soc.</i>, <b>2012</b>, 134(46), 19108-19117</p> <p><i>J. Med. Chem.</i>, <b>1997</b>, 40(17), 2755-2761</p> <p><i>J. Am. Chem. Soc.</i>, <b>1993</b>, 115(12), 5035-5040</p>
	<p><b>11a (MC-vc-PAB-PNP)</b></p>	<p>Имеется в продаже (159857-81-5) WO2014/19157 8 A1</p>
	<p><b>11b (DIBAC-suc-PEG4-vc-PAB-PNP)</b></p>	<p>Схема 12</p>
	<p><b>11c (BCN-PNP)</b></p>	<p>WO2013/18169 7A1</p> <p><i>Angew. Chem. Int. Ed.</i>, <b>2010</b>, 49 (49), 9422-9425</p>
	<p><b>11d (Fmoc-vc-PAB-PNP)</b></p>	<p>Имеется в продаже 863971-53-3</p>
	<p><b>12a (Boc-vc-PAB)</b></p>	<p>Имеется в продаже (870487-09-5) WO2008/34124 A2</p>
	<p><b>12b (MC-vc-PAB)</b></p>	<p>Имеется в продаже 159857-80-4</p>
	<p><b>12c (DIBAC-suc-PEG4-vc-PAB)</b></p>	<p>Схема 12</p>

## Схема 8

## Синтез 5e



(2R)-6-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4,6,8,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)гексанамидо]гексановая кислота (5e)

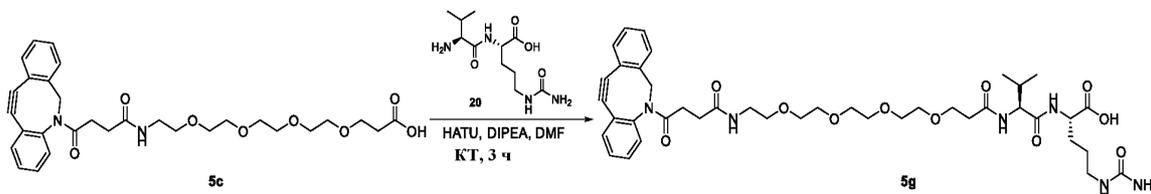


К смеси Н-D-Lys(Boc)-OH (17, 0.25 г, 1.0 ммоль) в DMF (10 мл) добавили 6-малеимидокапроновая кислота-NHS (5a, 0.31 г, 1.0 ммоль) и диизопропилэтиламин (DIPEA, 0.26 г 2.0 ммоль) при КТ. После этого реакцию смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи, соединение 5a было полностью разрушено. Смесь напрямую разделили при обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде (0.05% TFA)) и получили промежуточный продукт Boc-18 (ESI m/z: 440 (M+H)<sup>+</sup>) в виде бесцветного масла, который растворили в DCM (5 мл). К раствору добавили TFA (0.5 мл) по каплям при 0°C и смесь перемешивали при КТ на протяжении часа. Реакцию контролировали посредством LCMS, промежуточный продукт Boc-18 был полностью разрушен. Летучие вещества удалили in vacuo и получили сырой продукт 18 (ESI m/z: 340 (M/2+H)<sup>+</sup>), который использовали для следующего этапа без дальнейшей очистки. К смеси сырого соединения 18 (0.21 г, 0.62 ммоль) в DMF (5 мл) добавили активированный эфир 19 (0.20 г, 0.50 ммоль) и DIPEA (50 мг, 0.39 ммоль) при КТ. Затем реакцию смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи, соединение 19 было полностью разрушено, что контролировали посредством LCMS. Затем реакцию смесь напрямую разделили при обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде) и получили титльное соединение 5e (0.10 г, 20% выход за 3 этапа из 5a) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 627 (M+H)<sup>+</sup>.

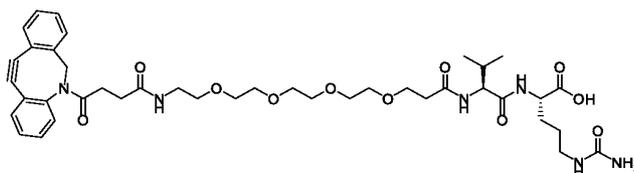
<sup>1</sup>H ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 МГц): δ 7.89 (d, J=13.2 Гц, 1H), 7.69-7.62 (m, 3H), 7.48-7.47 (m, 3H), 7.36-7.28 (m, 3H), 6.99 (s, 2H), 5.03 (d, J=13.6 Гц, 1H), 4.09-4.04 (m, 1H), 3.60 (d, J=13.6 Гц, 1H), 3.38-3.34 (m, 1H), 2.90-2.87 (m, 2H), 2.61-2.55 (m, 1H), 2.25-2.17 (m, 1H), 2.08-1.51 (m, 5H), 1.46-1.15 (m, 12H) ppm.

## Схема 9

## Синтез 5g



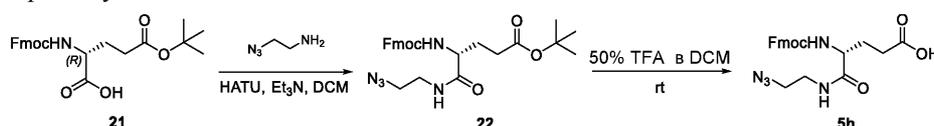
(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбуанамидо]-5-(карбамоиламино)пентановая кислота (5g)



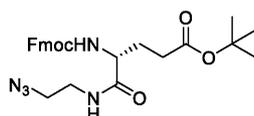
К раствору соединения 5с (0.30 г, 0.54 ммоль) в DMF (10 мл) добавили HATU (0.31 г, 0.81 ммоль) и DIPEA (0.14 г, 1.1 ммоль) при КТ. Смесь перемешивали при КТ на протяжении 15 мин. К реакционной смеси добавили Val-Cit-OH (20 (CAS-номер 159858-33-0), 0.21 г, 0.76 ммоль) при КТ и полученную смесь перемешивали при КТ на протяжении 3 ч до разрушения большей части материалов, что контролировали посредством LCMS. Реакционную смесь отфильтровали через фильтрующую мембрану и фильтрат напрямую очистили при обращенной флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде (с 10 ммоль/л бикарбонат аммония)) и получили титульный промежуточный продукт 5g (0.25 г, выход 57%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 809.5 (M+H)<sup>+</sup>.

### Схема 10

Синтез промежуточных соединений 5h



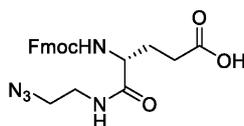
трет-бутил  
илметокси)карбонил]амино}бутаноат (22)



К смеси Fmoc- $\beta$ -D-Glu(OTBU)-OH (21, (104091-08-9), 0.30 г, 0.71 ммоль) и 2-азидоэтанамин (87156-40-9, 73 мг, 0.85 ммоль) в DCM (50 мл) добавили HATU (0.41 г, 1.1 ммоль) и триэтиламин (0.3 мл) при КТ. Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи. Большая часть соединения 21 была разрушена согласно TLC и LCMS. Затем реакционную смесь охладил водой (50 мл) при КТ, органический раствор промыли водой и рассолом, высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили при *prep*-TLC (силикагель, элюирование петролейным эфиром/этилацетатом (об/об=1)) и получили титульное соединение 22 (0.30 г, выход 76%) в виде желтого вязкого масла. ESI m/z: 494 (M+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  8.09 (m, 1H), 7.84-7.90 (m, 4H), 7.33-7.44 (m, 4H), 6.28 (s, 2H), 3.35 (m, 6H), 3.26 (m, 1H), 2.50 (m, 2H), 2.25 (m, 1H), 1.80 (m, 1H), 1.39 (s, 9H) ppm.

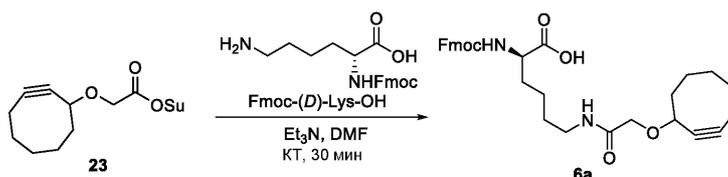
(4R)-4-[(2-азидоэтил)карбамоил]-4-[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}бутановая кислота (5h)



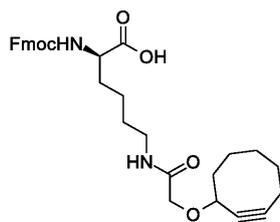
Полученную смесь перемешивали при КТ на протяжении 2 ч до полного разрушения соединения 22, что контролировали посредством TLC и LCMS. Летучие вещества удалили *in vacuo* и получили сырой продукт 5h (17 мг, выход 96%) в виде желтого масла, который использовали для следующего этапа без дальнейшей очистки. ESI m/z: 438 (M+H)<sup>+</sup>.

### Схема 11

Синтез промежуточных продуктов 6a



(2R)-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетида]-2-[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}-гексановая кислота (6a)

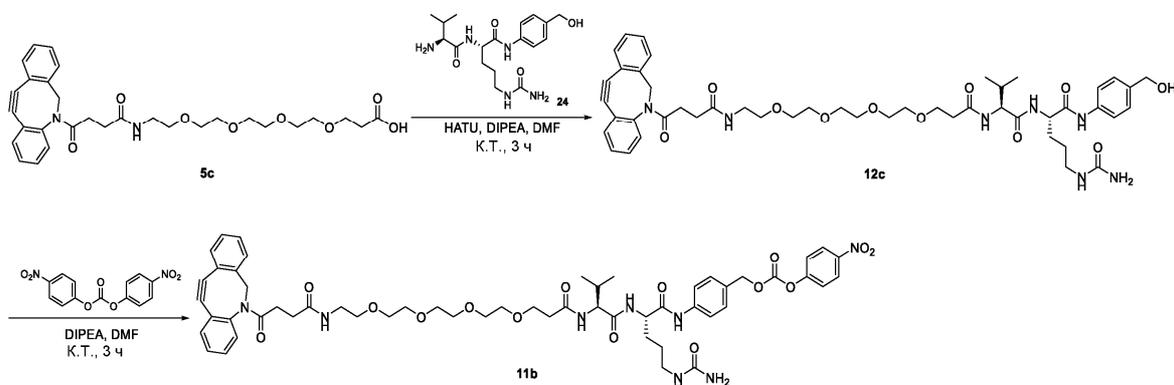


К смеси коммерческого соединения 23 (65 мг, 0.23 ммоль, CAS: 1425803-45-7) в DMF (2 мл) добавили Fmoc-D-Lys-OH (85 мг, 0.23 ммоль) и триэтиламин (52 мг, 0.51 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 30 мин. Смесь напрямую разделили при обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде (0.05% TFA)) и получили промежуточный продукт 6a (85 мг, выход 70%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 533 (M+H)<sup>+</sup>.

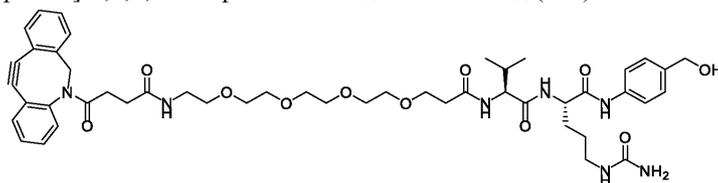
<sup>1</sup>H ЯМР (MeOD-d<sub>4</sub>, 500 МГц): δ 7.70 (d, J=7.5 Гц, 2H), 7.59 (t, J=8.0 Гц, 2H), 7.30 (t, J=7.5 Гц, 2H), 7.22 (t, J=7.4 Гц, 2H), 4.35-4.22 (m, 2H), 4.22-4.09 (m, 2H), 4.09-3.99 (m, 1H), 3.94-3.81 (m, 1H), 3.79-3.67 (m, 1H), 3.15 (t, J=6.9 Гц, 2H), 2.17-1.96 (m, 3H), 1.96-1.86 (m, 1H), 1.85-1.66 (m, 4H), 1.66-1.41 (m, 5H), 1.41-1.25 (m, 3H) ppm.

### Схема 12

Синтез промежуточных продуктов 11b и 12c

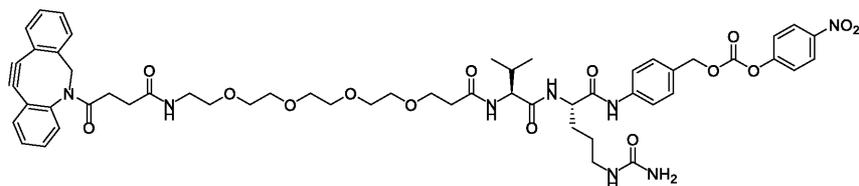


1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-N-[(1S)-1-[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{4-(гидроксиметил)фенил}карбамоил}бутил]карбамоил]-2-метилпропил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (12c)



Смесь перемешивали при КТ на протяжении 15 мин. К реакционному раствору добавили *vs*-РАВ (24 (159857-79-1), 0.21 г, 0.54 ммоль) при КТ и полученную смесь перемешивали при КТ на протяжении 3 ч до разрушения большей части материалов, что контролировали посредством LCMS. Реакционную смесь отфильтровали через фильтрующую мембрану и фильтрат напрямую очистили при обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде (с 10 ммоль/л бикарбонат аммония)) и получили титильный промежуточный продукт 12c (0.30 г, выход 60%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 617 (M+H)<sup>+</sup>.

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил 4-нитрофенил карбонат (11b)



К раствору соединения 12c (0.15 г, 0.16 ммоль) в DMF (10 мл) добавили бис(4-нитрофенил) карбонат (0.15 г, 0.49 ммоль) и DIPEA (63 мг, 0.49 ммоль) при 0°C. Затем смесь перемешивали при КТ на протяжении 3 ч до тех пор, пока соединение 12c не было разрушено практически полностью, что контроли-

ровали посредством LCMS. Реакционную смесь отфильтровали через фильтрующую мембрану и фильтрат напрямую очистили при обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде (с 10 ммоль/л бикарбонат аммония)) и получили титульный промежуточный продукт 11b (50 мг, выход 28%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 1079 (M+H)<sup>+</sup>.

В нижеприведенной табл. 5 представлены линкер-нагрузки, приготовленные с использованием описанных здесь способов.

Таблица 5  
Примеры линкер-нагрузок

LP (ЛН)	Нагрузка	Название линкера	Структуры
2a	1a	MC-VC-PAB	
2b	1a	DIBAC-suc-vc-PAB	
2c	1a	mc-PEG4-(сахар-COT)dLys-vc-PAB	
2d	1a	mc-PEG4-(сахар2)dGlu-vc-PAB	

2e	1a	MC-VC-PABA	<p>The structure shows a complex molecule with a central core consisting of a bicyclic system (likely a steroid or similar) with a hydroxyl group and a carbonyl group. This core is linked via an ester bond to a chain of amide groups. The chain includes a piperidine ring, a secondary amine, and a primary amide group. The primary amide is further substituted with a long alkyl chain ending in a piperidine ring.</p>
2f	1c	MC-VC-PAB	<p>The structure is similar to 1a, but the long alkyl chain is replaced by a shorter chain ending in a piperidine ring. The core and amide chain are identical to 1a.</p>
2g	1c	DIBAC-suc-vc-PAB	<p>The structure features a central core similar to 1a, but with a long, flexible chain containing a succinyl group and a DIBAC (diethylaminoethyl) group. The chain ends in a piperidine ring. The amide chain is more complex than in 1a, including a secondary amine and a primary amide.</p>
2j	1e	MC-VC-PAB	<p>The structure is similar to 1c, but the chain between the core and the piperidine ring is longer and includes a secondary amine and a primary amide group. The core and amide chain are identical to 1c.</p>
2k	1d	MC-VC-PAB	<p>The structure is similar to 1c, but the chain between the core and the piperidine ring is longer and includes a secondary amine and a primary amide group. The core and amide chain are identical to 1c.</p>

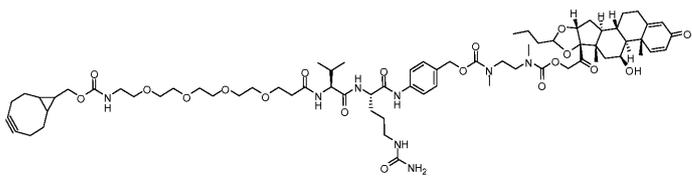
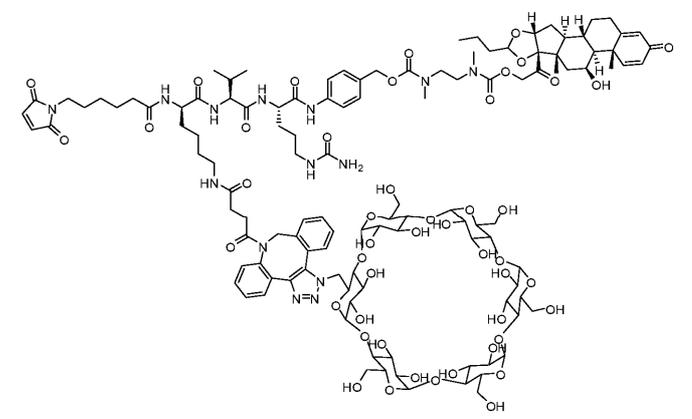
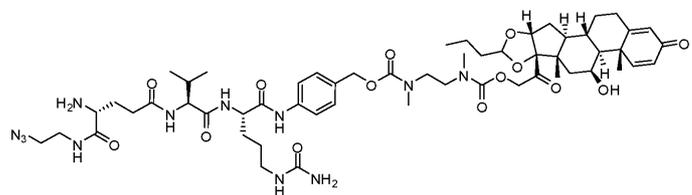
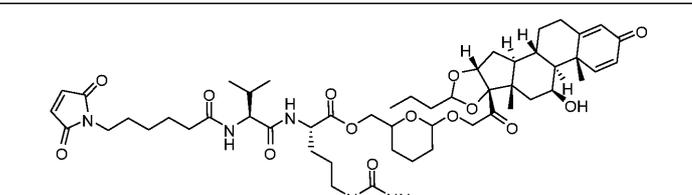
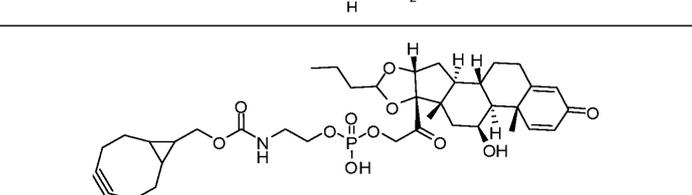
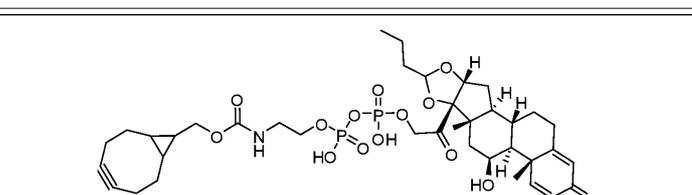
2l	1d	BCN-PEG4-vc-PAB	
2m	1d	mc-N5(CD-DIBAC-suc)Lys-vc-PAB	
2n	1d	азидоэтил-Glu-vc-PAB	
2q	1g	MC-VC	
2r	1k	BCN	
2s	1l	BCN	

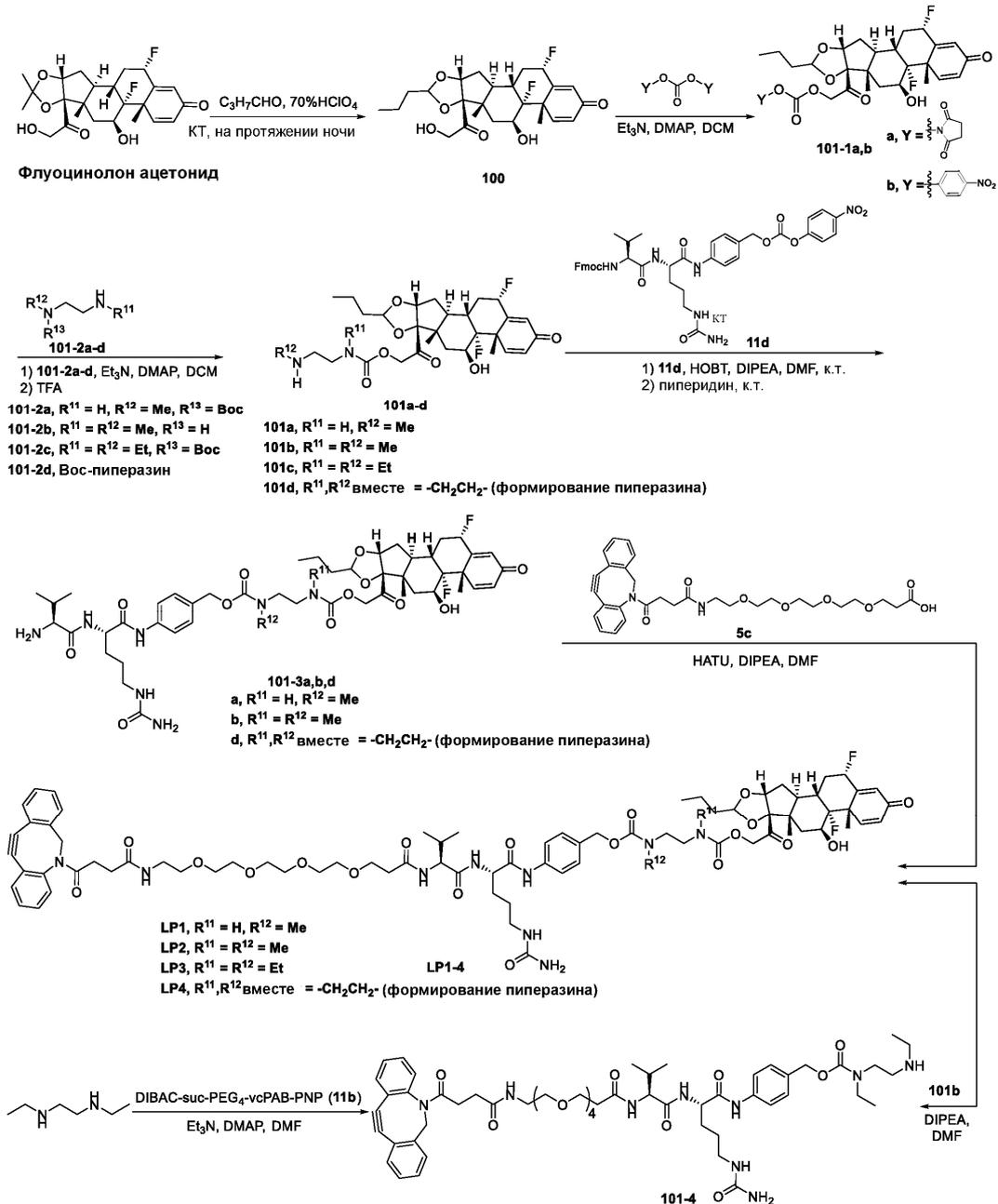
Таблица 6  
Характеризационные данные для линкер-нагрузок

LP (ЛН)	cLogP	MF	МВ	Чистота HPLC (%)	HPLC КТ (мин)	МС (м/з) 100%	Высо-чайший пик м/з
2a	4.18	C <sub>54</sub> H <sub>72</sub> N <sub>6</sub> O <sub>14</sub>	1029.2	92	7.6 (A)	1029 (M+H)	1029 (M+H)
2b	5.42	C <sub>74</sub> H <sub>95</sub> N <sub>7</sub> O <sub>18</sub>	1370.6	97	8.1 (B)	685.8 (M/2+H)	685.8 (M/2+H)
2c	1.03	C <sub>81</sub> H <sub>117</sub> N <sub>11</sub> O <sub>26</sub>	1660.9	97	7.0 (A)	830.8 (M/2+H)	830.8 (M/2+H)
2d	-1.87	C <sub>70</sub> H <sub>102</sub> N <sub>8</sub> O <sub>25</sub>	1455.6	100	6.48 (A)	728 (M/2+H)	1456 (M+H) (10%)
2e	3.45	C <sub>54</sub> H <sub>73</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	1028.2	100	7.54 (A)	1028.3 (M+H)	1028.3 (M+H)
2f	3.54	C <sub>57</sub> H <sub>76</sub> N <sub>6</sub> O <sub>15</sub>	1085.2	98	1.71 (LCMS)	1085.3 (M+H)	1085.3 (M+H)
2g	4.77	C <sub>77</sub> H <sub>99</sub> N <sub>7</sub> O <sub>19</sub>	1426.7	> 99	7.86 (B)	714.0 (M/2+H)	1427 (M+H) (15%)
2j	2.16	C <sub>57</sub> H <sub>77</sub> N <sub>9</sub> O <sub>16</sub>	1144.3	98	1.57 (LCMS)	1144.3 (M+H)	1144.3 (M+H)
2k	3.54	C <sub>59</sub> H <sub>82</sub> N <sub>8</sub> O <sub>15</sub>	1143.3	98	1.70 (LCMS)	1143.4 (M+H)	1143.4 (M+H)
2l	4.66	C <sub>71</sub> H <sub>104</sub> N <sub>8</sub> O <sub>19</sub>	1373.6	100	9.40 (A)	687.5 (M/2+H)	1396.8 (M+Na) (50%)
2m	-4.89	C <sub>120</sub> H <sub>166</sub> N <sub>14</sub> O <sub>47</sub>	2556.7	100	6.49 (A)	1278.8 (M/2+H)	1278.8 (M/2+H)
2n	1.68	C <sub>56</sub> H <sub>82</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub>	1147.3	100	7.72 (B)	1147.5 (M+H)	1147.5 (M+H)
2q	3.52	C <sub>52</sub> H <sub>75</sub> N <sub>5</sub> O <sub>14</sub>	994.2	79	10.36 (B)	995.3 (M+H)	995.3 (M+H)
2r	4.88	C <sub>38</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>11</sub> P	729.8	100	5.26 (B)	686.2 (слаб. мас.)	1459.1 (2M+H)
2s	0.55	C <sub>38</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>14</sub> P <sub>2</sub>	809.8	100	4.03 (B)	766.1 (M-44)	810.1 (M+H) (70%)

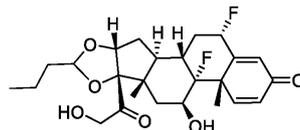
Синтез линкер-нагрузок LP1-4.

