

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390135 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.16(22) Дата подачи заявки
2021.06.23(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
C07K 5/062 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(54) ТУБУЛИЗИНЫ И КОНЬЮГАТЫ БЕЛОК-ТУБУЛИЗИН

(31) 63/043,771

(32) 2020.06.24

(33) US

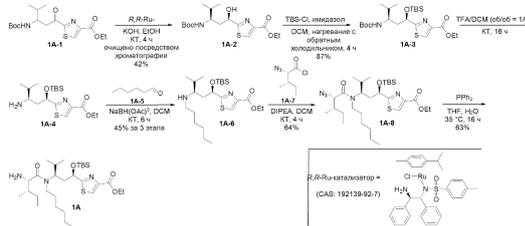
(86) PCT/US2021/038781

(87) WO 2021/262910 2021.12.30

(88) 2022.04.21

(71) Заявитель:
РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)(72) Изобретатель:
Хан Эми (US)(74) Представитель:
Безрукова О.М. (RU)

(57) В изобретении представлены соединения, композиции и способы лечения заболеваний и нарушений, ассоциируемых с раком, включая тубулизины и их конъюгаты белок (например, антитело)-лекарственное средство.



Синтез промежуточного соединения 1А

202390135

A1

A1

202390135

ТУБУЛИЗИНЫ И КОНЬЮГАТЫ БЕЛОК-ТУБУЛИЗИН

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ

[0001] Для настоящей заявки испрашивается приоритет относительно Предварительной заявки США № 63/043,771, поданной 24 июня 2020 года, содержание которой включается в настоящий документ полностью посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Здесь представлены новые тубулизины и их белковые конъюгаты, а также способы лечения различных заболеваний, нарушений и состояний, включающие введение тубулизинов и их белковых конъюгатов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] При том, что конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) находят все большее применение в схемах лечения рака, *de novo* или возникающие после начала лечения механизмы резистентности могут уменьшать клиническую пользу. Два механизма резистентности, которые возникают после продолжительного применения ADC *in vitro*, включают повышающую регуляцию транспортеров, которые обеспечивают множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) и утрату экспрессии когнатного антигена. Новые технологии, которые позволяют преодолеть эти механизмы резистентности, могут способствовать расширению сферы применения ADC следующего поколения.

[0004] Тубулизины, впервые выделенные из бульонной среды миксобактериальной культуры, представляют собой группу чрезвычайно сильных ингибиторов полимеризации тубулина, которые быстро дезинтегрируют цитоскелет делящихся клеток и индуцируют апоптоз. Тубулизины состоят из *N*-метил-D-пипеколиновой кислоты (Mer), L-изолейцина (Ile) и тубувалина (Tuv), который содержит необычный *N,O*-ацеталь и вторичную спиртовую или ацетокси группу. Тубулизины A, B, C, G и I содержат C-концевую тубутирозиновую (Tut) γ -аминокислоту, а у D, E, F и H в этой позиции имеется тубуфенилаланин (Tup) (*Angew. Chem.*^[1]*Int. Ed. Engl.* 43, 4888–4892).

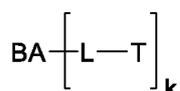
[0005] Тубулизины представляют собой перспективные противораковые средства ввиду своей высокой активности в клетках с устойчивостью к лекарственным средствам посредством подтвержденного механизма действия. Средняя активность в отношении ингибирования роста клеток превосходит активность хорошо известных эпитилонов, винбластинов и таксолов от 10 раз до более, чем 1000 раз, включая активность против карциномы с множественной лекарственной устойчивостью (*Biochem. J.* 2006, 396, 235-

242; *Nat. Prod. Rep.* 2015, 32, 654-662). Тубулизины имеют чрезвычайно высокую антипролиферативную активность против раковых клеток, включая клетки рака шейки матки KB-V1 с множественной лекарственной устойчивостью. (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4888-4892; и *Biochemical Journal* **2006**, 396, 235-242).

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Здесь представлены соединения, полезные, например, в противоопухолевой и антиангиогенной терапии.

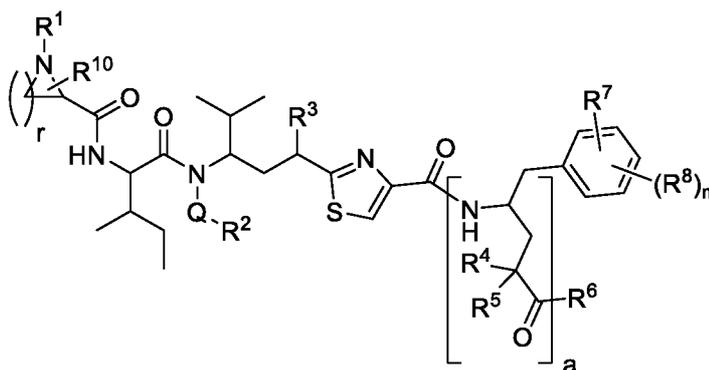
[0007] В одном варианте осуществления здесь представлены соединения, имеющие формулу



или их фармацевтически приемлемая соль, при этом

BA представляет собой связующий агент;

L представляет собой линкер, ковалентно связанный с **BA** и с **T**;



T представляет собой _____, при этом

R¹ представляет собой связь, водород, C₁-C₁₀ алкил, первый остаток N-концевой аминокислоты, первый аминокислотный остаток, -C₁-C₁₀ алкил-NR^{3a}R^{3b} или -C₁-C₁₀ алкил-OH;

R³ представляет собой гидроксил, -O-, -O-C₁-C₅ алкил, -OC(O)C₁-C₅ алкил, -OC(O)N(H)C₁-C₁₀ алкил, -OC(O)N(H)C₁-C₁₀ алкил-NR^{3a}R^{3b}, -NHC(O)C₁-C₅ алкил или -OC(O)N(H)(CH₂CH₂O)_nC₁-C₁₀ алкил-NR^{3a}R^{3b},

при этом **R^{3a}** и **R^{3b}** представляют собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил, при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R⁴ и **R⁵** независимо в каждом случае представляют собой водород или C₁-C₅ алкил;

R⁶ представляет собой -OH, -O-, -NHNH₂, -NHNH-, -NHSO₂(CH₂)_{a1}-арил-(CH₂)_{a2}NR^{6a}R^{6b},

при этом арил замещен или не замещен; и

R^{6a} и **R^{6b}** представляет собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил, при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R⁷ представляет собой независимо в каждом случае водород, –OH, –O–, галоген или –NR^{7a}R^{7b},

при этом **R^{7a}** и **R^{7b}** представляют собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил, ацил, –C(O)CH₂OH, –C(O)CH₂O–, первый остаток *N*-концевой аминокислоты, первый аминокислотный остаток, первый остаток *N*-концевого пептида, первый пептидный остаток, –CH₂CH₂NH₂ и –CH₂CH₂NH–; при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R⁸ представляет собой независимо в каждом случае водород, –NHR⁹ или галоген,

при этом **R⁹** представляет собой водород, –C₁-C₅ алкил или –C(O)C₁-C₅ алкил; и **m** имеет значение 1 или 2;

R¹⁰, при его наличии представляет собой –C₁-C₅ алкил;

Q представляет собой –CH₂– или –O–, при этом

R² представляет собой алкил, алкилен, алкинил, алкинилен, региоизомерный триазол, региоизомерный триазилилен;

при этом указанный региоизомерный триазол или региоизомерный триазилилен не замещен или замещен алкилом, алкенилом, алкинилом, циклоалкилом, арилом, гетероарилом или ацилом;

при этом **n** представляет собой целое число от одного до десяти.

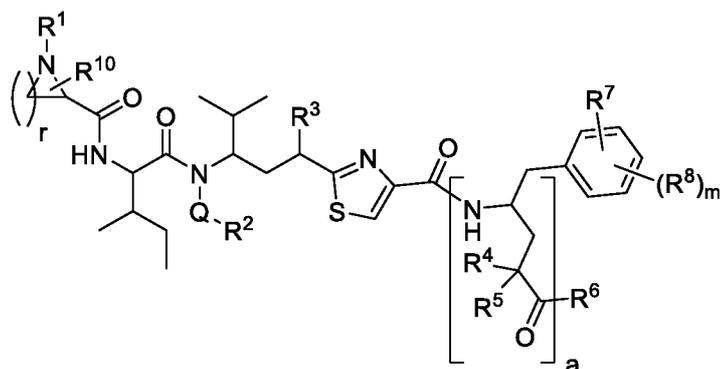
при этом **r** представляет собой целое число от одного до шести;

при этом **a**, **a1** и **a2** независимо имеют значение 0 или 1, и

k представляет собой целое число от одного до тридцати;

при этом **T** представляет собой не соединение **IVa**, **IVa'**, **IVb**, **IVc**, **IVd**, **IVe**, **IVf**, **IVg**, **IVh**, **IVj**, **IVk**, **IVl**, **IVm**, **IVn**, **IVo**, **IVp**, **IVq**, **IVr**, **IVs**, **IVt**, **IVu**, **IVvA**, **IVvB**, **IVw**, **IVx**, **IVy**, **Va**, **Va'**, **Vb**, **Vc**, **Vd**, **Ve**, **Vf**, **Vg**, **Vh**, **Vi**, **Vj**, **Vk**, **VIa**, **IVb**, **VIc**, **VId**, **VIe**, **VIg**, **VIh**, **VI**, **Vli**, **VII**, **VIII**, **IX**, **X**, **D-5a** и **D-5c** или его фармацевтически приемлемая соль, ковалентно связанная с **L**.

[0008] В одном варианте осуществления здесь представлены соединения, имеющие структуру Формулы I



Формула I

или их фармацевтически приемлемая соль, при этом

R¹ представляет собой водород, C₁-C₁₀ алкил, первый остаток *N*-концевой аминокислоты, -C₁-C₁₀ алкил-NR^{3a}R^{3b} или -C₁-C₁₀ алкил-OH;

R³ представляет собой гидроксил, -O-C₁-C₅ алкил, -OC(O)C₁-C₅ алкил, -OC(O)N(H)C₁-C₁₀ алкил, -OC(O)N(H)C₁-C₁₀ алкил-NR^{3a}R^{3b}, -NHC(O)C₁-C₅ алкил или -OC(O)N(H)(CH₂CH₂O)_nC₁-C₁₀ алкил-NR^{3a}R^{3b},

при этом **R^{3a}** и **R^{3b}** представляет собой независимо в каждом случае водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил, при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R⁴ и **R⁵** представляет собой независимо в каждом случае водород или C₁-C₅ алкил;

R⁶ представляет собой -OH, -NHNH₂, -NH₂SO₂(CH₂)_{a1}-арил-(CH₂)_{a2}NR^{6a}R^{6b},

при этом арил замещен или не замещен; и

R^{6a} и **R^{6b}** представляет собой независимо в каждом случае водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил, при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R⁷ представляет собой независимо в каждом случае водород, -OH, галоген или -NR^{7a}R^{7b},

при этом **R^{7a}** и **R^{7b}** представляют собой независимо в каждом случае водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил, ацил, -C(O)CH₂OH, первый остаток *N*-концевой аминокислоты, первый остаток *N*-концевого пептида и -CH₂CH₂NH₂; при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R⁸ представляет собой независимо в каждом случае водород, -NHR⁹ или галоген,

при этом **R⁹** представляет собой водород, -C₁-C₅ алкил или -C(O)C₁-C₅ алкил; и

m имеет значение 1 или 2;

R¹⁰, при его наличии представляет собой -C₁-C₅ алкил;

Q представляет собой -CH₂- или -O-, при этом

R² представляет собой алкил, алкинил или региоизомерный триазол;

при этом указанный региоизомерный триазол не замещен или замещен алкилом, алкенилом, алкинилом, циклоалкилом, арилом, гетероарилом и ацилом;

при этом n представляет собой целое число от одного до десяти.

при этом r представляет собой целое число от одного до шести;

при этом a , $a1$ и $a2$ независимо имеют значение 0 или 1, и

при этом T не представляет собой соединение **IVa**, **IVa'**, **IVb**, **IVc**, **IVd**, **IVe**, **IVf**, **IVg**, **IVh**, **IVj**, **IVk**, **IVl**, **IVm**, **IVn**, **IVo**, **IVp**, **IVq**, **IVr**, **IVs**, **IVt**, **IVu**, **IVvA**, **IVvB**, **IVw**, **IVx**, **IVy**, **Va**, **Va'**, **Vb**, **Vc**, **Vd**, **Ve**, **Vf**, **Vg**, **Vh**, **Vi**, **Vj**, **Vk**, **VIa**, **IVb**, **VIc**, **VI d**, **VIe**, **VI f**, **VIg**, **VIh**, **VI**, **VII**, **VIII**, **IX**, **X**, **D-5a**, **D-5c**, Тубулизин А-I, U-X или Z, Претубулизин D или N¹⁴-дезацетокситубулизин H.

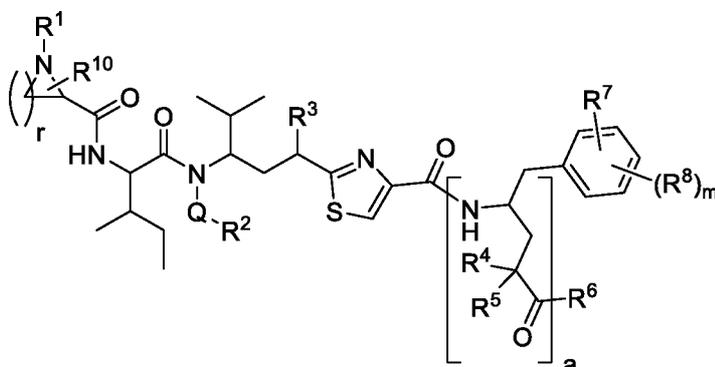
[0009] В другом варианте осуществления представлен способ лечения опухолей, которые экспрессируют антиген, выбираемый из группы, состоящей из PRLR и STEAP2.

[0010] В другом варианте осуществления представлено соединение линкер-нагрузка формулы



или его фармацевтически приемлемая соль, при этом

L представляет собой линкер, ковалентно связанный с **T**;



T представляет собой _____, при этом

R¹ представляет собой связь, водород, C₁-C₁₀ алкил, первый остаток N-концевой аминокислоты, первый аминокислотный остаток, -C₁-C₁₀ алкил-NR^{3a}R^{3b} или -C₁-C₁₀ алкил-OH;

R³ представляет собой гидроксил, -O-, -O-C₁-C₅ алкил, -OC(O)C₁-C₅ алкил, -OC(O)N(H)C₁-C₁₀ алкил, -OC(O)N(H)C₁-C₁₀ алкил-NR^{3a}R^{3b}, -NHC(O)C₁-C₅ алкил или -OC(O)N(H)(CH₂CH₂O)_nC₁-C₁₀ алкил-NR^{3a}R^{3b},

при этом **R^{3a}** и **R^{3b}** представляет собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил, при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R⁴ и **R⁵** представляет собой независимо в каждом случае водород или C₁-C₅ алкил;

R⁶ представляет собой –OH, –O–, –NHNH₂, –NHNH–, –NHSO₂(CH₂)_{a1}-арил-(CH₂)_{a2}NR^{6a}R^{6b},

при этом арил замещен или не замещен; и

R^{6a} и **R^{6b}** представляет собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил, при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R⁷ представляет собой независимо в каждом случае водород, –OH, –O–, галоген или –NR^{7a}R^{7b},

при этом **R^{7a}** и **R^{7b}** представляет собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил, ацил, –C(O)CH₂OH, –C(O)CH₂O–, первый остаток *N*-концевой аминокислоты, первый аминокислотный остаток, первый остаток *N*-концевого пептида, первый пептидный остаток, –CH₂CH₂NH₂ и –CH₂CH₂NH–; при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R⁸ представляет собой независимо в каждом случае водород, –NHR⁹ или галоген,

при этом **R⁹** представляет собой водород, –C₁-C₅ алкил или –C(O)C₁-C₅ алкил; и

m имеет значение 1 или 2;

R¹⁰, при его наличии представляет собой –C₁-C₅ алкил;

Q представляет собой –CH₂– или –O–, при этом

R² представляет собой алкил, алкилен, алкинил, алкинилен, региоизомерный триазол, региоизомерный триазолилен;

при этом указанный региоизомерный триазол или региоизомерный триазолилен не замещен или замещен алкилом, алкенилом, алкинилом, циклоалкилом, арилом, гетероарилом или ацилом;

при этом **n** представляет собой целое число от одного до десяти.

при этом **r** представляет собой целое число от одного до шести;

при этом **a**, **a1** и **a2** независимо имеют значение 0 или 1, и

при этом линкер-нагрузка представляет собой не соединение **LP1-IVa**, **LP2-Va**, **LP3-IVd**, **LP4-Ve**, **LP5-IVd**, **LP6-Vb**, **LP7-IVd**, **LP9-IVvB**, **LP10-VIh**, **LP11-IVvB**, **LP12-VIi**, **LP13-Ve**, **LP14-Ve**, **LP15-VIh**, **LP16-Ve**, **LP17-Ve**, **LP18-Ve**, **LP19-Ve**, **LP20-Ve**, **LP21-Ve**, **LP22-Ve**, **LP23-Vb**, **LP24-Vb**, **LP25-Ve** и **LP26-Ve** или его фармацевтически приемлемая соль.

[0011] В другом варианте осуществления здесь представлен конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с описанным здесь соединением.

[0012] В другом варианте осуществления здесь представлены способы приготовления соединений, линкер-нагрузок или конъюгатов антитело-лекарственное средство и композиций, которые здесь описаны.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАЦИЙ

[0013] На ФИГ. 1-11, 12А, 12В, 13А, 13В, 14, 15А, 15В, 15С и 16 показаны схемы синтетической химии для нагрузок тубулизина и линкер-нагрузок тубулизина, при этом каждая из них способна к конъюгации или конъюгирована с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0014] Здесь представлены соединения, композиции и способы, полезные для лечения, например, рака у субъекта.

Определения

[0015] При использовании в отношении описанных здесь соединений следующие термины имеют следующие значения, если не указано иное. Если не даны иные определения, все используемые здесь технические и научные термины имеют то значение, которое обычно подразумевается специалистом в данной области. Если имеется множество значений для приведенного здесь термина, эти определения будут иметь преимущественное значение, если не указано иное.

[0016] В контексте настоящего документа "алкил" означает одновалентный и насыщенный углеводородный радикал. Алкил необязательно замещен и может быть линейным, разветвленным или циклическим, т.е. циклоалкилом. Алкил включает, помимо прочего, радикалы с 1-20 атомами углерода, т.е. C₁₋₂₀ алкил; 1-12 атомами углерода, т.е. C₁₋₁₂ алкил; 1-10 атомами углерода, т.е. C₁₋₁₀ алкил; 1-8 атомами углерода, т.е. C₁₋₈ алкил; 5-10 атомами углерода, т.е. C₅₋₁₀ алкил; 1-5 атомами углерода, т.е. C₁₋₅ алкил; 1-6 атомами углерода, т.е. C₁₋₆ алкил; и 1-3 атомами углерода, т.е. C₁₋₃ алкил. Примеры алкильных групп включают, помимо прочего, метил, этил, *n*-пропил, *i*-пропил, *n*-бутил, *s*-бутил, *t*-бутил, *i*-бутил, пентильную группу, гексильную группу, циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил. Пентильная группа включает, помимо прочего, *n*-пентил и *i*-пентил. Гексильная группа включает, помимо прочего, *n*-гексил.

[0017] В контексте настоящего документа "алкилен" означает двухвалентную алкильную группу. Если не указано иное, алкилен содержит, но без каких-либо ограничений, 1-20 атомов углерода. Алкиленовая группа необязательно замещена, как описано здесь для алкила. В некоторых вариантах осуществления алкилен не замещен.

[0018] Обозначение аминокислоты или аминокислотного остатка без указания их стереохимии включает L- форму аминокислоты, D- форму аминокислоты или их рацемическую смесь.

[0019] В контексте настоящего документа “галоалкил” означает алкил, определение которому дано выше, при этом алкил включает минимум одного заместителя, который выбирается из галогена, например, фтора (F), хлора (Cl), брома (Br) или йода (I). Примеры галоалкилов включают, помимо прочего, $-\text{CF}_3$, $-\text{CH}_2\text{CF}_3$, $-\text{CCl}_2\text{F}$ и $-\text{CCl}_3$.

[0020] В контексте настоящего документа “алкенил” означает одновалентный углеводородный радикал, содержащий минимум два атома углерода и одну или более неароматических углерод-углеродных двойных связей. Алкенил необязательно замещен и может быть линейным, разветвленным или циклическим. Алкенил включает, но без каких-либо ограничений, радикалы, содержащие 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. Примеры алкенильных групп включают, помимо прочего, винил, пропенил, бутенил и циклогексенил.

[0021] В контексте настоящего документа “алкинил” означает одновалентный углеводородный радикал, содержащий минимум два атома углерода и одну или более углерод-углеродных тройных связей. Алкинил необязательно замещен и может быть линейным, разветвленным или циклическим. Алкинил включает, помимо прочего, радикалы, содержащие 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 атомов углерода, т.е., C_{2-4} алкинил. Примеры алкинильных групп включают, помимо прочего, этинил, пропилил и бутинил.

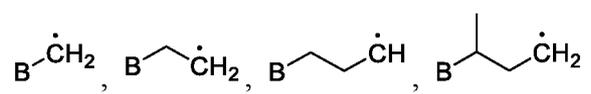
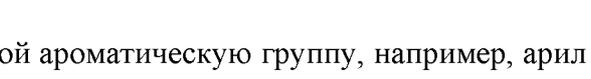
[0022] В контексте настоящего документа “алкокси” означает одновалентный и насыщенный углеводородный радикал, при этом углеводород включает одинарную связь с атомом кислорода и при этом радикал локализуется на атоме кислорода, например, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O}\cdot$ для этокси. Заместители алкокси связываются с соединением, которое они замещают, через этот атом кислорода заместителя алкокси. Алкокси необязательно замещен и может быть линейным, разветвленным или циклическим, т.е. циклоалкокси. Алкокси включает, помимо прочего, 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 атомов углерода, т.е., C_{1-3} алкокси. Примеры алкокси групп включают, помимо прочего, метокси, этокси, *n*-пропокси, *i*-пропокси, *n*-бутокси,

s-бутокси, *t*-бутокси, *i*-бутокси, пентокси группу, гексокси группу, циклопропокси, циклобутокси, циклопентокси и циклогексокси.

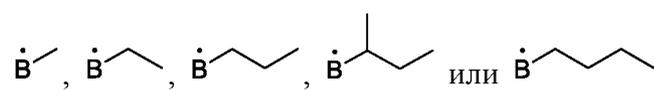
[0023] В контексте настоящего документа “галоалкокси” означает алкокси, определение чему было дано выше, при этом алкокси включает минимум одного заместителя, который выбирается из галогена, например, F, Cl, Br или I.

[0024] В контексте настоящего документа “арил” означает одновалентную группу, которая представляет собой радикал ароматического соединения, в котором кольцевыми атомами являются атомы углерода. Арил необязательно замещен и может быть моноциклическим или полициклическим, например, бициклическим или трициклическим. Примеры арильных групп включают, помимо прочего, группы, имеющие от 6 до 20 кольцевых атомов углерода, *m.e.*, C₆₋₂₀ арил; от 6 до 15 кольцевых атомов углерода, *m.e.*, C₆₋₁₅ арил, и от 6 до 10 кольцевых атомов углерода, *m.e.*, C₆₋₁₀ арил. Примеры арильных групп включают, помимо прочего, фенил, нафтил, флуоренил, азуленил, антрил, фенантрил и пиренил.

[0025] В контексте настоящего документа “арилалкил” означает одновалентную группу, которая представляет собой радикал алкильного соединения, при этом это алкильное соединение замещено ароматическим заместителем, т.е. ароматическое соединение содержит одинарную связь с алкильной группой и при этом радикал локализован на алкильной группе. Арилалкильная группа связывается с проиллюстрированной химической структурой через алкильную группу. Арилалкил

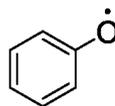
может быть представлен структурой, например,  или , при этом В представляет собой ароматическую группу, например, арил или фенил. Арилалкил необязательно замещен, т.е. арильная группа и/или алкильная группа может быть замещена так, как здесь описано. Примеры арилалкила включают, помимо прочего, бензил.

[0026] В контексте настоящего документа “алкиларил” означает одновалентную группу, которая представляет собой радикал арильного соединения, при этом арильное соединение замещено алкильным заместителем, т.е. арильное соединение содержит одинарную связь с алкильной группой и при этом радикал локализован на арильной группе. Алкиларильная группа связывается с проиллюстрированной химической структурой через арильную группу. Алкиларил может быть представлен структурой,

например, , при этом В представляет собой

ароматическая группа, например, фенил. Алкиларил необязательно замещен, т.е. арильная группа и/или алкильная группа может быть замещена так, как здесь описано. Примеры алкиларила включают, помимо прочего, толуил.

[0027] В контексте настоящего документа “арилокси” означает одновалентную группу, которая представляет собой радикал ароматического соединения, при этом кольцевыми атомами являются атомы углерода и при этом кольцо замещено кислородным радикалом, т.е. ароматическое соединение содержит одинарную связь с атомом кислорода и при этом



радикал локализован на атоме кислорода, например, для фенокси. Заместители арилокси связываются с соединением, которое они замещают, через этот атом кислорода. Арилокси необязательно замещена. Арилокси включает, но без каких-либо ограничений, радикалы, содержащие от 6 до 20 кольцевых атомов углерода, т.е. C_{6-20} арилокси; от 6 до 15 кольцевых атомов углерода, т.е. C_{6-15} арилокси, и от 6 до 10 кольцевых атомов углерода, т.е. C_{6-10} арилокси. Примеры арилокси групп включают, помимо прочего, фенокси, нафтокси и антрокси.

[0028] В контексте настоящего документа “арилен” означает двухвалентную группу ароматического соединения, в которой кольцевыми атомами являются только атомы углерода. Арилен необязательно замещен и может быть моноциклическим или полициклическим, например, бициклическим или трициклическим. Примеры ариленовых групп включают, помимо прочего, группы, содержащие от 6 до 20 кольцевых атомов углерода, т.е. C_{6-20} арилен; от 6 до 15 кольцевых атомов углерода, т.е. C_{6-15} арилен и от 6 до 10 кольцевых атомов углерода, т.е. C_{6-10} арилен.

[0029] В контексте настоящего документа “гетероалкил” означает алкил, в котором один или более атомов углерода замещены гетероатомами. В контексте настоящего документа “гетероалкенил” означает алкенил, в котором один или более атомов углерода замещены гетероатомами. В контексте настоящего документа “гетероалкинил” означает алкинил, в котором один или более атомов углерода замещены гетероатомами. Подходящие гетероатомы включают, помимо прочего, атомы азота, кислорода и серы. Гетероалкил, гетероалкенил и гетероалкинил необязательно замещены. Примеры гетероалкильных групп включают, помимо прочего, аминокалкил, сульфониалкил и сульфониалкил. Примеры гетероалкильных групп также включают, помимо прочего, метиламино, метилсульфонил и метилсульфинил.

[0030] В контексте настоящего документа “гетероарил” означает одновалентную группу, которая представляет собой радикал ароматического соединения, при этом кольцевые атомы содержат атомы углерода и минимум один атом кислорода, серы, азота или фосфора. Примеры гетероарильных групп включают, помимо прочего, соединения, содержащие от 5 до 20 кольцевых атомов, от 5 до 15 кольцевых атомов и от 5 до 10 кольцевых атомов. Гетероарил необязательно замещен.

[0031] В контексте настоящего документа “гетероарилен” означает двухвалентный гетероарил, в котором один или более кольцевых атомов ароматического кольца замещены атомом кислорода, серы, азота или фосфора. Гетероарилен необязательно замещен.

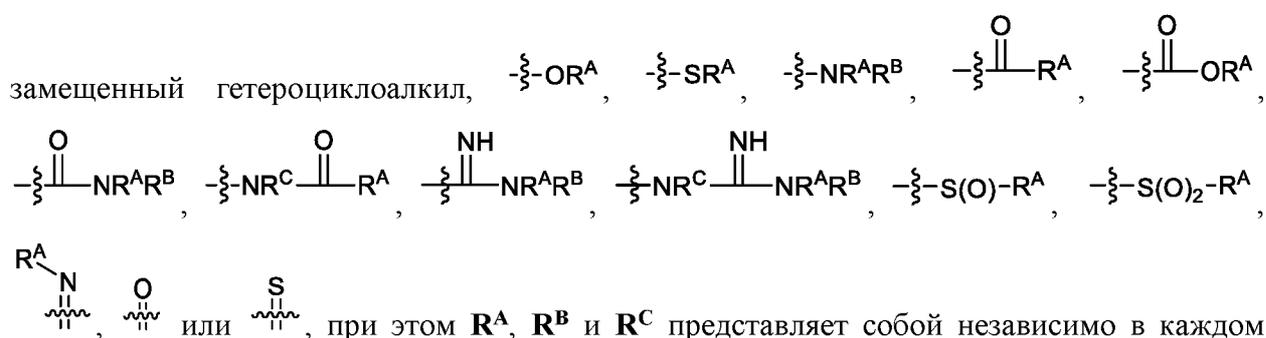
[0032] В контексте настоящего документа “гетероциклоалкил” означает циклоалкил, в котором один или более атомов углерода замещены гетероатомами. Подходящие гетероатомы включают, помимо прочего, атомы азота, кислорода и серы. Гетероциклоалкил необязательно замещен. Примеры гетероциклоалкильных групп включают, помимо прочего, морфолинил, пиперидинил, тетрагидропиранил, пирролидинил, имидазолидинил, оксазолидинил, тиазолидинил, диоксоланил, дитиоланил, оксанил или тианил.

[0033] В контексте настоящего документа “кислота Льюиса” означает молекулу или ион, которые акцептируют неподеленную пару электронов. Кислоты Льюиса, используемые в описанных здесь способах, не являются протонами. Кислоты Льюиса включают, помимо прочего, неметаллические кислоты, металлические кислоты, твердые кислоты Льюиса и мягкие кислоты Льюиса. Кислоты Льюиса включают, помимо прочего, кислоты Льюиса алюминия, бора, железа, олова, титана, магния, меди, антимония, фосфора, серебра, иттербия, скандия, никеля и цинка. Примеры кислот Льюиса включают, помимо прочего, AlBr_3 , AlCl_3 , BCl_3 , бор трихлорид метил сульфид, BF_3 , бор трифторид метил эфира, бор трифторид метил сульфид, бор трифторид тетрагидрофуран, дициклогексилбор трифторметансульфонат, бромид железа (III), хлорид железа (III), хлорид олова (IV), хлорид титана (IV), изопропоксид титана (IV), $\text{Cu}(\text{OTf})_2$, CuCl_2 , CuBr_2 , хлорид цинка, галоидный алкилалюминий ($\text{R}_n\text{AlX}_{3-n}$, при этом R представляет собой гидрокарбил), $\text{Zn}(\text{OTf})_2$, ZnCl_2 , $\text{Yb}(\text{OTf})_3$, $\text{Sc}(\text{OTf})_3$, MgBr_2 , NiCl_2 , $\text{Sn}(\text{OTf})_2$, $\text{Ni}(\text{OTf})_2$ и $\text{Mg}(\text{OTf})_2$.

[0034] В контексте настоящего документа “N-содержащий гетероциклоалкил” означает циклоалкил, в котором один или более атомов углерода замещены гетероатомами и при этом минимум один замещающий гетероатом представляет собой

атом азота. Подходящие гетероатомы, в дополнение к азоту, включают, помимо прочего, атомы кислорода и серы. *N*-содержащий гетероциклоалкил необязательно замещен. Примеры *N*-содержащего гетероциклоалкила включают, помимо прочего, морфолинил, пиперидинил, пирролидинил, имидазолидинил, оксазолидинил или тиазолидинил.

[0035] В контексте настоящего документа термин “необязательно замещенный” при использовании для описания радикальной группы, например, необязательно замещенного алкила, означает, что такая группа необязательно связана с одним или более заместителями. Примеры таких заместителей включают, помимо прочего, гало, циано, нитро, amino, гидроксил, необязательно замещенный галоалкил, aminoалкил, гидроксилалкил, азидо, эпокси, необязательно замещенный гетероарил, необязательно



случае атом водорода, алкил, алкенил, алкинил, арил, алкиларил, арилалкил, гетероалкил, гетероарил или гетероциклоалкил, или R^A и R^B вместе с атомами, с которыми они связаны, образуют насыщенное или ненасыщенное карбоциклическое кольцо, при этом кольцо необязательно замещено и при этом один или более кольцевых атомов необязательно замещены гетероатомом. В определенных вариантах осуществления, когда радикальная группа необязательно замещена необязательно замещенным гетероарилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом или необязательно замещенным насыщенным или ненасыщенным карбоциклическим кольцом, заместители на необязательно замещенном гетероариле, необязательно замещенном гетероциклоалкиле или необязательно замещенном насыщенном или ненасыщенном карбоциклическом кольце, если они замещены, не замещены заместителями, которые также необязательно замещены дополнительными заместителями. В некоторых вариантах осуществления, когда описанная здесь группа необязательно замещена, заместитель, связанный с группой, не замещен, если не указано иное.

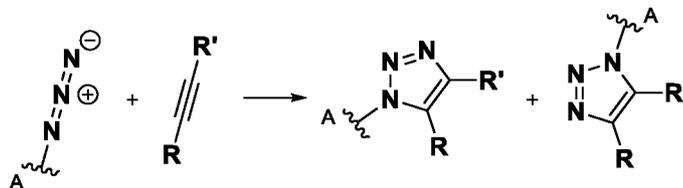
[0036] В контексте настоящего документа “связующий агент” означает любую молекулу, например, белок, антитело или его фрагмент, способные связываться со специфичностью с определенным партнером по связыванию, например, антигеном.

[0037] В контексте настоящего документа “линкер” означает двухвалентную, трехвалентную или мультивалентную группу, которая ковалентно соединяет или способна ковалентно соединять (например, через реакционноспособную группу на одном конце и в определенных вариантах осуществления аминокислоту и/или спейсер на другом конце), связующий агент и одно или более описанных здесь соединений, например, соединения нагрузки, усиливающие агенты и/или соединения пролекарственные нагрузки. В контексте настоящего документа термин “нагрузки” означает тубулизины или производные тубулизина. В контексте настоящего документа “соединения пролекарственные нагрузки” или “пролекарства” означают нагрузки, которые оканчиваются одним или более аминокислотными остатками или другим химическим остатком, описанным в настоящем документе. Таким образом, в определенных вариантах осуществления линкер может быть в конечном счете расщеплен, в результате чего произойдет высвобождение соединений нагрузок в форме производных тубулизина. В других вариантах осуществления линкер может быть в конечном счете расщеплен, в результате чего произойдет высвобождение соединения пролекарственной нагрузки в форме производного тубулизина, которое сохраняет один или более остатков концевой аминокислоты. Такое соединение пролекарственная нагрузка в дальнейшем также может быть обработано посредством принятых биологических процессов (например, гидролиза амидной связи), в результате которых в конечном счете получают соединения нагрузки в форме соединений нагрузки тубулизина без концевых аминокислотных остатков.

[0038] В контексте настоящего документа фраза “условия синтеза амида” означает условия реакции, способствующие образованию амида, например, при реакции карбоновой кислоты, активированной карбоновой кислоты или ацилгалогенида с амином. В некоторых примерах условия синтеза амида означают условия реакции, способствующие образованию амидной связи между карбоновой кислотой и амином. В некоторых из этих примеров карбоновая кислота сначала преобразуется в активированную карбоновую кислоту, а затем активированная карбоновая кислота вступает в реакцию с амином, в результате чего образуется амид. Подходящие условия, способствующие образованию амида, включают, помимо прочего, условия, при которых используются реактивы, способствующие протеканию 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'*-тетраметилуруния гексафторфосфат (HBTU), *O*-
(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилуруния тетрафторборат (TBTU),
1-[бис(диметиламино)метиле]н-1H-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиний-3-оксида
гексафторфосфат (HATU), *N*-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин (EEDQ),
N-этил-*N'*-(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
примерах карбоновая кислота сначала преобразуется в активированный эфир карбоновой
кислоты, а затем на эфир карбоновой кислоты воздействуют амином, в результате чего
образуется амидная связь. В определенных вариантах осуществления на карбоновую
кислоту воздействуют реактивом. Этот реактив активирует карбоновую кислоту
посредством депротонирования карбоновой кислоты и последующего образования
комплекса продукта с депротонированной карбоновой кислотой в результате
нуклеофильной атаки депротонированной карбоновой кислоты на протонированный
реактив. Активированные эфиры карбоновой кислоты для определенных карбоновых
кислот более восприимчивы к нуклеофильной атаке амина по сравнению с карбоновой
кислотой до ее активации. Это приводит к образованию амидной связи. В связи с этим
карбоновая кислота описывается как активированная. Примеры реактивов включают DCC
и DIC.

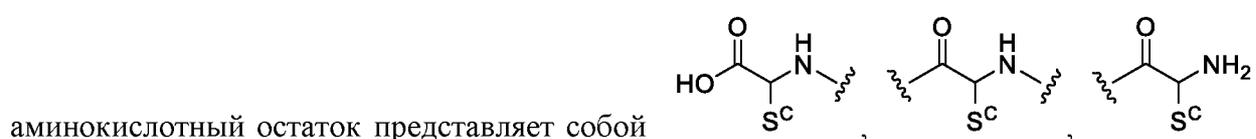
[0039] В контексте настоящего документа “региоизомер,” “региоизомеры” или “смесь
региоизомеров” означают продукт(ы) 1,3-циклодобавлений или промотированных
напряжением алкин-азидных циклоприсоединений (SPAAC)—иначе известных как клик-
реакции—которые получают от реакции подходящих азидов (например, $-N_3$, или $-PEG-N_3$
дериватизированных антител) и подходящих алкинов. В определенных вариантах
осуществления, например, региоизомеры и смеси региоизомеров характеризуются
продуктами клик-реакций, которые показаны также:

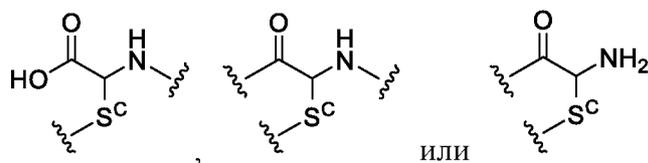


В определенных вариантах осуществления можно использовать более одного
подходящего азида и более одного подходящего алкина в схеме синтеза в процессе
получения продукта, где каждая пара азид-алкин может участвовать в одной или более
независимых клик-реакций, в результате чего образуется смесь региоизомерных

продуктов клик-реакций. Например, специалисту известно, что первый подходящий азид может независимо вступать в реакцию с первым подходящим алкином, а второй подходящий азид может независимо вступать в реакцию со вторым подходящим алкином в процессе получения продукта, в результате чего образуются четыре возможных региоизомера клик-реакции или смесь четырех возможных региоизомеров клик-реакции.

[0040] В контексте настоящего документа термин “остаток” означает химическую группу в соединении, которая остается после химической реакции. Например, термин “аминокислотный остаток”, “*N*-алкиламинокислотный остаток” или “остаток *N*-концевой аминокислоты” означает продукт амидной связи или пептидной связи аминокислоты, *N*-алкиламинокислоты или *N*-концевой аминокислоты с подходящим партнером по связыванию; при этом, например, молекула воды удаляется после амидной или пептидной связи аминокислоты или *N*-алкиламинокислоты, в результате чего образуется продукт, содержащий аминокислотный остаток, *N*-алкиламинокислотный остаток или остаток *N*-концевой аминокислоты. Термин “аминокислота” означает природные и синтетические α , β , γ или δ аминокислоты и включает, помимо прочего, аминокислоты, присутствующие в белках, а именно, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан, пролин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин, аспартат, глутамат, лизин, аргинин и гистидин. В определенных вариантах осуществления аминокислота присутствует в своей L-конфигурации. В качестве варианта, аминокислотой может быть производное аланила, валинила, лейцинила, изолейцинила, пролинила, фенилаланилина, триптофанила, метионинила, глицинила, серинила, треонинила, цистеинила, тирозинила, аспарагинила, глутаминила, аспартоила, глутароила, лизинила, аргинила, гистидинила, β -аланила, β -валинила, β -лейцинила, β -изолейцинила, β -пролинила, β -фенилаланинила, β -триптофанила, β -метионинила, β -глицинила, β -серинила, β -треонинила, β -цистеинила, β -тирозинила, β -аспарагинила, β -глутаминила, β -аспартоила, β -глутароила, β -лизинила, β -аргининила или β -гистидинила. Термин “производное аминокислоты” означает группу, получаемую из природной или неприродной аминокислоты, которая здесь описана и приведена в качестве примера. Производные аминокислот известны специалистам в данной области и включают, помимо прочего, эфир, аминокислотный спирт, аминокислотный альдегид, аминокислотный лактон и *N*-метил-производные природных и неприродных аминокислот. В определенных вариантах осуществления



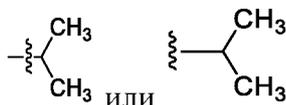


, при этом S^c представляет собой боковая цепь природной или не природной аминокислоты или связи (например, водород, как в глицине; $-\text{CH}_2\text{OH}$, как в серине; $-\text{CH}_2\text{SH}$, как в цистеине; $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, как в лизине; $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, как в глутаминовой кислоте; $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, как в глутамине; или $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, как в тирозине; и подобные); и \sim представляет связь с другим химическим элементом, включая, помимо прочего, другой аминокислотный остаток или *N*-алкиламинокислотный остаток, в результате чего получают пептид или пептидный остаток. В определенных вариантах осуществления S^c выбирается из группы, состоящей из водорода, алкила, гетероалкила, арилалкила и гетероарилалкила.

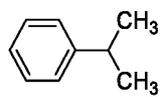
[0041] В контексте настоящего документа “терапевтически эффективное количество” означает количество (например, соединения), достаточное для оказания терапевтического действия на пациента при лечении заболевания или нарушения или управлении заболеванием или нарушением или для замедления появления или уменьшения одного или более симптомов, связанных с таким заболеванием или нарушением.

[0042] В контексте настоящего документа “конституционные изомеры” означают соединения, которые имеют такую же молекулярную формулу, но разные химические структуры в результате того, как располагаются атомы. Примеры конституционных изомеров включают *n*-пропил и изопропил; *n*-бутил, *втор*-бутил и *трет*-бутил; и *n*-пентил, изопентил и неопентил и подобные.

[0043] Определенные группы, компоненты, заместители и атомы изображаются с волнистой линией, которая пересекает связь или связи для обозначения атома, через который связываются эти группы, компоненты, заместители, атомы. Например, фенильная группа, которая замещена пропильной группой, изображенная следующим образом:

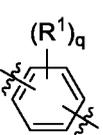
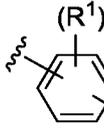


имеет следующую структуру:

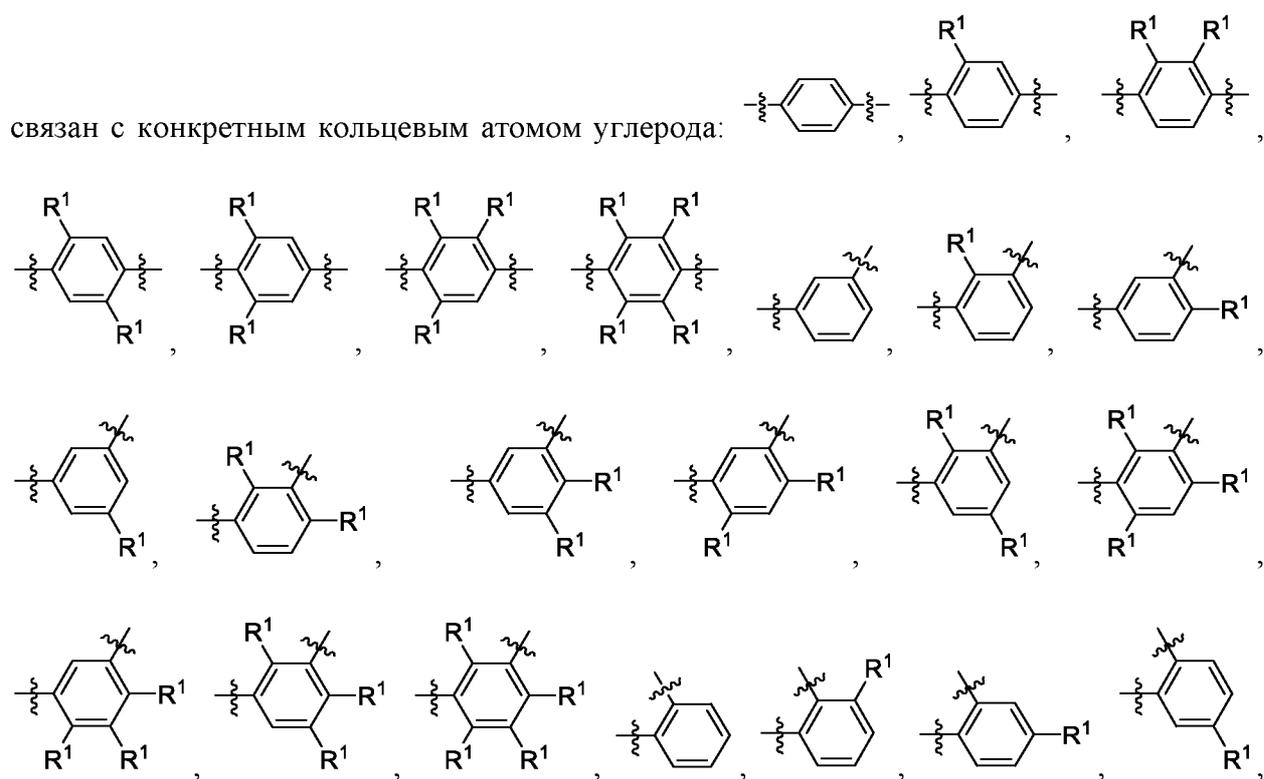


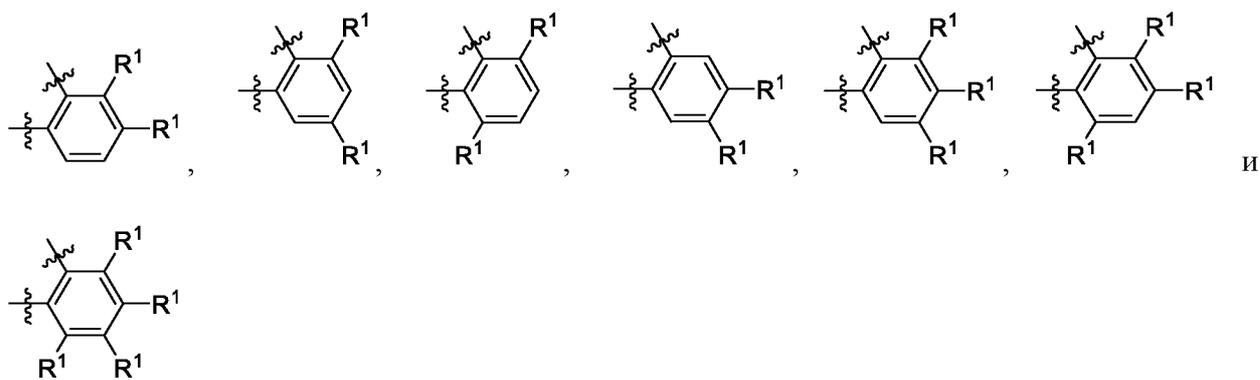
В контексте настоящего документа иллюстрации, изображающие заместителей, связанных с циклической группой (например, ароматическим,

гетероароматическим, конденсированным кольцом и насыщенным или ненасыщенным циклоалкилом или гетероциклоалкилом) через связь между кольцевыми атомами, означают, если не указано иное, то, что циклическая группа может быть замещена этим заместителем в любом кольцевом положении в циклической группе или на любом кольце в группе конденсированных колец, в соответствии с методами, представленными здесь или известными в области, к которой относится настоящее изобретение. Например,

группа,  или , где нижний индекс **q** представляет собой целое число от

0 до 4 и где позиции заместителя **R¹** описаны в общем, т.е. не присоединены напрямую к какой-либо вершине структуры линии связи, т.е. конкретному кольцевому атому углерода, включает следующие, неограничивающие примеры групп, в которых заместитель **R¹**





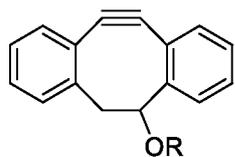
[0044] В контексте настоящего документа фраза “реакционноспособный линкер” или сокращение “RL” означает одновалентную группу, которая включает реакционноспособную группу (“RG”) и спейсерную группу (“SP”), изображенные, например, как $RG-SP-\zeta$, при этом **RG** представляет собой реакционноспособную группу, а **SP** представляет собой спейсерную группу. Согласно приведенному здесь описанию, реакционноспособный линкер может включать более одной реакционноспособной группы и более одной спейсерной группы. Спейсерная группа представляет собой любая двухвалентная группа, которая связывает реакционноспособную группу с другой группой, такой как, нагрузкой или пролекарственной нагрузкой. Реакционноспособные линкеры (RL), вместе с нагрузками или пролекарственными нагрузками, с которыми они связаны, дают промежуточные соединения (“линкер-нагрузки”, или LP, либо линкер-пролекарственные нагрузки), полезные как синтетические предшественники для приготовления описанных здесь конъюгатов антител. Реакционноспособный линкер включает реакционноспособную группу, которая является функциональной группой, способной вступать в реакцию с реакционноспособной частью другой группы, например, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, модифицированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, модифицированным трансклутаминазой антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или усиливающей группой. Группа, образованная в результате реакции реакционноспособной группы с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, модифицированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или модифицированным трансклутаминазой антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, вместе со связывающей группой, включает часть описанного здесь конъюгата “линкер связующего агента” (“BL”). В определенных вариантах осуществления “реакционноспособная группа” представляет собой функциональная группа (например, малеимид или *N*-гидроксисукцинимидный (NHS) эфир), которая вступает в реакцию с цистеиновым или лизиновым остатком антитела или

его антигенсвязывающего фрагмента. В определенных вариантах осуществления “реакционноспособная группа” представляет собой функциональная группа, способная вступать в реакцию клик-химии (см., например, клик-химию Huisgen *Proc. Chem. Soc.* **1961**, Wang *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2003**, и Agard *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2004**). В некоторых вариантах осуществления указанной реакции клик-химии реакционноспособная группа представляет собой алкин, способный вступать в реакцию 1,3-циклоприсоединения с азидом. Такие подходящие реакционноспособные группы включают, помимо прочего, напряженные алкины, например, алкины, подходящие для промотированных напряжением алкин-азидных циклоприсоединений (SPAAC), циклоалкины, например, циклооктины, бензаннелированные алкины и алкины, способные вступать в реакции 1,3-циклоприсоединения с алкинами в отсутствие катализаторов на основе меди. Подходящие алкины также включают, помимо прочего,

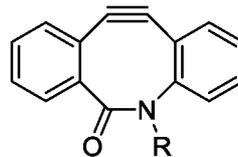


дибензоазациклооктин или

(DIBAC), дибензоциклооктин или

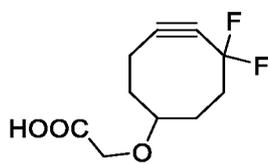


(DIBO), биарилазациклооктинон или

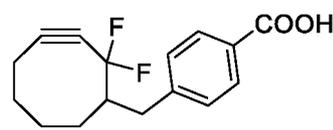


(BARAC),

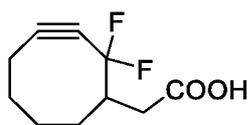
двухфтористый циклооктин или



, или

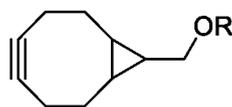


, или



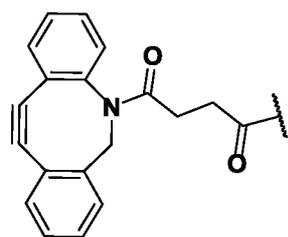
(DIFO), замещенные, например, фторированные алкины, аза-

циклоалкины, бицикло[6.1.0]нонин или

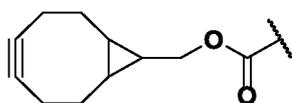


(BCN, где **R** представляет собой

алкил, алкокси или ацил) и их производные. Особенно полезные алкины включают



и

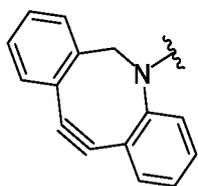


Линкер-нагрузки или линкер-

пролекарственные нагрузки, включающие такие реакционноспособные группы, полезны

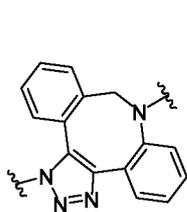
для конъюгирования антител, которые были функционализованы азидо-группами. В контексте настоящего документа "модифицированное транsgлутаминазой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент" означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с одним или более глутаминовыми (Gln или Q) остатками, способными вступить в реакцию с соединением, включающим первичную или вторичную аминофункциональную группу, в присутствии фермента транsgлутаминазы. Такие модифицированные транsgлутаминазой антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, функционализованные азидо-полиэтиленгликольными группами посредством опосредованного транsgлутаминазой соединения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с первичным амином, включающим азидо-полиэтиленгликольную группу. В определенных вариантах осуществления такое модифицированное транsgлутаминазой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают посредством воздействия на антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, по крайней мере, с одним глутаминовым остатком, например, Gln295 тяжелой цепи, соединением, содержащим аминогруппу и азидную группу, в присутствии фермента транsgлутаминазы, что описано далее.

[0045] В некоторых примерах реакционноспособная группа представляет собой алкин,



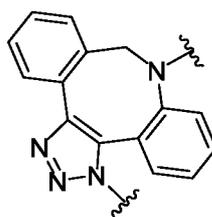
например, , который может вступить в реакцию посредством клик-химии с

азидом, например, $\text{N}=\text{N}=\text{N}$, в результате чего образуется продукт клик-химии,



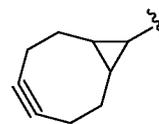
например,

или



В некоторых примерах реакционноспособная группа вступает в реакцию с азидом на модифицированном антителе или его антигенсвязывающем фрагменте. В некоторых примерах

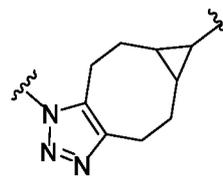
реакционноспособная группа представляет собой алкин, например,



, который

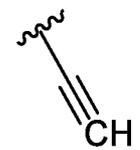
может вступить в реакцию посредством клик-химии с азидом, например, $\text{N}=\text{N}=\text{N}$, в

результате чего образуется продукт клик-химии, например,

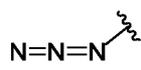


. В некоторых

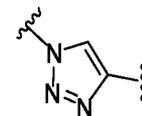
примерах реакционноспособная группа представляет собой алкин, например,



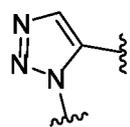
который может вступать в реакцию посредством клик-химии с азидом, например,



, в результате чего образуется продукт клик-химии, например,

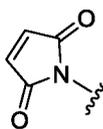


или



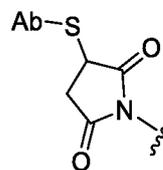
. В некоторых примерах реакционноспособная группа представляет собой

функциональная группа, например,



, которая вступает в реакцию с цистеиновым остатком на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, в результате чего

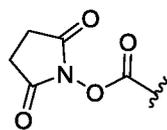
образуется углерод-серная связь с ним, например,



, при этом **Ab** означает

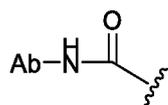
антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а **S** означает атом серы (S) на цистеиновом остатке, через который функциональная группа связывается с **Ab**. В некоторых примерах реакционноспособная группа представляет собой функциональная

группа, например,



, которая вступает в реакцию с лизиновым остатком на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, в результате чего образуется амидная

связь с ним, например,



, при этом **Ab** означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а **NH** означает NH-атом на остатке боковой цепи лизина, через который функциональная группа связывается с **Ab**.

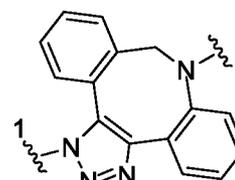
[0046] В контексте настоящего документа фраза “биоразлагаемая группа” означает группу, которая разлагается *in vivo* на нетоксичные, биосовместимые компоненты,

которые могут быть выведены из организма в ходе обычных биологических процессов. В некоторых вариантах осуществления биоразлагаемая группа полностью или в значительной степени разлагается *in vivo* на протяжении периода около 90 дней или менее, около 60 дней или менее или около 30 дней или менее, при этом степень разложения основана на потере массы биоразлагаемой группы в процентах и при этом полное разложение соответствует 100% потере массы. Примеры биоразлагаемых групп включают, помимо прочего, алифатические полиэфиры, такие как поли(ϵ -капролактон) (PCL), поли(3-гидроксibuтират) (PHB), поли(гликолевая кислота) (PGA), поли(молочная кислота) (PLA) и сополимеры с гликолевой кислотой (т.е. поли(D,L-лактид-когликолид) (PLGA) (публикации Vert M, Schwach G, Engel R and Coudane J (1998) *J Control Release* 53(1-3):85-92; Jain R A (2000) *Biomaterials* 21(23):2475-2490; Uhrich K E, Cannizzaro S M, Langer R S and Shakesheff K M (1999) *Chemical Reviews* 99(11): 3181-3198; и Park T G (1995) *Biomaterials* 16(15):1123-1130, содержание каждой из которых включается в настоящий документ полностью посредством ссылки).

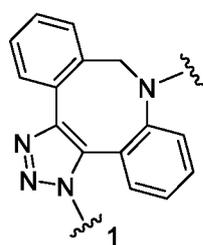
[0047] В контексте настоящего документа фраза “линкер связующего агента” или “BL” означает любую двухвалентную, трехвалентную или мультивалентную группу, которая связывает или соединяет связующий агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) с представленным здесь соединением-нагрузкой (например, тубулизидами) и необязательно с одним или более соединениями с боковой цепью. В общем, подходящие линкеры связующего агента для описанных здесь конъюгатов антител представляет собой линкеры, которые достаточно стабильны для использования периода полужизни в кровотоке конъюгатов антитела и в то же время способны высвободить свою нагрузку после антигенопосредованной интернализации конъюгата. Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Расщепляемые линкеры представляет собой линкеры, которые расщепляются посредством внутриклеточного обмена веществ после интернализации, например, расщепления через гидролиз, восстановление или ферментную реакцию. Нерасщепляемые линкеры представляет собой линкеры, которые высвобождают присоединенную нагрузку посредством лизосомной деградации антитела после интернализации. Подходящие линкеры включают, помимо прочего, кислотолабильные линкеры, гидролитически лабильные линкеры, расщепляемые под воздействием ферментов линкеры, лабильные при восстановлении линкеры, само-расщепляющиеся линкеры и нерасщепляемые линкеры. Подходящие линкеры также включают, помимо прочего, линкеры, которые представляют собой или содержат пептиды, глюкуроныды, сукцинимид-тиоэфиры, полиэтиленгликольные (ПЭГ) единицы, гидразоны, мал-капроильные единицы,

дипептидные единицы, валин-цитруллиновые единицы и пара-аминобензилоксикарбонил (РАВС), пара-аминобензильные (РАВ) единицы. В некоторых вариантах осуществления линкер связующего агента (**BL**) включает группу, которая образуется в результате реакции реакционноспособной группы (**RG**) реакционноспособного линкера (**RL**) и реакционноспособной части связующего агента, например, антитела, модифицированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0048] В некоторых примерах **BL** включает следующую группу

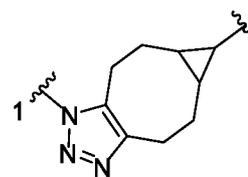


или



, при этом  представляет собой связь со связующим агентом. В

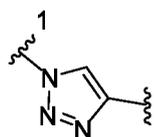
некоторых примерах **BL** включает следующую группу



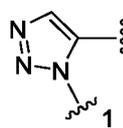
, при этом 

представляет собой связь со связующим агентом. В некоторых примерах **BL** включает

следующую группу

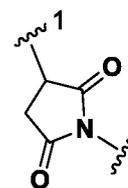


или



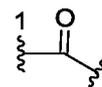
, при этом  представляет собой связь со

связующим агентом. В некоторых примерах **BL** включает следующую группу



при этом  представляет собой связь с цистеином антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента. В некоторых примерах **BL** включает следующую группу:



, при этом 

представляет собой связь с лизином антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0049] При использовании в отношении полипептидов фраза "существенное сходство" или "существенно похожие" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, при помощи программ GAP или BESTFIT с

использованием стандартных штрафов за продолжение гэпа, идентичны минимум на 95% или минимум на 98% или 99%. Сходство последовательностей также можно определить при помощи алгоритма BLAST, описанного в публикации Altschul *et al.* J. Mol. Biol. 215: 403-10 (при использовании опубликованных настроек по умолчанию) или доступного по адресу blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. В определенных вариантах осуществления позиции остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замена, при которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком с боковой цепью (**R** группа) со схожими химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена существенно не изменяет функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, идентичность последовательностей в процентах или степень схожести можно откорректировать в сторону повышения для компенсации консервативного характера замены. Способы такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со схожими химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амид-содержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат; и (7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Особенно полезные группы консервативных аминокислотных замен: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве варианта, консервативная замена представляет собой любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной в публикации Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443-1445. "Умеренно консервативная замена" представляет собой любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

[0050] В контексте настоящего документа "энантиомерный избыток (ЭИ)" означает безразмерную мольную долю, описывающую чистоту хиральных веществ, которые содержат, например, один стереогенный центр. Например, энантиомерный избыток в 0 % означает рацемическое соединение (например, 50:50 смесь энантиомеров, или отсутствие избытка одного энантиомера по отношению к другому). Также, например, энантиомерный избыток в 99 % означает практически стероидное энантиомерное соединение (т.е.

большой избыток одного энантиомера по отношению к другому). Энантиомерный избыток в процентах, ЭИ % = $\frac{[(R)\text{-соединение}] - [(S)\text{-соединение}]}{[(R)\text{-соединение}] + [(S)\text{-соединение}]} \times 100$, где (R)-соединение > (S)-соединение; или ЭИ % = $\frac{[(S)\text{-соединение}] - [(R)\text{-соединение}]}{[(S)\text{-соединение}] + [(R)\text{-соединение}]} \times 100$, где (S)-соединение > (R)-соединение. Более того, в контексте настоящего документа “диастереомерный избыток (ДИ)” означает безразмерную мольную долю, описывающую чистоту хиральных веществ, которые содержат более одного стереогенного центра. Например, диастереомерный избыток в 0 % означает эквимольную смесь диастереомеров. Также, например, диастереомерный избыток в 99 % означает практически стероческое диастереомерное соединение (т.е. большой избыток одного диастереомера по отношению к другому). Диастереомерный избыток можно рассчитать простым способом аналогично ЭИ. Специалистам должно быть ясно, что ДИ обычно указывается как ДИ в процентах (ДИ%). ДИ % можно рассчитать аналогично ЭИ %.

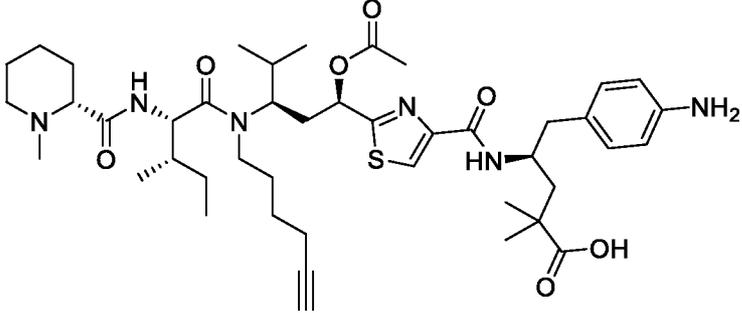
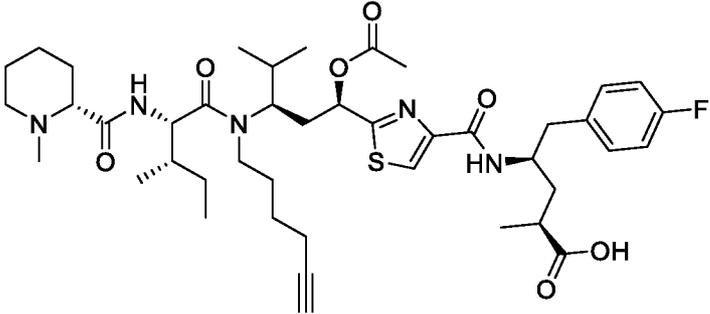
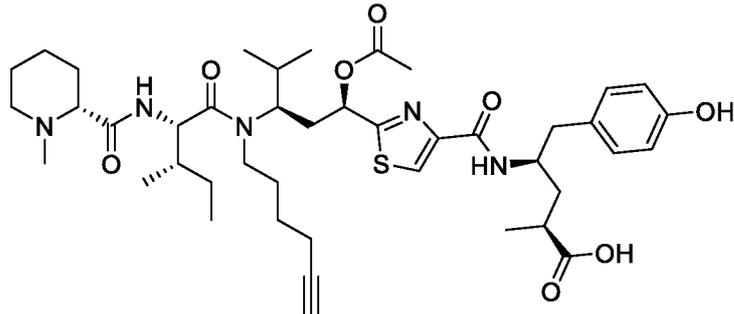
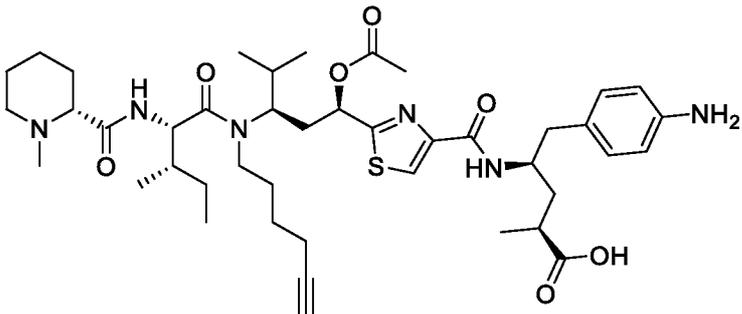
[0051] В определенных вариантах осуществления определенные соединения или нагрузки, указанные в нижеприведенной Таблице Р, исключаются из описанного здесь предмета заявки.

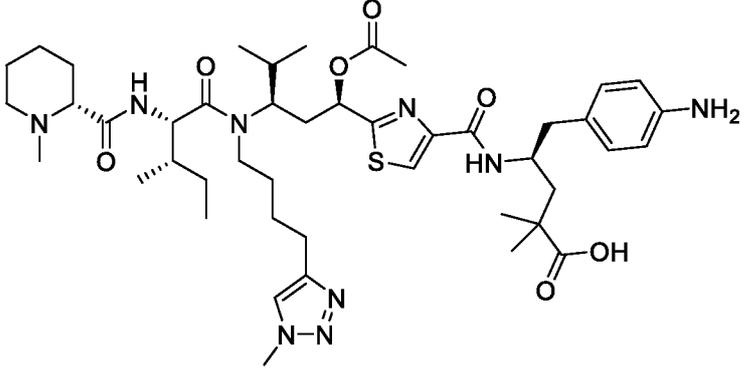
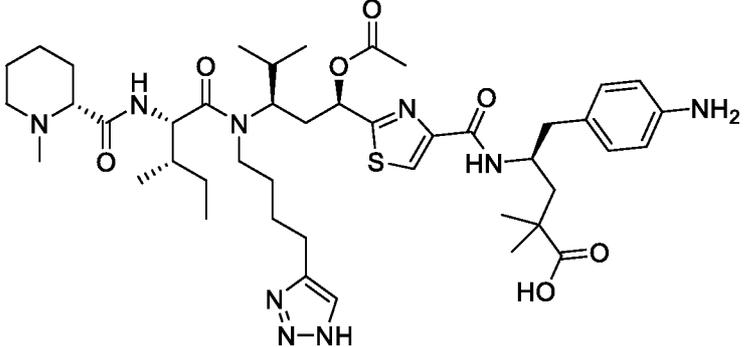
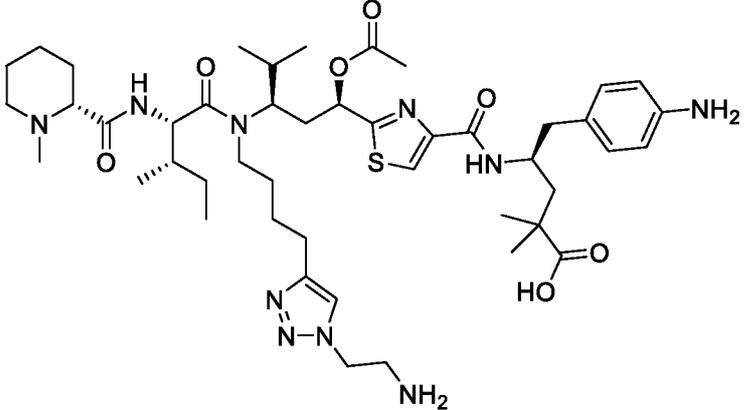
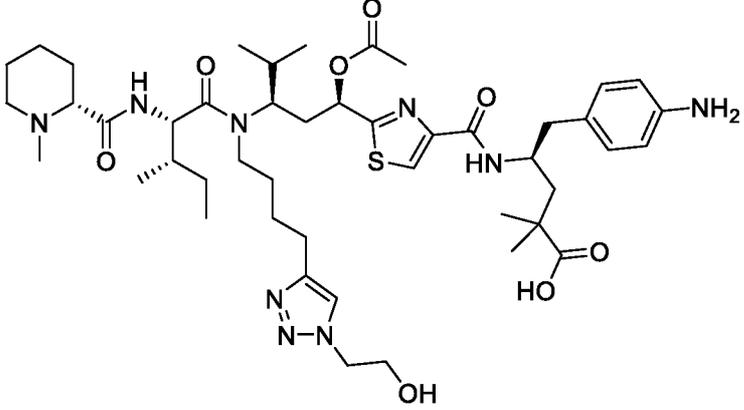
[0052] В определенных вариантах осуществления представленные здесь соединения включают любые или все соединения IVa, IVa', IVb, IVc, IVd, IVe, IVf, IVg, IVh, IVj, IVk, IVl, IVm, IVn, IVo, IVp, IVq, IVr, IVs, IVt, IVu, IVvA, IVvB, IVw, IVx, IVy, Va, Va', Vb, Vc, Vd, Ve, Vf, Vg, Vh, Vi, Vj, Vk, VIa, IVb, VIc, VId, VIe, VIe, VIg, VIh, VI, Vli, VII, VIII, IX, X, D-5a и D-5c в Таблице Р. В определенных вариантах осуществления представленные здесь соединения исключают любые или все соединения IVa, IVa', IVb, IVc, IVd, IVe, IVf, IVg, IVh, IVj, IVk, IVl, IVm, IVn, IVo, IVp, IVq, IVr, IVs, IVt, IVu, IVvA, IVvB, IVw, IVx, IVy, Va, Va', Vb, Vc, Vd, Ve, Vf, Vg, Vh, Vi, Vj, Vk, VIa, IVb, VIc, VId, VIe, VIg, VIh, VI, Vli, VII, VIII, IX, X, D-5a и D-5c в Таблице Р. Например, в определенных вариантах осуществления представленные здесь соединения включают остатки любых или всех соединений IVa, IVa', IVb, IVc, IVd, IVe, IVf, IVg, IVh, IVj, IVk, IVl, IVm, IVn, IVo, IVp, IVq, IVr, IVs, IVt, IVu, IVvA, IVvB, IVw, IVx, IVy, Va, Va', Vb, Vc, Vd, Ve, Vf, Vg, Vh, Vi, Vj, Vk, VIa, IVb, VIc, VId, VIe, VIg, VIh, VI, Vli, VII, VIII, IX, X, D-5a и D-5c, связанные с описанными здесь линкерами и/или связующими агентами. В определенных вариантах осуществления представленные здесь соединения исключают остатки любых или всех соединений IVa, IVa', IVb, IVc, IVd, IVe, IVf, IVg, IVh, IVj, IVk, IVl, IVm, IVn, IVo, IVp, IVq, IVr, IVs, IVt, IVu, IVvA, IVvB, IVw, IVx,

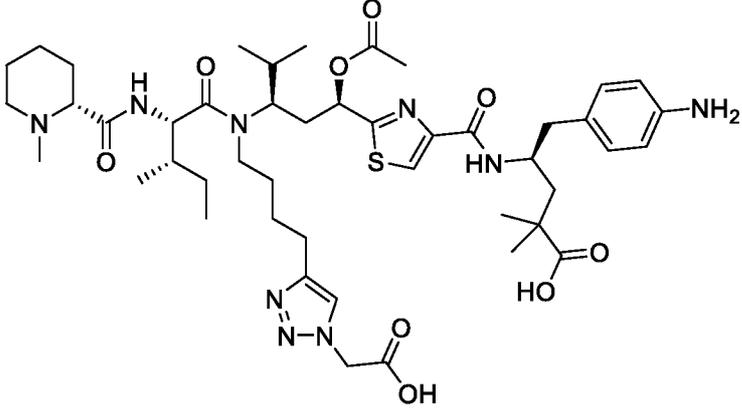
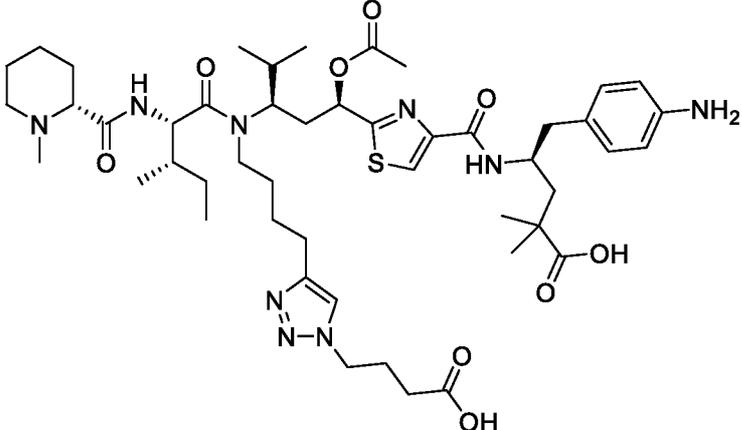
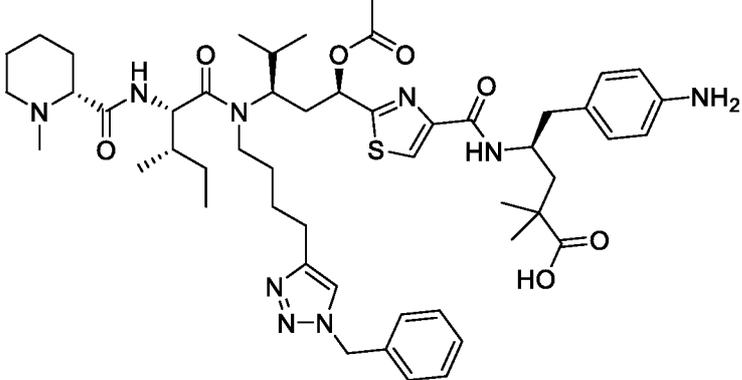
IVy, Va, Va', Vb, Vc, Vd, Ve, Vf, Vg, Vh, Vi, Vj, Vk, VIa, IVb, VIc, VIId, VIe, VIg, VIh, VI, VII, VIII, IX, X, D-5a и D-5c , связанные с описанными здесь линкерами и/или связующими агентами.