## Схема 101

Синтез нагрузки 100, ее спейсер-нагрузки 101a-d и линкер-нагрузок LP1-4

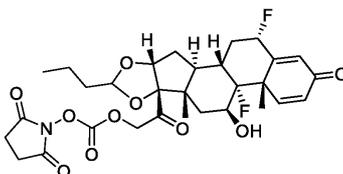


(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-8-(2-гидроксиацетил)-9,13-диметиламин-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-16-он (100)



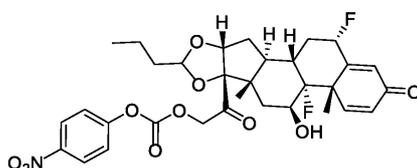
К смеси флуоцинолон ацетонида (10 г, 22 ммоль) и силикагеля (100 г) в гептанах (900 мл) добавили бутиральдегид (3.0 мл, 33 ммоль) ниже 10°C и суспензию перемешивали при 10-20°C на протяжении 30 мин. К смеси добавили перхлорную кислоту (70%, 7.6 мл, 91 ммоль) по каплям при 0°C. Затем реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи. Большая часть флуоцинолон ацетонида была разрушена согласно TLC и LCMS. Реакционную смесь разбавили петролейным эфиром и охладили нас. вод. карбонатом натрия. Суспензию отфильтровали и твердое вещество промыли DCM/метанолом (об/об=1:1). Комбинированный фильтрат сконцентрировали in vacuo. Остаток очистили посредством флэш-хроматографии (0-1.5% метанол в DCM) и получили соединение 100 (8.0 г, выход: 78%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 467.1 (M+H)<sup>+</sup>.

1-[(2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси)карбонил]окси]пирролидин-2,5-дион (101-1a)



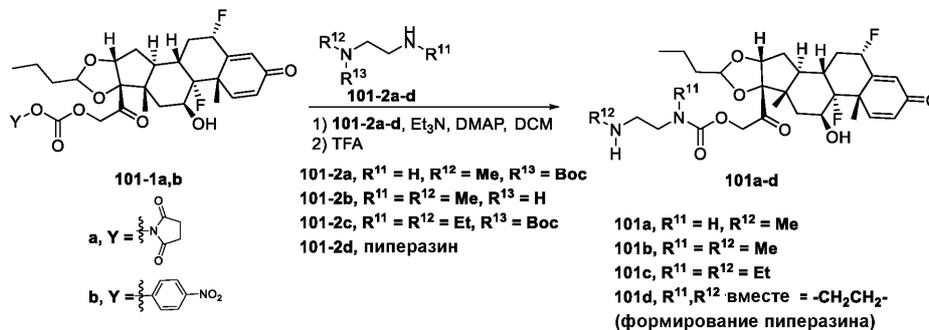
К раствору соединения 100 (0.47 г, 1.0 ммоль) в DCM (20 мл) добавили бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил) карбонат (0.28 г, 1.1 ммоль), триэтиламин (0.40 г, 4.0 ммоль) и DMAP (3.0 мг, кат.). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 4 ч до разрушения соединения 100, что контролировали посредством LCMS. Затем реакционную смесь разбавили DCM и промыли водой. Органический раствор высушили над сульфатом натрия. После фильтрации раствор сконцентрировали *in vacuo* и остаток (сырой продукт 101-1a) использовали для следующего этапа напрямую без очистки. ESI m/z: 608.2 (M+H)<sup>+</sup>.

(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-8-{2-[(4-нитрофеноксикарбонил)окси]ацетил}-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-16-он (101-1b)



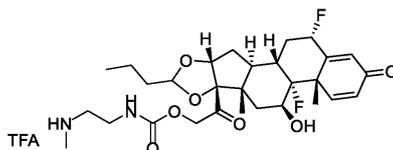
Смесь соединения 100 (0.80 г, 1.7 ммоль), бис(4-нитрофенил) карбоната (1.6 г, 5.2 ммоль) и DIPEA (1.1 г, 8.6 ммоль) в THF (20 мл) перемешивали при КТ на протяжении 4 ч, что контролировали посредством LCMS. Смесь сконцентрировали *in vacuo*. Сырой продукт очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (50% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение 101-1b (0.75 г, 69 % выход) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 632 (M+H)<sup>+</sup>.

Общая процедура для соединения 101.



К раствору соединения 101-1a или 101-1b (сырой продукт, по расчетам представляет собой 1.0 ммоль) в DCM (20 мл) добавили диамин 101-2(a, b, c или d) (1.1 ммоль) и DMAP (0.1 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 4 ч и добавили TFA (1 мл). Смесь перемешивали при КТ на протяжении получаса (для R<sup>13</sup> = Boc, реакционную смесь перемешивали до полного удаления Boc, что контролировали посредством LCMS). Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (50-80% ацетонитрила в вод. TFA (0.5%)) и получили соединение 101(a, b, c или d) в виде бесцветного масла.

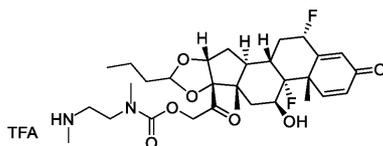
2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-[2-(метиламино)этил]карбамат (101a)



В соответствии с общей процедурой и при использовании соединения 101-1a с Boc-диамином 101-2a получили соединение 101a (0.38 г, 57% за 2 этапа, соль TFA) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 567 (M+H)<sup>+</sup>.

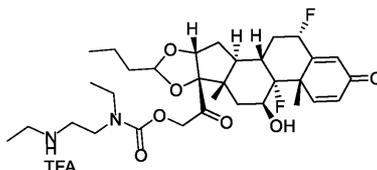
2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-метил-N-[2-

(метиламино)этил]карбамат (101b)



В соответствии с общей процедурой и при использовании соединения 101-1a с диамином 101-2b получили соединение 101b (0.45 г, 66% выход за 2 этапа, соль TFA) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 581 (M+H)<sup>+</sup>.

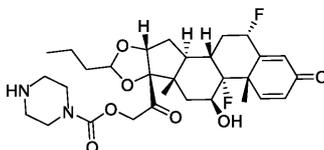
2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-этил-N-[2-(этиламино)этил]карбамат (101c)



В соответствии с общей процедурой и при использовании соединения 101-1b с диамином 101-2c получили соединение 101c (24 мг, 18% выход за 2 этапа, соль TFA) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 609 (M+H)<sup>+</sup>.

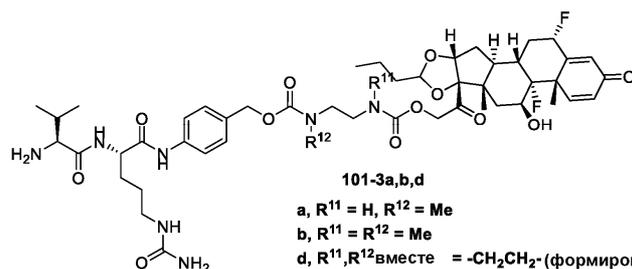
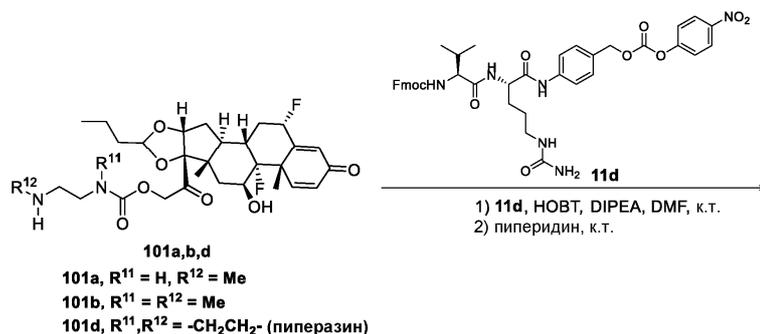
<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.38 (s, 2H), 7.30 (d, J=10.5 Гц, 1H), 6.24 (dd, J=10.5 Гц, 2.0 Гц, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.70-5.54 (m, 2H), 5.10-4.91 (m, 1H), 4.85-4.65 (m, 3H), 4.25-4.16 (m, 1H), 3.60-3.40 (m, 2H), 3.33-3.20 (m, 4H), 3.20-2.90 (m, 4H), 2.67-2.53 (m, 1H), 2.30-2.20 (m, 1H), 2.10-2.00 (m, 2H), 1.80-1.70 (m, 1H), 1.64-1.51 (m, 4H), 1.49 (s, 3H), 1.40-1.30 (m, 2H), 1.20-1.10 (m, 4H), 1.10-1.00 (m, 1H), 0.90-0.80 (m, 6H) ppm.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтилпиперазин-1-карбоксилат (101d)



В соответствии с общей процедурой и при использовании соединения 101-1b с пиперазином (101-2d) без воздействия TFA и при очистке посредством колоночной хроматографии с силикагелем (0-10% метанол в DCM) получили соединение 101d (0.21 г, 49% выход за 2 этапа, свободное основание) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 579 (M+H)<sup>+</sup>.

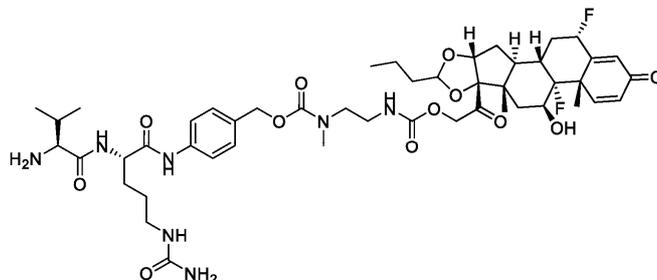
Общая процедура для соединения 101-3



К раствору соединения 101a, b или d (0.20 ммоль) в DMF (3 мл) добавили Fmoc-VC-PAВ-PNP 11d

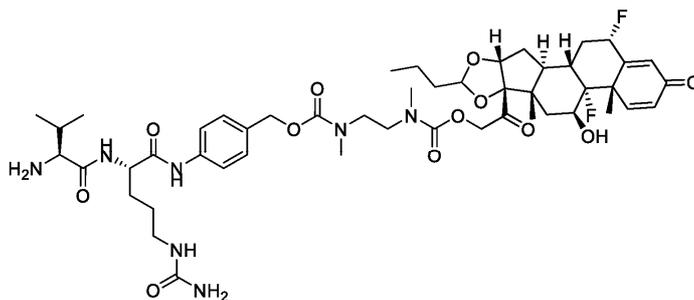
(0.17 г, 0.22 ммоль), НОВТ (41 мг, 0.30 ммоль) и DIPEA (77 мг, 0.60 ммоль). Смесь перемешивали при КТ на протяжении 3 ч, что контролировали посредством LCMS. Затем к смеси добавили пиперидин (0.3 мл). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении часа до полного удаления Fmoc согласно LCMS. Полученную смесь напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (50-80% ацетонитрил в вод.  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (10 мМ)) и получили соединение 101-3а, b или d в виде белого твердого вещества.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-(2-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]-(метил)амино}этил)карба мат (101-3а)



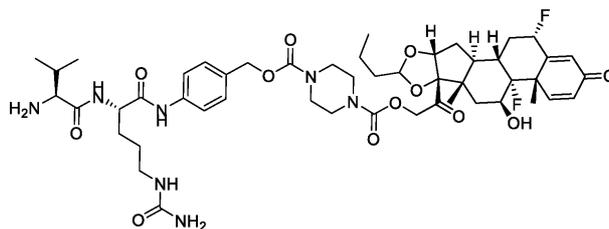
С соблюдением общей процедуры и при использовании соединения 101а получили соединение 101-3а (0.11 г, 57% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 972 (M+H)<sup>+</sup>.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-метил-N-[2-(метиламино)этил]карба мат (101-3b)



С соблюдением общей процедуры и при использовании соединения 101b получили соединение 101-3b (0.13 г, 65% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 986 (M+H)<sup>+</sup>.

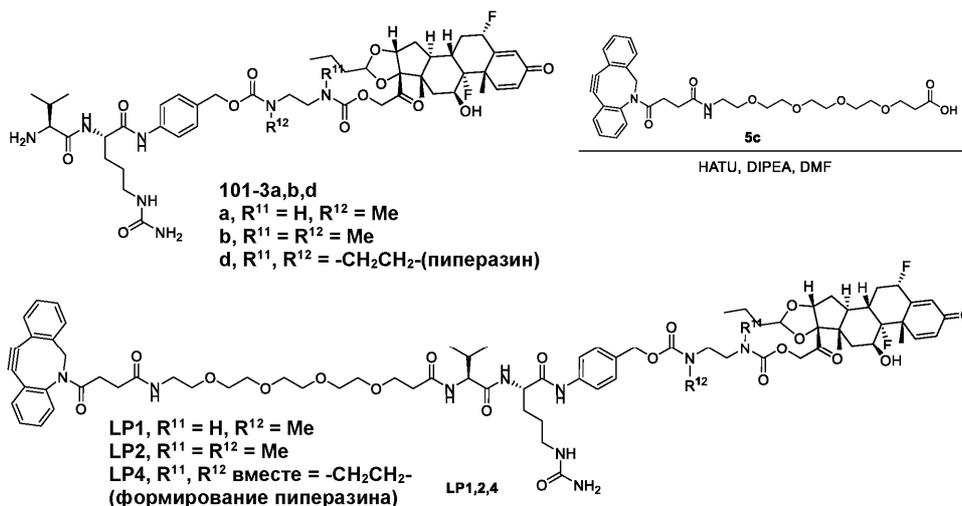
1-{4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил 4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил}пиперазин-1,4-дикарбоксилат (101-3d)



С соблюдением общей процедуры и при использовании соединения 101d (58 мг, 0.10 ммоль) получили соединение 101-3d (52 мг, 53% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 984 (M+H)<sup>+</sup>.

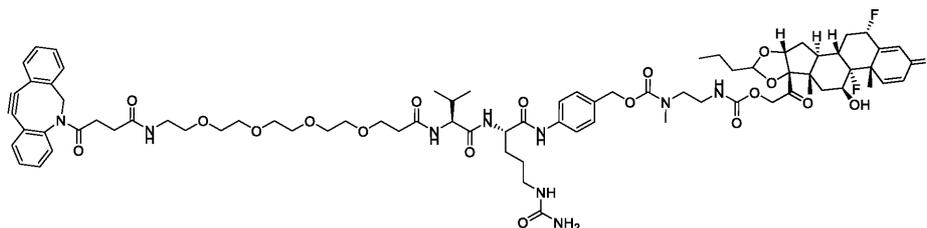
<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.0 (s, 1H), 8.14 (d, J=7.5 Гц, 1H), 7.60 (d, J=8.5 Гц, 2H), 7.31 (d, J=8.5 Гц, 2H), 7.26 (d, J=8.5 Гц, 1H), 6.30 (dd, J=1.5 Гц, 10.5 Гц, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.02-5.88 (m, 1H), 5.70-5.50 (m, 2H), 5.42 (s, 2H), 5.20-4.92 (m, 3H), 4.80-4.62 (m, 3H), 4.50-4.45 (m, 1H), 4.25-4.15 (m, 1H), 3.50-3.35 (m, 8H), 3.05-2.90 (m, 3H), 2.70-2.54 (m, 2H), 2.32-2.20 (m, 1H), 2.10-1.50 (m, 10H), 1.46 (s, 3H), 1.45-1.30 (m, 5H), 0.95 (d, J=7.5 Гц, 1H), 0.90-0.80 (m, 9H), 0.77 (d, J=7.0 Гц, 3H) ppm.

Общая процедура для соединений LP1, LP2 и LP4



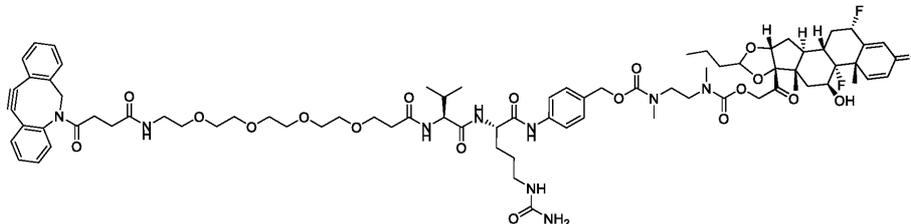
К раствору соединения 5с (34 мг, 60 мкмоль) в DMF (1 мл) добавили HATU (27 мг, 71 мкмоль) и DIPEA (20 мг, 0.15 ммоль). Смесь перемешивали при КТ на протяжении 5 мин и к смеси добавили соединение 101-3а, b или d (50 мкмоль). Смесь перемешивали при КТ на протяжении 2 ч, что контролировали посредством LCMS. Полученную смесь напрямую очистили при prep-HPLC (способ B) и получили соединение LP1, 2 или 4в виде белого твердого вещества.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-(2-[[{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил]-4-оксобутанамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил} метокси)карбонил](метил)амино}этил)карбамат (LP1)



С соблюдением общей процедуры и при использовании соединения 101-3а получили линкер-нагрузку LP1 (20 мг, 26% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 754 (M/2+H)<sup>+</sup>.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-(2-[[{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил]-4-оксобутанамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил} метокси)карбонил](метил)амино}этил)-N-метилкарбамат (LP2)



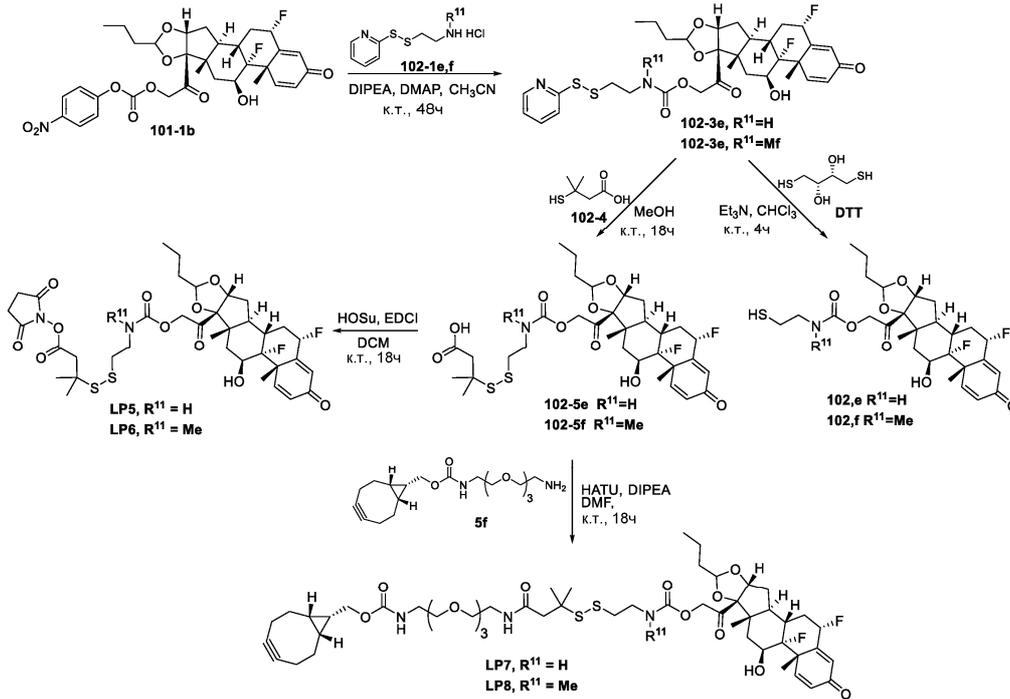
С соблюдением общей процедуры и при использовании соединения 101-3b получили линкер-нагрузку LP2 (20 мг, 26% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 761 (M/2+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.98 (s, 1H), 8.12 (d, J=7.4 Гц, 1H), 7.87 (d, J=8.6 Гц, 1H), 7.76 (t, J=5.4 Гц, 1H), 7.69-7.66 (m, 1H), 7.64-7.57 (m, 3H), 7.51-7.44 (m, 3H), 7.40-7.33 (m, 2H), 7.32-7.25 (m, 4H), 6.33-6.27 (m, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.98 (t, J=5.5 Гц, 1H), 5.70-5.55 (m, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.08-4.91 (m, 4H), 4.79-4.66 (m, 2H), 4.41-4.35 (m, 1H), 4.25-4.17 (m, 2H), 3.64-3.56 (m, 3H), 3.49-3.41 (m, 15H), 3.30-3.27 (m, 2H), 3.13-3.00 (m, 3H), 2.98-2.75 (m, 8H), 2.65-2.54 (m, 2H), 2.48-2.43 (m, 1H), 2.41-2.34 (m, 1H), 2.28-2.19 (m, 2H), 2.07-1.94 (m, 4H), 1.81-1.67 (m, 3H), 1.63-1.53 (m, 5H), 1.48 (s, 3H), 1.45-1.31 (m, 5H), 0.88-0.82 (m, 13H) ppm.

1-{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил]-4-оксобутанамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-



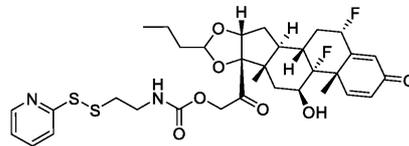
## Синтез пролекарств цистеина: линкер-нагрузки LP5, 6, 7 и LP8



2-(пиридин-2-илдисульфанил)этанамин гидрохлорид (102-1e) имелся в продаже с CAS 83578-21-6. трет-бутил (2-меркаптоэтил)(метил)карбамат (102-1f) синтезировали в соответствии с Eur. J. Med. Chem., 2015, 95, 483-491.

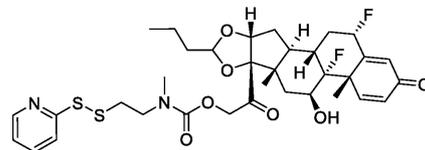
Эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметил N-(2-{2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этокси}этил)карбамат (5f) синтезировали в соответствии с WO2016168769.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-[2-(пиридин-2-илдисульфанил)этил]карбамат (102-3e)



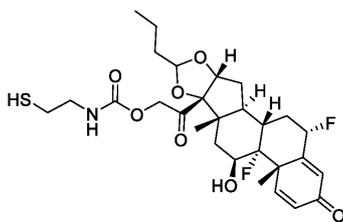
К раствору соединения 101-1b (0.54 г, 0.86 ммоль) в ацетонитриле (10 мл) добавили DIPEA (0.22 г, 1.7 ммоль), 102-1e (0.19 г, 0.86 ммоль) и DMAP (10 мг, 86 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 48 ч до полного разрушения 101-1b согласно LCMS. Затем смесь отфильтровали и фильтрат сконцентрировали in vacuo. Остаточное масло очистили при колоночной хроматографии с силикагелем (20-50% этилацетат в гексане) и получили соединение 102-3e (0.47 г, 80% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 679.2 (M+H)<sup>+</sup>.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-метил-N-[2-(пиридин-2-илдисульфанил)этил]карбамат (102-3f)



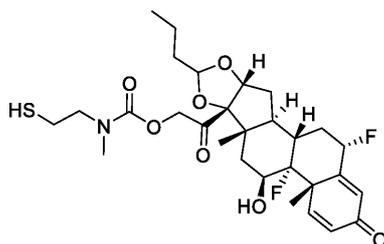
С соблюдением процедуры для 102-3e, за исключением замены 102-1f вместо 102-1e, получили соединение 102-3f (0.45 г, 75% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 693.2 (M+H)<sup>+</sup>.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-(2-сульфанилэтил)карбамат (102e)



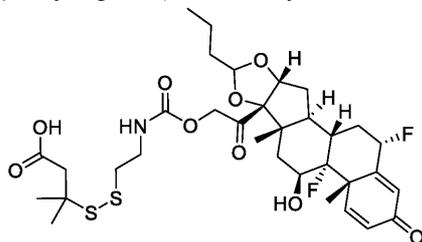
К раствору соединения 102-3e (1.4 г, 2.1 ммоль) в хлороформе (30 мл) добавили триэтиламин (0.82 мл, 5.9 ммоль) и 1,4-дитиотреитол (реактив Келланда, DTT) (1.2 г, 7.8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в атмосфере азота на протяжении 4 ч, что контролировали посредством LCMS. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили при колоночной хроматографии с силикагелем (50-70% этилацетат в гексане) и получили соединение 102e (0.95 г, 83% выход) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 570.2 (M+H)<sup>+</sup>.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил N-метил-N-(2-сульфанилэтил)карбамат (102f)



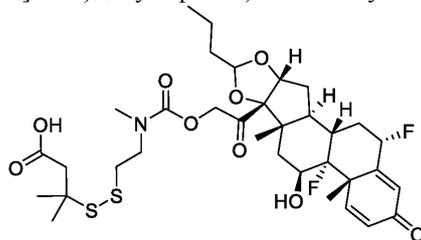
С соблюдением процедуры для 102e, за исключением замены 102-3f вместо 102-3e, получили соединение 102f (0.97 г, 83% выход) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 584.3 (M+H)<sup>+</sup>.

3-({2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси} карбонил)амино}этил} дисульфанил)-3-метилбутановая кислота (102-5e)



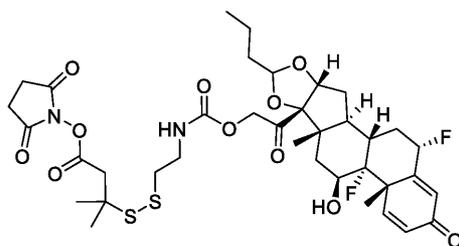
К раствору соединения 102-3e (0.68 г, 1.0 ммоль) в метаноле (5 мл) добавили соединение 102-4 (0.13 г, 1.0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 18 ч, что контролировали посредством LCMS. Полученную смесь напрямую очистили при *prep*-HPLC (способ B) и получили соединение 102-5e (0.39 г, 55% выход) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 702.2 (M+H)<sup>+</sup>.

3-({2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси} карбонил)(метил)амино}этил} дисульфанил)-3-метилбутановая кислота (102-5f)



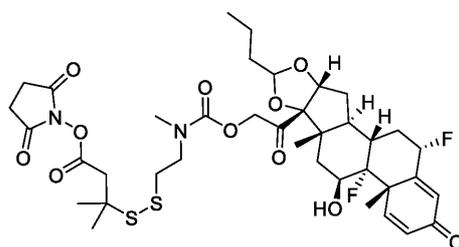
С соблюдением процедуры для 102-5e, за исключением замены 102-3f вместо 102-3e, получили соединение 102-5f (0.29 г, 40% выход) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 716.3 (M+H)<sup>+</sup>.

2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-({2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси} карбонил)амино}этил} дисульфанил)-3-метилбутаноат (LP5)



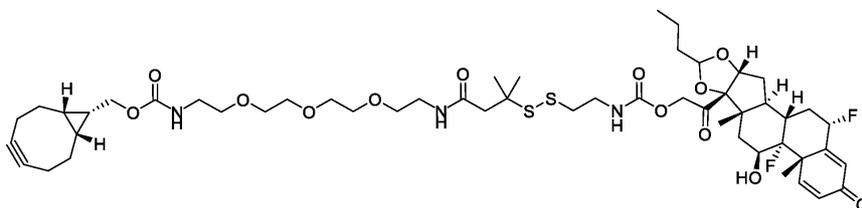
К раствору соединения 102-5e (0.20 г, 0.29 ммоль) в DCM (10 мл) добавили HOSu (73 мг, 0.64 ммоль) и EDCI (0.12 г, 0.64 ммоль) и смесь перемешивали при КТ на протяжении 24 ч, что контролировали посредством LCMS. Полученную смесь разбавили DCM (50 мл) и органический раствор промыли водой и рассолом, высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили при *prep*-HPLC (способ А) и получили LP5 (85 мг, 37% выход) в виде бесцветного масла. ESI  $m/z$ : 799.3 (M+H)<sup>+</sup>.

2,5-диоксопирролидин-1-ил-3-({2-[(2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси} карбонил)(метил)амино]этил} дисульфанил)-3-метилбутаноат (LP6)



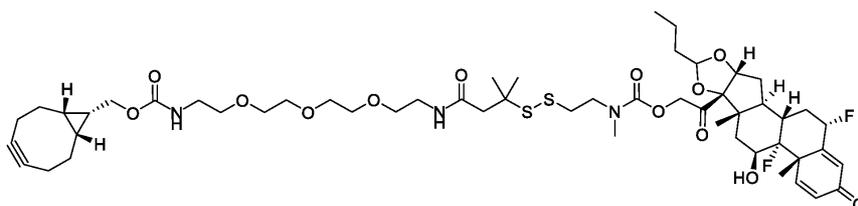
С соблюдением процедуры для LP5, за исключением замены 102-5f вместо 102-5e, получили соединение LP6 (86 мг, 36% выход) в виде бесцветного масла. ESI  $m/z$ : 813.3 (M+H)<sup>+</sup>.

эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметил N-{2-[2-(2-{2-[3-({2-[(2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси} карбонил)амино]этил} дисульфанил)-3-метилбутанамидо]этокси}этокси]этокси]этил} карбамат (LP7)



К раствору соединения 102-5e (0.20 г, 0.29 ммоль) в DMF (10 мл) добавили HATU (0.11 г, 0.29 ммоль) и DIPEA (75 мг, 0.58 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 10 мин и затем добавили соединение 5f (0.11 г, 0.29 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 18 ч, что контролировали посредством LCMS. Полученную смесь напрямую очистили при *prep*-HPLC (способ В) и получили соединение LP7 (0.16 г, 55% выход) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 526.7 (M/2+H)<sup>+</sup>.

Этоксиэндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметил N-{2-[2-(2-{2-[3-({2-[(2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси} карбонил)(метил)амино]этил} дисульфанил)-3-метилбутанамидо]этокси}этокси]этокси]этил} карбамат (LP8)

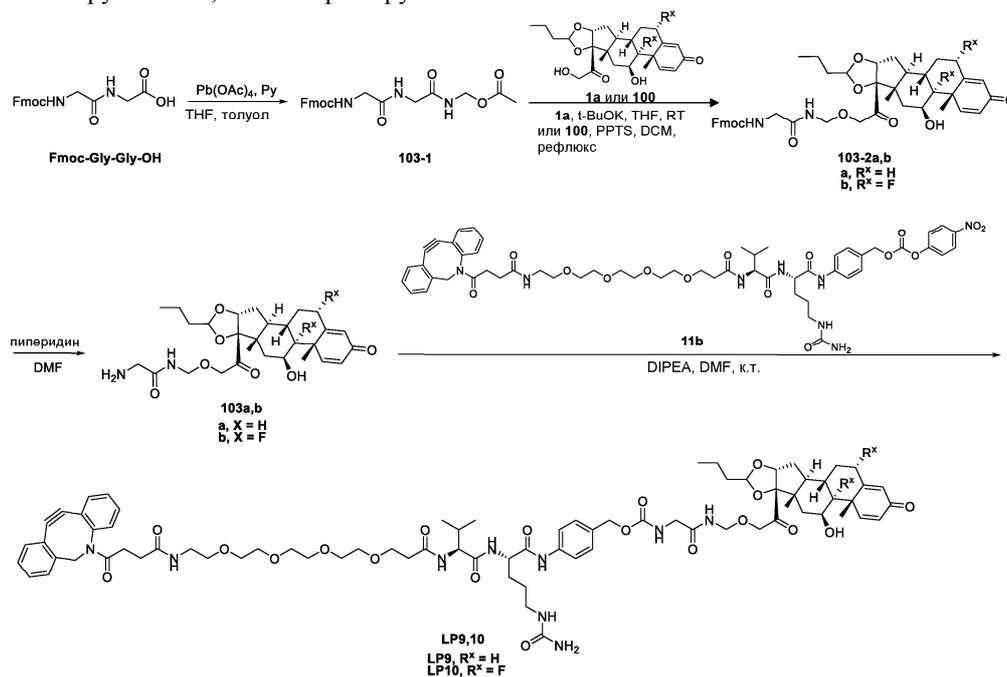


С соблюдением процедуры для LP7, исключением замены 102-5f вместо 102-5e, получили соединение LP8 (0.13 г, 41% выход) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 533.8 (M/2+H)<sup>+</sup>.

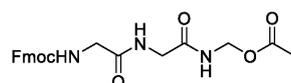
Синтез АМО линкер-нагрузок LP9-11.

### Схема 103А

Синтез нагрузок 103a,b и линкер-нагрузок LP9-10

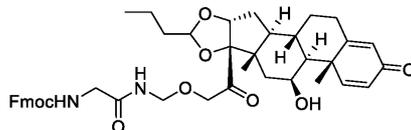


(2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбониламино)ацетидамидо)метил ацетат (103-1)



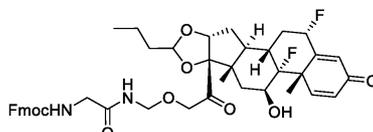
К смеси Fmoc-Gly-Gly-OH (4.3 г, 12 ммоль) в THF (0.12 л) и толуола (40 мл) добавили пиридин (1.2 мл, 15 ммоль) и тетраацетат свинца (6.8 г, 15 ммоль). Реакционную смесь нагревали в колбе с обратным холодильником на протяжении 5 часов, что контролировали посредством LCMS. После охлаждения до КТ реакционную смесь отфильтровали через целит для удаления нерастворимого материала и фильтрат сконцентрировали *in vacuo*. Остаток растворили в этилацетате и раствор промыли водой и рассолом. Органический раствор высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (10% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение 103-1 (3.0 г, 67% выход) в виде бесцветного твердого вещества. ESI *m/z*: 391 (M+Na)<sup>+</sup>.

9H-флуорен-9-илметил N-{{{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил}карбамоил]метил}карбамат (103-2a)



К раствору соединения 103-1 (0.37 г, 1.0 ммоль) и будесонида 1a (1.3 г, 3.0 ммоль) в THF (4 мл) добавили калия трет-бутоксид (0.22 г, 2.0 ммоль) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 15 мин, что контролировали посредством TLC. К реакционному раствору добавили этилацетат и воду при 0°C и экстрагировали его с использованием этилацетата и хлороформа. Комбинированный органический раствор высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (30-35% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение 103-2a (0.19 г, 40% выход) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 739 (M+H)<sup>+</sup>.

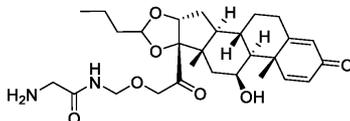
9H-флуорен-9-илметил N-{{{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил}карбамоил]метил}карбамат (103-2b)



В запаянный сосуд добавили раствор соединения 103-1 (0.30 г, 0.81 ммоль) и соединения 100 (0.38

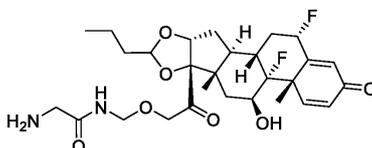
г, 0.81 ммоль) в DCM (4 мл) и пиридиния р-толуолсульфонат (21 мг, 81 мкмоль) при КТ. Реакционный сосуд запаяли и встряхивали при 50°C в течение 24 ч, что контролировали посредством LCMS. После охлаждения реакционную смесь сконцентрировали in vacuo и остаток очистили посредством prep-HPLC (способ А) и получили соединение 103-2b (0.23 г, 37% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 775(M+H)<sup>+</sup>.

2-амино-N-({2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил)ацетамид (103a)

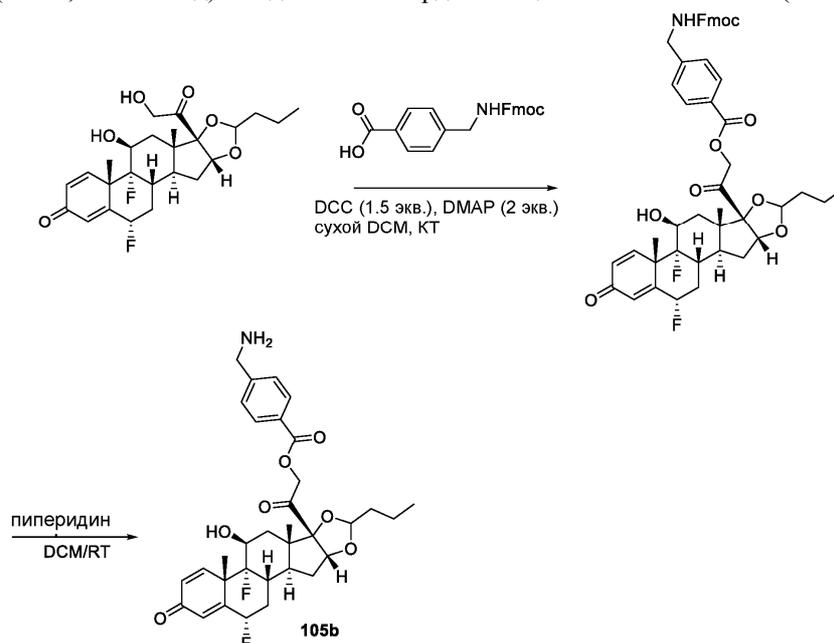


К раствору соединения 103-2a (0.10 г, 0.14 ммоль) в DMF (2 мл) добавили пиперидин (35 мг, 0.41 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 2 ч до полного удаления Fmoc, что контролировали посредством LCMS. Полученную смесь напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0.05%)) и получили соединение 103a (50 мг, 70% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 517.6 (M+H)<sup>+</sup>.

2-амино-N-({2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил)ацетамид (103b)

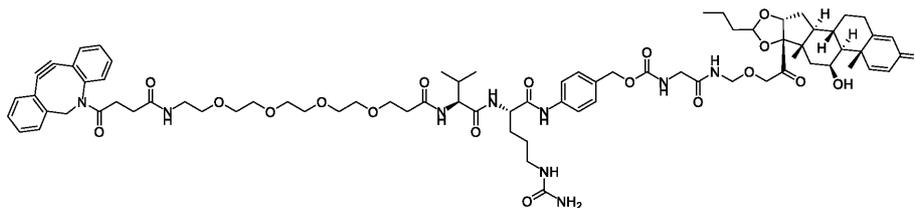


С соблюдением процедуры для 103a, за исключением замены 103-2b вместо 103-2a, получили соединение 103b (0.26 г, 65% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 553.2 (M/2+H)<sup>+</sup>.



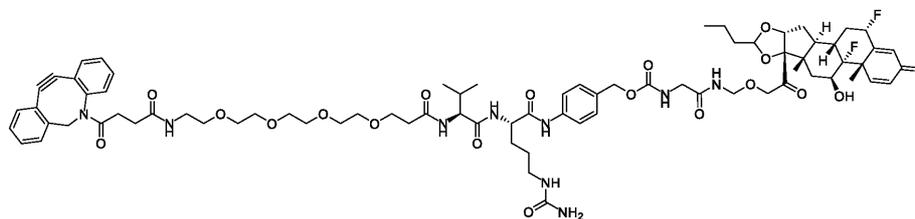
Соединение 105(b) приготовили в соответствии с вышеуказанной процедурой.

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил]-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-{{[(2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил)карбамоил]метил}карбамат (LP9)



К раствору соединения 103а (15 мг, 29 мкмоль) в DMF (1.0 мл) добавили соединение 11b (30 мг, 28 мкмоль), НОВТ (2.0 мг, 15 мкмоль) и DIPEA (7.7 мг, 60 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 2 ч, что контролировали посредством LCMS. Реакционную смесь очистили напрямую при ргер-НPLC (способ В) и получили линкер-нагрузку LP9 (5.0 мг, 11% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 729 (M/2+H)<sup>+</sup>.

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-{{(2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокс)этил}карбамоил}метил}карбамат (LP10)

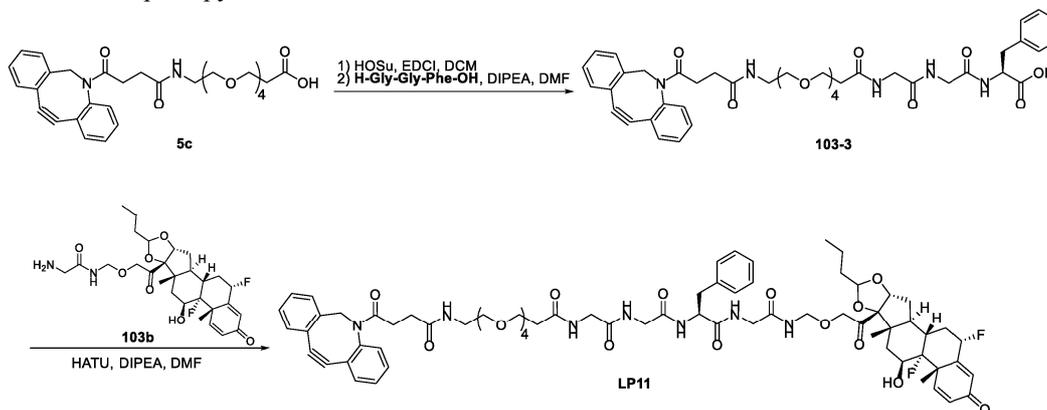


С соблюдением процедуры для LP9, за исключением замены 103b вместо 103а, получили линкер-нагрузку LP10 (23 мг, 58% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 747.0 (M/2+H)<sup>+</sup>; 513.8 (расщеплено на фрагменты посредством LCMS, расщеплено на части при NHCH<sub>2</sub>-O).

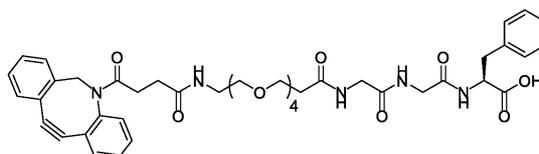
<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.02 (s, 1H), 8.80-8.72 (m, 1H), 8.15 (d, J=6.8 Гц, 1H), 7.89 (d, J=8.8 Гц, 1H), 7.80-7.75 (m, 1H), 7.68 (d, J=7.6 Гц, 1H), 7.64-7.58 (m, 3H), 7.54-7.22 (m, 9H), 6.29 (d, J=10.0 Гц, 1H), 6.10 (s, 1H), 6.04-5.96 (m, 1H), 5.78-4.10 (m, 15H), 3.66-3.54 (m, 5H), 3.54-3.42 (m, 13H), 3.32-3.26 (m, 2H), 3.20-2.50 (m, 7H), 2.42-2.20 (m, 4H), 2.05-1.90 (m, 4H), 1.85-1.25 (m, 15H), 0.90-0.80 (m, 13H) ppm.

### Схема 103B

Синтез линкер-нагрузки LP11



(2S)-2-(2-{2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]ацетамидо}ацетамидо)-3-фенилпропановая кислота (103-3)

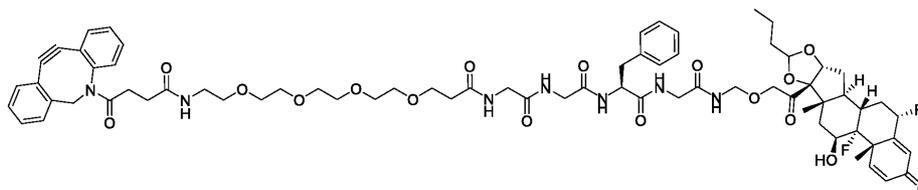


К раствору соединения 5с (0.16 г, 0.29 ммоль) в DCM (20 мл) добавили HOSu (73 мг, 0.64 ммоль) и EDCI (0.12 г, 0.64 ммоль). Смесь перемешивали при КТ на протяжении 24 ч до полного разрушения соединения 5с согласно LCMS. Полученную смесь разбавили DCM (50 мл) и органический раствор промыли водой (50 мл) и рассолом (50 мл), высушили безводным сульфатом натрия и сконцентрировали in vac-

ио и получили OSu активный эфир (0.16 г, 84% выход) в виде бесцветного масла, который использовали напрямую для следующего этапа.

К раствору H-Gly-Gly-Phe-OH (10 мг, 36 мкмоль) в DMF (0.5 мл) добавили OSu активный эфир (23 мг, 36 мкмоль), полученный так, как было описано выше, и DIPEA (9.0 мг, 72 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи. Смесь напрямую очистили при rper-HPLC (способ B) и получили соединение 103-3 (15 мг, 51% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 408.2 (M/2+H)<sup>+</sup>.