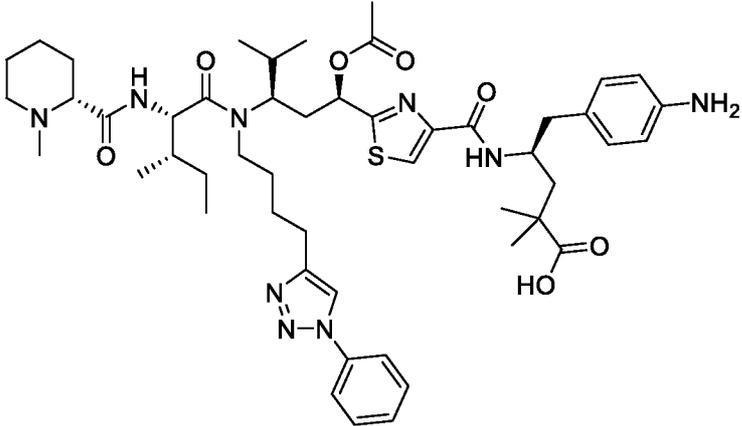
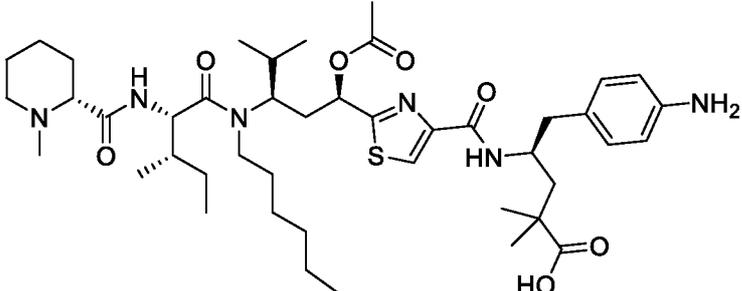
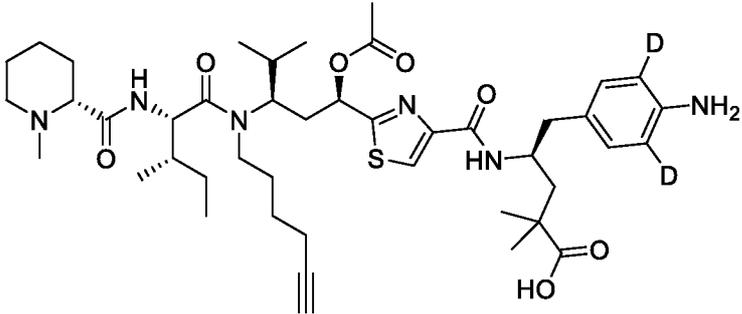
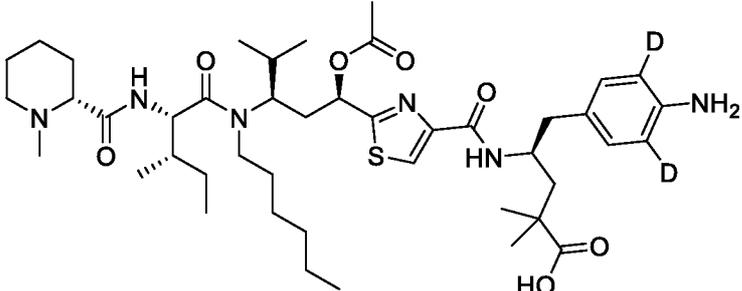
Таблица Р

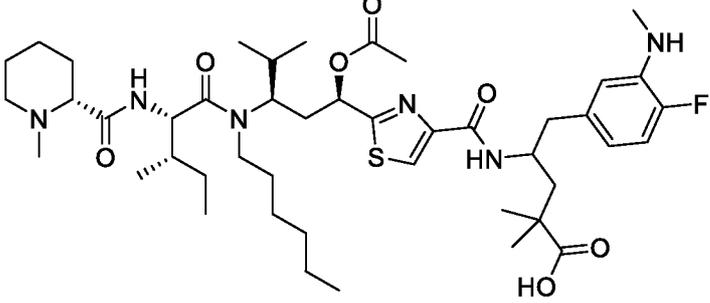
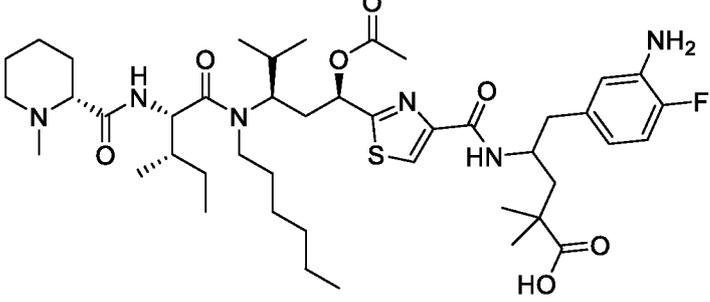
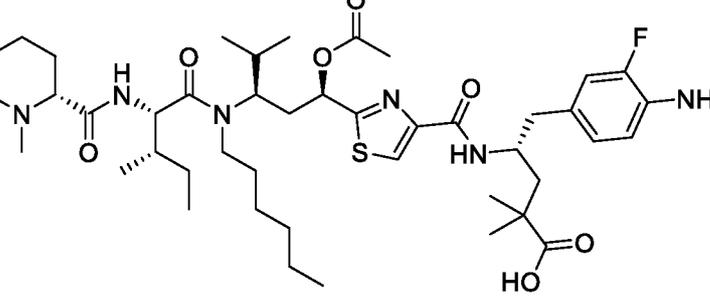
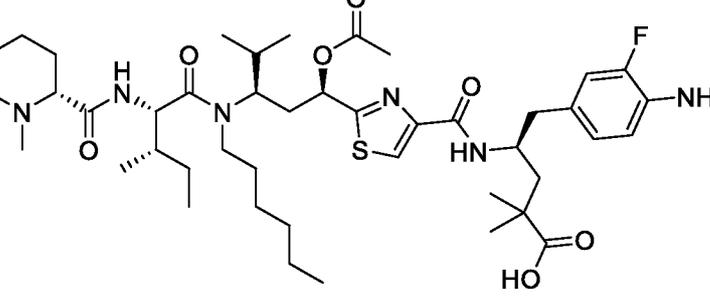
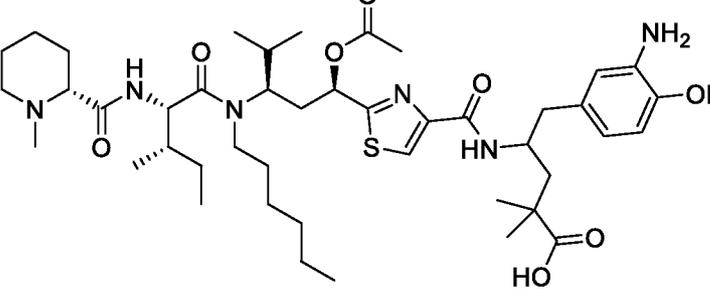
Соединение	Структура
IVa	
IVa'	
IVb	
IVc	

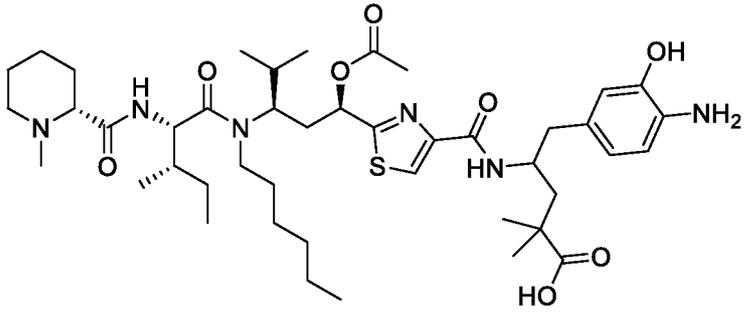
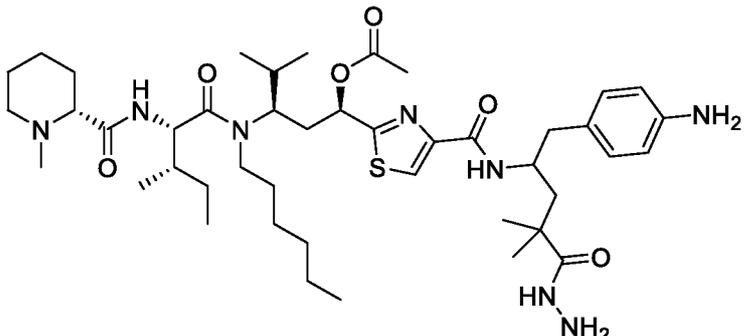
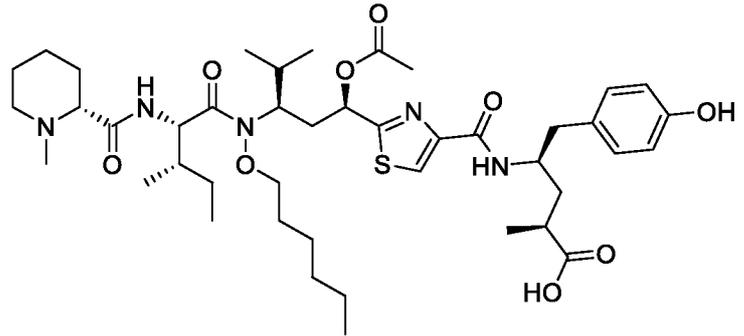
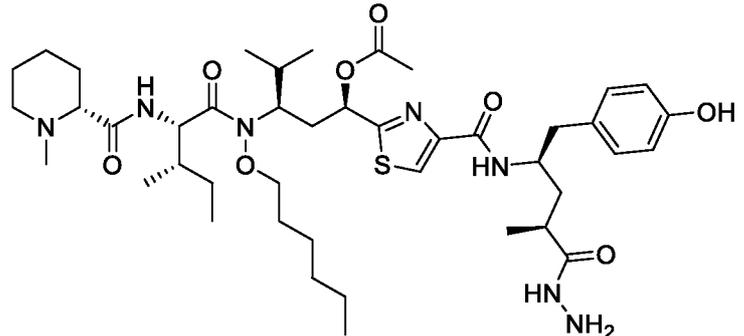
Соединение	Структура
IVd	
IVe	
IVf	
IVg	

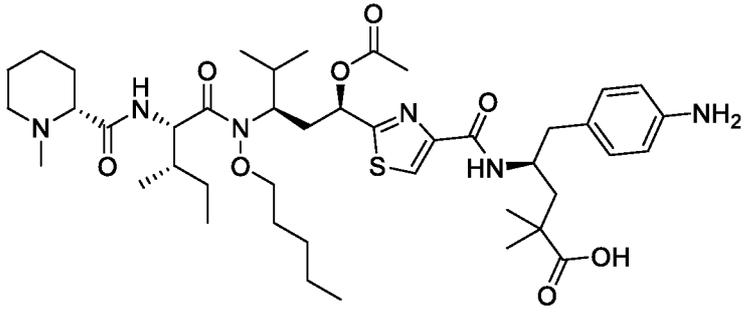
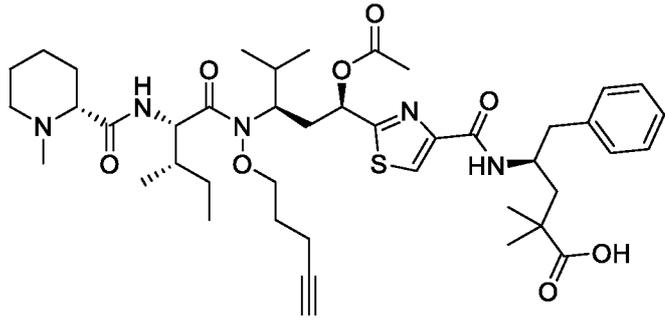
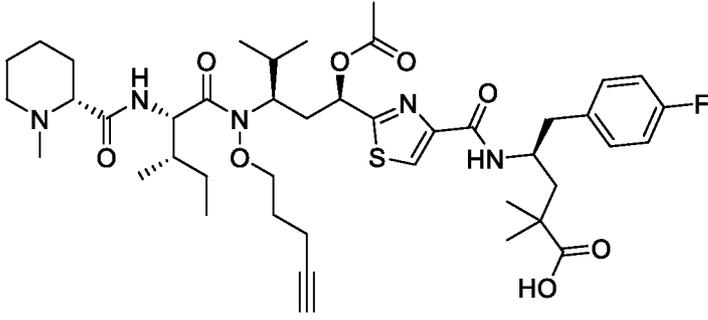
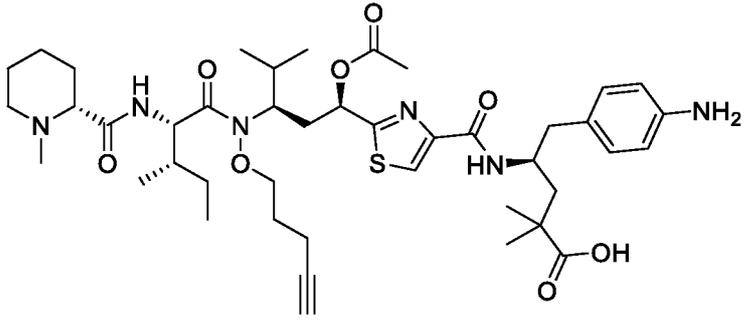
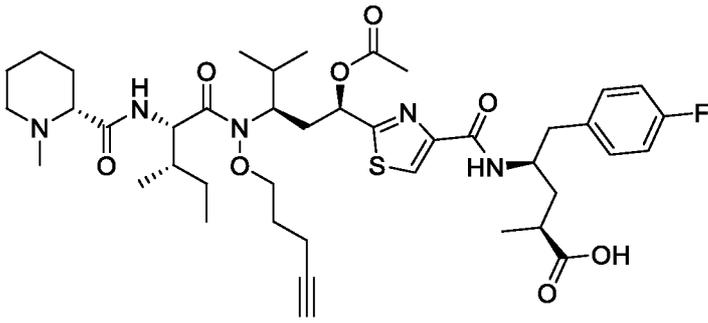
Соединение	Структура
IVh	
IVj	
IVk	
IVl	

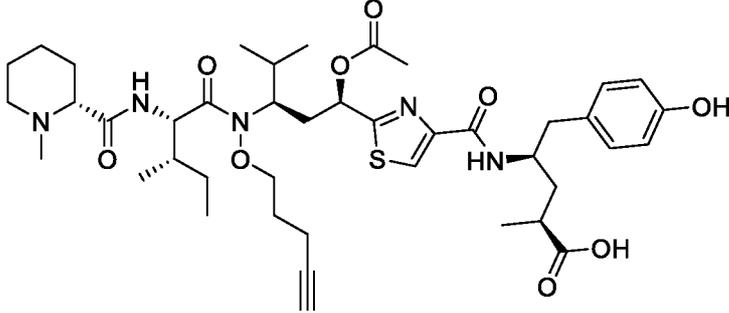
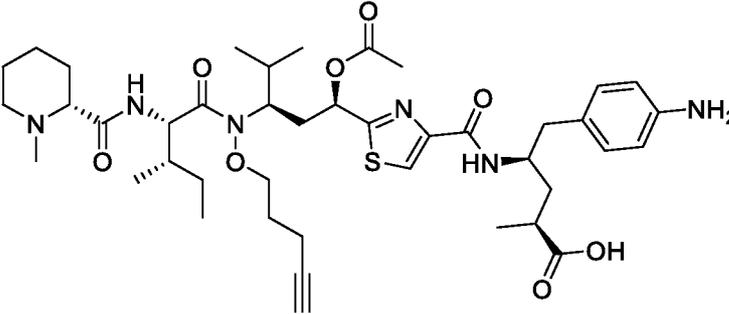
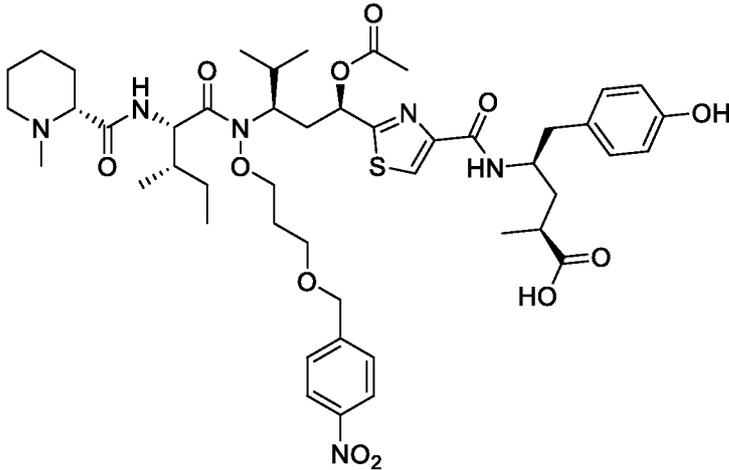
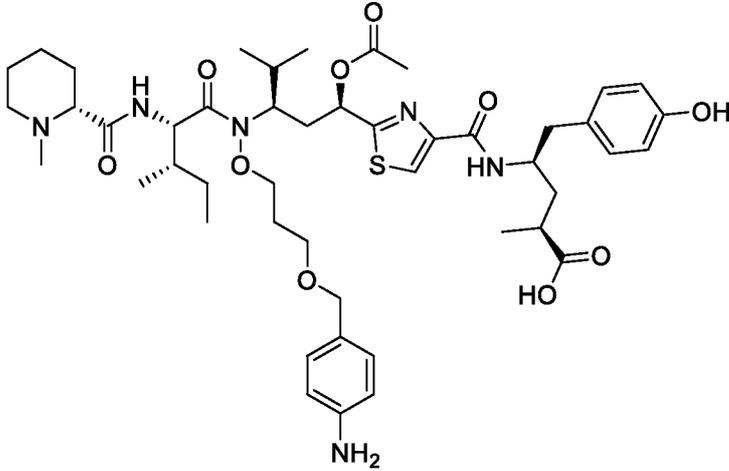
Соединение	Структура
IVm	 <p>The structure of compound IVm is a complex molecule. It features a central chain starting with a piperidine ring substituted with a methyl group. This is linked to a chiral center with a methyl group and a propyl group. The chain continues through a secondary amide, a tertiary amine substituted with an isopropyl group, and a chiral center with a methyl group and a propyl group. This is followed by a thiazole ring substituted with an acetoxy group and a methyl group. The chain ends with a primary amide linked to a chiral center with a methyl group and a propyl group, which is further substituted with a 4-aminophenyl group and a 2-hydroxy-2-methylpropyl group.</p>
IVn	 <p>The structure of compound IVn is similar to IVm, but the propyl group attached to the terminal chiral center is replaced by a pentyl group.</p>
IVo	 <p>The structure of compound IVo is similar to IVm, but the propyl group attached to the terminal chiral center is replaced by a benzyl group.</p>

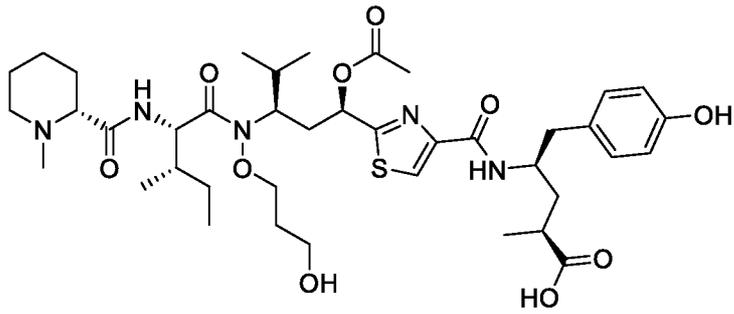
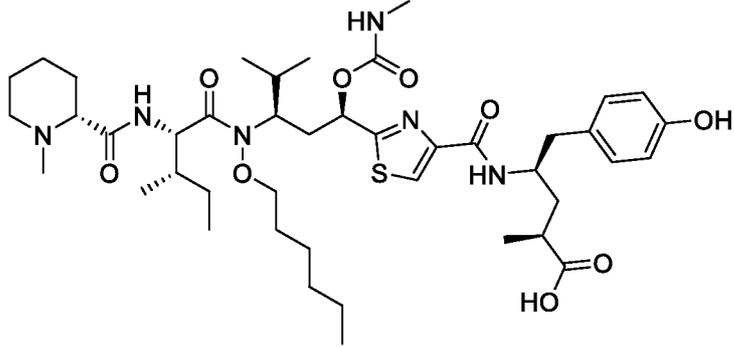
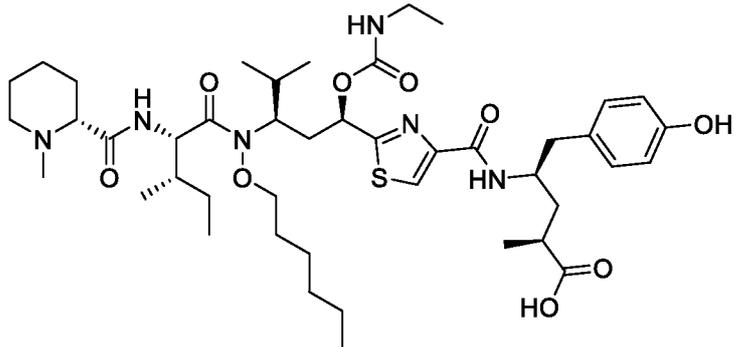
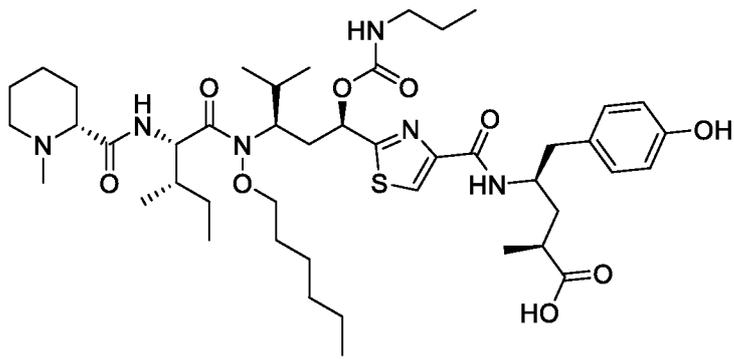
Соединение	Структура
IVp	 <p>The structure of IVp is a complex molecule. It features a piperidine ring with a methyl group on the nitrogen, connected via a carbonyl group to a chiral center. This center is further linked to a chain containing a secondary amide, a quaternary carbon with a methyl group, a chiral center with a methyl group, and a thiazole ring. The thiazole ring is substituted with an acetoxy group and an amide group. The amide group is connected to a chain that includes a chiral center with a methyl group, a secondary amide, and a para-aminophenyl group. Additionally, there is a separate chain with a quaternary carbon, a methyl group, and a hydroxyl group. A 1-phenyl-1H-tetrazole ring is also present, connected to the main chain.</p>
IVq	 <p>The structure of IVq is very similar to IVp, but the chain containing the tetrazole ring is shorter, ending in a methyl group instead of a phenyl group.</p>
IVr	 <p>The structure of IVr is similar to IVp, but the amide group is connected to a 2,4,6-trideuterioaniline ring. Additionally, the chain containing the tetrazole ring has a terminal alkyne group.</p>
IVs	 <p>The structure of IVs is similar to IVp, but the chain containing the tetrazole ring is shorter, ending in a methyl group, and the amide group is connected to a 2,4,6-trideuterioaniline ring.</p>

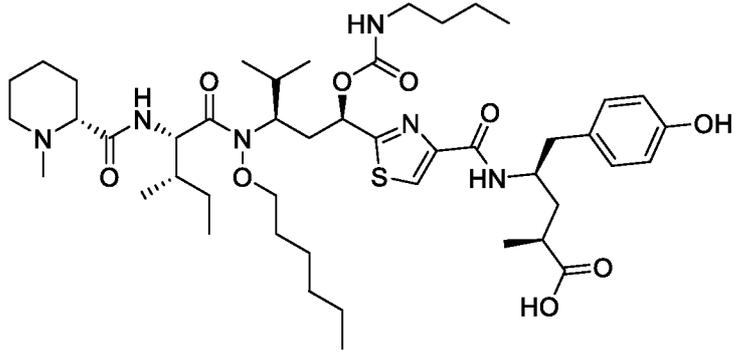
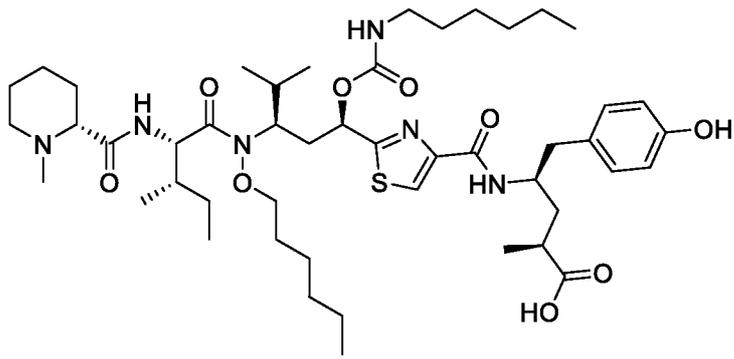
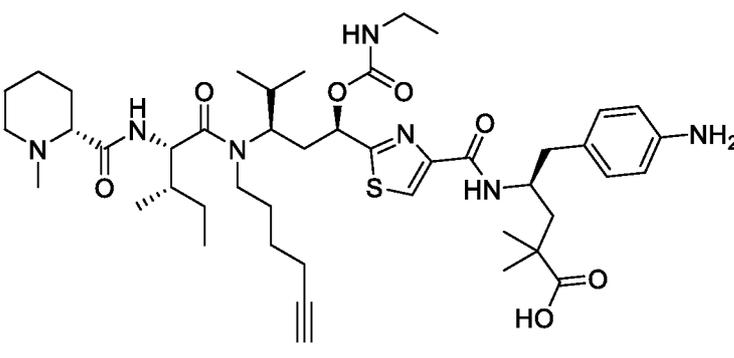
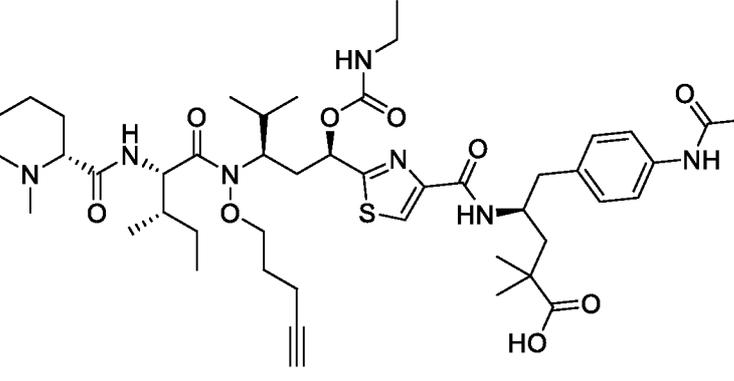
Соединение	Структура
IVt	 <p>The structure of IVt features a piperidine ring connected to a chiral center. This center is part of a chain containing a secondary amide, a tertiary amide, a chiral center with an isopropyl group, a chiral center with a propyl group, a chiral center with an acetoxy group, and a thiazole ring. The thiazole ring is substituted with a methyl group and a carbonyl group. This carbonyl group is further linked to a chain containing a secondary amide, a chiral center with a propyl group, and a chiral center with a 2-amino-5-fluorophenyl group. The chain ends with a quaternary carbon atom bonded to two methyl groups and a hydroxyl group.</p>
IVu	 <p>The structure of IVu is identical to IVt, except for the substituent on the terminal chiral center, which is a 2-amino-5-fluorophenyl group instead of a 2-amino-5-fluoro-N-methylphenyl group.</p>
IVvA	 <p>The structure of IVvA is identical to IVt, except for the stereochemistry of the terminal chiral center, which is shown with a dashed bond to the propyl group and a wedged bond to the 2-amino-5-fluorophenyl group.</p>
IVvB	 <p>The structure of IVvB is identical to IVvA, except for the stereochemistry of the terminal chiral center, which is shown with a wedged bond to the propyl group and a dashed bond to the 2-amino-5-fluorophenyl group.</p>
IVw	 <p>The structure of IVw is identical to IVt, except for the substituent on the terminal chiral center, which is a 2-amino-4-hydroxyphenyl group instead of a 2-amino-5-fluoro-N-methylphenyl group.</p>

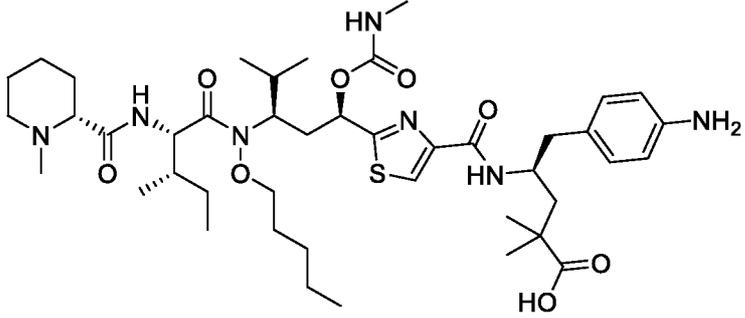
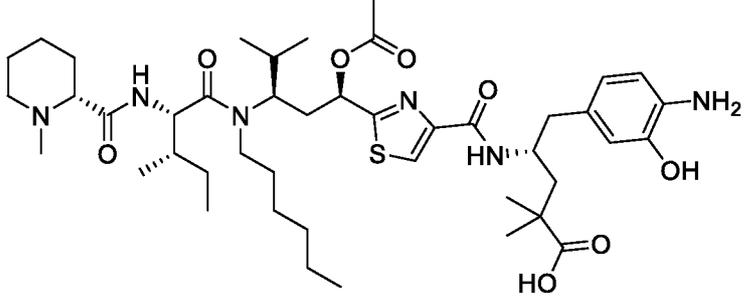
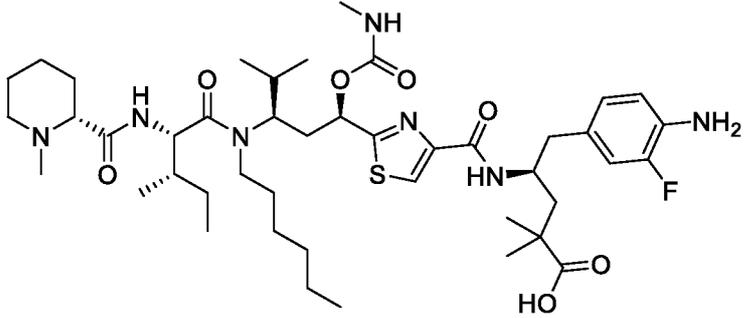
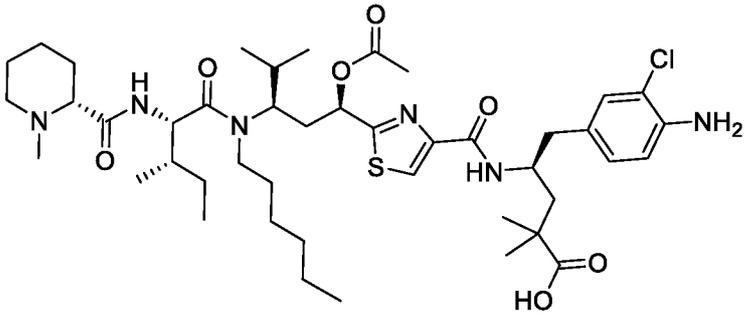
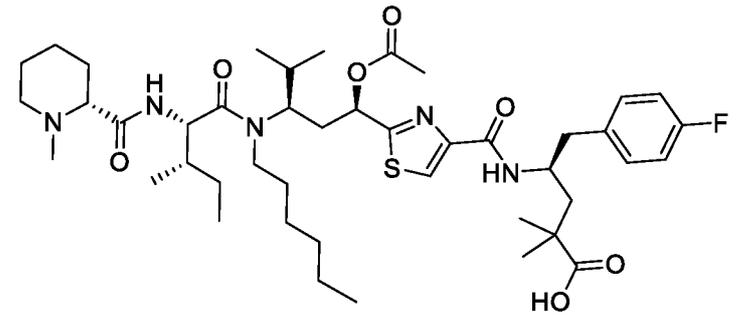
Соединение	Структура
IVx	 <p>The structure of IVx is a complex molecule. It features a piperidine ring on the left, connected via a carbonyl group to a chiral center. This center is also bonded to a methyl group and a propyl group. The chiral center is further linked to a nitrogen atom, which is bonded to an isopropyl group and a long alkyl chain. This nitrogen is also connected to a thiazole ring. The thiazole ring is substituted with an acetoxy group and a carbonyl group. The carbonyl group is linked to another chiral center, which is bonded to a hydroxyl group and a phenyl ring with an amino group at the para position. The chiral center is also bonded to a tert-butyl group and a carboxylic acid group.</p>
IVy	 <p>The structure of IVy is similar to IVx, but the carboxylic acid group is replaced by a hydrazide group (-NH-NH₂).</p>
Va	 <p>The structure of Va is similar to IVx, but the nitrogen atom is bonded to a long alkyl chain instead of an isopropyl group, and the phenyl ring has a hydroxyl group at the para position.</p>
Va'	 <p>The structure of Va' is similar to Va, but the carboxylic acid group is replaced by a hydrazide group (-NH-NH₂).</p>

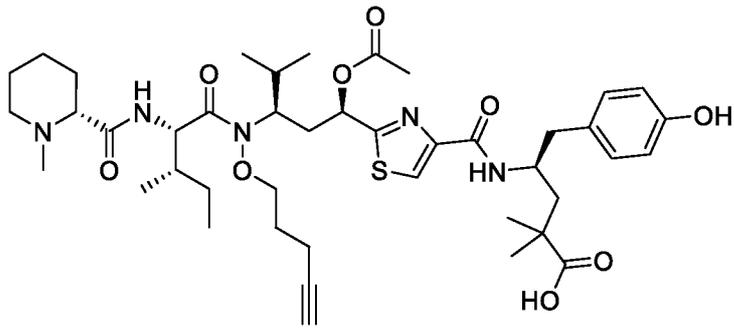
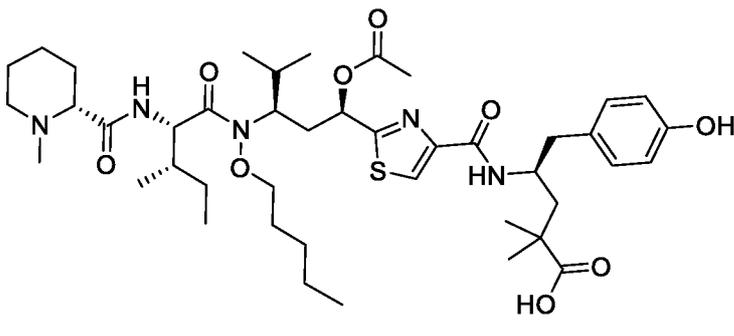
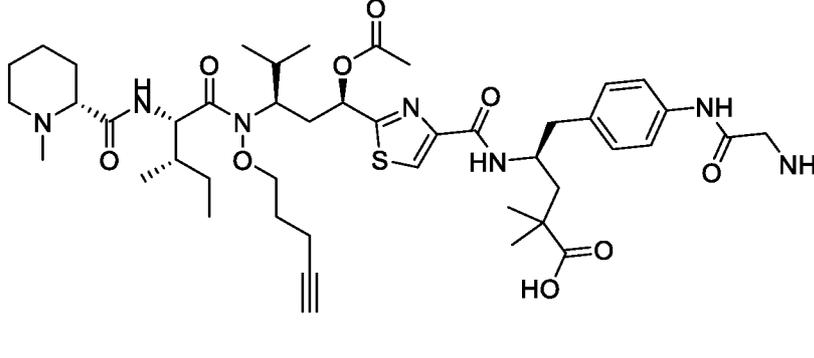
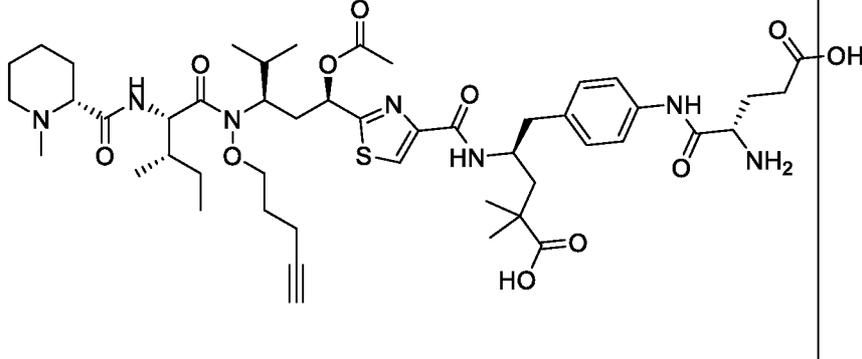
Соединение	Структура
Vb	
Vc	
Vd	
Ve	
Vf	

Соединение	Структура
Vg	 <p>The structure of compound Vg features a central chiral carbon atom bonded to a methyl group, a propyl group, a 1-methylpiperidine-2-carboxamide group, and a 1-(4-ethynylphenyl)ethoxy group. This central carbon is also bonded to a 1-(4-hydroxyphenyl)ethyl group and a 1-(4-hydroxyphenyl)ethyl group. The 1-(4-hydroxyphenyl)ethyl group is further substituted with a 1-(4-hydroxyphenyl)ethyl group and a 1-(4-hydroxyphenyl)ethyl group.</p>
Vh	 <p>The structure of compound Vh is similar to Vg, but the 4-hydroxyphenyl group is replaced by a 4-aminophenyl group.</p>
Vi	 <p>The structure of compound Vi is similar to Vg, but the 4-ethynylphenyl group is replaced by a 4-(4-nitrophenyl)ethoxy group.</p>
Vj	 <p>The structure of compound Vj is similar to Vg, but the 4-ethynylphenyl group is replaced by a 4-(4-aminophenyl)ethoxy group.</p>

Соединение	Структура
Vк	 <p>The structure of compound Vк features a piperidine ring connected via a carbonyl group to a chiral center. This center is also bonded to a methyl group and a propyl chain. The propyl chain is linked to a nitrogen atom, which is further connected to a chiral center with a methyl group and a hydroxyl group. This hydroxyl group is part of an ester linkage to a thiazole ring. The thiazole ring is substituted with a methylamino group and a carbonyl group. The carbonyl group is connected to a chiral center with a methyl group and a hydroxyl group. This hydroxyl group is part of an ester linkage to a 4-hydroxyphenyl group.</p>
VIa	 <p>The structure of compound VIa is similar to Vк, but the propyl chain is replaced by a hexyl chain. The methylamino group on the thiazole ring is replaced by a methylamino group.</p>
IVb	 <p>The structure of compound IVb is similar to Vк, but the propyl chain is replaced by a hexyl chain. The methylamino group on the thiazole ring is replaced by an ethylamino group.</p>
VIc	 <p>The structure of compound VIc is similar to VIa, but the methylamino group on the thiazole ring is replaced by a propylamino group.</p>

Соединение	Структура
VI d	
VI e	
VI f	
VI g	

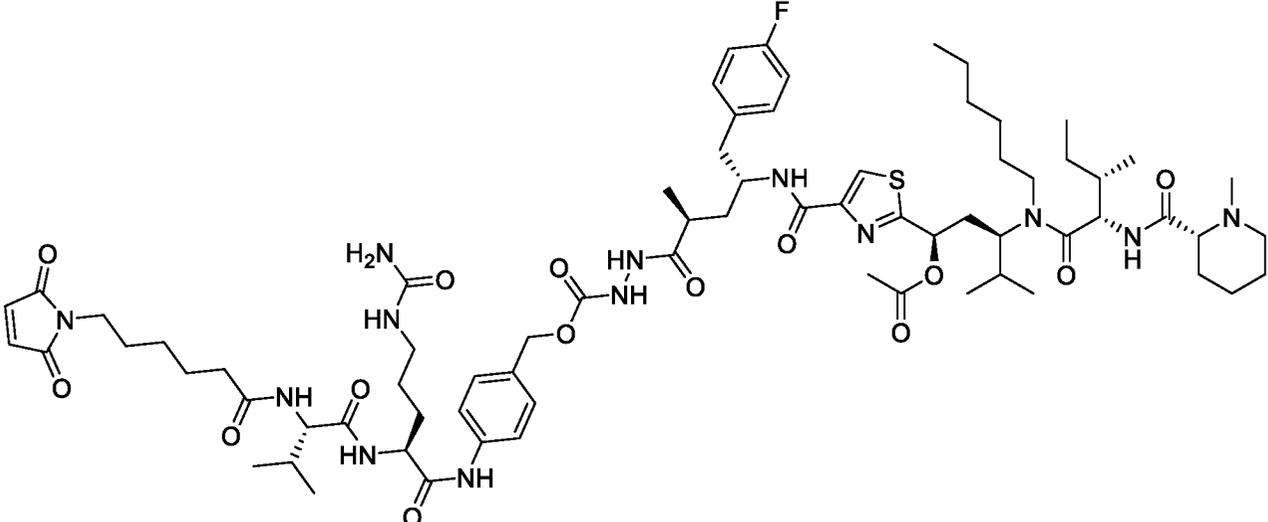
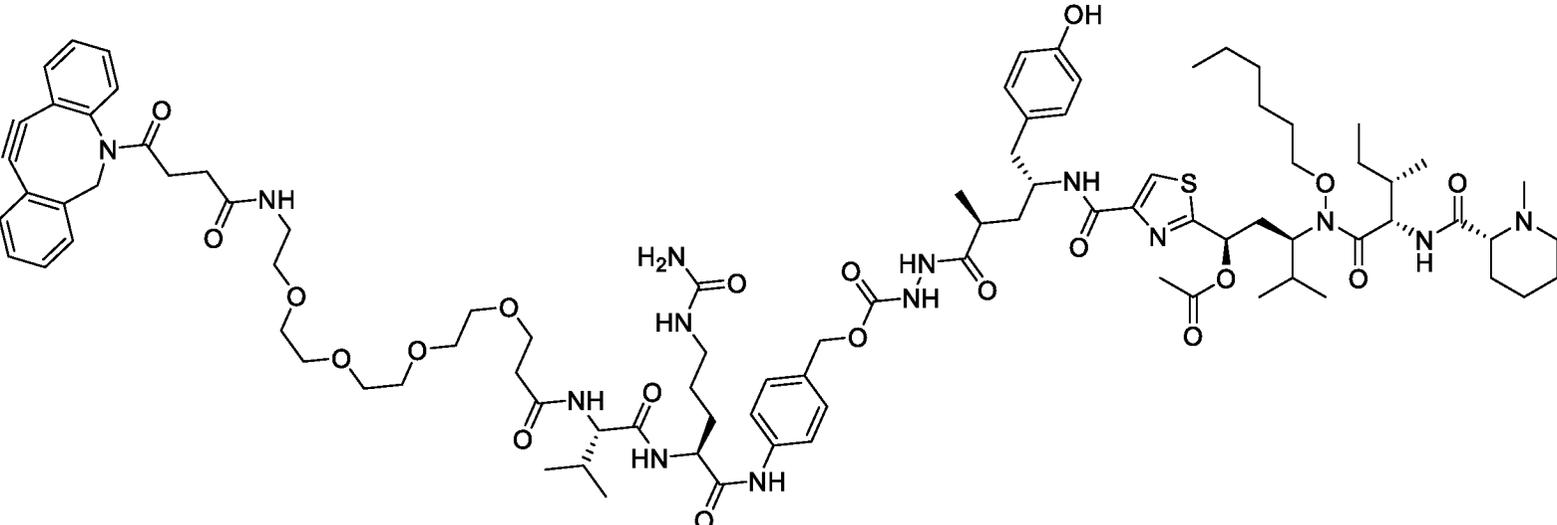
Соединение	Структура
VIh	
VI	
VII	
VII	
VIII	

Соединение	Структура
IX	
X	
D-5a	
D-5c	

[0053] В определенных вариантах осуществления определенные соединения или линкер-нагрузки, указанные в нижеприведенной Таблице P1, исключаются из описанного здесь предмета заявки.

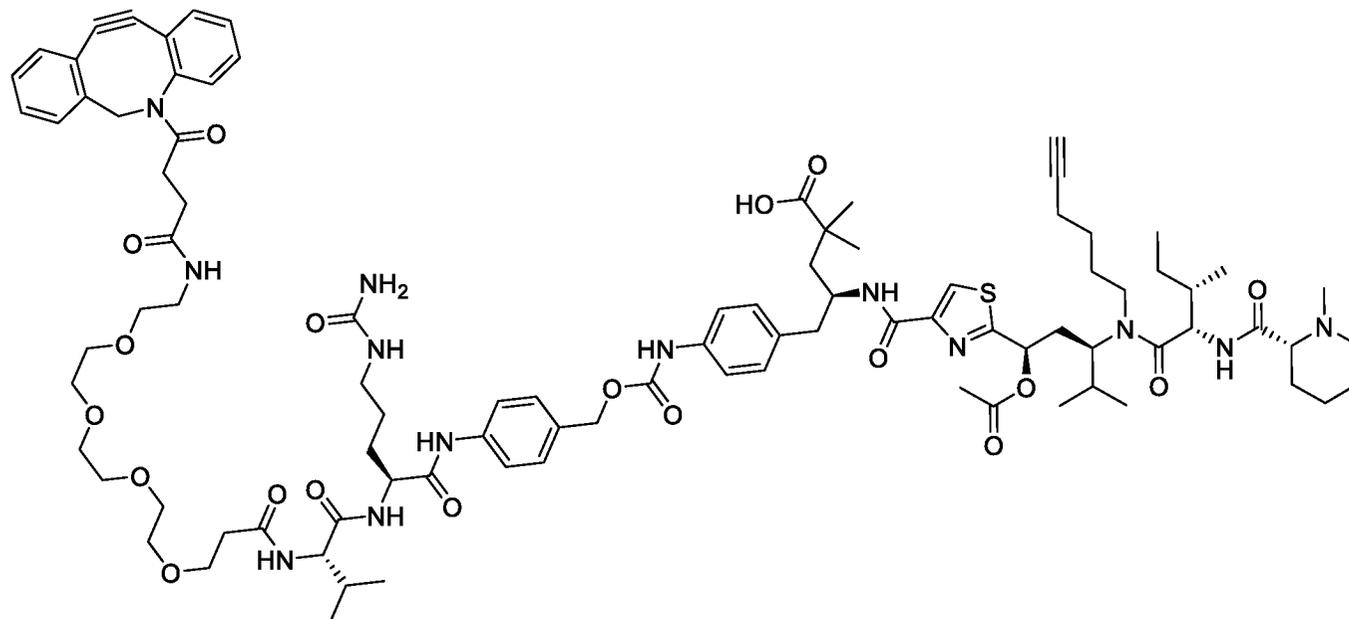
[0054] В определенных вариантах осуществления представленные здесь соединения включают любые или все соединения **LP1-IVa, LP2-Va, LP3-IVd, LP4-Ve, LP5-IVd, LP6-Vb, LP7-IVd, LP9-IVvB, LP10-VIh, LP11-IVvB, LP12-VIi, LP13-Ve, LP14-Ve, LP15-VIh, LP16-Ve, LP17-Ve, LP18-Ve, LP19-Ve, LP20-Ve, LP21-Ve, LP22-Ve, LP23-Vb, LP24-Vb, LP25-Ve** и **LP26-Ve** в Таблице P1. В определенных вариантах осуществления представленные здесь соединения исключают любые или все соединения **LP1-IVa, LP2-Va, LP3-IVd, LP4-Ve, LP5-IVd, LP6-Vb, LP7-IVd, LP9-IVvB, LP10-VIh, LP11-IVvB, LP12-VIi, LP13-Ve, LP14-Ve, LP15-VIh, LP16-Ve, LP17-Ve, LP18-Ve, LP19-Ve, LP20-Ve, LP21-Ve, LP22-Ve, LP23-Vb, LP24-Vb, LP25-Ve** и **LP26-Ve** в Таблице P1. Например, в определенных вариантах осуществления представленные здесь соединения включают остатки любых или всех соединений **LP1-IVa, LP2-Va, LP3-IVd, LP4-Ve, LP5-IVd, LP6-Vb, LP7-IVd, LP9-IVvB, LP10-VIh, LP11-IVvB, LP12-VIi, LP13-Ve, LP14-Ve, LP15-VIh, LP16-Ve, LP17-Ve, LP18-Ve, LP19-Ve, LP20-Ve, LP21-Ve, LP22-Ve, LP23-Vb, LP24-Vb, LP25-Ve** и **LP26-Ve**, связанные с описанными здесь связующими агентами. Например, в определенных вариантах осуществления представленные здесь соединения исключают остатки любых или всех соединений **LP1-IVa, LP2-Va, LP3-IVd, LP4-Ve, LP5-IVd, LP6-Vb, LP7-IVd, LP9-IVvB, LP10-VIh, LP11-IVvB, LP12-VIi, LP13-Ve, LP14-Ve, LP15-VIh, LP16-Ve, LP17-Ve, LP18-Ve, LP19-Ve, LP20-Ve, LP21-Ve, LP22-Ve, LP23-Vb, LP24-Vb, LP25-Ve** и **LP26-Ve**, связанные с описанными здесь связующими агентами.

Таблица P1

	Структуры
<p>LP1-IVa</p>	 <p>The chemical structure of LP1-IVa is a complex molecule. It features a central chain of amino acid residues: a proline ring, a lysine residue, a valine residue, and a phenylalanine residue. The lysine side chain is substituted with a long chain containing a succinimide ring and a piperidine ring. The phenylalanine side chain is substituted with a long chain containing a thiazole ring, a methyl group, and a piperidine ring. The thiazole ring is further substituted with a 4-fluorophenyl group.</p>
<p>LP2-Va</p>	 <p>The chemical structure of LP2-Va is similar to LP1-IVa but with several modifications. The proline ring is replaced by a large, complex polycyclic system. The lysine side chain is substituted with a long chain containing a polyether chain and a piperidine ring. The phenylalanine side chain is substituted with a long chain containing a thiazole ring, a methyl group, and a piperidine ring. The thiazole ring is further substituted with a 4-hydroxyphenyl group.</p>

Структуры

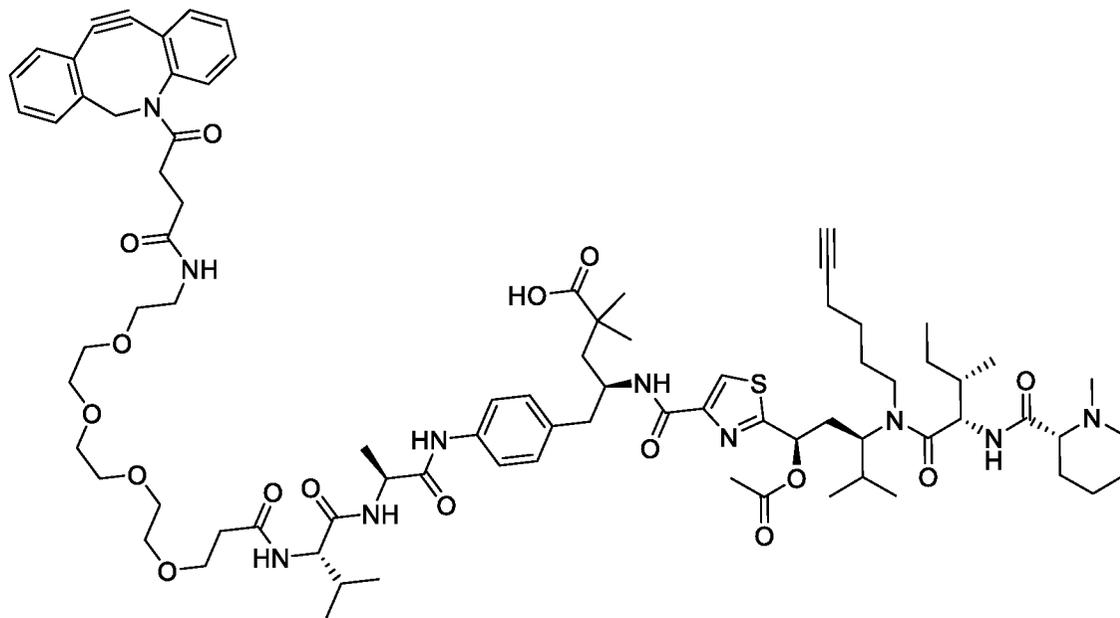
LP3-IVd



	Структуры
LP4-Ve	<p>The chemical structure of LP4-Ve is a complex molecule with the following features: <ul style="list-style-type: none"> A fluorenyl group (a tricyclic aromatic system) attached to a nitrogen atom. A polyether chain consisting of three ethylene glycol units (CH₂-CH₂-O) connected in series. A primary amide group (-NH₂) attached to the polyether chain. A secondary amide group (-NH-) connecting the polyether chain to a chiral carbon atom. A benzamide group (-NH-CO-Ph) attached to the chiral carbon atom. A thiazole ring system attached to the chiral carbon atom. A carboxylic acid group (-COOH) attached to the thiazole ring. A piperidine ring attached to the thiazole ring. An alkyne group (-C≡CH) attached to the piperidine ring. </p>

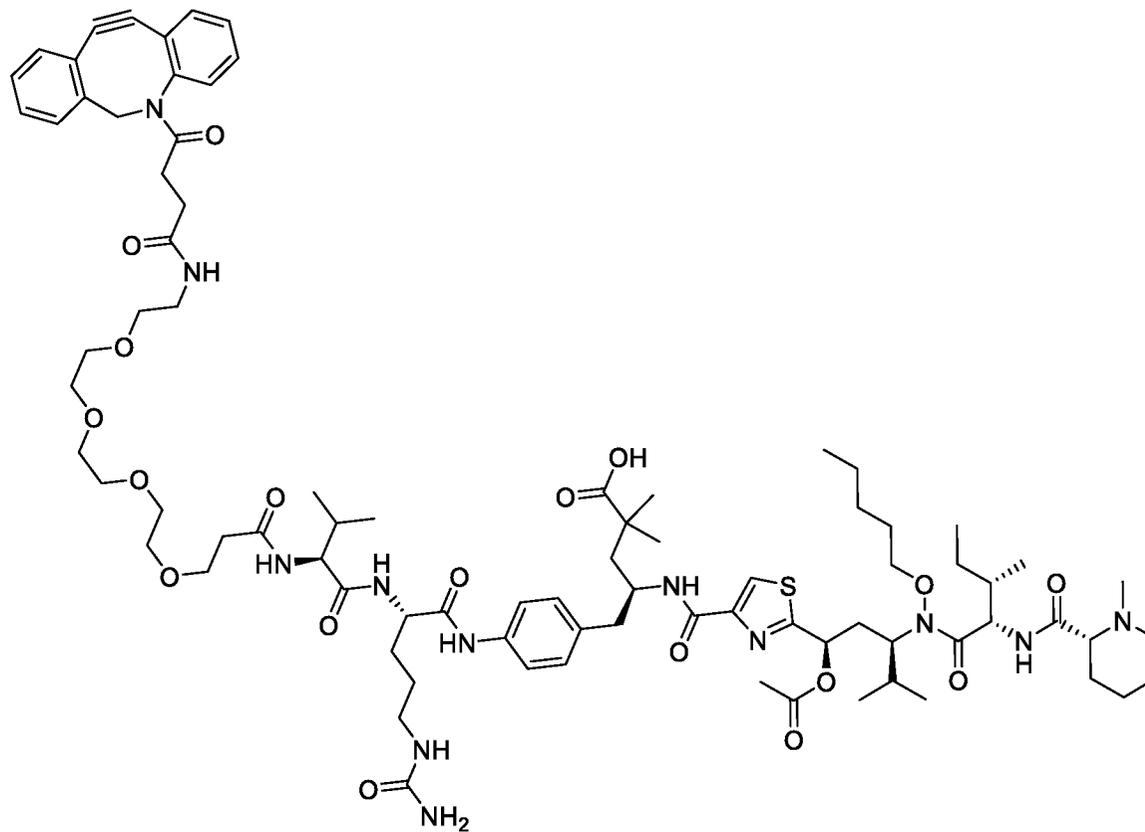
Структуры

LP5-IVd



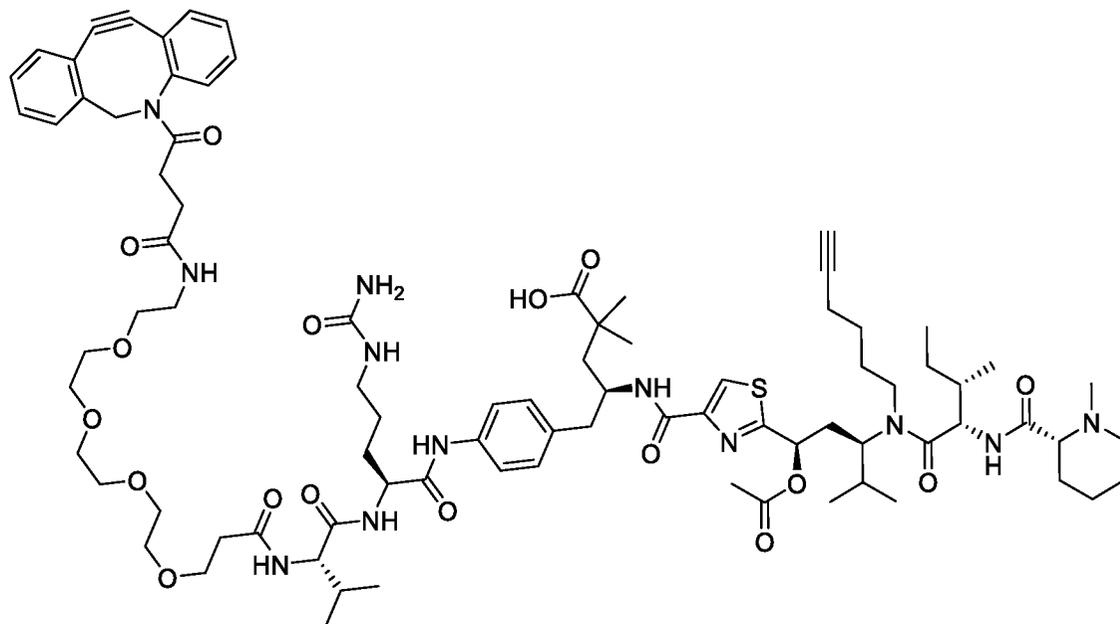
Структуры

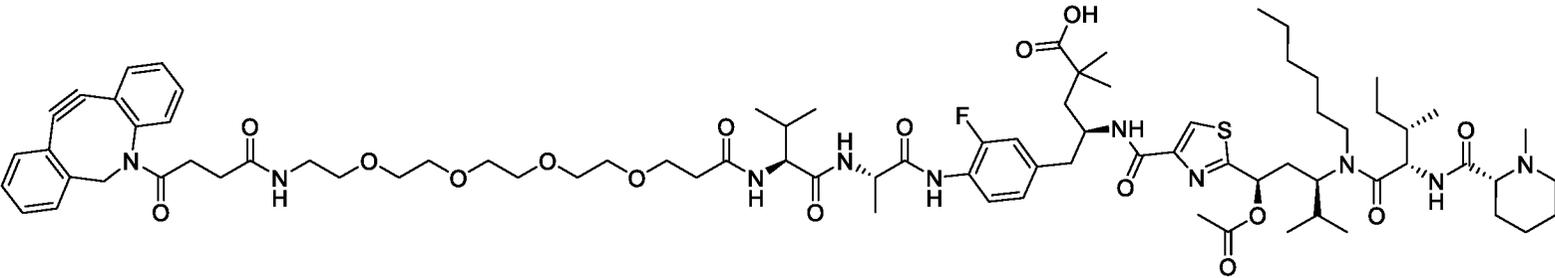
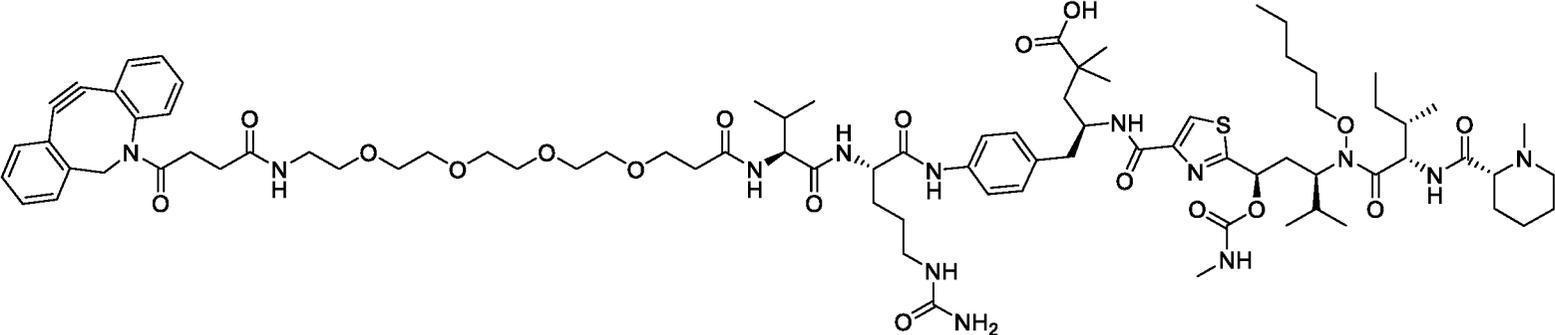
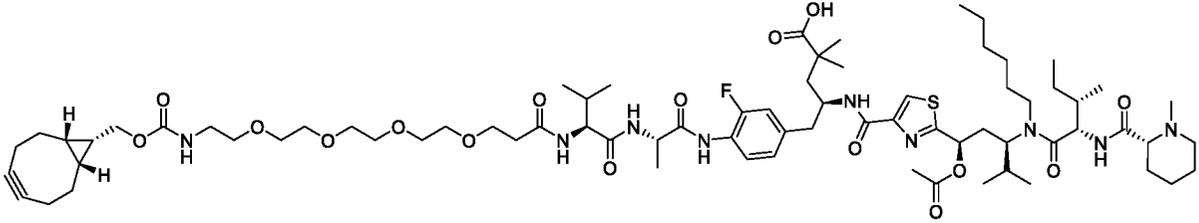
LP6-Vb



Структуры

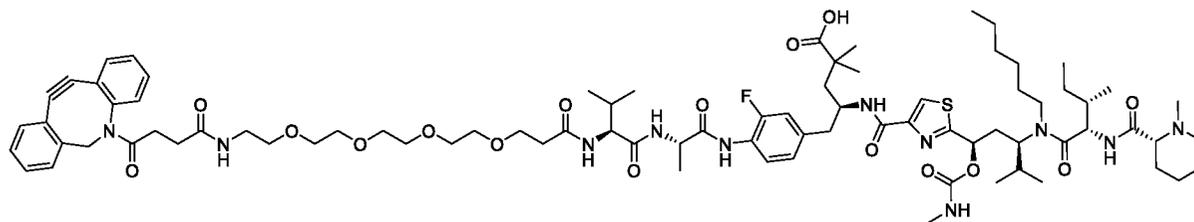
LP7-IVd



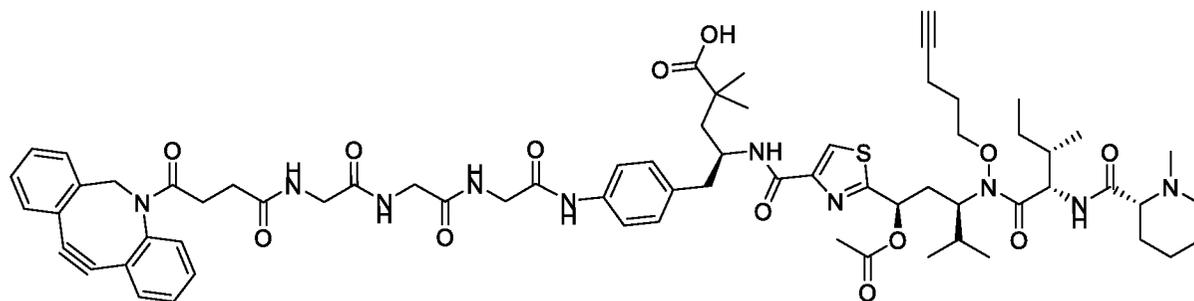
Структуры	
LP9-IVvB	 <p>The chemical structure of LP9-IVvB is a long, complex molecule. It features a central polyoxyethylene chain (PEG) connected to various functional groups. On the left, there is a bicyclic amide system with a benzene ring fused to a five-membered ring containing a nitrogen atom. The PEG chain is linked to a chiral center with an isopropyl group and a methyl group. Further down the chain, there is a fluorinated benzene ring, a hydroxyl group, and a thiazole ring system. The molecule terminates in a piperidine ring and a methyl group.</p>
LP10-VIh	 <p>The chemical structure of LP10-VIh is similar to LP9-IVvB but includes an additional primary amide group (-NH₂) attached to the chain. The rest of the molecule, including the bicyclic amide, PEG chain, chiral centers, fluorinated benzene ring, hydroxyl group, thiazole ring, and piperidine ring, is identical to LP9-IVvB.</p>
LP11-IVvB	 <p>The chemical structure of LP11-IVvB is similar to LP9-IVvB but features a different bicyclic amide system on the left side. This system consists of a bicyclic ring with a nitrogen atom and a hydroxyl group, connected to the PEG chain. The rest of the molecule, including the chiral centers, fluorinated benzene ring, hydroxyl group, thiazole ring, and piperidine ring, is identical to LP9-IVvB.</p>

Структуры

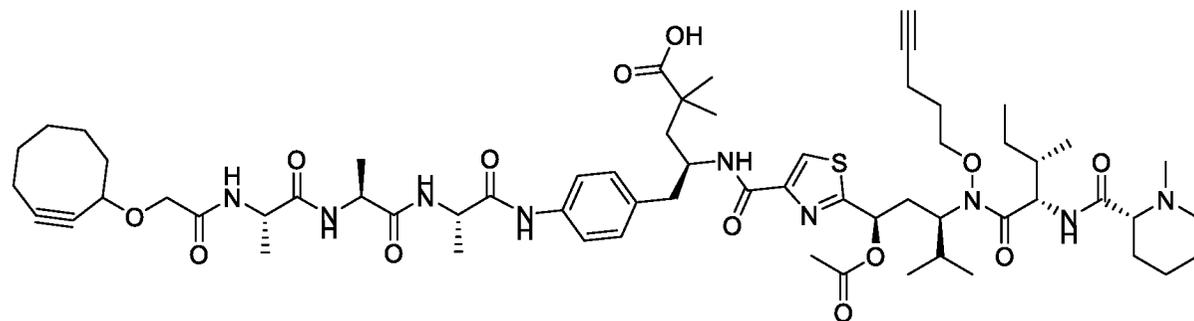
LP12-VIi



LP13-Ve

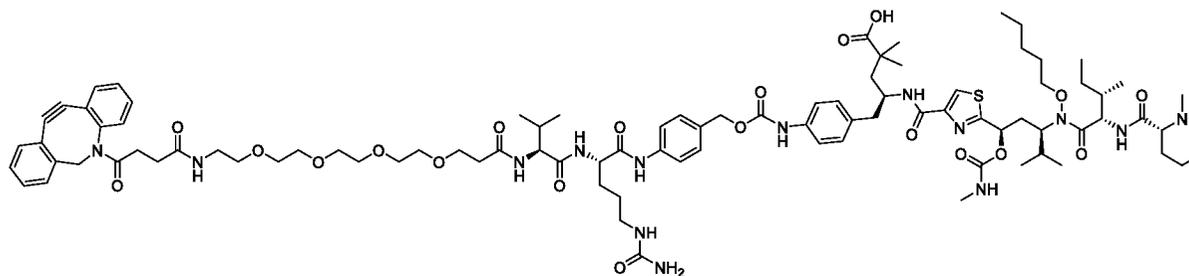


LP14-Ve

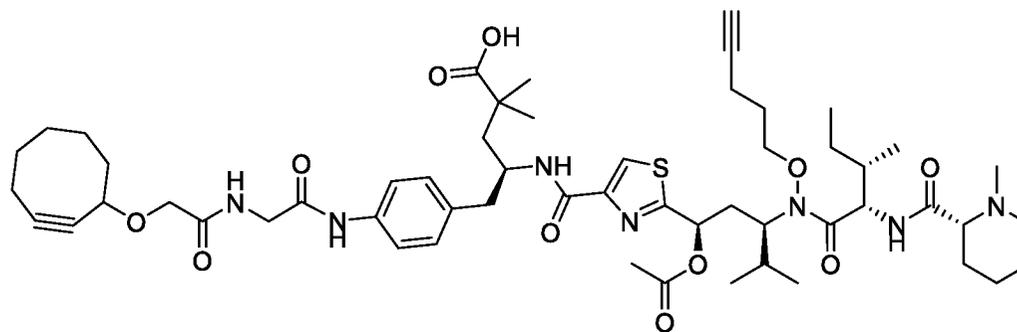


Структуры

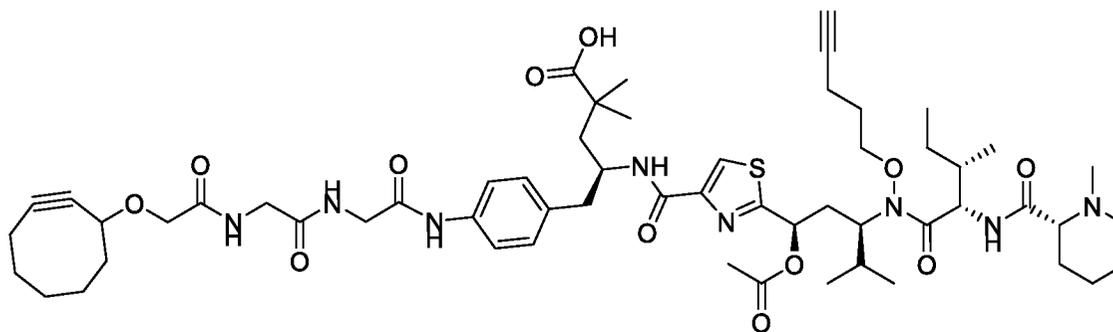
LP15-VIh



LP16-Ve

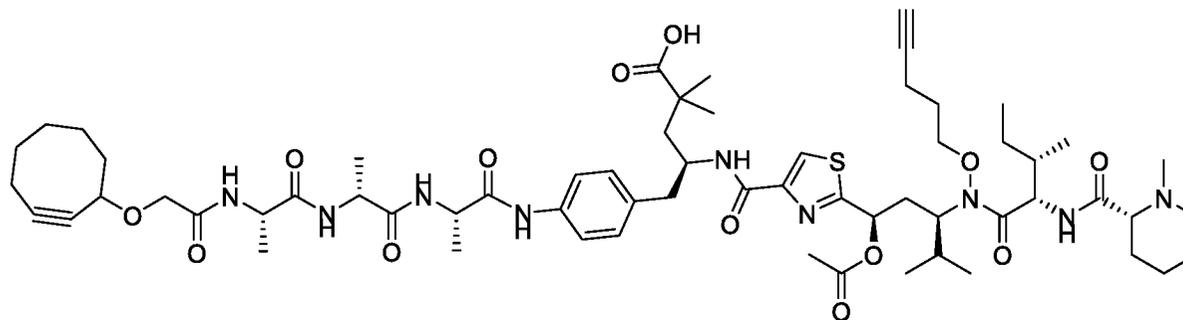


LP17-Ve

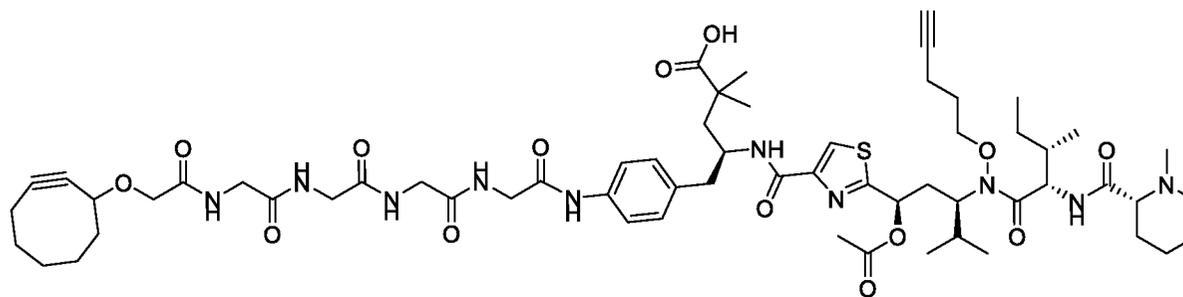


Структуры

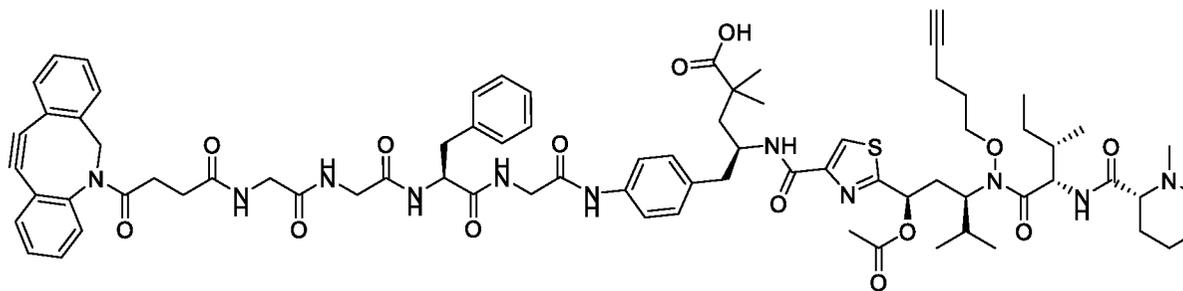
LP18-Ve



LP19-Ve

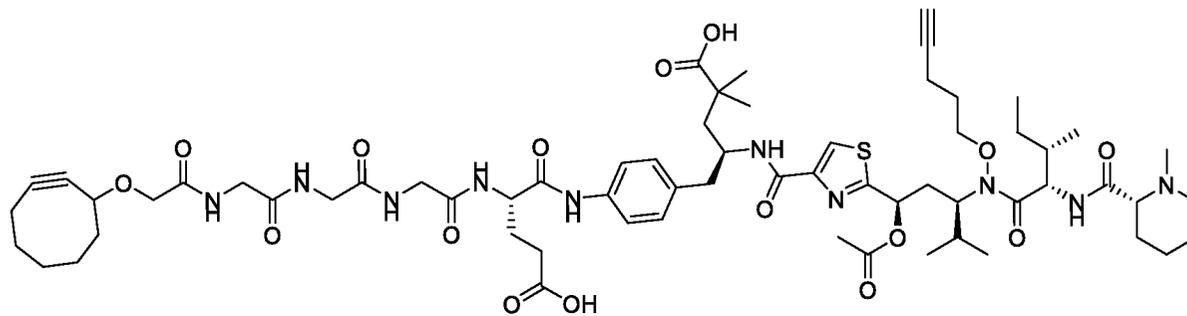


LP20-Ve

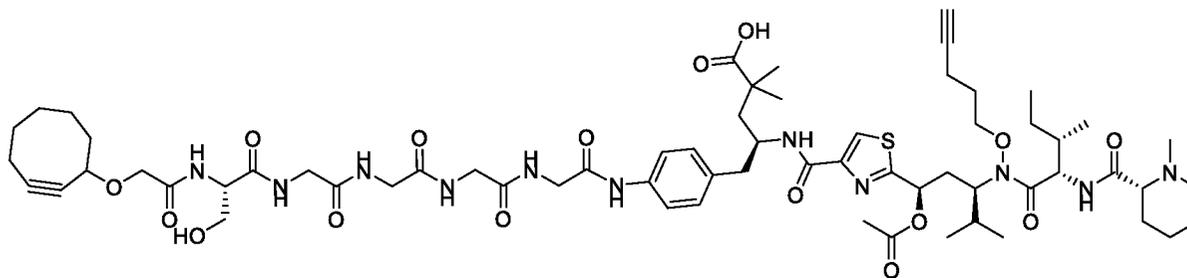


Структуры

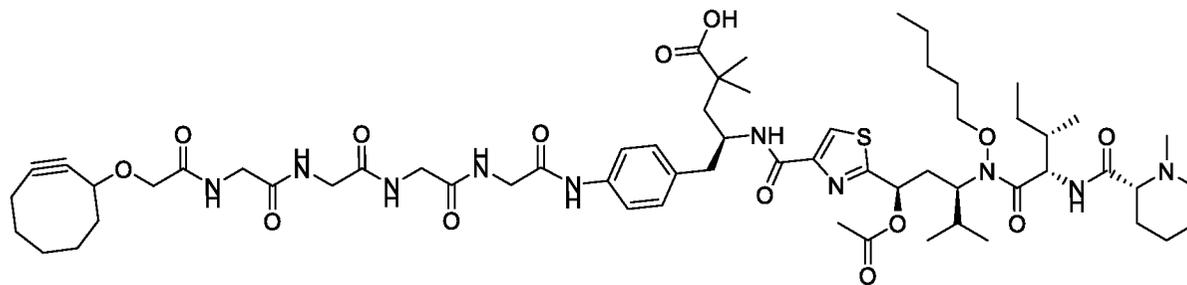
LP21-Ve

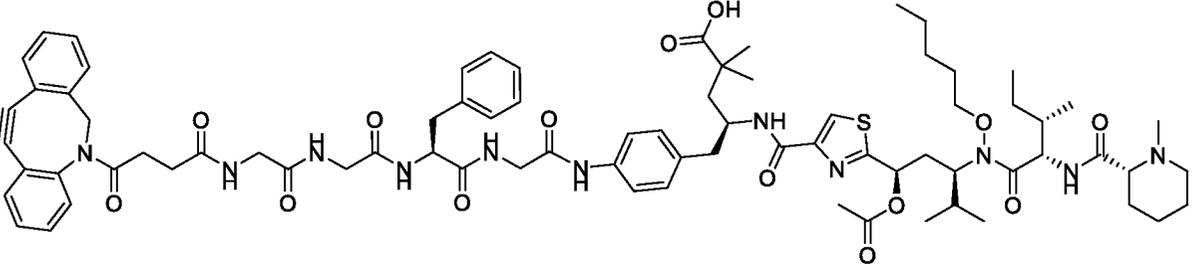
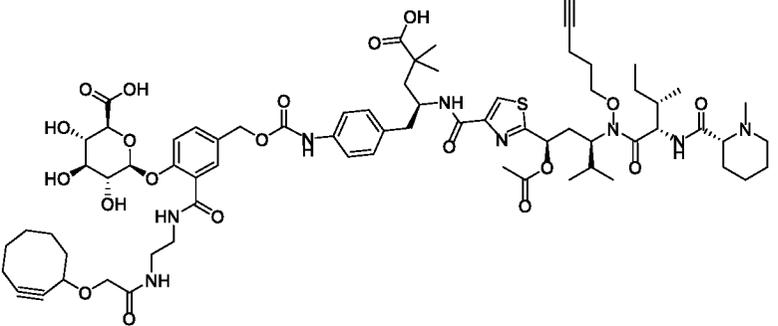
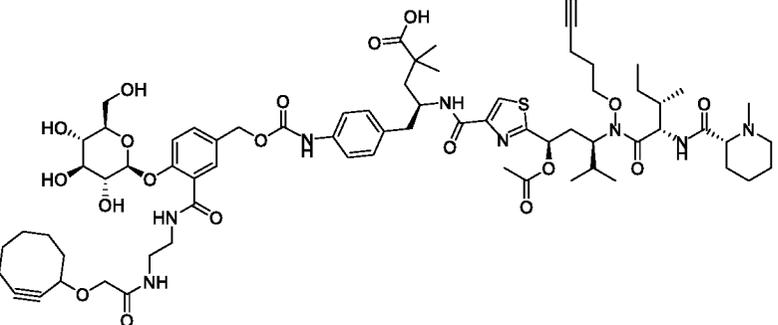


LP22-Ve



LP23-Vb



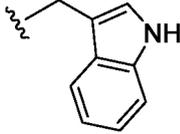
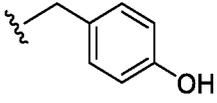
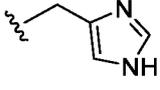
Структуры	
LP24-Vb	
LP25-Ve	
LP26-Ve	

Соединения, нагрузки и пролекарственные нагрузки

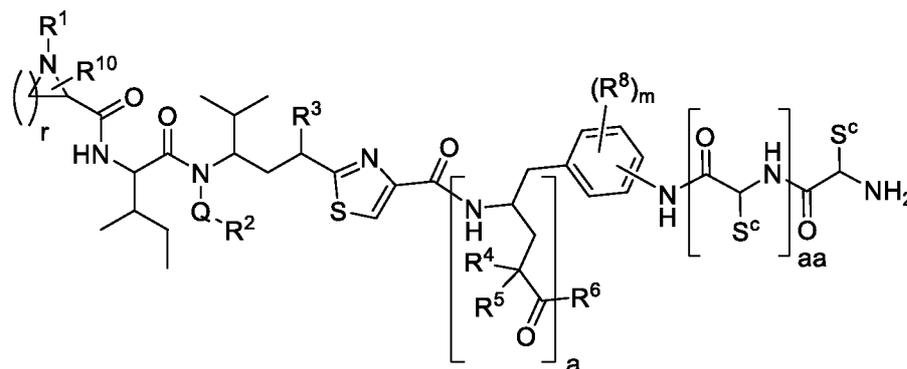
[0055] Здесь представлены соединения, биологически активные соединения или нагрузки. Без привязки к какой-либо конкретной теории, соединения включают тубулизины и их производные, например, их пролекарства. Термины или фразы “соединения”, “биологически активные соединения”, “пролекарственные нагрузки” и “нагрузки” применяются взаимозаменяемо по тексту настоящего описания изобретения.

[0056] В определенных вариантах осуществления биологически активное соединение (D^*) или его остаток включает, например, амино, гидроксильную, карбоксикислотную и/или амидную функциональную группу (например, $D^*-\text{NH}_2$ или $D^*-\text{NH}-R$; $D^*-\text{OH}$ или $D^*-\text{O}-R$; $D^*-\text{COOH}$ или $D^*-\text{C}(\text{O})\text{O}-R$; и/или $D^*-\text{CONH}_2$, $D^*-\text{CONH}-R$, или $D^*-\text{NHC}(\text{O})-R$). В определенных вариантах осуществления в настоящем документе, для примера и удобства, гетероциклический азот, R^2 , R^3 , R^6 и/или R^7 представляет амино, гидроксильную, карбоксикислотную и амидную функциональные группы в описанных здесь биологически активных соединениях, что должно быть ясно специалистам. Иными словами, специалисту в отрасли должно быть известно, что гетероциклический азот, R^2 , R^3 , R^6 и/или R^7 может быть частью описанных здесь биологически активных соединений (например, D^*) и может использоваться как функциональная группа для целей конъюгации. В одном варианте осуществления гидроксильная функциональная группа представляет собой первичная гидроксильная группа (например, $D^*-\text{CH}_2\text{OH}$ или $D^*-\text{CH}_2\text{O}-R$; или $D^*-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OH}$ или $D^*-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{O}-R$). В другом варианте осуществления гидроксильная функциональная группа представляет собой вторичная гидроксильная группа (например, $D^*-\text{CH}(\text{OH})R$ или $D^*-\text{CH}(\text{O}-R)R$; или $D^*-\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{R})(\text{OH})$ или $D^*-\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{R})(\text{O}-R)$). В другом варианте осуществления гидроксильная функциональная группа представляет собой третичная гидроксильная группа (например, $D^*-\text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)(\text{OH})$ или $D^*-\text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)(\text{O}-R)$; или $D^*-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)(\text{OH})$ или $D^*-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{R}_1)(\text{R}_2)(\text{O}-R)$). В определенных вариантах осуществления биологически активное соединение (D^*) или его остаток включают амино функциональную группу (например, $D^*-\text{NR}_2$ или $D^*-\text{N}(\text{R})-\text{R}$). В одном варианте осуществления амино функциональная группа представляет собой первичная амино группа (например, $D^*-\text{CH}_2\text{NR}_2$ или $D^*-\text{CH}_2\text{N}(\text{R})-\text{R}$; или $D^*-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{NR}_2$ или $D^*-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{N}(\text{R})-\text{R}$). В другом варианте осуществления амино функциональная группа представляет собой вторичная амино группа (например, $D^*-\text{CH}(\text{NR}_2)R$ или $D^*-\text{CH}(\text{NR}-R)R$; или $D^*-\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{R})(\text{NR}_2)$ или $D^*-\text{C}(\text{O})\text{CH}(\text{R})(\text{NR}-R)$). В другом варианте осуществления амино функциональная группа представляет собой третичная амино группа (например,

$D^*-C(R_1)(R_2)(NR_2)$ или $D^*-C(R_1)(R_2)(N(R)-R)$; или $D^*-C(O)C(R_1)(R_2)(NR_2)$ или $D^*-C(O)C(R_1)(R_2)(N(R)-R)$. В другом варианте осуществления amino функциональная группа является четвертичной, что должно быть известно специалистам. В другом варианте осуществления D^* , включающее amino функциональную группу представляет собой арил амин (например, $D^*-Ar-NR_2$, $D^*-Ar-N(R)-R$). Специалистам должно быть известно, что каждая функциональная группа в предыдущих предложениях может быть частью биологически активного соединения D^* и одновременно может отражаться в формуле для ясности, удобства и/или акцентирования внимания. В другом варианте осуществления D^* , включающее гидроксильную функциональную группу представляет собой арил гидроксил или фенольный гидроксил (например, $D^*-Ar-OH$, $D^*-Ar-O-R$). В другом варианте осуществления D^* , включающее амидную функциональную группу представляет собой тубулизиновый пролекарственный остаток, образовавшийся в результате реакции соединения или производного тубулизина, например, на описанном здесь R^7 , и аминокислотного соединения, также описанного здесь. Например, в определенных вариантах осуществления $D^*-NHC(O)C(S^c)(H)NH_2$ представляет тубулизиновое пролекарство с остатком N-концевой аминокислоты, при этом S^c представляет боковую цепь аминокислоты. В качестве дальнейшего примера, в определенных вариантах осуществления $D^*-NH[C(O)C(S^c)(H)NH]_{aa}C(O)C(S^c)(H)NH_2$ представляет тубулизиновое пролекарство с остатком N-концевого пептида, при этом S^c представляет боковую цепь аминокислоты, а aa является целым числом от одного до ста. В определенных вариантах осуществления aa имеет значение 1. В определенных вариантах осуществления aa имеет значение 2. В определенных вариантах осуществления aa имеет значение 3. В определенных вариантах осуществления aa имеет значение 4. В определенных вариантах осуществления aa имеет значение 5. В контексте настоящего документа “аминокислотная боковая цепь” означает дополнительную химическую группу на том же углероде, который несет первичный или вторичный амин и карбоновую кислоту аминокислоты. Как известно специалисту в отрасли, существует двадцать одна “стандартная” аминокислота. Примеры “стандартных” аминокислот включают, помимо прочего, аланин, серин, пролин, аргинин и аспарагиновую кислоту. Другие аминокислоты включают цистеин, селеноцистеин и глицин (например, где дополнительная химическая группа на том же углероде, который несет первичный амин и карбоновая кислота глицина представляет собой водород). Примеры аминокислотных боковых цепей включают, помимо прочего, метил (т.е. аланин), *втор*-бутил (т.е. изолейцин), *изо*-бутил (т.е. лейцин),

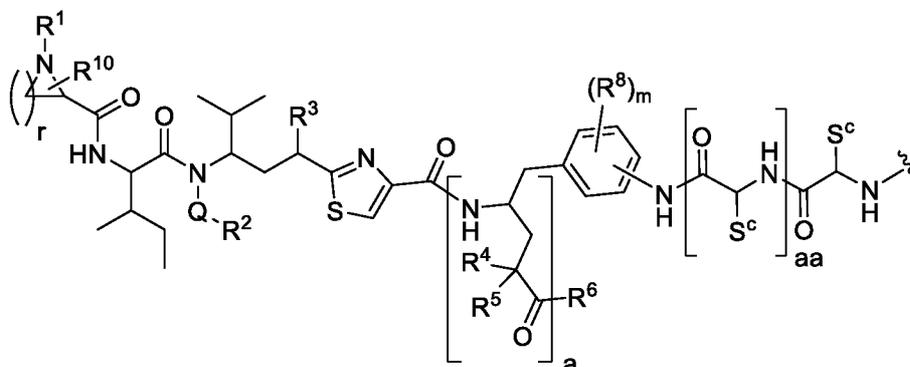
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ (т.е. метионин), $-\text{CH}_2\text{Ph}$ (т.е. фенилаланин),  (т.е. триптофан),
 (т.е. тирозин), *изо*-пропил (т.е. валин), гидроксиметил (т.е. серин),
 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ (т.е. треонин), $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ (т.е. аспарагин), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ (т.е. глутамин), $-\text{CH}_2\text{SH}$ (т.е. цистеин), $-\text{CH}_2\text{SeH}$ (т.е. селеноцистеин), $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ (т.е. глицин),
 пропилен или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (т.е. пролин), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ (т.е. аргинин),
 (т.е. гистидин), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ (т.е. лизин), $-\text{CH}_2\text{COOH}$ (т.е. аспарагиновая кислота) и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (т.е. глутаминовая кислота).

[0057] В определенных вариантах осуществления биологически активным соединением (\mathbf{D}^*), включающим амидную функциональную группу ($\mathbf{D}^*-\text{NHC}(\text{O})-\mathbf{R}$), например, на \mathbf{R}^7 , является пролекарственное соединение с Формулой Ia



Формула Ia.

В определенных вариантах осуществления Формула Iaa пролекарства



Формула Iaa

может быть связана с линкером или связующим агентом, которые описаны в настоящем документе, при этом $\{$ обозначает присоединение к линкеру и/или связующему агенту, которые описаны в настоящем документе.

[0058] В определенных вариантах осуществления соединения могут доставляться к клеткам, будучи частью конъюгата. В определенных вариантах осуществления соединения способны оказывать какое-либо действие тубулизина или производного тубулизина у мишени или в мишени, например, у клетки-мишени или в клетке-мишени. Определенные соединения могут иметь одно или более дополнительных действий. В определенных вариантах осуществления соединения способны модулировать активность рецептора фолиевой кислоты, рецептора соматостатина и/или рецептора бомбезина.

Соединения, нагрузки или пролекарственные нагрузки—Q представляет собой углерод

[0059] В определенных вариантах осуществления здесь представлено соединение, имеющее структуру Формулы I, где r имеет значение 4.

[0060] В определенных вариантах осуществления вышеприведенной Формулы I полезные R^3 группы включают гидроксил, $-O-C_1-C_5$ алкил, $-OC(O)C_1-C_5$ алкил, $-OC(O)N(H)C_1-C_{10}$ алкил, $-OC(O)N(H)C_1-C_{10}$ алкил- $NR^{3a}R^{3b}$, $-NHC(O)C_1-C_5$ алкил или $-OC(O)N(H)(CH_2CH_2O)_n C_1-C_{10}$ алкил- $NR^{3a}R^{3b}$, при этом R^{3a} и R^{3b} представляет собой независимо в каждом случае водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил, при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой гидроксил. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-O-C_1-C_5$ алкил. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-OMe$. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-OEt$. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-O$ -пропил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-O$ -бутил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-O$ -пентил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-OC(O)C_1-C_5$ алкил. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-OC(O)Me$. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-OC(O)Et$. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-OC(O)$ -пропил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-OC(O)$ -бутил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-OC(O)$ -пентил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой

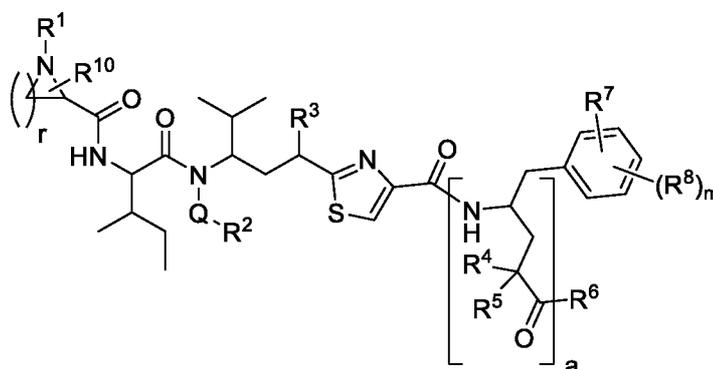
представляет собой $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{C}_{1-10}$ алкил- $\text{NR}^{3a}\text{R}^{3b}$, при этом n представляет собой целое число от 1 до 10. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{NR}^{3a}\text{R}^{3b}$, при этом n представляет собой целое число от одного до десяти. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}^{3a}\text{R}^{3b}$, при этом n представляет собой целое число от одного до десяти. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}^{3a}\text{R}^{3b}$, при этом n имеет значение 3. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}^{3a}\text{R}^{3b}$, при этом n представляет собой целое число от одного до десяти. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}^{3a}\text{R}^{3b}$, при этом n представляет собой целое число от одного до десяти. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}^{3a}\text{R}^{3b}$, при этом n представляет собой целое число от одного до десяти. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}^{3a}\text{R}^{3b}$, при этом n представляет собой целое число от одного до десяти. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}^{3a}\text{R}^{3b}$, при этом n представляет собой целое число от одного до десяти. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}^{3a}\text{R}^{3b}$, при этом n представляет собой целое число от одного до десяти. В любом из непосредственно предшествующих двенадцати вариантов осуществления R^{3a} и R^{3b} представляет собой водород.

[0061] В определенных вариантах осуществления вышеприведенной Формулы I полезные R^7 группы независимо включают водород, $-\text{OH}$, фтор, хлор, бром, йод и $-\text{NR}^{7a}\text{R}^{7b}$. В одном варианте осуществления R^7 представляет собой водород. В одном варианте осуществления R^7 представляет собой $-\text{OH}$. В одном варианте осуществления R^7 представляет собой фтор. В другом варианте осуществления R^7 представляет собой хлор. В другом варианте осуществления R^7 представляет собой бром. В другом варианте

осуществления R^7 представляет собой йод. В одном варианте осуществления R^7 представляет собой $-NR^{7a}R^{7b}$. В одном варианте осуществления R^{7a} и R^{7b} представляет собой водород. В одном варианте осуществления R^{7a} представляет собой водород, а R^{7b} представляет собой $-C(O)CH_2OH$. В одном варианте осуществления R^{7a} представляет собой водород, а R^{7b} представляет собой первый остаток N-концевой аминокислоты. R^{7b} как первый остаток N-концевой аминокислоты отличает эти аминокислотные остатки от вторых аминокислотных остатков в линкере, что описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления R^{7a} представляет собой водород, а R^{7b} представляет собой первый остаток N-концевого пептида. R^{7b} как первый остаток N-концевого пептида отличает эти пептидные остатки от вторых пептидных остатков в линкере, что описано в настоящем документе. В одном варианте осуществления R^{7a} представляет собой водород, а R^{7b} представляет собой $-CH_2CH_2NH_2$.

[0062] В определенных приведенных выше вариантах осуществления Формулы I полезные R^8 группы независимо включают водород, $-NHR^9$ и галоген. В одном варианте осуществления R^8 представляет собой водород. В одном варианте осуществления R^8 представляет собой $-NHR^9$, при этом R^9 представляет собой водород. В одном варианте осуществления R^8 представляет собой фтор. В другом варианте осуществления R^8 представляет собой хлор. В другом варианте осуществления R^8 представляет собой бром. В другом варианте осуществления R^8 представляет собой йод. В одном варианте осуществления m имеет значение 1. В одном варианте осуществления m имеет значение 2.

[0063] В определенных вариантах осуществления здесь представлено соединение, имеющее структуру Формулы I



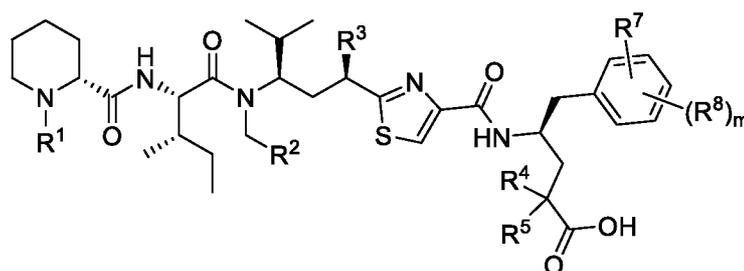
Формула I

или его фармацевтически приемлемая соль или пролекарство, при этом Q представляет собой $-CH_2-$; R^1 представляет собой C₁-C₁₀ алкил; R^2 представляет собой алкил; R^4 и R^5 представляет собой C₁-C₅ алкил; R^6 представляет собой $-OH$; R^{10} отсутствует; при этом r

имеет значение 4; и при этом a имеет значение 1. В Формуле I в определенных вариантах осуществления полезные R^1 группы включают метил и этил. В определенных вариантах осуществления полезные R^1 группы включают пропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил, нонил, децил и их конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой этил. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой гексил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой гептил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой октил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой нонил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой децил и его конституционные изомеры. В Формуле I в определенных вышеприведенных вариантах осуществления полезные R^2 группы включают *n*-пентил, *n*-гексил, *n*-гептил, *n*-октил, *n*-нонил и *n*-децил. В одном варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-пентил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-гексил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-гептил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-октил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-нонил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-децил или его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления $Q-R^2$ представляет собой *n*-гексил. В Формуле I в определенных вариантах осуществления полезные R^3 группы соответствуют приведенным выше описаниям. В определенных приведенных выше вариантах осуществления Формулы I полезные R^4 группы включают метил, этил, пропил, бутил и пентил. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой метил. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой этил. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В определенных приведенных выше вариантах осуществления Формулы I полезные R^5 группы включают метил, этил, пропил, бутил и пентил. В одном варианте осуществления

R^5 представляет собой метил. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой этил. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В определенных вариантах осуществления вышеприведенной Формулы I независимые комбинации R^4 и R^5 рассматриваются в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляют собой метил. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляют собой этил. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой независимо пропил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляют собой независимо бутил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляют собой независимо пентил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой этил, а R^5 представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой этил, а R^5 независимо пропил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой независимо пропил и его конституционные изомеры; а R^5 представляет собой независимо бутил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой независимо бутил и его конституционные изомеры; а R^5 представляет собой независимо пентил и его конституционные изомеры.

[0064] В определенных вариантах осуществления здесь представлено соединение, имеющее структуру Формулы II

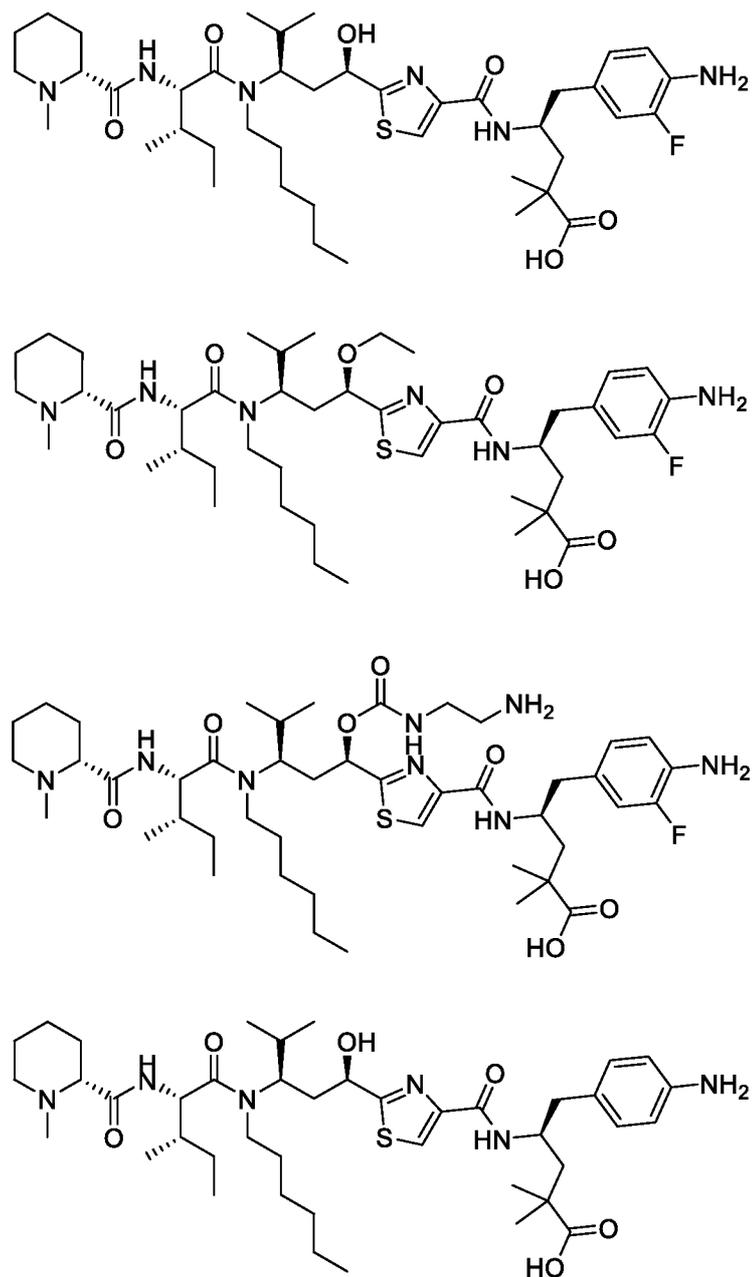


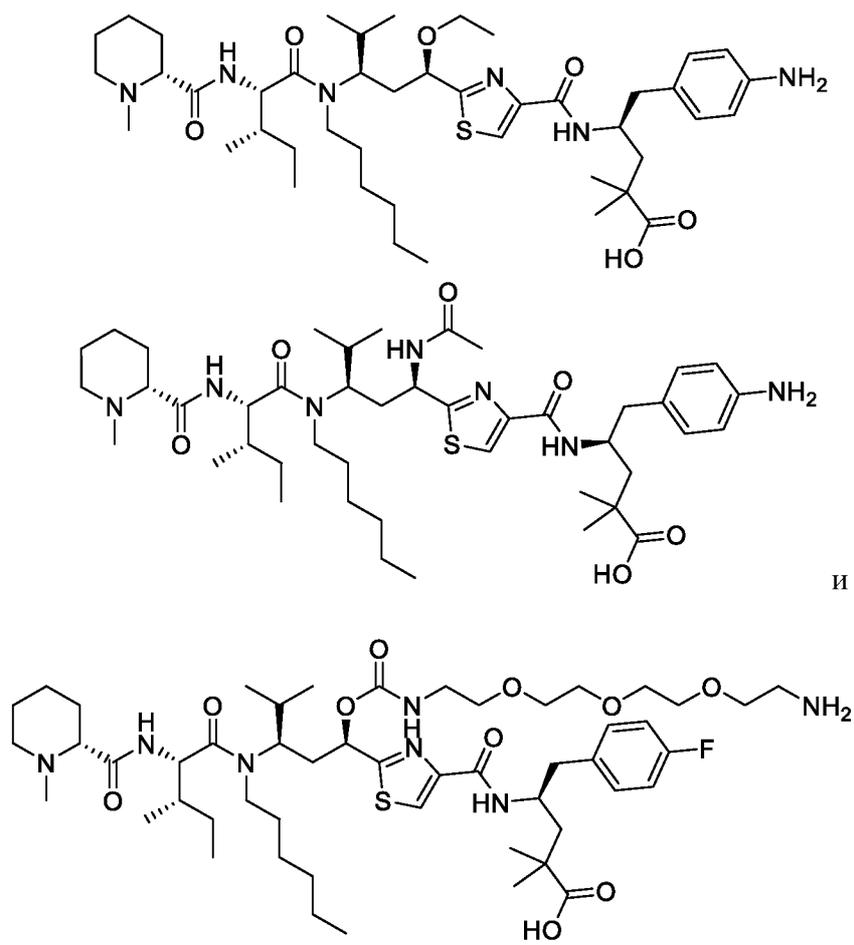
Формула II

или его фармацевтически приемлемая соль или пролекарство. В определенных вариантах осуществления R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^7 , R^8 и m соответствуют описаниям для вышеприведенной Формулы I. В определенных вариантах осуществления R^3 представляет собой гидроксил, $-OEt$, $-OC(O)N(H)CH_2CH_2NH_2$, $-NHC(O)Me$ или $-OC(O)N(H)CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2NH_2$. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой гидроксил. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой

–OEt. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $–OC(O)N(H)CH_2CH_2NH_2$.
 В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $–NHC(O)Me$.
 В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $–OC(O)N(H)CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2NH_2$.

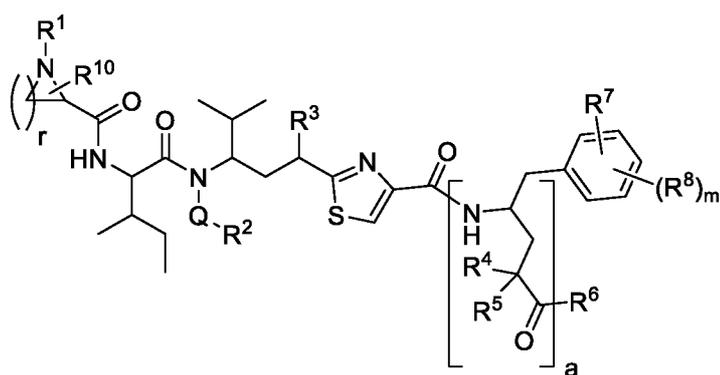
[0065] В определенных вариантах осуществления здесь представлены соединения
 Формулы II, выбираемые из группы, состоящей из





их фармацевтически приемлемая соль.

[0066] В определенных вариантах осуществления здесь представлено соединение, имеющее структуру Формулы I



Формула I

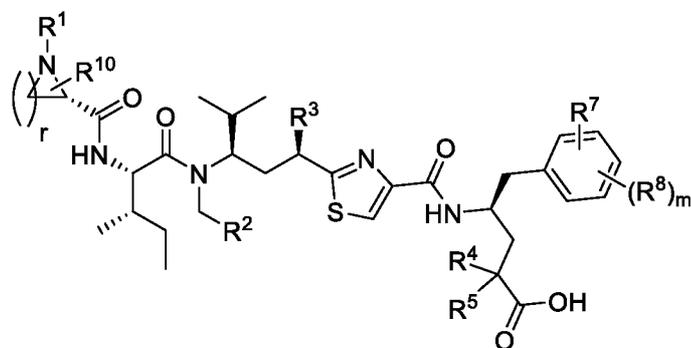
или его фармацевтически приемлемая соль или пролекарство, при этом **Q** представляет собой $-\text{CH}_2-$; **R¹** представляет собой водород или C_1 - C_{10} алкил; **R²** представляет собой алкил; **R⁴** и **R⁵** представляет собой C_1 - C_5 алкил; **R⁶** представляет собой $-\text{OH}$; при этом **r** имеет значение 3 или 4; и при этом **a** имеет значение 1. В Формуле I, в одном варианте

осуществления, R^1 представляет собой водород. В Формуле I в определенных вариантах осуществления полезные R^1 группы включают метил и этил. В определенных вариантах осуществления полезные R^1 группы включают пропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил, нонил, децил и их конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой этил. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой гексил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой гептил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой октил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой нонил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой децил и его конституционные изомеры. В Формуле I в определенных вышеприведенных вариантах осуществления полезные R^2 группы включают *n*-пентил, *n*-гексил, *n*-гептил, *n*-октил, *n*-нонил и *n*-децил. В одном варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-пентил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-гексил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-гептил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-октил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-нонил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-децил или его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления $Q-R^2$ представляет собой *n*-гексил. В Формуле I в определенных вариантах осуществления полезные R^3 группы соответствуют приведенным выше описаниям. В определенных приведенных выше вариантах осуществления Формулы I полезные R^4 группы включают метил, этил, пропил, бутил и пентил. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой метил. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой этил. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В определенных приведенных выше вариантах осуществления Формулы I полезные R^5 группы включают метил, этил, пропил, бутил и пентил. В одном варианте осуществления

R^5 представляет собой метил. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой этил. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В определенных вариантах осуществления вышеприведенной Формулы I независимые комбинации R^4 и R^5 рассматриваются в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой этил. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой независимо пропил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой независимо бутил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой независимо пентил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой этил, а R^5 представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой этил, а R^5 независимо пропил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой независимо пропил и его конституционные изомеры; а R^5 представляет собой независимо бутил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой независимо бутил и его конституционные изомеры; а R^5 представляет собой независимо пентил и его конституционные изомеры. В Формуле I в определенных вариантах осуществления полезные R^7 и R^8 группы соответствуют приведенным выше описаниям. В определенных вариантах осуществления Формулы I R^{10} представляет собой -C₁-C₅ алкил. В определенных вариантах осуществления полезные R^{10} группы включают пропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил, нонил, децил и их конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой этил. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой гексил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой гептил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой октил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой нонил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^{10}

представляет собой децил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления r имеет значение 3. В одном варианте осуществления r имеет значение 4.

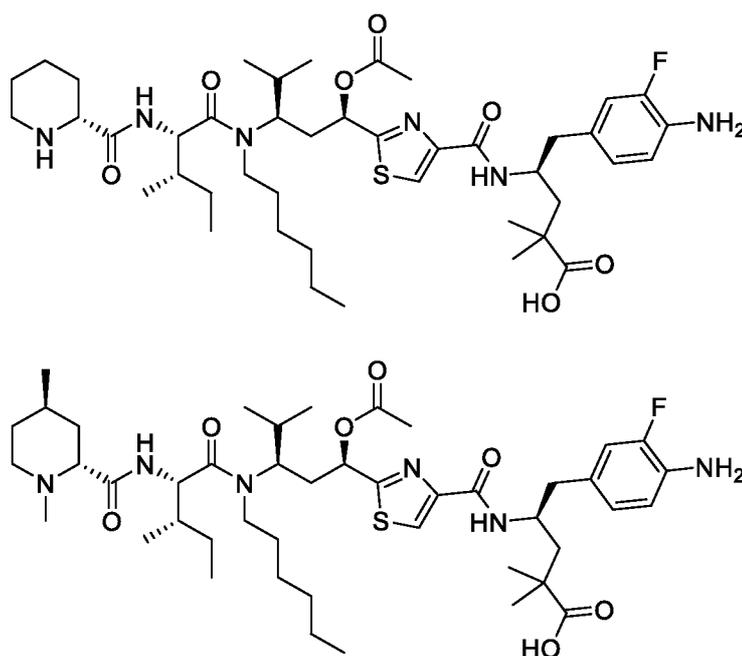
[0067] В определенных вариантах осуществления здесь представлено соединение, имеющее структуру Формулы III

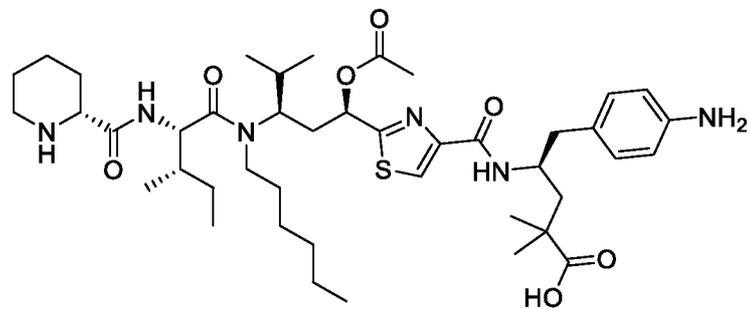
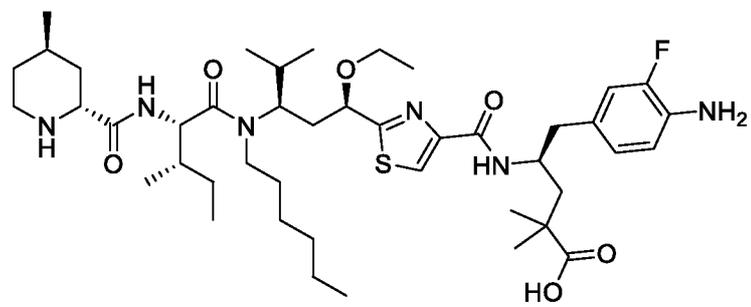
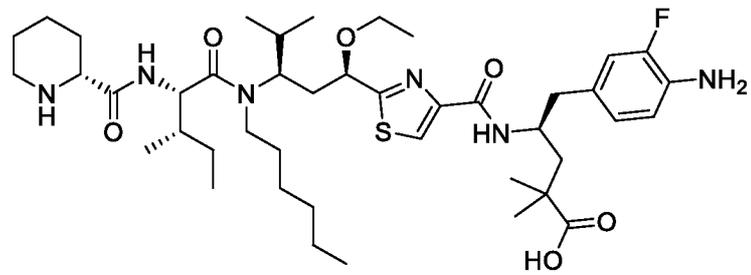
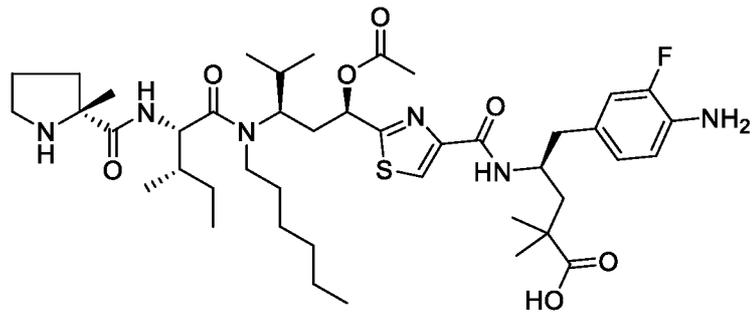
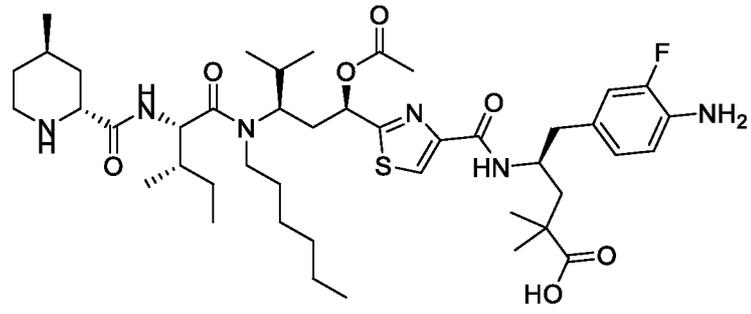


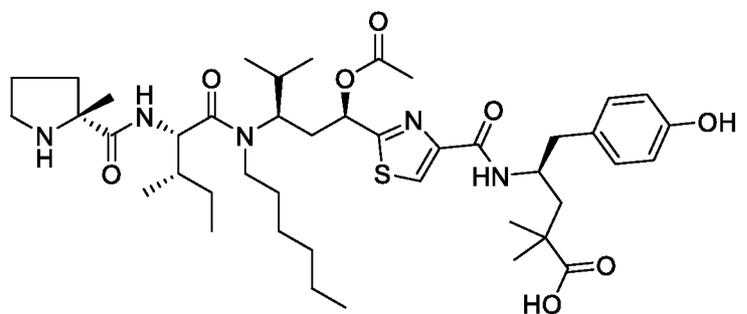
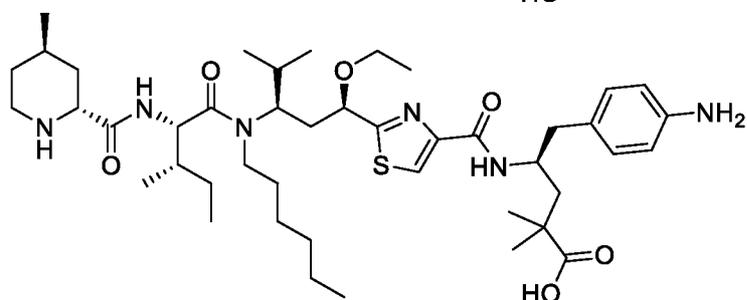
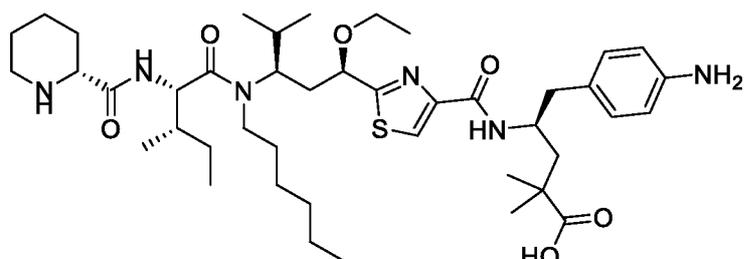
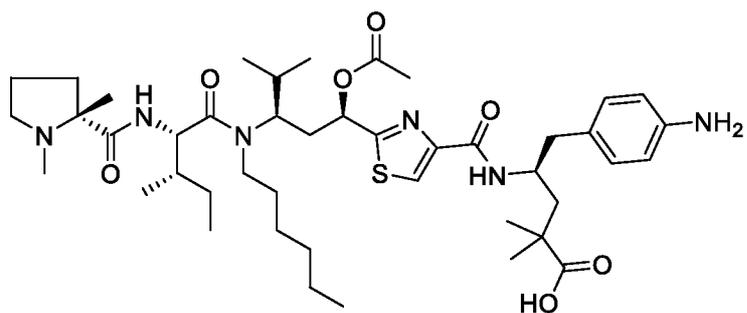
Формула III

или его фармацевтически приемлемая соль или пролекарство. В определенных вариантах осуществления R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^7 , R^8 , R^{10} и m соответствуют описаниям для вышеприведенной Формулы I. В определенных вариантах осуществления R^1 представляет собой водород или метил; а R^{10} представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой водород; а R^{10} представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой метил; и R^{10} представляет собой метил.

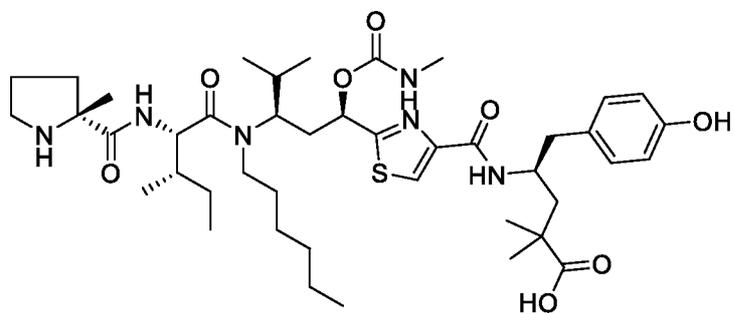
[0068] В определенных вариантах осуществления здесь представлены соединения Формулы III, выбираемые из группы, состоящей из







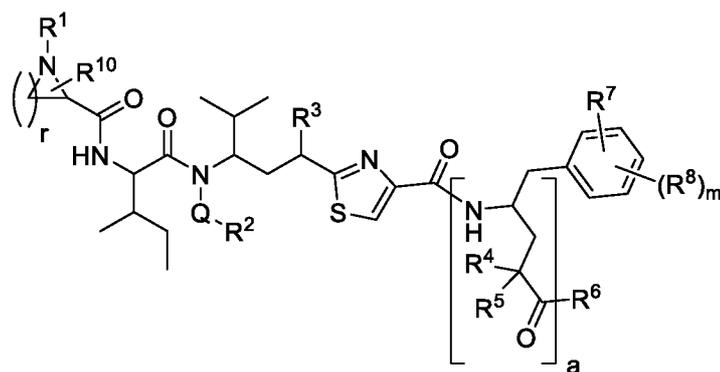
и



или

их фармацевтически приемлемая соль.

[0069] В определенных вариантах осуществления здесь представлено соединение, имеющее структуру Формулы I

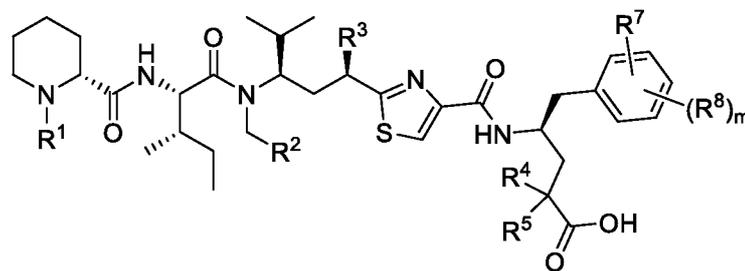


Формула I

или его фармацевтически приемлемая соль или пролекарство, при этом **Q** представляет собой $-\text{CH}_2-$; **R¹** представляет собой водород или C_1 - C_{10} алкил; **R²** представляет собой алкил; **R⁴** и **R⁵** представляет собой C_1 - C_5 алкил; **R⁶** представляет собой $-\text{OH}$; **R¹⁰** отсутствует; при этом **r** имеет значение 4; и при этом **a** имеет значение 1. В Формуле I, в одном варианте осуществления, **R¹** представляет собой водород. В Формуле I в определенных вариантах осуществления полезные **R¹** группы включают метил и этил. В определенных вариантах осуществления полезные **R¹** группы включают пропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил, нонил, децил и их конституционные изомеры. В одном варианте осуществления **R¹** представляет собой метил. В одном варианте осуществления **R¹** представляет собой этил. В одном варианте осуществления **R¹** представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления **R¹** представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления **R¹** представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления **R¹** представляет собой гексил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления **R¹** представляет собой гептил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления **R¹** представляет собой октил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления **R¹** представляет собой нонил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления **R¹** представляет собой децил и его конституционные изомеры. В Формуле I в определенных вышеприведенных вариантах осуществления полезные **R²** группы включают *n*-пентил, *n*-гексил, *n*-гептил, *n*-октил, *n*-нонил и *n*-децил. В одном варианте осуществления **R²** представляет собой *n*-пентил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления **R²** представляет собой *n*-гексил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления **R²** представляет собой *n*-гептил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления **R²** представляет собой *n*-октил или его конституционные

изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой n -нонил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой n -децил или его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления $Q-R^2$ представляет собой n -гексил. В Формуле I в определенных вариантах осуществления полезные R^3 группы соответствуют приведенным выше описаниям. В определенных приведенных выше вариантах осуществления Формулы I полезные R^4 группы включают метил, этил, пропил, бутил и пентил. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой метил. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой этил. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В определенных приведенных выше вариантах осуществления Формулы I полезные R^5 группы включают метил, этил, пропил, бутил и пентил. В одном варианте осуществления R^5 представляет собой метил. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой этил. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В определенных вариантах осуществления вышеприведенной Формулы I независимые комбинации R^4 и R^5 рассматриваются в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой этил. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой независимо пропил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой независимо бутил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой независимо пентил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой этил, а R^5 представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой этил, а R^5 независимо пропил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой независимо пропил и его конституционные изомеры; а R^5 представляет собой независимо бутил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой независимо бутил и его конституционные изомеры; а R^5 представляет собой независимо пентил и его конституционные изомеры. В Формуле I в определенных вариантах осуществления полезные R^7 и R^8 группы соответствуют приведенным выше описаниям.

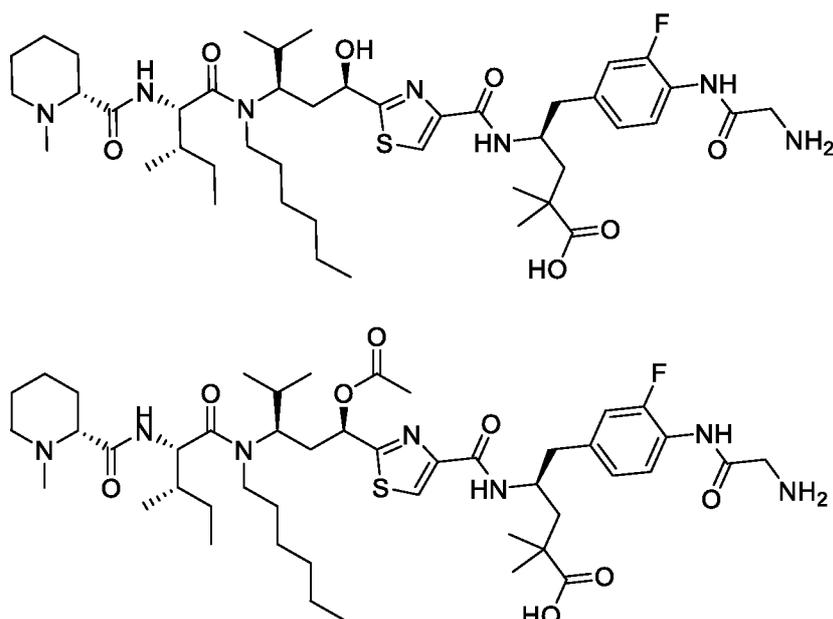
[0070] В определенных вариантах осуществления здесь представлено соединение, имеющее структуру Формулы II

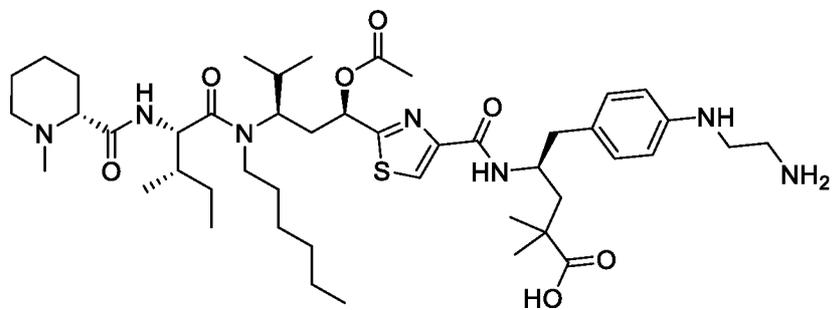
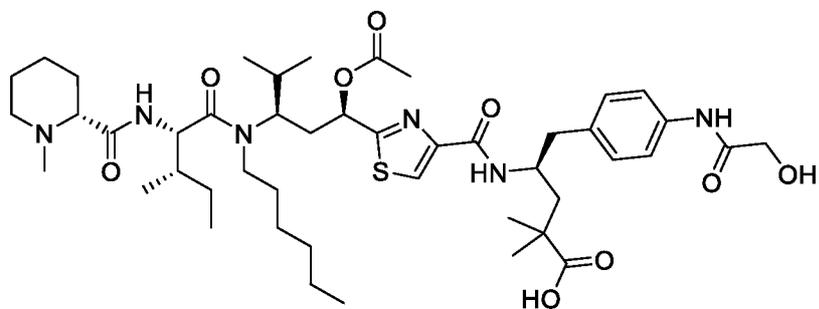
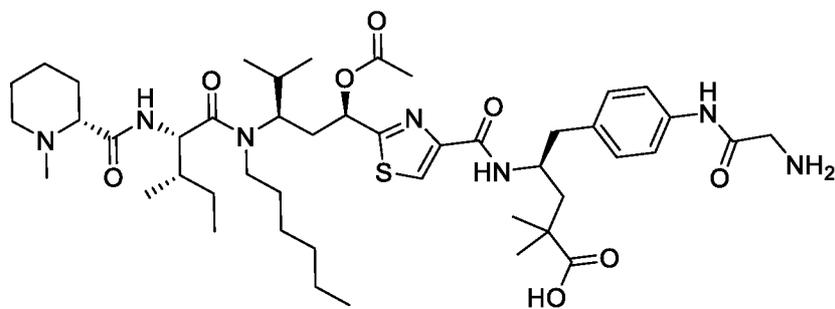
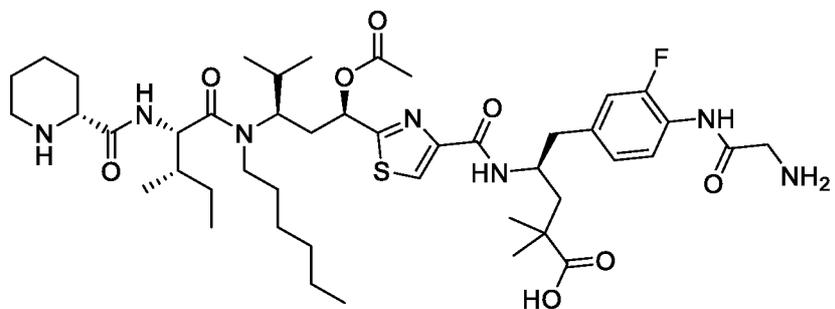
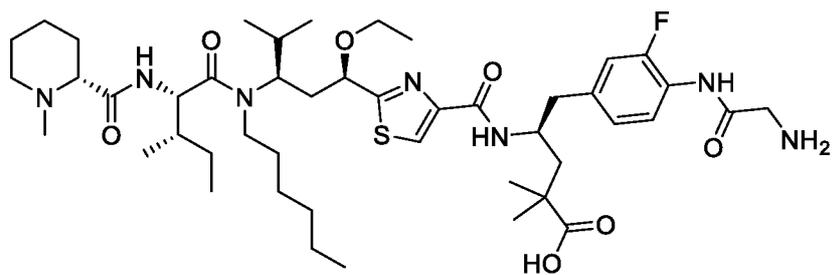


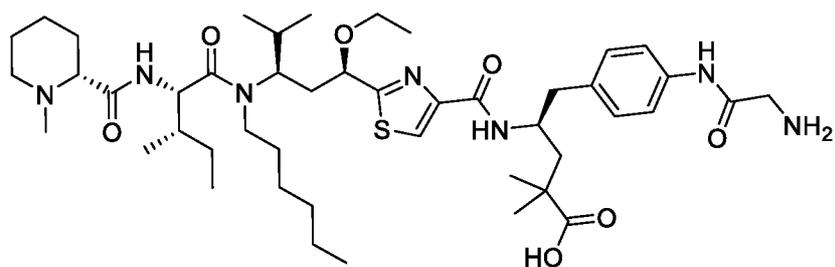
Формула II

или его фармацевтически приемлемая соль или пролекарство. В определенных вариантах осуществления R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁷, R⁸ и m соответствуют описаниям для вышеприведенной Формулы I. В определенных вариантах осуществления R⁷ представляет собой водород, -N(H)C(O)CH₂NH₂, -N(H)C(O)CH₂OH или -N(H)CH₂CH₂NH₂; а R⁸ представляет собой водород или фтор. В одном варианте осуществления R⁷ представляет собой -N(H)C(O)CH₂NH₂; а R⁸ представляет собой фтор. В одном варианте осуществления R⁷ представляет собой -N(H)C(O)CH₂NH₂; а R⁸ представляет собой водород. В одном варианте осуществления R⁷ представляет собой -N(H)C(O)CH₂OH; а R⁸ представляет собой водород. В одном варианте осуществления R⁷ представляет собой -N(H)CH₂CH₂NH₂; а R⁸ представляет собой водород.

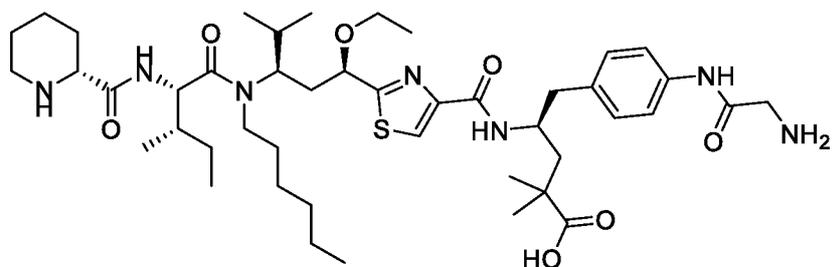
[0071] В определенных вариантах осуществления здесь представлены соединения Формулы II, выбираемые из группы, состоящей из







и

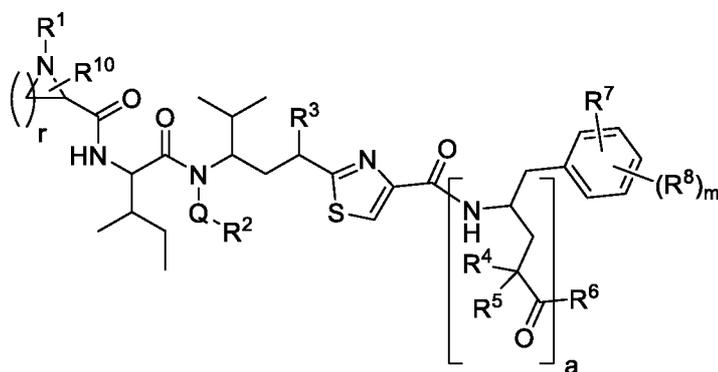


или

их фармацевтически приемлемая соль.

Соединения, нагрузки или пролекарственные нагрузки—**Q** представляет собой кислород

[0072] В определенных вариантах осуществления здесь представлено соединение, имеющее структуру Формулы I



Формула I

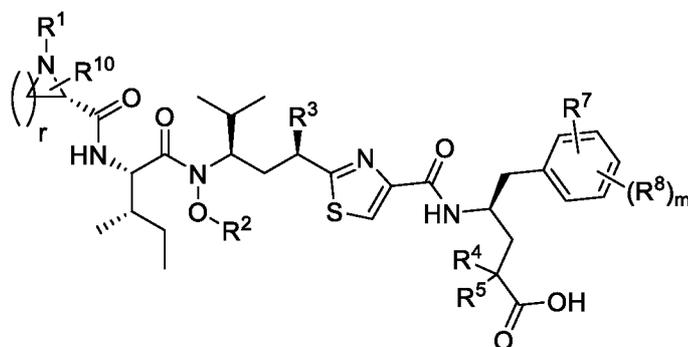
или его фармацевтически приемлемая соль или пролекарство, при этом **Q** представляет собой $-O-$; **R¹** представляет собой водород или C_1-C_{10} алкил; **R²** представляет собой алкил или алкинил; **R³** представляет собой гидроксил или $-OC(O)C_1-C_5$ алкил; **R⁴** и **R⁵** представляет собой C_1-C_5 алкил; **R⁶** представляет собой $-OH$; **R¹⁰**, если присутствует представляет собой $-C_1-C_5$ алкил; при этом **r** имеет значение 3 или 4; и при этом **a** имеет значение 1. В Формуле I, в одном варианте осуществления, **R¹** представляет собой водород. В Формуле I в определенных вариантах осуществления полезные **R¹** группы включают метил и этил. В определенных вариантах осуществления полезные **R¹** группы включают пропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил, нонил, децил и их конституционные изомеры. В одном варианте осуществления **R¹** представляет собой метил. В одном

варианте осуществления R^1 представляет собой этил. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой гексил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой гептил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой октил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой нонил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой децил и его конституционные изомеры. В Формуле I в определенных вышеприведенных вариантах осуществления полезные R^2 группы включают *n*-пентил, *n*-гексил, *n*-гептил, *n*-октил, *n*-нонил и *n*-децил. В одном варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-пентил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-гексил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-гептил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-октил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-нонил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-децил или его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^3 представляет собой гидроксил. В определенных приведенных выше вариантах осуществления Формулы I полезные R^3 группы включают $-C(O)Me$, $-C(O)Et$, $-C(O)$ пропил, $-C(O)$ бутил и $-C(O)$ пентил. В одном варианте

осуществления R^3 представляет собой $-C(O)Me$. В другом варианте осуществления R^3 представляет собой $-C(O)Et$. В другом варианте осуществления R^3 представляет собой $-C(O)$ пропил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^3 представляет собой $-C(O)$ бутил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^3 представляет собой $-C(O)$ пентил и его конституционные изомеры. В определенных приведенных выше вариантах осуществления Формулы I полезные R^4 группы включают метил, этил, пропил, бутил и пентил. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой метил. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой этил. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В определенных приведенных выше вариантах осуществления Формулы I полезные R^5 группы включают метил, этил, пропил, бутил и пентил. В одном варианте осуществления R^5 представляет собой метил. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой этил. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В определенных вариантах осуществления вышеприведенной Формулы I независимые комбинации R^4 и R^5 рассматриваются в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой этил. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой независимо пропил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой независимо бутил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой независимо пентил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой этил, а R^5 представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой этил, а R^5 независимо пропил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой независимо пропил и его конституционные изомеры; а R^5 представляет собой независимо бутил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой независимо бутил и его конституционные изомеры; а R^5 представляет собой независимо пентил и его конституционные изомеры. В Формуле I в определенных вариантах осуществления полезные R^7 и R^8 группы соответствуют приведенным выше описаниям. В определенных

вариантах осуществления Формулы I R^{10} отсутствует. В определенных вариантах осуществления Формулы I R^{10} представляет собой $-C_1-C_5$ алкил. В определенных вариантах осуществления полезные R^{10} группы включают пропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил, нонил, децил и их конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой этил. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой гексил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой гептил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой октил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой нонил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^{10} представляет собой децил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления r имеет значение 3. В одном варианте осуществления r имеет значение 4.

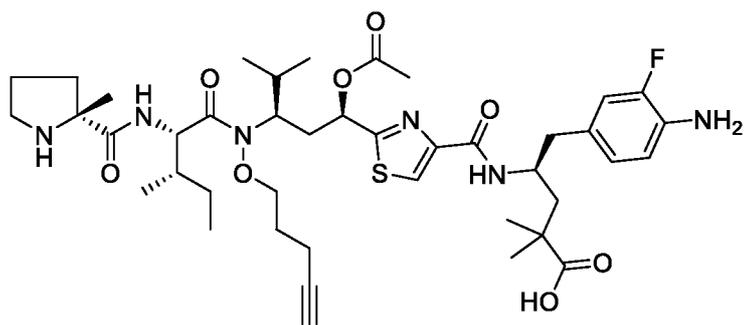
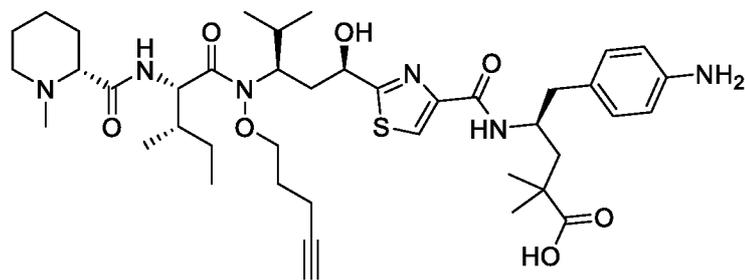
[0073] В определенных вариантах осуществления здесь представлено соединение, имеющее структуру Формулы IV



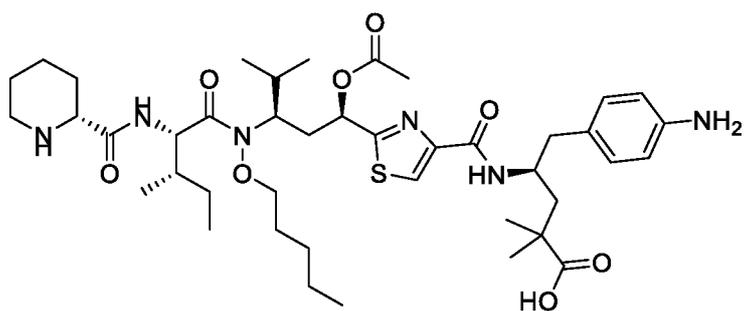
Формула IV

или его фармацевтически приемлемая соль или пролекарство. В определенных вариантах осуществления R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^7 , R^8 , R^{10} b m соответствуют описаниям для вышеприведенной Формулы I. В определенных вариантах осуществления R^7 представляет собой водород или $-NH_2$; а R^8 представляет собой водород или фтор. В одном варианте осуществления R^7 представляет собой $-NH_2$; а R^8 представляет собой водород. В одном варианте осуществления R^7 представляет собой $-NH_2$; а R^8 представляет собой фтор.

[0074] В определенных вариантах осуществления здесь представлены соединения Формулы IV, выбираемые из группы, состоящей из



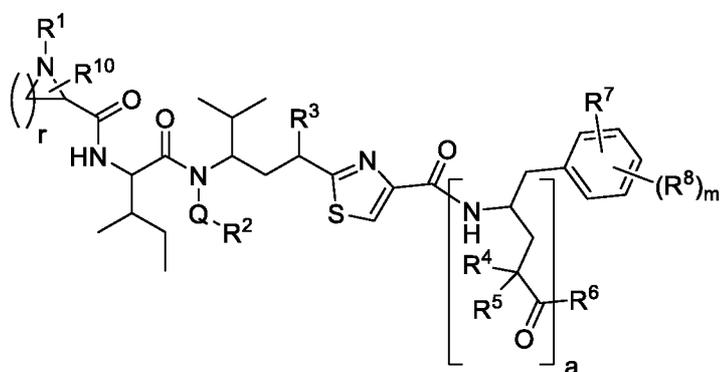
и



или

их фармацевтически приемлемая соль.

[0075] В определенных вариантах осуществления здесь представлено соединение, имеющее структуру Формулы I

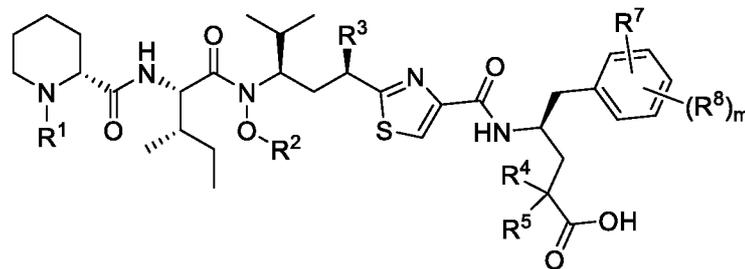


Формула I

или его фармацевтически приемлемая соль или пролекарство, при этом Q представляет собой $-O-$; R^1 представляет собой C_1-C_{10} алкил; R^2 представляет собой алкинил; R^3 представляет собой $-OC(O)C_1-C_5$ алкил; R^4 и R^5 представляет собой C_1-C_5 алкил; R^6 представляет собой $-OH$; R^{10} отсутствует; при этом r имеет значение 4; и при этом a имеет значение 1. В Формуле I в определенных вариантах осуществления полезные R^1 группы включают метил и этил. В определенных вариантах осуществления полезные R^1 группы включают пропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил, нонил, децил и их конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой этил. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой гексил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой гептил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой октил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой нонил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой децил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CCH$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CCH$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CCH$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CCH$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH$. В одном варианте осуществления Формулы I R^3 представляет собой гидроксил. В определенных приведенных выше вариантах осуществления Формулы I полезные R^3 группы включают $-C(O)Me$, $-C(O)Et$, $-C(O)$ пропил, $-C(O)$ бутил и $-C(O)$ пентил. В одном варианте осуществления R^3 представляет собой $-C(O)Me$. В другом варианте осуществления R^3

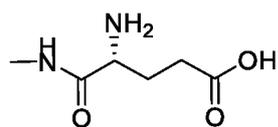
представляет собой $-C(O)Et$. В другом варианте осуществления R^3 представляет собой $-C(O)$ пропил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^3 представляет собой $-C(O)$ бутил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^3 представляет собой $-C(O)$ пентил и его конституционные изомеры. В определенных приведенных выше вариантах осуществления Формулы I полезные R^4 группы включают метил, этил, пропил, бутыл и пентил. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой метил. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой этил. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой бутыл и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В определенных приведенных выше вариантах осуществления Формулы I полезные R^5 группы включают метил, этил, пропил, бутыл и пентил. В одном варианте осуществления R^5 представляет собой метил. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой этил. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой бутыл и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В определенных вариантах осуществления вышеприведенной Формулы I независимые комбинации R^4 и R^5 рассматриваются в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой этил. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой независимо пропил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой независимо бутыл и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой независимо пентил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой этил, а R^5 представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой этил, а R^5 независимо пропил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой независимо пропил и его конституционные изомеры, а R^5 представляет собой независимо бутыл и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой независимо бутыл и его конституционные изомеры, а R^5 представляет собой независимо пентил и его конституционные изомеры. В Формуле I в определенных вариантах осуществления полезные R^7 и R^8 группы соответствуют приведенным выше описаниям.

[0076] В определенных вариантах осуществления здесь представлено соединение, имеющее структуру Формулы V

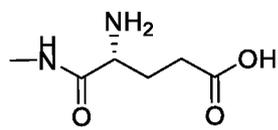


Формула V

или его фармацевтически приемлемая соль или пролекарство. В определенных вариантах осуществления R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^7 , R^8 и m соответствуют описаниям для вышеприведенной Формулы I. В определенных вариантах осуществления R^7 представляет собой водород или $-N(H)C(O)CH_2OH$, $-N(H)C(O)CH_2NHC(O)CH_2NH_2$ или

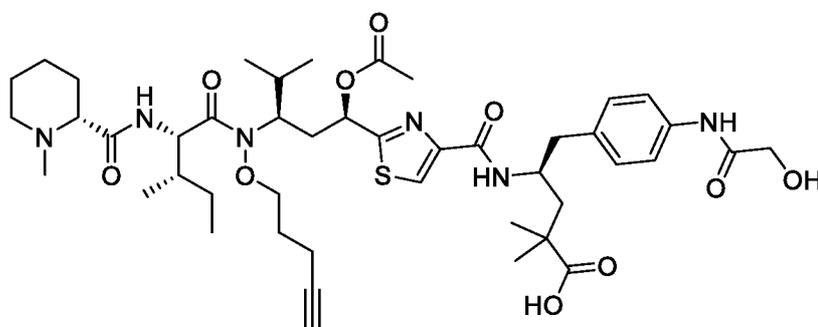


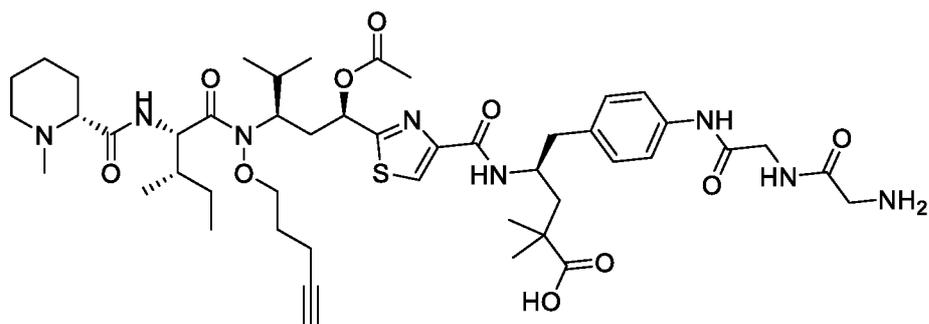
; а R^8 представляет собой водород. В одном варианте осуществления R^7 представляет собой $-N(H)C(O)CH_2OH$; а R^8 представляет собой водород. В одном варианте осуществления R^7 представляет собой $-N(H)C(O)CH_2NHC(O)CH_2NH_2$; а R^8 представляет собой водород. В одном варианте осуществления R^7 представляет собой



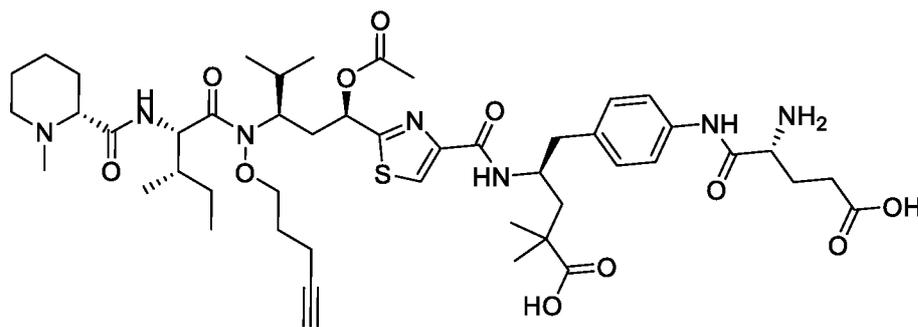
; а R^8 представляет собой водород.

[0077] В определенных вариантах осуществления здесь представлены соединения Формулы V, выбираемые из группы, состоящей из





И

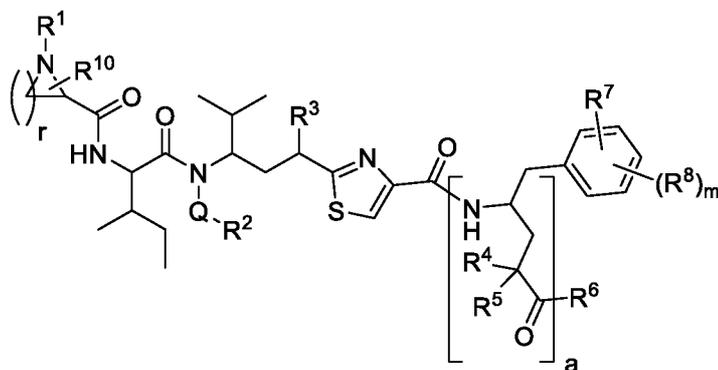


ИЛИ

их фармацевтически приемлемая соль.

Соединения, нагрузки или пролекарственные нагрузки—**Q** представляет собой углерод или кислород

[0078] В определенных вариантах осуществления здесь представлено соединение, имеющее структуру Формулы I



Формула I

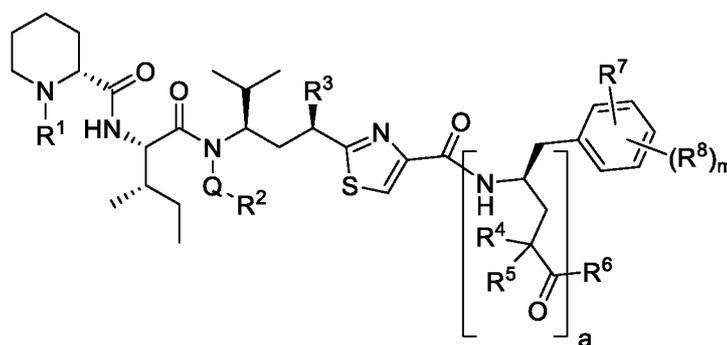
или его фармацевтически приемлемая соль или пролекарство, при этом **Q** представляет собой $-\text{CH}_2-$ или $-\text{O}-$; **R**¹ представляет собой C_1 - C_{10} алкил; **R**² представляет собой алкил или алкинил; **R**³, **R**⁴ и **R**⁵ представляет собой C_1 - C_5 алкил; **R**⁶ представляет собой $-\text{NHSO}_2(\text{CH}_2)_{a1}$ -арил- $(\text{CH}_2)_{a2}\text{NR}^{6a}\text{R}^{6b}$; **R**¹⁰ отсутствует; при этом **r** имеет значение 4; и при этом **a**, **a**₁ и **a**₂ представляет собой независимо имеют значение 0 или 1. В Формуле I, в одном варианте осуществления, **Q** представляет собой $-\text{CH}_2-$. В Формуле I, в одном варианте осуществления, **Q** представляет собой $-\text{O}-$. В Формуле I в определенных

вариантах осуществления полезные R^1 группы включают метил и этил. В определенных вариантах осуществления полезные R^1 группы включают пропил, бутил, пентил, гексил, гептил, октил, нонил, децил и их конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой этил. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой гексил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой гептил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой октил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой нонил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^1 представляет собой децил и его конституционные изомеры. В Формуле I в определенных вышеприведенных вариантах осуществления полезные R^2 группы включают *n*-пентил, *n*-гексил, *n*-гептил, *n*-октил, *n*-нонил и *n*-децил. В одном варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-пентил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-гексил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-гептил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-октил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-нонил или его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^2 представляет собой *n*-децил или его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH_3$. В одном варианте осуществления Формулы I R^2 представляет собой $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CCH_3$. В Формуле I в

определенных вариантах осуществления полезные R^3 группы соответствуют приведенным выше описаниям. В определенных приведенных выше вариантах осуществления Формулы I полезные R^4 группы включают метил, этил, пропил, бутил и пентил. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой метил. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой этил. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^4 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В определенных приведенных выше вариантах осуществления Формулы I полезные R^5 группы включают метил, этил, пропил, бутил и пентил. В одном варианте осуществления R^5 представляет собой метил. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой этил. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой пропил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой бутил и его конституционные изомеры. В другом варианте осуществления R^5 представляет собой пентил и его конституционные изомеры. В определенных вариантах осуществления вышеприведенной Формулы I независимые комбинации R^4 и R^5 рассматриваются в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой этил. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой независимо пропил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой независимо бутил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 и R^5 представляет собой независимо пентил и конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой этил, а R^5 представляет собой метил. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой этил, а R^5 независимо пропил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой независимо пропил и его конституционные изомеры, а R^5 представляет собой независимо бутил и его конституционные изомеры. В одном варианте осуществления R^4 представляет собой независимо бутил и его конституционные изомеры, а R^5 представляет собой независимо пентил и его конституционные изомеры. В Формуле I, в определенных вариантах осуществления, полезные R^{6a} и R^{6b} группы представляет собой водород. В Формуле I, в определенных вариантах осуществления, a имеет значение 0. В Формуле I, в определенных вариантах осуществления, a имеет значение 1. В Формуле I, в определенных вариантах осуществления, $a1$ имеет значение 0, и $a2$ имеет значение 1. В Формуле I, в определенных вариантах осуществления, $a1$ имеет значение 0, и $a2$ имеет значение 0. В Формуле I, в

определенных вариантах осуществления, **a1** имеет значение 1, и **a2** имеет значение 0. В Формуле I, в определенных вариантах осуществления, **a** имеет значение 0, **a1** имеет значение 0, и **a2** имеет значение 1. В Формуле I, в определенных вариантах осуществления, **a** имеет значение 0, **a1** имеет значение 0, и **a2** имеет значение 0. В Формуле I, в определенных вариантах осуществления, **a** имеет значение 0, **a1** имеет значение 1, и **a2** имеет значение 0. В Формуле I, в определенных вариантах осуществления, **a** имеет значение 1, **a1** имеет значение 0, и **a2** имеет значение 1. В Формуле I, в определенных вариантах осуществления, **a** имеет значение 1, **a1** имеет значение 0, и **a2** имеет значение 0. В Формуле I, в определенных вариантах осуществления, **a** имеет значение 1, **a1** имеет значение 1, и **a2** имеет значение 0.

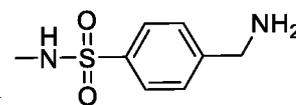
[0079] В определенных вариантах осуществления здесь представлено соединение, имеющее структуру Формулы VI

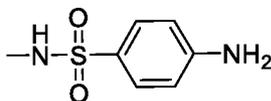
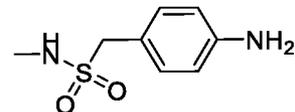


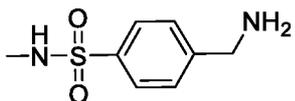
Формула VI

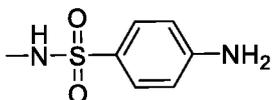
или его фармацевтически приемлемая соль или пролекарство. В определенных вариантах осуществления **Q**, **R¹**, **R²**, **R³**, **R⁴**, **R⁵** и **R⁶** соответствуют описаниям для вышеприведенной

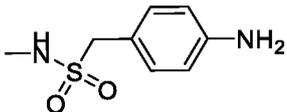
Формулы I. В одном варианте осуществления **R⁶** представляет собой

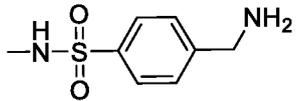
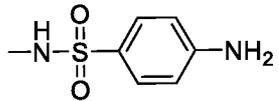
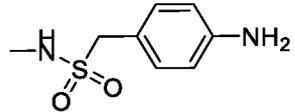


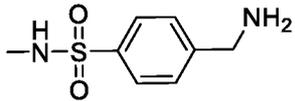
представляет собой  или . В одном варианте осуществления **R⁶**

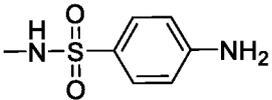
представляет собой . В одном варианте осуществления **R⁶**

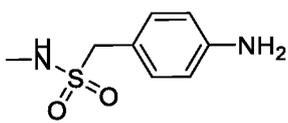
представляет собой . В одном варианте осуществления **R⁶** представляет

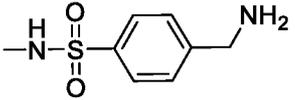
с собой  . В одном варианте осуществления **a** имеет значение 0; и **R⁶**

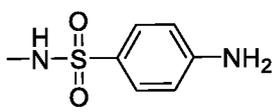
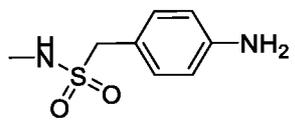
представляет собой ,  или  . В одном варианте осуществления **a** имеет значение 0; и **R⁶** представляет собой

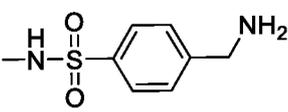
 . В одном варианте осуществления **a** имеет значение 0; и **R⁶**

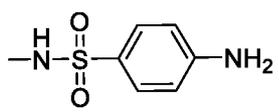
представляет собой  . В одном варианте осуществления **a** имеет

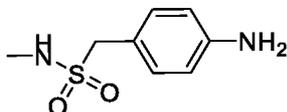
значение 0; и **R⁶** представляет собой  . В одном варианте

осуществления **a** имеет значение 1; и **R⁶** представляет собой ,

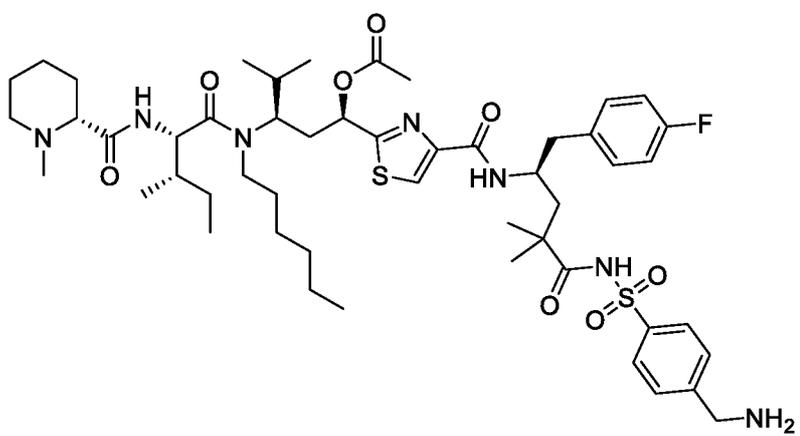
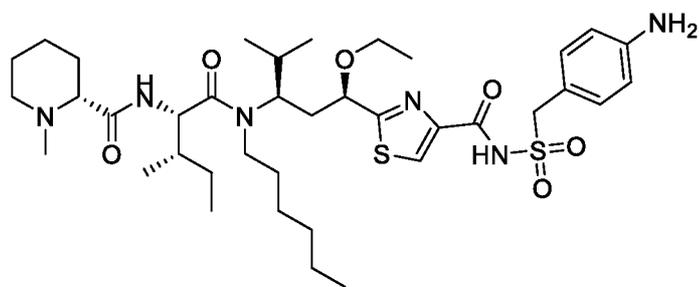
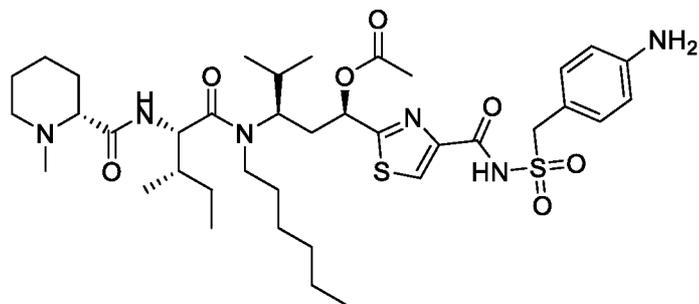
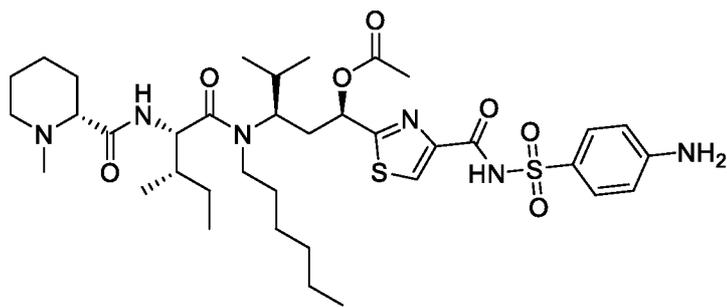
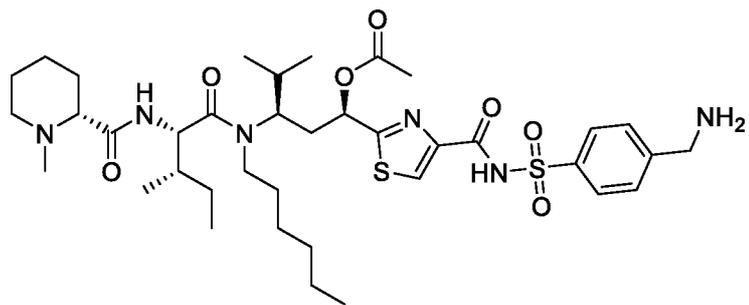
 или  . В одном варианте осуществления **a** имеет

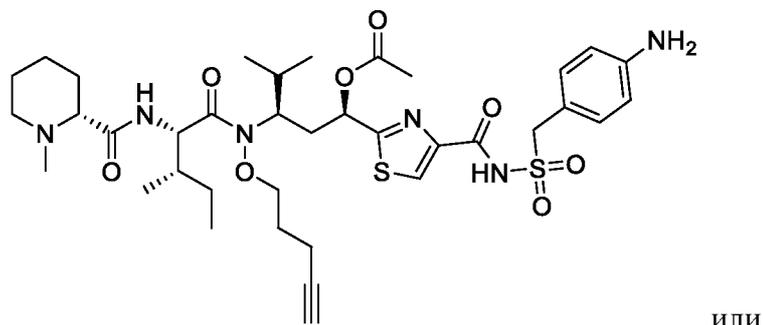
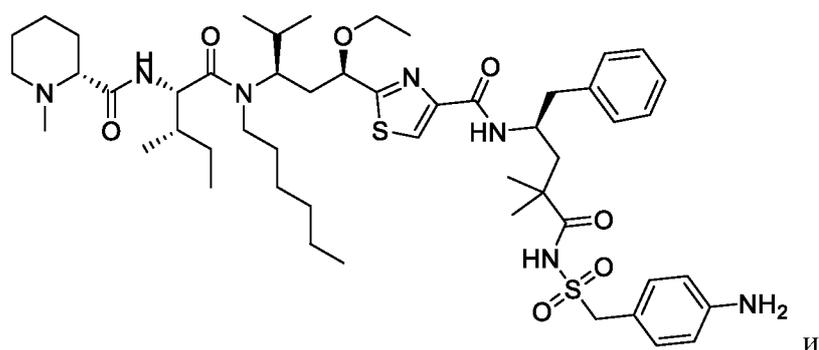
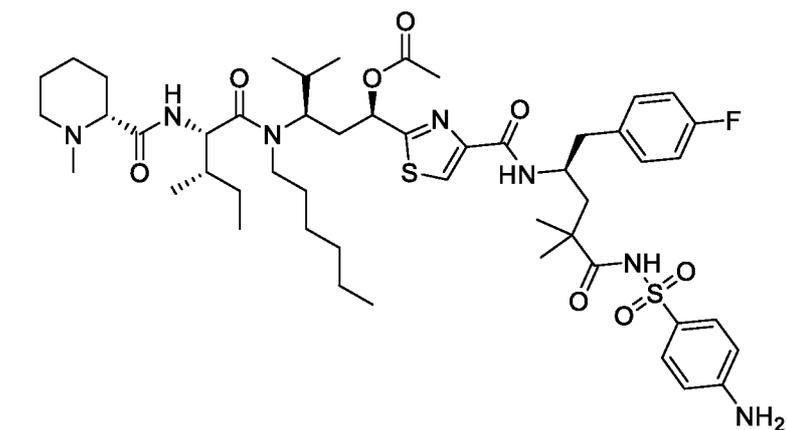
значение 1; и **R⁶** представляет собой  . В одном варианте

осуществления **a** имеет значение 1; и **R⁶** представляет собой  . В одном варианте осуществления **a** имеет значение 1; и **R⁶** представляет собой



[0080] В определенных вариантах осуществления здесь представлены соединения Формулы VI, выбираемые из группы, состоящей из





или

их фармацевтически приемлемая соль.

Связующие агенты

[0081] Подходящие связующие агенты для любого из представленных в настоящем описании изобретения конъюгатов включают, помимо прочего, антитела, лимфокины (например, IL-2 или IL-3), гормоны (например, инсулин и глюкокортикоиды), факторы роста (например, ЭФР, трансферрин и фибронектин типа III), вирусные рецепторы, интерлейкины или любые другие связывающиеся с клеткой или связывающиеся с пептидом молекулы или вещества. Связующие агенты также включают, помимо прочего, белки с анкириновым повтором и интерфероны.