1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-N-{{{[(1S)-1-({[2-[(19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил)карбамоил]метил}карбамоил]-2-фенилэтил]карбамоил}метил}карбамоил]метил}-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (LP11)

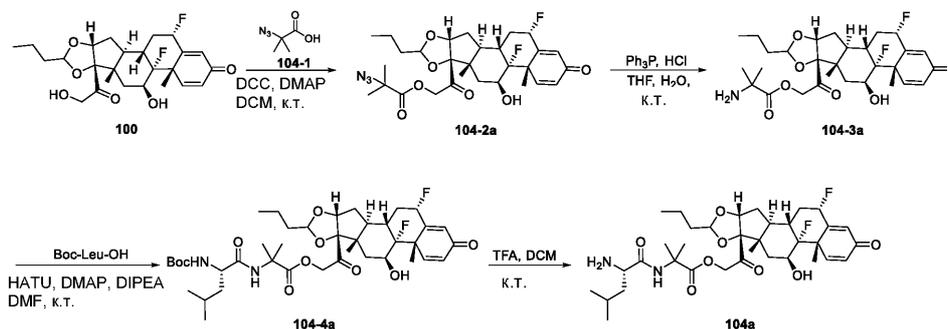


К раствору соединения 103-3 (15 мг, 18 мкмоль) в DMF (0.5 мл) добавили HATU (14 мг, 36 мкмоль) и DIPEA (9.3 мг, 72 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 10 мин и затем к смеси добавили соединение 103b (10 мг, 18 мкмоль). Затем реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи. Полученную смесь очистили напрямую при rper-HPLC (способ B) и получили линкер-нагрузку LP11 (5.0 мг, 20% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 420.2 (M/3+H)<sup>+</sup>.

Синтез дипептидного пролекарства: линкер-нагрузка LP12

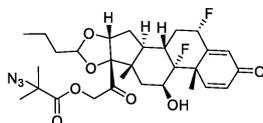
#### Схема 104A

Синтез нагрузки 104a



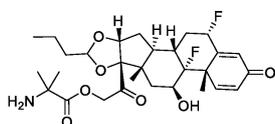
Альфа-азидоизомасляную кислоту 104-1 синтезировали согласно Org. Lett, 2001, 3(5), 781-783.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-азидо-2-метилпропаноат (104-2a)



К раствору соединения 100 (0.10 г, 0.21 ммоль) в DCM (30 мл) добавили соединение 104-1 (52 мг, 0.40 ммоль), DCC (90 мг, 0.44 ммоль) и DMAP (10 мг) и смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи, что контролировали посредством LCMS. Полученную смесь сконцентрировали in vacuo и остаток очистили при rper-HPLC (способ A) и получили соединение 104-2a (80 мг, 70% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 578.3 (M+H)<sup>+</sup>.

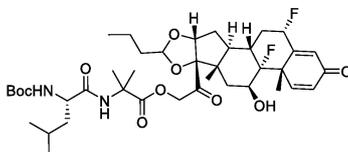
2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-азидо-2-амино-2-метилпропаноат (104-3a)



К раствору соединения 104-2a (75 мг, 0.15 ммоль) в THF (5 мл) добавили PPh<sub>3</sub> (0.15 г, 0.57 ммоль), воду (5 мл) и конц. HCl (1 капля) и реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи.

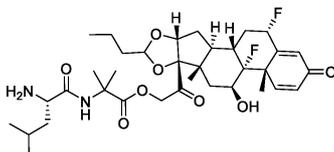
Смесь сконцентрировали *in vacuo* и разбавили DMF. Осадок удалили фильтрацией. Фильтрат очистили при *prep*-HPLC (способ А) и получили соединение 104-3а (45 мг, 54% выход) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 552.3 (M+H)<sup>+</sup>.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил 2-[(2S)-2-[(трет-бутоксикарбонил)амино]-4-метилпентанамидо]-2-метилпропаноат (104-4а)



К смеси Вос-Leu-OH (20 мг, 87 мкмоль) и HATU (50 мг, 0.13 ммоль) в DMF (3 мл) добавили DIPEA (30 мг, 0.23 ммоль), DMAP (2 мг) и соединение 104-3а (30 мг, 54 мкмоль). Смесь перемешивали при КТ на протяжении часа, что контролировали посредством LCMS. Смесь напрямую очистили при *prep*-HPLC (способ А) и получили соединение 104-4а (25 мг, 55% выход) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 787.4 (M+Na)<sup>+</sup>.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил 2-[(2S)-2-амино-4-метилпентанамидо]-2-метилпропаноат (104а)

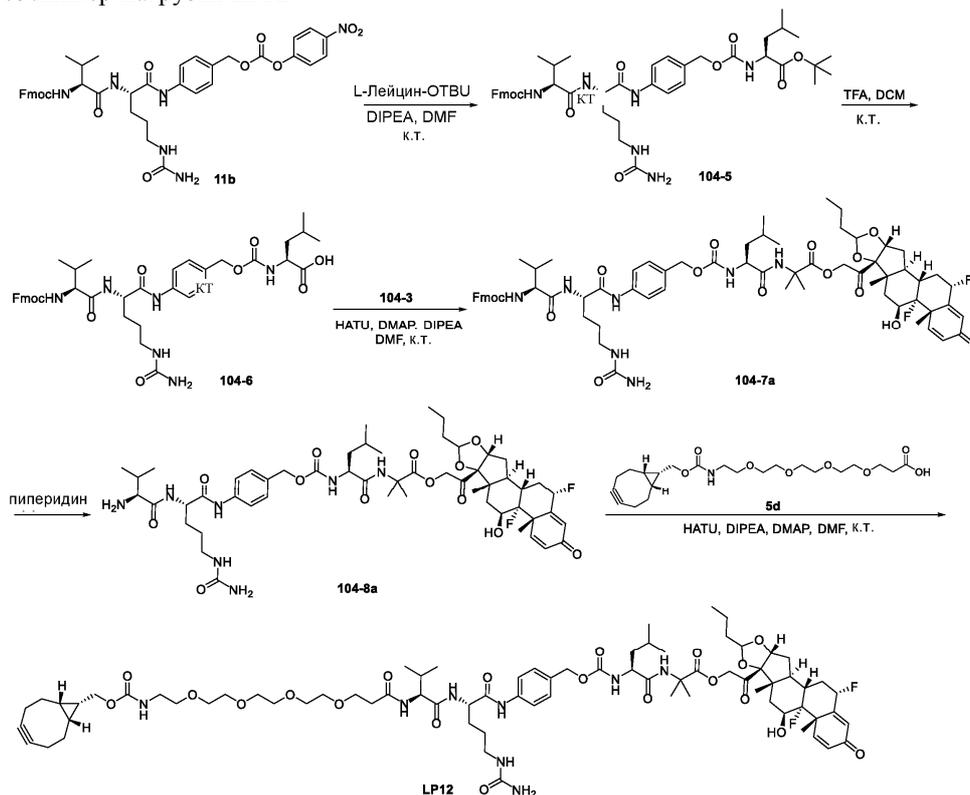


К смеси соединения 104-4а (25 мг, 33 мкмоль) в DCM (1.5 мл) добавили TFA (0.15 мл), и смесь перемешивали при КТ в течение часа до полного удаления Вос согласно LCMS. Реакционную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили при *prep*-HPLC (способ А) и получили соединение 104а (13 мг, 61% выход) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 665.4 (M+H)<sup>+</sup>.

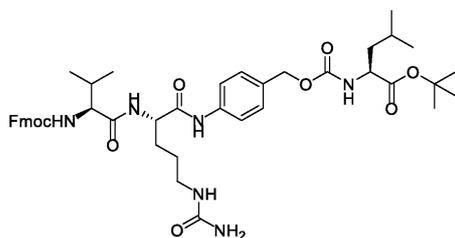
<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.39 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.27 (d, J=10.0 Гц, 1H), 6.31 (d, J=10.1 Гц, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.63 (t, J=24.2 Гц, 2H), 5.30-5.05 (m, 1H), 4.96 (d, J=17.7 Гц, 1H), 4.81-4.65 (m, 2H), 4.20 (s, 1H), 2.69-2.54 (m, 1H), 2.36-2.15 (m, 1H), 2.12-1.94 (m, 2H), 1.85-1.63 (m, 2H), 1.63-1.53 (m, 3H), 1.52-1.41 (m, 11H), 1.41-1.10 (m, 6H), 0.97-0.76 (m, 12H) ppm.

#### Схема 104В

##### Синтез линкер-нагрузки LP12

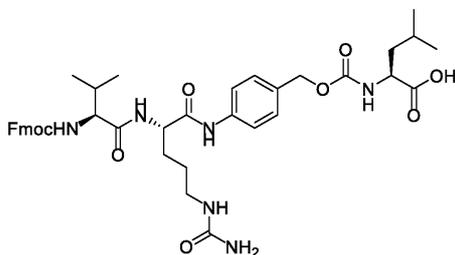


трет-бутил (2S)-2-{{{4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-{{(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}-4-метилпропаноат (104-5)



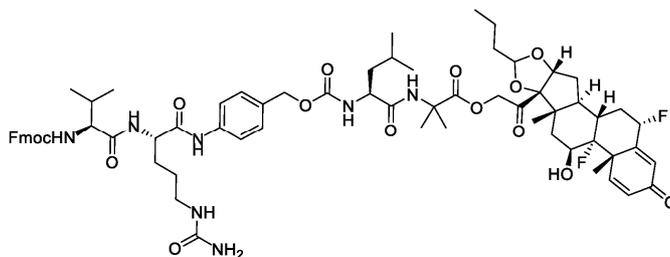
К раствору соединения 11b (0.30 г, 0.39 ммоль) и H-Leu-OTBU-OH (0.14 г, 0.63 ммоль) в DMF (3 мл) добавили DIPEA (0.26 г, 2.0 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 2 ч. Полученную смесь напрямую очистили при rper-HPLC (способ А) и получили соединение 104-5 (0.11 г, 35% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 815.4 (M+H)<sup>+</sup>.

(2S)-2-{{{4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-{{(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}-4-метилпентановая кислота (104-6)



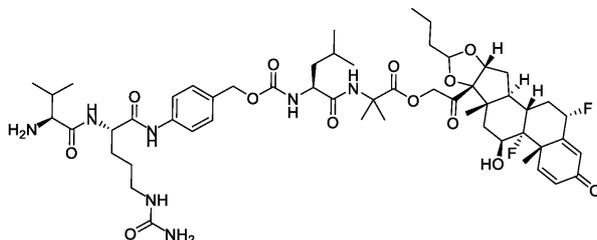
К раствору соединения 104-5 (25 мг, 31 мкмоль) в DCM (4 мл) добавили TFA (0.8 мл) и смесь перемешивали при КТ на протяжении 2 ч. Полученную смесь сконцентрировали in vacuo и остаток очистили при rper-HPLC (способ А) и получили соединение 104-6 (15 мг, 67% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 759.3 (M+H)<sup>+</sup>.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил 2-[(2S)-2-{{{4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-{{(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}-4-метилпентанамидо]-2-метилпропаноат (104-7a)



К раствору соединения 104-5 (20 мг, 26 мкмоль) и соединения 104-3 (17 мг, 32 мкмоль) в DMF (2 мл) добавили HATU (20 мг, 52 мкмоль), DIPEA (13 мг, 0.10 ммоль) и DMAP (1 мг) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение часа, что контролировали посредством LCMS. Полученную смесь напрямую очистили при rper-HPLC (способ А) и получили соединение 104-7a (30 мг, 89% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 1293 (M+H)<sup>+</sup>.

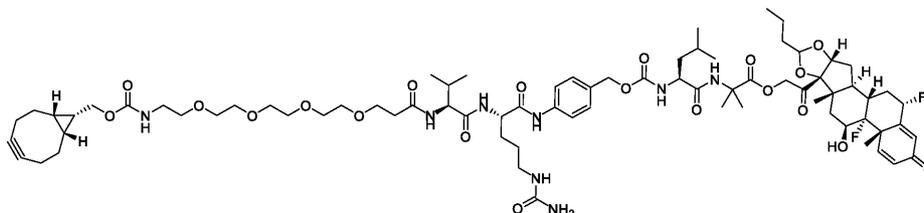
2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил 2-[(2S)-2-{{{4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}-4-метилпентанамидо]-2-метилпропаноат (104-8a)



К раствору соединения 104-7a (25 мг, 19 мкмоль) в DMF (2 мл) добавили пиперидин (0.2 мл) и

смесь перемешивали при КТ в течение получаса до полного удаления Fmoc согласно LCMS. Полученную смесь напрямую очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-50% ацетонитрил в вод. TFA (0.03%)) и получили соединение 104-8а (20 мг, 95% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 1070.5 (M+H)<sup>+</sup>.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил 2-[(2S)-2-[[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-({эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси]карбонил}амино)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил]метокси]карбонил]амино]-4-метилпентанамидо]-2-метилпропаноат (LP12)

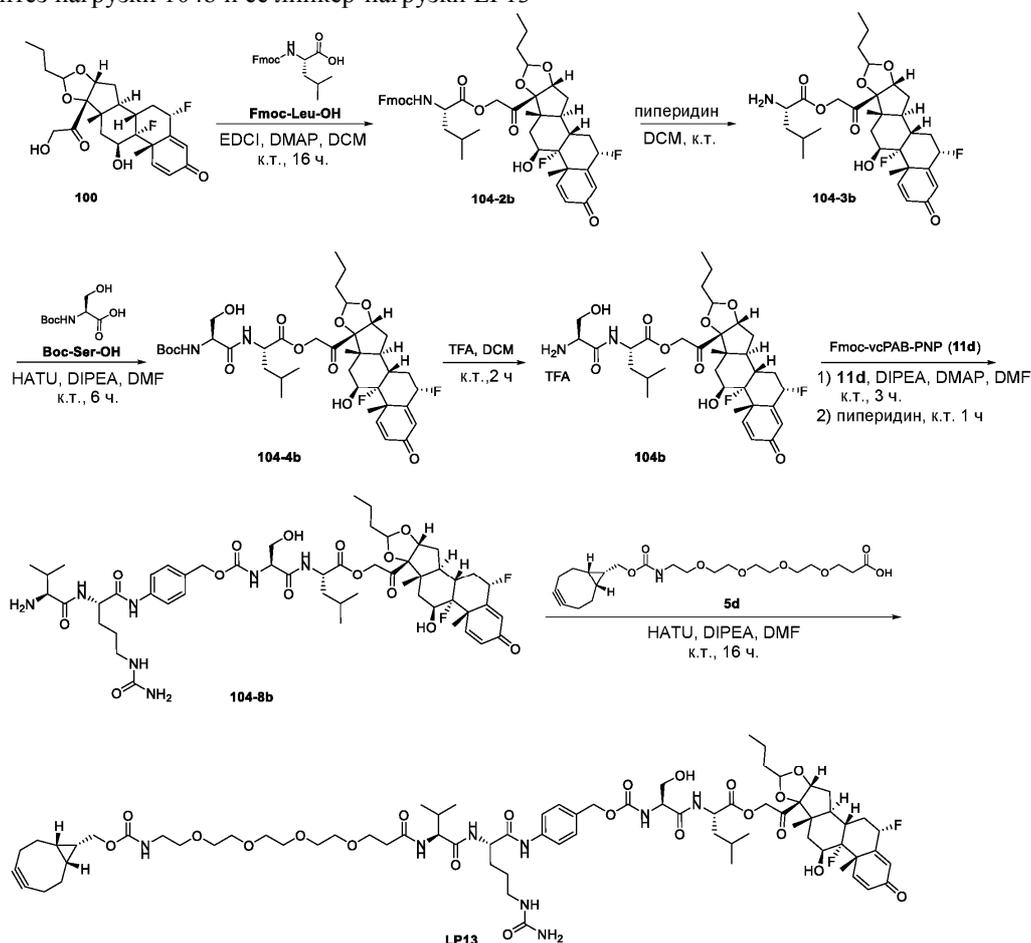


К раствору соединения 104-8а (20 мг, 26 мкмоль) и соединения 5d (14 мг, 32 мкмоль) в DMF (2 мл) добавили HATU (22 мг, 58 мкмоль), DIPEA (15 мг, 0.12 ммоль) и DMAP (1 мг) и реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 2 ч, что контролировали посредством LCMS. Полученную смесь очистили напрямую при ргер-НPLC (способ А) и получили линкер-нагрузку LP12 (10 мг, 21% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 747.6 (M/2+H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.97 (s, 1H), 8.35-8.25 (m, 1H), 8.11 (d, J=7.4 Гц, 1H), 7.87 (d, J=8.6 Гц, 1H), 7.58 (d, J=8.2 Гц, 2H), 7.34-7.18 (m, 4H), 7.17-7.04 (m, 1H), 6.30 (d, J=10.1 Гц, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.03-5.90 (s, 1H), 5.72-5.50 (m, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.34-3.91 (m, 12H), 3.66-3.38 (m, 15H), 3.15-2.88 (m, 4H), 2.73-2.53 (m, 1H), 2.50-2.45 (m, 1H), 2.41-2.31 (m, 1H), 2.30-1.90 (m, 9H), 1.83-1.62 (m, 2H), 1.63-1.17 (m, 27H), 0.92-0.77 (m, 20H) ppm.

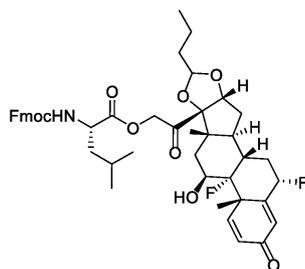
### Схема 104С

Синтез нагрузки 104b и ее линкер-нагрузки LP13



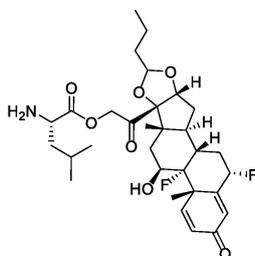
2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-

пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил (2S)-2-[[{(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}-4-метилпентаноат (104-2b)



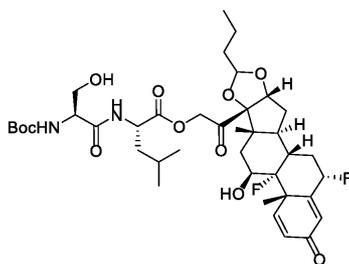
К раствору соединения 100 (0.47 г, 1.0 ммоль) и Fmoc-Leu-OH (0.39 г, 1.1 ммоль) в DCM (10 мл) добавили EDCI (0.23 г, 1.2 ммоль) и DMAP (12 мг, 0.10 ммоль). Смесь перемешивали при КТ в течение 16 ч, что контролировали посредством LCMS. Полученную смесь разбавили водой (50 мл) и экстрагировали при помощи DCM (50 мл×2). Комбинированный органический раствор высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (10-50% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение 104-2b (0.52 г, 65% выход) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 802.4 (M+H)<sup>+</sup>.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил (2S)-2-амино-4-метилпентаноат (104-3b)



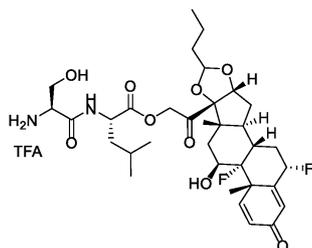
К раствору соединения 104-2b (0.50 г, 0.62 ммоль) в DCM (9 мл) добавили пиперидин (1 мл) и реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 30 мин до полного удаления Fmoc согласно LCMS. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии с силикагелем (5-10% метанол в DCM) и получили соединение 104-3b (0.32 г, 90% выход) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 580.3 (M+H)<sup>+</sup>.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифторо-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил (2S)-2-[(2S)-2-[[{(трет-бутокси)карбонил]амино}-3-гидроксипропанамидо]-4-метилпентаноат (104-4b)



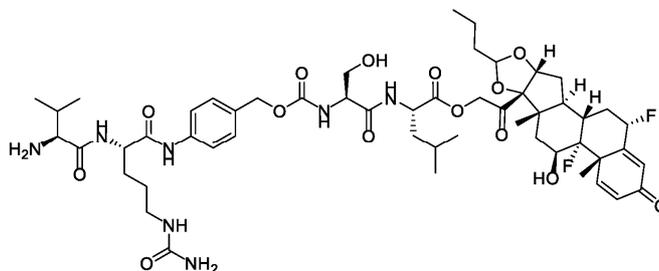
К смеси соединения 104-3b (0.32 г, 0.55 ммоль) и Boc-Ser-OH (0.14 г, 0.66 ммоль) в DMF (3 мл) добавили HATU (0.25 г, 0.66 ммоль) и DIPEA (0.21 г, 1.6 ммоль) при КТ. Смесь перемешивали при КТ в течение 6 ч, что контролировали посредством LCMS. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили при колоночной хроматографии с силикагелем (10-50% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение 104-4b (0.34 мг, 80% выход) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 767.4 (M+H)<sup>+</sup>.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифлоро-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил (2S)-2-[(2S)-2-амино-3-гидроксипропанамидо]-4-метилпропаноат трифторуксусной кислоты соль (104b)



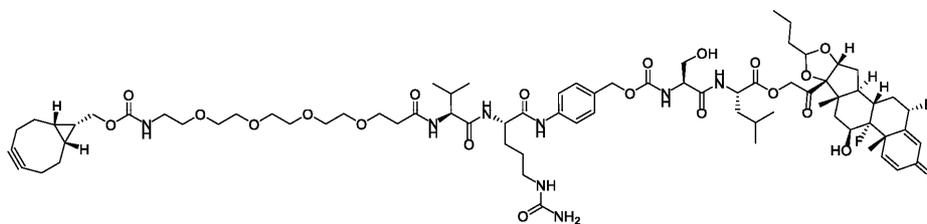
К раствору соединения 104-4b (0.34 г, 0.44 ммоль) в DCM (5 мл) добавили TFA (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 2 ч до полного удаления Вос согласно LCMS. Полученную смесь сконцентрировали, и остаток (0.33 г, 95% выход) был достаточно чистым для следующего этапа. 100 мг сырого продукта очистили далее посредством ргер-HPLC (способ А) и получили соединение 104b (80 мг, 80% выход) в виде желтого твердого вещества. ESI m/z: 667.3 (M+H)<sup>+</sup>.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифлоро-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил (2S)-2-[(2S)-2-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил]метокси-карбонил]амино]-3-гидроксипропанамидо]-4-метилпропаноат (104-8b)