[0082] В некоторых вариантах осуществления связующим агентом является антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитело может быть в любой форме, известной

специалистам в данной области. Термин "антитело" в контексте настоящего документа означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий минимум одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается с определенным антигеном или взаимодействует с ним. Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, взаимосвязанные дисульфидными связями, а также мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную 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 переменную область легкой цепи (которая сокращается здесь как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L можно далее разделить на области гипервариабельности, называемые определяемыми комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В разных представленных здесь вариантах осуществления FR антител (или их антигенсвязывающей части), подходящие для представленных здесь соединений, могут быть идентичными человеческим последовательностям зародышевого типа либо 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 антигенсвязывающие фрагменты молекул полноразмерных 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 молекул полноразмерных антител с использованием любого подходящего стандартного метода (методов), таких как протеолитическое расщепление или метод(ы) рекомбинантной генной инженерии, включающие манипуляции и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК

(включая, например, фаговые библиотеки антител) либо может быть синтезирована. Секвенирование и манипуляции с ДНК могут осуществляться химическим образом или с использованием методов молекулярной биологии, например, для расположения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, изменения, добавления или удаления аминокислот и т.д. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab фрагменты; (ii) F(ab')₂ фрагменты; (iii) Fd фрагменты; (iv) Fv фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb фрагменты; и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную CDR, например, пептид CDR3), или пептид FR3-CDR3-FR4 с ограниченной конформационной свободой. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитой CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, одновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), иммунопрепараты на основе модульного белка с малым размером молекул (SMIP) и переменные домены IgNAR акул, также охватываются термином "антигенсвязывающий фрагмент" в контексте настоящего документа. Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит минимум один переменный домен. Этот переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и обычно содержит минимум одну CDR, которая примыкает или находится в одной рамке с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих V_H домен, связанный с V_L доменом, V_H и V_L домены могут располагаться относительно друг друга любым подходящим образом. Например, переменная область может быть димерной и может содержать V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L димеры. В качестве варианта антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный V_H или V_L домен. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать минимум один переменный домен, ковалентно связанный с минимум одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть внутри антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H-C_{H1}; (ii) V_H-C_{H2}; (iii) V_H-C_{H3}; (iv) V_H-C_{H1}-C_{H2}; (v) V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}; (vi) V_H-C_{H2}-C_{H3}; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_{H1}; (ix) V_L-C_{H2}; (x) V_L-C_{H3}; (xi) V_L-C_{H1}-C_{H2}; (xii) V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}; (xiii) V_L-C_{H2}-C_{H3}; и (xiv) V_L-C_L. В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любую из иллюстративных конфигураций,

перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть либо напрямую связаны друг с другом, либо могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять из минимум 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, в результате чего образуется гибкая или полугибкая связь между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Как в случае с молекулами полноразмерных антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит минимум два разных переменных домена, при этом каждый переменный домен способен специфическим связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на том же антигене. Формат мультиспецифического антитела, включая описанные здесь форматы иллюстративного биспецифического антитела, может быть приспособлен для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению при помощи стандартных методов, известных в данной области. В определенных описанных здесь вариантах осуществления описанные здесь антитела являются человеческими антителами. Термин "человеческое антитело" в контексте настоящего документа включает антитела с переменными и константными областями, полученными от последовательностей зародышевого типа человеческого иммуноглобулина. Человеческие антитела по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не закодированные последовательностями зародышевого типа человеческого иммуноглобулина (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* либо посредством соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Тем не менее, термин "человеческое антитело" в контексте настоящего документа не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные от зародышевой линии другого вида млекопитающих, например, мыши, были привиты на человеческие каркасные последовательности. Термин "человеческое антитело" не включает природные молекулы, которые естественным образом существуют без модификаций или вмешательства/манипуляций человека в природном немодифицированном живом организме. Описанные здесь антитела могут в некоторых вариантах осуществления быть рекомбинантными человеческими антителами. Термин "рекомбинантное человеческое антитело" в контексте настоящего документа включает все человеческие антитела, которые подготавливаются, экспрессируются, создаются или выделяются рекомбинантными средствами, например, антитела, экспрессированные при помощи рекомбинантного

вектора экспрессии, который трансфицируется в клетку-хозяина (описывается далее), антитела, выделенные из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител (описывается далее), антитела, выделенные из животного (например, мыши), трансгенного для генов человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, которые подготавливаются, экспрессируются, создаются или выделяются любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена человеческого иммуноглобулина в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей зародышевого типа человеческого иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления, тем не менее, такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются *in vitro* мутагенезу (или, если применяется животное, трансгенное для последовательностей человеческого Ig, *in vivo* соматическому мутагенезу), и, таким образом, аминокислотные последовательности V_H и V_L областей рекомбинантных антител представляет собой последовательности, которые, будучи полученными от последовательностей V_H и V_L человеческой зародышевой линии и связанными с ними, не могут существовать естественным образом в зародышевом наборе антитела человека *in vivo*. Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые ассоциируются с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит устойчивую четырехцепьевую конструкцию приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе межцепевой дисульфидной связью тяжелых цепей. Во второй форме димеры не связываются межцепевыми дисульфидными связями, и образуется молекула около 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (полу-антитело). Ранее эти формы было чрезвычайно сложно разделить, даже после афинной очистки. Частота появления второй формы в различных интактных изоформах IgG обусловлена, помимо прочего, структурными различиями, связанными с изоформой шарнирной области антитела. Единичная аминокислотная замена в шарнирной области шарнира человеческого IgG4 может значительным образом снизить частоту появления второй формы (Angal *et al.* (1993) Molecular Immunology 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнира человеческого IgG1. Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций в шарнире, области C_H2 или C_H3, которые могут быть желательными, например, в производстве для улучшения выхода желаемой формы антитела. Описанные здесь антитела могут быть выделенными антителами. "Выделенное антитело" в контексте настоящего документа означает антитело, которое определили и отделили и/или изолировали от

минимум одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое отделили или удалили из минимум одного компонента организма или из ткани или клетки, в которых антитело существует естественным образом или производится естественным образом, является "выделенным антителом" в целях настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляет собой антитела, которые подвергли минимум одному этапу очистки или выделения. Согласно определенным вариантам осуществления, выделенное антитело может, в сущности, не иметь другого клеточного материала и/или химических веществ. Используемые здесь антитела могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасной и/или CDR областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей в сравнении с соответствующими последовательностями зародышевого типа, от которых были получены эти антитела. Такие мутации можно легко определить посредством сравнения описанных здесь аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевого типа, доступными, например, в общедоступных базах данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, полученные от любых описанных здесь аминокислотных последовательностей, при этом одна или более аминокислот в одной или более каркасных и/или CDR областях мутированы в соответствующий остаток (остатки) последовательности зародышевого типа, от которой было получено антитело, или в соответствующий остаток (остатки) другой последовательности зародышевого типа человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка (остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательностей называются здесь в совокупности "герминативные мутации"). Специалист в данной области, начиная с описанных здесь последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко получать множество антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или более отдельных герминативных мутаций или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все каркасные и/или CDR остатки в V_H и/или V_L доменах мутированы обратно в остатки, присутствующие в первоначальной последовательности зародышевого типа, от которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки мутированы обратно в первоначальную последовательность зародышевого типа, например, только мутированные остатки, присутствующие в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, присутствующие в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более каркасных и/или CDR

остатков мутированы в соответствующий остаток (остатки) другой последовательности зародышевого типа (т.е. последовательности зародышевого типа, которая отличается от последовательности зародышевого типа, от которой антитело было получено изначально). Также антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более герминативных мутаций в каркасной и/или CDR областях, например, в которых определенные отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевого типа, а определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевого типа, сохранены или мутированы в соответствующий остаток другой последовательности зародышевого типа. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более герминативных мутаций, можно легко проверить на одно или более желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от ситуации), пониженная иммуногенность и т.д. Настоящее изобретение охватывает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим образом. Антитела, полезные для описанных здесь соединений, также включают антитела, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных здесь, с одной или более консервативными заменами. Термин "эпитоп" означает антигенную детерминанту, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известным как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными областями на антигене и могут иметь разное биологическое действие. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп производится пространственно рядом расположенными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, созданный соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать группы сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

[0083] В определенных вариантах осуществления антитело содержит легкую цепь. В определенных вариантах осуществления такая легкая цепь представляет собой легкая цепь каппа. В определенных вариантах осуществления такая легкая цепь представляет собой легкая цепь лямбда. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь. В некоторых вариантах осуществления такая тяжелая цепь представляет

собой IgA. В некоторых вариантах осуществления такая тяжелая цепь представляет собой IgD. В некоторых вариантах осуществления такая тяжелая цепь представляет собой IgE. В некоторых вариантах осуществления такая тяжелая цепь представляет собой IgG. В некоторых вариантах осуществления такая тяжелая цепь представляет собой IgM. В некоторых вариантах осуществления такая тяжелая цепь представляет собой IgG1. В некоторых вариантах осуществления такая тяжелая цепь представляет собой IgG2. В некоторых вариантах осуществления такая тяжелая цепь представляет собой IgG3. В некоторых вариантах осуществления такая тяжелая цепь представляет собой IgG4. В некоторых вариантах осуществления такая тяжелая цепь представляет собой IgA1. В некоторых вариантах осуществления такая тяжелая цепь представляет собой IgA2.

[0084] В некоторых вариантах осуществления антитело является фрагментом антитела. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела является Fv фрагментом. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела является Fab фрагментом. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела является F(ab')₂ фрагментом. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела является Fab' фрагментом. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела является scFv (sFv) фрагментом. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела является scFv-Fc фрагментом.

[0085] В некоторых вариантах осуществления антитело является моноклональным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является поликлональным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является биспецифическим антителом, включающим первый антигенсвязывающий домен (также называемый здесь “D1”) и второй антигенсвязывающий домен (также называемый здесь “D2”).

[0086] В контексте настоящего документа выражение “антигенсвязывающий домен” означает любой пептид, полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты, молекулу каркасного типа, пептидную дисплейную молекулу или полипептид-содержащую конструкцию, способную специфически связываться с определенным представляющим интерес антигеном (например, PRLR или STEAP2). Термин “специфически связывается” или подобные в контексте настоящего документа означает, что антигенсвязывающий домен образует комплекс с определенным антигеном, характеризуемым константой диссоциации (K_D) в 1 μM или менее, и не связывается с другими неродственными антигенами в обычных условиях анализа. “Неродственные антигены” представляет собой белки, пептиды или полипептиды с идентичностью аминокислот по отношению друг к другу менее 95%.

[0087] Иллюстративные категории антигенсвязывающих доменов, которые могут использоваться в контексте настоящего описания изобретения, включают антитела, антигенсвязывающие части антител, пептиды, которые специфически взаимодействуют с определенным антигеном (например, пептитела), рецепторные молекулы, которые специфически взаимодействуют с определенным антигеном, белки, содержащие лигандсвязывающую часть рецептора, который специфически связывается с определенным антигеном, антигенсвязывающие скаффолды (например, дарпины, белки с HEAT-повторами, белки с ARM-повторами, белки с тетратрикопептидными повторами и другие скаффолды, основанные на природных белках с повторами и т.д. [см., например, Voetsma and Pluckthun, 2011, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:849-857, и указанную там справочную литературу]), и их аптамеры или части.

[0088] Способы для определения того, связываются ли две молекулы друг с другом специфически, хорошо известны в данной области и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и подобные. Например, антигенсвязывающий домен, используемый в контексте настоящего описания изобретения, включает полипептиды, которые связываются с определенным антигеном (например, целевая молекула [Т] или белок, связывающий эффектор интернализации [Е]), или его частью с K_D менее, чем около 1 μ М, менее, чем около 500 нМ, менее, чем около 250 нМ, менее, чем около 125 нМ, менее, чем около 60 нМ, менее, чем около 30 нМ, менее, чем около 10 нМ, менее, чем около 5 нМ, менее, чем около 2 нМ, менее, чем около 1 нМ, менее, чем около 500 пМ, менее, чем около 400 пМ, менее, чем около 300 пМ, менее, чем около 200 пМ, менее, чем около 100 пМ, менее, чем около 90 пМ, менее, чем около 80 пМ, менее, чем около 70 пМ, менее, чем около 60 пМ, менее, чем около 50 пМ, менее, чем около 40 пМ, менее, чем около 30 пМ, менее, чем около 20 пМ, менее, чем около 10 пМ, менее, чем около 5 пМ, менее, чем около 4 пМ, менее, чем около 2 пМ, менее, чем около 1 пМ, менее, чем около 0,5 пМ, менее, чем около 0,2 пМ, менее, чем около 0,1 пМ, или менее, чем около 0,05 пМ, по результатам измерений методом плазмонного поверхностного резонанса.

[0089] В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является гуманизированным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является человеческим антителом.

[0090] В некоторых вариантах осуществления антитело является анти-PSMA, анти-PRLR, анти-MUC16, анти-HER2, анти-EGFRvIII, анти-MET или анти-STEAP2 антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

представляет собой анти-PSMA. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-MUC16. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-HER2. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-EGFRvIII. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-MET. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-PRLR или анти-STEAP2. В некоторых вариантах осуществления антитело является анти-PRLR или анти-HER2 антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-STEAP2. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-PRLR.

[0091] Антитело может иметь специфичность связывания с любым антигеном, который специалисты в данной области считают подходящим. В определенных вариантах осуществления антиген является трансмембранной молекулой (например, рецептором). В одном варианте осуществления антиген экспрессируется в опухоли. В некоторых вариантах осуществления связующие агенты взаимодействуют или связываются с опухолевыми антигенами, включая антигены, специфические к типу опухоли, или антигены, которые являются общими, сверхэкспрессируются или модифицируются в опухоли определенного типа. В одном варианте осуществления антиген экспрессируется на солидных опухолях. Примеры антигенов включают, помимо прочего, липопротеины; альфа-антитрипсин; цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген (CTLA), например, CTLA-4; фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF); рецепторы для гормонов или факторов роста; белок А или D; рецептор 2 фактора роста фибробластов (FGFR2), EphCAM, GD3, FLT3, PSMA, PSCA, MUC1, MUC16, STEAP, STEAP2, CEA, TENB2, EphA рецепторы, EphB рецепторы, рецептор фолиевой кислоты, FOLRI, мезотелин, крипто, альфа в бета 6, интегрины, VEGF, VEGFR, EGFR, трансферриновый рецептор, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5; CD белки, такие как CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, CD152 или антитело, которое связывается с одним или более опухолеассоциированных антигенов или рецепторами клеточной поверхности, описанными в Публикации США № 2008/0171040 или Публикации США № 2008/0305044, содержание каждой из которых полностью включается в настоящий документ посредством

ссылки; эритропоэтин; остеиндуктивные факторы; иммунотоксины; костный морфогенетический белок (BMP); Т-клеточные рецепторы; поверхностные мембранные белки; интегрины, такие как CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 и VCAM; опухолеассоциированный антиген, такой как AFP, ALK, B7H4, BAGE белки, β -катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9 (угольная ангидраза IX), каспаза-8, CD20, CD40, CD123, CDK4, CEA, CLEC12A, c-kit, cMET, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, эндоглин, молекула клеточной адгезии эпителия, EphA2, ErbB2/Her2, ErbB3/Her3, ErbB4/Her4, ETV6-AML, Fra-1, FOLR1, GAGE белки, GD2, GD3, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/EBNA1, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R, LGR5, LMP2, MAGE белки, MART-1, мезотелин, ML-IAP, Muc1, Muc16, CA-125, MUM1, NA17, NGER, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PDGFR- α , PDGFR- β , PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PLAC1, PRLR, PRAME, PSCA, PSGR, PSMA (FOLH1), RAGE белки, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, STn, сурвивин, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, Tn, TNFRSF17, TRP-1, TRP-2, тирозиназа и уроплакин-3 и фрагменты любых из перечисленных выше полипептидов; экспрессируемые клеточной поверхностью антигены; MUC16; c-MET; молекулы, такие как скавенджер-рецепторы класса А, включая скавенджер-рецептор А (SR-A), и другие мембранные белки, такие как член, связанный с семейством В7, включая белок VSIG4, рецептор колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R), асиалогликопротеиновый рецептор (ASGPR) и белок, подобный белку-предшественнику бета-амилоида 2 (APLP-2). В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой PRLR или HER2. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой STEAP2. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой человеческий STEAP2. В некоторых примерах MAGE белки выбираются из MAGE-1, -2, -3, -4, -6 и -12. В некоторых примерах GAGE белки выбираются из GAGE-1 и GAGE-2.

[0092] Примеры антигенов также включают, помимо прочего, BCMA, SLAMF7, GPNMB и UPK3A. Примеры антигенов также включают, помимо прочего, MUC16, STEAP2 и HER2.

[0093] В некоторых вариантах осуществления антигены включают MUC16. В некоторых вариантах осуществления антигены включают STEAP2. В некоторых вариантах осуществления антигены включают PSMA. В некоторых вариантах осуществления антигены включают HER2. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой пролактиновый рецептор (PRLR) или простатспецифический мембранный антиген

(PSMA). В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой MUC16. В некоторых вариантах осуществления антигены включают PSMA. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой HER2. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой STEAP2.

[0094] В определенных вариантах осуществления антитело содержит глутаминовый остаток в одной или более позициях тяжелой цепи под номером 295 в системе нумерации EU. В настоящем описании изобретения данная позиция называется глутамин 295, или Gln295, или Q295. Специалистам в данной области известно, что это консервативный глутаминовый остаток в последовательности дикого типа многих антител. В других полезных вариантах осуществления антитело может быть изменено и может включать глутаминовый остаток. В определенных вариантах осуществления антитело содержит одну или более мутаций N297Q. Методы изменения последовательности антитела для включения глутаминового остатка известны специалистам в данной области (см. , например, Ausubel *et al. Current Protoc. Mol. Biol.*).

[0095] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с линкер-нагрузкой или нагрузкой, могут быть антителом, нацеленным на STEAP2. Подходящие антитела к STEAP2 или их антигенсвязывающие фрагменты включают, например, антитела и их антиген-связывающие фрагменты в Международной публикации № WO 2018/058001 A1, включая антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие аминокислотные последовательности, описанные в Таблице 1 на странице 75 указанной публикации. В некоторых вариантах осуществления антитело к STEAP2 представляет собой H1H7814N WO 2018/058001 A1, содержащее CDR H1M7814N в этой же публикации. В некоторых вариантах осуществления антитело к STEAP2 содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID № 2; HCDR2, содержащую SEQ ID № 3; HCDR3, содержащую SEQ ID № 4; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID № 6; LCDR2, содержащую SEQ ID № 7; и LCDR3, содержащую SEQ ID № 8. В некоторых вариантах осуществления антитело к STEAP2 содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID № 1, и переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую SEQ ID № 5. В любом из предшествующих вариантов осуществления антитело к STEAP2 можно получить посредством сайт-направленного мутагенеза для вставки глутаминового остатка в сайт без нарушения функции или связывания антитела. Например, в любом из предшествующих

вариантов осуществления антитело к STEAP2 может содержать мутацию Asn297Gln (N297Q). Такие антитела с мутацией N297Q также могут содержать один или более дополнительных природных глутаминовых остатков в своих переменных областях, которые могут быть доступными для трансглутаминазы и, следовательно, способными к конъюгации с нагрузкой или линкер-нагрузкой (Таблица А). В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи (HCVR) SEQ ID № 1; и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи (LCVR) SEQ ID № 5. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID № 1 и аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID № 5. Международная публикация № WO 2018/058001 A1 настоящим полностью включается в данный документ посредством ссылки.

[0096] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с линкер-нагрузкой или нагрузкой, могут быть антителом, нацеленным на человеческий пролактиновый рецептор (PRLR). Подходящие антитела к PRLR или их антигенсвязывающие фрагменты включают антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, например, описанные в Международной публикации № WO 2015/026907 A1, включая антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие аминокислотные последовательности, описанные в Таблице 1 на странице 36 указанной публикации. В некоторых вариантах осуществления антитело к PRLR представляет собой H1H6958N2 по WO 2015/026907 A1, содержащее CDR H2M6958N2 в той же публикации. В некоторых вариантах осуществления антитело к PRLR содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR)-1, содержащую SEQ ID № 10; HCDR2, содержащую SEQ ID № 11; HCDR3, содержащую SEQ ID № 12; определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR)-1, содержащую SEQ ID № 14; LCDR2, содержащую SEQ ID № 15; и LCDR3, содержащую SEQ ID № 16. В некоторых вариантах осуществления антитело к PRLR содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID № 9, и переменную область легкой цепи (LCVR), содержащую SEQ ID № 13. В любом из предшествующих вариантов осуществления антитело к PRLR можно получить посредством сайт-направленного мутагенеза для вставки глутаминового остатка в сайт без нарушения функции или связывания антитела. Например, в любом из

предшествующих вариантов осуществления антитело к PRLR может содержать мутацию Asn297Gln (N297Q). Такие антитела с мутацией N297Q также могут содержать один или более дополнительных природных глутаминовых остатков в своих переменных областях, которые могут быть доступными для трансглутаминазы и, следовательно, способными к конъюгации с нагрузкой или линкер-нагрузкой (Таблица А). В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи (HCVR) SEQ ID № 9; и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи (LCVR) SEQ ID № 13. В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID № 9 и аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID № 13. Международная публикация № WO 2015/026907 A1 настоящим полностью включается в данный документ посредством ссылки.

Таблица А. Последовательности примеров антител H1H7814N (к STEAP2) и H1H6958N2 (к PRLR)

<u>SEQ ID</u> <u>№</u>	<u>Молекула /</u> <u>Антитело</u>	<u>Область</u>	<u>Последовательность</u>
1	H1H7814N	HCVR	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTISSYGMNWVRQAPG KGLEWVAVISYDGGNKYSVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDSAVYYCARGRYFDLWGRGTLVTVSS
2	H1H7814N	HCDR1	GFTISSYG
3	H1H7814N	HCDR2	ISYDGGNK
4	H1H7814N	HCDR3	ARGRYFDL
5	H1H7814N	LCVR	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPRG APNLLISKASSLKSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTVSSLQPDFA TYYCQQYYSYSYTFGQGTKLEIK
6	H1H7814N	LCDR1	QSISSW
7	H1H7814N	LCDR2	KAS
8	H1H7814N	LCDR3	QQYYSYSY
9	H1H6958N2	HCVR	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCGASGFTFRNYGMQWVRQGP KGLEWVTLTISFDGNDKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMN SLRTEDTAVYYCARGGDFDYWGQGTTLVTVSS

<u>SEQ ID</u> <u>№</u>	<u>Молекула /</u> <u>Антитело</u>	<u>Область</u>	<u>Последовательность</u>
10	H1H6958N2	HCDR1	GFTFRNYG
11	H1H6958N2	HCDR2	ISFDGNDK
12	H1H6958N2	HCDR3	ARGGDFDY
13	H1H6958N2	LCVR	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDIRKDLGWYQQKPGK APKRLIYAASSLHSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCLQHNSYPMYTFGQGTKLEIK
14	H1H6958N2	LCDR1	QDIRKD
15	H1H6958N2	LCDR2	AAS
16	H1H6958N2	LCDR3	LQHNSYPMYT
17	hPRLR ecto- MMH		MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADAQLPPGKPEIFKCR SPNKETFTCWWRPGTDGGLPTNYSLTYHREGETLMHECPDYI TGGPNSCHFGKQYTSMWRTYIMMVNATNQMGSSFSDELYVDV TYIVQPDPPLELAVEVKQPEDRKPYLWIKWSPPTLIDLKTGW FTLLYEIRLKPEKAAEWEIHFAGQQTEFKILSLHPGQKYLVD VRCKPDHGYWSAWSPATFIQIPSDFTMNDEQKLISEEDLGGE QKLISEEDLHNNHHH

[0097] В настоящем описании изобретения представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с STEAP2, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из любых аминокислотных последовательностей HCVR, указанных в Таблице А, или по существу аналогичную ей последовательность с идентичностью последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[0098] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с STEAP2, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из любых аминокислотных последовательностей LCVR, указанных в Таблице А, или по существу аналогичную ей последовательность с идентичностью последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[0099] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с STEAP2, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, указанных в

Таблице А, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, указанных в Таблице А. Согласно определенным вариантам осуществления, в данном описании изобретения представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из примеров антител к STEAP2, указанных в Таблице А. В определенных вариантах осуществления эта пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбирается из группы, состоящей из 250/258; что описано в Международной публикации № WO 2018/058001 A1, содержание которой включается в настоящий документ полностью посредством ссылки.

[00100] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с STEAP2, содержащие CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из любых аминокислотных последовательностей HCDR1, указанных в Таблице А, или по существу аналогичную ей последовательность с идентичностью последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[00101] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с STEAP2, содержащие CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из любых аминокислотных последовательностей HCDR2, указанных в Таблице А, или по существу аналогичную ей последовательность с идентичностью последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[00102] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с STEAP2, содержащие CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из любых аминокислотных последовательностей HCDR3, указанных в Таблице А, или по существу аналогичную ей последовательность с идентичностью последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[00103] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с STEAP2, содержащие CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную

последовательность, выбираемую из любых аминокислотных последовательностей LCDR1, указанных в Таблице А, или по существу аналогичную ей последовательность с идентичностью последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[00104] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с STEAP2, содержащие CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из любых аминокислотных последовательностей LCDR2, указанных в Таблице А, или по существу аналогичную ей последовательность с идентичностью последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[00105] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с STEAP2, содержащие CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из любых аминокислотных последовательностей LCDR3, указанных в Таблице А, или по существу аналогичную ей последовательность с идентичностью последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[00106] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с STEAP2, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, указанных в Таблице А, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, указанных в Таблице А. Согласно определенным вариантам осуществления, в данном описании изобретения представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из примеров антител к STEAP2, указанных в Таблице А. В определенных вариантах осуществления эта пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбирается из группы, состоящей из 256/254; что описано в Международной публикации № WO 2018/058001 А1, содержание которой включается в настоящий документ полностью посредством ссылки.

[00107] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с STEAP2,

содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в любом из примеров антител к STEAP2, указанных в Таблице А. В определенных вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбирается из группы, состоящей из: 252-254-256-260-262-264; что описано в Международной публикации № WO 2018/058001 A1, содержание которой включается в настоящий документ полностью посредством ссылки.

[00108] В схожем варианте осуществления в настоящем описании изобретения представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с STEAP2, содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, что определяется любым из примеров антител к STEAP2, указанных в Таблице А. Например, настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с STEAP2, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбираемой из группы, состоящей из 250/258; что описано в Международной публикации № WO 2018/058001 A1, содержание которой включается в настоящий документ полностью посредством ссылки. Способы и методы определения CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области и могут применяться для определения CDR в описанных здесь определенных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR. Типовые определения, которые могут использоваться для определения границ CDR, включают, например, определение по Кабату (Kabat), определение по Чотиа (Chothia) и определение AbM. В общем, определение по Кабату основано на вариабельности последовательностей, определение по Чотиа основано на местоположении структурных петлевых областей, а определение AbM представляет собой компромисс между подходами Кабата и Чотиа. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Также имеются общедоступные базы данных для определения последовательностей CDR в антителе.

[00109] В настоящем описании изобретения представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PRLR, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из

любых аминокислотных последовательностей HCVR, указанных в Таблице А, или по существу аналогичную ей последовательность с идентичностью последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[00110] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PRLR, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из любых аминокислотных последовательностей LCVR, указанных в Таблице А, или по существу аналогичную ей последовательность с идентичностью последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[00111] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PRLR, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, указанных в Таблице А, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, указанных в Таблице А. Согласно определенным вариантам осуществления, в данном описании изобретения представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из примеров антител к PRLR, указанных в Таблице А. В определенных вариантах осуществления эта пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбирается из группы, состоящей из 18/26; 66/74; 274/282; 290/298; и 370/378; что описано в Международной публикации № WO 2015/026907 А1, содержание которой включается в настоящий документ полностью посредством ссылки.

[00112] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PRLR, содержащие CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, указанных в Таблице А, или по существу аналогичную ей последовательность с идентичностью последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[00113] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PRLR, содержащие CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из любых аминокислотных последовательностей

HCDR2, указанных в Таблице А, или по существу аналогичную ей последовательность с идентичностью последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[00114] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PRLR, содержащие CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из любых аминокислотных последовательностей HCDR3, указанных в Таблице А, или по существу аналогичную ей последовательность с идентичностью последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[00115] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PRLR, содержащие CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из любых аминокислотных последовательностей LCDR1, указанных в Таблице А, или по существу аналогичную ей последовательность с идентичностью последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[00116] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PRLR, содержащие CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из любых аминокислотных последовательностей LCDR2, указанных в Таблице А, или по существу аналогичную ей последовательность с идентичностью последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[00117] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PRLR, содержащие CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из любых аминокислотных последовательностей LCDR3, указанных в Таблице А, или по существу аналогичную ей последовательность с идентичностью последовательностей минимум 90%, минимум 95%, минимум 98% или минимум 99%.

[00118] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PRLR, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, указанных в Таблице А, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, указанных в Таблице А. Согласно определенным вариантам осуществления, в данном описании изобретения представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из примеров антител к PRLR, указанных в Таблице А. В определенных вариантах осуществления эта пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбирается из группы, состоящей из 24/32; 72/80; 280/288; 296/304; и 376/384; что описано в Международной публикации № WO 2015/026907 А1, содержание которой включается в настоящий документ полностью посредством ссылки.

[00119] В настоящем описании изобретения также представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PRLR, содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в любом из примеров антител к PRLR, указанных в Таблице А. В определенных вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбирается из группы, состоящей из 20-22-24-28-30-32; 68-70-72-76- 78-80; 276-278-280-284-286-288; 292-294-296-300-302-304; и 372-374-376-380-382-384; что описано в Международной публикации № WO 2015/026907 А1, содержание которой включается в настоящий документ полностью посредством ссылки.

[00120] В схожем варианте осуществления в настоящем описании изобретения представлены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PRLR, содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, что определяется любым из примеров антител к PRLR, указанных в Таблице А. Например, настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с PRLR, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбираемой из группы, состоящей из 18/26; 66/74; 274/282; 290/298; и 370/378; что описано в

Международной публикации № WO 2015/026907 A1, содержание которой включается в настоящий документ полностью посредством ссылки. Способы и методы определения CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области и могут применяться для определения CDR в описанных здесь определенных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR. Типовые определения, которые могут использоваться для определения границ CDR, включают, например, определение по Кабату (Kabat), определение по Чотиа (Chothia) и определение AbM. В общем, определение по Кабату основано на вариативности последовательностей, определение по Чотиа основано на местоположении структурных петлевых областей, а определение AbM представляет собой компромисс между подходами Кабата и Чотиа. См., например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); и Martin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Также имеются общедоступные базы данных для определения последовательностей CDR в антителе.

[00121] Линкеры связующего агента могут связываться со связующим агентом, например, антителом или антигенсвязывающей молекулой, через присоединение на определенной аминокислоте в антителе или антигенсвязывающей молекуле. Примеры аминокислотных присоединений, которые могут применяться в контексте данного варианта осуществления 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, 105:12451-12456), формилглицин (см., например, Carrico *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321-322; Agarwal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2013, 110:46-51, и Rabuka *et al.*, *Nat. Protocols*, 2012, 10:1052-1067), неприродные аминокислоты (см., например, WO 2013/068874 и WO 2012/166559) и кислые аминокислоты (см., например, WO 2012/05982). Линкеры также могут быть конъюгированы с антигенсвязывающим белком через присоединение к углеводам (см., например, US 2008/0305497, WO 2014/065661 и Ryan *et al.*, *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, 13:127-130).

[00122] В некоторых примерах связующий агент является антителом или антигенсвязывающей молекулой, и антитело связывается с линкером через лизиновый

остаток. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающая молекула связываются с линкером через цистеиновый остаток.

[00123] Линкеры также могут быть конъюгированы с одним или более глутаминовыми остатками посредством хемоферментативной конъюгации на основе трансглутаминазы (см., например, Dennler *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 2014, 25, 569-578). Например, в присутствии трансглутаминазы один или более глутаминовых остатков антитела могут связываться с первичным аминным соединением. Первичные аминные соединения включают, например, нагрузки или линкер-нагрузки, которые напрямую дают конъюгаты модифицированное трансглутаминазой антитело-лекарственное средство посредством опосредованного трансглутаминазой связывания. Первичные аминные соединения также включают линкеры и спейсеры, которые функционализованы реакционноспособными группами, которые в последующем могут вступать в реакцию с другими соединениями по направлению к синтезу конъюгатов антитело-лекарственное средство (например, в определенных вариантах осуществления конъюгатов модифицированное трансглутаминазой антитело-лекарственное средство). Антитела, содержащие глутаминовые остатки, могут быть выделены из природных источников или изменены таким образом, чтобы они содержали один или более глутаминовых остатков. Методы для включения глутаминовых остатков в полипептидную цепь антитела (глутаминил-модифицированные антитела или антигенсвязывающие молекулы) известны специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления антитело является агликозильированным.

[00124] В определенных вариантах осуществления антитело, модифицированное глутаминилом антитело или модифицированное трансглутаминазой антитело или их антигенсвязывающие фрагменты содержат минимум один глутаминовый остаток минимум в одной последовательности полипептидной цепи. В определенных вариантах осуществления антитело, модифицированное глутаминилом антитело или модифицированное трансглутаминазой антитело или их антигенсвязывающие фрагменты содержат два полипептида с тяжелой цепью, каждый из них с одним остатком Gln295 или Q295. В дальнейших вариантах осуществления антитело, модифицированное глутаминилом антитело или модифицированное трансглутаминазой антитело или их антигенсвязывающие фрагменты содержат один или более глутаминовых остатков в участке, кроме 295 тяжелой цепи. Сюда включаются антитела согласно данному разделу, имеющие описанную здесь мутацию (мутации) N297Q.

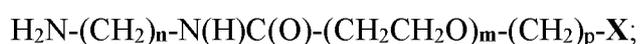
Первичные аминные соединения

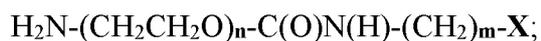
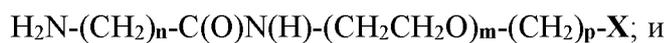
[00125] В определенных вариантах осуществления первичные аминные соединения, полезные для опосредованного трансклутаминазой соединения антитела (или антигенсвязывающего соединения), содержащего один или более глутаминовых остатков (в результате чего получают модифицированное трансклутаминазой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), могут быть любым первичным аминным соединением, которое специалист считает полезным. В общем, первичное аминное соединение имеет формулу H_2N-R , где **R** может быть любой группой, совместимой с антителом и условиями реакции. В определенных вариантах осуществления **R** представляет собой алкил, замещенный алкил, гетероалкил или замещенный гетероалкил.

[00126] В некоторых вариантах осуществления первичное аминное соединение содержит реакционноспособную группу или защищенную реакционноспособную группу. Полезные реакционноспособные группы включают азиды, алкины, циклоалкины, тиолы, спирты, кетоны, альдегиды, карбоновые кислоты, эфиры, амиды, гидразиды, анилины и амины. В определенных вариантах осуществления реакционноспособная группа выбирается из группы, состоящей из азида, алкина, сульфгидрила, циклоалкина, альдегида и карбоксила.

[00127] В определенных вариантах осуществления первичное аминное соединение соответствует формуле $H_2N-LL-X$, где **LL** представляет собой двухвалентный спейсер и **X** представляет собой реакционноспособная группа или защищенная реакционноспособная группа. В конкретных вариантах осуществления **LL** представляет собой двухвалентная полиэтиленгликольная (ПЭГ) группа. В определенных вариантах осуществления **X** выбирается из группы, состоящей из $-SH$, $-N_3$, алкина, альдегида и тетразола. В конкретных вариантах осуществления **X** представляет собой $-N_3$.

[00128] В определенных вариантах осуществления первичное аминное соединение соответствует одной из следующих формул:



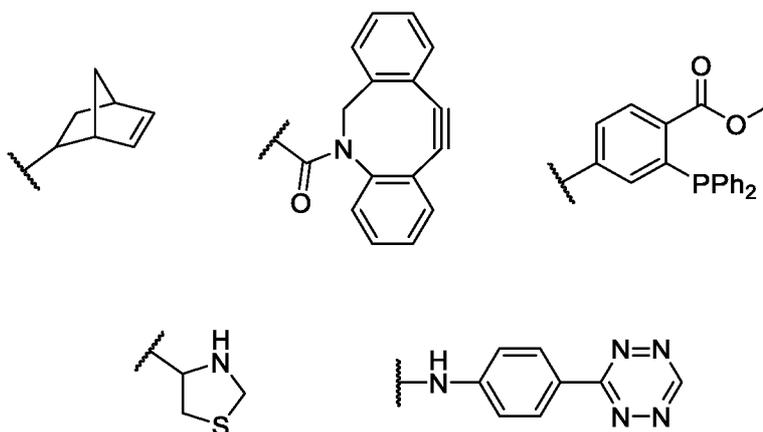


где **n** представляет собой целое число, которое выбирается в диапазоне от 1 до 12;

m представляет собой целое число, которое выбирается в диапазоне от 0 до 12;

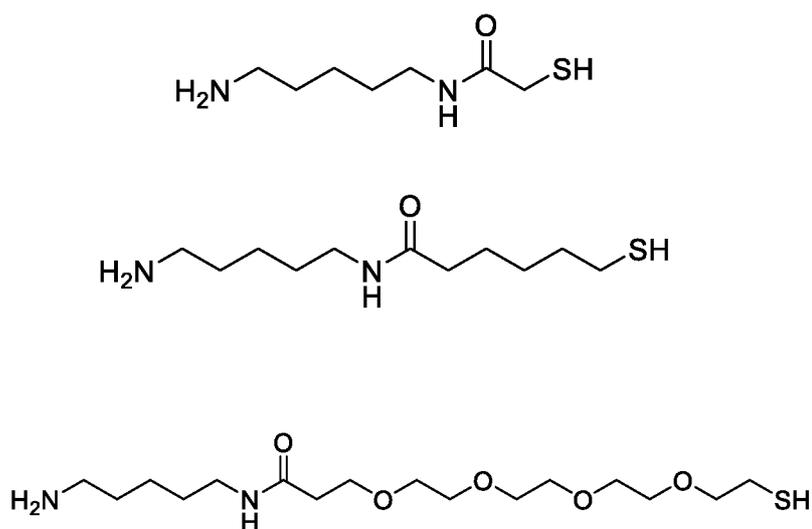
p представляет собой целое число, которое выбирается в диапазоне от 0 до 2;

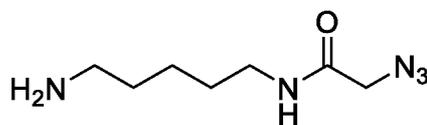
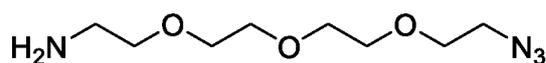
и **X** выбирается из группы, состоящей из $-\text{SH}$, $-\text{N}_3$, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{H}$, тетразола и любого из



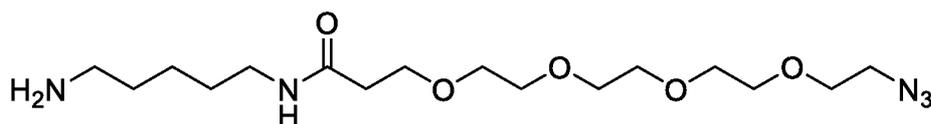
[00129] В вышеприведенном описании любая из алкильных или алкиленовых (т.е. $-\text{CH}_2-$) групп может быть необязательно замещена, например, C_{1-8} алкилом, метилформилом или $-\text{SO}_3\text{H}$. В определенных вариантах осуществления алкильные группы не замещены.

[00130] В определенных вариантах осуществления первичное аминное соединение выбирается из группы, состоящей из:

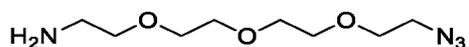




и



[00131] В конкретных вариантах осуществления первичное аминное соединение представляет собой



Примеры условий для описанных выше и ий представлены далее в разделе "Примеры".

Линкеры

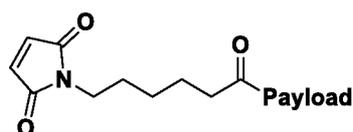
[00132] В определенных вариантах осуществления линкерная **L** часть описанных здесь конъюгатов представляет собой группа, например, двухвалентная группа, которая ковалентно связывает описанные здесь связующий агент и соединение-нагрузку. В других примерах линкер **L** представляет собой трехвалентная или мультивалентная группа, которая ковалентно связывает описанные здесь связующий агент и соединение-нагрузку. Подходящие линкеры можно найти, например, в публикациях *Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins*; Phillips, G. L., Ed.; Springer Verlag: New York, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Ducry, L., Ed.; Humana Press, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Wang, J., Shen, W.-C., and Zaro, J. L., Eds.; Springer International Publishing, 2015, содержание каждой из которых включено в настоящий документ полностью посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления линкерная **L** часть описанных здесь линкер-нагрузок или линкер-пролекарственных нагрузок представляет собой группа, ковалентно связанная с описанным здесь соединением-нагрузкой или пролекарственной нагрузкой, способная двухвалентно и ковалентно связывать описанные здесь связующий агент и соединение-нагрузку или пролекарственную нагрузку. В других примерах линкерная **L** часть описанных здесь линкер-нагрузок представляет собой группа, ковалентно связанная с описанным здесь соединением-нагрузкой или пролекарственной нагрузкой, способная

ковалентно связывать, будучи трехвалентной или мультивалентной группой, описанные здесь связующий агент и соединение-нагрузку и пролекарственную нагрузку. Соединения-нагрузка или пролекарственная нагрузка включают соединения вышеприведенной Формулы I, Ia, Iaa, II, III, IV, V и VI, и их остатки после связывания с линкером L или включения в него являются линкер-нагрузками или линкер-пролекарственными нагрузками. Линкер-нагрузки могут далее быть связаны со связующими агентами, такими как антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, в результате чего образуются конъюгаты антитело-лекарственное средство. Специалистам в данной области известно, что определенные функциональные группы нагрузок удобны для связывания с линкерами и/или связующими агентами. Например, в определенных вариантах осуществления линкер отсутствует и нагрузки или пролекарственные нагрузки напрямую связываются со связующими агентами. В одном варианте осуществления нагрузки или пролекарственные нагрузки включают концевые алкины, а связующие агенты включают азиды, при этом каждый алкин и азид участвуют в региоизомерной клик-химии для связывания остатков нагрузок и остатков связующих агентов напрямую. В другом варианте осуществления нагрузки или пролекарственные нагрузки включают карбоновые кислоты, а связующие агенты включают лизины, при этом каждая карбоновая кислота и лизин участвуют в формировании амидной связи для связывания остатков нагрузок и остатков связующих агентов напрямую. Функциональные группы нагрузок далее включают амины (например, Формулы C, D, E, LPc, LPd и LPe), четвертичные аммоний-ионы (например, Формулы A и LPa), гидроксилы (например, Формулы C, D, E, LPc, LPd и LPe), фосфаты, карбоновые кислоты (например, в форме эфиров при связывании с L, как в Формулах B, D, LPb и LPd), гидразиды (например, Формулы B и LPb), амиды (например, полученные от анилинов Формулы C и LPc, или амины Формулы D, E, LPd и LPe) и сахара.

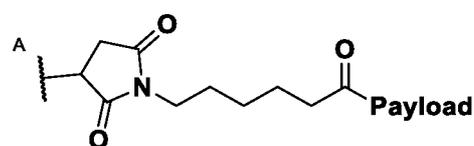
[00133] В определенных вариантах осуществления линкеры являются устойчивыми в физиологических условиях. В определенных вариантах осуществления линкеры являются расщепляемыми, например, способными высвободить минимум часть нагрузки в присутствии фермента и в определенном диапазоне или при определенном значении pH. В некоторых вариантах осуществления линкер включает расщепляемую ферментом группу. Примеры расщепляемых ферментом групп включают, помимо прочего, пептидные связи (т.е. отличающиеся от пролекарственных нагрузок с пептидными связями, описанных здесь), сложноэфирные связи, гидразоны, β --глюкуронидные связи и дисульфидные связи. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит расщепляемый катепсином

линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит расщепляемый β глюкоронидазой (GUSB) линкер (см., например, GUSB линкеры от Creative Biolabs, creative-biolabs.com/adc/beta-glucuronide-линкер.htm, или *ACS Med. Chem. Lett.* 2010, 1: 277–280).

[00134] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит нерасщепляемую группу. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер получают от

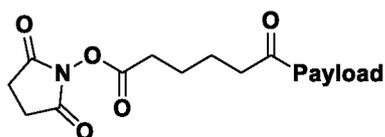


или его остатка. В некоторых вариантах осуществления остаток



нерасщепляемого линкера-нагрузки представляет собой

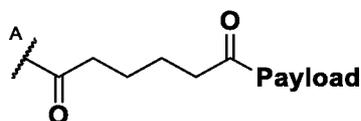
или его региоизомер. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер



получают от

или его остатка. В некоторых вариантах

осуществления остаток нерасщепляемого линкера-нагрузки представляет собой



или его региоизомер. В одном варианте осуществления линкер

представляет собой малеимид циклогексан карбоксилат или 4-(N-

малеимидометил)циклогексанкарбоновая кислота (МСС). В этих структурах  означает

связь со связующим агентом. В этих структурах в некоторых примерах  означает

остаток клик-химии, получаемый в результате реакции, например, связующего агента с азидной или алкиновой функциональной группой и линкер-нагрузки с комплементарной алкиновой или азидной функциональной группой. В этих структурах в других примерах

 означает двухвалентный сульфид, получаемый в результате реакции, например, одного или более цистеинов связующего агента с одним или более линкерами или линкер-нагрузками с малеимидной функциональной группой посредством реакций присоединения

Михаэля. В этих структурах в других примерах  означает амидную связь, образованную в результате реакции, например, одного или более лизинов связующего агента с одним или

более линкерами или линкер-нагрузками с активированной или неактивированной карбоксильной функциональной группой, что понятно специалисту в данной области. В

одном варианте осуществления $\overset{A}{-}\xi$ означает амидную связь, образованную в результате реакции, например, одного или более лизинов связующего агента с одним или более линкерами или линкер-нагрузками с активированной карбоксильной функциональной группой, что понятно специалисту в данной области.

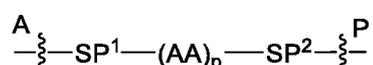
[00135] В некоторых вариантах осуществления подходящие линкеры включают, помимо прочего, линкеры, которые химически связаны с двумя цистеиновыми остатками одного связующего агента, например, антитела. Такие линкеры могут служить для имитации дисульфидных связей антитела, которые разрушаются в результате процесса конъюгации.

[00136] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит одну или более аминокислот (отличающихся от пролекарственных нагрузок, содержащих пептидные связи, полученные от отличительных аминокислот, которые здесь описаны). Подходящие аминокислоты включают природные, неприродные, стандартные, нестандартные, протеиногенные, непротеиногенные и L- или D- α -аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аланин, валин, глицин, лейцин, изолейцин, метионин, триптофан, фенилаланин, пролин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, гистидин или цитруллин, их производное или любую их комбинацию (например, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, полипептиды и подобные). В определенных вариантах осуществления одна или более боковых цепей аминокислот связаны с группой боковой цепи, описанной далее. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот валина и цитруллина (например, двухвалентным $-\text{Val-Cit-}$ или двухвалентным $-\text{VCit-}$). В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот аланина и аланина, или двухвалентным $-\text{AA-}$. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот глутаминовой кислоты и аланина, или $-\text{EA-}$. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот глутаминовой кислоты и глицина, или $-\text{EG-}$. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот глицина и глицина, или $-\text{GG-}$. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот глутамина, валина и цитруллина, или $-\text{Q-V-Cit-}$ или $-\text{QVCit-}$. В некоторых вариантах осуществления линкер

является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот глутаминовой кислоты, валина и цитруллина, или –E-V-Cit– или –EVCit–. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот –GGGGS–. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот –GGGGG–. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот –GGGGK–. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот –GFGG–. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот –GG–. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот –GGG–. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот –GGGG–. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот –GGFG–. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот лизина, валина и цитруллина, или –KVCit–. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот –KVA–. В некоторых вариантах осуществления линкер является пептидом, содержащим или состоящим из аминокислот –VA–. В любом из вариантов осуществления в данном пункте и по тексту настоящего описания изобретения используются стандартные трехбуквенные или однобуквенные обозначения аминокислот, что понятно специалисту в данной области. Примеры однобуквенных обозначений аминокислот включают G для глицина, K для лизина, S для серина, V для валина, A для аланина и F для фенилаланина.

[00137] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит саморасщепляющуюся группу. Саморасщепляющаяся группа может быть любой группой, известной специалистам в данной области. В конкретных вариантах осуществления такой саморасщепляющейся группой является *p*-аминобензил (PAB) или его производное. Полезные производные включают *p*-аминобензилоксикарбонил (PABC). Специалистам в данной области понятно, что саморасщепляющаяся группа способна вступать в химическую реакцию, в результате которой высвобождаются оставшиеся атомы линкера от нагрузки.

[00138] В некоторых вариантах осуществления линкер -



при этом:

SP¹ представляет собой спейсер;

SP² представляет собой спейсер;

 одна или более связей со связующим агентом;

 одна или более связей с нагрузкой;

каждый **AA** представляет собой аминокислотный остаток; и

p представляет собой целое число от нуля до десяти.

В определенных вариантах осуществления здесь каждая **AA** в линкере **L** может быть охарактеризована как второй аминокислотный остаток, в отличие от первого аминокислотного остатка в нагрузке или пролекарственной нагрузке, которые здесь описаны. Специалисту должно быть известно, что определенных вариантах осуществления здесь более одной **AA** в линкере **L** могут быть охарактеризованы как второй пептидный остаток, в отличие от первого пептидного остатка в нагрузке или пролекарственной нагрузки, которые здесь описаны.

[00139] Спейсер **SP¹** представляет собой группа, которая соединяет (**AA**)_p группу или остаток со связующим агентом (**BA**) или с остатком реакционноспособной группы, который связан с **BA**. Подходящие спейсеры **SP¹** включают, помимо прочего, спейсеры, содержащие алкилен или полиэфир, или и то, и другое. Концы спейсеров, например, часть спейсера, связанная с **BA** или **AA**, могут быть группами, полученными от реакционноспособных групп, которые используются в целях связывания антитела или **AA** со спейсером во время химического синтеза конъюгата. В определенных вариантах осуществления **p** имеет значение 0, 1, 2, 3 или 4. В конкретных вариантах осуществления **p** имеет значение 2. В конкретных вариантах осуществления **p** имеет значение 3. В конкретных вариантах осуществления **p** имеет значение 4.

[00140] В некоторых вариантах осуществления спейсер **SP¹** содержит алкилен. В некоторых вариантах осуществления спейсер **SP¹** содержит C₅₋₇ алкилен. В некоторых вариантах осуществления спейсер **SP¹** содержит полиэфир. В некоторых вариантах осуществления спейсер **SP¹** содержит полимер этиленоксида, например, полиэтиленгликоль.

[00141] В некоторых вариантах осуществления спейсер **SP¹** -



при этом:

RG' представляет собой остаток реакционноспособной группы после реакции реакционноспособной группы **RG** со связующим агентом;

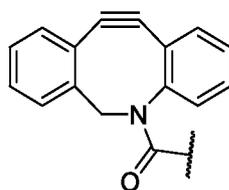
$\begin{array}{c} \text{A} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{array}$ представляет собой связь со связующим агентом;

$\begin{array}{c} \text{---} \\ \text{---} \end{array}$ представляет собой связь с(AA)_p, где **p** представляет собой целое число от нуля до десяти; и

b представляет собой целое число от двух до восьми.

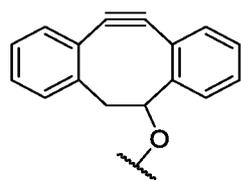
[00142] Реакционноспособная группа **RG** может быть любой реакционноспособной группой, которая, как известно специалисту в данной области, способна образовывать одну или более связей со связующим агентом. Реакционноспособная группа **RG** представляет собой группа, содержащая часть в своей структуре, способную вступать в реакцию со связующим агентом (например, вступать в реакцию с антителом на его цистеиновом или лизиновом остатках или на азидной группе, например, PEG-N₃ функционализованном антителе на одном или более глутаминовых остатках), в результате чего образуется соединение Формулы **A**, **A'**, **B**, **B'**, **C**, **C'**, **D**, **D'**, **E** или **E'**. После конъюгации со связующим агентом реакционноспособная группа становится остатком реакционноспособной группы (**RG'**). Примеры реакционноспособных групп включают, помимо прочего, группы, которые содержат части галоацетила, изотиоцианата, сукцинимида, *N*-гидроксисукцинимида или малеимида, способные вступать в реакцию со связующим агентом.

[00143] В определенных вариантах осуществления реакционноспособные группы включают, помимо прочего, алкины. В определенных вариантах осуществления такие алкины представляет собой алкины, способные вступать в реакции 1,3-циклоприсоединения с азидами в отсутствие катализаторов на основе меди, например, напряженные алкины. Напряженные алкины подходят для промотированных напряжением алкин-азидных циклоприсоединений (SPAAC) и включают циклоалкины, например, циклооктины и бензаннелированные алкины. Подходящие алкины включают, помимо

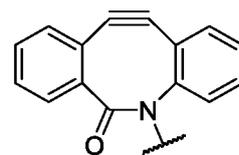


прочего, дибензоазациклооктин или

(DIBAC); дибензоциклооктин или

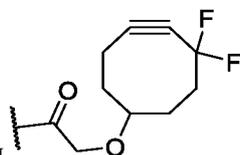


(DIBO); биарилазацетонинон или

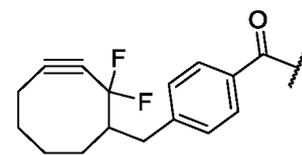


(BARAC);

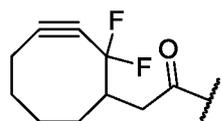
двухфтористый циклооктин или



, или

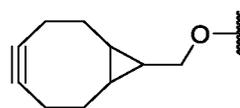


, или



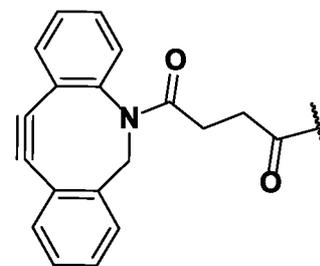
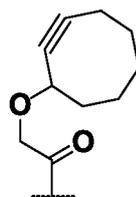
(DIFO); замещенные, например, фторсодержащие алкины, аза-

циклоалкины, бицикло[6.1.0]нонин или

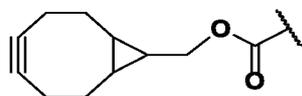


(BCN); и их производные.

Особенно полезные алкины включают

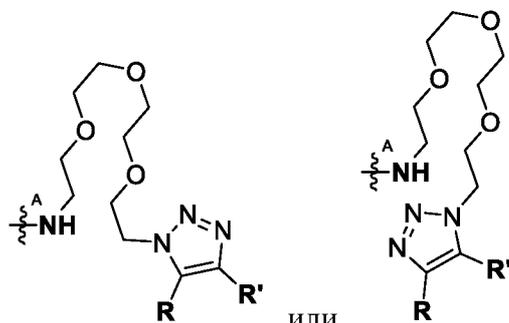


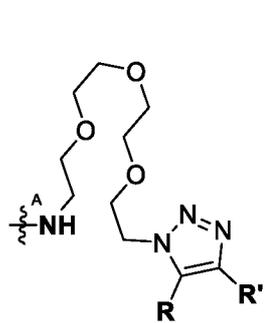
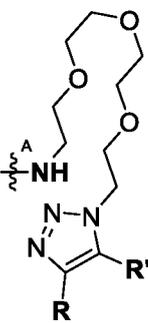
и



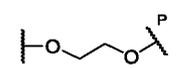
[00144] В определенных вариантах осуществления связующий агент напрямую связан с **RG'**. В определенных вариантах осуществления связующий агент связан с **RG'** через спейсер, например, **SP⁴**, расположенный между $\frac{A}{\xi}$ и **RG'**. В конкретных вариантах осуществления связующий агент опосредованно связан с **RG'** через **SP⁴**, например, ПЭГ спейсер. Как подробно описано далее, в определенных вариантах осуществления связующий агент подготавливают посредством функционализации с одной или более азидо группами. Каждая азидо группа способна вступать в реакцию с **RG**, в результате чего образуется **RG'**. В конкретных вариантах осуществления связующий агент дериватизируют **-PEG-N₃**, связанным с глутаминовым остатком (т.е. модифицированный трансглутаминой связующий агент). Здесь представлены примеры **-N₃** дериватизированных связующих агентов, способы их приготовления и способы их использования в реакциях с **RG**. В определенных вариантах осуществления **RG** представляет собой алкин, подходящий для участия в 1,3-циклоприсоединениях, а **RG'**

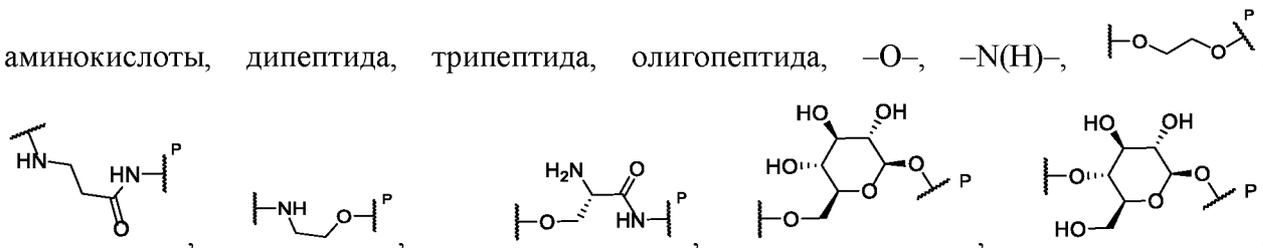
представляет собой региоизомерная 1,2,3-триазолильная группа, образованная в результате реакции **RG** с азидофункционализированным связующим агентом. В качестве дальнейшего примера, в определенных вариантах осуществления **RG'** связан со связующим агентом так,

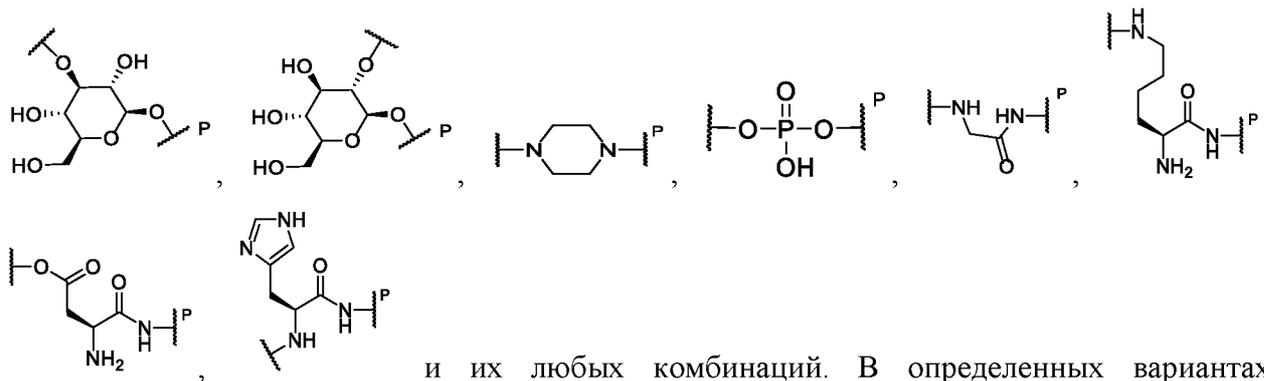


как показано в  или  или смеси каждого региоизомера. Каждый **R** и **R'** соответствуют приведенным здесь описаниям или примерам.

[00145] Спейсер **SP²**, при его наличии представляет собой группа, которая соединяет **(AA)_p** группу с нагрузкой. Подходящие спейсеры включают, помимо прочего, спейсеры, описанные выше как спейсеры **SP¹**. Другие подходящие спейсеры **SP²** включают, помимо прочего, спейсеры, содержащие алкилен или полиэфир или и то, и другое. Концы спейсеров **SP²**, например, часть спейсера, напрямую связанная с нагрузкой, пролекарственной нагрузкой или **AA**, могут быть группами, полученными от реакционноспособных групп, которые используются в целях связывания нагрузки, пролекарственной нагрузки или **AA** со спейсером **SP²** во время химического синтеза конъюгата. В некоторых примерах концы спейсеров **SP²**, например, часть спейсера **SP²**, напрямую связанная с нагрузкой, пролекарственной нагрузкой или **AA**, могут быть остатками реакционноспособных групп, которые используются в целях связи нагрузки, пролекарственной нагрузки или **AA** со спейсером во время химического синтеза конъюгата.

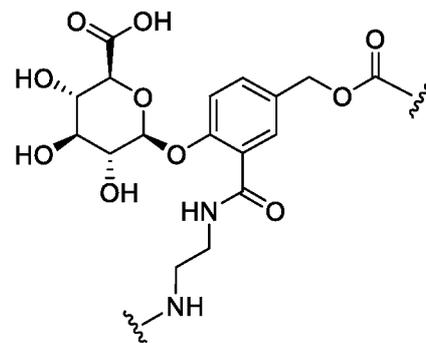
[00146] В некоторых вариантах осуществления спейсер **SP²**, при его наличии, выбирается из группы, состоящей из $-\text{NH}-(p\text{-C}_6\text{H}_4)\text{-CH}_2-$, $-\text{NH}-(p\text{-C}_6\text{H}_4)\text{-CH}_2\text{OC(O)-}$, аминокислоты, дипептида, трипептида, олигопептида, $-\text{O}-$, $-\text{N(H)}-$, ,



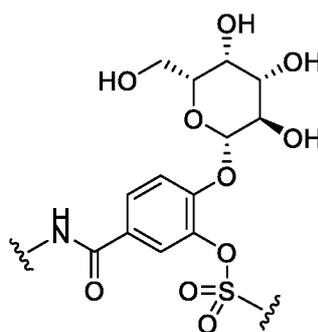
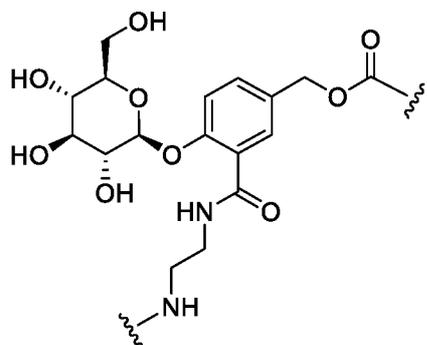


и их любых комбинаций. В определенных вариантах осуществления каждая $\text{---}\overset{\text{P}}{\text{---}}$ представляет собой связь с нагрузкой или пролекарственной нагрузкой, а каждая $\text{---}\overset{\text{P}}{\text{---}}$ представляет собой связь с $(\text{AA})_p$.

[00147] В вышеприведенных формулах каждая $(\text{AA})_p$ представляет собой аминокислота или необязательно



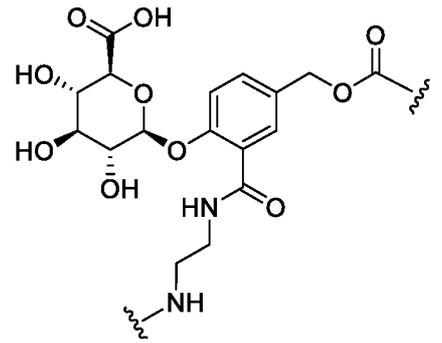
p-аминобензилоксикарбонильный остаток (PABC),



или

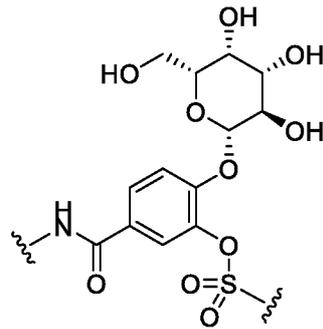
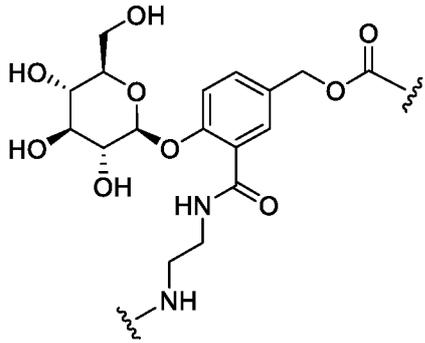
. Если присутствует PABC,

тогда в конкретных вариантах осуществления присутствует только один PABC. В определенных вариантах осуществления остаток PABC, если он присутствует, связан с концевой AA в $(\text{AA})_p$ группе, проксимальной по отношению к нагрузке или



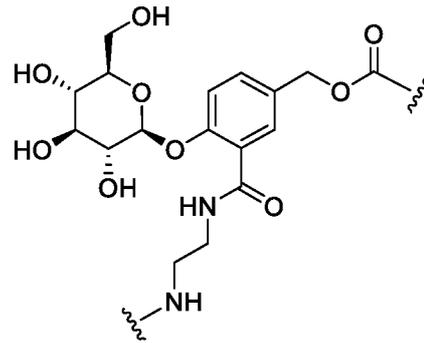
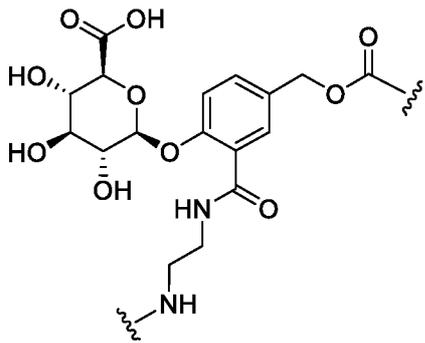
пролекарственной нагрузке.

Если присутствует

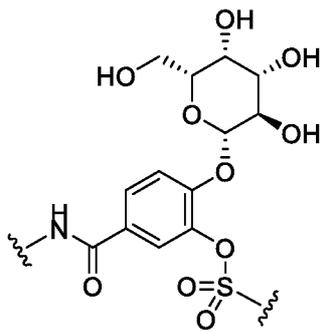


или

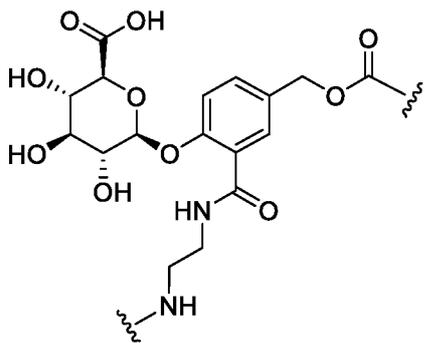
, тогда присутствует только



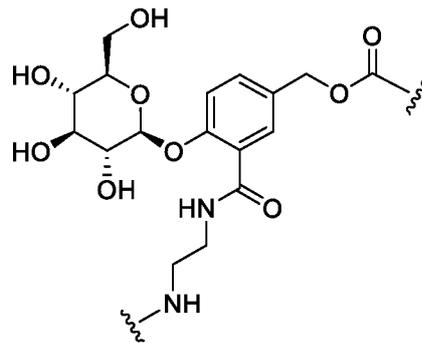
или



В определенных вариантах осуществления остаток

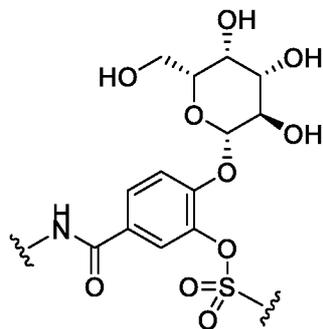


или



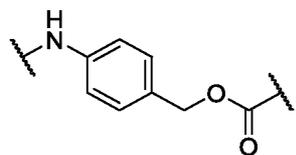
, если он присутствует,

связан с нагрузкой или пролекарственной нагрузкой через бензилоксикарбонильную группу и АА отсутствует. В определенных вариантах осуществления остаток



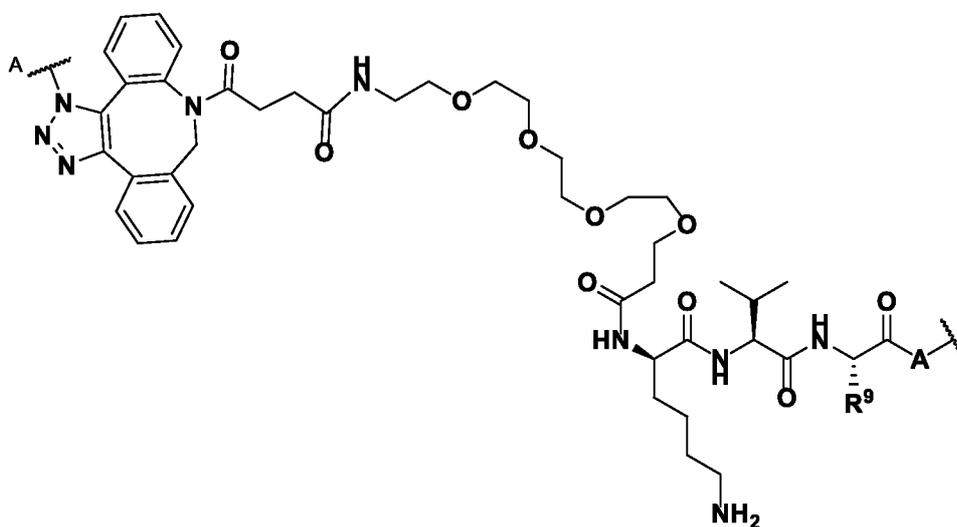
, если он присутствует, связан с нагрузкой или пролекарственной нагрузкой посредством $-O-$. Подходящие аминокислоты для каждой АА включают природные, неприродные, стандартные, нестандартные, протеиногенные, непротеиногенные или L- или D- α -аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления АА содержит аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, триптофан, фенилаланин, пролин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, гистидин или цитруллин, их производное или любую их комбинацию (например, дипептиды, трипептиды, и олигопептиды и подобные). В определенных вариантах осуществления одна или более боковых цепей аминокислот связаны с группой боковой цепи, описанной далее. В некоторых вариантах осуществления p имеет значение 2. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_p$ представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_p$ представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_p$ представляет собой валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_p$ представляет собой аланин-валин. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_p$ представляет собой валин-глицин. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_p$ представляет собой глицин-валин. В некоторых вариантах осуществления p имеет значение 3. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_p$ представляет собой валин-цитруллин-РАВС. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_p$ представляет собой цитруллин-валин-РАВС. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_p$ представляет собой глутамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_p$ представляет собой глутамин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_p$ представляет собой лизин-валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_p$ представляет собой лизин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления p имеет значение 4. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_p$ представляет собой глутамат-валин-цитруллин-РАВ. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_p$ представляет собой глутамин-валин-цитруллин-РАВС.

Специалистам в данной области известен РАВС как остаток *p*-аминобензилоксикарбонила со следующей структурой:

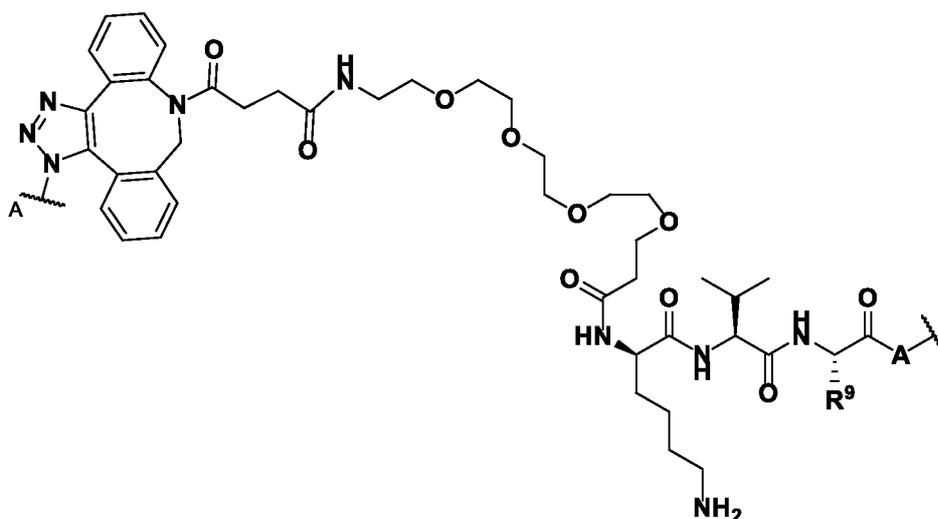


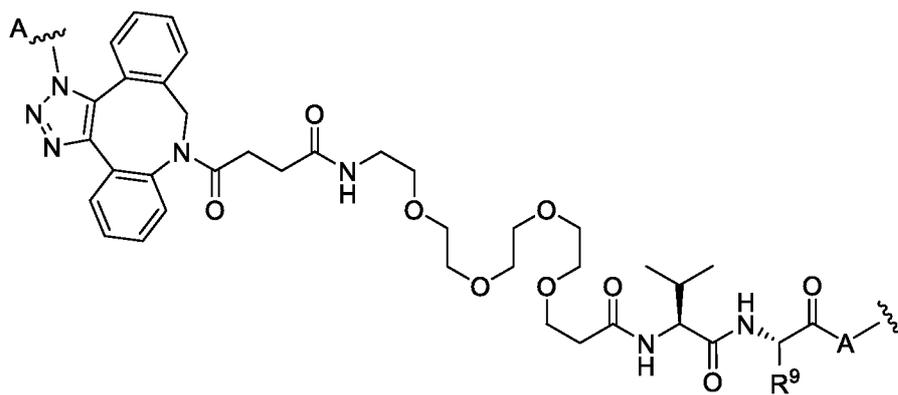
Было доказано, что остаток РАВС способствует расщеплению определенных линкеров *in vitro* и *in vivo*. Специалистам в данной области известно, что РАВ представляет собой двухвалентный остаток *p*-аминобензила или $-\text{NH}-(p\text{-C}_6\text{H}_4)\text{-CH}_2-$.

[00148] В некоторых вариантах осуществления линкер -

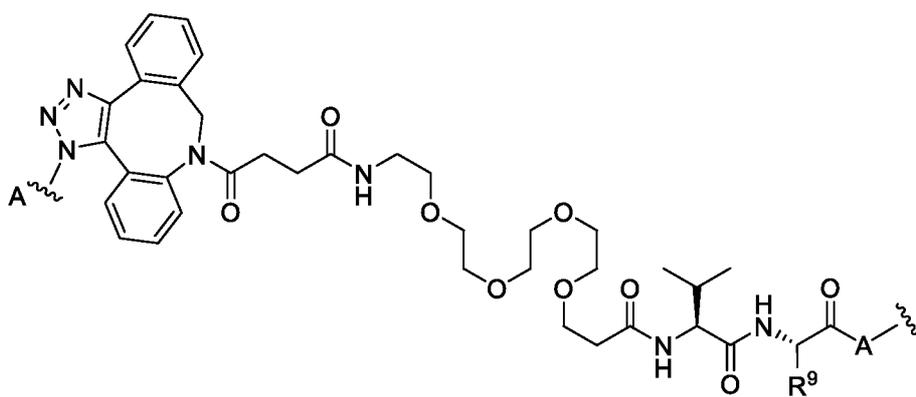


ИЛИ

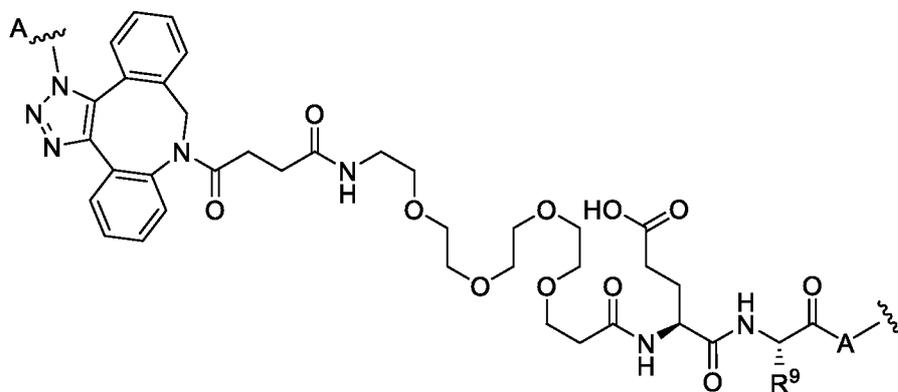




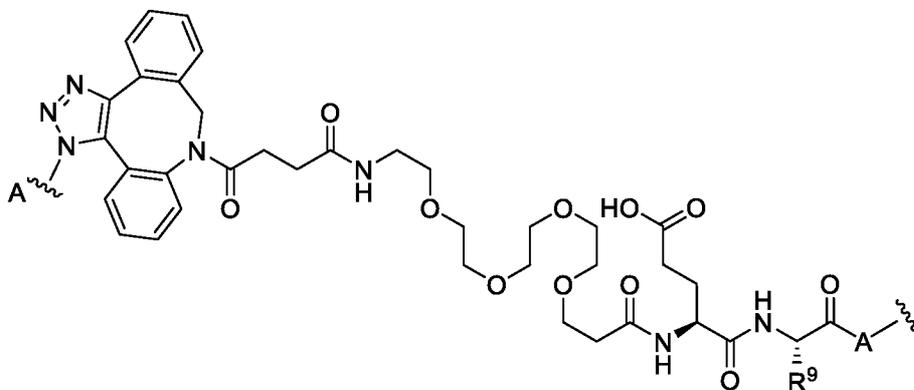
ИЛИ



; ИЛИ



ИЛИ

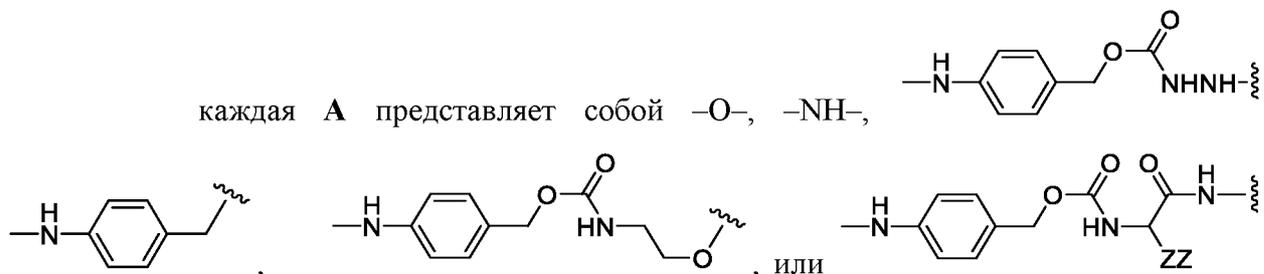


где:

каждая $\text{---}\overset{\text{A}}{\text{---}}$ представляет собой связь с модифицированным трансглутаминой связующим агентом;

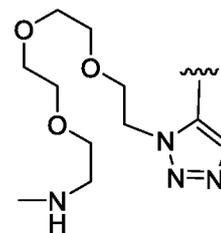
каждая $\text{---}\overset{\text{Z}}{\text{---}}$ представляет собой связь с нагрузкой;

каждая R^9 представляет собой ---CH_3 или $\text{---(CH}_2\text{)}_3\text{N(H)C(O)NH}_2$; и

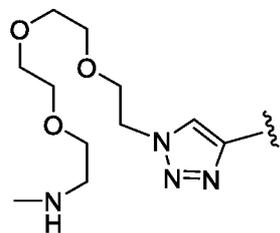


где **ZZ** представляет собой водород или боковая цепь для аминокислоты, что рассмотрено в настоящем документе. В качестве дальнейшего примера, в одном варианте осуществления **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дальнейшего примера, в одном варианте осуществления **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил. В конкретных вариантах осуществления данного пункта **A** можно получить от первичного аминного соединения или его остатка, где **X** представляет собой ---N_3 , что рассмотрено в настоящем документе. В этих вариантах осуществления 1,2,3-триазольный остаток получают от азиды после участия в реакции клик-химии, что описано в настоящем документе, с алкином или концевым ацетиленом описанного здесь соединения или нагрузки. Соответственно, в

одном неограничивающем примере **A** представляет собой

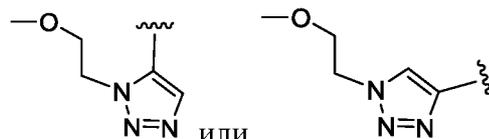


или



или их смесь. В качестве варианта, в другом варианте осуществления

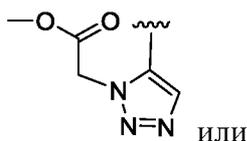
A представляет собой



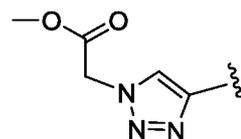
или

или их смесь. В другом варианте

осуществления А представляет собой

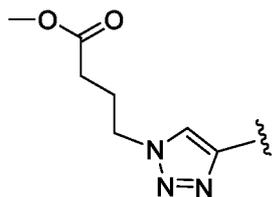


или



или их смесь. В

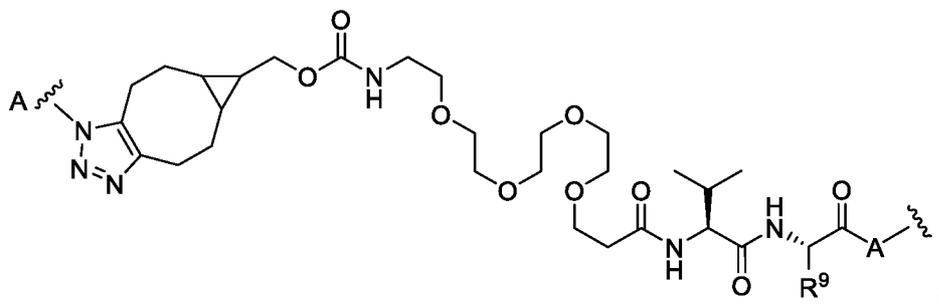
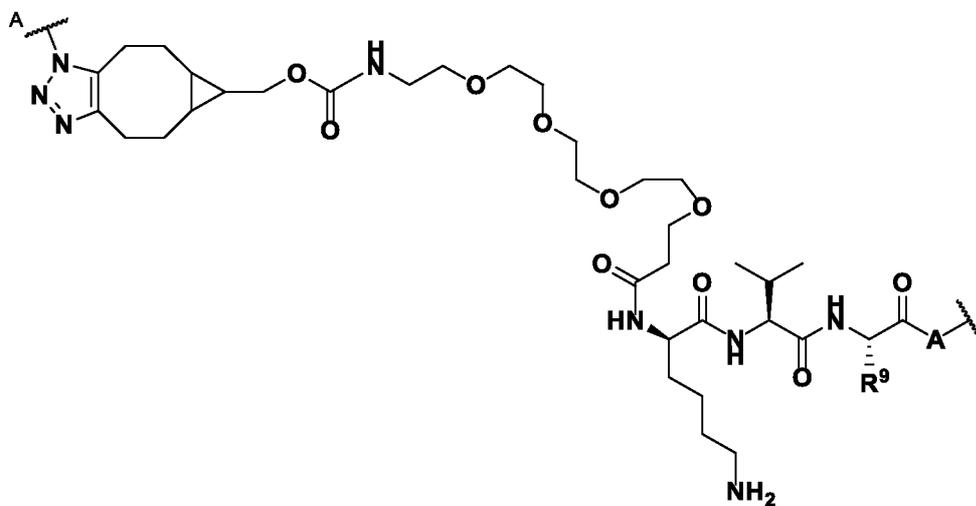
другом варианте осуществления А представляет собой



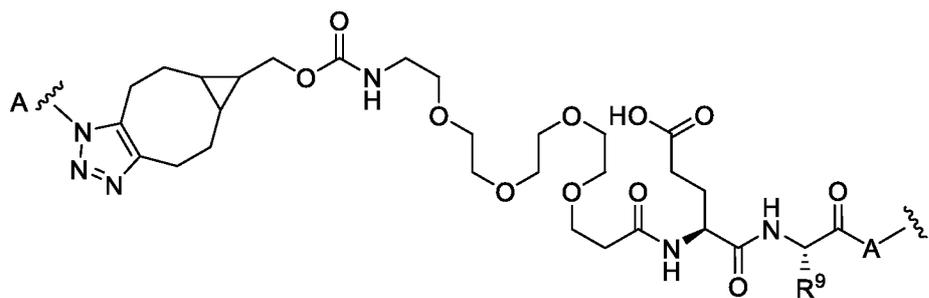
или их смесь. Как было рассмотрено выше, связь со связующим

агентом может быть прямой или через спейсер. В определенных вариантах осуществления связь со связующим агентом осуществляется через ПЭГ спейсер с глутаминовым остатком связующего агента.

[00149] В некоторых вариантах осуществления линкер -



или

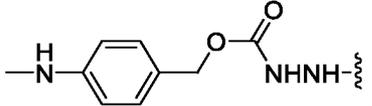


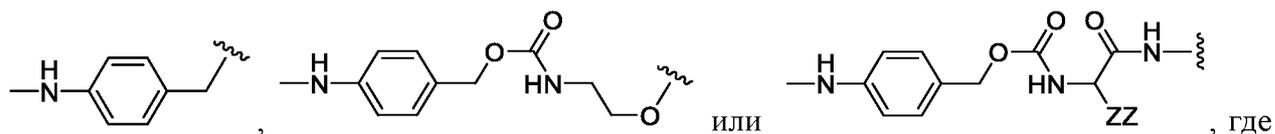
при этом:

каждая  представляет собой связь с модифицированным трансклутаминой связующим агентом;

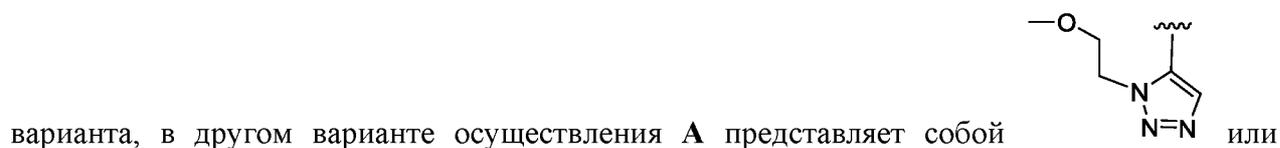
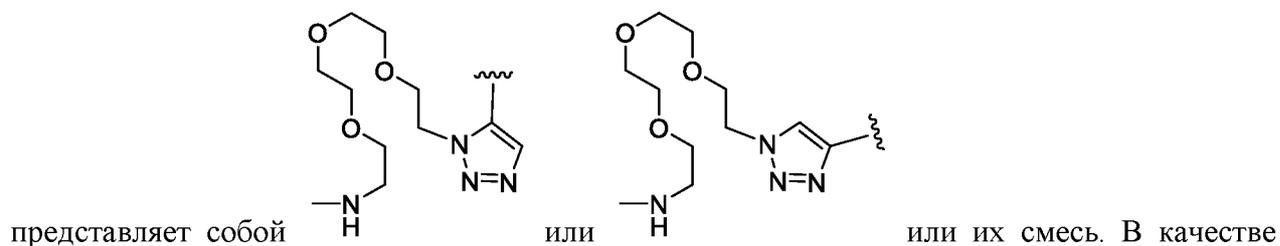
каждая  представляет собой связь с нагрузкой;

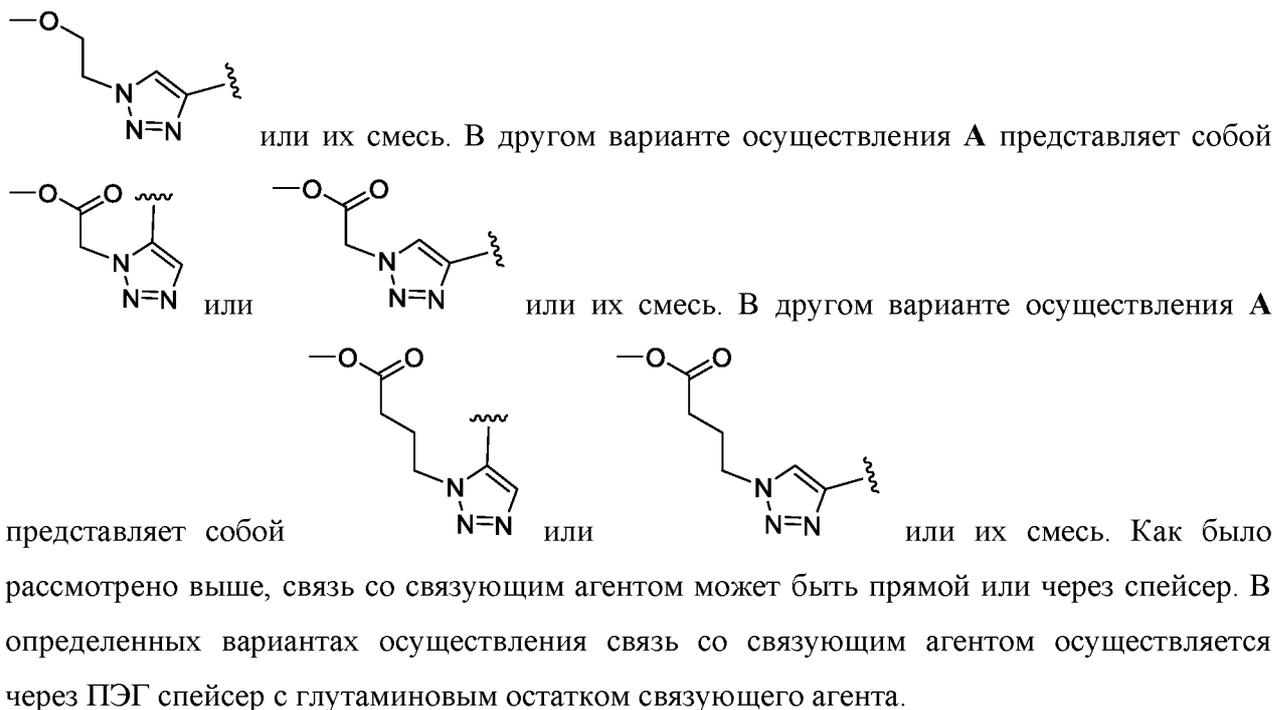
каждая R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждая A представляет собой $-O-$, $-N(H)-$, ,



ZZ представляет собой или боковая цепь для аминокислоты, что рассмотрено в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления ZZ представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дальнейшего примера, в одном варианте осуществления ZZ представляет собой C_{1-6} гетероалкил. В конкретных вариантах осуществления данного пункта A можно получить от первичного аминного соединения или его остатка, где X представляет собой $-N_3$, что рассмотрено в настоящем документе. В этих вариантах осуществления 1,2,3-триазольный остаток получают от азиды после участия в реакции клик-химии, что описано в настоящем документе, с алкином или концевым ацетиленом описанного здесь соединения или нагрузки. Соответственно, в одном неограничивающем примере A

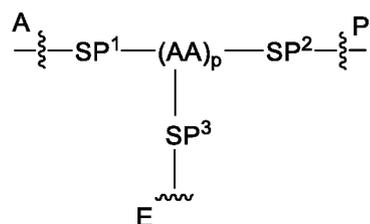




[00150] В любом из вышеприведенных вариантов осуществления $(AA)_p$ группа может быть модифицирована одной или несколькими усиливающими группами. Преимущество заключается в том, что такая усиливающая группа может быть соединена с боковой цепью любой аминокислоты в $(AA)_p$. Полезные аминокислоты для связи усиливающих групп включают лизин, аспарагин, аспарат, глутамин, глутамат и цитруллин. Связью с усиливающей группой может быть прямая связь с боковой цепью аминокислоты либо связь может быть опосредованной через спейсер и/или реакционноспособную группу. Полезные спейсеры и реакционноспособные группы включают любые описанные выше спейсеры и реакционноспособные группы. Усиливающая группа может быть любой группой, которую считают полезной специалисты в данной области. Например, усиливающая группа может быть любой группой, которая наделяет полезными свойствами соединение, нагрузку, линкер-нагрузку или конъюгат антитела, включая, помимо прочего, биологическое, биохимическое действие, действие при синтезе, сольубилизации, визуализации, детекции и способность вступать в реакции и подобные. В определенных вариантах осуществления усиливающая группа является гидрофильной группой. В определенных вариантах осуществления усиливающая группа является циклодекстрином. В определенных вариантах осуществления усиливающей группой является алкил, гетероалкил, алкиленил, гетероалкиленил-сульфоновая кислота, гетероалкиленилтаурин, гетероалкиленил-фосфорная кислота или фосфат, гетероалкилениламин (например, четвертичный амин) или гетероалкиленильный сахар. В определенных вариантах

осуществления сахара включают, помимо прочего, 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, также включая конъюгированные формы, такие как глюкурониды (т.е. посредством глюкуронирования). Примеры дисахаридов включают мальтозу, сахарозу, лактозу, лактулозу, трегалозу и подобные. Примеры полисахаридов включают амилозу, амилопектин, гликоген, инулин, целлюлозу и подобные. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалисту в данной области. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа циклодекстрин, бета циклодекстрин или гамма циклодекстрин или их смеси. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой бета циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой гамма циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления усиливающая группа способна улучшать растворимость оставшейся части конъюгата. В определенных вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота замещены или не замещены. В определенных вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_n-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2CH_2O)_m-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_n-N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, $-(CH_2)_n-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$ или $-(CH_2CH_2O)_m-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, при этом n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5, и m имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил или алкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1-5}SO_3H$. В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_n-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_m-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где m имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_n-N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом

варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{O})\text{N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$, где **n** имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{C}(\text{O})\text{N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$, где **m** имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления линкер -



при этом:

SP¹ представляет собой спейсер;

SP² представляет собой спейсер;

SP³ представляет собой спейсер, связанный с одной **AA** от **(AA)_p**;

$\begin{array}{l} \text{A} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{array}$ одна или более связей со связующим агентом;

$\begin{array}{l} \text{P} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{array}$ одна или более связей с нагрузкой или пролекарственной нагрузкой;

$\begin{array}{l} \text{E} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{array}$ одна или более связей с усиливающей группой **EG**;

каждая **AA** представляет собой аминокислота; и

p представляет собой целое число от нуля до десяти.

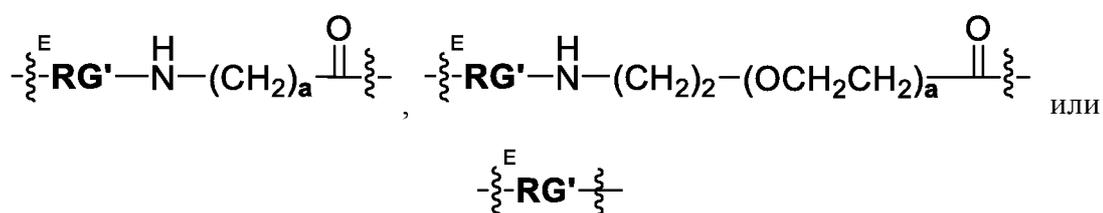
Как было рассмотрено выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В определенных вариантах осуществления связь со связующим агентом осуществляется через ПЭГ спейсер с глутаминовым остатком связующего агента.

[00151] Спейсерная группа **SP¹** соответствует вышеприведенному описанию. Спейсерная группа **SP²** соответствует вышеприведенному описанию. Каждая группа **(AA)_p** соответствует вышеприведенному описанию.

[00152] Спейсер **SP³** представляет собой группа, которая соединяет группу **(AA)_p** с усиливающей группой (**EG**). Подходящие спейсеры **SP³** включают, помимо прочего, спейсеры, содержащие алкилен или полиэфир, или и то, и другое. Концы спейсеров **SP³**, т.е. часть спейсера **SP³**, напрямую связанная с усиливающей группой или **AA**, могут быть группами, полученными от реакционноспособных групп, которые используются в целях

связи усиливающей группы или **AA** со спейсером **SP³** во время химического синтеза конъюгата. В некоторых примерах концы спейсеров **SP³**, т.е. часть спейсера, напрямую связанная с усиливающей группой или **AA**, могут быть остатками реакционноспособных групп, которые используются в целях связи усиливающей группы или **AA** со спейсером во время химического синтеза конъюгата. В определенных вариантах осуществления **SP³** представляет собой спейсер, связанный с одной и только одной **AA** у **(AA)_p**. В определенных вариантах осуществления спейсер **SP³** связан с боковой цепью лизинового остатка **(AA)_p**.

[00153] В некоторых вариантах осуществления спейсер **SP³** -



при этом:

RG' представляет собой остаток реакционноспособной группы после реакции реакционноспособной группы **RG** с усиливающим агентом **EG**;

$\begin{array}{c} \text{---} \text{E} \\ \text{---} \end{array}$ представляет собой связь с усиливающим агентом;

$\begin{array}{c} \text{---} \\ \text{---} \end{array}$ представляет собой связь с **(AA)_p**;

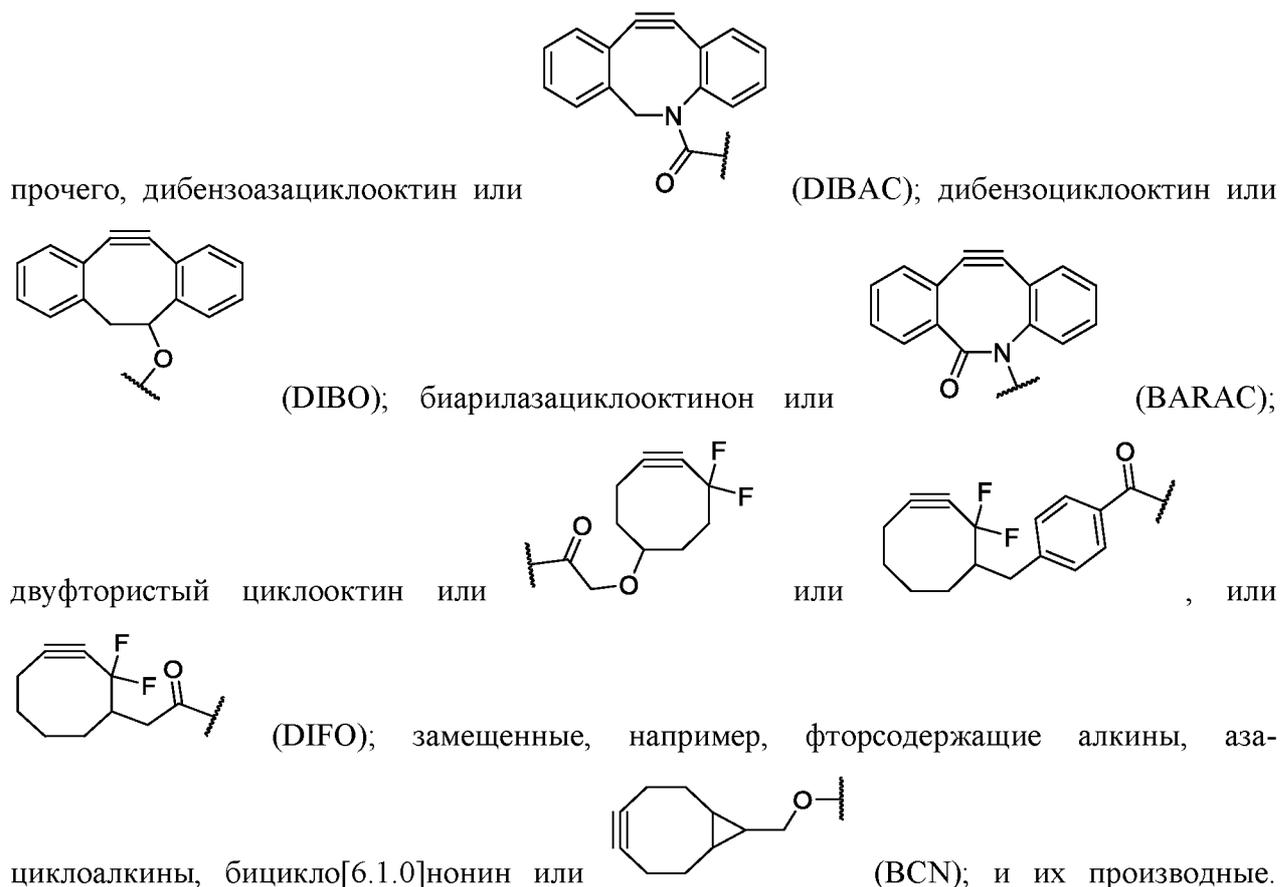
a представляет собой целое число от 2 до 8; и

p представляет собой целое число от нуля до десяти.

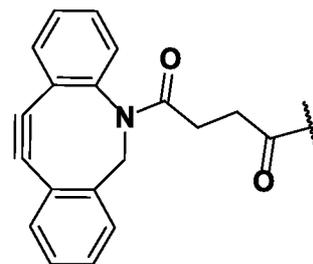
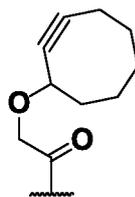
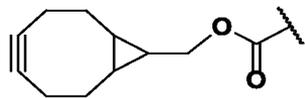
[00154] Реакционноспособная группа **RG** может быть любой реакционноспособной группой, которая, как известно специалисту в данной области, способна образовывать одну или более связей с усиливающим агентом. Реакционноспособная группа **RG** представляет собой группа, содержащая часть в своей структуре, которая способна вступать в реакцию с усиливающей группой, в результате чего образуется соединение Формулы **LPa**, **LPb**, **LPc**, **LPd**, **LPe**, **LPa'**, **LPb'**, **LPc'**, **LPd'**, **LPe'**, **A**, **B**, **C**, **D**, **E**, **A'**, **B'**, **C'**, **D'** или **E'**. После конъюгации с усиливающей группой реакционноспособная группа становится остатком

реакционноспособной группы (**RG'**). Реакционноспособная группа **RG** может быть любой описанной выше реакционноспособной группой. Примеры реакционноспособных групп включают, помимо прочего, группы, которые содержат части галоацетила, изотиоцианата, сукцинимида, *N*-гидроксисукцинимида или малеимида, способные вступать в реакцию со связующим агентом.

[00155] В определенных вариантах осуществления реакционноспособные группы включают, помимо прочего, алкины. В определенных вариантах осуществления такие алкины представляет собой алкины, способные вступать в реакции 1,3-циклоприсоединения с азидами в отсутствие катализаторов на основе меди, например, напряженные алкины. Напряженные алкины подходят для промотированных напряжением алкин-азидных циклоприсоединений (SPAAC) и включают циклоалкины, например, циклооктины и бензаннелированные алкины. Подходящие алкины включают, помимо

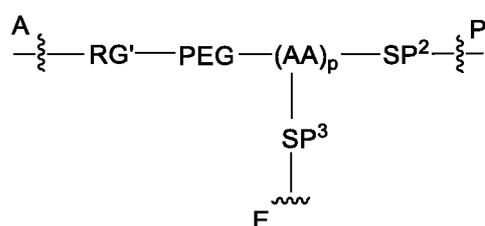


Особенно полезные алкины включают



и

[00156] В некоторых вариантах осуществления линкер -



при этом:

RG' остаток реакционноспособной группы после реакции реакционноспособной группы **RG** со связующим агентом;

PEG представляет собой $\text{---NH---PEG4---C(O)---}$;

SP² представляет собой спейсер;

SP³ представляет собой спейсер, связанный с одним остатком **AA** у $(\text{AA})_p$;

$\begin{array}{l} \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{array} \text{A}$ одна или более связей со связующим агентом;

$\begin{array}{l} \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{array} \text{P}$ одна или более связей с нагрузкой;

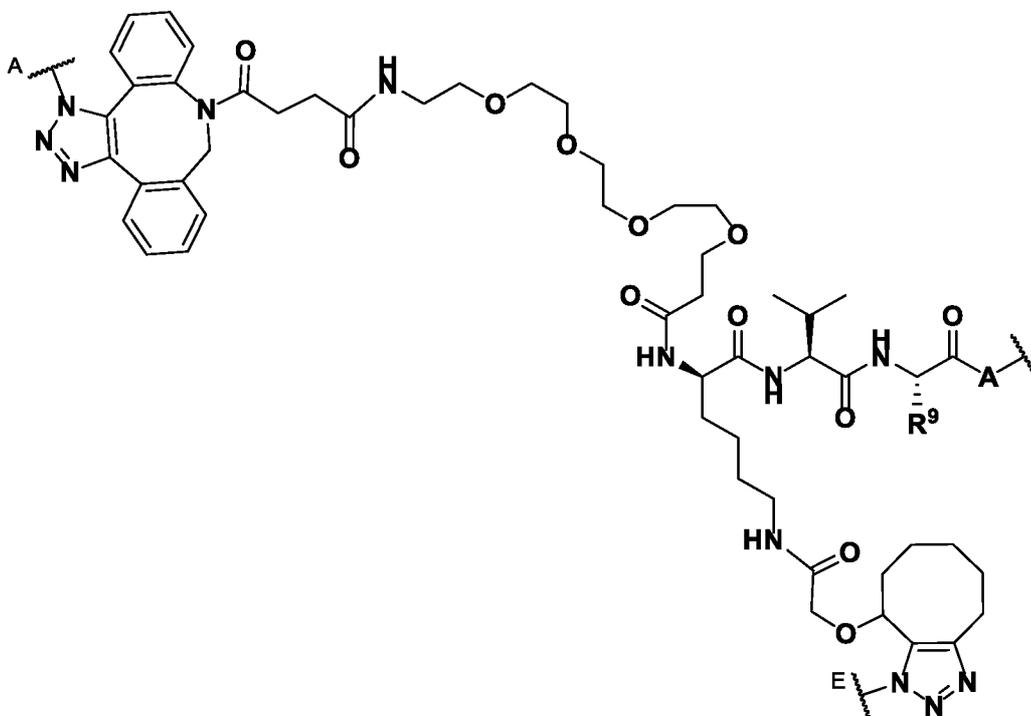
$\begin{array}{l} \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{array} \text{E}$ одна или более связей с усиливающей группой **EG**;

каждый **AA** представляет собой аминокислотный остаток; и

p представляет собой целое число от нуля до десяти.

Как было рассмотрено выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В определенных вариантах осуществления связь со связующим агентом осуществляется через ПЭГ спейсер с глутаминовым остатком связующего агента.

[00157] В определенных вариантах осуществления линкер -



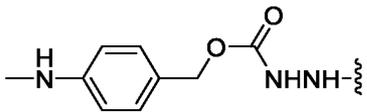
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или смесь его региоизомеров, при этом:

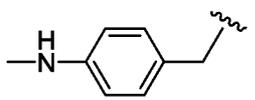
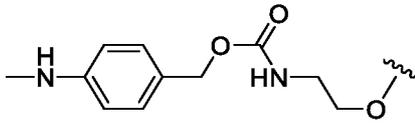
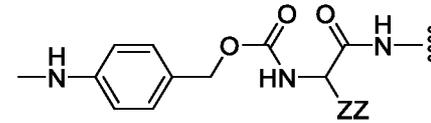
каждая  представляет собой связь с модифицированным трансклутаминой связующим агентом;

каждая  представляет собой связь с нагрузкой;

каждый  представляет собой связь с усиливающим агентом;

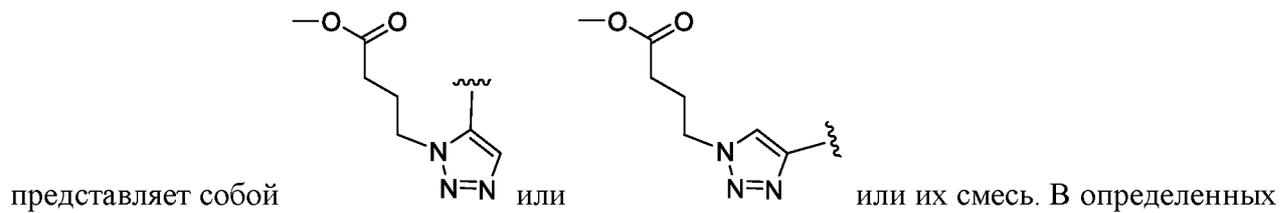
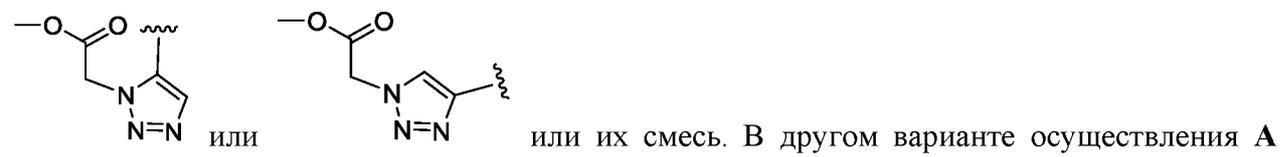
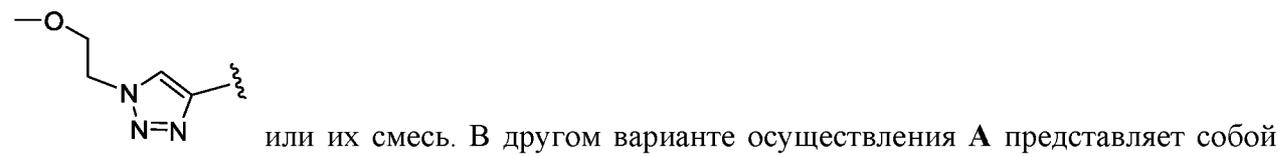
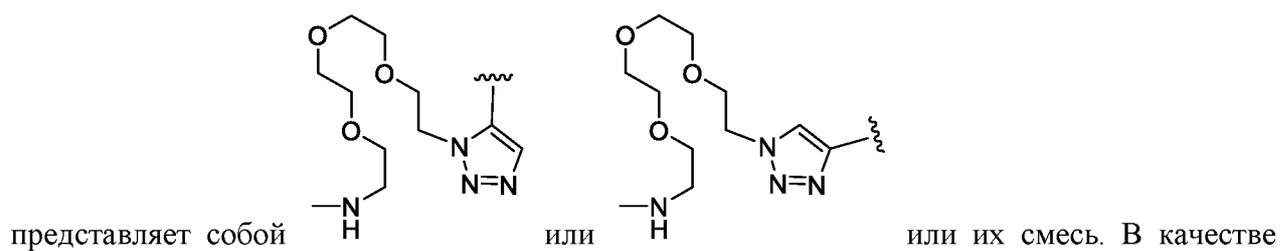
каждая R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждая **A** представляет собой $-O-$, $-N(H)-$, ,

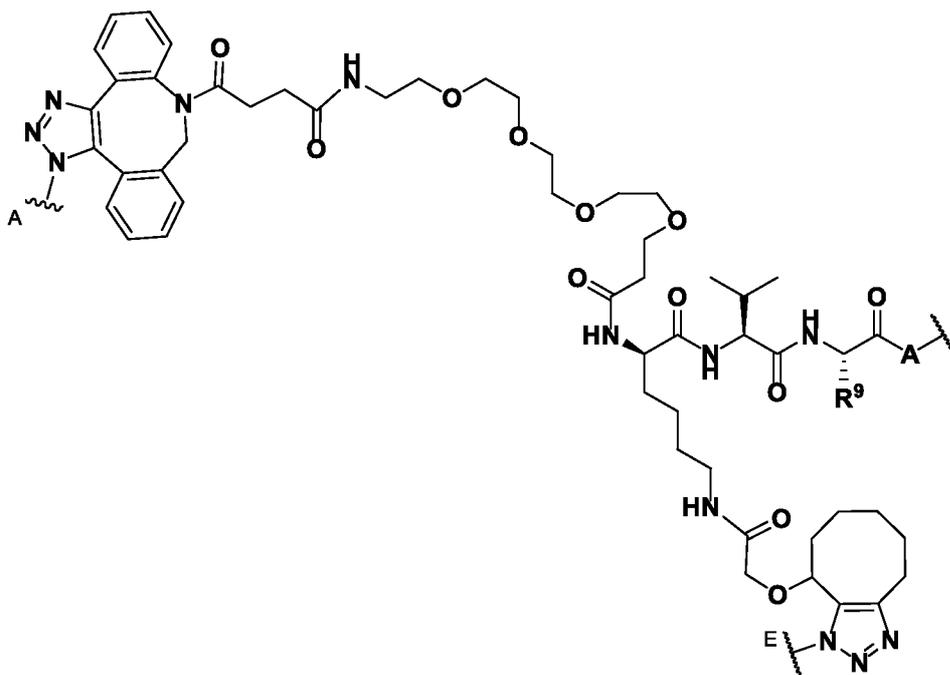
,  или , где

ZZ представляет собой или боковая цепь для аминокислоты, что рассмотрено в настоящем

документе. Например, в одном варианте осуществления **ZZ** представляет собой C₁₋₆ алкил. В качестве дальнейшего примера, в одном варианте осуществления **ZZ** представляет собой C₁₋₆ гетероалкил. В конкретных вариантах осуществления данного пункта **A** можно получить от первичного аминного соединения или его остатка, где **X** представляет собой –N₃, что рассмотрено в настоящем документе. В этих вариантах осуществления 1,2,3-триазольный остаток получают от азидо после участия в реакции клик-химии, что описано в настоящем документе, с алкином или концевым ацетиленом описанного здесь соединения или нагрузки. Соответственно, в одном неограничивающем примере **A**

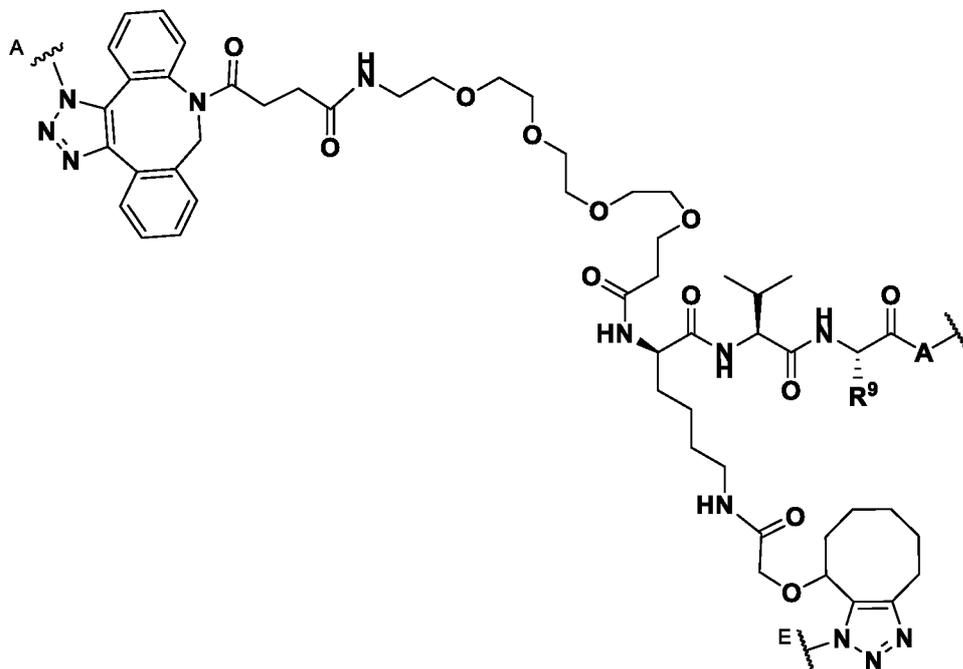


вариантах осуществления 1,3-циклоприсоединение или региоизомеры SPAAC, или смесь региоизомеров получают от PEG-N₃ -derivatизированных антител, на которых воздействовали подходящими алкинами. Например, в одном варианте осуществления линкер представляет собой



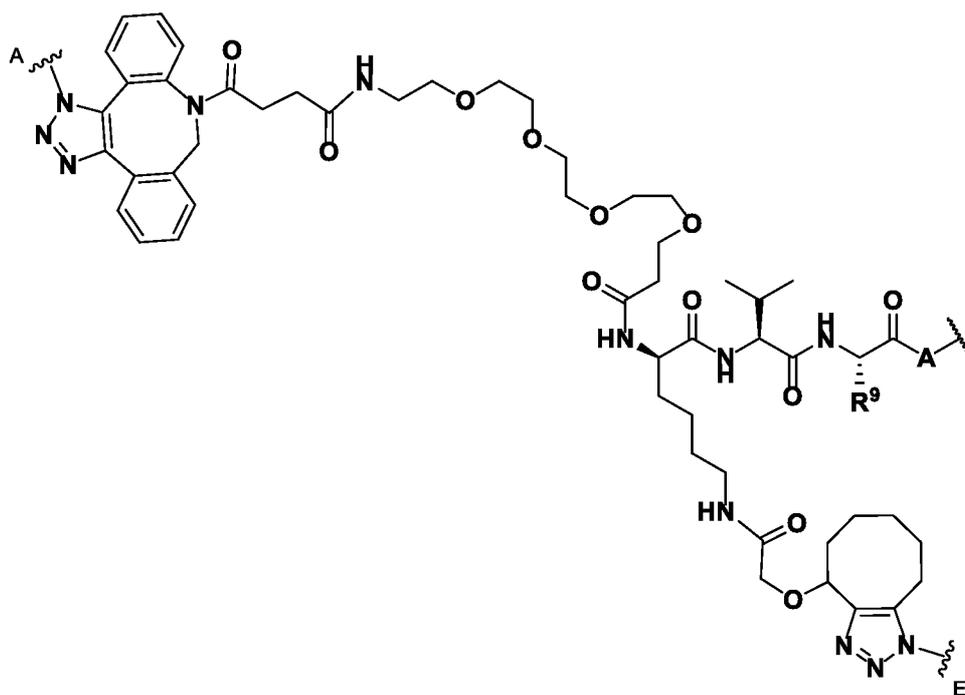
или его

фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или региоизомер, или смесь региоизомеров. В качестве следующего примера, в одном варианте осуществления линкер -



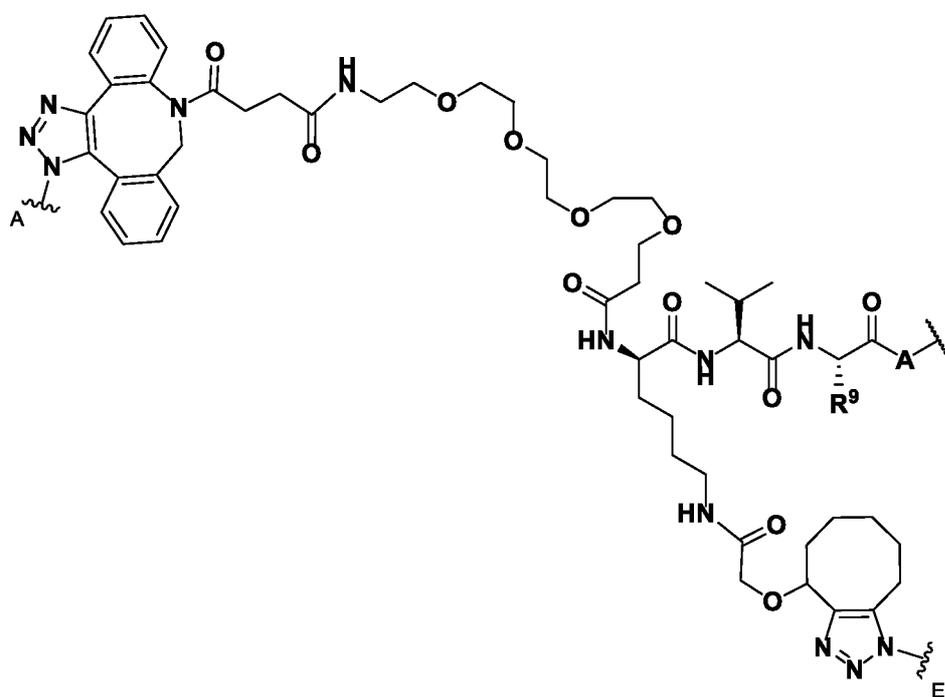
или его

фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или смесь его региоизомеров. В качестве следующего примера линкер



представляет собой

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или региоизомер, или смесь региоизомеров. В качестве следующего примера, в одном варианте осуществления линкер представляет собой



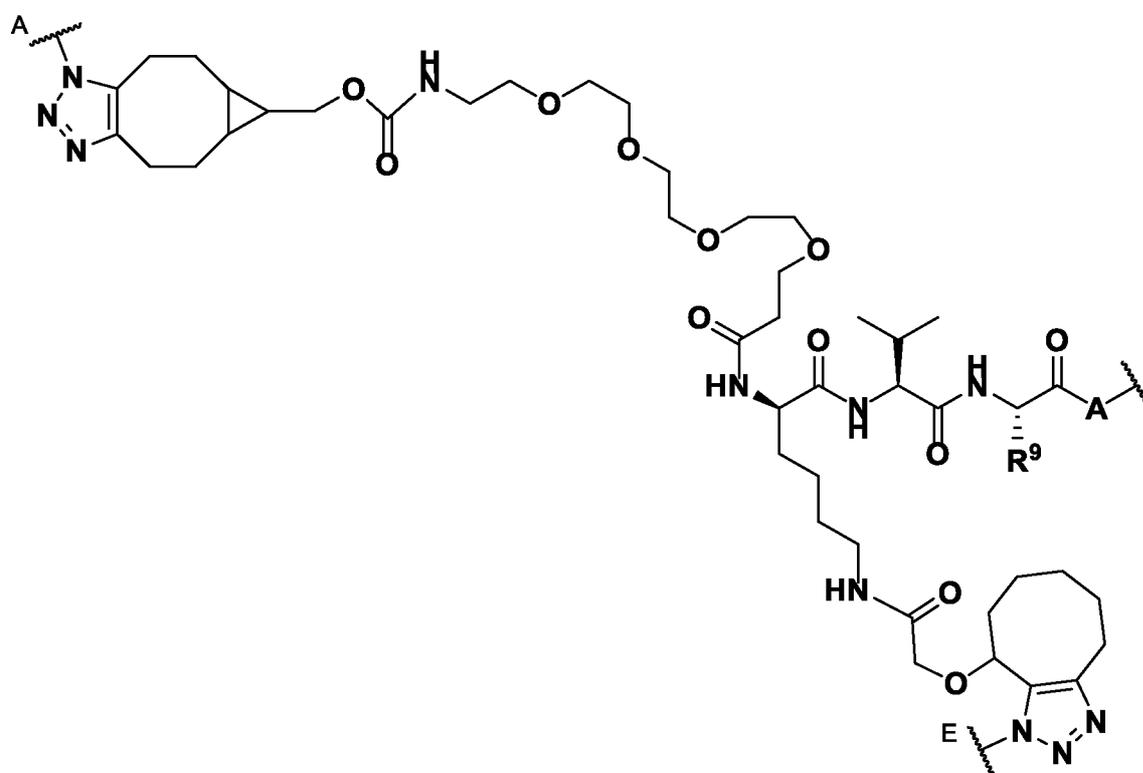
или его

фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или региоизомер, или смесь региоизомеров. Как было рассмотрено выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В определенных вариантах осуществления связь со связующим агентом осуществляется через ПЭГ спейсер с глутаминовым остатком связующего агента. В определенных вариантах осуществления усиливающий агент

представляет собой гидрофильная группа. В определенных вариантах осуществления усиливающий агент является циклодекстрином. В определенных вариантах осуществления усиливающей группой является алкил, гетероалкил, алкиленил, гетероалкиленил-сульфоновая кислота, гетероалкиленилтаурин, гетероалкиленил-фосфорная кислота или фосфат, гетероалкилениламин (например, четвертичный амин) или гетероалкиленильный сахар. В определенных вариантах осуществления сахара включают, помимо прочего, 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, также включая конъюгированные формы, такие как глюкурониды (т.е. посредством глюкуронирования). Примеры дисахаридов включают мальтозу, сахарозу, лактозу, лактулозу, трегалозу и подобные. Примеры полисахаридов включают амилозу, амилопектин, гликоген, инулин, целлюлозу и подобные. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалисту в данной области. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа циклодекстрин, бета циклодекстрин или гамма циклодекстрин или их смеси. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой бета циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой гамма циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_n-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2CH_2O)_m-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_n-N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, $-(CH_2)_n-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$ или $-(CH_2CH_2O)_m-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5, и m имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил или алкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1-5}SO_3H$. В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_n-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_m-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где m имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил,

алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(\text{CH}_2)_n-$
 $\text{N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте
 осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота
 представляет собой
 $-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{O})\text{N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В
 другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-
 сульфоновая кислота представляет собой
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{C}(\text{O})\text{N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$, где m имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5.

[00158] В некоторых вариантах осуществления линкер -



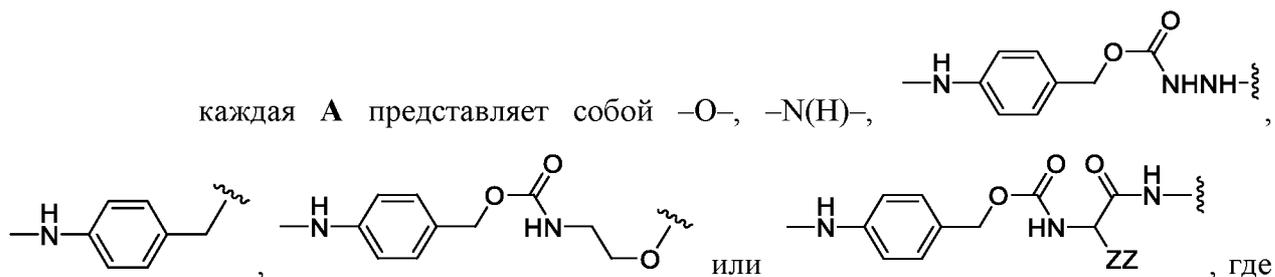
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизмерная форма, или его
 региоизомер, или смесь его региоизомеров, при этом:

каждая $\text{---}\overset{\text{A}}{\text{~}}\text{---}$ представляет собой связь с модифицированным
 трансклутаминой связующим агентом;

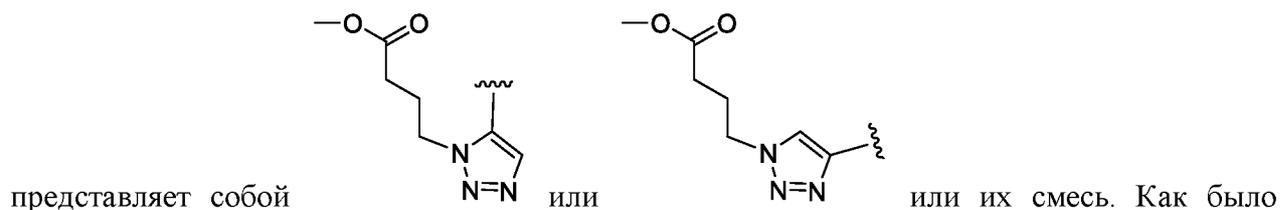
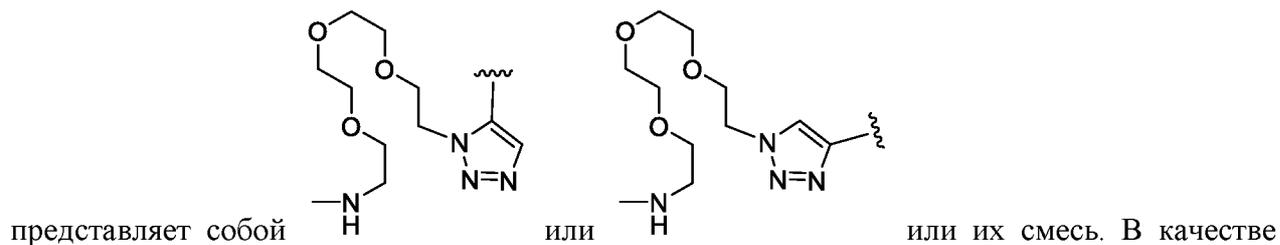
каждый $\text{---}\overset{\text{E}}{\text{~}}\text{---}$ представляет собой связь с усиливающим агентом;

каждая $\text{---}\overset{\text{R}^9}{\text{~}}\text{---}$ представляет собой связь с нагрузкой;

каждая R^9 представляет собой $-\text{CH}_3$ или $-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$; и



ZZ представляет собой или боковая цепь для аминокислоты, что рассмотрено в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дальнейшего примера, в одном варианте осуществления **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил. В конкретных вариантах осуществления данного пункта **A** можно получить от первичного аминного соединения или его остатка, где **X** представляет собой $-N_3$, что рассмотрено в настоящем документе. В этих вариантах осуществления 1,2,3-триазольный остаток получают от азида после участия в реакции клик-химии, что описано в настоящем документе, с алкином или концевым ацетиленом описанного здесь соединения или нагрузки. Соответственно, в одном неограничивающем примере **A**

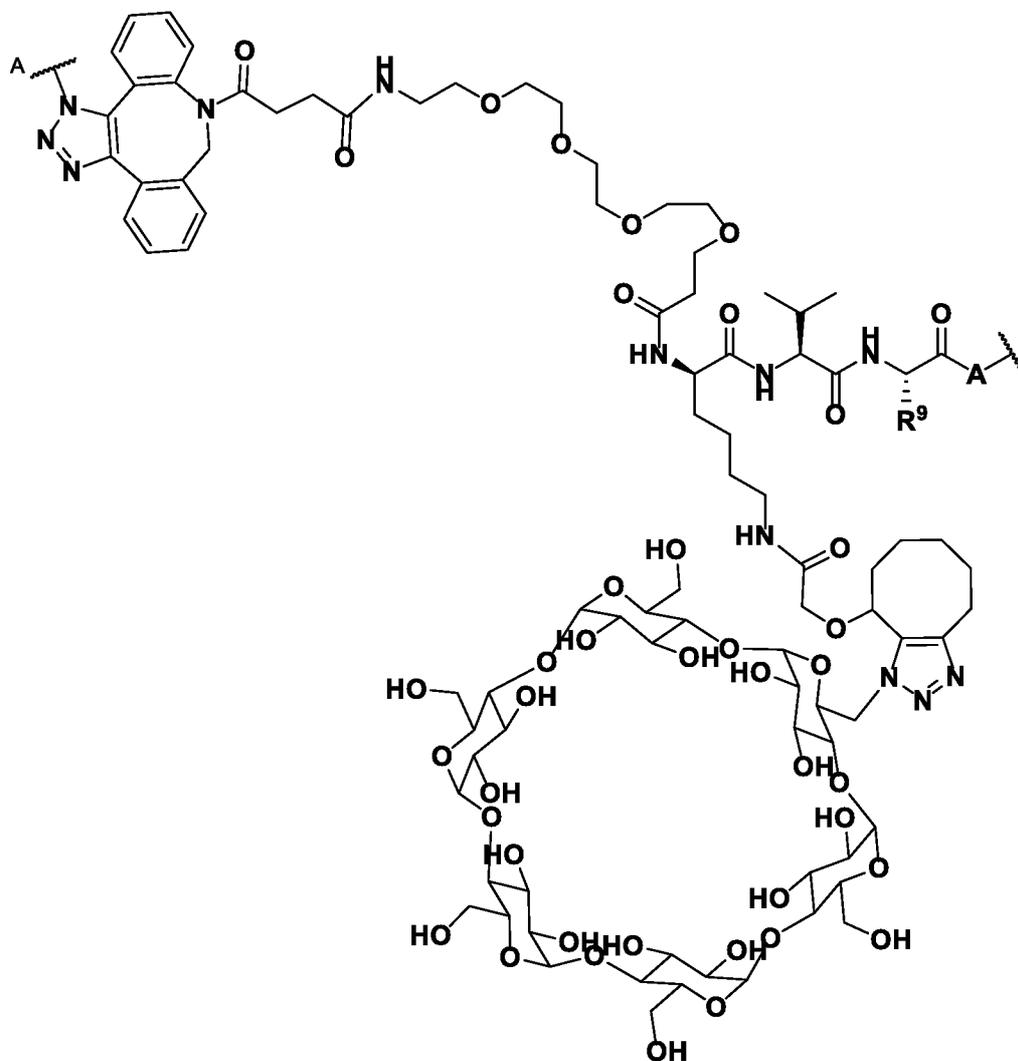


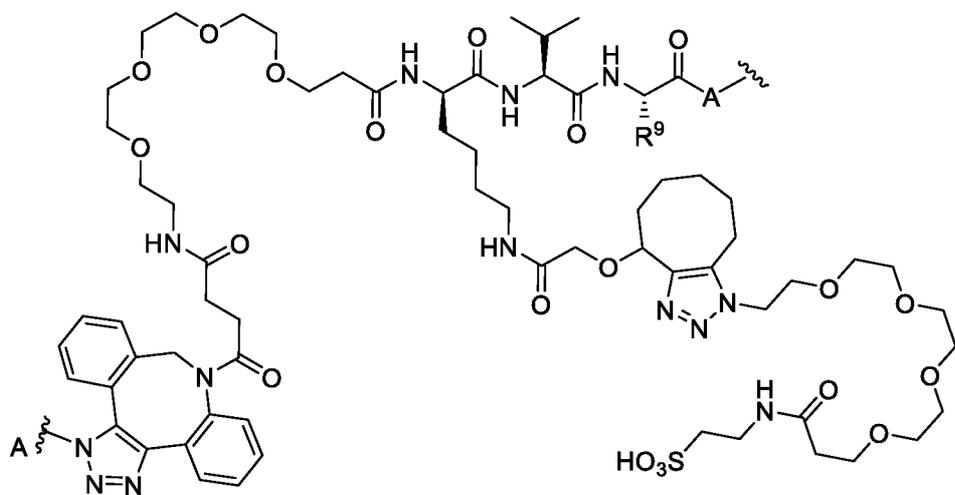
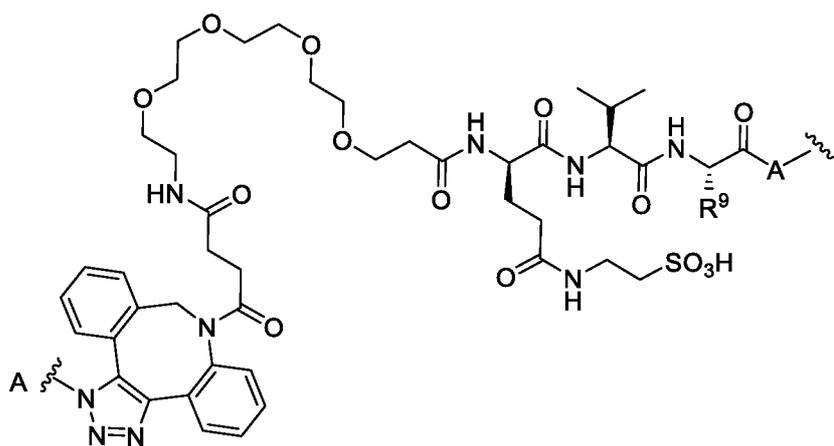
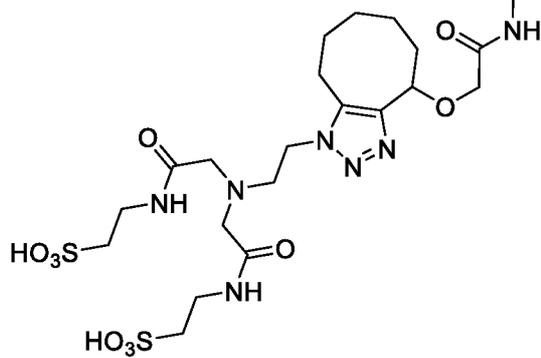
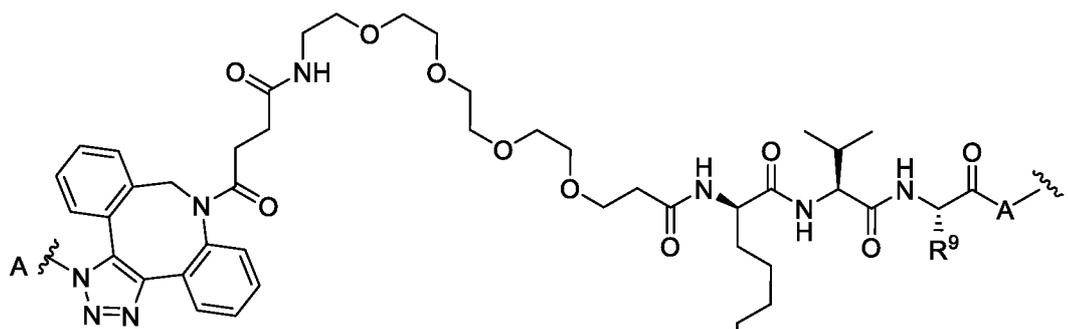
рассмотрено выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В определенных вариантах осуществления связь со связующим агентом осуществляется

через ПЭГ спейсер с глутаминовым остатком связывающего агента. В определенных вариантах осуществления усиливающий агент представляет собой гидрофильная группа. В определенных вариантах осуществления усиливающий агент является циклодекстрином. В определенных вариантах осуществления усиливающей группой является алкил, гетероалкил, алкиленил, гетероалкиленил-сульфоновая кислота, гетероалкиленилтаурин, гетероалкиленил-фосфорная кислота или фосфат, гетероалкилениламин (например, четвертичный амин) или гетероалкиленильный сахар. В определенных вариантах осуществления сахара включают, помимо прочего, моносахариды, дисахариды и полисахариды. Примеры моносахаридов включают глюкозу, рибозу, деоксирибозу, ксилозу, арабинозу, маннозу, галактозу, фруктозу и подобные. В определенных вариантах осуществления сахара включают сахарные кислоты, такие как глюкуроновая кислота, также включая конъюгированные формы, такие как глюкурониды (т.е. посредством глюкуронирования). Примеры дисахаридов включают мальтозу, сахарозу, лактозу, лактулозу, трегалозу и подобные. Примеры полисахаридов включают амилозу, амилопектин, гликоген, инулин, целлюлозу и подобные. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалисту в данной области. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа циклодекстрин, бета циклодекстрин или гамма циклодекстрин или их смеси. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой бета циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой гамма циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_n-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2CH_2O)_m-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_n-N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, $-(CH_2)_n-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$ или $-(CH_2CH_2O)_m-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5, и m имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил или алкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1-5}SO_3H$. В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_n-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-

сульфоновая кислота представляет собой $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H}$, где **m** имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(\text{CH}_2)_n-\text{N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$, где **n** имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{O})\text{N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$, где **n** имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{C}(\text{O})\text{N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$, где **m** имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5.

[00159] В некоторых вариантах осуществления линкер -



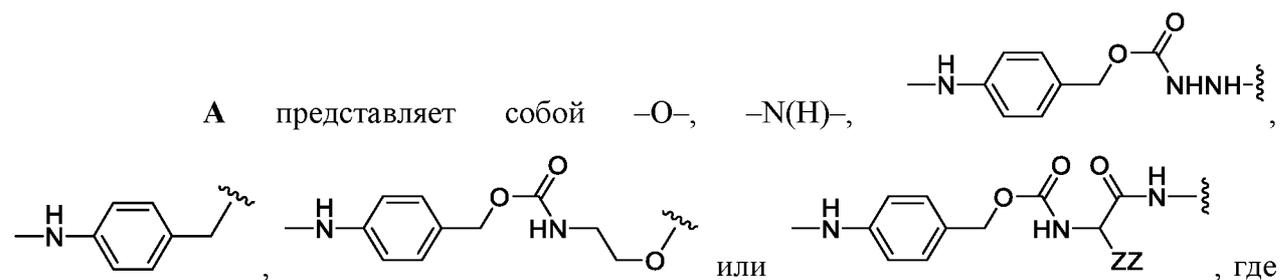


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или смесь его региоизомеров, при этом:

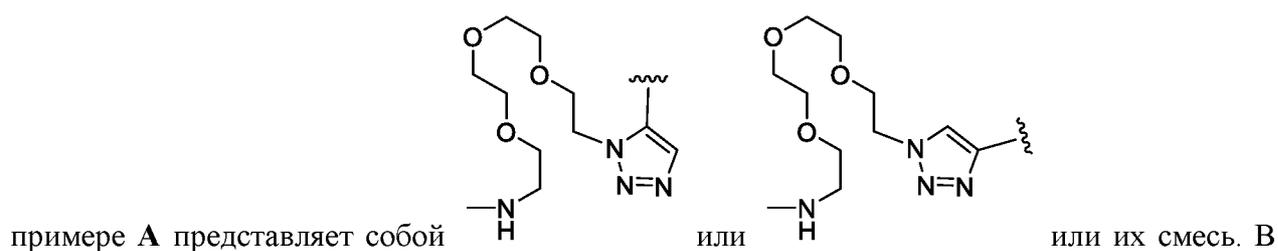
каждая  представляет собой связь с модифицированным трансклутаминой связующим агентом;

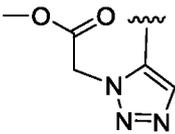
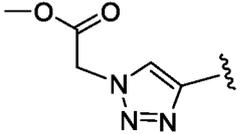
каждая  представляет собой связь с нагрузкой;

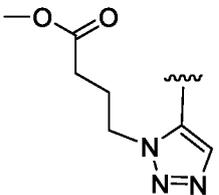
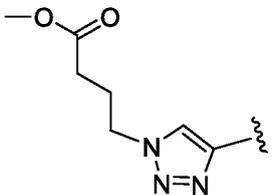
R⁹ представляет собой $-\text{CH}_3$ или $-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$; и



ZZ представляет собой водород или боковая цепь для аминокислоты, что рассмотрено в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дальнейшего примера, в одном варианте осуществления **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил. В конкретных вариантах осуществления данного пункта **A** можно получить от первичного аминного соединения или его остатка, где **X** представляет собой $-\text{N}_3$, что рассмотрено в настоящем документе. В этих вариантах осуществления 1,2,3-триазольный остаток получают от азида после участия в реакции клик-химии, что описано в настоящем документе, с алкином или концевым ацетиленом описанного здесь соединения или нагрузки. Соответственно, в одном неограничивающем

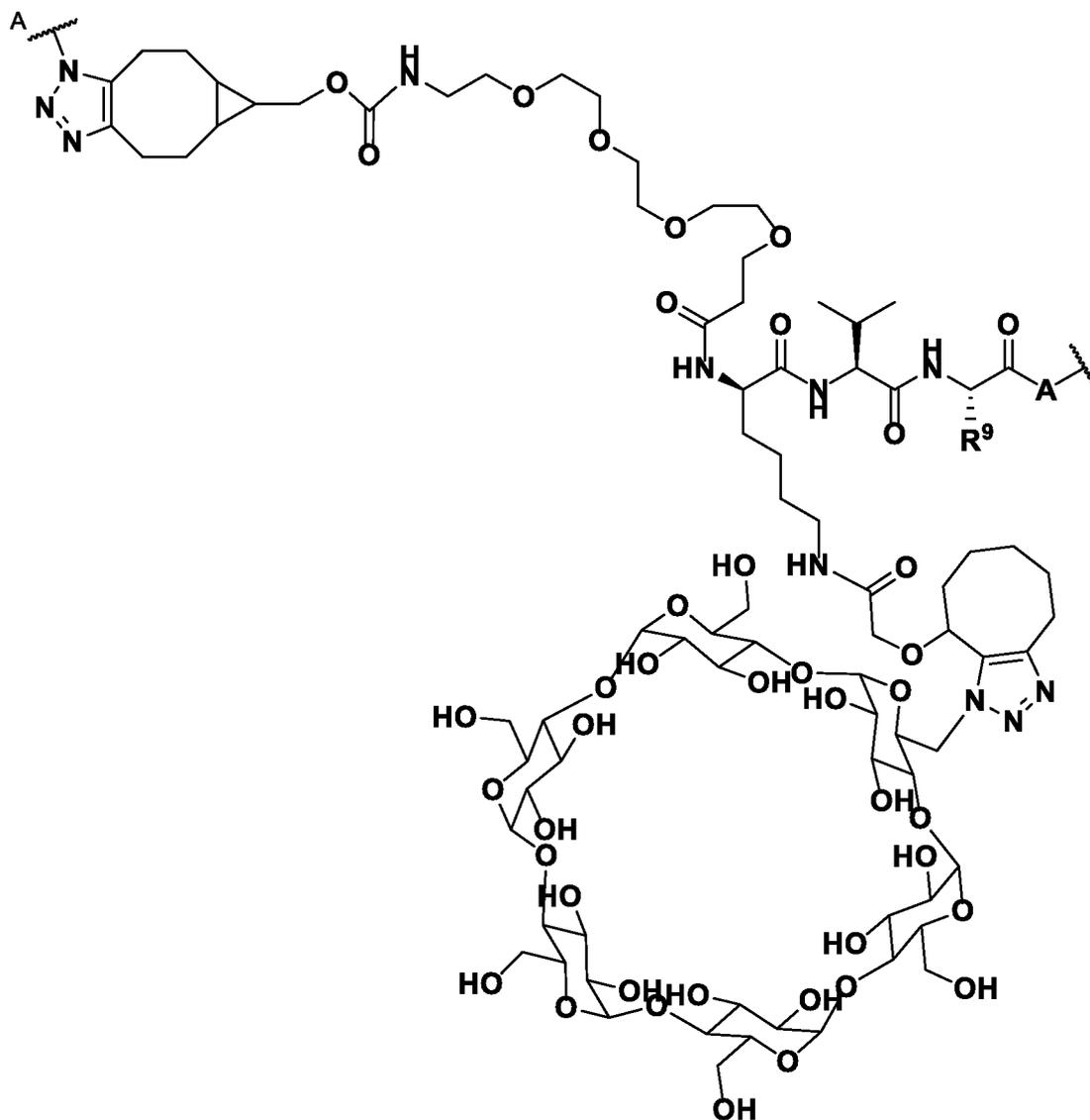


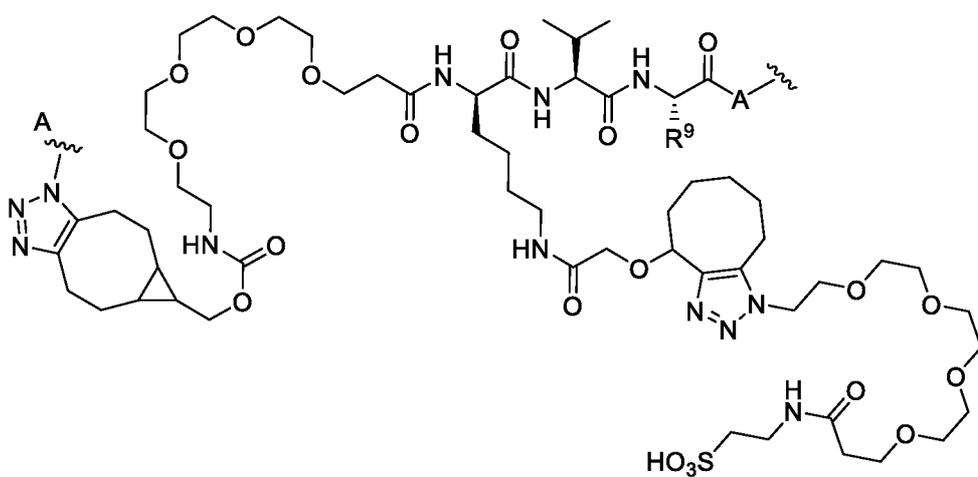
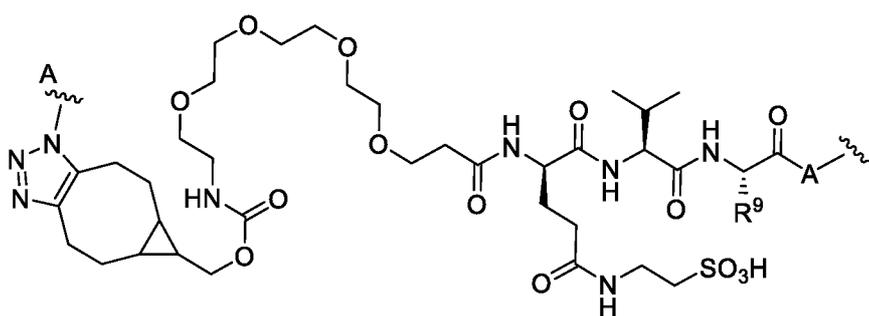
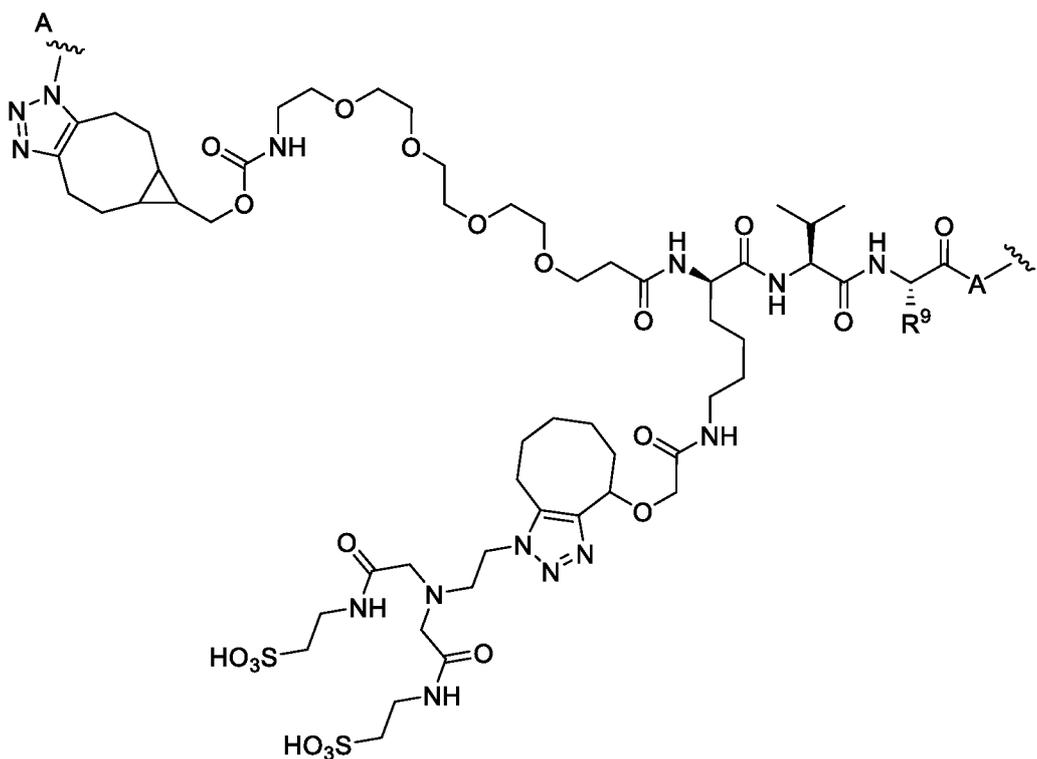
с собой  или  или их смесь. В другом варианте осуществления

A представляет собой  или  или их смесь. Как было

рассмотрено выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В определенных вариантах осуществления связь со связующим агентом осуществляется через ПЭГ спейсер с глутаминовым остатком связующего агента.

[00160] В некоторых вариантах осуществления линкер –



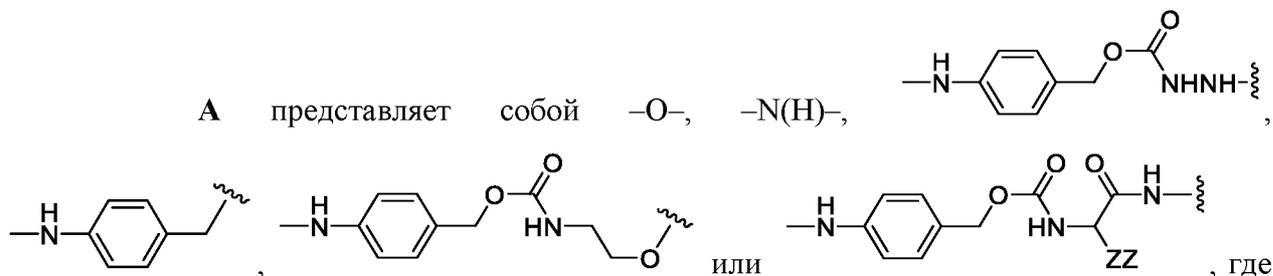


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или смесь его региоизомеров, при этом:

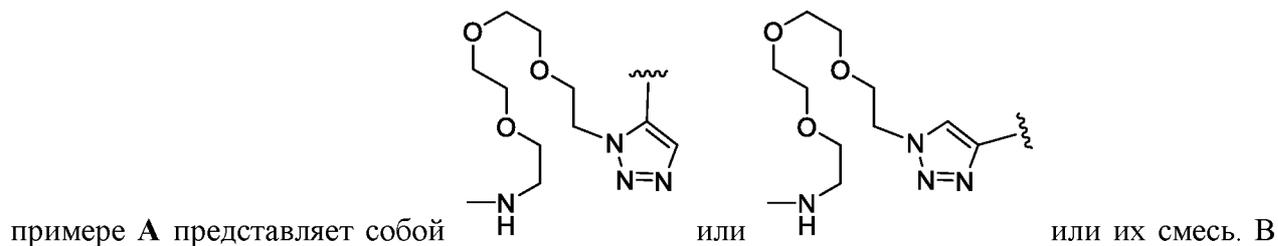
каждая  представляет собой связь с модифицированным транглутаминой связующим агентом;

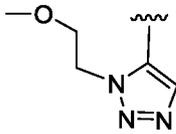
каждая  представляет собой связь с нагрузкой;

R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

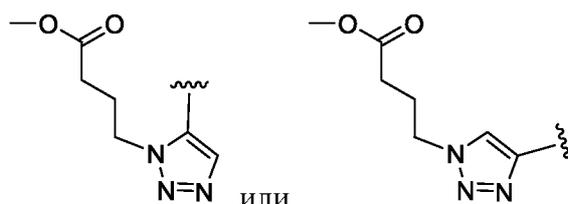


ZZ представляет собой водород или боковая цепь для аминокислоты, что рассмотрено в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления ZZ представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дальнейшего примера, в одном варианте осуществления ZZ представляет собой C_{1-6} гетероалкил. В конкретных вариантах осуществления данного пункта A можно получить от первичного аминного соединения или его остатка, где X представляет собой $-N_3$, что рассмотрено в настоящем документе. В этих вариантах осуществления 1,2,3-триазольный остаток получают от азиды после участия в реакции клик-химии, что описано в настоящем документе, с алкином или концевым ацетиленом описанного здесь соединения или нагрузки. Соответственно, в одном неограничивающем



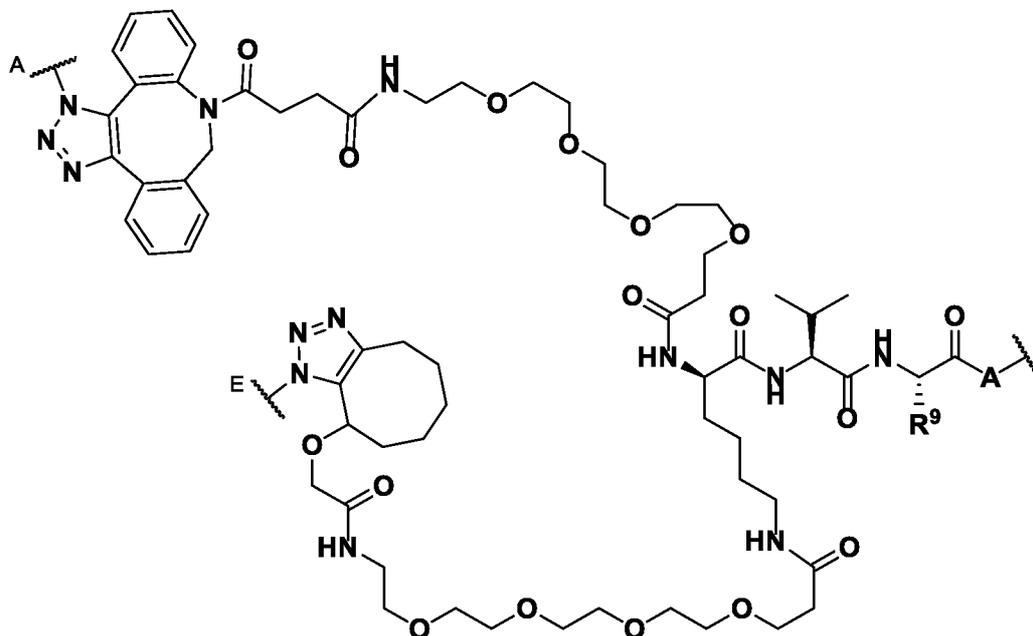
качестве варианта, в другом варианте осуществления A представляет собой 





A представляет собой или или их смесь. Как было рассмотрено выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В определенных вариантах осуществления связь со связующим агентом осуществляется через ПЭГ спейсер с глутаминовым остатком связующего агента.

[00161] В некоторых вариантах осуществления линкер -



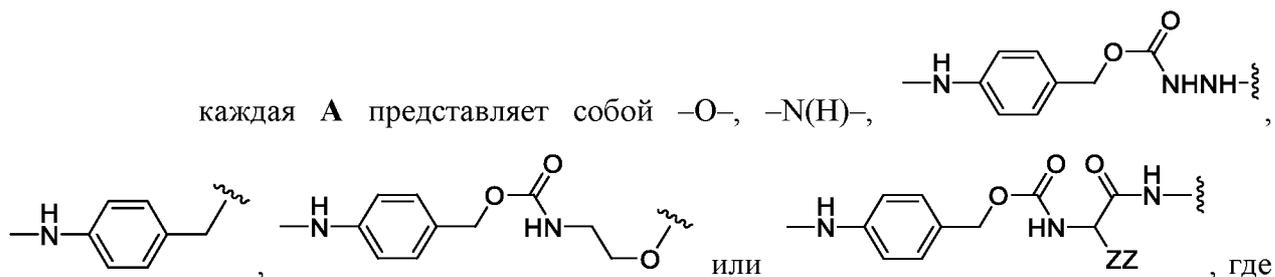
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или смесь его региоизомеров, при этом:

каждая  представляет собой связь с модифицированным трансглутаминазой связующим агентом;

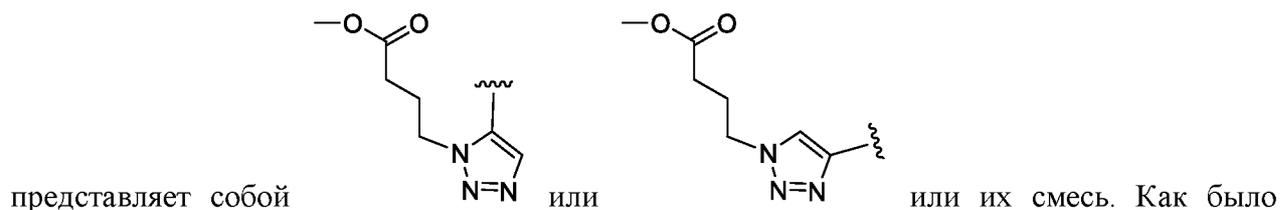
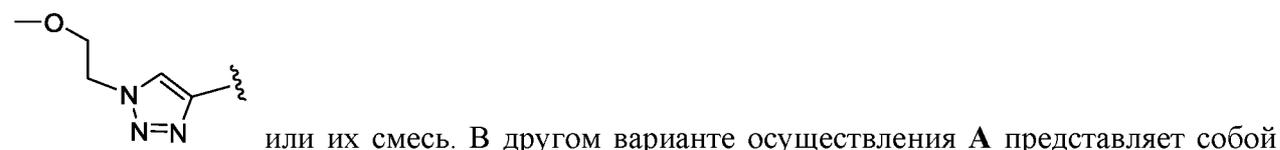
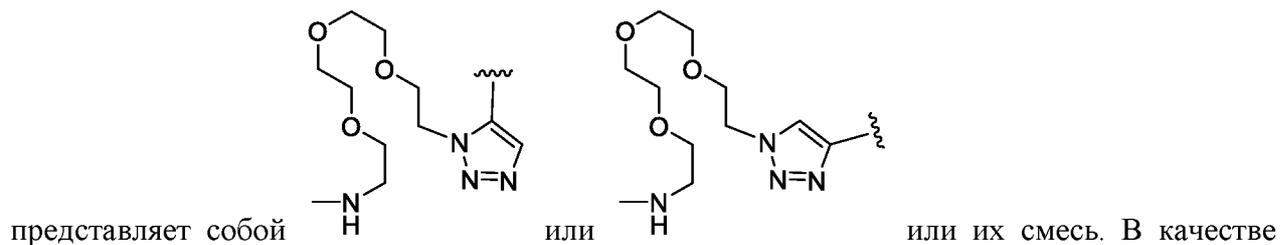
каждая  представляет собой связь с нагрузкой;

каждый  представляет собой связь с усиливающей группой;

каждая **R⁹** представляет собой $-\text{CH}_3$ или $-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$; и



ZZ представляет собой или боковая цепь для аминокислоты, что рассмотрено в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дальнейшего примера, в одном варианте осуществления **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил. В конкретных вариантах осуществления данного пункта **A** можно получить от первичного аминного соединения или его остатка, где **X** представляет собой $-N_3$, что рассмотрено в настоящем документе. В этих вариантах осуществления 1,2,3-триазольный остаток получают от азиды после участия в реакции клик-химии, что описано в настоящем документе, с алкином или концевым ацетиленом описанного здесь соединения или нагрузки. Соответственно, в одном неограничивающем примере **A**

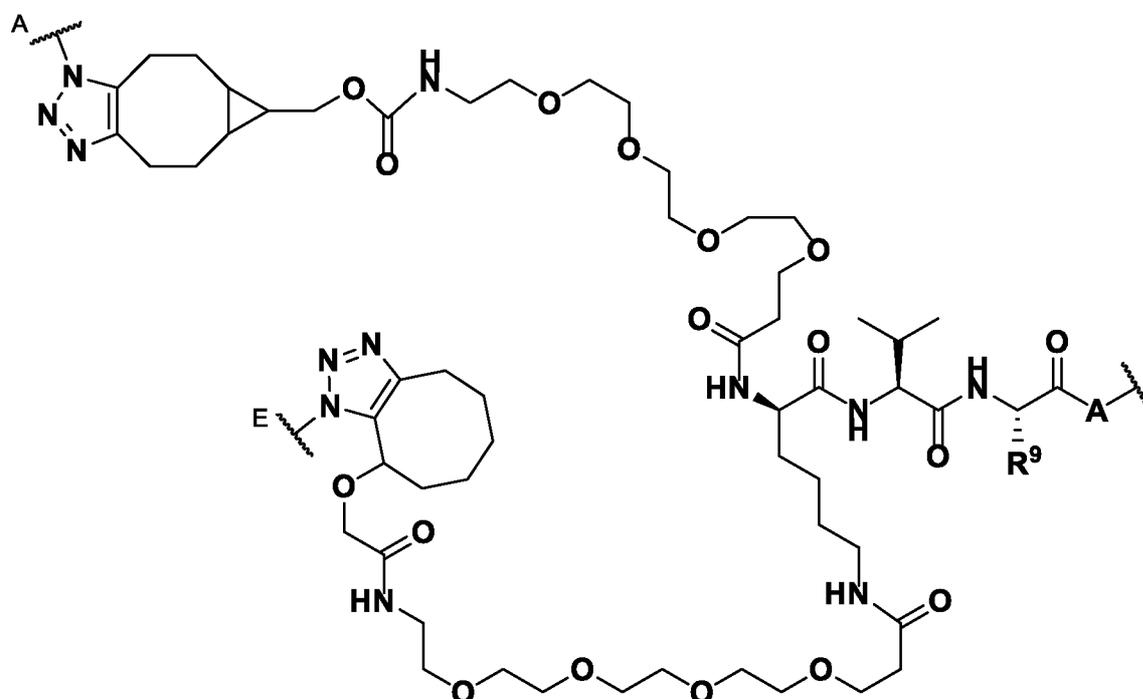


рассмотрено выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В определенных вариантах осуществления связь со связующим агентом осуществляется

через ПЭГ спейсер с глутаминовым остатком связывающего агента. В определенных вариантах осуществления усиливающий агент представляет собой гидрофильная группа. В определенных вариантах осуществления усиливающий агент является циклодекстрином. В определенных вариантах осуществления усиливающей группой является алкил, гетероалкил, алкиленил, гетероалкиленил-сульфоновая кислота, гетероалкиленилтаурин, гетероалкиленил-фосфорная кислота или фосфат, гетероалкилениламин (например, четвертичный амин) или гетероалкиленильный сахар. В определенных вариантах осуществления сахара включают, помимо прочего, моносахариды, дисахариды и полисахариды. Примеры моносахаридов включают глюкозу, рибозу, деоксирибозу, ксилозу, арабинозу, маннозу, галактозу, фруктозу и подобные. В определенных вариантах осуществления сахара включают сахарные кислоты, такие как глюкуроновая кислота, также включая конъюгированные формы, такие как глюкурониды (т.е. посредством глюкуронирования). Примеры дисахаридов включают мальтозу, сахарозу, лактозу, лактулозу, трегалозу и подобные. Примеры полисахаридов включают амилозу, амилопектин, гликоген, инулин, целлюлозу и подобные. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалисту в данной области. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа циклодекстрин, бета циклодекстрин или гамма циклодекстрин или их смеси. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой бета циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой гамма циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_n-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2CH_2O)_m-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_n-N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, $-(CH_2)_n-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$ или $-(CH_2CH_2O)_m-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5, и m имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил или алкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1-5}SO_3H$. В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_n-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-

сульфоновая кислота представляет собой $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H}$, где **m** имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(\text{CH}_2)_n-\text{N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$, где **n** имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{O})\text{N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$, где **n** имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{C}(\text{O})\text{N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$, где **m** имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5.