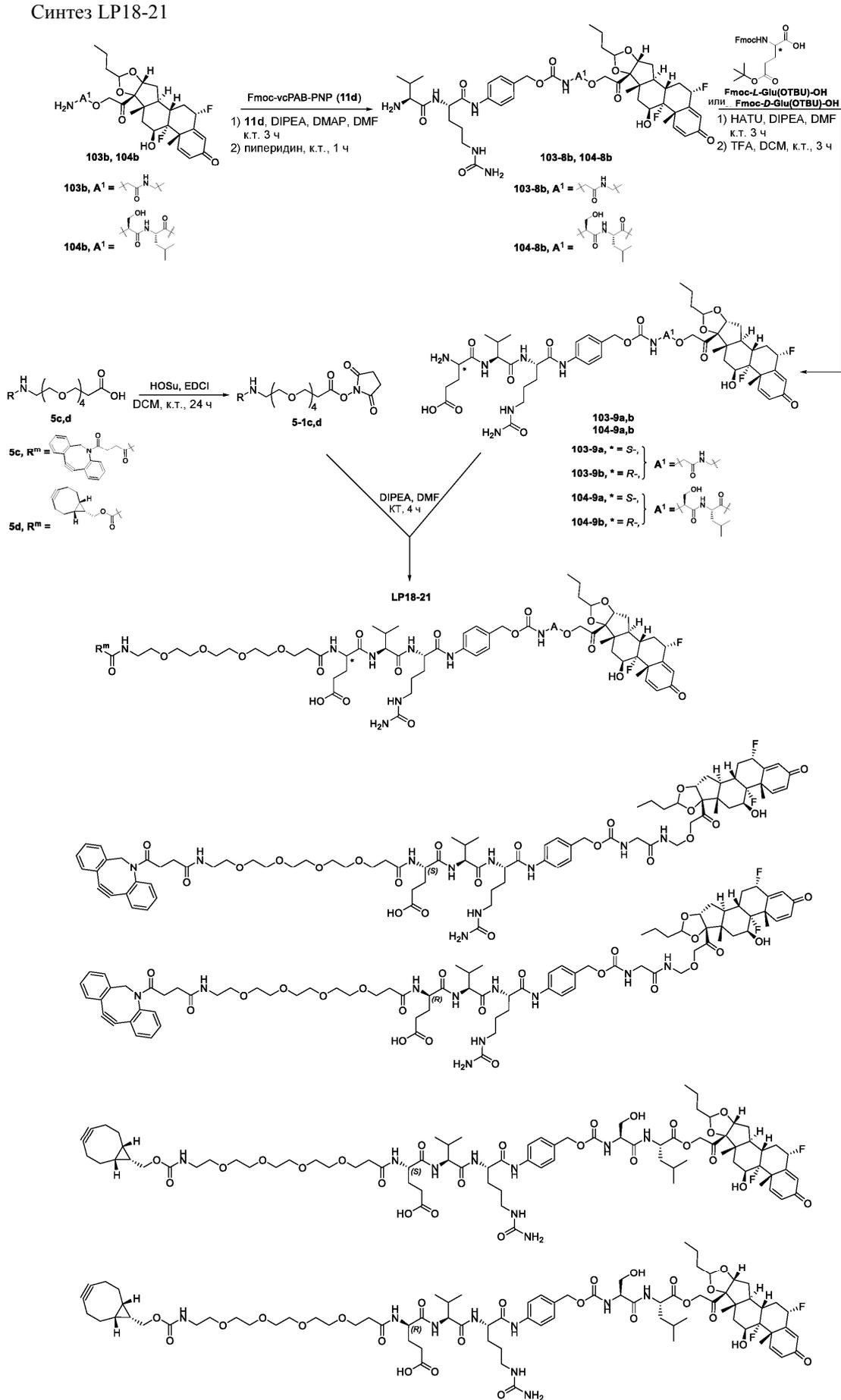
К раствору свежего сырого соединения 104b (0.10 г, 0.13 ммоль), полученному так, как было описано выше, в DMF (3 мл) добавили Fmoc-vcPAB-PNP (11d) (0.12 г, 0.16 ммоль), DMAP (16 мг, 0.13 ммоль) и DIPEA (50 мг, 0.39 ммоль) при КТ. Смесь перемешивали при КТ на протяжении 3 ч до разрушения большей части исходных материалов, что контролировали посредством LCMS. Затем к реакционной смеси добавили пиперидин (1 мл). Затем перемешивали смесь при комнатной температуре на протяжении часа до полного удаления Fmoc согласно LCMS. Полученную смесь очистили напрямую при ргер-HPLC (способ В) и получили соединение 104-8b (28 мг, 20% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 536.8 (M/2+H)<sup>+</sup>.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифлоро-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил(2S)-2-[(2S)-2-[[4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-({эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси]карбонил}амино)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил]метокси]карбонил]амино]-3-гидроксипропанамидо]-4-метилпропаноат (LP13)

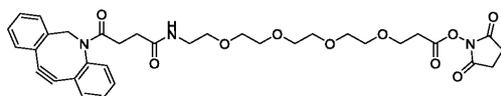


К раствору соединения 5d (10 мг, 22 мкмоль) в DMF (1 мл) добавили NATU (9 мг, 22 мкмоль) и DIPEA (8.0 мг, 62 мкмоль) последовательно при КТ. Смесь перемешивали при КТ на протяжении получаса и добавили раствор соединения 104-8b (20 мг, 19 мкмоль) в DMF (1 мл). Полученную смесь перемешивали при КТ на протяжении 2 ч до разрушения соединения 104-8b, что контролировали посредством LCMS. После фильтрации через мембрану фильтрат напрямую очистили посредством ргер-HPLC (способ В) и получили линкер-нагрузку LP13 (10 мг, 35% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 748.4 (M/2+H)<sup>+</sup>.

## Схема 105

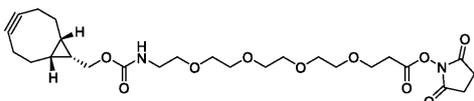


2,5-диоксопирролидин-1-ил 1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-оат (5-1c)



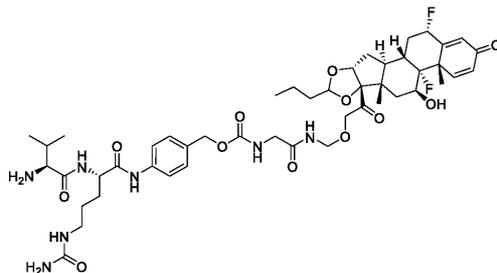
К раствору соединения 5с (160 мг, 0.290 ммоль) в DCM (20 мл) добавили HOSu (73.3 мг, 0.637 ммоль) и EDCI (122 мг, 0.637 ммоль) и смесь перемешивали при КТ в течение 24 ч, что контролировали посредством LCMS. Реакционную смесь разбавили DCM (50 мл) и органический слой промыли водой (50 мл) и рассолом, высушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сконцентрировали *in vacuo* и получили соединение 5-1с (159 мг, 84% выход) в виде бесцветного масла, которое использовали напрямую для следующего этапа. ESI m/z: 650 (M+H)<sup>+</sup>.

2,5-диоксопирролидин-1-ил 1-[(эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси)карбонил]амино]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-оат (5-1d)



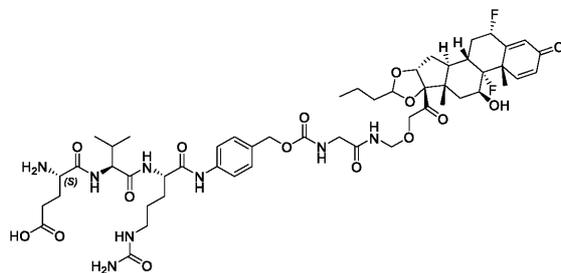
При соблюдении процедуры для 5-1с, за исключением замены 5d вместо 5с, получили соединение 5-1d (150 мг, 54% выход) в виде бесцветного масла, которое использовали напрямую для следующего этапа без дальнейшей очистки. ESI m/z: 539 (M+H)<sup>+</sup>.

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-[[{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифлоро-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил]карбамоил]метил}карбамат (103-8b)



С соблюдением процедуры для 104-8b (см. схему 104C), за исключением замены 103b вместо 104b, получили соединение 103-8b (28 мг, 20% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 480 (M/2+H)<sup>+</sup>.

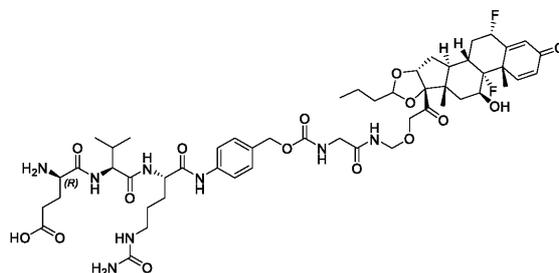
(4S)-4-амино-4-[[{(1S)-1-[[{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-[[{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифлоро-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил]карбамоил]метил}карбамоил]окси}метил}фенил]карбамоил]бутил]карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил]бутановая кислота (103-9а)



К раствору соединения Вос-L-Glu(OTBU)-OH (0.15 г, 0.50 ммоль) в DMF (5 мл) добавили HATU (0.19 г, 0.50 ммоль) и DIPEA (0.13 г, 1.0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 10 мин, затем к реакционной смеси добавили соединение 103-8b (0.48 г, 0.50 ммоль). Затем реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 3 ч до полного разрушения 103-8b согласно LCMS. Смесь экстрагировали посредством EtOAc и комбинированный органический раствор промыли водой, высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток растворили в DCM (10 мл). К раствору добавили TFA (2 мл) и реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении 3 ч, что контролировали посредством LCMS. Реакционную смесь сконцентрировали и остаток напрямую очистили при *rp*ер-HPLC (способ B) и получили соединение 103-9а (0.41 г, 75% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 536.8 (M/2+H)<sup>+</sup>.

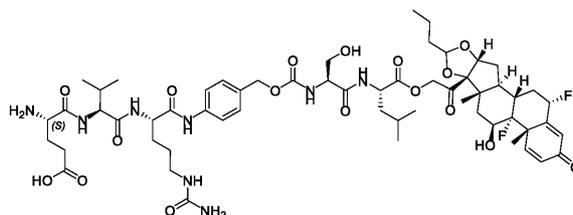
(4R)-4-амино-4-[[{(1S)-1-[[{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-[[{2-

[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифлоро-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил}карбамоил]метил}карбамоил}окси}метил}фенил}карбамоил]бутил}карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (103-9b)



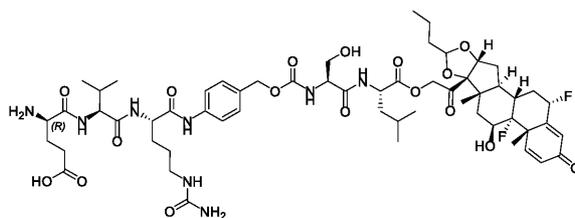
С соблюдением процедуры для 103-9а, за исключением замены Вос-Z)-Glu(OTBU)-ОН вместо Вос-L-Glu(OTBU)-ОН, получили соединение 103-9b (0.40 г, 74% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 536.8 (M/2+H)<sup>+</sup>.

(4S)-4-амино-4-{{(1S)-1-{{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-(4-{{((1S)-1-{{(2S)-1-{{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифлоро-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}-4-метил-1-оксопентан-2-ил]карбамоил}-2-гидроксиэтил}карбамоил}окси}метил}фенил}карбамоил)бутил}карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (104-9а)



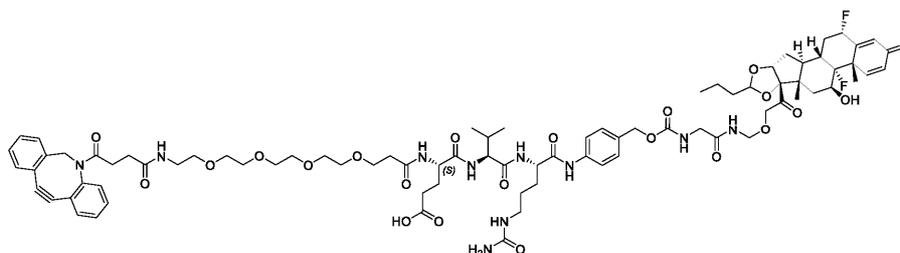
С соблюдением процедуры для 103-9а, за исключением замены 104-8b вместо 103-8b, получили соединение 104-9а (0.39 г, 65% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 601.3 (M/2+H)<sup>+</sup>.

(4R)-4-амино-4-{{(1S)-1-{{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-(4-{{((1S)-1-{{(2S)-1-{{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифлоро-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}-4-метил-1-оксопентан-2-ил]карбамоил}-2-гидроксиэтил}карбамоил}окси}метил}фенил}карбамоил)бутил}карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (104-9b)



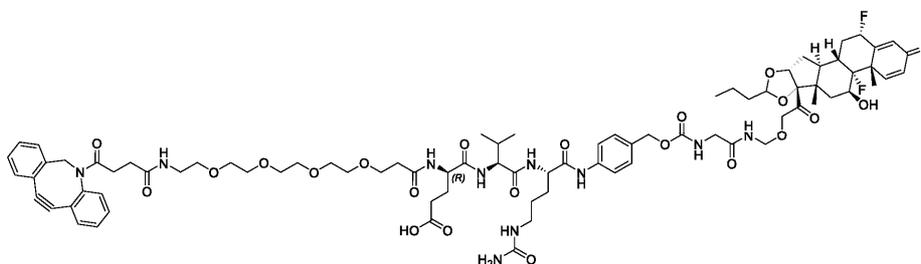
С соблюдением процедуры для 103-9а, за исключением замены 104-8b вместо 103-8b, Вос-D-Glu(OTBU)-ОН вместо Вос-L-Glu(OTBU)-ОН, получили соединение 104-9b (0.39 г, 65% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 601.3 (M/2+H)<sup>+</sup>.

(4S)-4-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-4-{{((1S)-1-{{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-(4-{{((1S)-1-{{(2S)-1-{{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифлоро-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил}карбамоил]метил}карбамоил}окси}метил}фенил}карбамоил]бутил}карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (LP18)



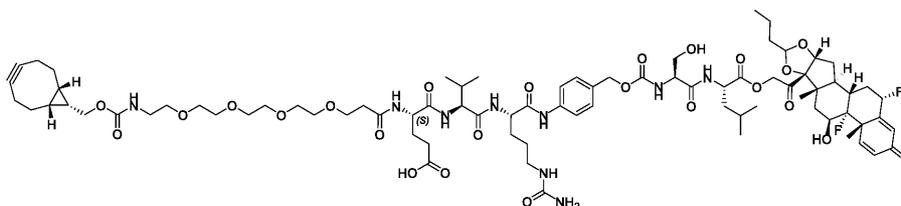
К раствору соединения 103-9а (57 мг, 53 мкмоль) в DMF (1 мл) добавили соединение 5-1с (36 мг, 56 мкмоль) и DIPEA (27 мг, 0.21 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 ч, что контролировали посредством LCMS. Затем полученную смесь напрямую очистили при rper-HPLC (способ В) и получили соединение LP18 (12 мг, 15% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 811.4 (M/2+H)<sup>+</sup>.

(4R)-4-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тераоксапентадекан-15-амидо]-4-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{{[[[2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифлоро-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диокапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}метил]карбамоил}метил}карбамоил]окси}метил}фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (LP19)



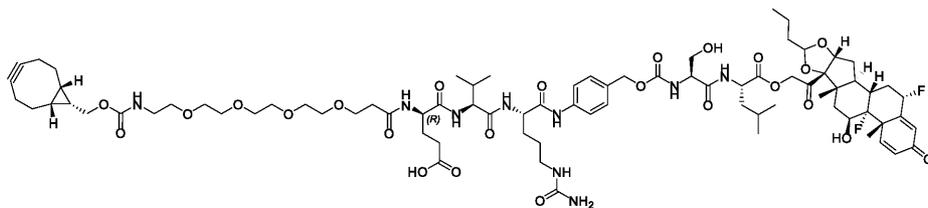
С соблюдением процедуры для LP18, за исключением замены 103-9b вместо 103-9а, получили соединение LP19 (14 мг, 17% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 811.4 (M/2+H)<sup>+</sup>.

(4S)-4-{1-[(эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси}карбонил)амино]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-4-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-({4-[[[(1S)-1-{{(2S)-1-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифлоро-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диокапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}-4-метил-1-оксопентан-2-ил]карбамоил}-2-гидроксиэтил]карбамоил}окси}метил}фенил}карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (LP20)



К раствору соединения 104-9а (64 мг, 53 мкмоль) в DMF (1 мл) добавили соединение 5-1d (30 мг, 56 мкмоль) и DIPEA (27 мг, 0.21 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 4 ч, что контролировали посредством LCMS. Затем полученную смесь напрямую очистили при rper-HPLC (способ В) и получили соединение LP20 (17 мг, 20% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 813.0 (M/2+H)<sup>+</sup>.

(4R)-4-{1-[(эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси}карбонил)амино]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-4-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-({4-[[[(1S)-1-{{(2S)-1-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифлоро-11-гидрокси-9,13-диметиламин-16-оксо-6-пропил-5,7-диокапентацикло[10.8.0.0<sup>2,9</sup>.0<sup>4,8</sup>.0<sup>13,18</sup>]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}-4-метил-1-оксопентан-2-ил]карбамоил}-2-гидроксиэтил]карбамоил}окси}метил}фенил}карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (LP21)



С соблюдением процедуры для LP20, за исключением замены 104-9b вместо 104-9a, получили соединение LP21 (14 мг, 17% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 813.0 (M/2+H)<sup>+</sup>.

В нижеприведенной табл. 5a представлены линкер-нагрузки, приготовленные с использованием описанных здесь способов.

Таблица 5a  
Примеры линкер-нагрузок

LP (ЛН)	Нагрузка	Название линкера	Структуры
LP1	101a	DIBAC-suc-PEG4-vcPAB-MEDA-100	
LP2	101b	DIBAC-suc-PEG4-vcPAB-DMEDA-100	
LP3	101c	DIBAC-suc-PEG4-vcPAB-DEEDA-100	
LP4	101d	DIBAC-suc-PEG4-vcPAB-Pip-100	
LP5	102e	NHS-дисульфид-SEA-100	
LP6	102f	NHS-дисульфид-SEMA-100	

LP7	102e	BCN-PEG3- дисульфид- SEA-100	
LP8	102f	BCN-PEG3- дисульфид- SEMA-100	
LP9	103a	DIBAC-suc- PEG4- vcPAB-Gly- AMO-Bud	
LP10	103b	DIBAC-suc- PEG4- vcPAB-Gly- AMO-100	
LP11	103b	DIBAC-suc- PEG4-GGFG- AMO-100	
LP12	104a	BCN-PEG4- vcPAB-Leu- Aib-100	
LP13	104b	BCN-PEG4- vcPAB-Ser- Leu-100	
LP18	103b	DIBAC-suc- PEG4-EVC- PAB-Gly- AMO-100	
LP19	103b	DIBAC-suc- PEG4-4EVC- PAB-Gly- AMO-100	

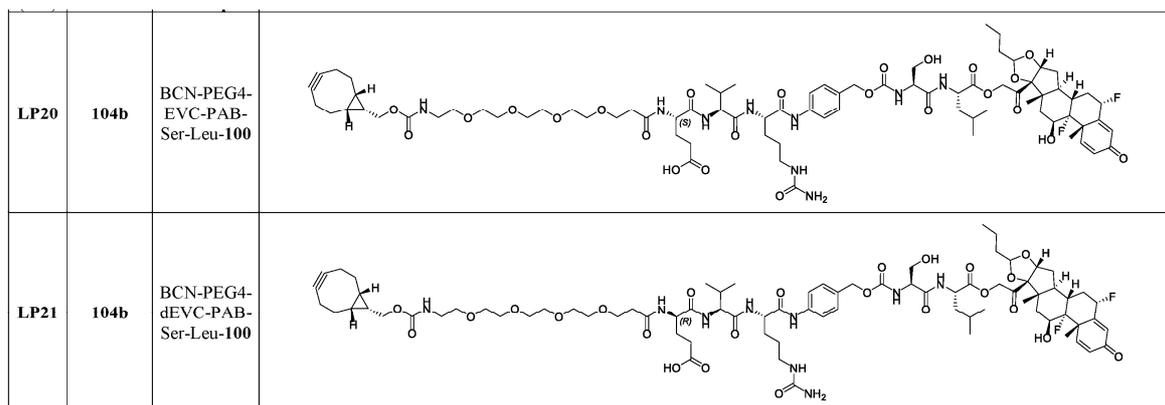


Таблица 6а

## Характеризационные данные для линкер-нагрузок

LP (ЛН)	cLogP	MF	МВ	Чистота HPLC (%)	МС (м/з) 100%	Высочайший пик м/з
LP1	4.26	C <sub>78</sub> H <sub>101</sub> F <sub>2</sub> N <sub>9</sub> O <sub>19</sub>	1506.71	95	753.9 (m/2+H)	753.9 (m/2+H)
LP2	4.48	C <sub>79</sub> H <sub>103</sub> F <sub>2</sub> N <sub>9</sub> O <sub>19</sub>	1520.71	97	761.0 (m/2+H)	761.0 (m/2+H)
LP3	5.20	C <sub>81</sub> H <sub>107</sub> F <sub>2</sub> N <sub>9</sub> O <sub>19</sub>	1548.76	95	775.0 (m/2+H)	775.0 (m/2+H)
LP4	4.31	C <sub>79</sub> H <sub>101</sub> F <sub>2</sub> N <sub>9</sub> O <sub>19</sub>	1518.69	99	760.0 (m/2+H)	760.0 (m/2+H)
LP5	3.40	C <sub>37</sub> H <sub>48</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub> S <sub>2</sub>	798.91	99	799.3 (m+H)	799.3 (m+H)
LP6	3.62	C <sub>38</sub> H <sub>50</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub> S <sub>2</sub>	812.94	97	813.3 (m+H)	813.3 (m+H)
LP7	5.20	C <sub>52</sub> H <sub>75</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>13</sub> S <sub>2</sub>	1052.29	97	526.7 (m/2+H)	526.7 (m/2+H)
LP8	5.42	C <sub>53</sub> H <sub>77</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>13</sub> S <sub>2</sub>	1066.32	98	533.8 (m/2+H)	533.8 (m/2+H)
LP9	3.65	C <sub>77</sub> H <sub>101</sub> N <sub>9</sub> O <sub>19</sub>	1456.70	96	729.0 (m/2+H)	729.0 (m/2+H)
LP10	3.35	C <sub>77</sub> H <sub>99</sub> F <sub>2</sub> N <sub>9</sub> O <sub>19</sub>	1492.68	95	513.8 (фрагмент)	747.0 (m/2+H)
LP11	1.96	C <sub>71</sub> H <sub>87</sub> F <sub>2</sub> N <sub>7</sub> O <sub>17</sub>	1348.51	95	450.2 (m/3+H)	675.2 (m/2+H)
LP12	5.61	C <sub>76</sub> H <sub>110</sub> F <sub>2</sub> N <sub>8</sub> O <sub>20</sub>	1493.75	90	747.6 (m/2+H)	747.6 (m/2+H)
LP13	4.13	C <sub>75</sub> H <sub>108</sub> F <sub>2</sub> N <sub>8</sub> O <sub>21</sub>	1495.70	95	748.4 (m/2+H)	748.4 (m/2+H)
LP18	2.46	C <sub>82</sub> H <sub>106</sub> F <sub>2</sub> N <sub>10</sub> O <sub>22</sub>	1621.77	95	811 (m/2+H)	811 (m/2+H)
LP19	2.46	C <sub>82</sub> H <sub>106</sub> F <sub>2</sub> N <sub>10</sub> O <sub>22</sub>	1621.77	95	811 (m/2+H)	811 (m/2+H)
LP20	3.25	C <sub>80</sub> H <sub>115</sub> F <sub>2</sub> N <sub>9</sub> O <sub>24</sub>	1624.81	95	813 (m/2+H)	813 (m/2+H)
LP21	3.25	C <sub>80</sub> H <sub>115</sub> F <sub>2</sub> N <sub>9</sub> O <sub>24</sub>	1624.81	95	813 (m/2+H)	813 (m/2+H)

## Пример 2.

Данный пример демонстрирует конкретные процедуры для сайт-специфической конъюгации алкин-линкер-нагрузки к антителу.

В данном примере сайт-специфические конъюгаты создаются за два этапа. Первый этап представляет собой МТГ-основанное ферментное присоединение малой молекулы, такой как азид-PEG<sub>3</sub>-амин (supra), к антителу, имеющему Q-метку (например, WO2017/147542) (в дальнейшем именуемая "конъюгация на основе МТГ"). Антитело, имеющее N297Q мутацию или N297D мутацию, имеет Q295/Q297 или Q295, которых стимулируют присоединяться к МТГ для ферментно-основанных сайт-специфических конъюгаций, где Q295 и/или Q297 были определены как Q-метка. На втором этапе проводится присоединение линкер-нагрузки к азидо-функционализованному антителу через [2+3] циклоприсоединение, на-

пример, 1,3-двухполярное циклоприсоединение между азидами и циклооктинами (также называемое клик-химия без соединений меди). См. документы Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. PNAS 2007, 104. (43), 16793-7, содержание которых включается в настоящий документ полностью посредством ссылки, где реактивная группа (RG) представляет собой DIBAC фрагмент, конъюгация выполняется с азидо-функционализированным антителом через [2+3] циклоприсоединение. Данный процесс дает сайт-специфические и стехиометрические конъюгаты.