[00162] В некоторых вариантах осуществления линкер -

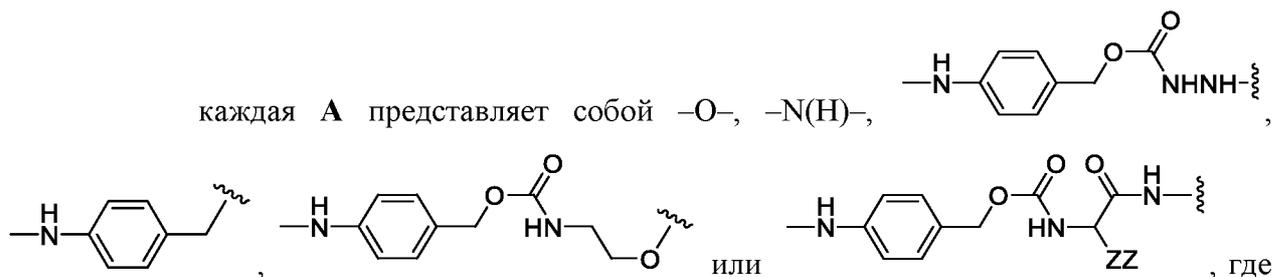


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или смесь его региоизомеров, при этом:

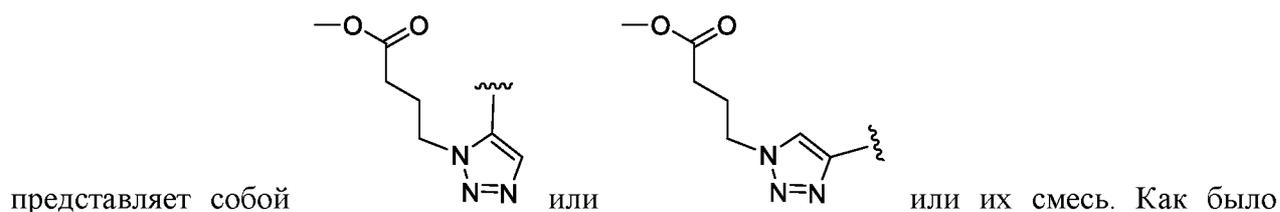
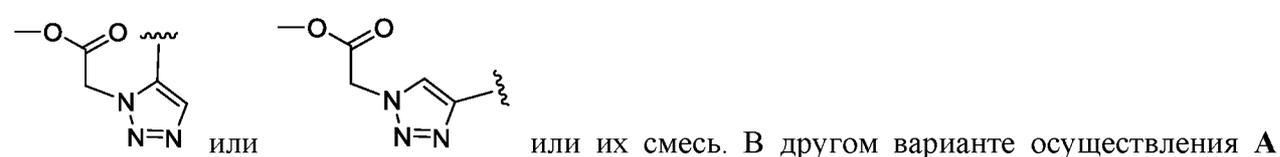
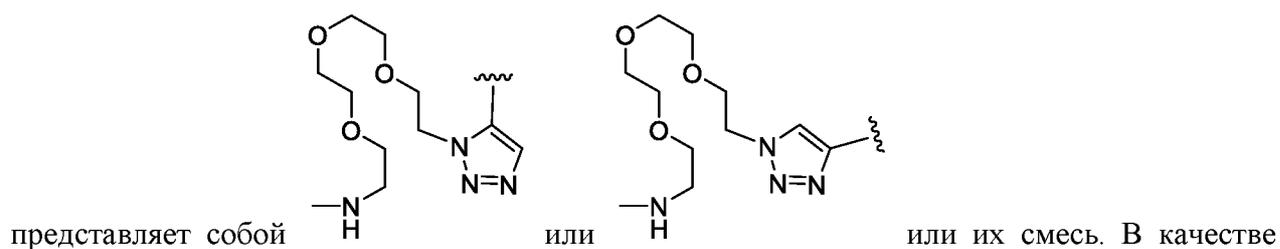
каждая $\text{---}\overset{\text{A}}{\text{~}}\text{---}$ представляет собой связь с модифицированным трансклутаминой связующим агентом;

каждая $\text{---}\overset{\text{E}}{\text{~}}\text{---}$ представляет собой связь с нагрузкой;

каждая **R⁹** представляет собой $-\text{CH}_3$ или $-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$; и



ZZ представляет собой или боковая цепь для аминокислоты, что рассмотрено в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дальнейшего примера, в одном варианте осуществления **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил. В конкретных вариантах осуществления данного пункта **A** можно получить от первичного аминного соединения или его остатка, где **X** представляет собой $-N_3$, что рассмотрено в настоящем документе. В этих вариантах осуществления 1,2,3-триазольный остаток получают от азида после участия в реакции клик-химии, что описано в настоящем документе, с алкином или концевым ацетиленом описанного здесь соединения или нагрузки. Соответственно, в одном неограничивающем примере **A**

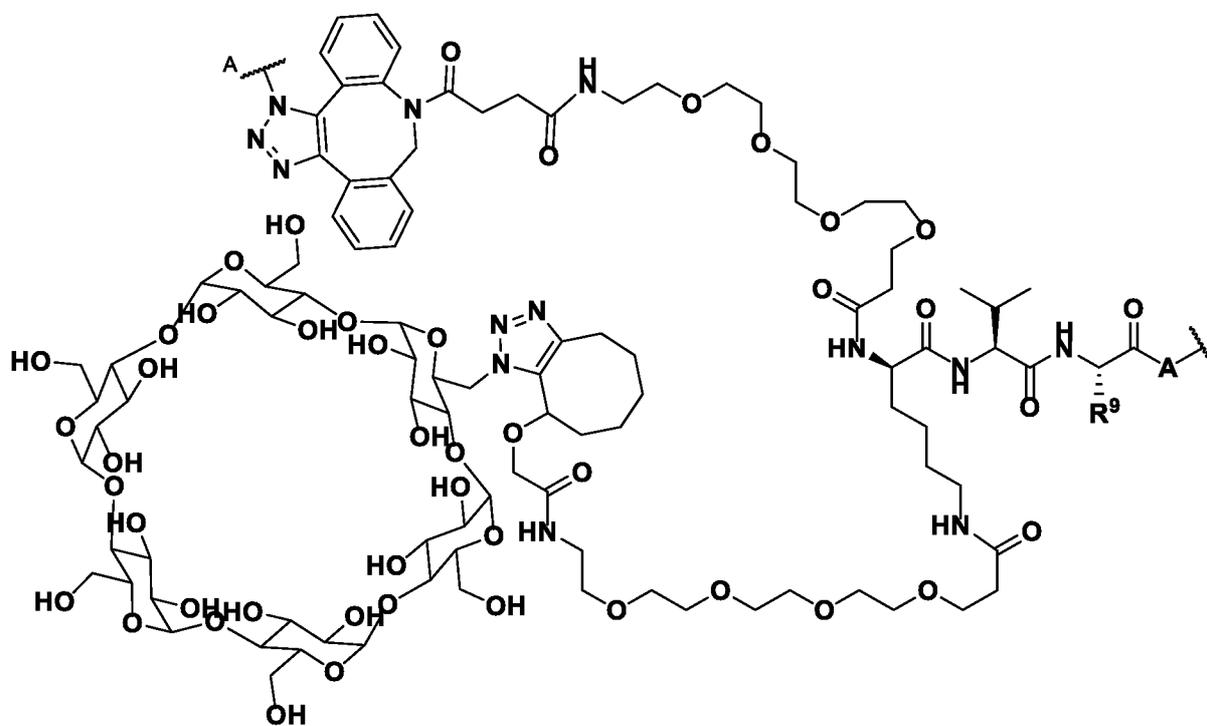


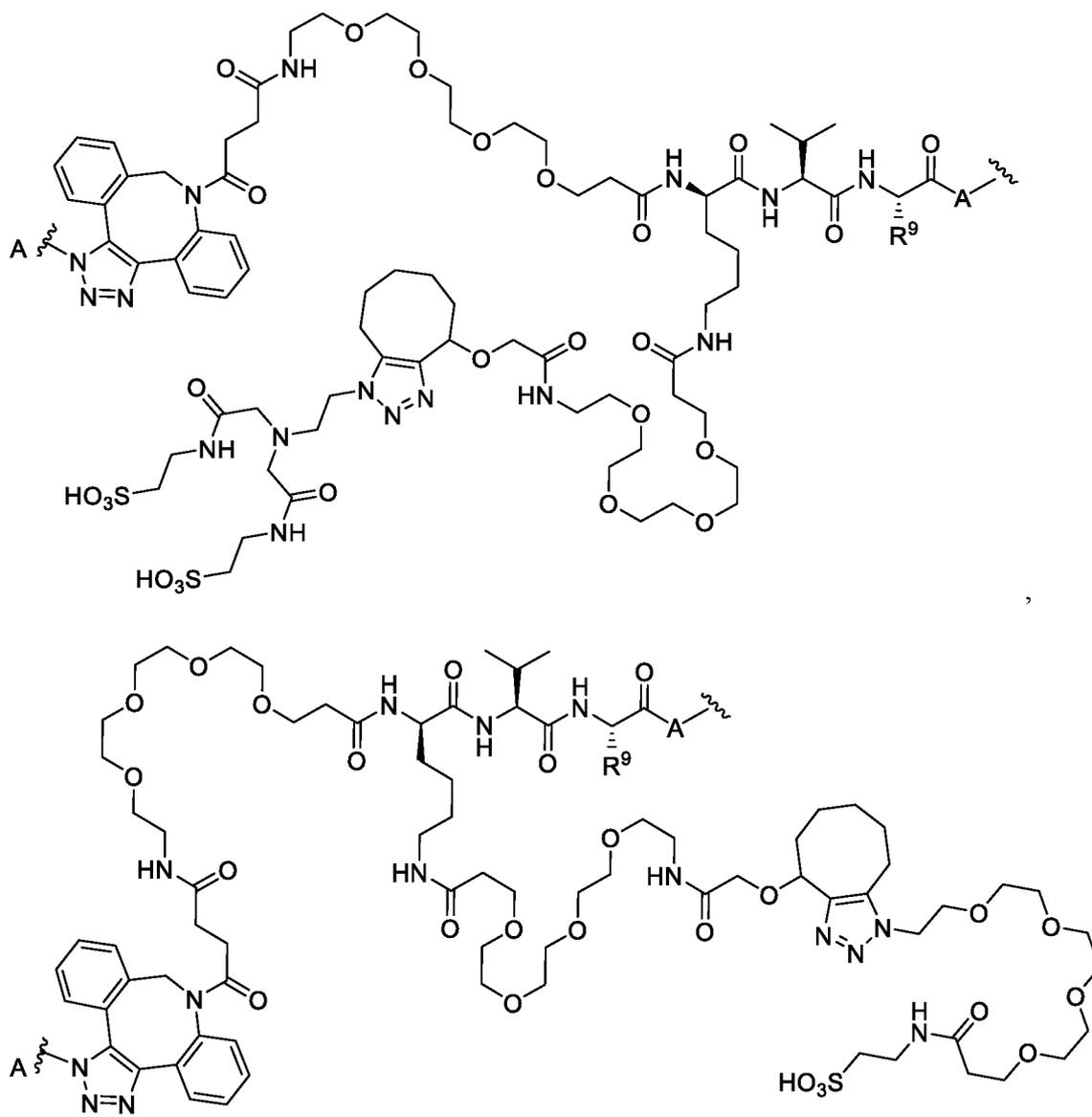
рассмотрено выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В определенных вариантах осуществления связь со связующим агентом осуществляется

через ПЭГ спейсер с глутаминовым остатком связывающего агента. В определенных вариантах осуществления усиливающий агент представляет собой гидрофильная группа. В определенных вариантах осуществления усиливающий агент является циклодекстрином. В определенных вариантах осуществления усиливающей группой является алкил, гетероалкил, алкиленил, гетероалкиленил-сульфоновая кислота, гетероалкиленилтаурин, гетероалкиленил-фосфорная кислота или фосфат, гетероалкилениламин (например, четвертичный амин) или гетероалкиленильный сахар. В определенных вариантах осуществления сахара включают, помимо прочего, моносахариды, дисахариды и полисахариды. Примеры моносахаридов включают глюкозу, рибозу, деоксирибозу, ксилозу, арабинозу, маннозу, галактозу, фруктозу и подобные. В определенных вариантах осуществления сахара включают сахарные кислоты, такие как глюкуроновая кислота, также включая конъюгированные формы, такие как глюкурониды (т.е. посредством глюкуронирования). Примеры дисахаридов включают мальтозу, сахарозу, лактозу, лактулозу, трегалозу и подобные. Примеры полисахаридов включают амилозу, амилопектин, гликоген, инулин, целлюлозу и подобные. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалисту в данной области. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа циклодекстрин, бета циклодекстрин или гамма циклодекстрин или их смеси. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой бета циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой гамма циклодекстрин. В определенных вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_n-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2CH_2O)_m-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_n-N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, $-(CH_2)_n-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$ или $-(CH_2CH_2O)_m-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5, и m имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил или алкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1-5}SO_3H$. В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_n-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где n имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-

сульфоновая кислота представляет собой $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H}$, где **m** имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(\text{CH}_2)_n-\text{N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$, где **n** имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{O})\text{N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$, где **n** имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленил-сульфоновая кислота представляет собой $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{C}(\text{O})\text{N}((\text{CH}_2)_{1-5}\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_{1-5}\text{SO}_3\text{H})_2$, где **m** имеет значение 1, 2, 3, 4 или 5.

[00163] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой



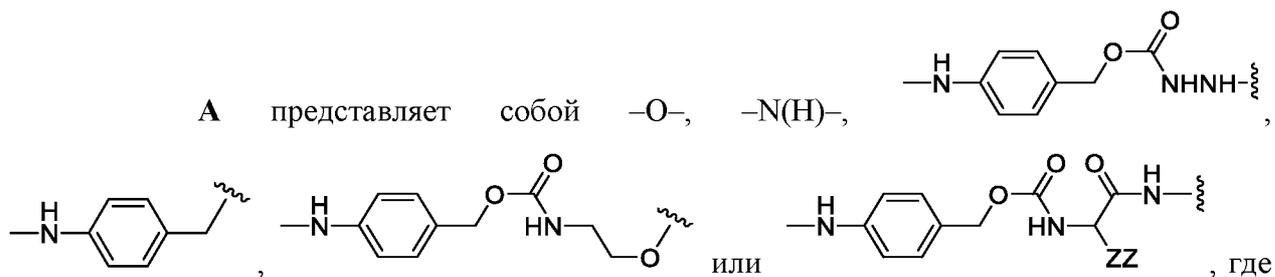


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или смесь его региоизомеров, при этом:

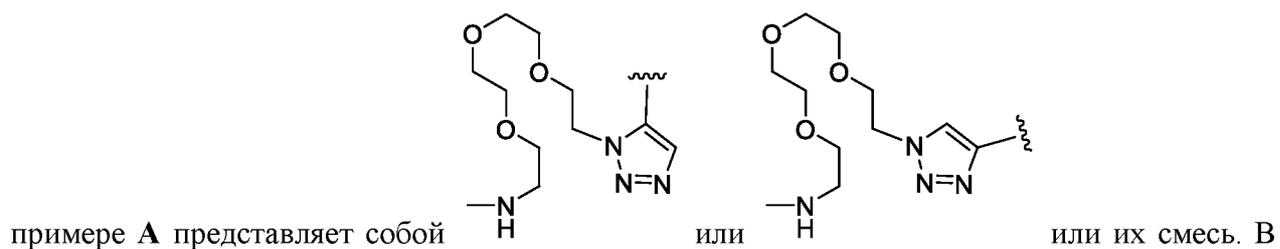
каждая $\overset{A}{\sim}$ представляет собой связь с модифицированным трансклутаминой связующим агентом;

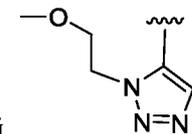
каждая $\overset{B}{\sim}$ представляет собой связь с нагрузкой;

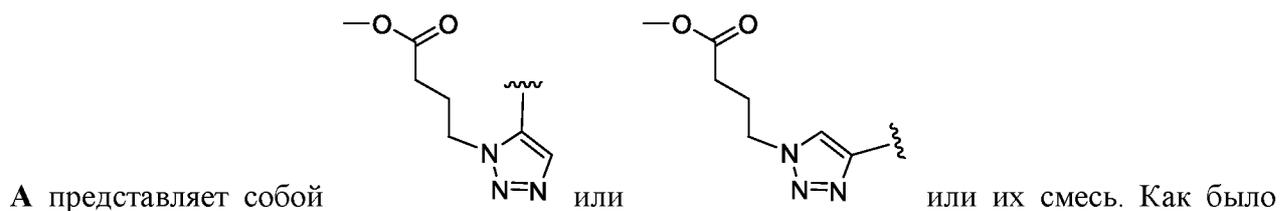
R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и



ZZ представляет собой водород или боковая цепь для аминокислоты, что рассмотрено в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления ZZ представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дальнейшего примера, в одном варианте осуществления ZZ представляет собой C_{1-6} гетероалкил. В конкретных вариантах осуществления данного пункта A можно получить от первичного аминного соединения или его остатка, где X представляет собой $-\text{N}_3$, что рассмотрено в настоящем документе. В этих вариантах осуществления 1,2,3-триазольный остаток получают от азида после участия в реакции клик-химии, что описано в настоящем документе, с алкином или концевым ацетиленом описанного здесь соединения или нагрузки. Соответственно, в одном неограничивающем



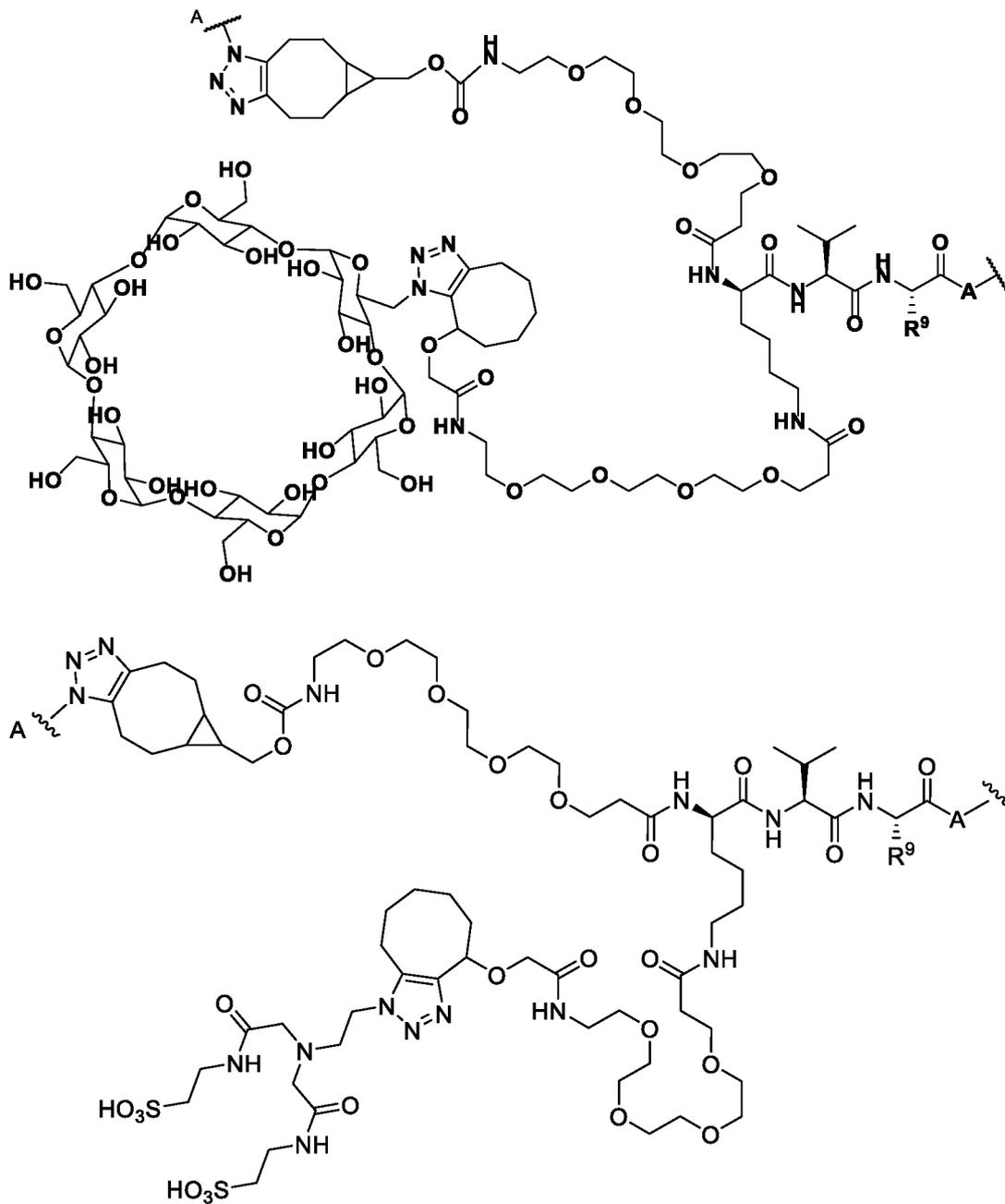
качестве варианта, в другом варианте осуществления A представляет собой 

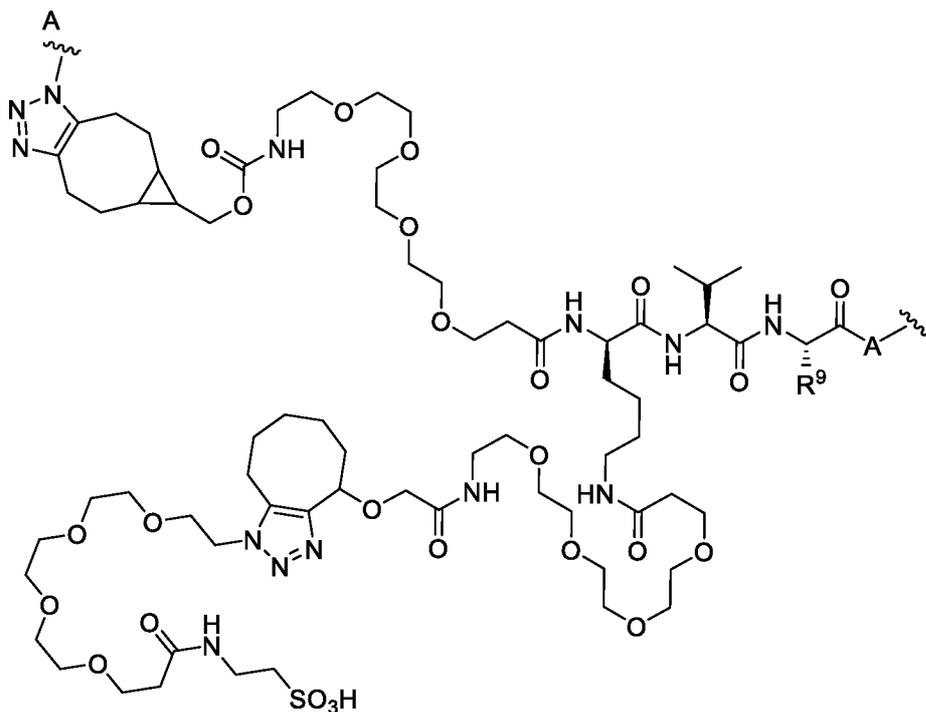


рассмотрено выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В

определенных вариантах осуществления связь со связующим агентом осуществляется через ПЭГ спейсер с глутаминовым остатком связующего агента.

[00164] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой



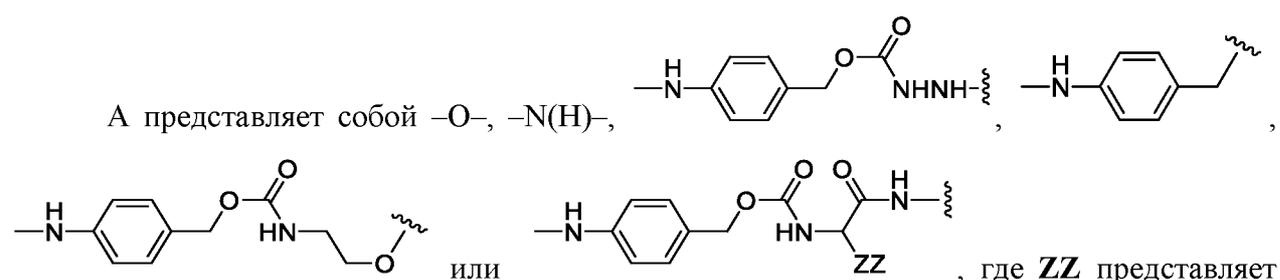


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или смесь его региоизомеров, при этом:

каждая  представляет собой связь с модифицированным трансглутаминой связующим агентом;

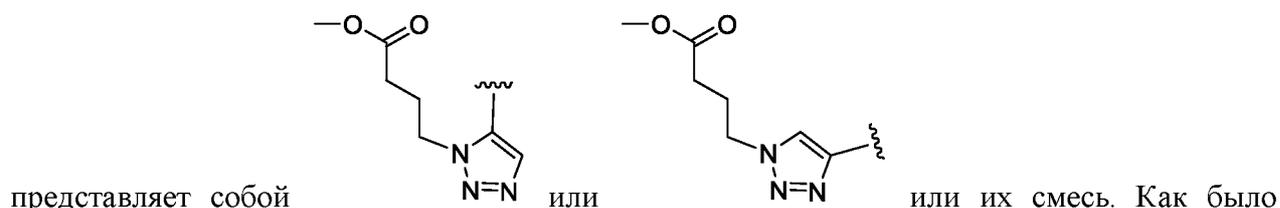
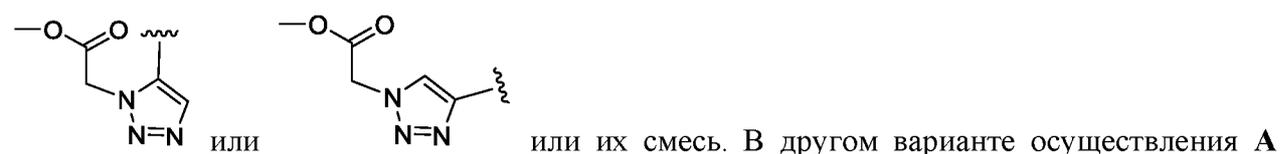
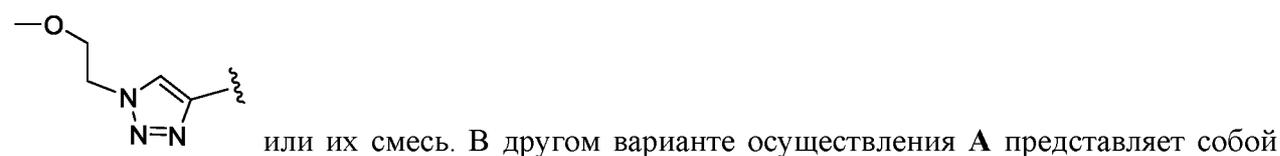
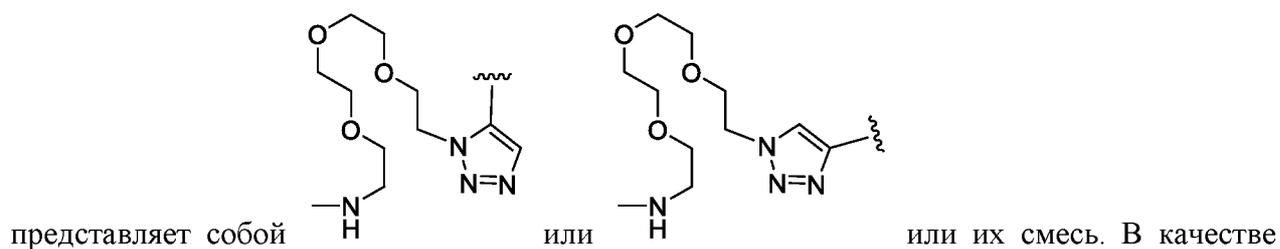
каждая  представляет собой связь с нагрузкой;

R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и



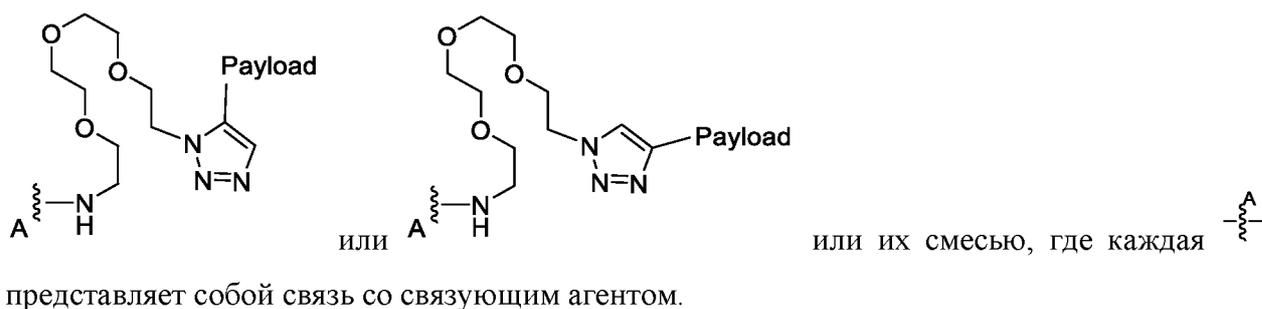
собой водород или боковая цепь для аминокислоты, что рассмотрено в настоящем документе. Например, в одном варианте осуществления **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дальнейшего примера, в одном варианте осуществления **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил. В конкретных вариантах осуществления данного пункта **A** можно получить от первичного аминного соединения или его остатка, где **X** представляет собой $-N_3$, что рассмотрено в настоящем документе. В этих вариантах осуществления 1,2,3-триазольный остаток получают от азиды после участия в реакции клик-химии, что описано

в настоящем документе, с алкином или концевым ацетиленом описанного здесь соединения или нагрузки. Соответственно, в одном неограничивающем примере А



рассмотрено выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В определенных вариантах осуществления связь со связующим агентом осуществляется через ПЭГ спейсер с глутаминовым остатком связующего агента.

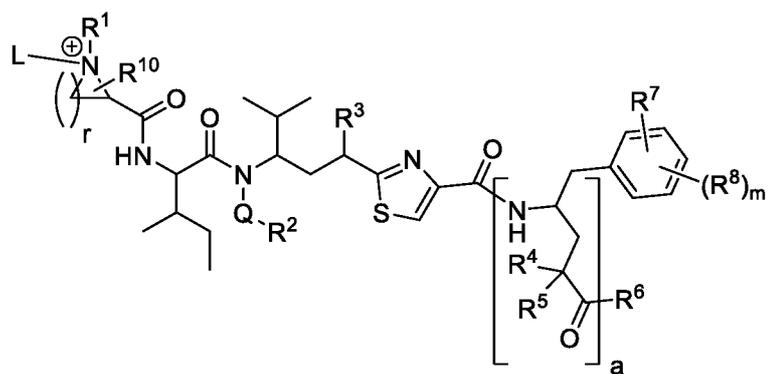
[00165] В конкретных вариантах осуществления описанные здесь соединения, нагрузки или пролекарственные нагрузки с алкином или концевым ацетиленом могут быть связаны со связующим агентом, дериватизированным $-PEG-N_3$, связанным с глутаминовым остатком (т.е. модифицированным трансглутаминазой связующим агентом). Здесь представлены примеры $-N_3$ -дериватизированных связующих агентов (т.е. модифицированных трансглутаминазой связующих агентов), способы их приготовления и способы их использования. В определенных вариантах осуществления описанное здесь соединение или нагрузка с алкином, подходящие для участия в 1,3-циклоприсоединениях со связующими агентами, дериватизированными $-PEG-N_3$, дают региоизомерные 1,2,3-триазолил-связанные группы. Например, в определенных вариантах осуществления соединения или нагрузки, связанные со связующим агентом, могут быть



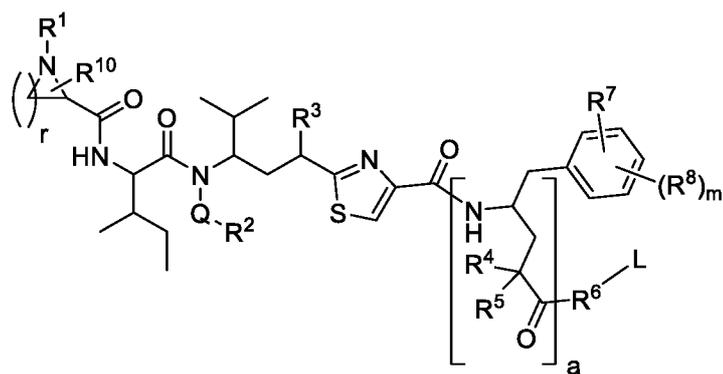
Линкер-нагрузки

[00166] В определенных вариантах осуществления линкер-нагрузки или линкер-пролекарственные нагрузки (т.е. эти описания используются по тексту взаимозаменяемо) включают любое конкретное соединение любой одной или нескольких вышеприведенных Формул I, Ia, II, III, IV, V или VI, связанное с линкером, при этом описанный (описанные) здесь линкер(ы) включает (включают) группу, которая способна вступать в реакцию с описанным здесь антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В конкретных вариантах осуществления линкер связан с гетероциклическим соединением, содержащим азот, R^1 , R^2 , R^3 , R^6 или R^7 в любой одной или нескольких вышеприведенных Формулах I, Ia, II, III, IV, V или VI.

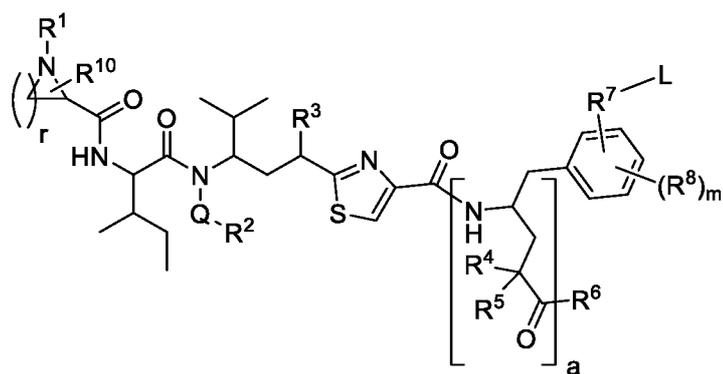
[00167] В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет Формулу **LPa**, **LPb**, **LPc**, **LPd** или **LPe**



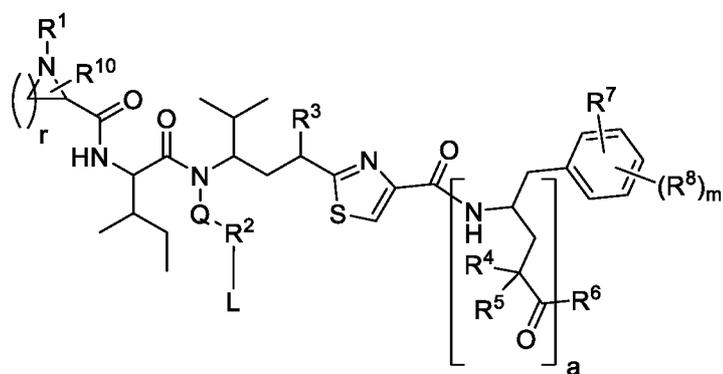
(LPa)



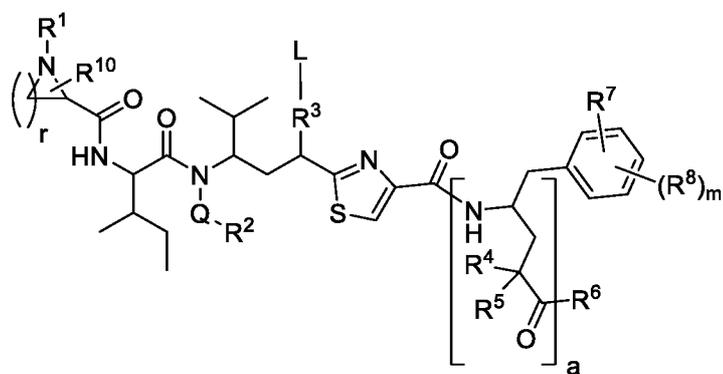
(LPb)



(LPc)



(LPd)



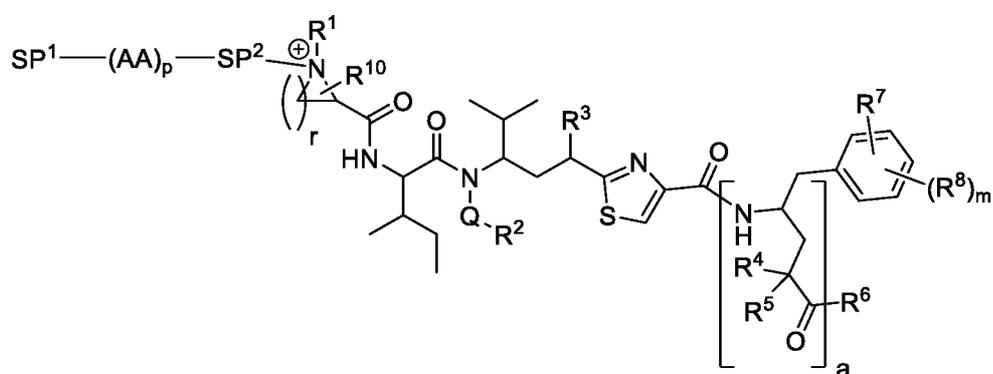
(LPe)

при этом L представляет собой линкер.

[00168] В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет Формулу **LPa**, **LPb**, **LPc**, **LPd** или **LPe**, где

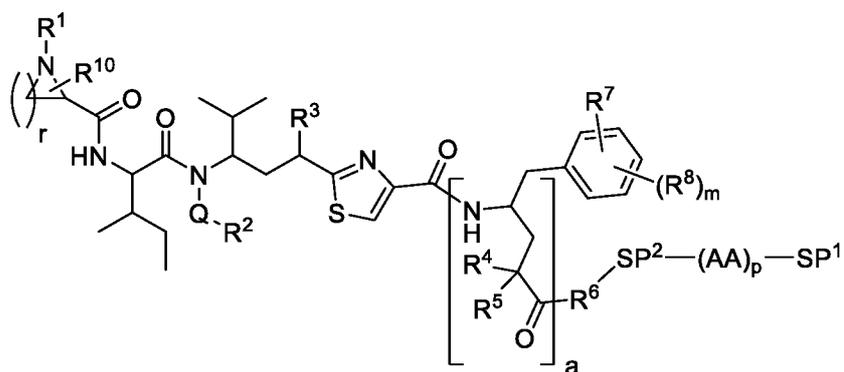
L представляет собой линкер; и **R⁷** представляет собой независимо в каждом случае водород, –OH, –O–, галоген или –NR^{7a}R^{7b}, где **R^{7a}** и **R^{7b}** представляет собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил, ацил, –C(O)CH₂OH, –C(O)CH₂O–, первый остаток *N*-концевой аминокислоты, первый остаток *N*-концевого пептида, –CH₂CH₂NH₂ и –CH₂CH₂NH–, где алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены.

[00169] В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру Формулы **LPa'**



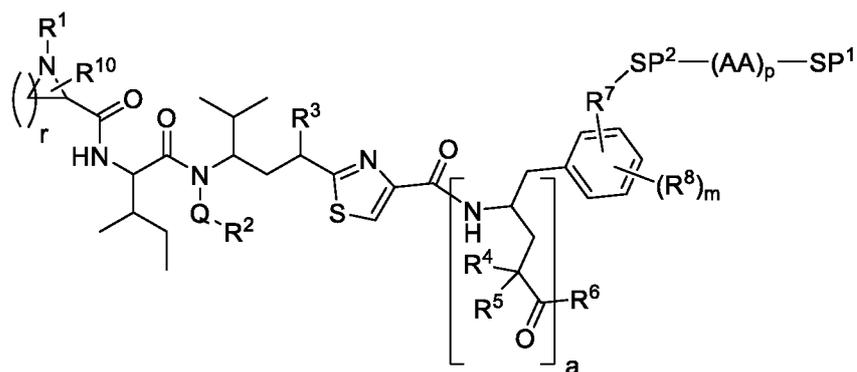
(LPa')

при этом **SP¹**, **(AA)_p**, **SP²**, **R¹**, **Q**, **R²**, **R³**, **R⁴**, **R⁵**, **R⁶**, **R⁷**, **R⁸**, **R¹⁰**, **r** и **a** соответствуют описаниям любого из приведенных здесь вариантов осуществления. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру Формулы **LPb'**



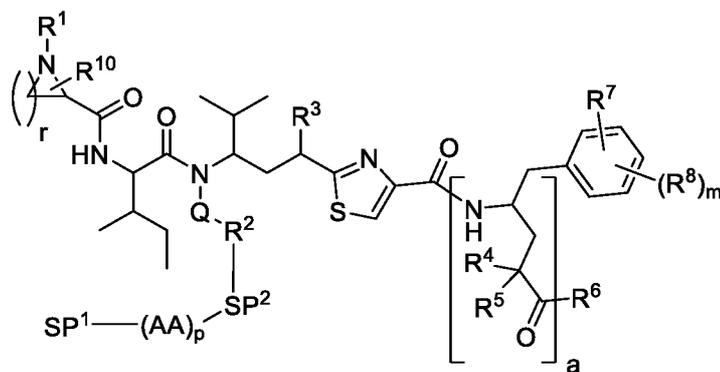
(LPb')

при этом **SP¹**, **(AA)_p**, **SP²**, **R¹**, **Q**, **R²**, **R³**, **R⁴**, **R⁵**, **R⁶**, **R⁷**, **R⁸**, **R¹⁰**, **r** и **a** соответствуют описаниям любого из приведенных здесь вариантов осуществления. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру Формулы **LPc'**



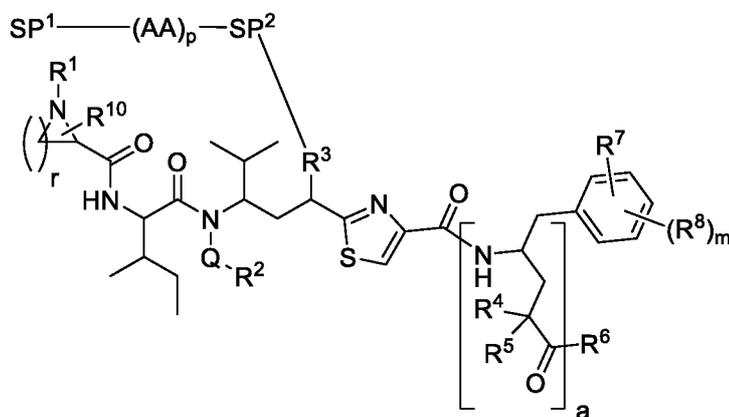
(LPc')

при этом SP^1 , $(AA)_p$, SP^2 , R^1 , Q , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^{10} , r и a соответствуют описаниям любого из приведенных здесь вариантов осуществления. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру Формулы LPd'



(LPd')

при этом SP^1 , $(AA)_p$, SP^2 , R^1 , Q , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^{10} , r и a соответствуют описаниям любого из приведенных здесь вариантов осуществления. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру Формулы LPe'



(LPe')

при этом SP^1 , $(AA)_p$, SP^2 , R^1 , Q , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^{10} , r и a соответствуют описаниям любого из приведенных здесь вариантов осуществления. В любом из вариантов осуществления в данном пункте Формулы LPa' , LPb' , LPc' , LPd' или LPe' могут быть фармацевтически приемлемой солью или пролекарством. В любом из вариантов осуществления в данном пункте p имеет значение 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру LPa' , LPb' , LPc' , LPd' или

LPe' , при этом $-SP^2-$ спейсер, если он присутствует представляет собой

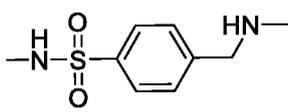
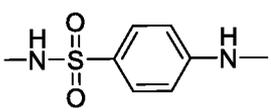
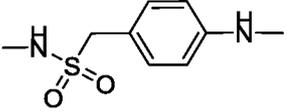


SP^1- спейсер представляет собой $\text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b \text{---} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH---RG}$, при этом RG представляет собой реакционноспособная группа; и b представляет собой целое число от одного до четырех. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру LPa' , LPb' , LPc' , LPd' или LPe' , при этом Q представляет собой $-\text{O}-$. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру LPa' , LPb' , LPc' , LPd' или LPe' , при этом Q представляет собой $-\text{CH}_2-$; R^1 представляет собой $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ алкил; R^2 представляет собой алкил; R^4 и R^5 представляет собой $\text{C}_1\text{-C}_5$ алкил; R^6 представляет собой $-\text{OH}$; R^{10} отсутствует; при этом r имеет значение 4; и при этом a имеет значение 1. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру LPc' или ее фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру LPc' или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом R^7 представляет собой $-\text{NH}-$; и R^8 представляет собой водород или фтор. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру LPc' или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом R^7 представляет собой $-\text{NH}-$; и R^8 представляет собой водород. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру LPc' или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом R^7 представляет собой $-\text{NH}-$; и R^8 представляет собой фтор. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру LPe' или ее фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка

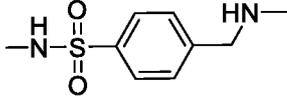
имеет структуру **LPe'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **R³** представляет собой $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ или $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPe'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **R³** представляет собой $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPe'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **R³** представляет собой $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPa'**, **LPb'**, **LPc'**, **LPd'** или **LPe'**, при этом **Q** представляет собой $-\text{CH}_2-$; **R¹** представляет собой водород или C₁-C₁₀ алкил; **R²** представляет собой алкил; **R⁴** и **R⁵** представляет собой C₁-C₅ алкил; **R⁶** представляет собой $-\text{OH}$; при этом **r** имеет значение 3 или 4; и при этом **a** имеет значение 1. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPc'** или ее фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPc'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **R⁷** представляет собой $-\text{NH}-$; и **R⁸** представляет собой водород. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPa'**, **LPb'**, **LPc'**, **LPd'** или **LPe'**, при этом **Q** представляет собой $-\text{CH}_2-$; **R¹** представляет собой водород или C₁-C₁₀ алкил; **R²** представляет собой алкил; **R⁴** и **R⁵** представляет собой C₁-C₅ алкил; **R⁶** представляет собой $-\text{OH}$; **R¹⁰** отсутствует; при этом **r** имеет значение 4; и при этом **a** имеет значение 1. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPc'** или ее фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPc'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **R⁷** представляет собой $-\text{NH}-$; и **R⁸** представляет собой водород. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPa'**, **LPb'**, **LPc'**, **LPd'** или **LPe'**, при этом **Q** представляет собой $-\text{O}-$; **R¹** представляет собой водород или C₁-C₁₀ алкил; **R²** представляет собой алкил или алкинил; **R³** представляет собой гидроксил или $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_1-\text{C}_5$ алкил; **R⁴** и **R⁵** представляет собой C₁-C₅ алкил; **R⁶** представляет собой $-\text{OH}$; **R¹⁰**, если он присутствует представляет собой $-\text{C}_1-\text{C}_5$ алкил; при этом **r** имеет значение 3 или 4; и при этом **a** имеет значение 1. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPc'** или ее фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPc'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **R⁷** представляет собой $-\text{NH}-$; и **R⁸** представляет собой водород. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPa'**, **LPb'**, **LPc'**, **LPd'** или **LPe'**, при этом **Q** представляет собой $-\text{CH}_2-$ или $-\text{O}-$; **R¹** представляет собой C₁-C₁₀ алкил; **R²** представляет собой алкил или алкинил; **R⁴** и

R^5 представляет собой C_1-C_5 алкил; R^6 представляет собой $-NHSO_2(CH_2)_{a1}$ -арил- $(CH_2)_{a2}NR^{6a}R^{6b}$;

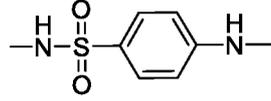
R^{10} отсутствует; при этом r имеет значение 4; и при этом a , $a1$ и $a2$ независимо имеют значение 0 или 1. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру LPb' или ее фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру LPb' или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом R^6

представляет собой ,  или  .. В

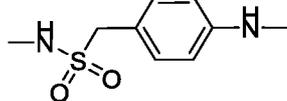
одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру LPb' или ее

фармацевтически приемлемой соли, при этом R^6 представляет собой .

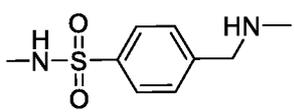
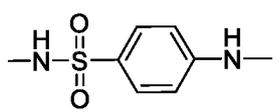
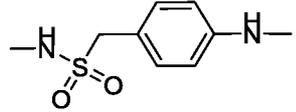
В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру LPb' или ее

фармацевтически приемлемой соли, при этом R^6 представляет собой .

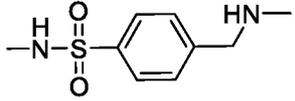
В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру LPb' или ее

фармацевтически приемлемой соли, при этом R^6 представляет собой .

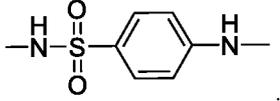
В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру LPb' или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом a имеет значение 0; и R^6 представляет собой

,  или  . В одном варианте

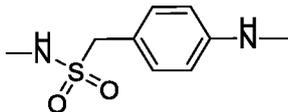
осуществления линкер-нагрузка имеет структуру LPb' или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом a имеет значение 0; и R^6 представляет собой

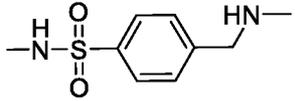
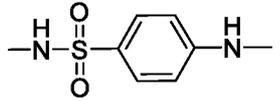
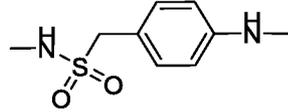
 . В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру

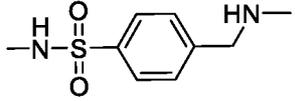
LPb' или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом a имеет значение 0; и R^6

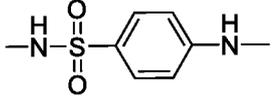
представляет собой  . В одном варианте осуществления линкер-нагрузка

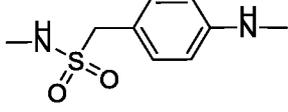
имеет структуру LPb' или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом a имеет

значение 0; и R^6 представляет собой . В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPb'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом a имеет значение 1; и R^6 представляет собой

,  или . В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPb'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом a имеет значение 1; и R^6 представляет собой

. В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPb'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом a имеет значение 1; и R^6

представляет собой . В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPb'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом a имеет

значение 1; и R^6 представляет собой . В одном варианте осуществления линкер-нагрузка имеет структуру **LPc'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом R^7 представляет собой $-O-$; и R^8 представляет собой водород.

[00170] В любом из предшествующих вариантов осуществления арил включает фенил, нафтил, флуоренил, азуленил, антрил, фенантрил и пиренил; гетероарил включает фуранил, тиофенил, пирролил, оксазолил, тиазолил, имидазолил, пиразолил, изоксазолил, изотиазолил, пиридил, пиразинил, пиримидинил, пиридазинил, хинолинил, изохинолинил, циннолинил, хиназолинил, хиноксалинил, фталазинил, птеридинил, бензофуранил, дибензофуранил, бензотиофенил, бензоксазолил, бензтиазоил, дибензотиофенил, индолил, индолинил, бензимидазолил, индазолил и бензтриазолил; гетероциклическое соединение, содержащее азот, включает азиридилил, азетидинил, пирролидинил, пиперидинил, азепанил и азоканил; и ацил включает $C(O)R^{3c}$, при этом R^{3c} содержит алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил и гетероарил. В одном варианте осуществления арил представляет собой фенил. В одном варианте осуществления арил представляет собой нафтил. В одном варианте осуществления арил представляет собой флуоренил. В одном варианте осуществления арил представляет собой азуленил. В одном варианте

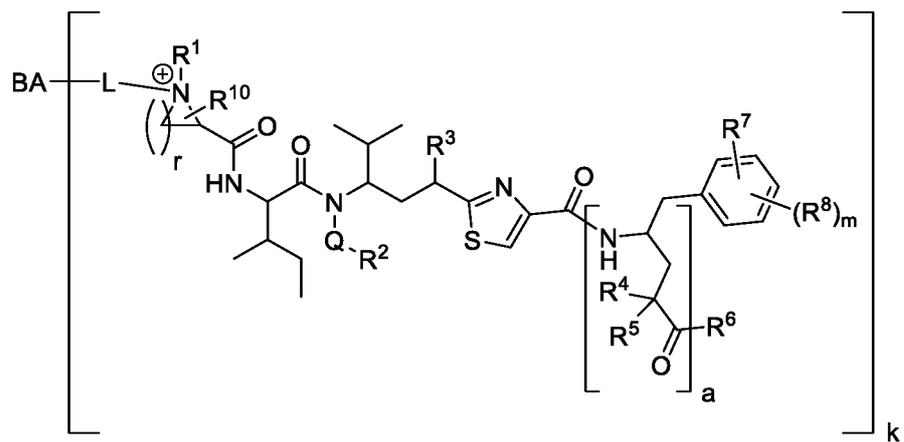
варианте осуществления гетероциклическое соединение, содержащее азот представляет собой пирролидинил. В одном варианте осуществления гетероциклическое соединение, содержащее азот представляет собой пиперидинил. В одном варианте осуществления гетероциклическое соединение, содержащее азот представляет собой азепанил. В одном варианте осуществления гетероциклическое соединение, содержащее азот представляет собой азоканил. В одном варианте осуществления ацил представляет собой $-C(O)R^{3c}$, а R^{3c} представляет собой алкил. В одном варианте осуществления ацил представляет собой $-C(O)R^{3c}$, а R^{3c} представляет собой алкенил. В одном варианте осуществления ацил представляет собой $-C(O)R^{3c}$, а R^{3c} представляет собой алкинил. В одном варианте осуществления ацил представляет собой $-C(O)R^{3c}$, а R^{3c} представляет собой циклоалкил. В одном варианте осуществления ацил представляет собой $-C(O)R^{3c}$, а R^{3c} представляет собой арил. В одном варианте осуществления ацил представляет собой $-C(O)R^{3c}$, а R^{3c} представляет собой гетероарил.

[00171] В любом предшествующем варианте осуществления в данном разделе R^7 представляет собой $-O-$ или $-NR^{7a}R^{7b}$, при этом R^{7a} и R^{7b} представляет собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил, ацил, первый остаток N-концевой аминокислоты или первый остаток N-концевого пептида, при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены. В определенных вариантах осуществления R^{7a} представляет собой водород и R^{7b} представляет собой связь. В определенных вариантах осуществления R^7 представляет собой $-O-$. В одном варианте осуществления R^{7a} представляет собой водород, а R^{7b} представляет собой первый остаток N-концевой аминокислоты.

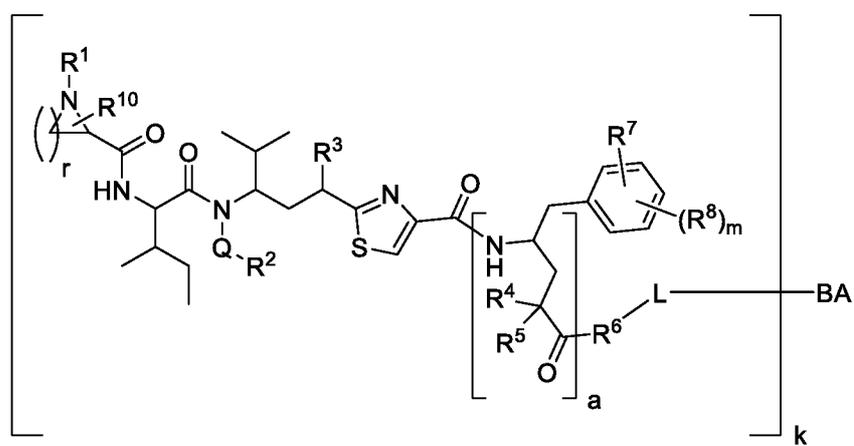
Конъюгаты/конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC)

[00172] Здесь представлены антитела или их антигенсвязывающий фрагмент, при этом указанное антитело конъюгировано с одним или более соединениями Формулы I, Ia, II, III, IV, V или VI, описанными здесь.

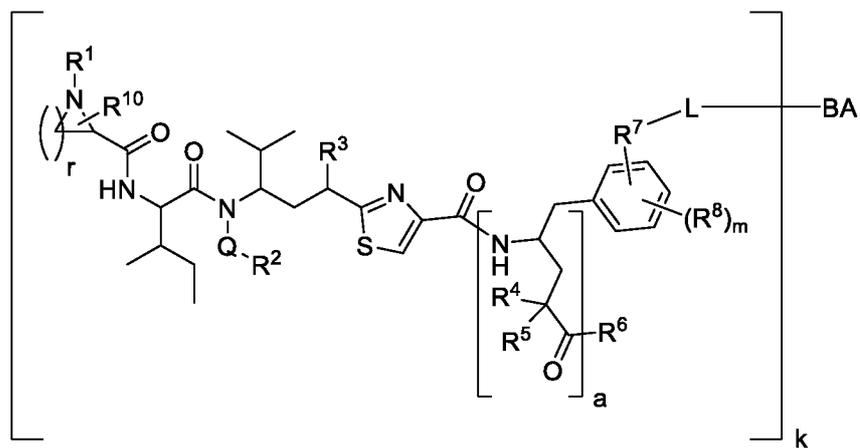
[00173] Здесь представлены конъюгаты с Формулой **A**, **B**, **C**, **D** или **E**



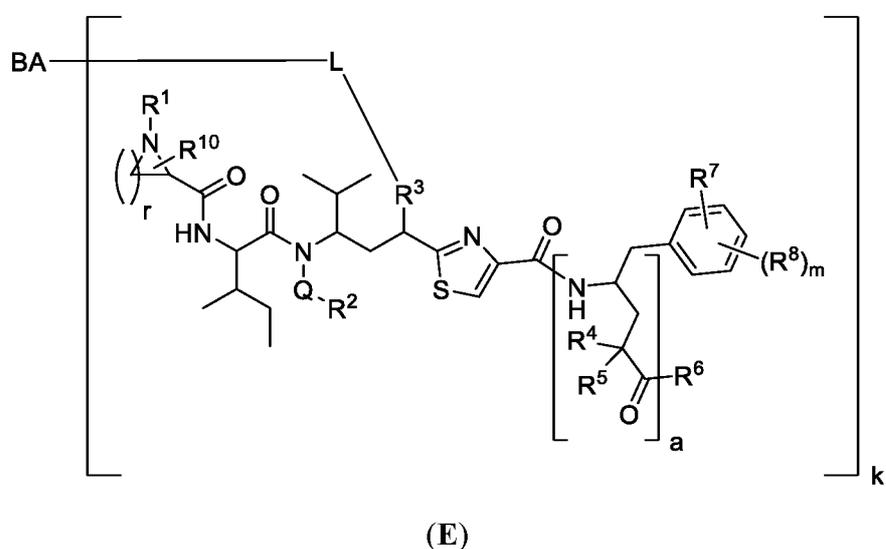
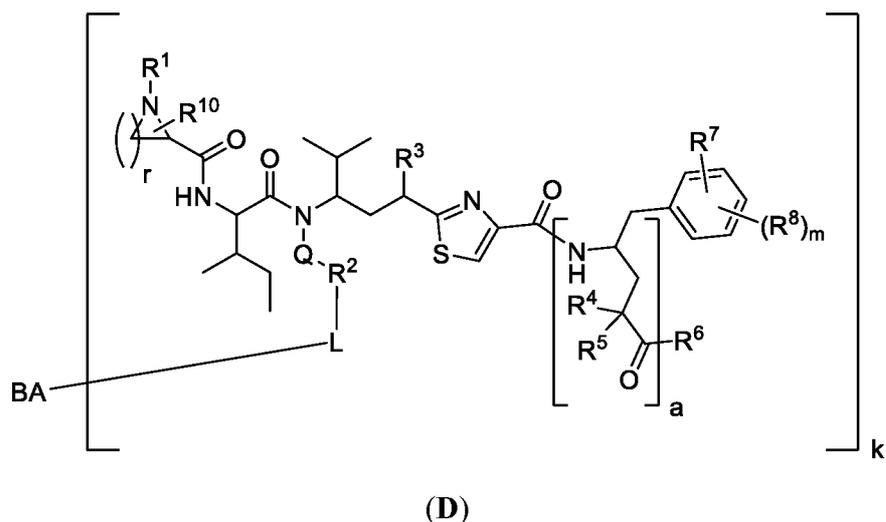
(A)



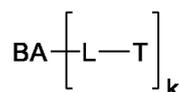
(B)



(C)



при этом **L** представляет собой линкер. В определенных вариантах осуществления **R¹**, **Q**, **R²**, **R³**, **R⁴**, **R⁵**, **R⁶**, **R⁷**, **R⁸**, **R¹⁰**, **m**, **r** и **a** соответствуют вышеприведенным описаниям для Формулы I, и **k** имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В определенных вариантах осуществления **k** находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 или 1-4.

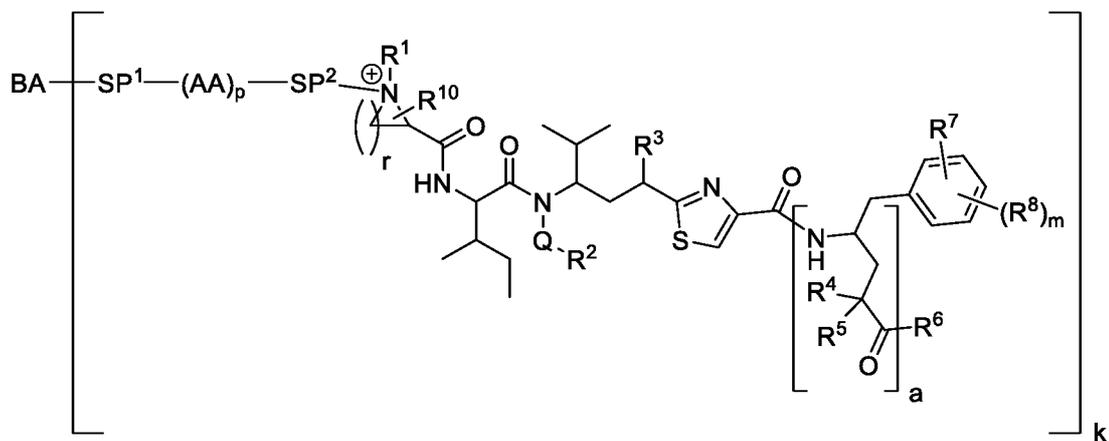


[00174] Здесь представлены конъюгаты с Формулой $\text{BA} \left[\text{L}-\text{T} \right]_k$, **A**, **B**, **C**, **D** или **E**, при этом **T** описан в настоящем документе или является фармацевтически приемлемой солью, сольватом, региоизомерной или стереоизомерной формой, при этом **R⁷** представляет собой независимо в каждом случае водород, -OH, -O-, галоген или -NR^{7a}R^{7b},

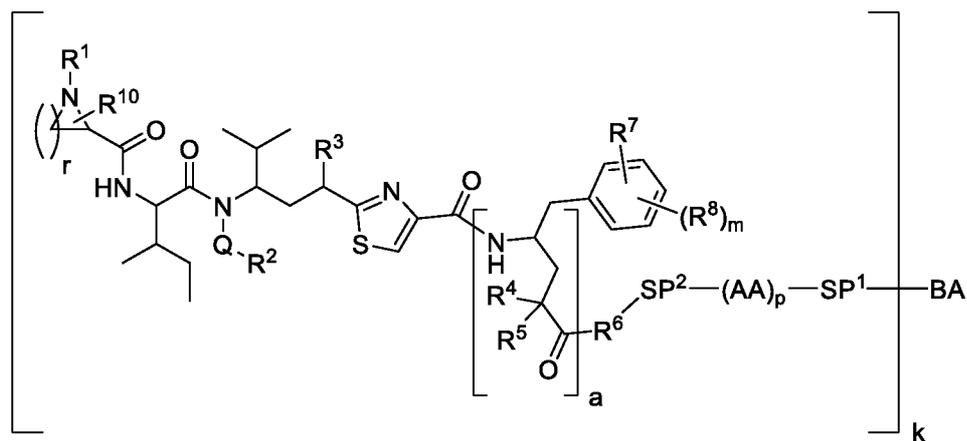
при этом **R^{7a}** и **R^{7b}** представляет собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил, ацил, -C(O)CH₂OH, -C(O)CH₂O-, первый остаток *N*-концевой аминокислоты, первый остаток *N*-концевого пептида, -CH₂CH₂NH₂ и -CH₂CH₂NH-; при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены; В определенных вариантах осуществления **R¹**,

Q , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^{10} , m , r и a соответствуют вышеприведенным описаниям для Формулы I, и k имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В определенных вариантах осуществления k находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 или 1-4.

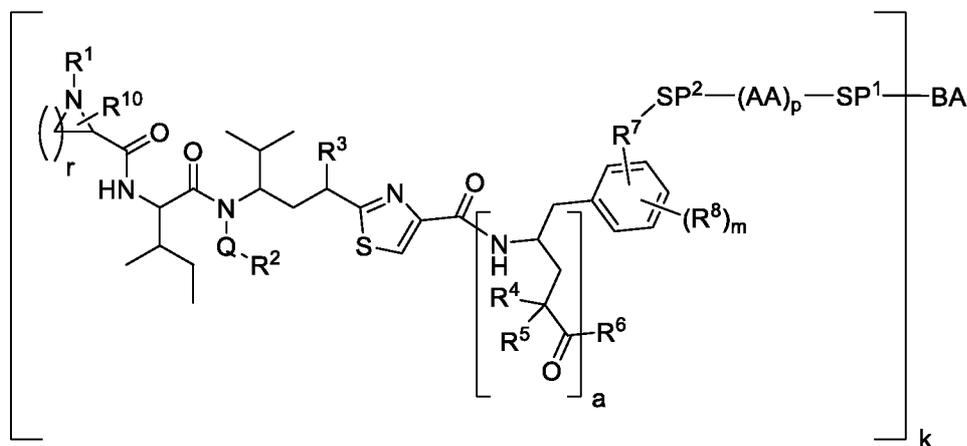
[00175] Здесь представлены конъюгаты с Формулой A', B', C', D' или E'



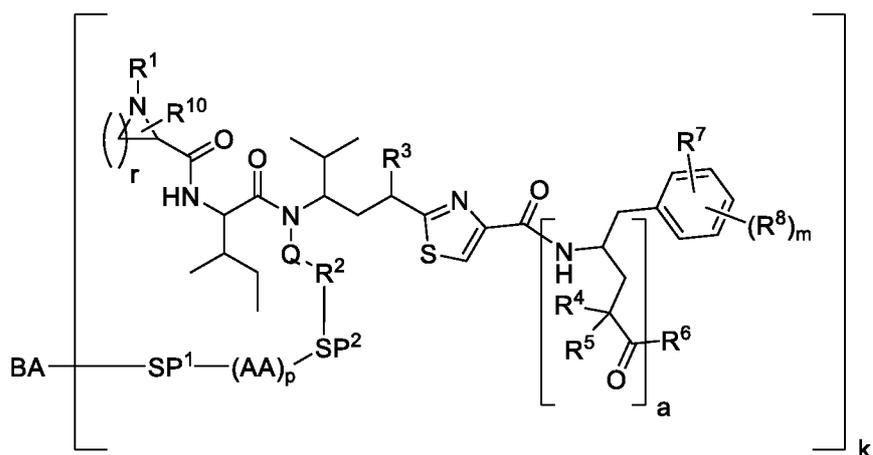
(A')



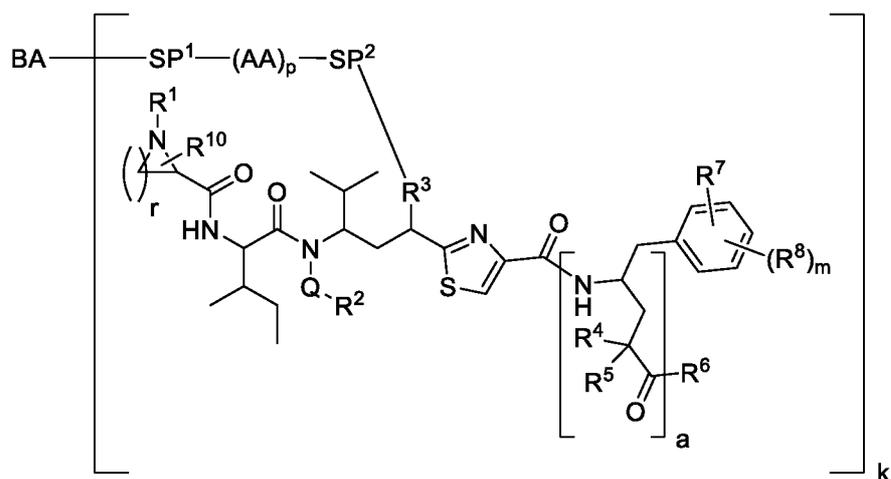
(B')



(C')

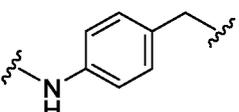
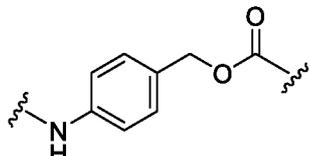


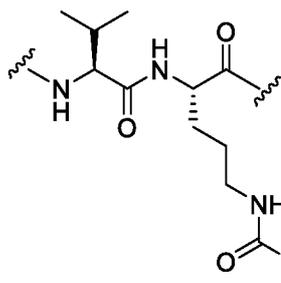
(D')



(E')

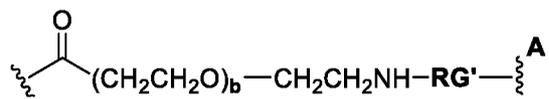
или их фармацевтически приемлемая соль, пролекарство, сольват, региоизомерная или стереоизомерная форма, при этом SP^1 и SP^2 , если они присутствуют представляет собой спейсерные группы; каждая AA , если она присутствует представляет собой второй аминокислотный остаток; и p представляет собой целое число от нуля до десяти. В определенных вариантах осуществления R^1 , Q , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^{10} , m , r и a соответствуют вышеприведенным описаниям для Формулы I, и k имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В определенных вариантах осуществления k находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 или 1-4. В определенных вариантах осуществления $-SP^2-$ спейсер, если он

присутствует представляет собой  или  ; вторая –



(AA)_p— представляет собой

—SP¹—спейсер представляет собой



, при этом **RG'** представляет собой остаток реакционноспособной группы после реакции реакционноспособной группы **RG** со

связующим агентом; $\begin{array}{c} \text{A} \\ \text{—} \end{array}$ представляет собой связь, прямая или опосредованная, со

связующим агентом; и **b** представляет собой целое число от одного до четырех. В

определенных вариантах осуществления **p** соответствует вышеприведенному описанию. В

определенных вариантах осуществления **b** имеет значение 1. В определенных вариантах

осуществления **b** имеет значение 2. В определенных вариантах осуществления **b** имеет

значение 3. В определенных вариантах осуществления **b** имеет значение 4. В определенных

вариантах осуществления **Q** представляет собой —O—. В определенных вариантах

осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **A'**, **B'**, **C'**, **D'** или **E'**, при этом **Q**

представляет собой —CH₂—; **R**¹ представляет собой C₁-C₁₀ алкил; **R**² представляет собой

алкил; **R**⁴ и **R**⁵ представляет собой C₁-C₅ алкил; **R**⁶ представляет собой —OH; **R**¹⁰

отсутствует; при этом **r** имеет значение 4; и при этом **a** имеет значение 1. В одном варианте

осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **C'** или ее фармацевтически

приемлемой соли. В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы

C' или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **R**⁷ представляет собой —NH—; и **R**⁸

представляет собой водород или фтор. В одном варианте осуществления конъюгат имеет

структуру Формулы **C'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **R**⁷

представляет собой —NH—; и **R**⁸ представляет собой водород. В одном варианте

осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **C'** или ее фармацевтически

приемлемой соли, при этом **R**⁷ представляет собой —NH—; и **R**⁸ представляет собой фтор. В

одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **E'** или ее

фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления конъюгат имеет

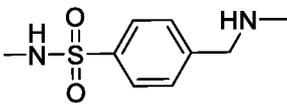
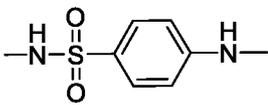
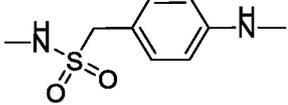
структуру Формулы **E'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **R**³

представляет собой —OC(O)N(H)CH₂CH₂NH— или —

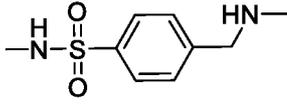
OC(O)N(H)CH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂NH—. В одном варианте осуществления

конъюгат имеет структуру Формулы **E'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **R³** представляет собой $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$. В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **E'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **R³** представляет собой $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$. В определенных вариантах осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **A', B', C', D'** или **E'**, при этом **Q** представляет собой $-\text{CH}_2-$; **R¹** представляет собой водород или C_1 - C_{10} алкил; **R²** представляет собой алкил; **R⁴** и **R⁵** представляет собой C_1 - C_5 алкил; **R⁶** представляет собой $-\text{OH}$; при этом **r** имеет значение 3 или 4; и при этом **a** имеет значение 1. В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **C'** или ее фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **C'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **R⁷** представляет собой $-\text{NH}-$; и **R⁸** представляет собой водород. В определенных вариантах осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **A', B', C', D'** или **E'**, при этом **Q** представляет собой $-\text{CH}_2-$; **R¹** представляет собой водород или C_1 - C_{10} алкил; **R²** представляет собой алкил; **R⁴** и **R⁵** представляет собой C_1 - C_5 алкил; **R⁶** представляет собой $-\text{OH}$; **R¹⁰** отсутствует; при этом **r** имеет значение 4; и при этом **a** имеет значение 1. В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **C'** или ее фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **C'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **R⁷** представляет собой $-\text{NH}-$; и **R⁸** представляет собой водород. В определенных вариантах осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **A', B', C', D'** или **E'**, при этом **Q** представляет собой $-\text{O}-$; **R¹** представляет собой водород или C_1 - C_{10} алкил; **R²** представляет собой алкил или алкинил; **R³** представляет собой гидроксил или $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_1$ - C_5 алкил; **R⁴** и **R⁵** представляет собой C_1 - C_5 алкил; **R⁶** представляет собой $-\text{OH}$; **R¹⁰**, если он присутствует представляет собой $-\text{C}_1$ - C_5 алкил; при этом **r** имеет значение 3 или 4 и при этом **a** имеет значение 1. В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **C'** или ее фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **C'** или ее фармацевтически приемлемой соли, **R⁷** представляет собой $-\text{NH}-$; и **R⁸** представляет собой водород. В определенных вариантах осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **A', B', C', D'** или **E'**, при этом **Q** представляет собой $-\text{CH}_2-$ или $-\text{O}-$; **R¹** представляет собой C_1 - C_{10} алкил; **R²** представляет собой алкил или алкинил; **R⁴** и **R⁵** представляет собой C_1 - C_5 алкил; **R⁶** представляет собой $-\text{NHSO}_2(\text{CH}_2)_{a1}$ -арил- $(\text{CH}_2)_{a2}\text{NR}^{6a}\text{R}^{6b}$;

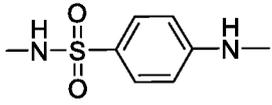
R^{10} отсутствует; при этом r имеет значение 4; и при этом a , $a1$ и $a2$ независимо имеют значение 0 или 1. В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы B' или ее фармацевтически приемлемой соли. В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы B' или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом R^6

представляет собой ,  или . В

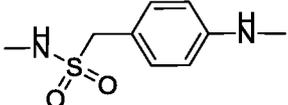
одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы B' или ее

фармацевтически приемлемой соли, при этом R^6 представляет собой .

В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы B' или ее

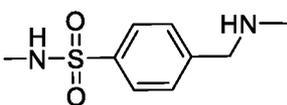
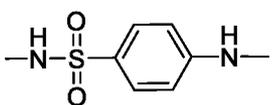
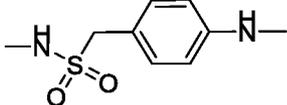
фармацевтически приемлемой соли, при этом R^6 представляет собой .

В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы B' или ее

фармацевтически приемлемой соли, при этом R^6 представляет собой .

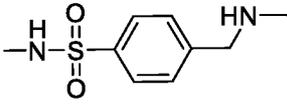
В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы B' или ее

фармацевтически приемлемой соли, при этом a имеет значение 0; и R^6 представляет собой

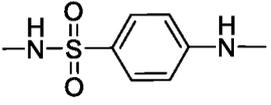
,  или . В одном варианте

осуществления конъюгат имеет структуру Формулы B' или ее фармацевтически

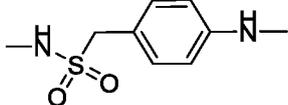
приемлемой соли, при этом a имеет значение 0; и R^6 представляет собой

. В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру

Формулы B' или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом a имеет значение 0; и R^6

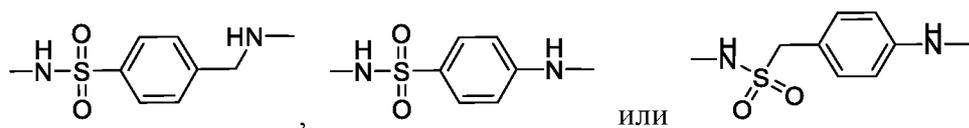
представляет собой . В одном варианте осуществления конъюгат имеет

структуру Формулы B' или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом a имеет

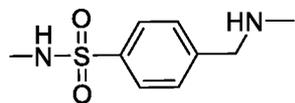
значение 0; и R^6 представляет собой . В одном варианте

осуществления конъюгат имеет структуру Формулы B' или ее фармацевтически

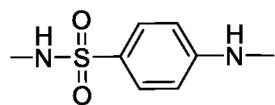
приемлемой соли, при этом **a** имеет значение 1; и **R⁶** представляет собой



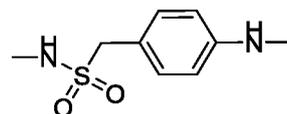
. В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **B'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **a** имеет значение 1; и **R⁶** представляет собой



. В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **B'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **a** имеет значение 1; и **R⁶**



представляет собой . В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **B'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **a** имеет



значение 1; и **R⁶** представляет собой . В одном варианте осуществления конъюгат имеет структуру Формулы **C'** или ее фармацевтически приемлемой соли, при этом **R⁷** представляет собой -O-; и **R⁸** представляет собой водород.

[00176] Здесь представлены конъюгаты Формулы **A**. В определенных вариантах осуществления соединения, конъюгированные с —**L**—**ВА** в Формуле **A**, включают одно или более соединений Формул I, Ia, II, III, IV, V и/или VI, согласно вышеприведенным описаниям, при этом **ВА** представляет собой связующий агент; **L** представляет собой линкер; и **k** имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В определенных вариантах осуществления **k** находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 или 1-4. В любом варианте осуществления в данном пункте **ВА** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы I, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **ВА** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы Ia, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **ВА** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы II, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **ВА** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы III, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **ВА** представляет собой антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы IV, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **ВА** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы V, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **ВА** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы VI, описанным выше. В любом из вариантов осуществления в настоящем пункте любое одно или более соединений Формул I, Ia, II, III, IV, V и/или VI, конъюгированных с **—L—ВА** в Формуле А, конъюгированы посредством гетероциклического соединения, содержащего азот, описанного в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления, если **Q** представляет собой **—O—**, тогда **R²** представляет собой C₁-C₁₀ алкил, C₁-C₁₀ алкинил, региоизомерный триазол, **—C₁-C₁₀** алкилен-(5-членный гетероарил), **—C₁-C₃** алкилен-**Q¹**-(CH₂)_mарил, C₁-C₃ гидроксилалкил или C₁-C₁₀ алкилэфир. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 1. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 2. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 3. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 4. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 5. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 6. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 7. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 8. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 9. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 10. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **Q¹** представляет собой **—CH₂—**. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **Q¹** представляет собой **—O—**. В определенных вариантах осуществления, если **Q** представляет собой **—CH₂—**, тогда **R²** представляет собой C₅-C₁₀ алкил, C₁-C₁₀ алкинил, **—C₁-C₁₀** алкилен-(5-членный гетероарил), **—C₁-C₃** алкилен-**Q¹**-(CH₂)_mарил, C₁-C₃ гидроксилалкил или C₁-C₁₀ алкилэфир. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 1. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 2. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 3. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 4. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 5. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 6. В определенных вариантах

осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 7. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 8. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 9. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 10. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **Q¹** представляет собой $-\text{CH}_2-$. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **Q¹** представляет собой $-\text{O}-$.