Конъюгация ADC через [2+3] клик-реакцию.

Этап 1. Приготовление азидо-функционализованного антитела.

IgG агликозилированного человеческого антитела (IgG1, IgG4 и т.д.) или изотип человеческого IgG1 с N297Q мутацией (номенклатура EU), в PBS (pH 6.5-8.0) смешивают с  $\geq 200$  молярными эквивалентами азидо-dPEG<sub>3</sub>-амина (MW=218.26 г/моль). Полученный раствор смешивают с МТГ (ЕС 2.3.2.13 из Zedira, Дармштадт, Германия, или Modernist Pantry [L# 210115A] - ACTIVA TI содержит мальтодекстрин из Ajinomoto, Япония) (25 ед/мл; 5ед МТГ на мг антитела), в результате чего получают итоговую концентрацию антитела 0.5-5 мг/мл, и затем раствор инкубируют при 37°C на протяжении 4-24 ч при аккуратном встряхивании. Реакцию контролируют посредством ESI-MS. По завершении реакции излишек амина и МТГ удаляют посредством SEC или колоночной хроматографии на основе белка А, в результате чего получают азидо-функционализованное антитело. Данный продукт характеризуют посредством SDS-PAGE и ESI-MS. Азидо-dPEG<sub>3</sub>-амин добавляют к двум сайтам антитела, что дает повышение 204 Да для конъюгата 2DAR антитело-PEG<sub>3</sub>-азид.

Этап 2. Приготовление сайт-специфических конъюгатов лекарственного средства к антителу с помощью реакции клик-химии.

Сайт-специфические конъюгаты антитело-лекарственное средство с человеческим IgG (IgG1, IgG4 и т.д.) в табл. 7 готовят посредством [2+3] клик-реакции между азидо-функционализированными антителами и алкин-содержащей линкер-нагрузкой. Далее описана подробная процедура конъюгации. Сайт-специфический конъюгат антитела с линкер-нагрузкой (LP) готовят посредством инкубирования mAb-PEG3-N3 (1-3 мг/мл) в водной среде (например, PBS, PBS с содержанием 5% глицерина, HBS) с  $\geq 6$  моляр. эквивалентами LP, растворенными в подходящем органическом растворителе, таком как DMSO, DMF или DMA (т.е. реакционная смесь содержит 5-20% органический растворитель, об./об.) от 24°C до 37°C на протяжении более 6 ч. Протекание реакции контролируют посредством ESI-MS, и отсутствие mAb-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> указывает на завершение конъюгации. Излишнее количество LP и органического растворителя удаляют посредством SEC через элюирование с PBS или посредством колоночной хроматографии на основе белка А через элюирование с кислым буфером с последующей нейтрализацией при помощи Tris (pH8.0).

Конечный продукт концентрируют посредством ультра-центрифугирования и характеризуют посредством UV, SEC, SDS-PAGE и ESI-MS.

Пример 3.

Данный пример демонстрирует способ выполнения несайт-специфической конъюгации лекарственного средства с антителом при помощи тиол-малеимидной реакции.

Конъюгация через цистеины антитела выполняется за два этапа с использованием способов, аналогичных способам, описанным в Mol Pharm. 2015 Jun 1; 12(6): 1863-71.

Моноклональное антитело (mAb, 10 мг/мл в 50 mM HEPES, 150 mM NaCl) с pH 7.5 восстанавливают 1 mM дитиотреитола (0.006 мг на мг антитела) или ТСЕР (2.5 моляр, эквивалент антитела) при 37°C в течение 30 мин. Концентрацию антитела вычисляют на основе поглощения при 280 нм на Nanodrop (ThermoFisher Scientific) и коэффициента экстинкции антитела. После гелевой фильтрации (G-25, pH 4.5 ацетат натрия) соединение LP в DMSO (10 мг/мл) добавляют к восстановленному антителу и pH смеси корректируют до pH 7.0 при помощи 1 M HEPES (pH 7.4). Смеси дают прореагировать на протяжении 3-14 ч. Полученный конъюгат очищают посредством SEC. Значения DAR (УФ) определяют с использованием измеренного поглощения pcADC и коэффициентов экстинкции антитела и соединения LP.

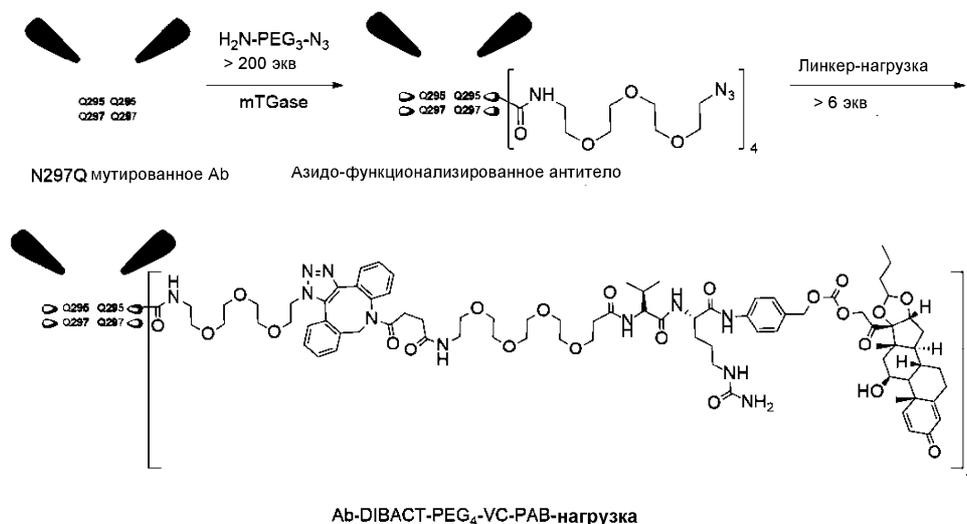
Пример 4.

Конъюгация ADC.

В одном примере сайт-специфические конъюгаты получают посредством двухэтапной конъюгации антитела с мутацией N297Q или N297D на основе микробной трансглутаминазы (МТГ) (МТГ ЕС 2.3.2.13, Zedira, Дармштадт, Германия) (здесь "на основе МТГ"). На первом этапе антитело с мутацией N297Q функционализируется с азидо-PEG<sub>3</sub>-амином посредством ферментной реакции на основе МТГ. См., например, Международную патентную заявку РСТ № РСТ/US17/19537, поданную 24 февраля 2017 года, содержание которой включается в настоящий документ полностью посредством ссылки во всех целях. На втором этапе алкин-функционализованная линкер-нагрузка присоединяется к азидо-функционализованному антителу посредством реакции [2+3] 1, 3-двухполярного циклоприсоединения с конъюгацией с азидо-функционализированным антителом, полученным посредством [2+3] циклизации). Данный процесс дает сайт-специфические и стехиометрические конъюгаты.

## Пример 5.

Следующий пример описывает способ получения конъюгата азидо-функционализованным антитело-лекарственным средством, указанного в табл. 7.



Агликозилированное антитело с изотопом человеческого IgG1 в VupH™ (pH 7.6-7.8) смешали с  $\geq 200$  моляр. эквивалентами азидо-dPEG<sub>3</sub>-амина (МВ 218.26 г/моль). Полученный раствор смешали с трансклутаминой (25 ед/мл; 5ед МТГ на мг антитела), в результате чего получили итоговую концентрацию антитела в 0.5-3 мг/мл и затем раствор инкубировали при 37°C в течение 4-24 ч при аккуратном встряхивании. Реакцию контролировали посредством SDS-PAGE или ESI-MS. По завершении реакции избыток амина и МТГ удалили посредством эксклюзионной хроматографии по размеру (SEC) и получили азидо-функционализованным антитело. Данный продукт проанализировали посредством SDS-PAGE и ESI-MS. Азидо-dPEG<sub>3</sub>-амин добавили к двум сайтам - Q295 и Q297- антитела, что дало повышение 804 Да для конъюгата 4DAR агликозилированное антитело-PEG<sub>3</sub>-азид.

Следующий пример демонстрирует способ выполнения сайт-специфической конъюгации лекарственного средства с антителом при помощи реакций клик-химии.

Сайт-специфические конъюгаты агликозилированное антитело-лекарственное средство с человеческим IgG1 с содержанием мутации N297Q приготовили посредством [2+3] клик-реакции между азидо-функционализованными антителами с алкин-содержащей линкер-нагрузкой. В частности, анти PRLR Ab-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> конъюгировали с 2b, 2g, 2l, 2r, или 2s; и анти HER2 Ab-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> конъюгировали с 2b, 2g, 2l, 2r, или 2s. Эти конъюгаты антитела против HER2 синтезировали для работы в качестве изотипического контроля в описанных далее анализах. Далее, для удобства, антитела против HER2 называются "изотопическими" антителами.

Далее описана подробная процедура конъюгации. Сайт-специфический конъюгат антитела с линкер-нагрузкой (LP или 2) приготовили посредством инкубирования mAb-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> (1-3 мг/мл) в водной среде (например, PBS, PBS с содержанием 5% глицерина, HBS) с  $\geq 6$  молярными эквивалентами LP, растворенными в подходящем органическом растворителе, таком как DMSO, DMF или DMA (т.е. реакционная смесь содержит 5-20% органический растворитель, об./об.) при температуре от 24°C до 37°C на протяжении более 6 ч. Протекание реакции контролировали посредством ESI-MS, и отсутствие mAb-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> означало завершение конъюгации. Излишнее количество LP и органического растворителя удалили посредством SEC через элюирование с PBS или посредством колоночной хроматографии на основе белка А через элюирование с кислым буфером с последующей нейтрализацией при помощи Tris (pH8.0). Очищенные конъюгаты проанализировали посредством SEC, SDS-PAGE и ESI-MS. В табл. 7 приведен перечень стероидных антитело-конъюгатов от соответствующих LP, их молекулярный вес и значения ESI-DAR.

В конкретном примере на азидо-функционализованным антитело (1 мг) в 0.800 мл PBSg (PBS, 5% глицерин, pH 7.4) воздействовали 6-моляр. эквивалентами 2b (конц. 10 мг/мл в DMSO) на протяжении 6 - 12 ч при КТ и избыток линкер-нагрузки (LP) удалили посредством эксклюзионной хроматографии по размеру (SEC, Superdex 200 HR, GE Healthcare). Конечный продукт концентрировали посредством ультра-центрифугирования и характеризовали посредством UV, SEC, SDS-PAGE и ESI-MS.

## Пример 6.

## Характеризация ADC.

Для анализа целостности и чистоты ADC применяют SDS-PAGE.

Согласно одному способу, условия проведения SDS-PAGE включают невосстановленные и восстановленные образцы (2-4 мкг) вместе с эталонным набором предокрашенных маркерных белков (Invitrogen, кат. № 10748-010; № партии 1671922.), которые помещают на дорожку в (1.0 мм×10 лунок) Novex 4 -

20% трис-глициновом геле, и процесс выполняется при 180 В, 300 мА на протяжении 80 мин. Невосстановленный образец готовят при помощи Novex трис-глицинового SDS буфера (2×) (Invitrogen, кат. № LC2676), а восстановленный образец готовят при использовании SDS буфера для образца (2×) с содержанием 10% 2-мекаптоэтанола.

Молекулярный вес антител и псADC при SDS-PAGE определяют для невосстанавливающих и восстанавливающих условий. Сдвиги массы могут быть неочевидными в невосстанавливающих условиях из-за относительно малого процента изменений массы. Тем не менее, массы тяжелых цепей повышаются от голых антител до азидо-функционализированных антител и далее до конъюгата псADC. Может быть обнаружен или может быть не обнаружен материал с поперечной связью.

ADC анализируют на чистоту посредством эксклюзионной хроматографии по размеру (SEC).

Для определения чистоты конъюгатов антитело-лекарственное средство выполняют эксклюзионную хроматографию по размеру. Аналитические эксперименты SEC проводятся с использованием прибора Waters 600, на HR-колонке Superdex 200 (1.0×30см), с расходом 0.80 мл/мин с использованием PBS pH 7.4, и контролируются на  $\lambda$ 280 нм с использованием Waters 2998 PDA. Образец для анализа состоит из 200 мкл PBS (pH 7.4) с 30-100 мкл исследуемого образца. Очистки препаративной SEC выполняют с использованием прибора АКТА от GE Healthcare, на колонке Superdex 200 PG (2.6×60 см), с расходом 2 мл/мин с элюированием с PBSg при pH 7.4 и контролируют на  $\lambda$ 280 нм.

Антитело и ADC анализируют посредством анализа массы исходного вещества при помощи LC-ESI-MS, что описывается далее.

Измерение массы исходного вещества для образцов ADC посредством LC-ESI-MS провели для определения профиля распределения лекарственного препарата-нагрузки и вычисления среднего отношения DAR. Каждый исследуемый образец (20-50 нг, 5мкл) поместили в колонку Acquity UPLC Protein BEH C4 (10K psi, 300 Å, 1.7 мкм, 75мкм×100 мм; кат. № 186003810). После 3 мин обессоливания белок был элюирован и масс-спектры были получены при помощи масс-спектрометра Waters Synapt G2-SL.

В табл. 7 приведен перечень конъюгатов будесонид-спейсер-линкер-антитело от соответствующих LPs (2b, 2g, 2l, 2r, и 2s), их молекулярный вес голых антител, азидо-функционализированных антител, LP и стероидных ADC, а также значений ESI-DAR. В табл. Ab означает антитело, Ab-N<sub>3</sub> означает азидо-функционализированное антитело, а Ab-стероидные конъюгаты означают нецитотоксические стероидные антитело-конъюгаты с соответствующими LP. Как указано в табл. 7, большинство сайт-специфических ADC имеют 4DAR.

Таблица 7

LP (ЛН)		Ab, Ab-N <sub>3</sub> , или Ab-стероидные конъюгаты		
EX	MC м/з	Название	МВ (Да)	DAR
		Анти-PRLR Ab	144602	-
PEG <sub>3</sub> -N <sub>3</sub>	218.3	Анти-PRLR Ab -N <sub>3</sub>	145385	4
<b>2b</b>	1369.7	Анти- PRLR Ab- <b>2b</b>	150894	4
<b>2g</b>	1426.7	Анти- PRLR Ab- <b>2g</b>	151097	4
<b>2l</b>	1373.7	Анти- PRLR Ab- <b>2l</b>	150884	4
<b>2r</b>	729.8	Анти- PRLR Ab- <b>2r</b>	148330	4
<b>2s</b>	809.8	Анти- PRLR Ab- <b>2s</b>	148623	4
		Анти-HER2 (изотипическое) Ab	145126	-
PEG <sub>3</sub> -N <sub>3</sub>	218.3	Изотипическое Ab -N <sub>3</sub>	145930	4
<b>2b</b>	1369.7	Изотипическое Ab- <b>2b</b>	151439	3.8
<b>2g</b>	1426.7	Изотипическое Ab- <b>2g</b>	151652	4
<b>2l</b>	1373.7	Изотипическое Ab- <b>2l</b>	151445	3.9
<b>2r</b>	729.8	Изотипическое Ab - <b>2r</b>	148876	4
<b>2s</b>	809.8	Изотипическое Ab- <b>2s</b>	149169	4

Пример 7.

Для анализа активации ГР будесонидом и описанных здесь стероидов в зависимости от времени провели клеточный анализ репортерного гена люциферазы ко-активатора глюкокортикоидного рецептора (ГР).

Для создания клеточной линии для анализа была сконструирована клеточная линия НЕК293 для

экспрессии человеческого полноразмерного PRLR. Затем такую стабильную клеточную линию далее трансфицировали рBIND-ГР вектором (Кат. № E1581, Promega) и рGL4.35 [Luc2P/9xGAL4UAS/Hygro] вектором (Кат. № E1370, Promega), чтобы ген люциферазы транскрибировался при стероидном связывании на ГР. Полученная стабильная клеточная линия называется здесь HEK293/PRLR/GRE-Luc.

Активность стероидов в клетках HEK293/PRLR/GRE-Luc изучали через 24, 48 и 72 ч инкубирования после добавления исследуемых реактивов. Для данного анализа 20000 клеток посеяли на 96-луночные планшеты в среду с содержанием DMEM, дополненную 10% FBS и пенициллином/стрептомицином (полная среда) и культивировали на протяжении ночи при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Для создания кривых ответов на дозы свободных стероидов и/или их псADC последовательно разбавленные реактивы от 100 нМ до 5.1 пМ добавили к клеткам и инкубировали на протяжении 24, 48 и 72 ч при 37°C. Активность люциферазы определяли добавлением 100 мкл реактива One-Glo™ (Promega, кат. № E6130), инкубирования при комнатной температуре на протяжении 5 мин, относительные световые единицы (OCE) измерили на люцинометре Victor (Perkin Elmer).

На первом этапе анализа анти-PRLR Ab псADC (Anti-PRLR Ab-2r, Anti-PRLR Ab-2s и Anti-PRLR Ab-2b), изотип. Ab псADC (изотип. Ab-2r, изотип. Ab-2s и изотип. Ab-2b) и свободную нагрузку будесонида проанализировали в ходе анализа клеток HEK293/PRLR/GRE-Luc с использованием описанного выше протокола с инкубированием в течение 24, 48 или 72 ч в ходе одного этапа анализа. На втором этапе анализа анти-PRLR Ab псADC (анти-PRLR Ab-2b, анти-PRLR Ab-2l, и анти-PRLR Ab-2g), изотип. Ab псADC (изотип. Ab-2b, изотип. Ab-2l и изотип. Ab-2g), только антитела (анти-PRLR Ab и изотип. Ab) и свободную нагрузку будесонида проанализировали в ходе клеточного анализа HEK293/PRLR/GRE-Luc с использованием описанного выше протокола с инкубированием в течение 72 ч. Значения EC<sub>50</sub> определили с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по 10-точечной характеристике с применением GraphPad Prism. Доставка стероидов обуславливала активацию репортера Luc в клетках HEK293/PRLR/GRE-Luc.

Фиг. 1А-С и табл. 8 иллюстрируют результаты первого этапа анализа. Как показано на фиг. 1А-С, конъюгат анти-PRLR Ab-2b индуцировал активацию клеток HEK293/PRLR/GRE-Luc через 24, 48 и 72 ч, при этом значение EC<sub>50</sub> было менее ≤10 нМ во всех трех временных точках и была показана >15-кратная селективность в отношении контрольного изотип.-Ab-2b. Конъюгат анти-PRLR Ab-2s индуцировал активацию в клетках HEK293/PRLR/GRE-Luc через 24, 48 и 72 ч, тем не менее, он не показал селективность в отношении контрольного изотип.-2s. Конъюгат анти-PRLR Ab-2r индуцировал активацию в клетках HEK293/PRLR/GRE-Luc с <5-кратной селективностью через 24 и 48 ч, но повысил активацию только через 72 часа с EC<sub>50</sub> в 13.4 нМ.

На втором этапе анализа, что показано на фиг. 2 и в табл. 9, конъюгат анти-PRLR Ab-2b индуцировал активацию в клетках HEK293/PRLR/GRE-Luc, с EC<sub>50</sub> в 0.48 нМ и показал приблизительно 14-кратную селективность в отношении контрольного изотип.-Ab-2b. Конъюгат анти-PRLR Ab-2g индуцировал активацию в клетках HEK293/PRLR/GRE-Luc с EC<sub>50</sub> в 1.9 нМ с приблизительно 3.7-кратной селективностью в отношении контрольного изотипа.-Ab-2g. Конъюгат анти-PRLR Ab-2l индуцировал активацию в клетках HEK293/PRLR/GRE-Luc с EC<sub>50</sub> в 8.98 нМ, при этом изотип.-Ab-2l не продемонстрировало активацию в ходе этого анализа.

Таблица 8

Молекула	HEK293/PRLR/GRE-Luc клетки		
	EC <sub>50</sub> (24 ч)	EC <sub>50</sub> (48 ч)	EC <sub>50</sub> (72 ч)
Анти-PRLR Ab-2s	0.9078	0.4239	0.4823
Анти-PRLR Ab-2r	34.98	18.33	13.35
Анти-PRLR Ab-2b	1.225	0.4674	0.4291
Изотипическое Ab-2s	1.461	0.6594	0.4904
Изотипическое Ab-2r	109.2	64.01	310.9
Изотипическое Ab-2b	15.04	8.201	5.243
<b>1a</b>	0.5732	0.5679	1.043

Таблица 9

Стероидные ADC	HEK293/PRLR/GRE-Luc клетки
	EC <sub>50</sub> (нМ) через 72 часа
Анти-PRLR Ab-2b	0.29
Анти-PRLR Ab-2l	8.98

Анти-PRLR Ab-2i	>90.9
Анти-PRLR Ab-2g	1.90
Изотипическое Ab-2b	4.16
Изотипическое Ab-2l	НА
Изотипическое Ab-2i	НА
Изотипическое Ab-2g	7.11
Будесонид (1a)	5.42
Анти-PRLR Ab	НА
Изотипическое Ab	НА

НА означает неактивное.

#### Пример 8.

Данный пример описывает мышиную модель ЛПС-индуцированного высвобождения цитокинов.

Цель настоящего исследования заключается в том, чтобы проанализировать исследуемые соединения в плане ингибирования ЛПС-индуцированного высвобождения цитокинов у мышей. Исследуемые соединения вводят за 48 ч, 24 ч и 2 ч до анализа с ЛПС, уровни цитокинов в образцах крови, включая TNF- $\alpha$  и IL6, измерили через 2 ч и 4 ч после анализа с LPS.

#### Материалы и реактивы.

Липополисахарид (ЛПС), полученный от E. Coli K12, можно купить в Invivogen (Сан-Диего, штат Калифорния, США, кат. № Tlr1-eklps), Дексаметазон можно приобрести в ADAMAS (Эмеривилл, штат Калифорния, США, кат. № 50-02-2). Набор TNF- $\alpha$  ELISA мыши можно приобрести в ebioscience (ThermoFisher Scientific, кат. №88-7324). Набор IL6 ELISA мыши можно приобрести в ebioscience (ThermoFisher Scientific, кат. №88-7064).

#### Экспериментальные методы.

##### Животные.

В данном исследовании использовали всего 18 мышей C57BL/6j, ранее не получавших никаких препаратов. Эти животные были самцами, с весом тела в 18-20 г в начале исследования. Животных приобрели в Shanghai Laboratory Animal Center, CAS (SLAC), и поместили в виварий ChemPartner в свободную от патогенной флоры среду. После прибытия животных проверили в плане состояния здоровья, включая шерстный покров, конечности, отверстия и аномальные признаки в позе или движениях, их акклиматизация к среде длилась более 7 дней.

Животных поместили по 3 мыши в клетку из поликарбоната с индивидуальной вентиляцией в свободную от патогенной флоры среду; средства регулирования среды в клетках были настроены на поддержание температуры в 20-26°C, влажности в 40-70% и на цикл 12-часового освещения/12-часовой темноты.

Стандартный корм (SLAC-M01, из Shanghai Laboratories Animal Center) и очищенную воду (фильтрованную воду качества воды для городского потребления) обеспечивали ad libitum на всем протяжении периода исследования.

#### Экспериментальные процедуры.

Разделение на группы: животных в случайном порядке распределили по 6 группам (A-F) до начала исследования. Каждая группа включала 3 мыши. Группа А служила в качестве наивной контрольной группы; Группа В получала дексаметазон и служила положительным контролем; Группа С получала исследуемое соединение, и Группы D-F получали исследуемые соединения.

#### Процедура эксперимента.

Все мыши получили ЛПС, растворенный в PBS, с дозой в 0.5 мг/кг посредством внутрибрюшинной инъекции. Мыши в группе А получили PBS, мыши в группе В получили Dex (5 мг/кг) и мыши в группе С получили 4b (5 мг/кг) посредством внутрибрюшинной инъекции, за 2 часа до провокации ЛПС; мыши в группе D, E и F получили дозу в 5 мг/кг посредством внутрибрюшинной инъекции, за 2 ч, 24 ч и 48 ч до провокации ЛПС, соответственно.

Образцы крови взяли через 2 ч и 4 ч после провокации ЛПС, в пробирки с гепарином. Образцы крови центрифугировали, взяли образцы плазмы и хранили их при -80°C до проведения анализа.

Уровни TNF $\alpha$  в плазме измерили с использованием наборов ELISA в соответствии со стандартными процедурами. Измерили различные PK параметры (например, T<sub>макс</sub>, C<sub>макс</sub>, предел. t<sub>1/2</sub>, AUC<sub>посл.</sub> и AU-C<sub>INF</sub>).

Образцы крови взяли через 2 ч после провокации LPS; измерили уровни TNF- $\alpha$  в плазме. Данные выразили как среднее  $\pm$ 8EM (средняя погрешность среднего), \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs Группа А, посредством однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

## Пример 9.

## Дендритные клетки мышей.

Чтобы определить влияние исследуемого соединения на *ex-vivo* ЛПС-индуцированные воспалительные иммунные ответы, CD11c<sup>+</sup> дендритные клетки (ДК) выделили из селезенок мышей C57Bl/6 дикого типа (Jackson Labs, Протокол №426.0). ДК из селезенок выделили с использованием расщепления Коллагеназой D (400 ед/мл коллагеназы D (Roche кат. №11088858001), 20 мкг/мл ДНКазы I (Roche кат. №10104159001), 2% FCS в HEPES-буферизованной RPMI-1640) и инкубировали при 37°C на протяжении 25 мин. После инкубирования ткань селезенки промыли RPMI-1640 и отфильтровали через 70 мкм фильтр, затем выполнили лизис эритроцитов с использованием буфера для лизиса АСК (Gibco кат. № A1049201) в течение 1 мин. Клеточную суспензию в последующем промыли дважды с использованием RPMI-1640. Классические ДК выделили из суспензии мононуклеарных клеток с использованием магнитных микрогранул CD11c (Milteny Biotec кат. № 130108338). Если описать процесс кратко, клеточную суспензию промыли дважды с использованием подвижного буфера autoMACS (Milteny Biotec кат. № 130091221) до 30-минутной инкубации при 4°C с CD11c<sup>+</sup> микрогранулы, в соответствии с утвержденными протоколами Milteny Biotec. CD11c<sup>+</sup> клетки выделили посредством позитивной селекции, промыли, суспендировали в полной среде RPMI [RPMI-1640 (ThermoFisher Scientific, кат. № 15140122) с содержанием 10% FBS (ThermoFisher Scientific, кат. № 10082147) и 1% пенициллина-стрептомицина (ThermoFisher Scientific, кат. № 11875093)] и выполнили количественный анализ перед культивированием 2×10<sup>5</sup> клеток на лунку. Контрольную полную среду RPMI, полную среду RPMI с соединением Формулы (III) (при 10 нМ и 100 нМ) или полную среду RPMI с дексаметазоном (Sigma, кат. № D4902-25 мг) (с 10 нМ и 100 нМ) добавили к клеткам в 96-луночную чашку для культивирования. ДК/контроль, клетки, на которые воздействовали исследуемым соединением или дексаметазоном, инкубировали на протяжении 24 ч при 37°C перед стимуляцией с использованием 10 нг/мл LPS на протяжении 24 ч.

## Дендритные клетки человека.

Чтобы определить влияние исследуемого соединения на *ex-vivo* ЛПС-индуцированные воспалительные иммунные ответы в клетках врожденной иммунной системы человека, CD14<sup>+</sup> моноциты (Lonza кат. №2W-400C) выделяют и культивируют в присутствии полной среды RPMI [RPMI-1640 (ThermoFisher Scientific, кат. №15140122) с содержанием 10% FBS (ThermoFisher Scientific, кат. №10082147) и 1% пенициллина-стрептомицина (ThermoFisher Scientific, кат. №11875093)], дополненной человеческим IL4 (50 нг/мл) (Milteny Biotec, кат. №130-093-922) и человеческим GM-CSF (100 нг/мл) (Milteny Biotec, кат. №130093866) на протяжении 7 дней. Полную среду RPMI с IL4 и GM-CSF меняют каждые три дня. Создают два специфических условия культивирования:

условие 1: инкубирование CD14<sup>+</sup> моноцитов с контрольной полной средой RPMI, полной средой RPMI с исследуемым соединением (с 10 нМ и 100 нМ) или полной средой с RPMI с дексаметазоном (Sigma) (с 10 нМ и 100 нМ) на протяжении 7 дней культивирования, или

условие 2: инкубирование CD14<sup>+</sup> моноцитов с контрольной полной средой RPMI на протяжении 5 дней перед инкубированием с контрольной полной средой RPMI, полной средой RPMI с исследуемым соединением (с 10 нМ и 100 нМ) или полной средой RPMI с дексаметазоном (Sigma, кат. №D4902-25 мг) (с 10 нМ и 100 нМ) до дня 7. На день 7 различные экспериментальные группы стимулируют 10 нг/мл ЛПС на протяжении 24 ч.

Измерение цитокинов в супернатантах через 24 ч после воздействия LPS *ex vivo*.

Супернатанты собирают в 96-луночные планшеты для тканевых культур с круглым дном через 24 ч после провокации ЛПС и хранят при -20°C до проведения дальнейшего анализа. Концентрации цитокинов в супернатантах измеряют с использованием набора для иммунологического анализа Pro-inflammatory Panel 1 (mouse) multiplex immunoassay kit (MesoScale Discovery, кат. №K15048D) в соответствии с инструкциями производителя или набора для иммунологического анализа Pro-inflammatory Panel 1 (human) multiplex immunoassay kit (MesoScale Discovery, кат. №K15049D). Если описать процесс кратко, 50 мкл/лунку калибровочных маркеров и образцов (разбавленных в Разбавителе 1:2) добавляют на планшеты с предварительным нанесением иммобилизованных антител и инкубируют при комнатной температуре при встряхивании с частотой 700 об/мин в течение 2 ч. Затем планшеты промывают 3 раза при использовании 1×PBS с содержанием 0.05% (в/об) Tween-20, с последующим добавлением 25 мкл раствора для детекции антител, разбавленного в Разбавителе 45. После 2-часового инкубирования при комнатной температуре при встряхивании планшеты промывают 3 раза и в каждую лунку добавляют 150 мкл 2× буфера считывания. Затем немедленно определяют электрохемилюминесценцию на приборе MSD Spectro®. Анализ данных выполняется с использованием программного обеспечения GraphPad Prism™. Статистическую значимость в группах определяют посредством однофакторного Anova с рассчитанными апостериорным критерием множественного сравнения Turkey и стандартной погрешностью среднего (SEM±). Измеряют производство IL2p70, IL1β, IL6, KC-GRO и TNF-α при помощи CD11c<sup>+</sup> ДК. Измеряют экспрессию IL2p70, IL1β, IL6, и TNF-α ДК, полученными от человеческих моноцитов.

Пример 10.

Стабильность в плазме 103а.

Стабильность в плазме можно измерить в соответствии со следующим протоколом.

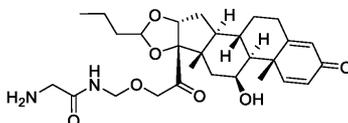
Предварительно нагретый 0.05 М фосфат натрия и 0.07 М NaCl буфер, pH 7.4: 14.505 г/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 1.483 г/л NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O и 4.095 г/л NaCl растворили в деионизированной воде. Основной раствор затем титровали фосфорной кислотой до pH 7.40 и хранили в охлажденном состоянии до 7 дней. pH проверили в день эксперимента и корректировали, если внешние характеристики составляли 7.4±1.

Подготовка плазмы: замороженную плазму оттаивали при температуре 37°C. Плазму центрифугировали при 3000 об/мин на протяжении 8 мин для удаления сгустков, пипетировали и супернатант собрали в качестве плазмы, которая будет использоваться в эксперименте. pH плазмы проверили и записали и плазму применяли только в диапазоне pH от 7.4 до 8. Если уровень pH превышал 8, плазму утилизировали. Первоначальный уровень pH плазмы не корректировали до pH 7.4 при помощи кислоты или посредством барботирования CO<sub>2</sub>. При использовании инкубатора 5% CO<sub>2</sub> и PBS буфера pH of 7.4 достигли спустя 4 ч равновесного диализа. Плазму положили на лед до использования.

Раствор добавки исследуемых соединений и эталонных соединений. 0.5 мМ раствор добавки исследуемых соединений А: 10 мкл 10 мМ исходного раствора исследуемых соединений добавили к 190 мкл DMSO. 0.02 мМ раствор добавки В: 40 мкл раствора добавки А добавили к 960 мкл 0.05 мМ буфера фосфата натрия с 0.5% BSA.

Плазму и раствор добавки В предварительно нагревали при 37°C в течение 5 мин. 10 мкл предварительно нагретого раствора добавки В добавили в лунки, выбранные для всех временных точек (0, 0.25, 1, 8, 24 ч). Для 0-мин 400 мкл ACN с содержанием IS добавили в лунки планшета 0-мин и затем добавили 90 мкл плазмы. 90 мкл предварительно нагретой плазмы добавили в лунки, назначенные для временных точек (0.25, 1, 8, 24 ч) и запустили отсчет времени. По истечении 0.25, 1, 8, 24 ч 400 мкл ACN с содержанием IS добавили в лунки соответствующих планшетов, соответственно, чтобы остановить реакцию. После охлаждения планшеты встряхивали на вибраторе (ПСА, MTS 2/4) на протяжении 10 мин (600 об/мин) и затем центрифугировали с 5594 g в течение 15 мин (Thermo Multifuge×3R). 50 мкл супернатанта из каждой лунки перенесли на 96-луночный планшет образцов с содержанием 50 мкл ультрачистой воды (Millipore, ZMQS50F01) для анализа LC/MS.

Данные стабильности в человеческой плазме для соединения 103а показаны в нижеприведенной таблице.



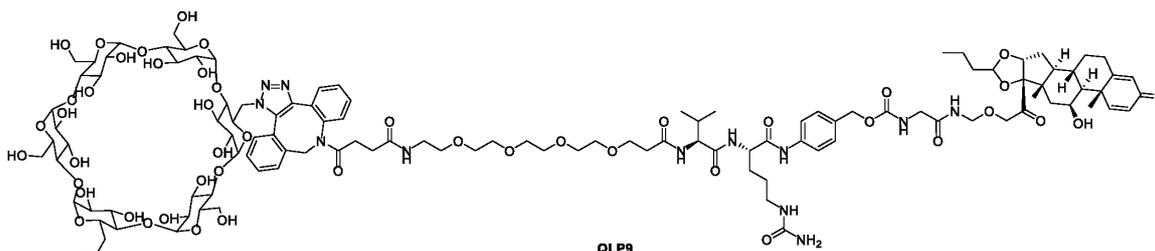
Исследуемый образец	Оставшийся процент (%)					T <sub>1/2</sub> (ч)
	0ч	0.25ч	1ч	8ч	24ч	
Прокаин	100.00	НПКО	НПКО	НПКО	НПКО	<0.25
<b>103а</b>	100.00	107.04	96.48	78.87	38.03	<b>16.79</b>
	Отношение площадей					
Будесонид, высвобожденный из <b>103а</b>	0.054	0.052	0.042	0.047	0.049	

НПКО: ниже предела количественного обнаружения.

Пример 11.

Стабильность pH линкер-нагрузки.

Поскольку растворимость нагрузки 103а,b и их линкер-нагрузок LP9,10 низкие (<0.02 мг/мл вод. DMSO (20%)), стабильность pH этих соединений не анализировалась. LP9 охладили при помощи CD-N3 и получили следующее соединение QLP9, которое было растворимо в воде и использовалось для теста на стабильность pH.



Синтез соединения QLP9: К раствору LP9 (5 мг, 3.4 мкмоль) в DMF (1.0 мл) добавили соединение

CD-N<sub>3</sub> (7.0 мг, 6.8 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ на протяжении ночи, что контролировали посредством LCMS. Реакционную смесь очистили напрямую при rper-HPLC и получили соединение QLP9 (5 мг, 60% выход) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 819.0 (M/3 + H)<sup>+</sup>.

pH стабильность в буферах: Стабильность QLP9 в DMSO, pH 5.0, 7.4 и 8.5 PBS буферах (с содержанием 20% DMSO) проанализировали, и соединение оказалось стабильным в таких растворах спустя 7 дней.

Пример 12.

Клеточный анализ репортерного гена люциферазы глюкокортикоидного рецептора (ГР).

Для анализа активности агониста ГР описанных здесь соединений применили клеточный анализ репортерного гена люциферазы ГР. В ходе данного анализа использовали следующие материалы.

	Информация о векторе (если применимо)
Клетки HEK293	ATCC, кат. № CRL-1573
HEK293/UAS-Luc/pBIND GR	
Питательная среда: DME с высоким содержанием глюкозы, 10% FBS, 100 ед/мл пенициллина, 100 мг/мл, стрептомицин, 53 мкг/мл глутамин, 100 мкг/мл гигромицин, 500 мкг/мл G418	
DME с высоким содержанием глюкозы, 500 мл	Irvine Scientific #9033
Фетальная бычья сыворотка	Saradigm # 1500-500
L-глутаминовый раствор пенициллина-стрептомицина 100X	Gibco # 10378-016
Вектор pGL4.35[Luc2p/9xGAL 4UAS/гигро]	Promega, кат. № E137A
Вектор pBIND-GR, селективный маркер представляет собой нсомицин	Promega, кат. № E158A
Гигромицин-B 100 мг/мл	InvivoGen # ant-hg-5
G418 100 мг/мл	GIBCO #11811-098
96-луночный планшет для иммуноанализа Nunclon delta, стерильный, белый, с плоским дном	Thermo Scientific # 13610
Среда для анализа: Та же, что и питательная среда	
DMSO диметиламин сульфоксид, для культивирования клеток	ATCC. #4-x.
ONE Glo	Promega, кат. № E6130
Прибор	Планшетный ридер Envision, Perkin Elmer
Планшеты для разведения	Axygen Scientific, кат. № P-DW-11-C-S
Трипсин-EDTA	Millipore кат. №SM-2004-C
PBS 1X без солей кальция и магния	Irvine Scientific # 9240
Исследуемое соединение <b>1a</b>	Sigma/1278201 /RO36WO
Исследуемое соединение <b>100</b>	
Исследуемое соединение <b>105a</b>	
Исследуемое соединение <b>103a</b>	
Исследуемое соединение <b>103b</b>	
Исследуемое соединение Дексаметазон	Sigma/D1756-25MG/BCBV3214

Для получения клеточной линии для анализа клетки HEK293 ко-трансфицировали векторами pBind-GR (Promega, кат. № E158A) и pGL4.35 [Luc2P/9xGAL4UAS/гигро] (Promega, кат. № E137A). Вектор pBind-GR экспрессирует слитый белок, состоящий из дрожжевого Gal4DNA-связывающего домена и ГР лиганд-связывающего домена, который может связываться с активирующей последовательностью (АП) Gal4 в векторе экспрессии люциферазы и индуцировать экспрессию люциферазы после связывания с агонистом ГР. Селекцию клеток выполняли на протяжении минимум 2 недель в G418+ гигромицин. Полученная клеточная линия называется HEK293/UASLuc/pBIND-GR.

Клетки посеяли в 96-луночные планшеты (20000 клеток/лунока) в среду для анализа (DME с высо-

ким содержанием глюкозы, дополненной 10% FBS, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 53 мкг/мл глутамин, 500 мкг/мл G418 и 100 мкг/мл гигромицина) за один день до анализа. Трехкратные последовательные разведения исследуемых соединений приготовили в 100% DMSO, перенесли в свежую среду для анализа и добавили к клеткам. Итоговую концентрацию DMSO поддерживали на постоянном уровне в 0.2%, а итоговые концентрации исследуемых соединений варьировались от 100 нМ до 0.015 нМ. Последняя лунка в планшете служила пустой контрольной пробой, содержащей только среду для анализа, и 0.2% DMSO (необработанная лунка), и для нее был построен график как продолжение 3-кратного последовательного разведения.

Через сорок восемь часов активность люциферазы определили после добавления реактива One-Glo™ (Promega, кат. № E6130). Относительные световые единицы (ОСЕ) измерили на люцинометре Epsilon (PerkinElmer), а значения EC<sub>50</sub> определили с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по десятиточечной кривой ответа на дозу (GraphPad Prism). Отношение сигнала к шуму (С/Ш) определили при помощи отношения макс. ОСЕ на кривой ответа на дозу к ОСЕ в необработанных лунках.

Как показано в нижеприведенной таблице, значения EC<sub>50</sub> варьировались от 51.8 пМ до 3.24 нМ, а значения С/Ш варьировались от 12.4 до 17.3. Исследуемое соединение 100 оказалось в 5.6 раз более эффективным по сравнению с 1a (будесонидом) и в 5.9 раз более эффективным по сравнению с Дексаметазоном. Спейсерное присоединение к 1a для получения 103a дало значения EC<sub>50</sub>, сопоставимые с 1a. Аналогичным образом, спейсерное присоединение к 100 для получения 103b дало значения EC<sub>50</sub>, сопоставимые с 100. Спейсерное присоединение к 100 для получения 105a дало значения EC<sub>50</sub>, которые были в 2.7 раз менее эффективными по сравнению с 100. Значения С/Ш были сопоставимыми для всех исследуемых соединений.

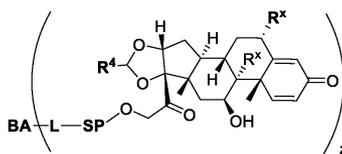
Активность репортера ГР под воздействием агонистов ГР.

Исследуемое соединение	EC <sub>50</sub> (М)	С/Ш
Дексаметазон	3.24E-09	17.3
<b>1a</b>	3.06E-10	15.3
<b>103a</b>	4.84E-10	14.6
<b>100</b>	5.47E-11	14.5
<b>103b</b>	5.18E-11	16.6
<b>105b</b>	1.49E-10	12.4

Описанные выше варианты осуществления и примеры даны исключительно в иллюстративных целях и являются неограничивающими. Специалистам в данной области известны способы выполнения стандартной экспериментальной работы, множество эквивалентов конкретных соединений, материалы и процедуры. Считается, что все такие эквиваленты входят в пределы объема приложенной формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

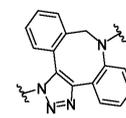
##### 1. Соединение формулы (III)



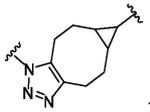
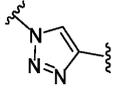
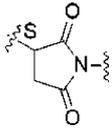
(III);

или его фармацевтически приемлемая соль или стереоизомер, где R<sup>4</sup> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил; оба R<sup>x</sup> представляют собой водород или оба R<sup>x</sup> представляют собой фтор; и SP представляет собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-NR<sup>50</sup>C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-NR<sup>50a</sup>-, где терминальный NR<sup>50a</sup> присоединяется к L; R<sup>50</sup> и R<sup>50a</sup> представляют собой независимо водород или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил; z представляет собой целое число, выбранное от 1 до 30 включительно; L представляет собой линкер формулы -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-(L<sup>3</sup>)<sub>0-1</sub>-; где L<sup>1</sup> присоединен к BA и L<sup>3</sup> присоединен к SP;

L<sup>1</sup> представляет собой остаток реакционноспособной группы, выбранный из



или его

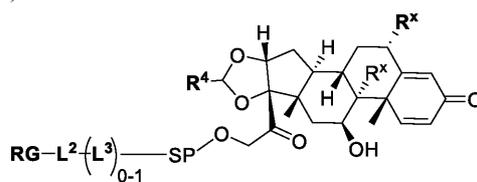
региоизомер;  ;  или его региоизомер; или  , где S относится к атому серы на остатке цистеина, через который остаток реакционноспособной группы присоединяется к ВА, и  , где N относится к атому азота на остатке лизина, через который остаток реакционноспособной группы соединяется с ВА;

$L^2$  является связующим линкером;

$L^3$ , если присутствует, представляет собой саморасщепляющийся линкер; и

ВА представляет собой антитело, фрагмент антитела или его антиген-связывающий фрагмент.

2. Соединение формулы (II)



(II);

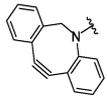
или его фармацевтически приемлемая соль, или стереоизомер,

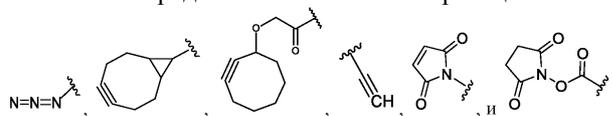
где  $R^4$  представляет собой  $C_1$ - $C_6$ -алкил;

оба  $R^x$  представляют собой водород или оба  $R^x$  представляют собой фтор;

SP представляет собой  $-(C_1-C_{10}\text{-алкилен})-NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}\text{-алкилен})-NR^{50a}-$ , где терминальный  $NR^{50a}$  присоединяется к  $(L^3)_{0-1}$ ;

$R^{50}$  и  $R^{50a}$  представляет собой независимо водород или  $C_1$ - $C_6$ -алкил;

RG представляет собой реакционноспособную группу, выбранную из 



$L^2$  представляет собой соединительный линкер; и

$L^3$ , если имеется, представляет собой саморасщепляющийся линкер.

3. Соединение по п.1 или 2, где  $R^4$  представляет собой линейный или разветвленный  $C_1$ - $C_6$ -алкил.

4. Соединение по любому из пп.1-3, где  $R^4$  находится в (R)-конфигурации.

5. Соединение по любому из пп.1-4, где SP представляет собой  $-(\text{линейный } C_1-C_3\text{-алкилен})-NR^{50}C(O)-(\text{линейный } C_1-C_3\text{-алкилен})-NR^{50a}-$ .

6. Соединение по любому из пп.1-5, где  $R^{50}$  и  $R^{50a}$  представляет собой независимо водород или метил.

7. Соединение по любому из пп.1-5, где  $R^{50}$  и  $R^{50a}$  представляет собой в каждом случае водород.

8. Соединение по любому из пп.1-5, где  $R^{50}$  и  $R^{50a}$  представляет собой в каждом случае метил.

9. Соединение по любому из пп.1-8, где оба  $R^x$  представляют собой водород.

10. Соединение по любому из пп.1-8, где оба  $R^x$  представляют собой фтор.

11. Соединение формулы (III) по любому из пп.1 и 3-10, где z выбирается от 1 до 10 включительно.

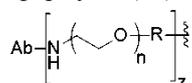
12. Соединение формулы (III) по любому из пп.1 и 3-11, где z выбирается от 2 до 4 включительно.

13. Соединение формулы (III) по любому из пп.1 и 3-12, где z равно 4.

14. Соединение формулы (III) по любому из пп.1 и 3-12, где z равно 2.

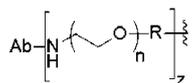
15. Соединение формулы (III) по любому из пп.1 и 3-14, где ВА содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

16. Соединение формулы (III) по любому из пп.1 и 3-15, где ВА содержит антитело, имеющее сле-



дующую структуру, где Ab представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, фрагмент антитела или биспецифическое антитело; R представляет собой  $C_{2-4}$ -алкилен, n представляет собой целое число от 1 до 10 включительно, и z представляет собой целое число от 1 до 10 включительно.

17. Соединение формулы (III) по любому из пп.1 и 3-16, где ВА содержит антитело, имеющее сле-

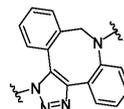


дующую структуру, где Ab представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, фрагмент антитела или биспецифическое антитело; R представляет собой C<sub>2-4</sub>-алкилен; и n представляет собой целое число, выбранное от 2 до 4 включительно.