[00177] Здесь представлены конъюгаты Формулы **B**. В определенных вариантах осуществления соединения, конъюгированные с $-\text{L}-\text{BA}$ в Формуле **B**, включают одно или более соединений Формул I, Ia, II, III, IV, V, и/или VI, согласно вышеприведенным описаниям, при этом **BA** представляет собой связующий агент; **L** представляет собой линкер; и **k** имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В определенных вариантах осуществления **k** находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 или 1-4. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы I, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы Ia, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы II, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы III, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы IV, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы V, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы VI, описанным выше. В любом из вариантов осуществления в данном пункте любое одно или более соединений Формул I, Ia, II, III, IV, V и/или VI, конъюгированные с $-\text{L}-\text{BA}$ в Формуле **B**, конъюгированы посредством двухвалентного **R⁶**. В определенных вариантах осуществления, если **Q** представляет собой $-\text{O}-$, тогда **R²** представляет собой C_1-C_{10} алкил, C_1-C_{10} алкинил, региоизомерный триазол, $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен-(5-членный

гетероарил), $-C_1-C_3$ алкилен- $Q^1-(CH_2)_m$ арил, C_1-C_3 гидроксиалкил или C_1-C_{10} алкилэфир. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 1. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 2. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 3. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 4. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 5. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 6. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 7. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 8. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 9. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 10. В определенных вариантах осуществления в данном пункте Q^1 представляет собой $-CH_2-$. В определенных вариантах осуществления в данном пункте Q^1 представляет собой $-O-$. В определенных вариантах осуществления, если **Q** представляет собой $-CH_2-$, тогда R^2 представляет собой C_5-C_{10} алкил, C_1-C_{10} алкинил, $-C_1-C_{10}$ алкилен-(5-членный гетероарил), $-C_1-C_3$ алкилен- $Q^1-(CH_2)_m$ арил, C_1-C_3 гидроксиалкил или C_1-C_{10} алилэфир. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 1. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 2. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 3. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 4. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 5. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 6. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 7. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 8. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 9. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 10. В определенных вариантах осуществления в данном пункте Q^1 представляет собой $-CH_2-$. В определенных вариантах осуществления в данном пункте Q^1 представляет собой $-O-$.

[00178] Здесь представлены конъюгаты Формулы С. В определенных вариантах осуществления соединения, конъюгированные с $-L-BA$ в Формуле С, включают одно или более соединений Формул I, Ia, II, III, IV, V, и/или VI, согласно вышеприведенным описаниям, при этом **BA** представляет собой связующий агент; **L** представляет собой линкер; и **k** имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В определенных вариантах осуществления **k** находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 или 1-4. В любом варианте

осуществления в данном пункте **ВА** представляет собой антителио или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антителио конъюгировано с соединением Формулы I, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **ВА** представляет собой антителио или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антителио конъюгировано с соединением Формулы Ia, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **ВА** представляет собой антителио или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антителио конъюгировано с соединением Формулы II, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **ВА** представляет собой антителио или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антителио конъюгировано с соединением Формулы III, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **ВА** представляет собой антителио или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антителио конъюгировано с соединением Формулы IV, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **ВА** представляет собой антителио или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антителио конъюгировано с соединением Формулы V, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **ВА** представляет собой антителио или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антителио конъюгировано с соединением Формулы VI, описанным выше. В любом из вариантов осуществления в данном пункте любое одно или более соединений Формул I, Ia, II, III, IV, V и/или VI, конъюгированные с —L—**ВА** в Формуле C, конъюгированы посредством двухвалентного **R**⁷. В определенных вариантах осуществления, если **Q** представляет собой —O—, тогда **R**² представляет собой C₁-C₁₀ алкил, C₁-C₁₀ алкинил, региоизомерный триазол, —C₁-C₁₀ алкилен-(5-членный гетероарил), —C₁-C₃ алкилен-**Q**¹-(CH₂)_nарил, C₁-C₃ гидроксилалкил или C₁-C₁₀ алкилэфир. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 1. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 2. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 3. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 4. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 5. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 6. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 7. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 8. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 9. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 10. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **Q**¹ представляет собой —CH₂—. В

определенных вариантах осуществления в данном пункте Q^1 представляет собой $-O-$. В определенных вариантах осуществления, если Q представляет собой $-CH_2-$, тогда R^2 представляет собой C_5-C_{10} алкил, C_1-C_{10} алкинил, $-C_1-C_{10}$ алкилен-(5-членный гетероарил), $-C_1-C_3$ алкилен- $Q^1-(CH_2)_m$ арил, C_1-C_3 гидроксиалкил или C_1-C_{10} алилэфир. В определенных вариантах осуществления в данном пункте nn имеет значение 1. В определенных вариантах осуществления в данном пункте nn имеет значение 2. В определенных вариантах осуществления в данном пункте nn имеет значение 3. В определенных вариантах осуществления в данном пункте nn имеет значение 4. В определенных вариантах осуществления в данном пункте nn имеет значение 5. В определенных вариантах осуществления в данном пункте nn имеет значение 6. В определенных вариантах осуществления в данном пункте nn имеет значение 7. В определенных вариантах осуществления в данном пункте nn имеет значение 8. В определенных вариантах осуществления в данном пункте nn имеет значение 9. В определенных вариантах осуществления в данном пункте nn имеет значение 10. В определенных вариантах осуществления в данном пункте Q^1 представляет собой $-CH_2-$. В определенных вариантах осуществления в данном пункте Q^1 представляет собой $-O-$.

[00179] Здесь представлены конъюгаты Формулы **D**. В определенных вариантах осуществления соединения, конъюгированные с $-L-BA$ в Формуле **D**, включают одно или более соединений Формул I, Ia, II, III, IV, V, и/или VI, согласно вышеприведенным описаниям, при этом **BA** представляет собой связующий агент; **L** представляет собой линкер; и **k** имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В определенных вариантах осуществления **k** находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 или 1-4. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы I, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы Ia, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы II, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы III, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы IV, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы V, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы VI, описанным выше.

Формулы IV, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **ВА** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы V, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **ВА** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы VI, описанным выше.

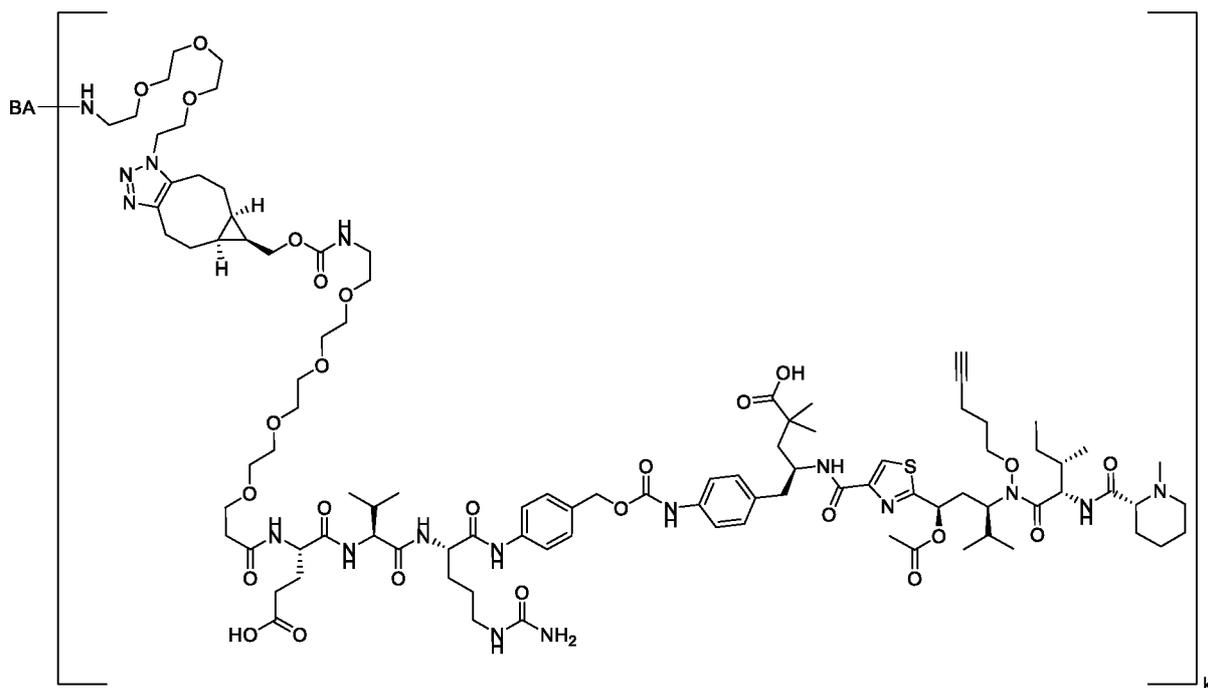
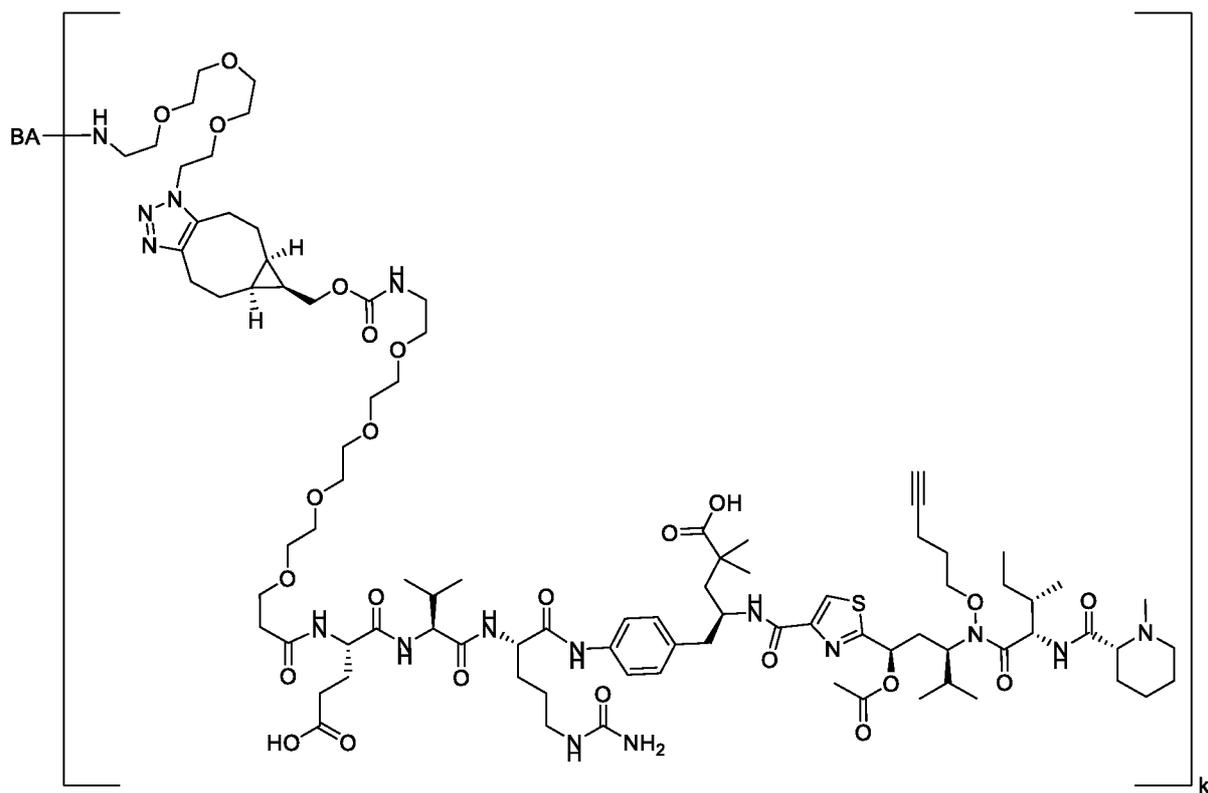
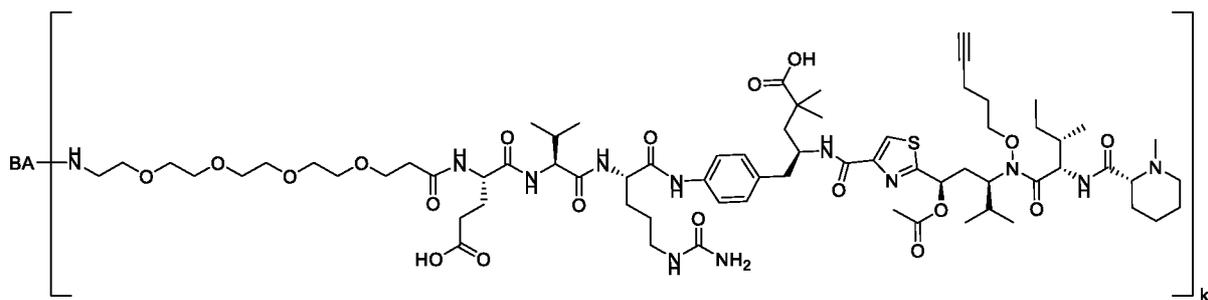
В любом из вариантов осуществления в данном пункте любое одно или более соединений Формул I, Ia, II, III, IV, V и/или VI, конъюгированные с $—L—BA$ в Формуле D, конъюгированы посредством двухвалентного R^2 . В определенных вариантах осуществления, если Q представляет собой $—O—$, тогда R^2 представляет собой C_1-C_{10} алкилен, C_1-C_{10} алкинилен, региоизомерный C_1-C_{10} триазилилен, региоизомерный $—C_1-C_{10}$ алкилен-(5-членный гетероарилен) или $—C_1-C_3$ алкилен- $Q^1-(CH_2)_m$ арилен. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 1. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 2. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 3. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 4. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 5. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 6. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 7. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 8. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 9. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 10. В определенных вариантах осуществления в данном пункте Q^1 представляет собой $—CH_2—$. В определенных вариантах осуществления в данном пункте Q^1 представляет собой $—O—$. В определенных вариантах осуществления, если Q представляет собой $—CH_2—$, тогда R^2 представляет собой C_5-C_{10} алкилен, C_1-C_{10} алкинилен, региоизомерный C_1-C_{10} триазилилен, региоизомерный $—C_1-C_{10}$ алкилен-(5-членный гетероарилен) или $—C_1-C_3$ алкилен- $Q^1-(CH_2)_m$ арилен. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 1. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 2. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 3. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 4. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 5. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 6. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 7. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 7. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 7.

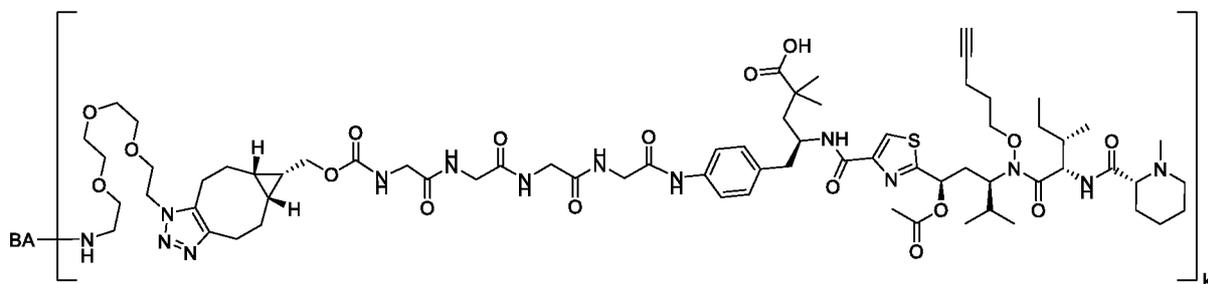
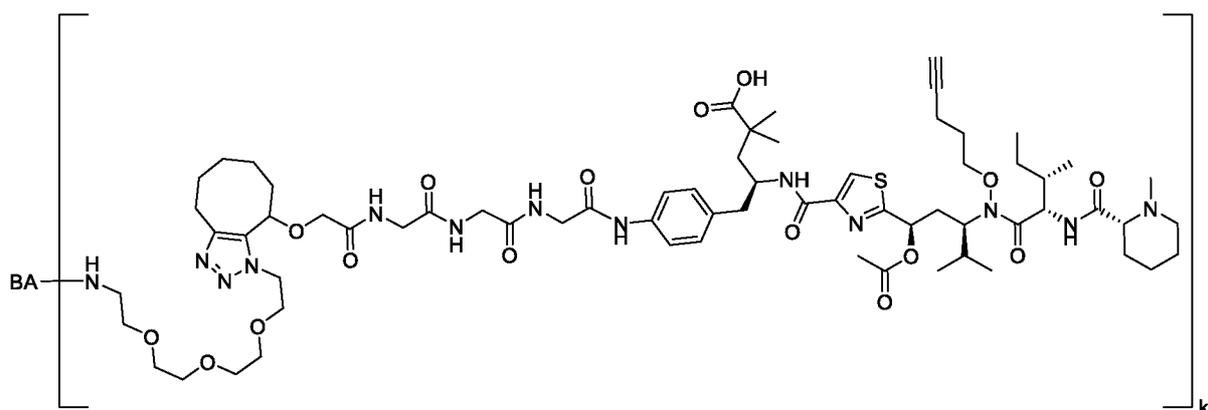
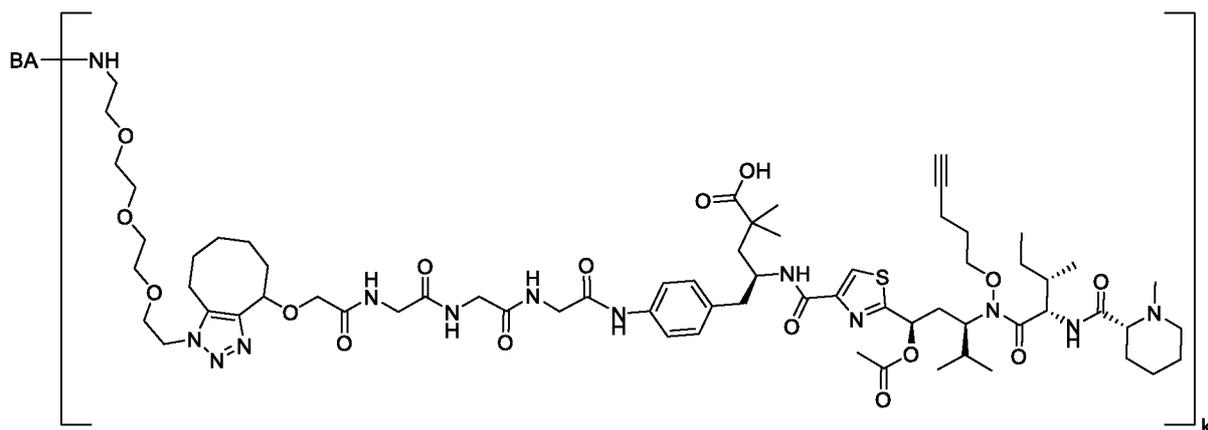
определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 8. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 9. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 10. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **Q¹** представляет собой $-\text{CH}_2-$. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **Q¹** представляет собой $-\text{O}-$.

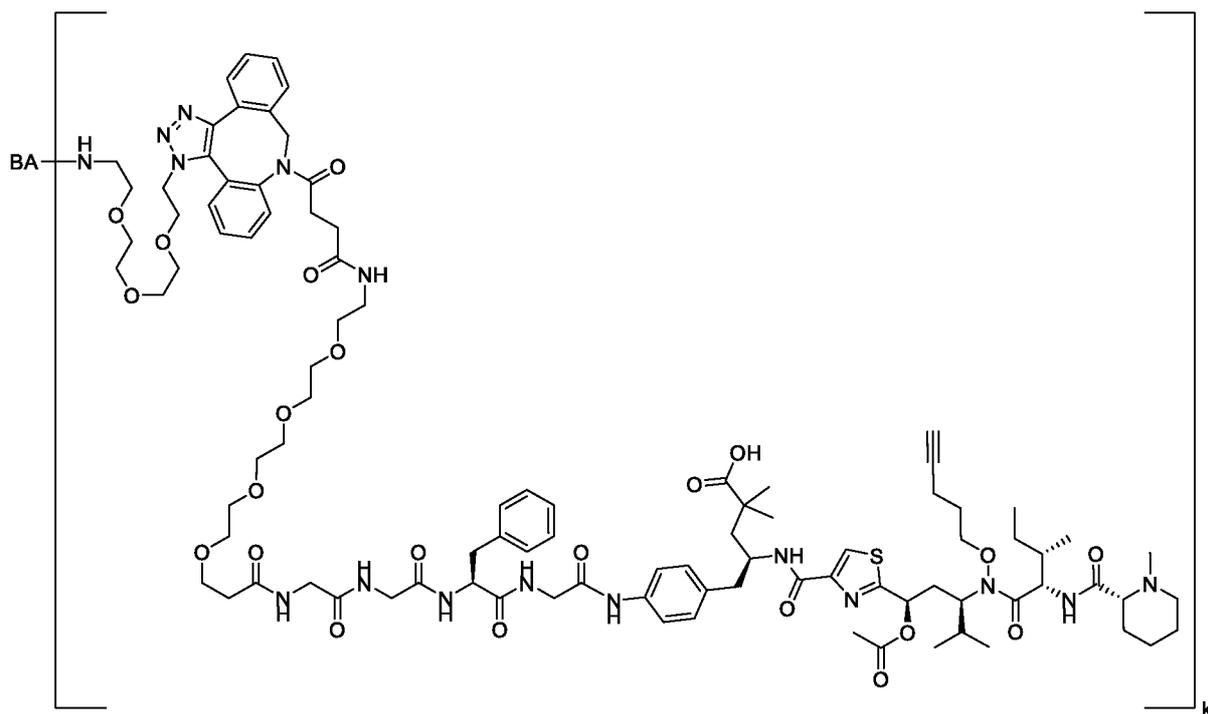
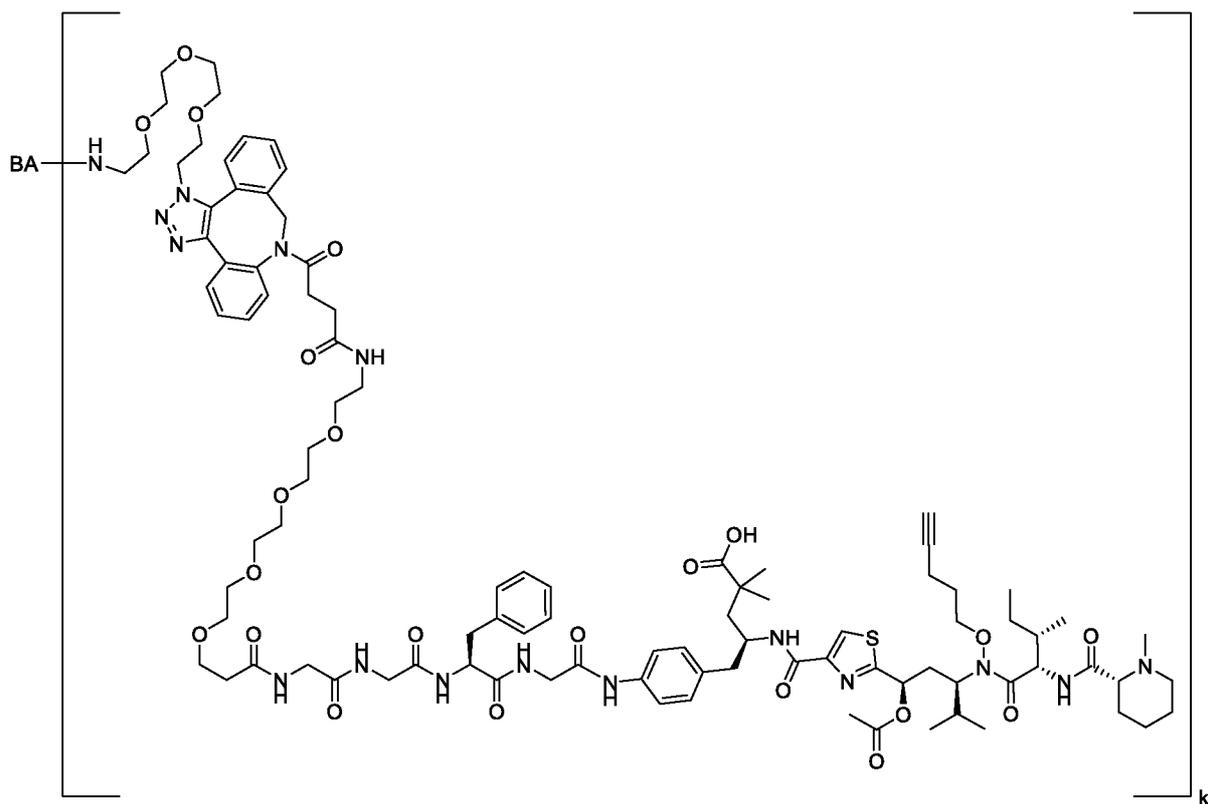
[00180] Здесь представлены конъюгаты Формулы **E**. В определенных вариантах осуществления соединения, конъюгированные с $-\text{L}-\text{BA}$ в Формуле **E**, включают одно или более соединений Формул I, Ia, II, III, IV, V, и/или VI, согласно вышеприведенным описаниям, при этом **BA** представляет собой связующий агент; **L** представляет собой линкер; и **k** имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В определенных вариантах осуществления **k** находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 или 1-4. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы I, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы Ia, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы II, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы III, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы IV, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы V, описанным выше. В любом варианте осуществления в данном пункте **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом антитело конъюгировано с соединением Формулы VI, описанным выше. В любом из вариантов осуществления в данном пункте любое одно или более соединений Формул I, Ia, II, III, IV, V и/или VI, конъюгированные с $-\text{L}-\text{BA}$ в Формуле **E**, конъюгированы посредством двухвалентного **R³**. В определенных вариантах осуществления, если **Q** представляет собой $-\text{O}-$, тогда **R²** представляет собой C₁-C₁₀ алкил, C₁-C₁₀ алкинил, региоизомерный триазол, $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ алкилен-(5-членный гетероарил), $-\text{C}_1-\text{C}_3$ алкилен-**Q¹**-(CH₂)_mарил, C₁-C₃ гидроксилалкил или C₁-C₁₀ алкилэфир.

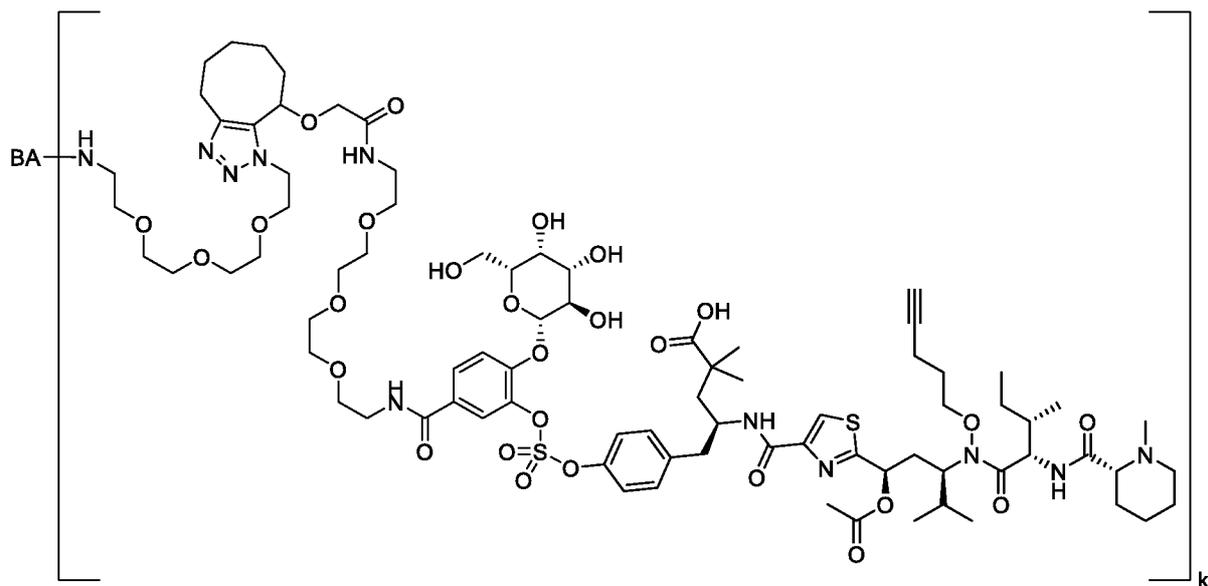
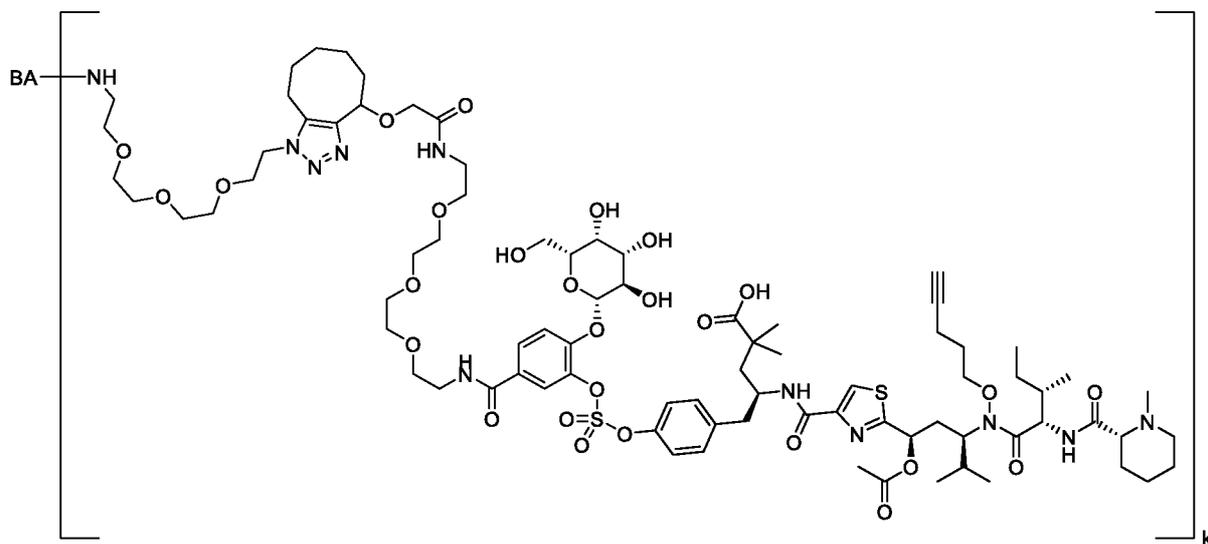
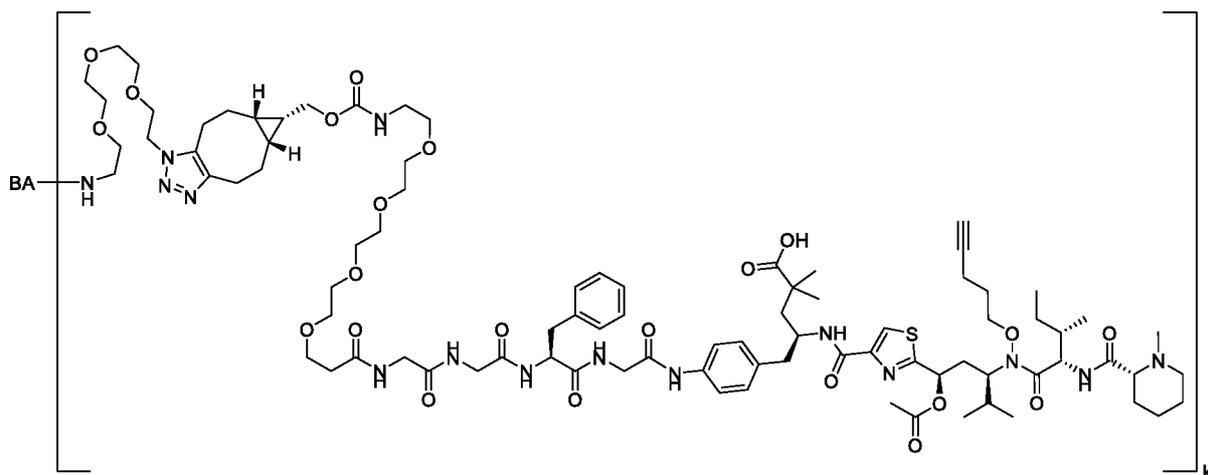
В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 1. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 2. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 3. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 4. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 5. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 6. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 7. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 8. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 9. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 10. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **Q¹** представляет собой $-\text{CH}_2-$. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **Q¹** представляет собой $-\text{O}-$. В определенных вариантах осуществления, если **Q** представляет собой $-\text{CH}_2-$, тогда **R²** представляет собой $\text{C}_5\text{-C}_{10}$ алкил, $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ алкинил, $-\text{C}_1\text{-C}_{10}$ алкилен-(5-членный гетероарил), $-\text{C}_1\text{-C}_3$ алкилен-**Q¹**-(CH_2)_mарил, $\text{C}_1\text{-C}_3$ гидроксиалкил или $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ алилэфир. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 1. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 2. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 3. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 4. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 5. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 6. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 7. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 8. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 9. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **nn** имеет значение 10. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **Q¹** представляет собой $-\text{CH}_2-$. В определенных вариантах осуществления в данном пункте **Q¹** представляет собой $-\text{O}-$.

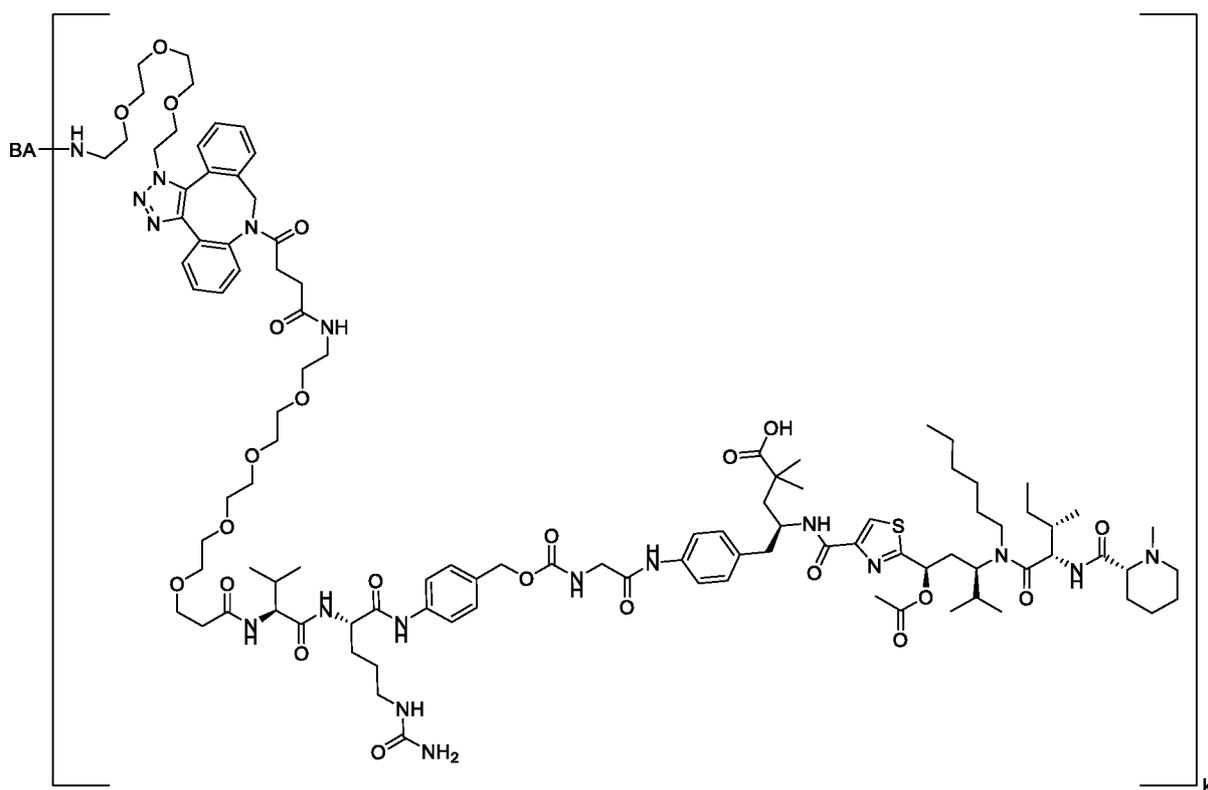
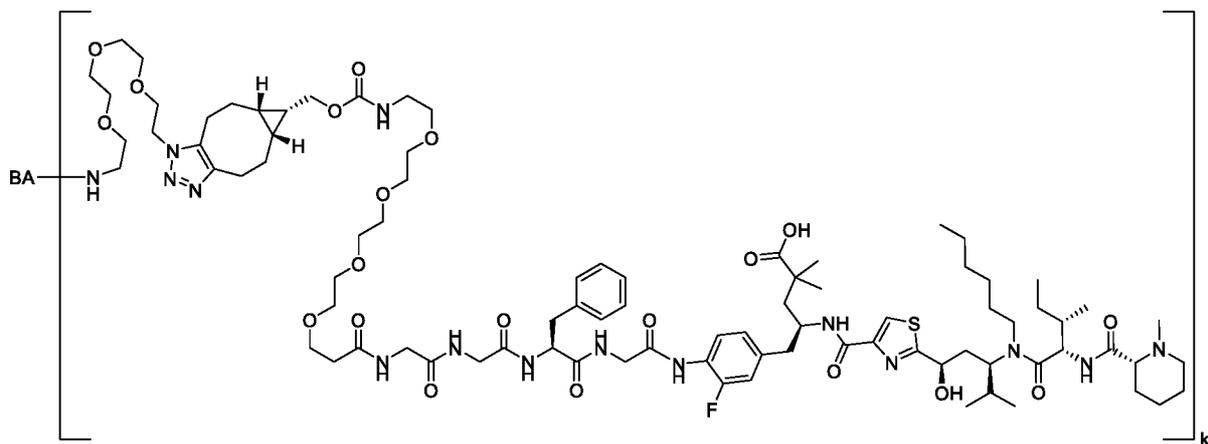
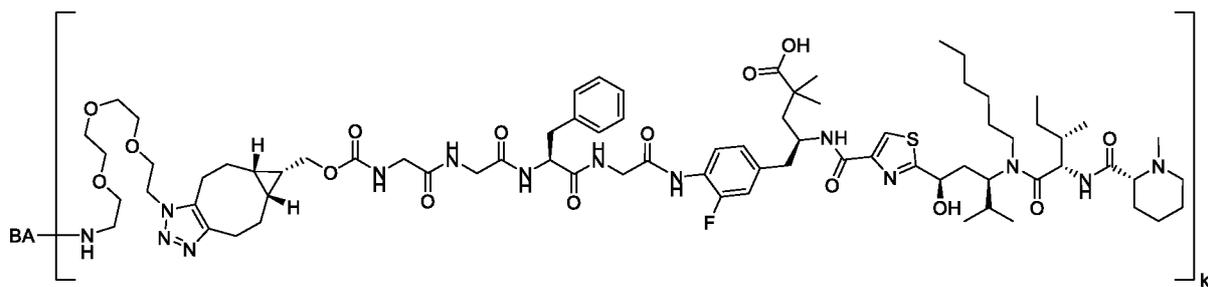
[00181] В определенных вариантах осуществления соединение Формулы **A'**, **B'**, **C'**, **D'** или **E'** выбирается из группы, состоящей из

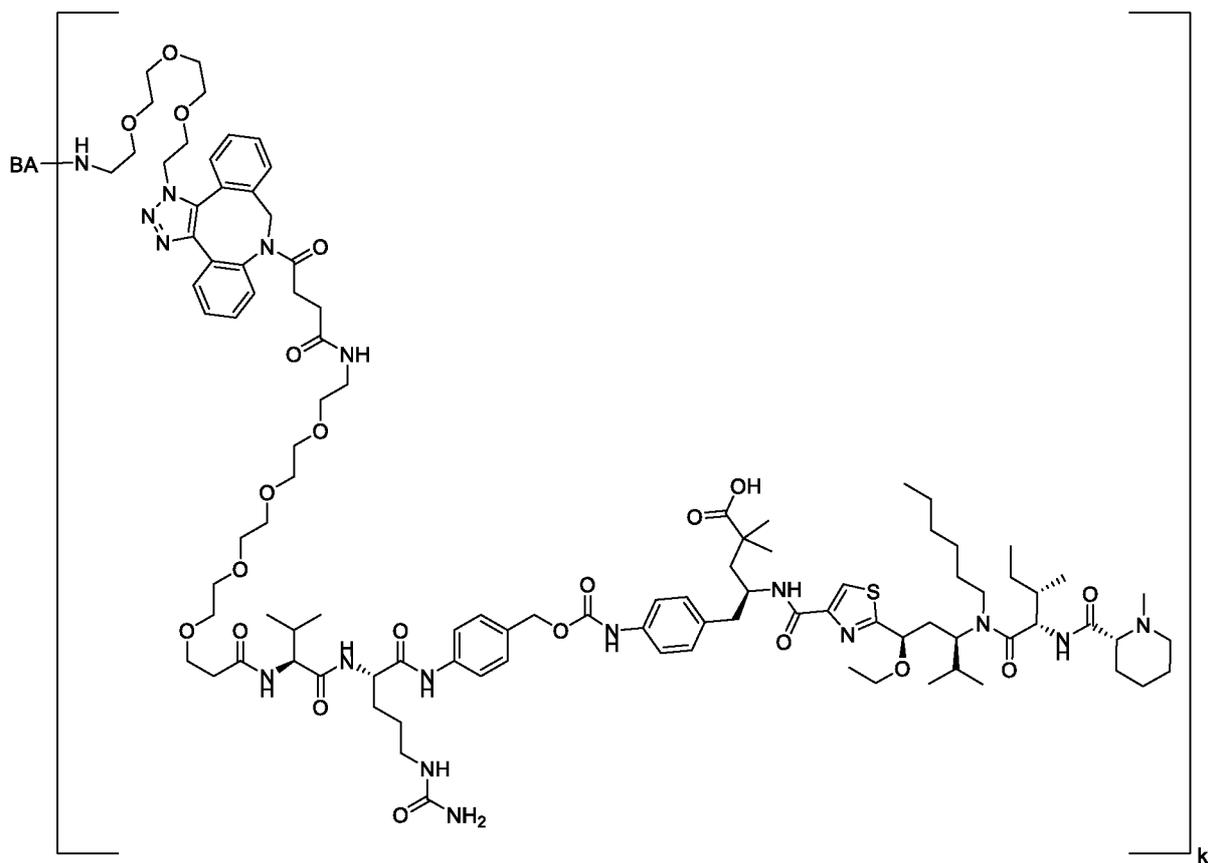
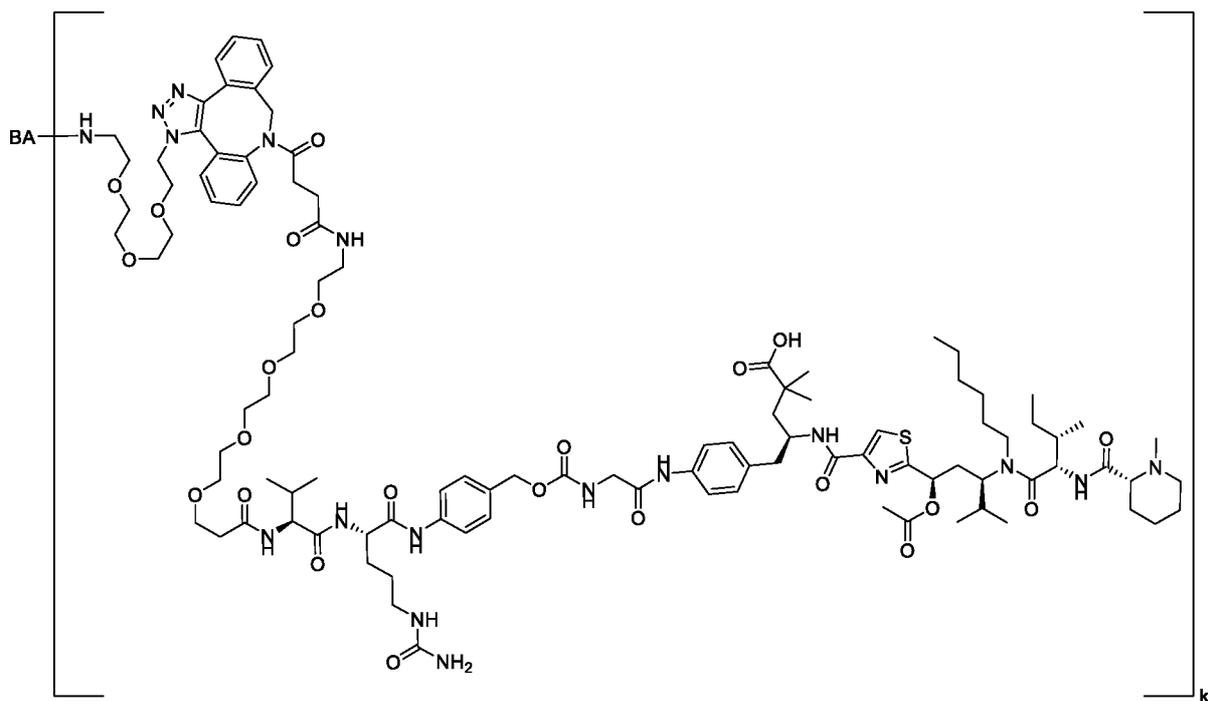


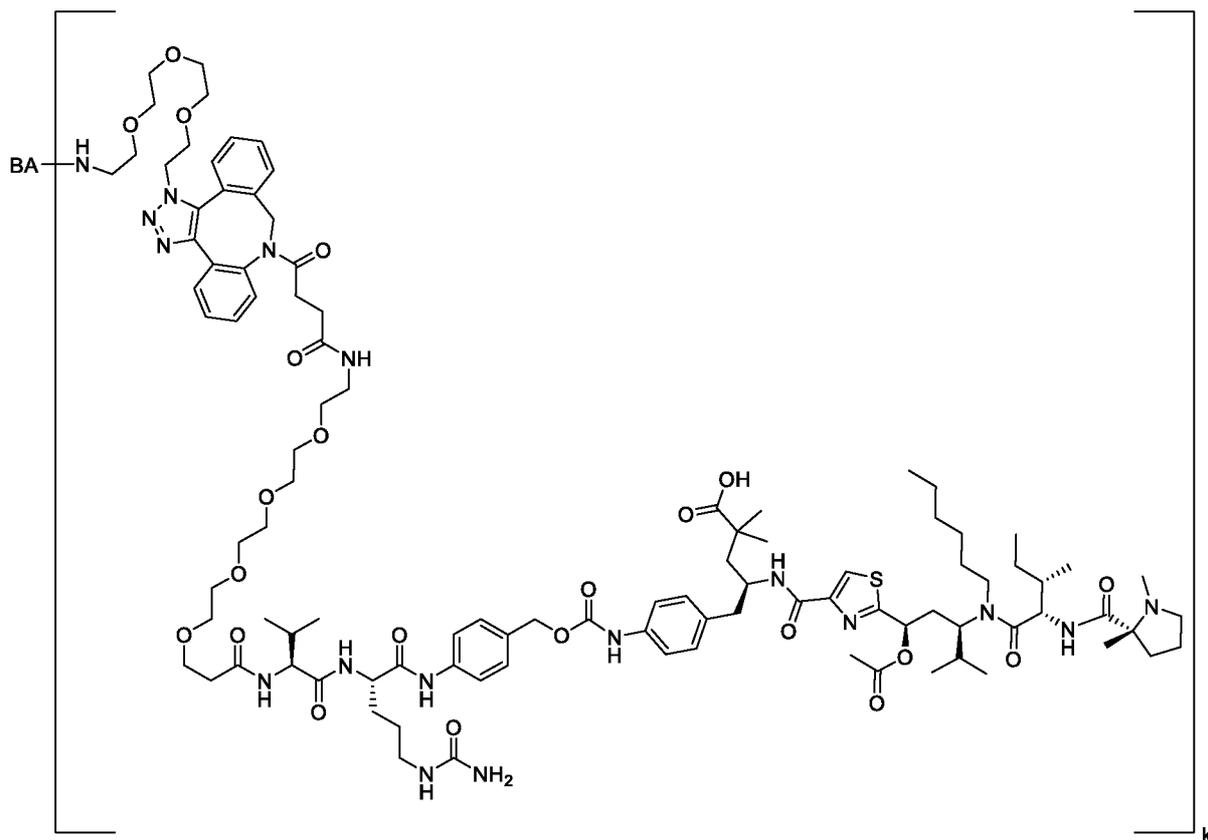
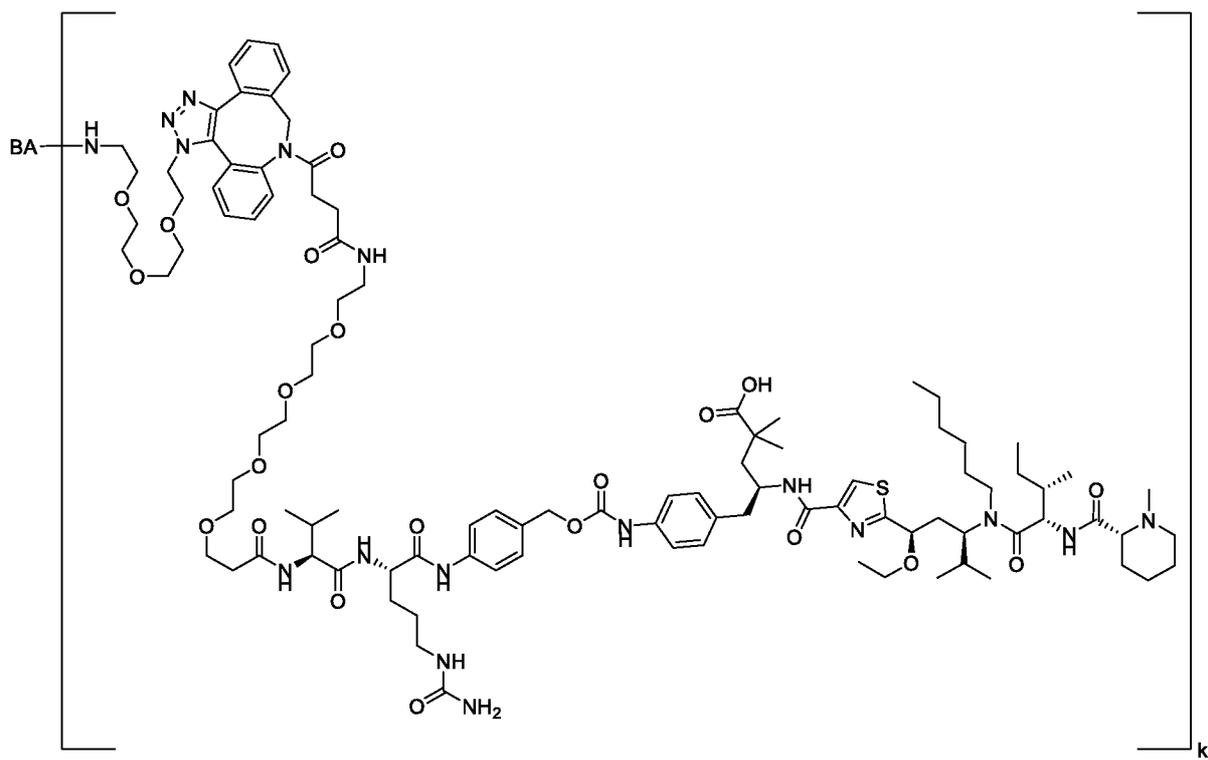


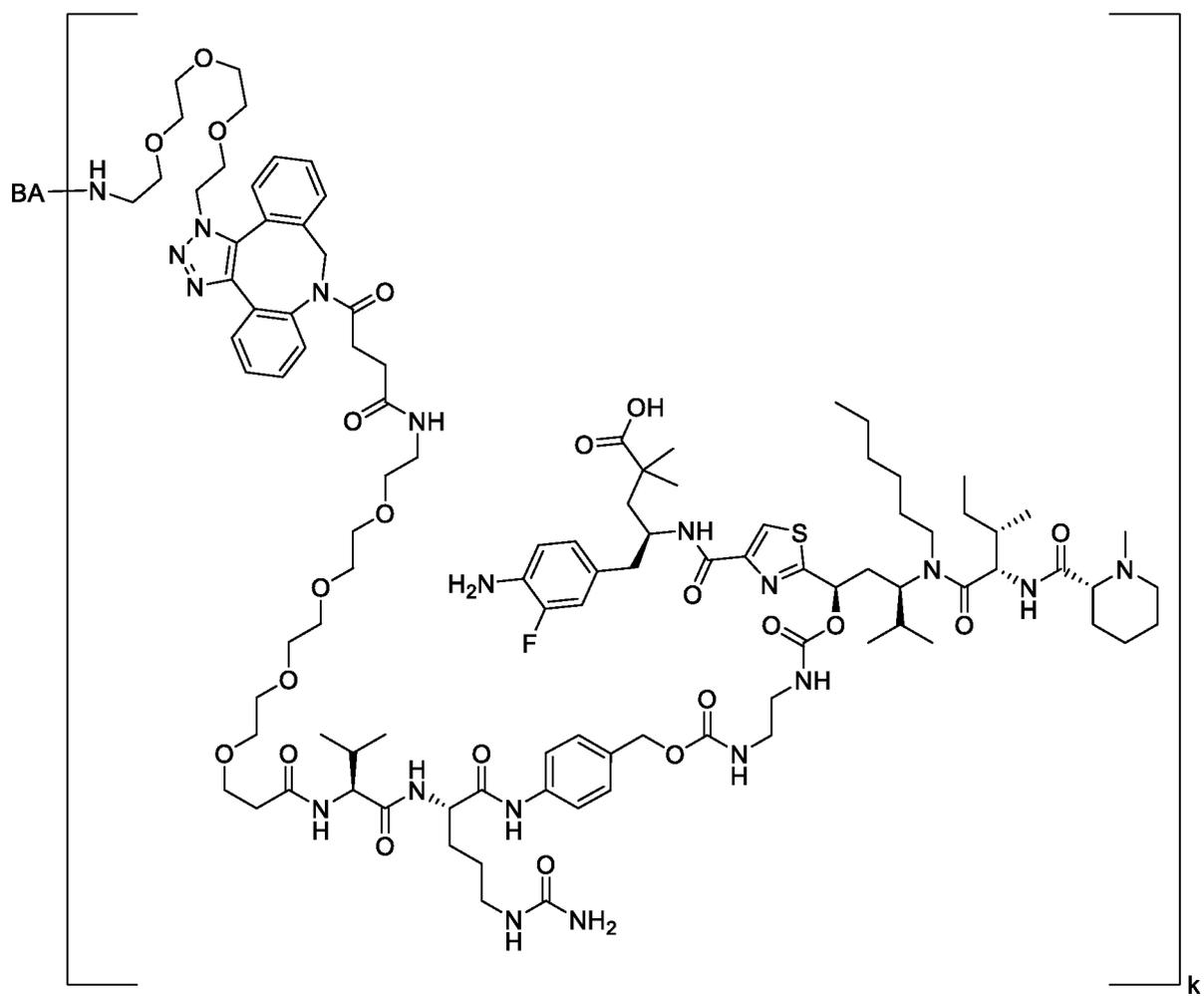
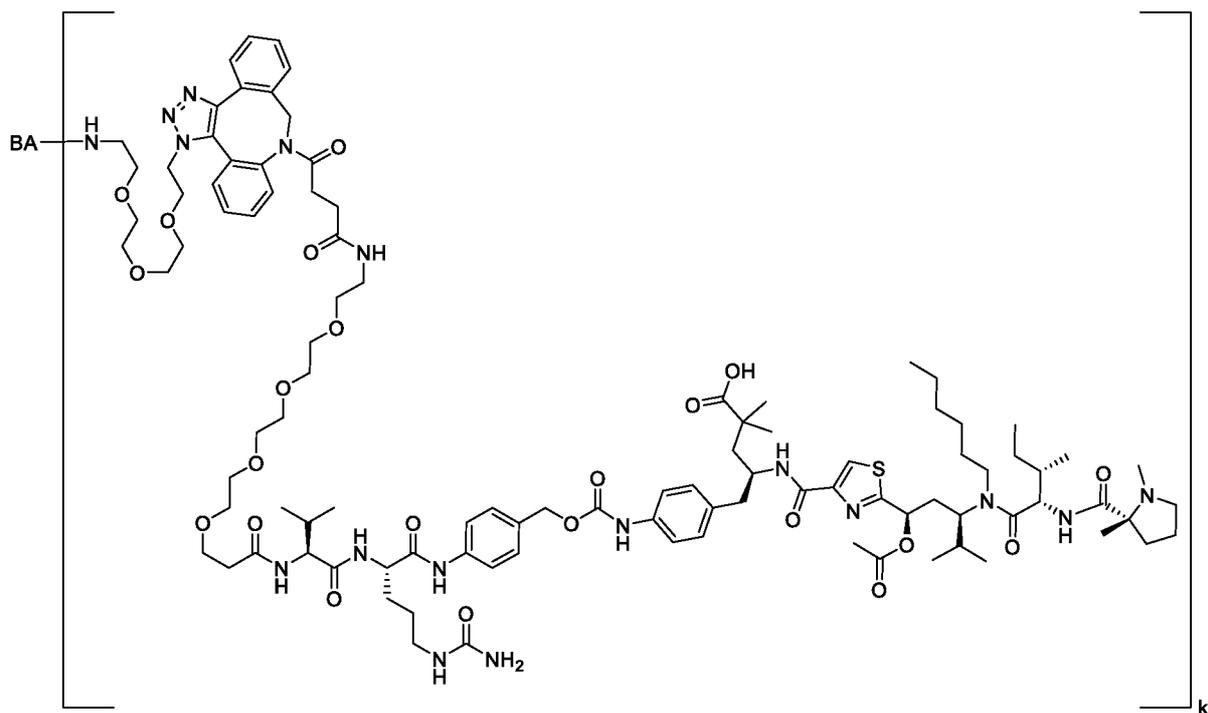


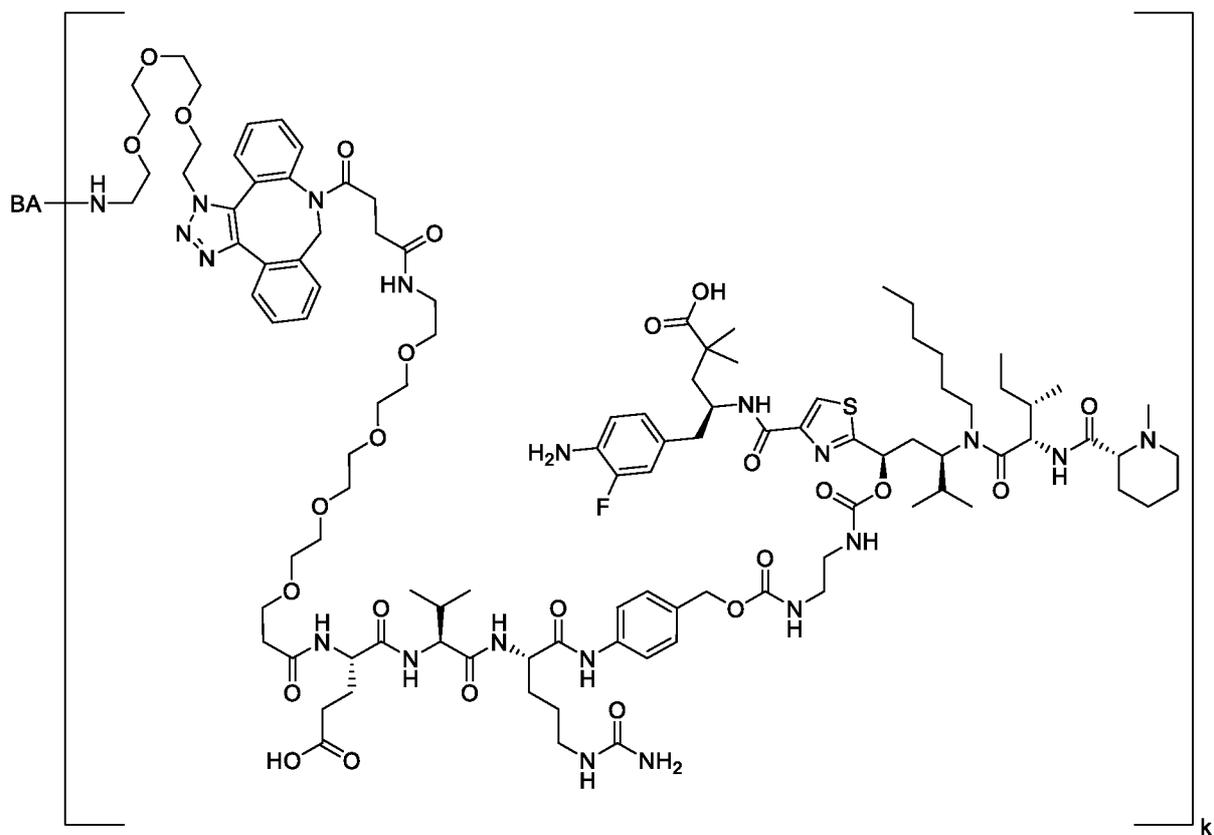
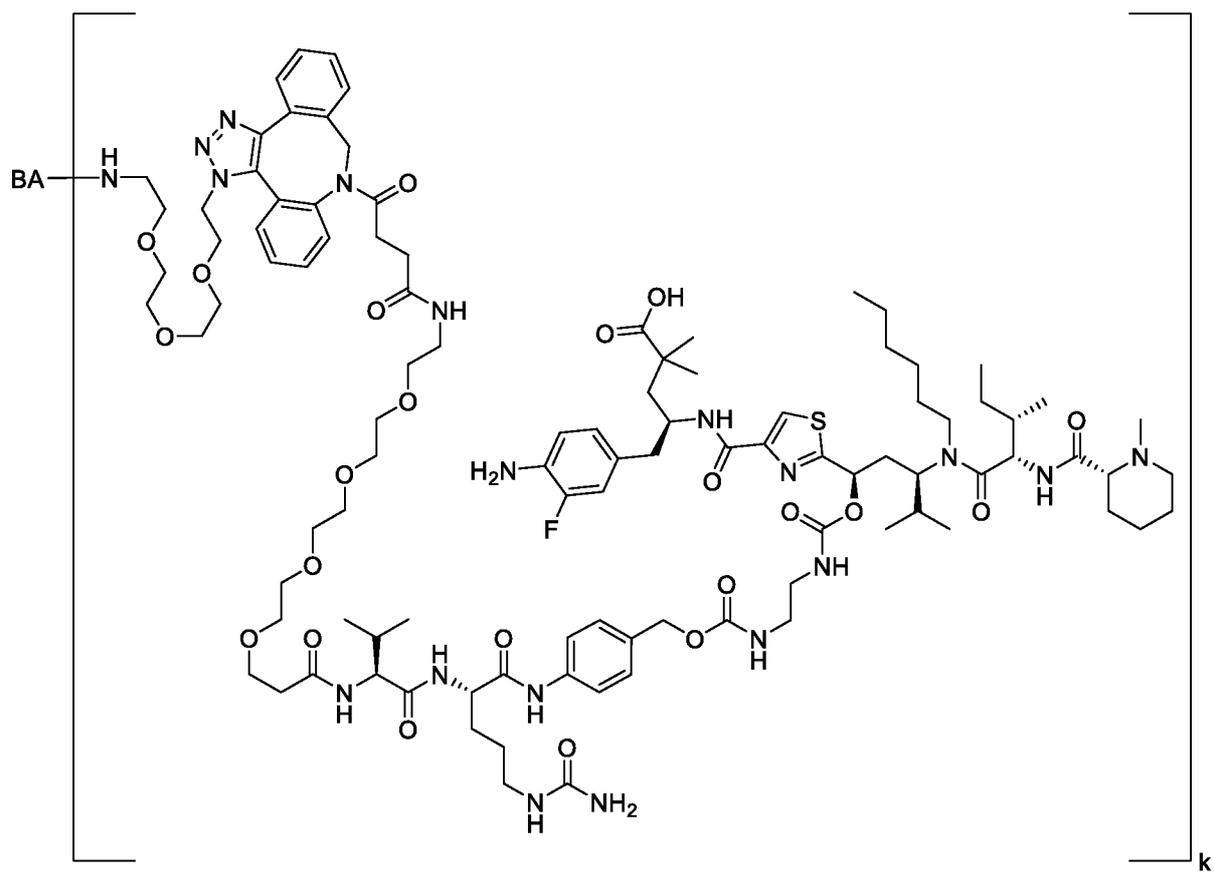


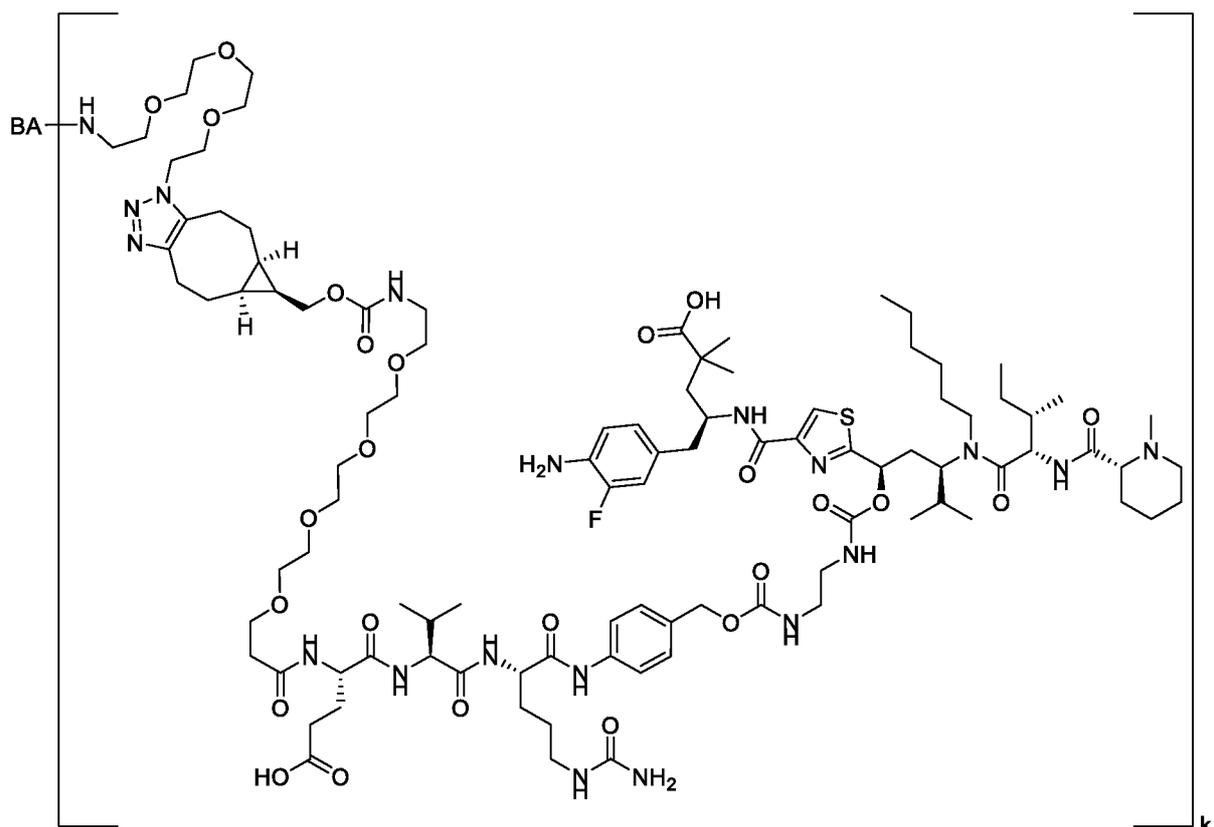
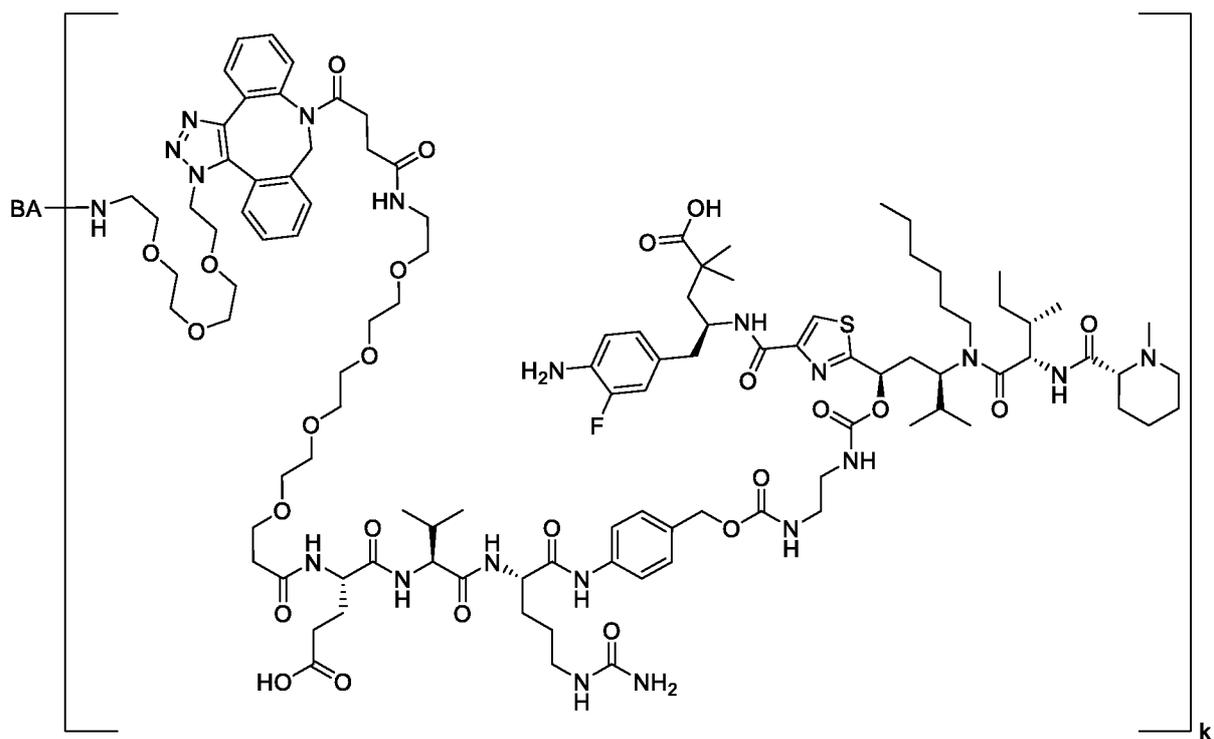


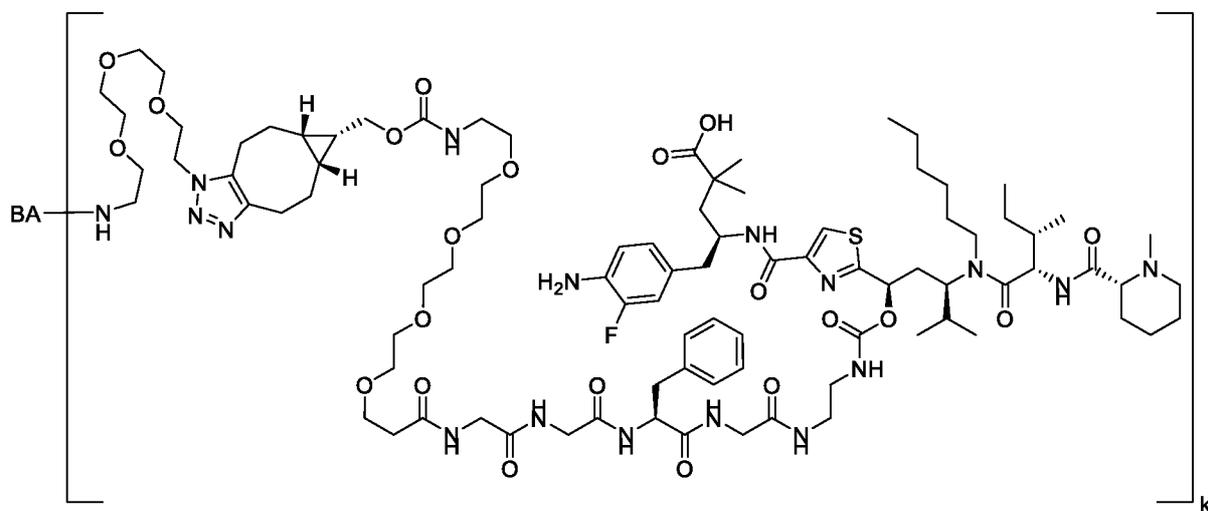
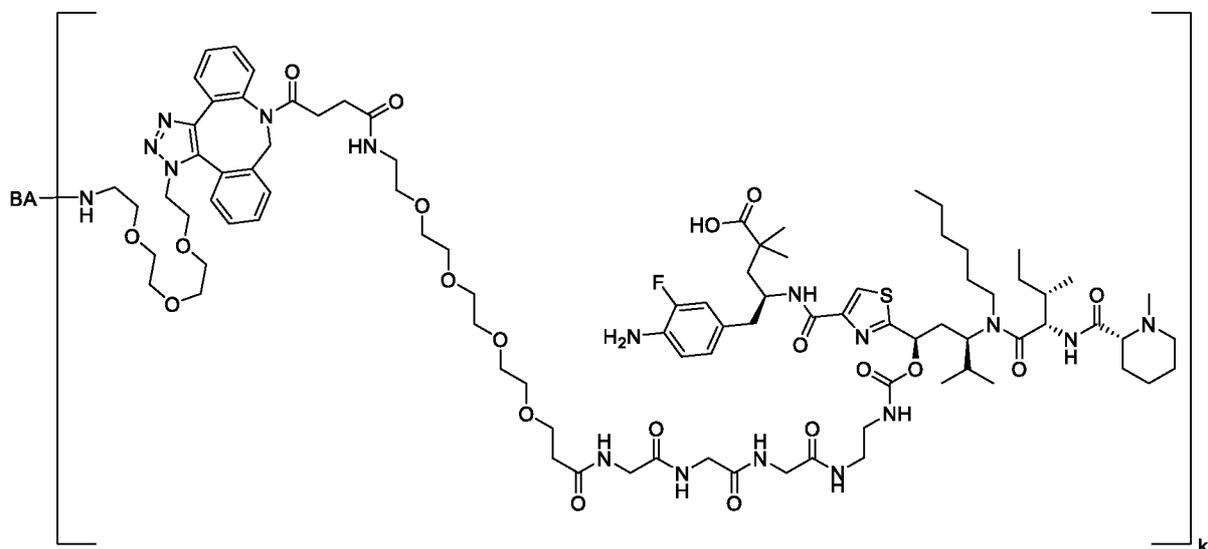
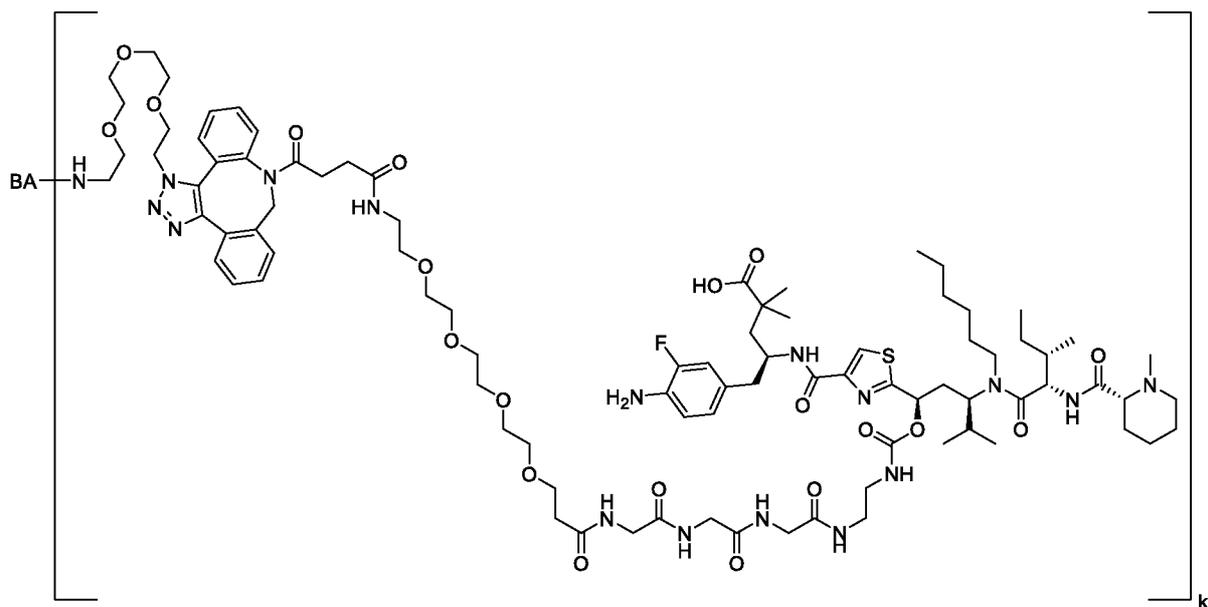


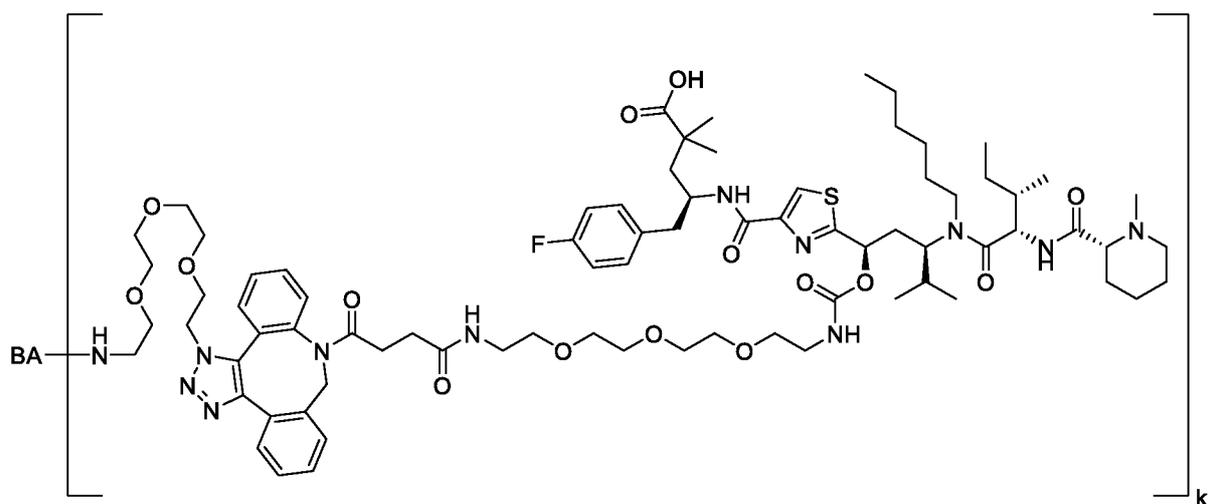
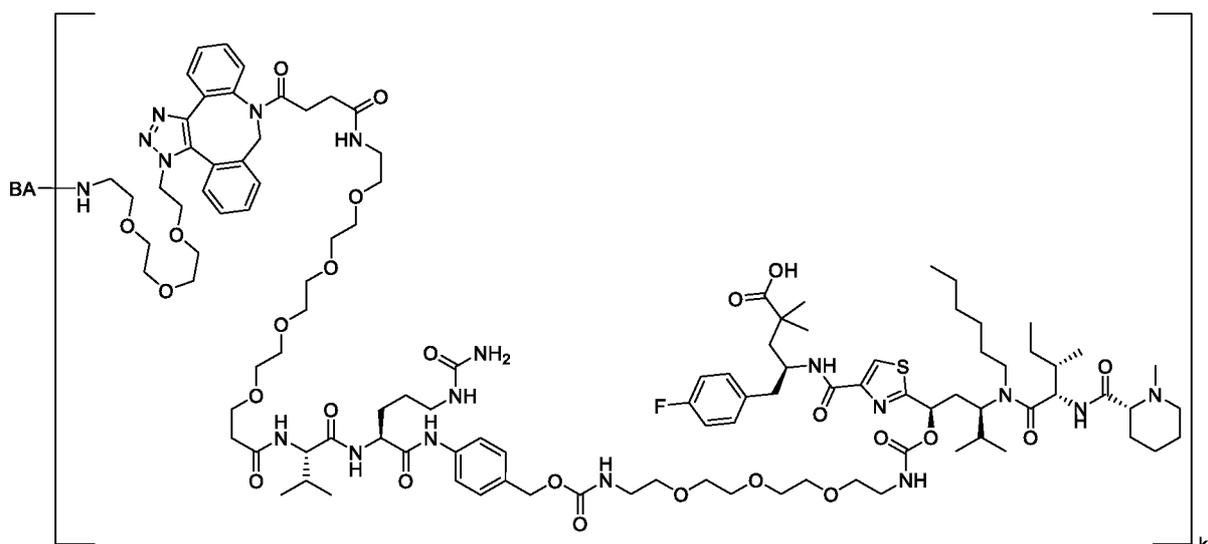
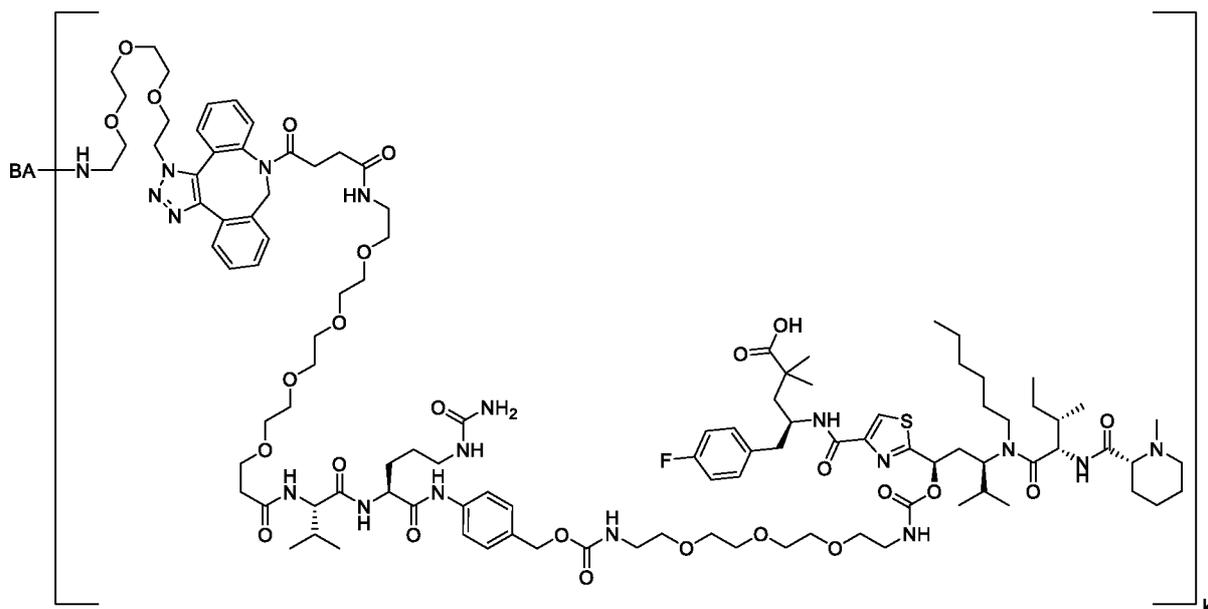