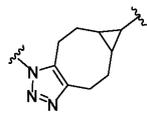
18. Соединение формулы (III) по любому из пп.1 и 3-17, где ВА содержит антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который связывает сквенджер-рецептор макрофагов 1 (MSR1).

19. Соединение формулы (III) по любому из пп.1 и 3-18, где L представляет собой -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>, где L<sup>1</sup> присоединяется к ВА и L<sup>2</sup> присоединяется к SP; и где L<sup>1</sup> представляет собой остаток реактивной группы и L<sup>2</sup> представляет собой соединительный линкер.

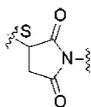
20. Соединение формулы (III) по любому из пп.1 и 3-18, где L представляет собой -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>.



21. Соединение формулы (III) по п.19 или 20, где L<sup>1</sup> выбирается из

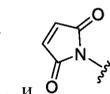
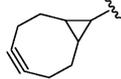
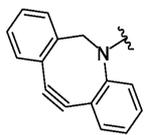


; или региоизомера; и

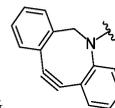


где S означает атом серы на цистеиновом остатке, через который остаток реактивной группы присоединяется к ВА.

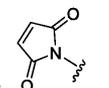
22. Соединение формулы (II) по любому из пп.2-10, где RG выбирается из



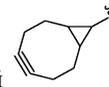
23. Соединение формулы (II) по любому из пп.2-10, где RG представляет собой



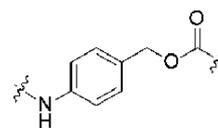
24. Соединение формулы (II) по любому из пп.2-10, где RG представляет собой



25. Соединение формулы (II) по любому из пп.2-10, где RG представляет собой



26. Соединение по любому из пп.1-21, где для соединения формулы (III) L представляет собой -L<sup>1</sup>-

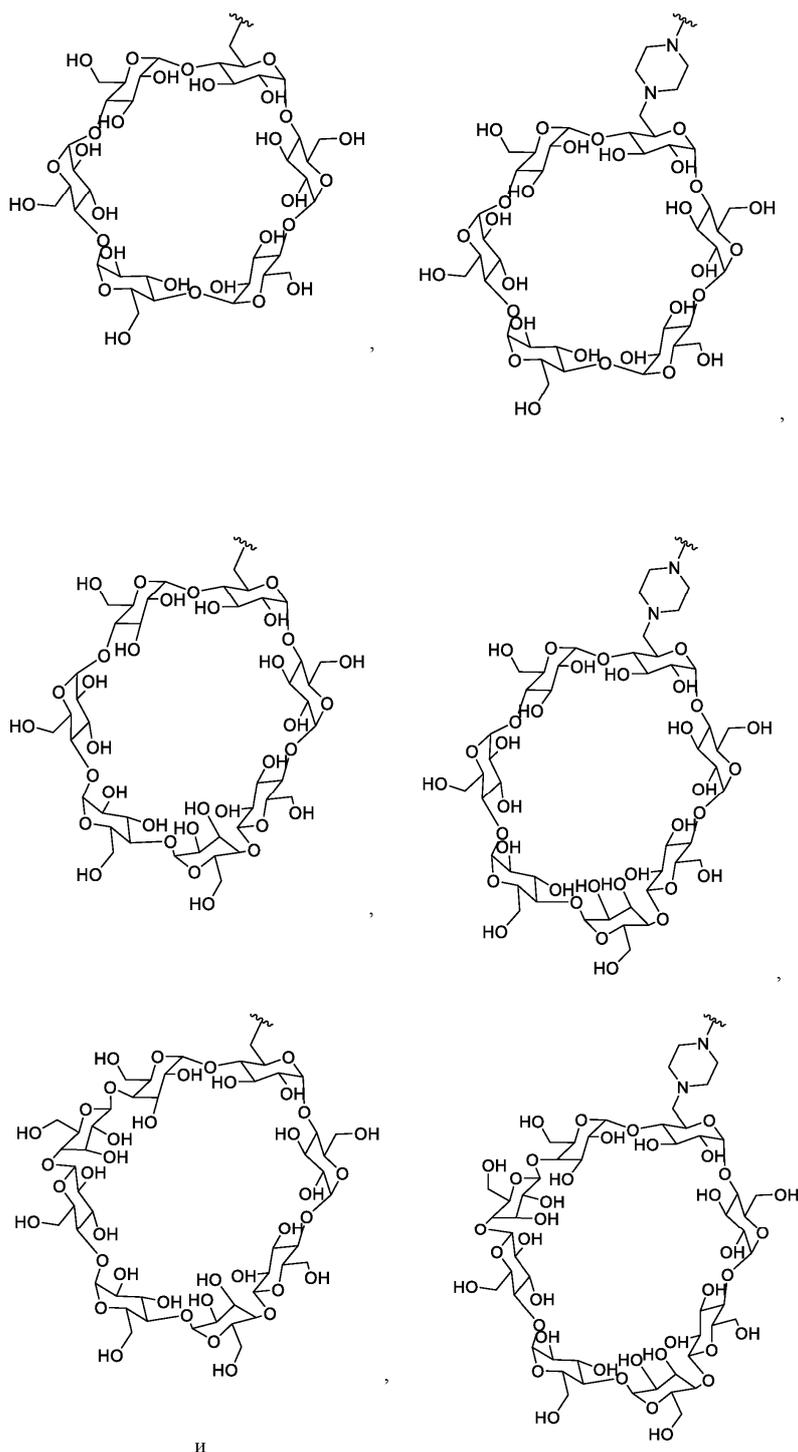


L<sup>2</sup>-(L<sup>3</sup>)<sub>0-1</sub>; и где L<sup>3</sup> в соединении формулы (II) или (III) представляет собой где -NH- группа присоединяется к L<sup>2</sup>, когда SP представляет собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-NR<sup>50</sup>C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкилен)-NR<sup>50a</sup>-; или L<sup>3</sup> в соединении формулы (II) или (III) отсутствует.

27. Соединение по любому из пп.1-26, где для соединения формулы (III) L представляет собой -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-(L<sup>3</sup>)<sub>0-1</sub>; и где L<sup>2</sup> в соединении формулы (II) или (III) содержит PEG, дипептидный остаток, трипептидный остаток, тетрапептидный остаток, пентапептидный остаток, -C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, циклодекстриновый (CD) остаток или -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)- или любую их комбинацию.

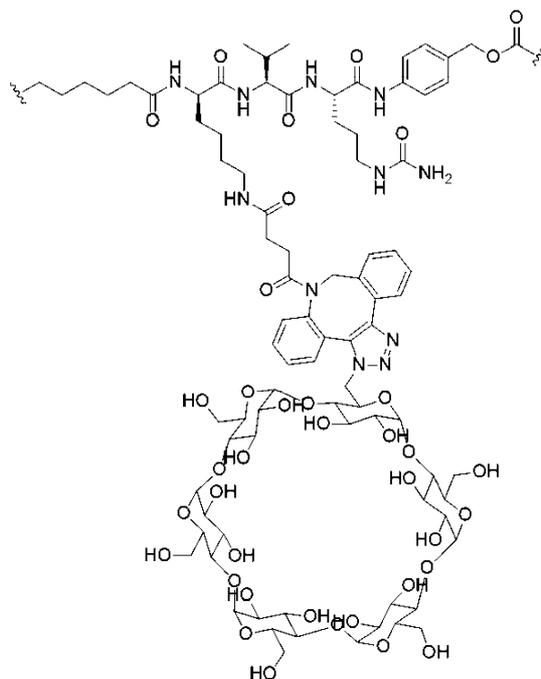
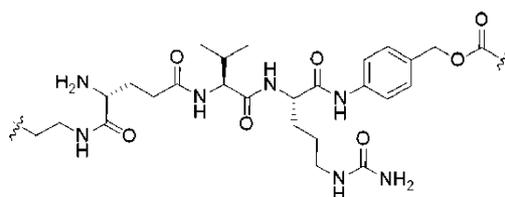
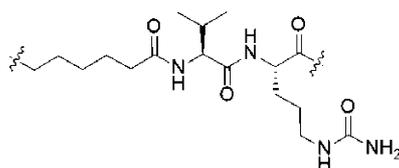
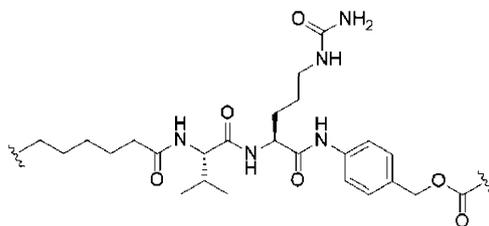
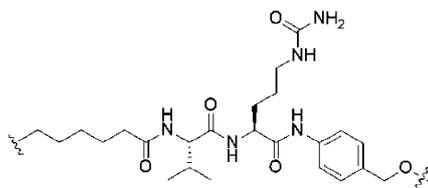
28. Соединение по любому из пп.1-26, где для соединения формулы (III) L представляет собой -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-(L<sup>3</sup>)<sub>0-1</sub>; и где L<sup>2</sup> в соединении формулы (II) или (III) содержит





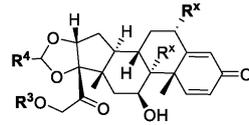
31. Соединение по любому из пп.1-25, где для соединения формулы (III) L представляет собой  $-L^1-L^2-(L^3)_{0-1}-$ ; и где  $-L^2-(L^3)_{0-1}-$  в соединении формулы (II) или (III) содержит

045111





## 32. Соединение формулы (I)



(I);

или его фармацевтически приемлемая соль, или стереоизомер,

где  $R^4$  представляет собой  $-C_1-C_6$ -алкил;

a) оба  $R^x$  представляют собой водород; и

$R^3$  представляет собой  $-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50a}R^{50b}$ ; или

b) оба  $R^x$  представляют собой фтор; и

$R^3$  представляет собой  $-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50}C(O)-(C_1-C_{10}$ -алкилен)- $NR^{50a}R^{50b}$ ; и

в каждом случае  $R^{50}$ ,  $R^{50a}$  и  $R^{50b}$  представляет собой независимо водород или  $C_1-C_6$ -алкил.

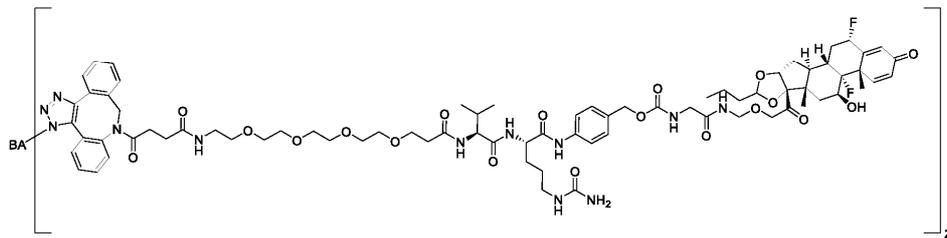
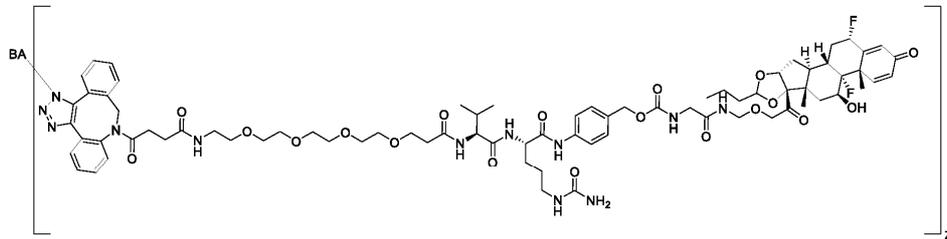
33. Соединение по п.32, где  $R^4$  представляет собой  $C_1-C_6$ -алкил.

34. Соединение по п.32 или 33, где  $R^4$  находится в (R)-конфигурации.

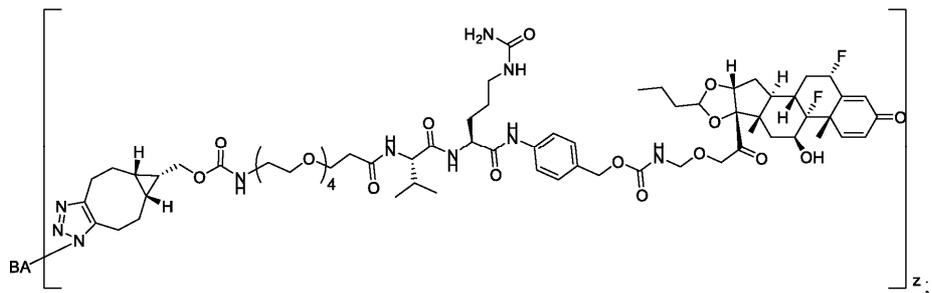
35. Соединение по любому из пп.33, 34, где оба  $R^x$  представляют собой водород.

36. Соединение по любому из пп.33, 34, где оба  $R^x$  представляют собой фтор.

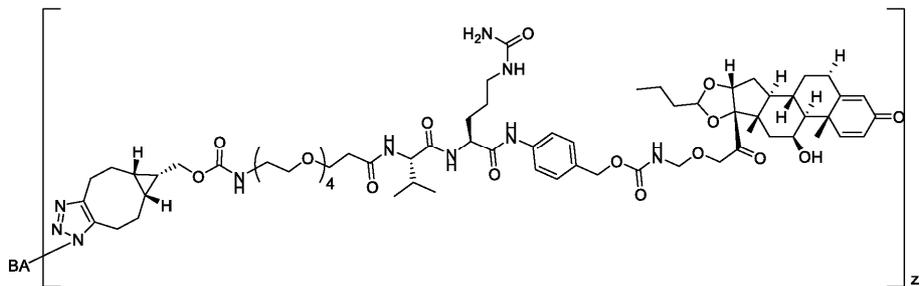
37. Соединение одной из следующих формул:



или их смесь;



или



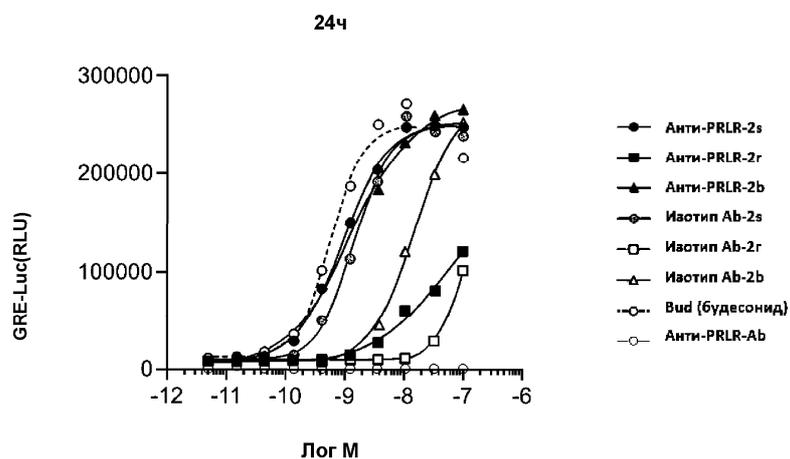
38. Способ лечения заболевания, нарушения или состояния, связанного с сигнализацией глюкокортикоидного рецептора, включающий введение пациенту с упомянутым заболеванием, нарушением или

состоянием терапевтически эффективного количества соединения формулы (III) по любому из пп.1, 3-21, 26-31 и 37.

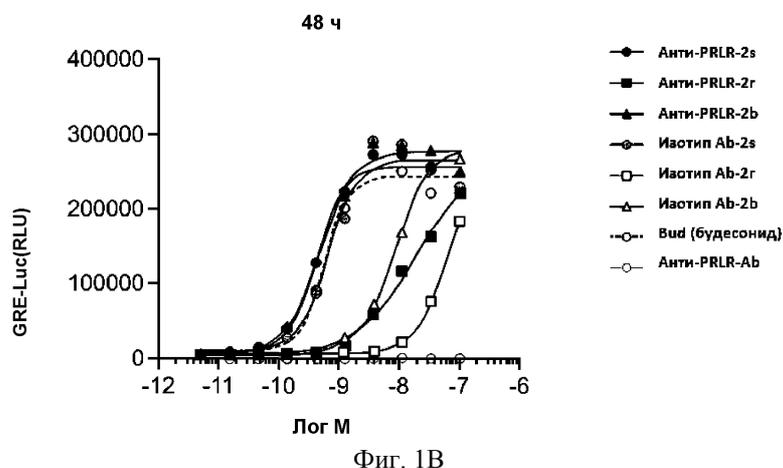
39. Способ по п.38, когда таким заболеванием, нарушением или состоянием является воспалительное заболевание, нарушение или состояние.

40. Способ по п.38 или 39, когда уменьшаются побочные действия, связанные с введением неконъюгированной стероидной нагрузки указанного соединения.

**Влияние полезной нагрузки линкера на ГР активацию стероидных конъюгатов ADC, согласно тестам в НЕК293/PRLR/GRE-Luc клетках**



**Влияние полезной нагрузки линкера на ГР активацию стероидных конъюгатов ADC, согласно тестам в НЕК293/PRLR/GRE-Luc клетках**



Влияние полезной нагрузки линкера на ГР активацию стероидных конъюгатов ADC, согласно тестам в HEK293/PRLR/GRE-Luc клетках

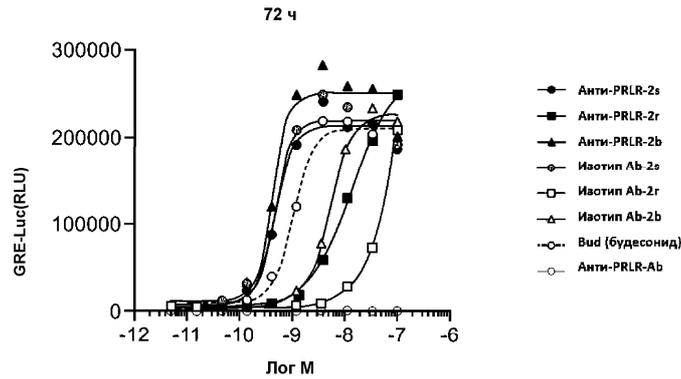


ТАБЛИЦА 8

Молекула	HEK293/PRLR/GRE-Luc клетки		
	EC <sub>50</sub> (24 ч)	EC <sub>50</sub> (48 ч)	EC <sub>50</sub> (72 ч)
Анти-PRLR Ab-2s	0.9078	0.4239	0.4823
Анти-PRLR Ab-2r	34.98	18.33	13.35
Анти-PRLR Ab-2b	1.225	0.4674	0.4291
Изотип Ab-2s	1.461	0.6594	0.4904
Изотип Ab-2r	109.2	64.01	310.9
Изотип Ab-2b	15.04	8.201	5.243
1a	0.5732	0.5679	1.043

Фиг. 1С

Влияние полезной нагрузки линкера на ГР активацию стероидных конъюгатов ADC, согласно тестам в HEK293/PRLR/GRE-Luc клетках

Стероид ADC\_72ч

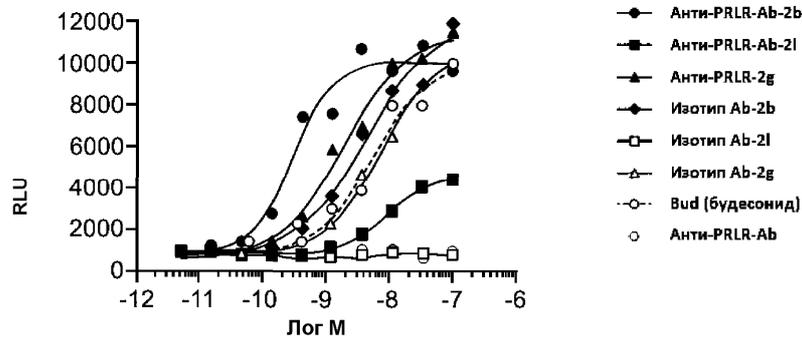


ТАБЛИЦА 9

Стероидные ADC	HEK293/PRLR/GRE-Luc клетки EC <sub>50</sub> (нМ) через 72 часа
Анти-PRLR Ab-2b	0.29
Анти-PRLR Ab-2l	8.98
Анти-PRLR Ab-2i	>90.9
Анти-PRLR Ab-2g	1.90
Изотип Ab-2b	4.16
Изотип Ab-2l	HA
Изотип Ab-2i	HA
Изотип Ab-2g	7.11
Будесонид (1a)	5.42
Анти-PRLR Ab	HA
Изотип Ab	HA

Фиг. 2

Схема 1 Синтез спейсер-будесонида 1с-1е, 1g-1i и 1j-1l

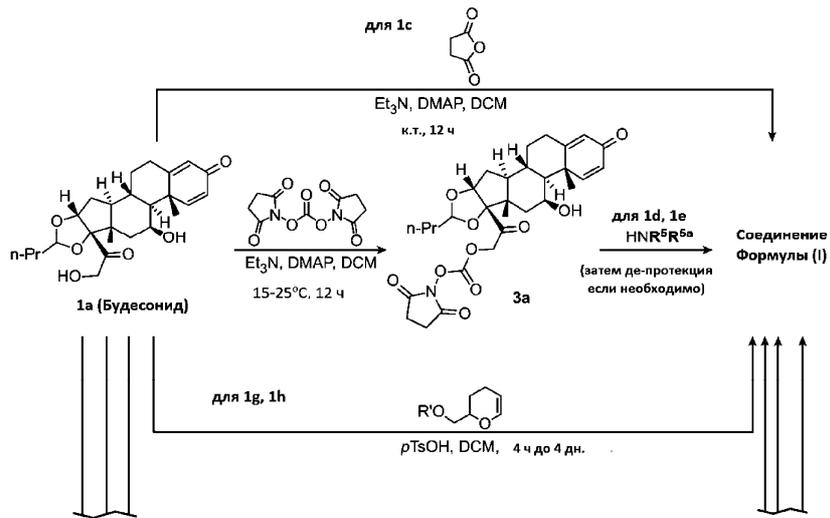
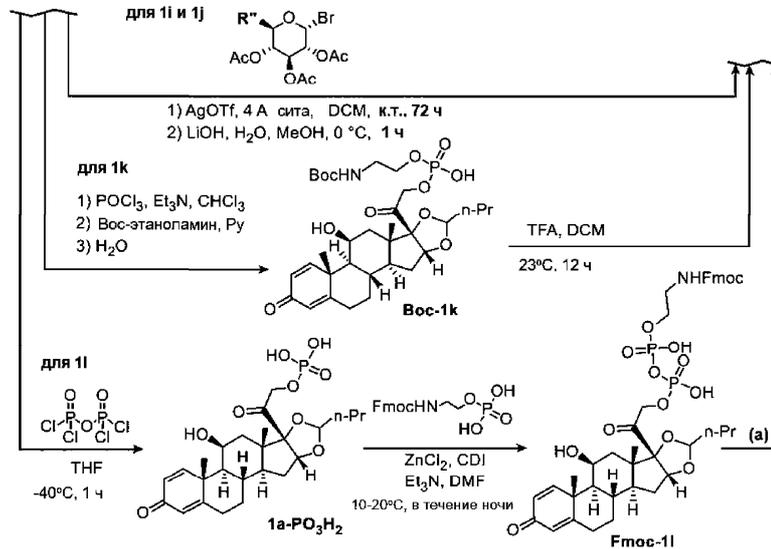


Схема 1 Синтез спейсер-будесонида 1с-1е, 1g-1i и 1j-1l



(a) пиперидин, DCM, 10-20°C, 16 ч

где Соединение по Формуле (I) представляет собой 1с, 1d, 1е, 1g, 1h, 1i, 1j, 1k, 1l

Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2