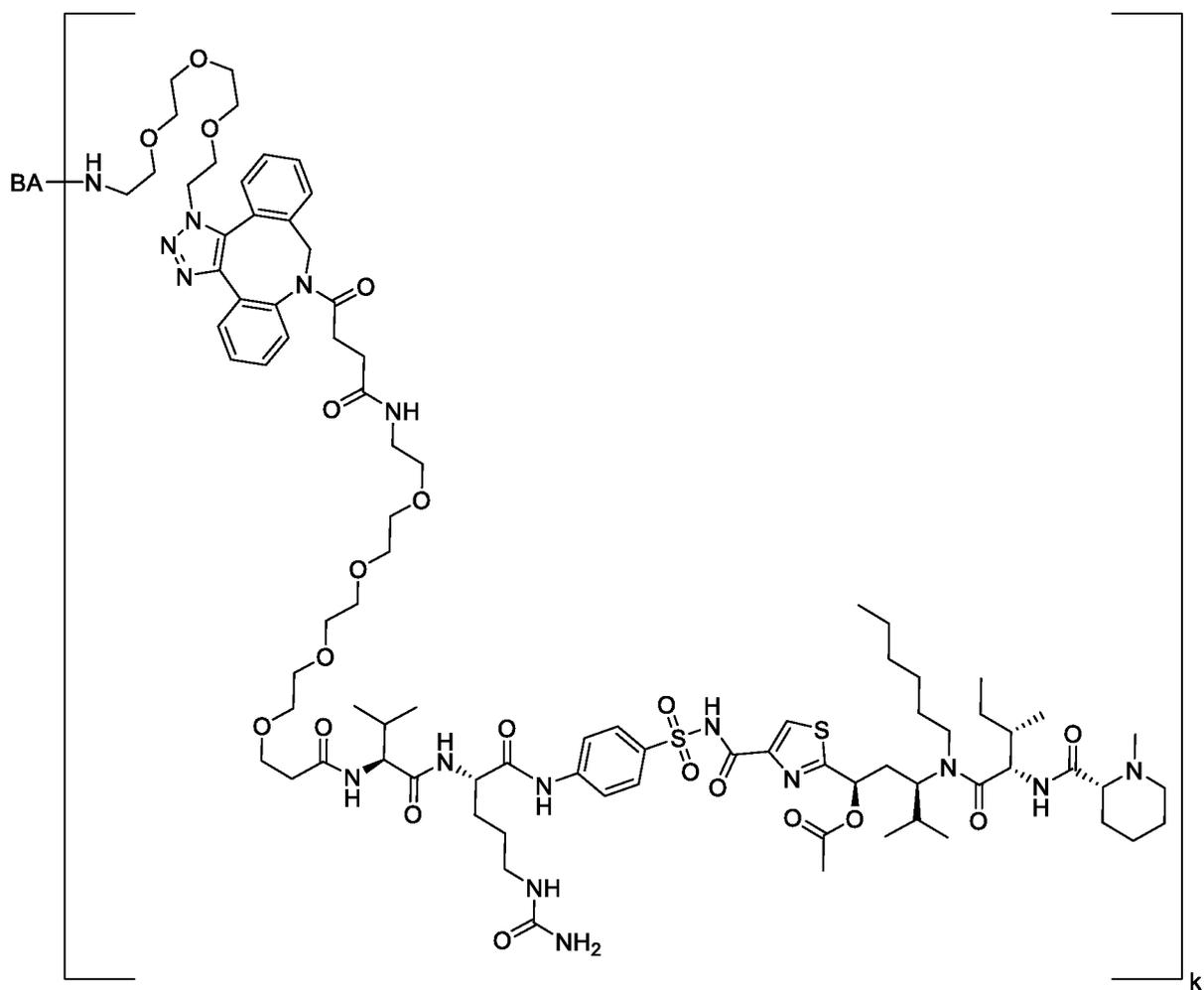
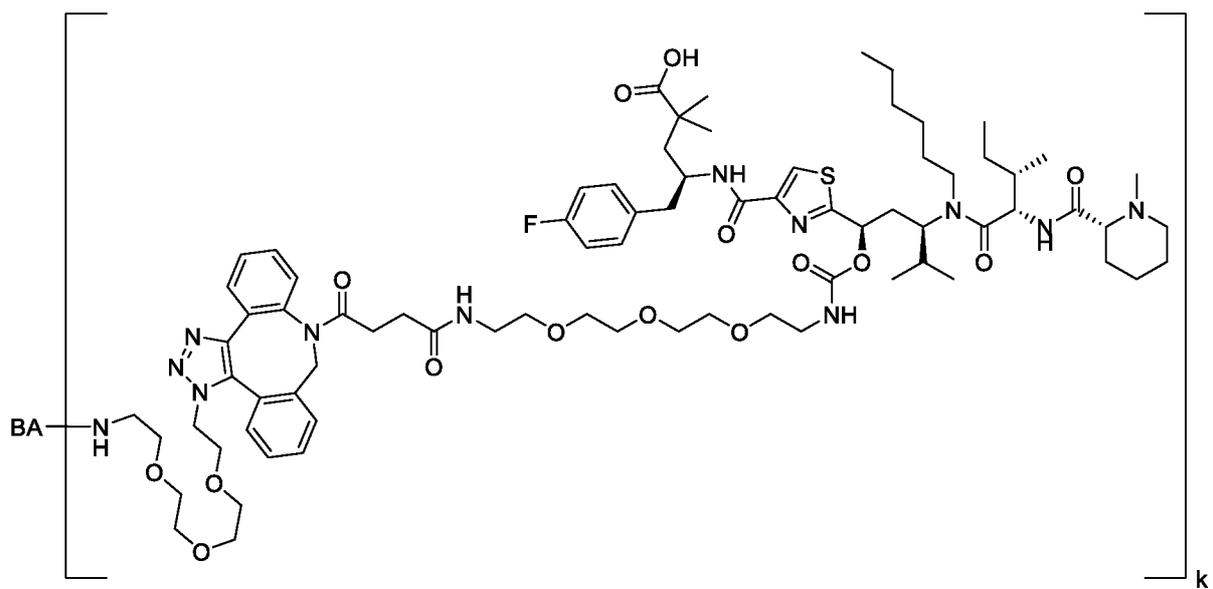


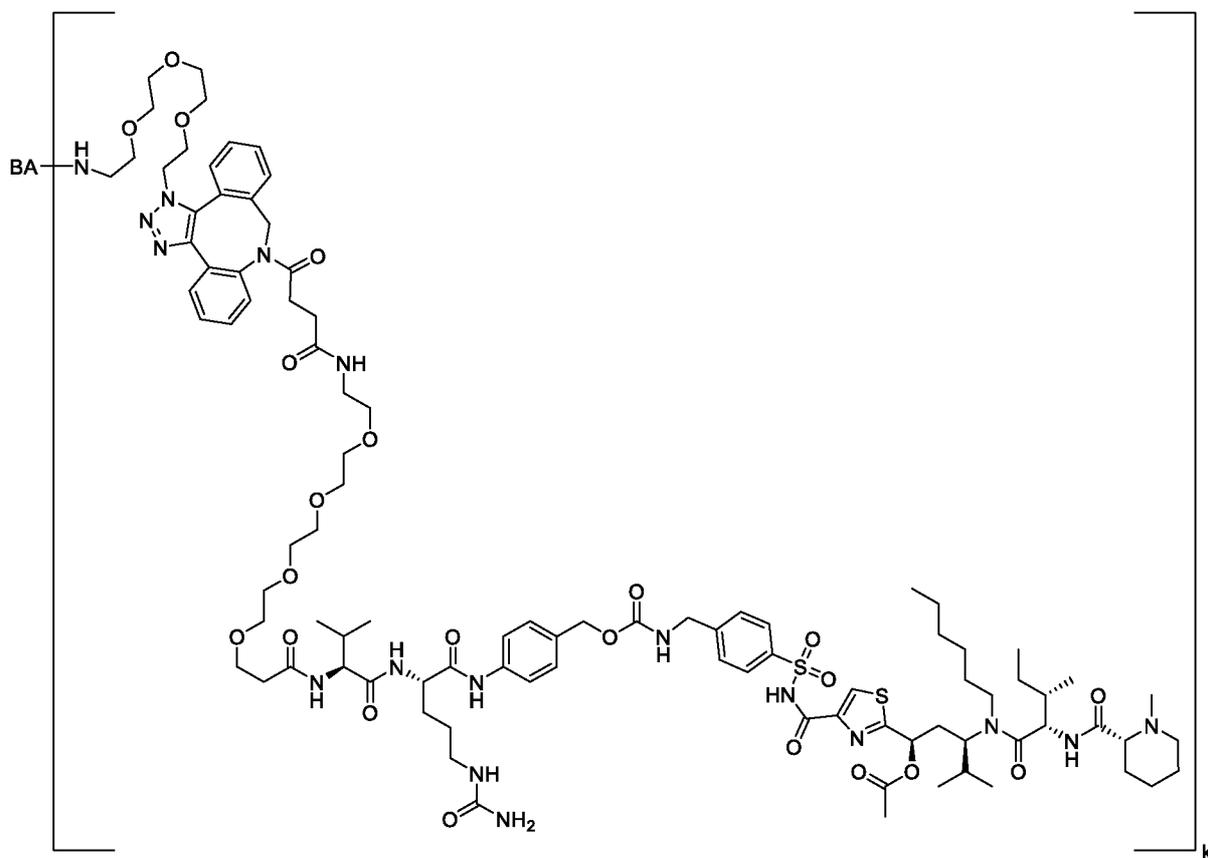
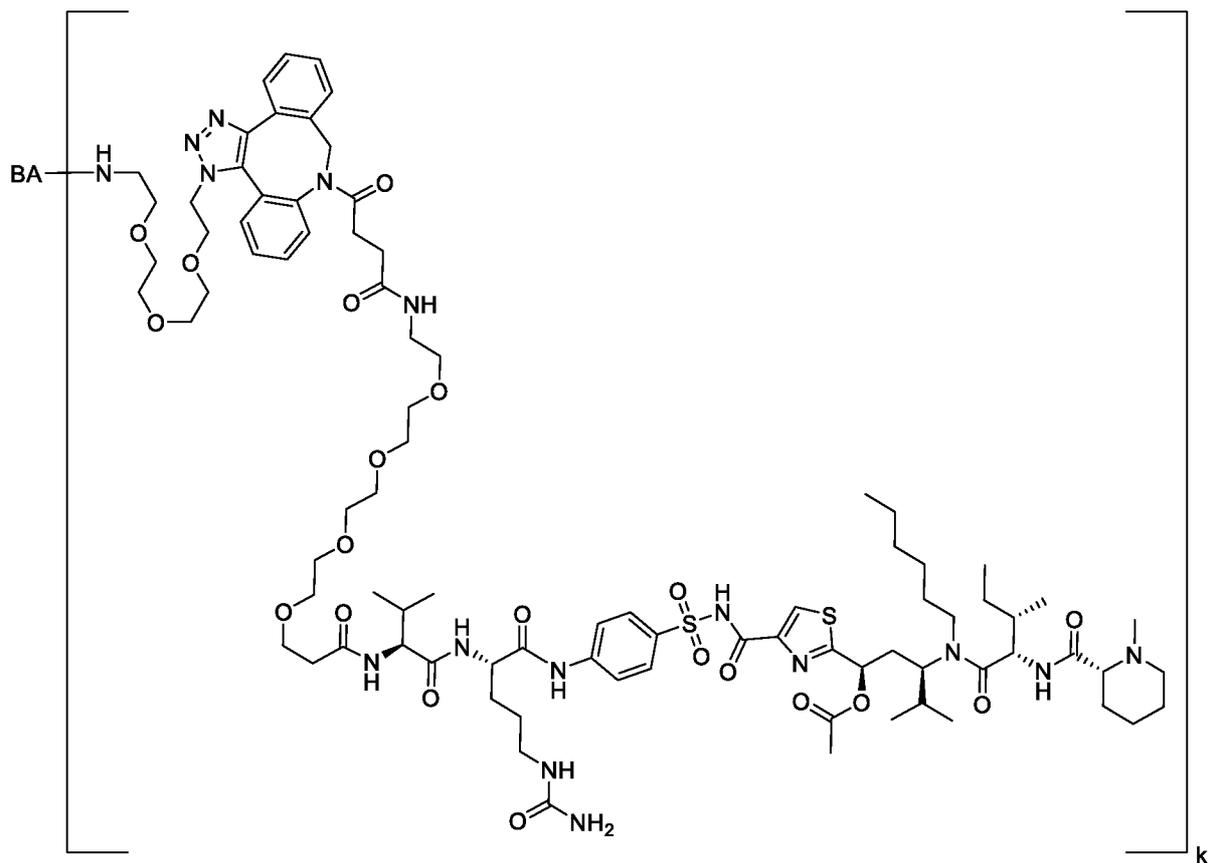


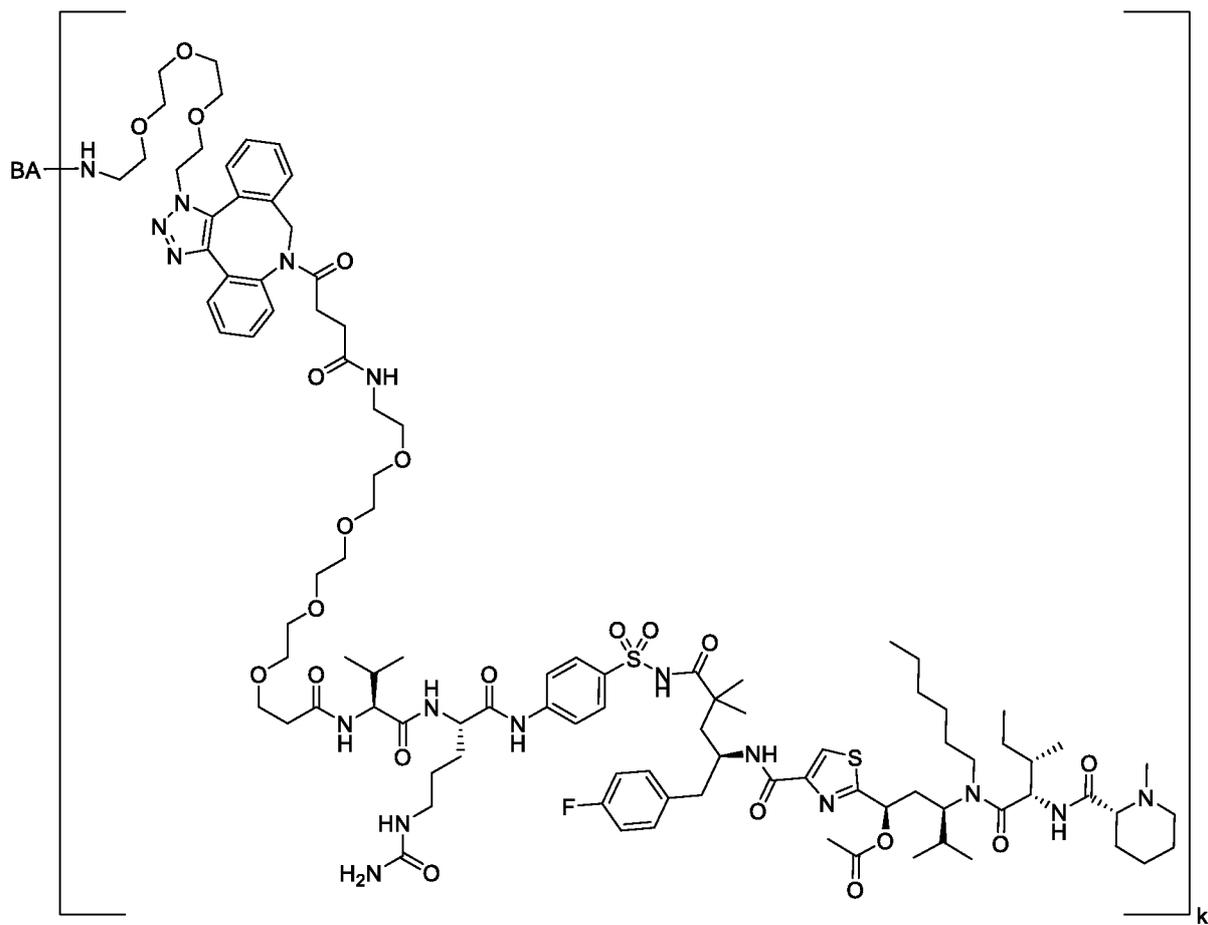
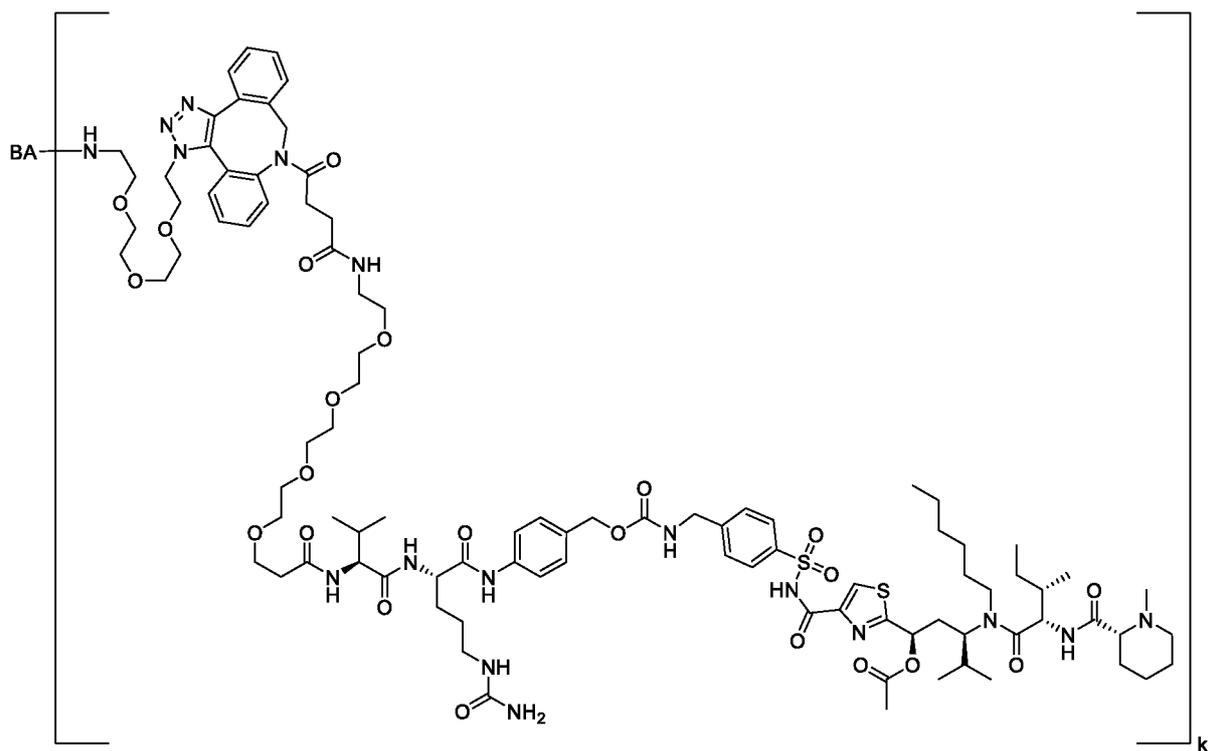


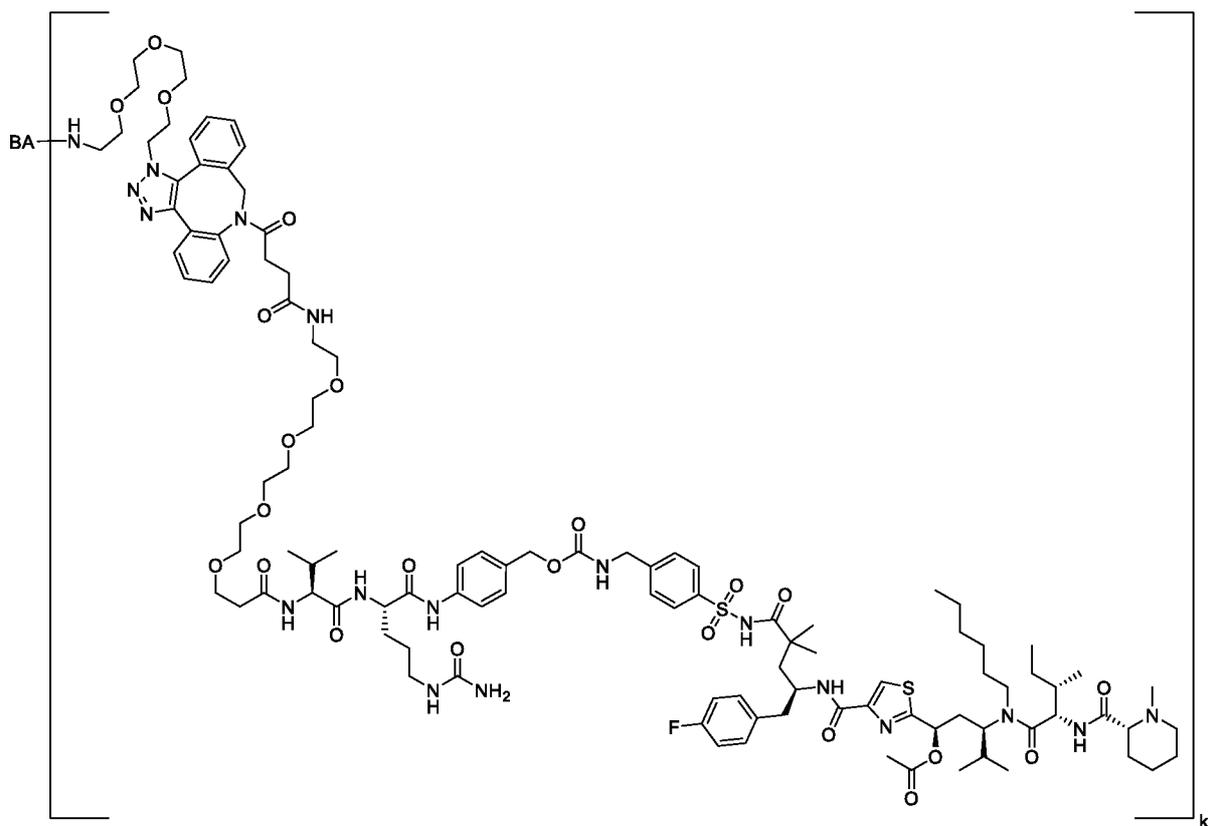
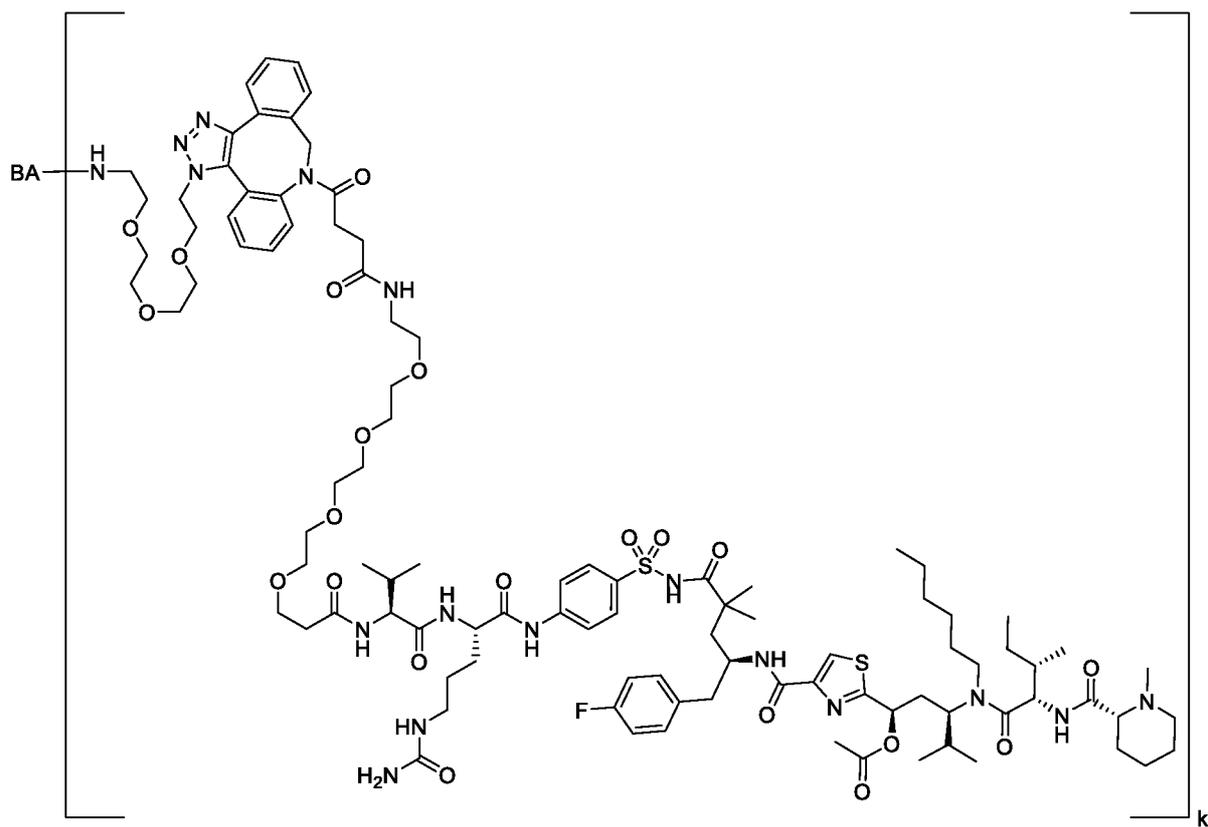


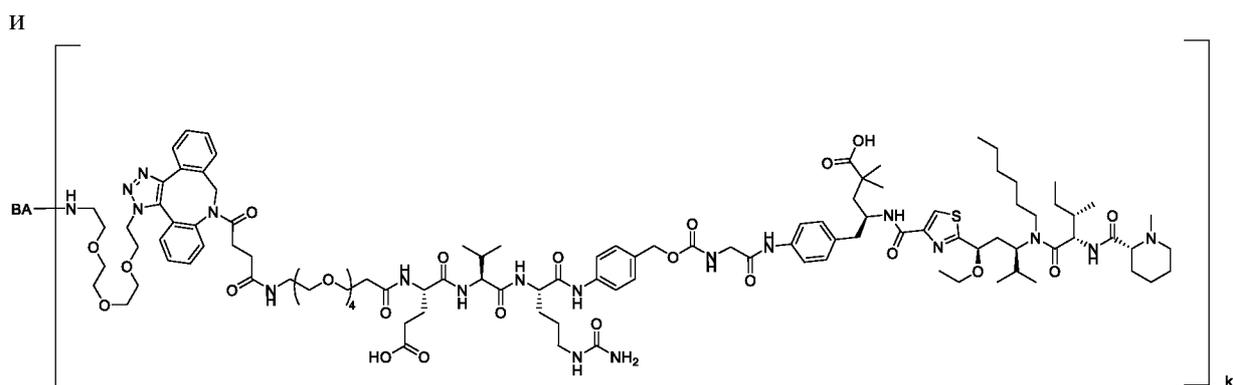
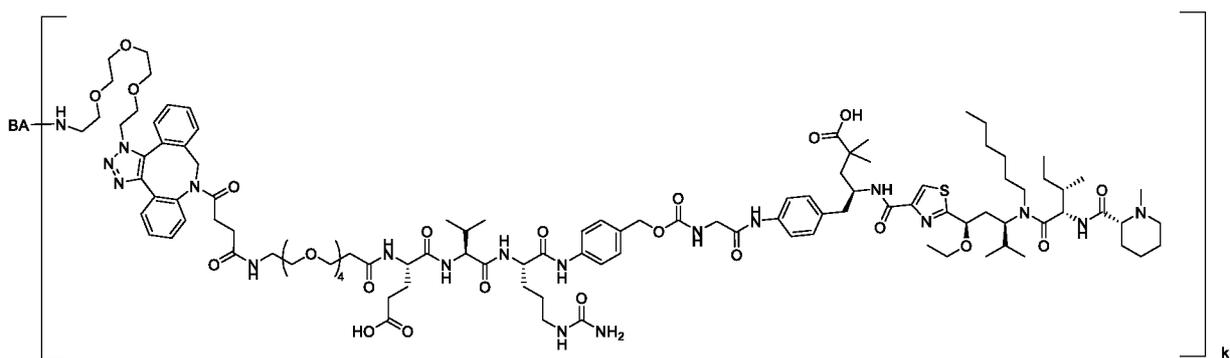
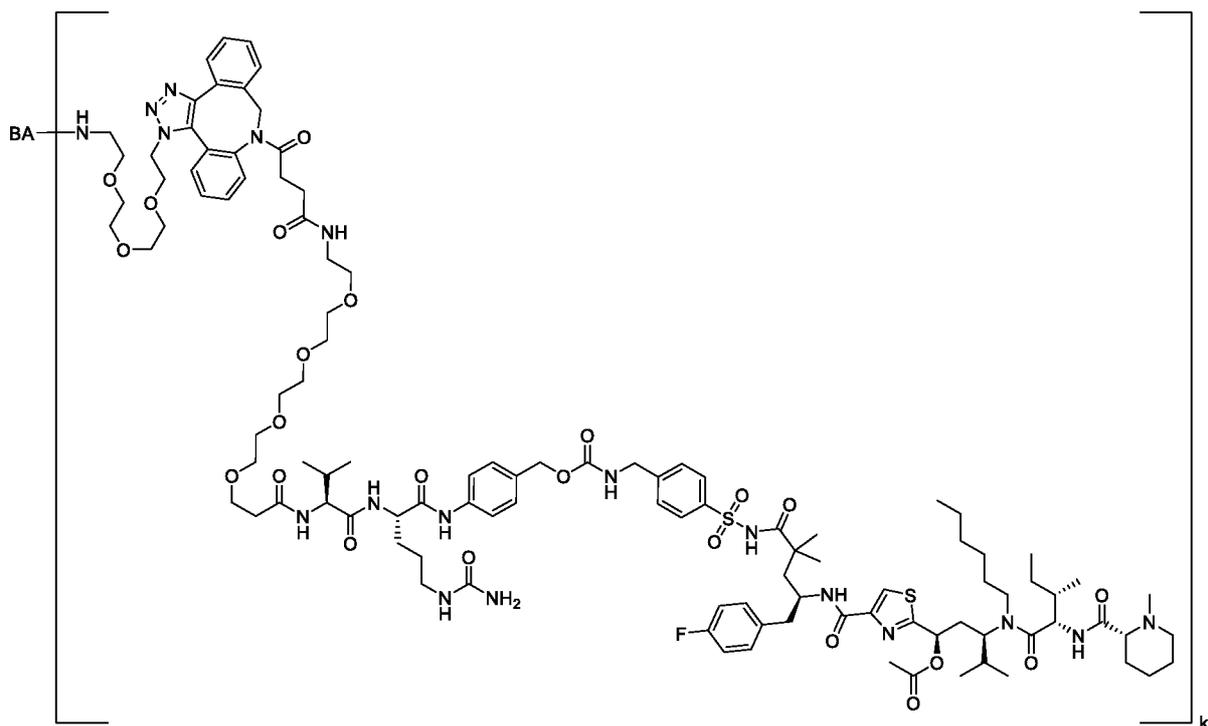








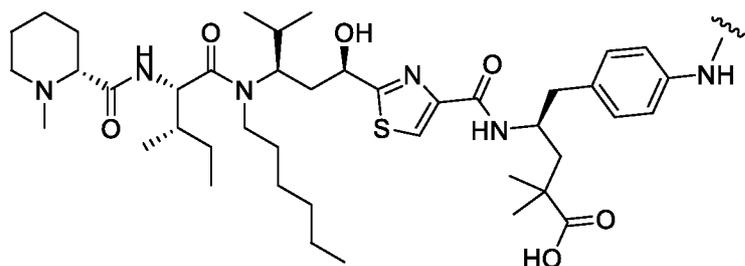
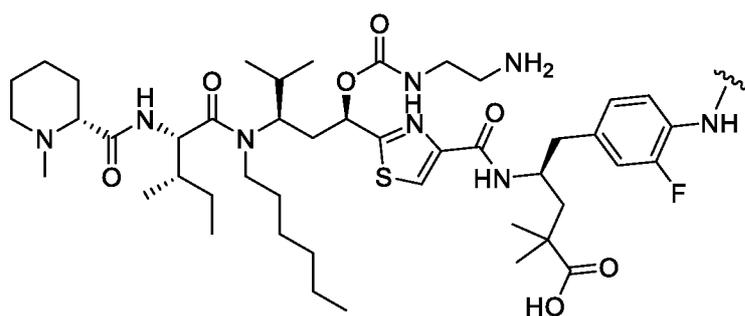
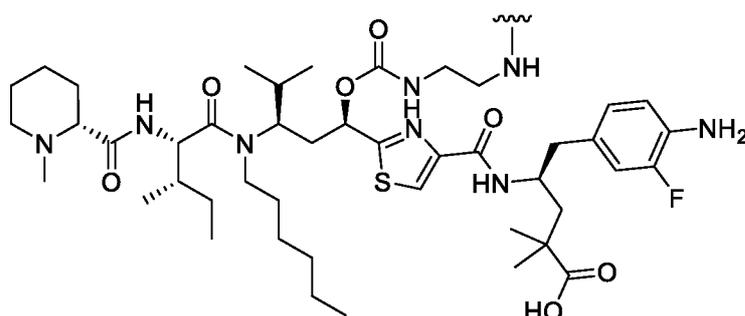
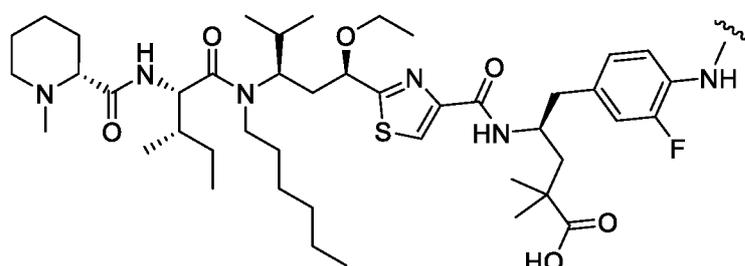
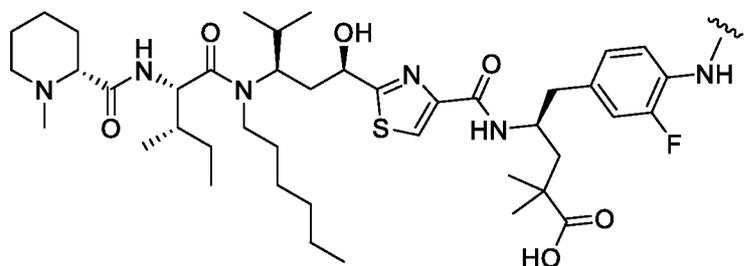


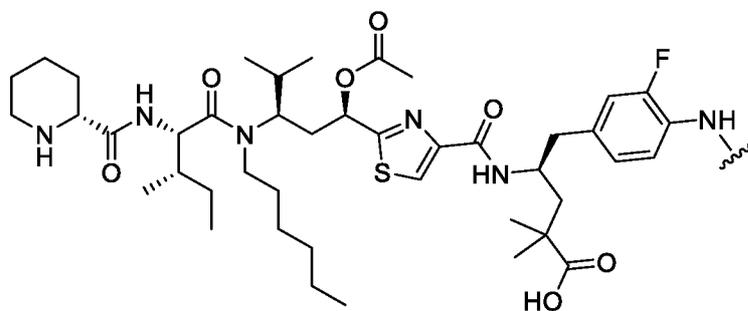
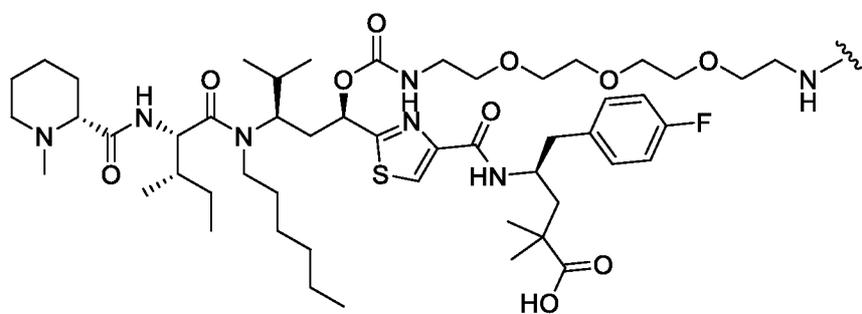
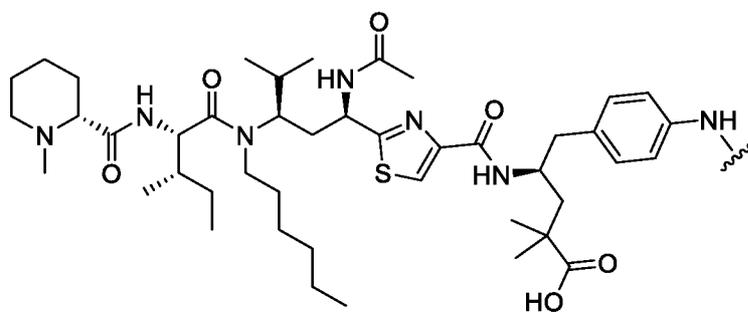
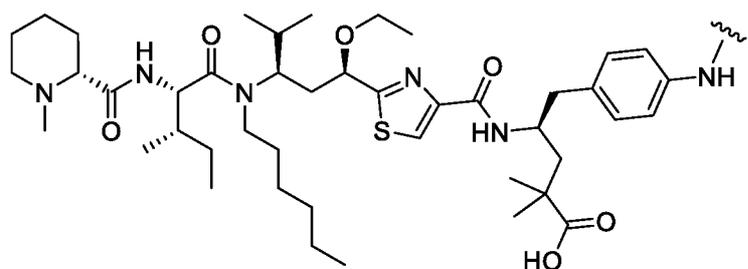
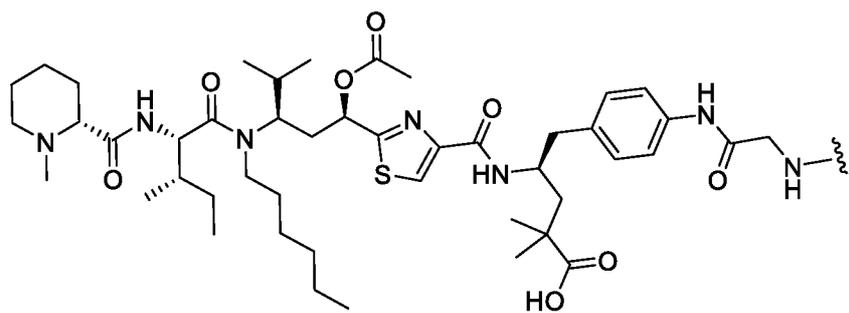


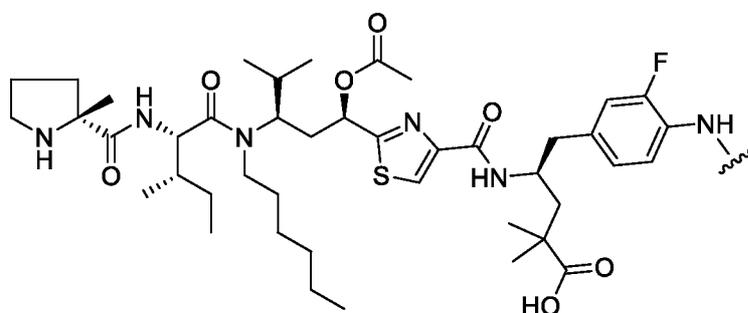
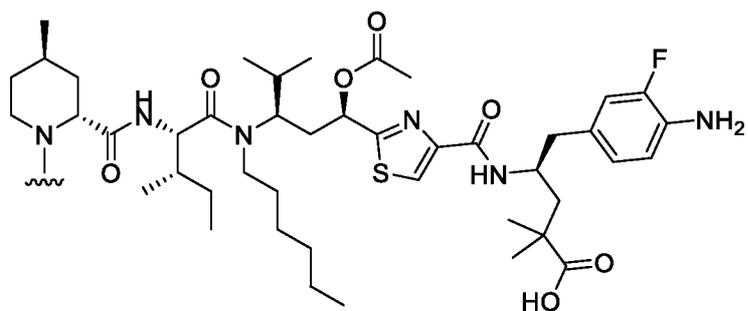
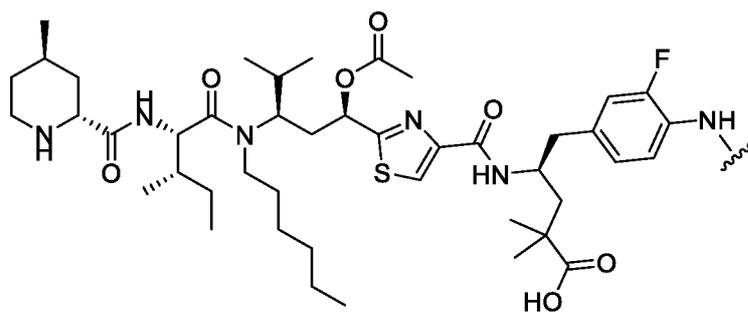
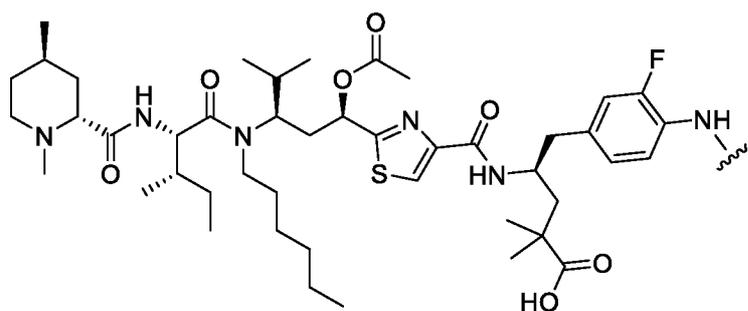
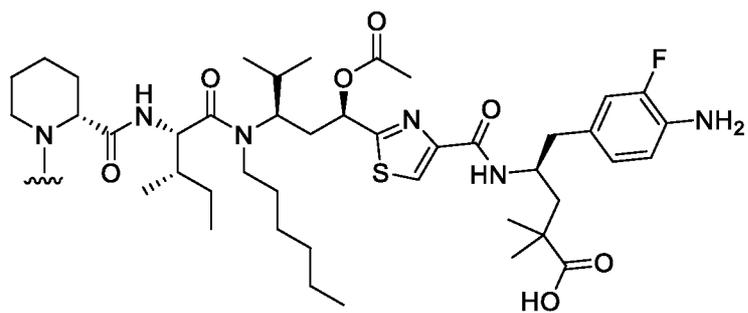
или их фармацевтически приемлемой соли, при этом **ВА** представляет собой связующий агент; и **k** имеет значение 1, 2, 3 или 4.

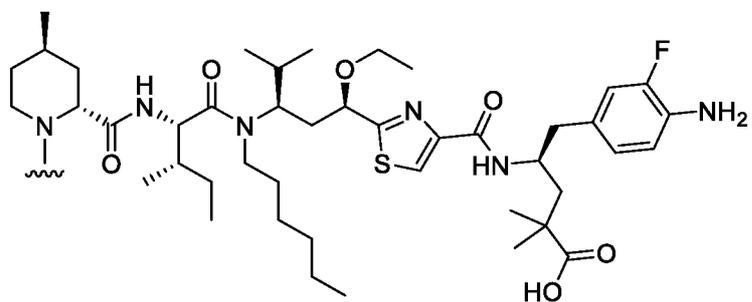
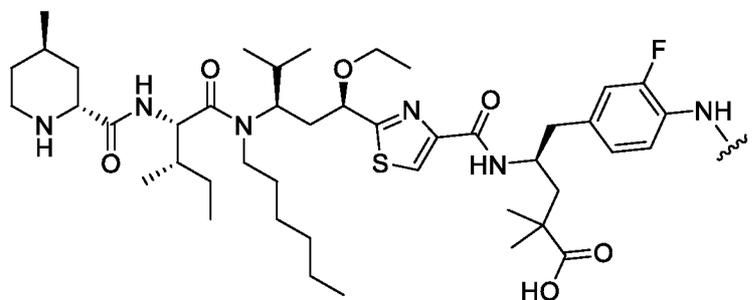
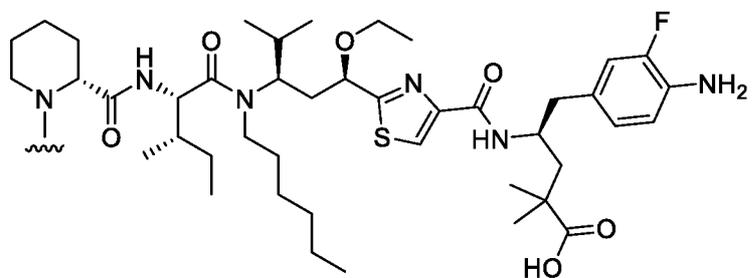
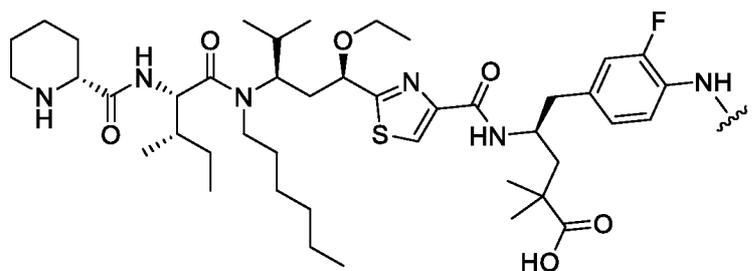
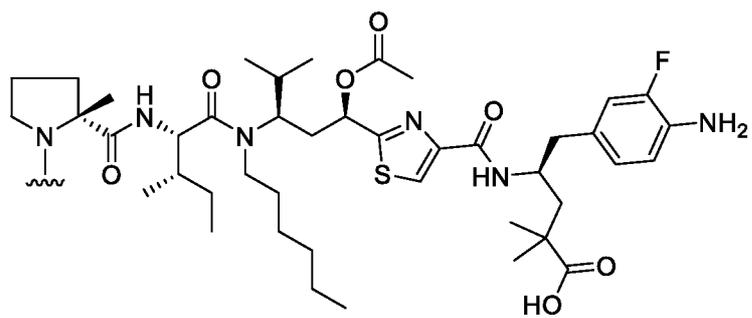
[00182] В определенных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть конъюгированы напрямую или посредством линкера с любым одним или более соединениями Формул I, Ia, II, III, IV, V и/или VI,

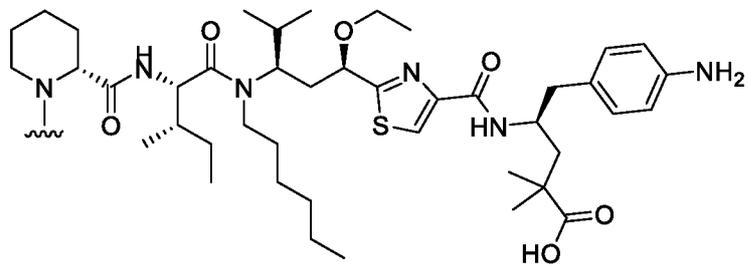
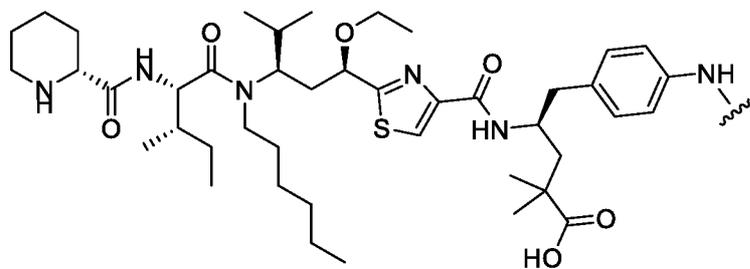
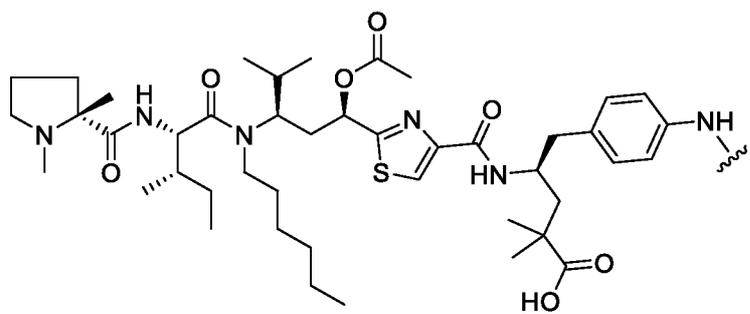
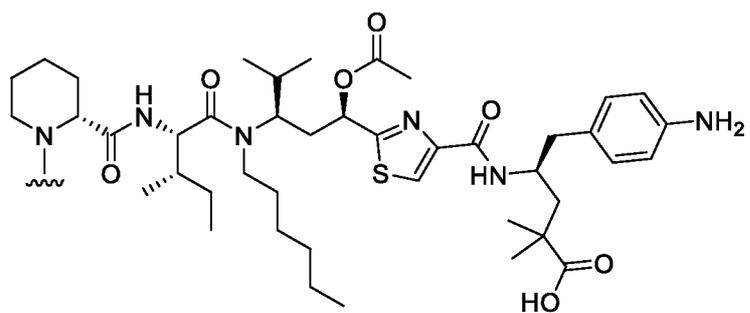
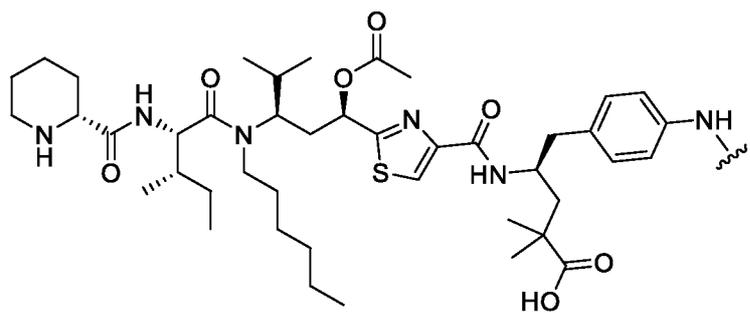
описанными в настоящем документе. В одном варианте осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с одним или более соединениями Формул I, Ia, II, III, IV, V и/или VI, описанными в настоящем документе, выбираемыми из группы, состоящей из

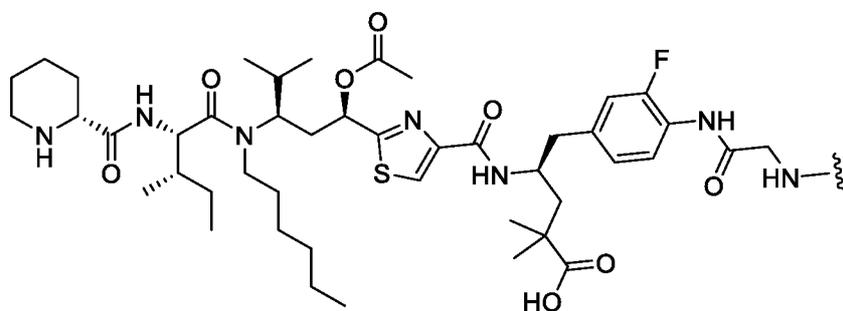
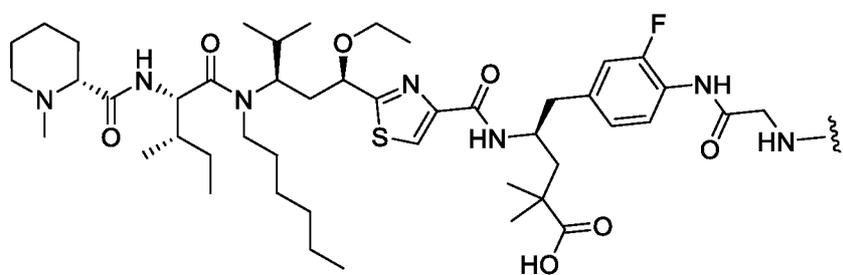
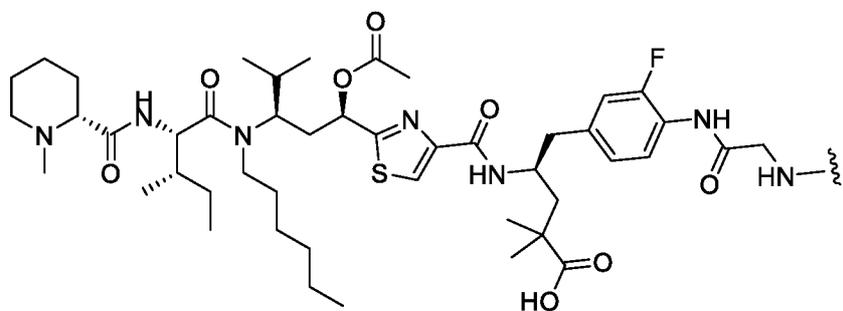
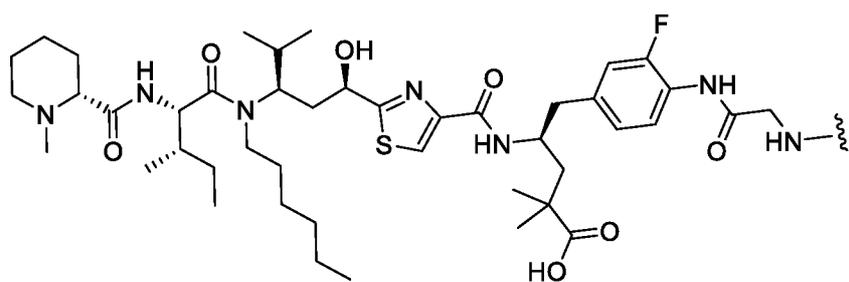
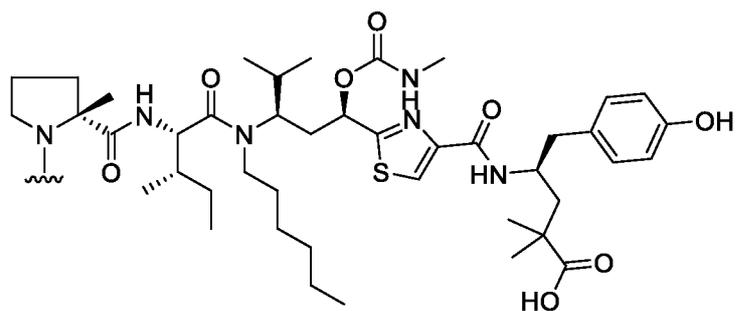


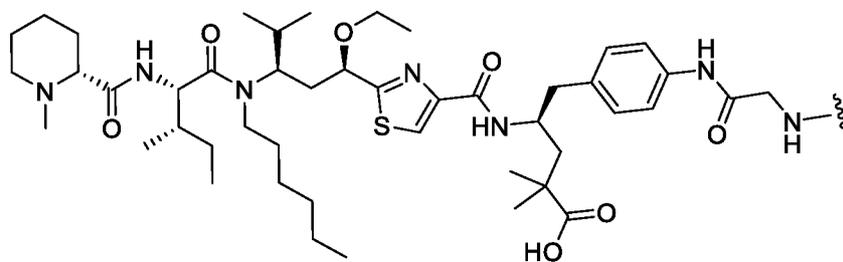
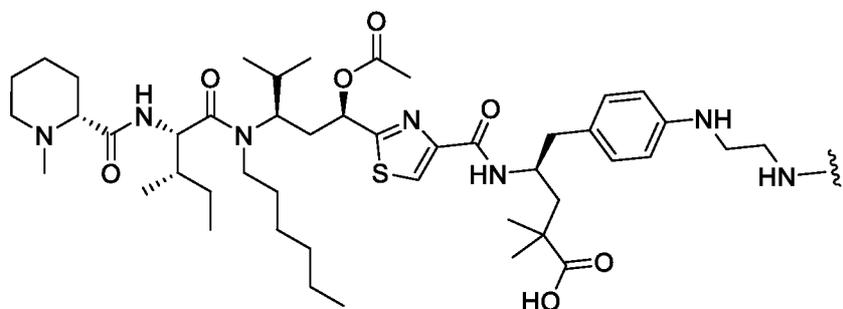
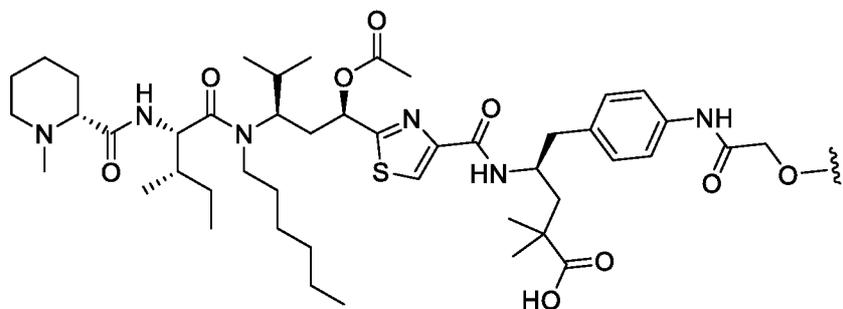
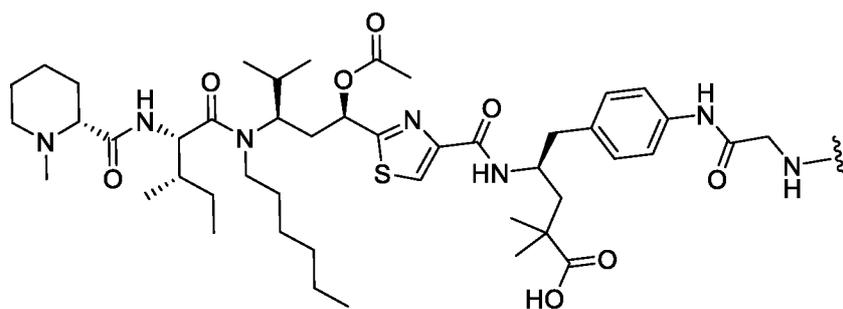
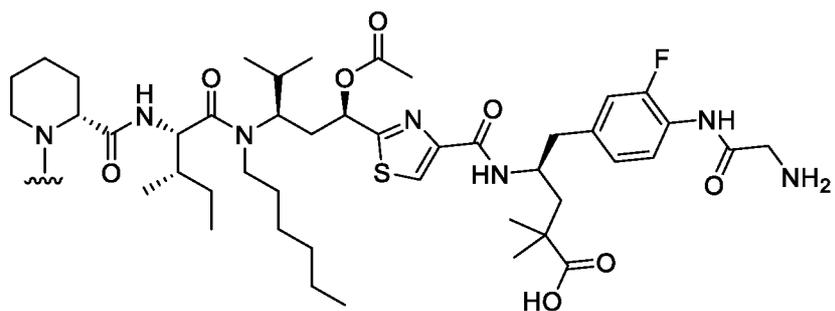


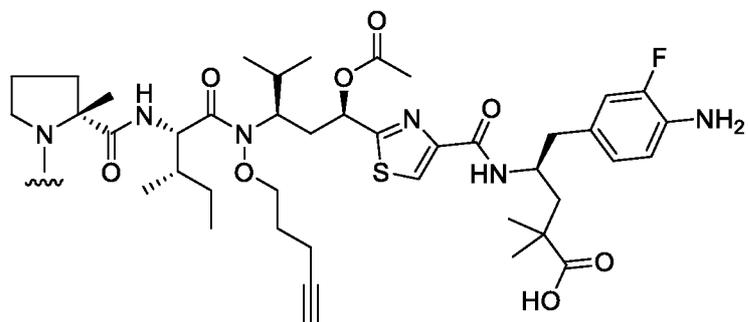
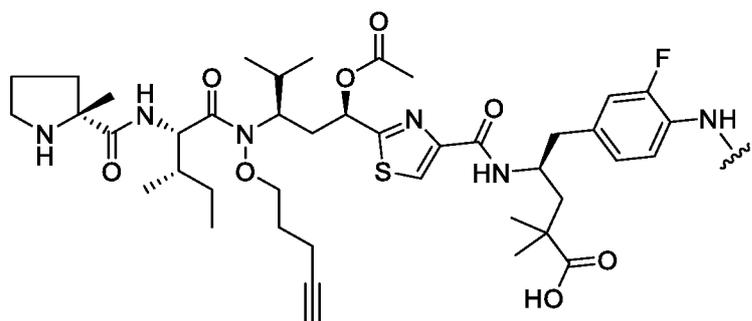
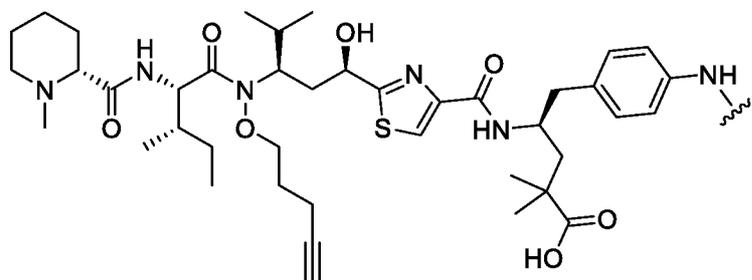
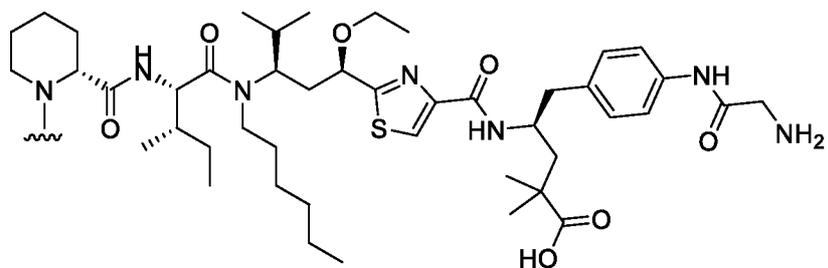
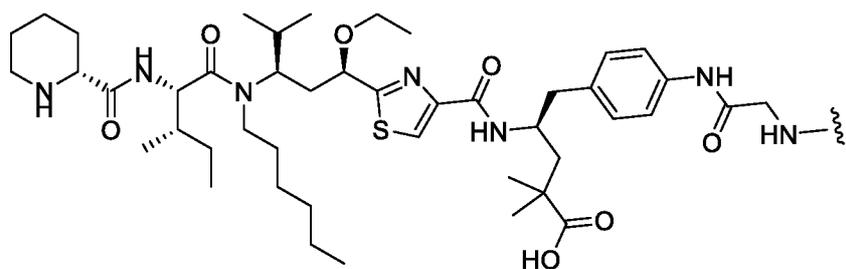


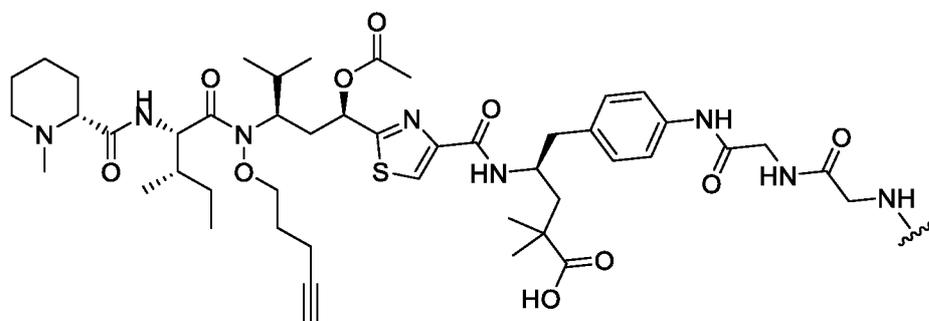
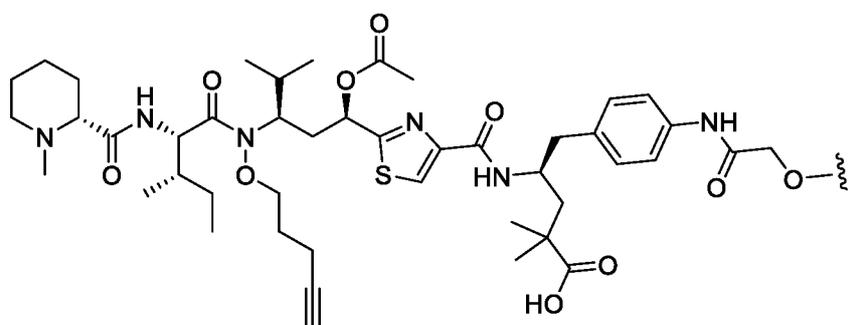
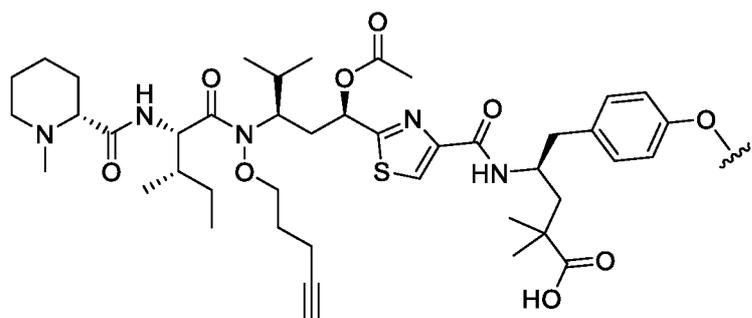
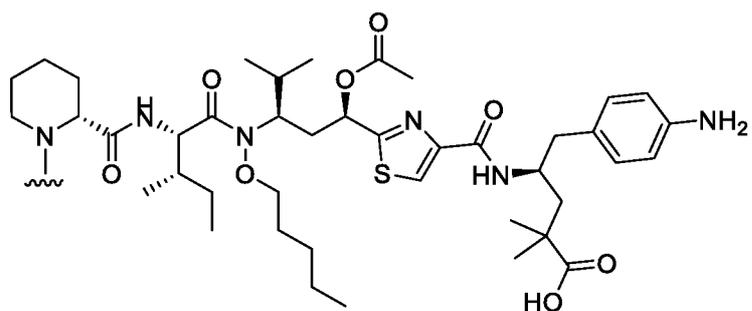
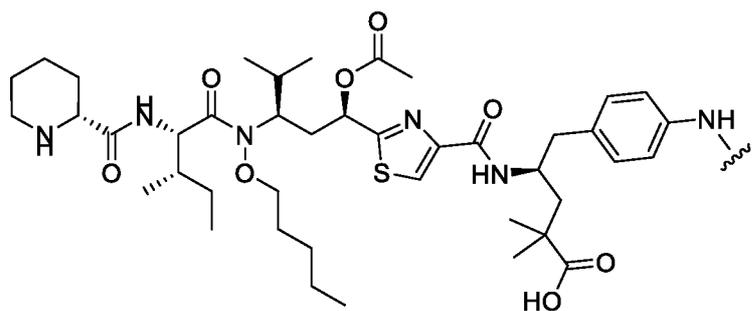


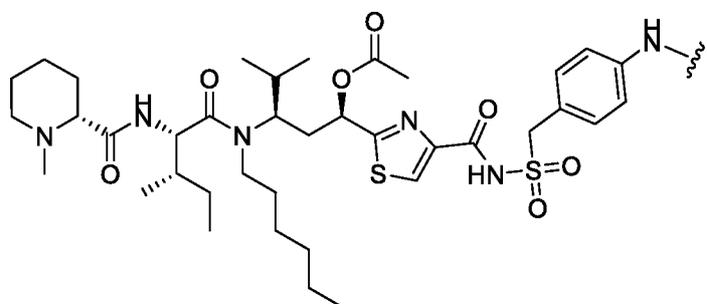
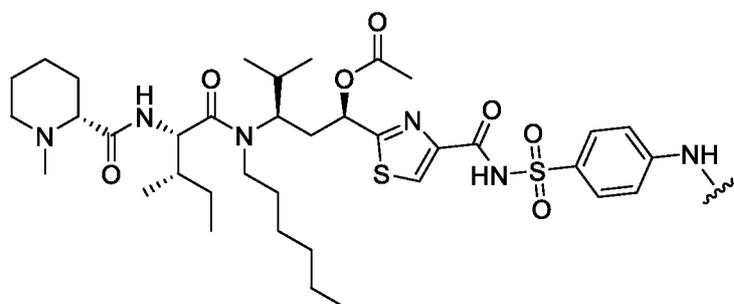
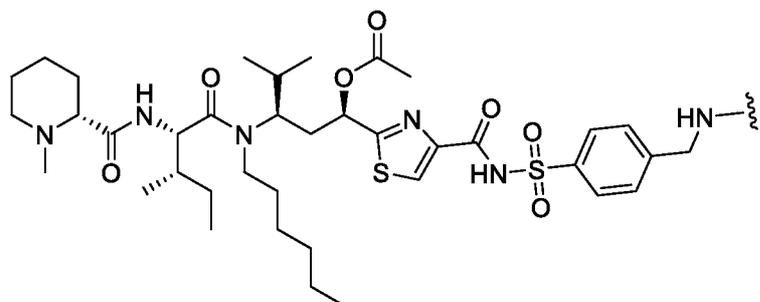
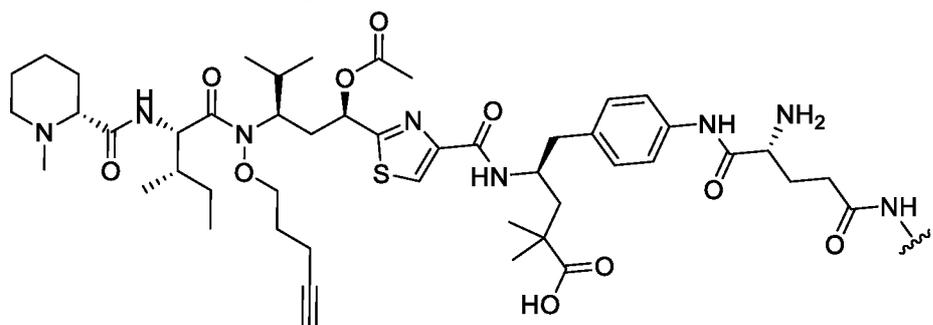
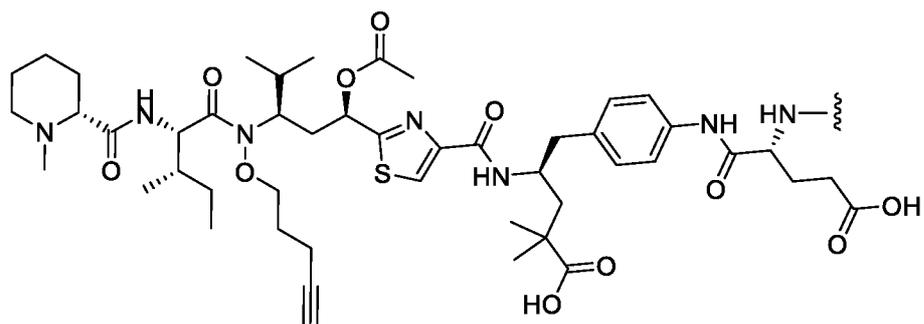


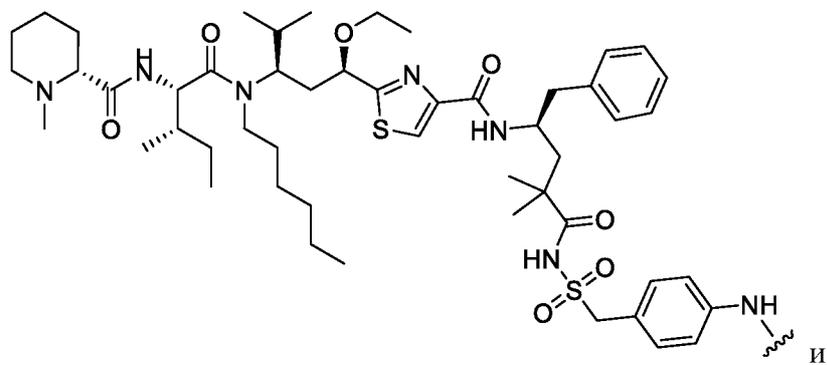
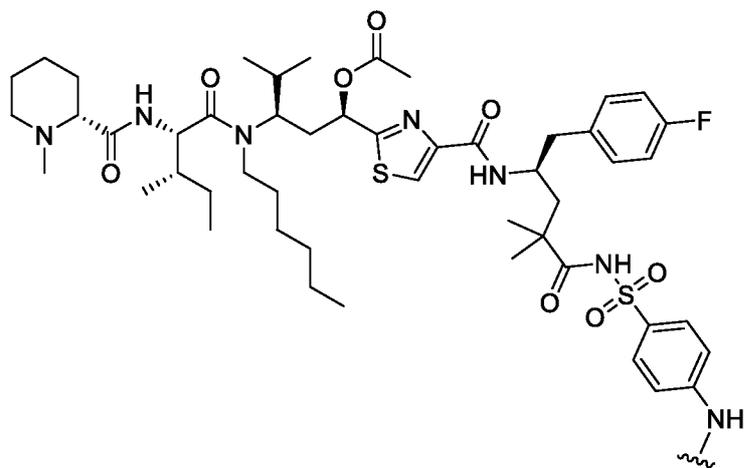
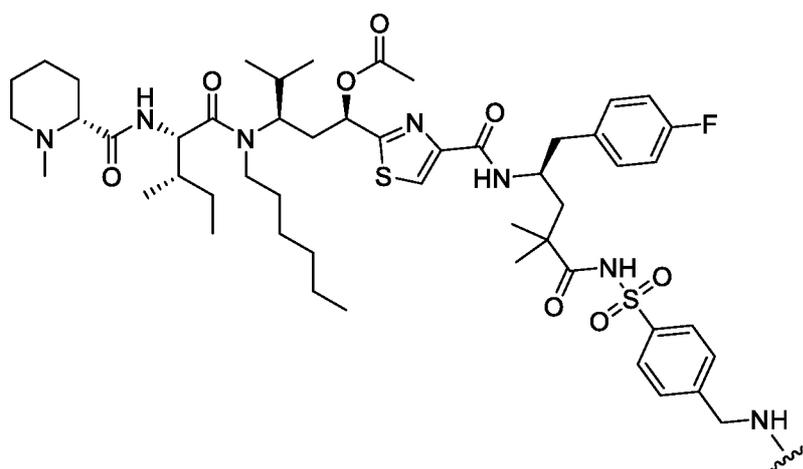
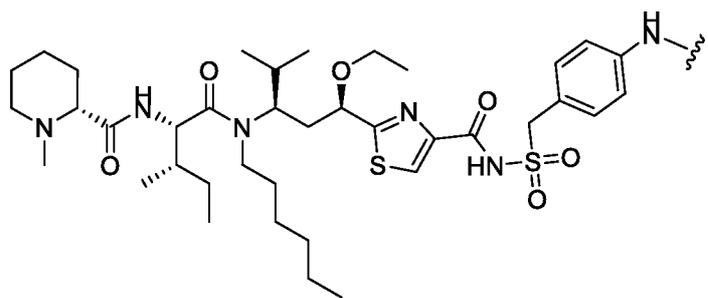


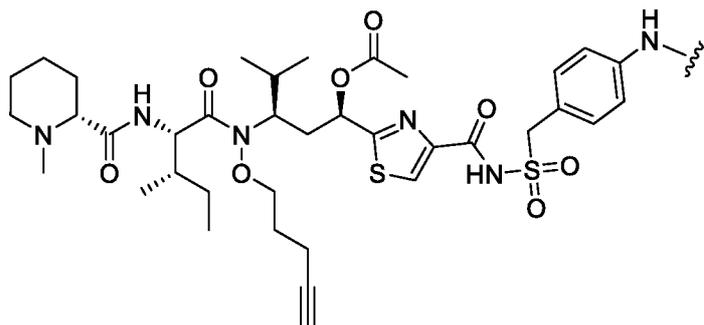












[00183] В любом из представленных вариантов осуществления соединений или конъюгатов **ВА** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с PRLR. В любом из представленных вариантов осуществления соединений или конъюгатов **ВА** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с STEAP2. В любом из представленных вариантов осуществления соединений или конъюгатов **ВА** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и конъюгация осуществляется через минимум один остаток Q295. В любом из представленных вариантов осуществления соединений или конъюгатов **ВА** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и конъюгация осуществляется через два остатка Q295. В любом из представленных вариантов осуществления соединений или конъюгатов **ВА** представляет собой антитело N297Q или его антигенсвязывающий фрагмент. В любом из представленных вариантов осуществления соединений или конъюгатов **ВА** представляет собой антитело N297Q или его антигенсвязывающий фрагмент, и конъюгация осуществляется минимум через один остаток Q295 и минимум один остаток Q297. В любом из представленных вариантов осуществления соединений или конъюгатов **ВА** представляет собой антитело N297Q или его антигенсвязывающий фрагмент, и конъюгация осуществляется минимум через два остатка Q295 и два остатка Q297. В конкретных вариантах осуществления нумерация соответствует системе нумерации EU.

[00184] В любом из представленных выше вариантов осуществления **ВА** представляет собой антитело к STEAP2. В определенных вариантах осуществления **ВА** представляет собой антитело к STEAP2 H1H7814N, описанное далее в разделе "Примеры". В определенных вариантах осуществления **ВА** представляет собой антитело к STEAP2 H1H7814N N297Q, описанное далее в разделе "Примеры". В определенных вариантах осуществления **ВА** представляет собой антитело к STEAP2, содержащее HCVR согласно SEQ ID № 1 и LCVR согласно SEQ ID № 5. В определенных вариантах осуществления **ВА** представляет собой антитело N297Q, содержащее HCVR согласно SEQ ID № 1 и LCVR

согласно SEQ ID № 5. В определенных вариантах осуществления **ВА** представляет собой антитело к STEAP2, содержащее одну, две, три, четыре, пять или шесть HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID № 2, 3, 4, 6, 7 и 8, соответственно. В определенных вариантах осуществления **ВА** представляет собой антитело N297Q, содержащее одну, две, три, четыре, пять или шесть HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID № 2, 3, 4, 6, 7 и 8, соответственно. N297Q указывает, что один или более остатков 297 мутированы из аспарагина (N) в глутамин (Q). В определенных вариантах осуществления каждый остаток 297 мутирован в Q. В определенных вариантах осуществления нумерация соответствует системе нумерации EU. В определенных вариантах осуществления данного пункта **k** находится в диапазоне от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления **k** имеет значение 1, 2, 3 или 4. В определенных вариантах осуществления **k** имеет значение 4.

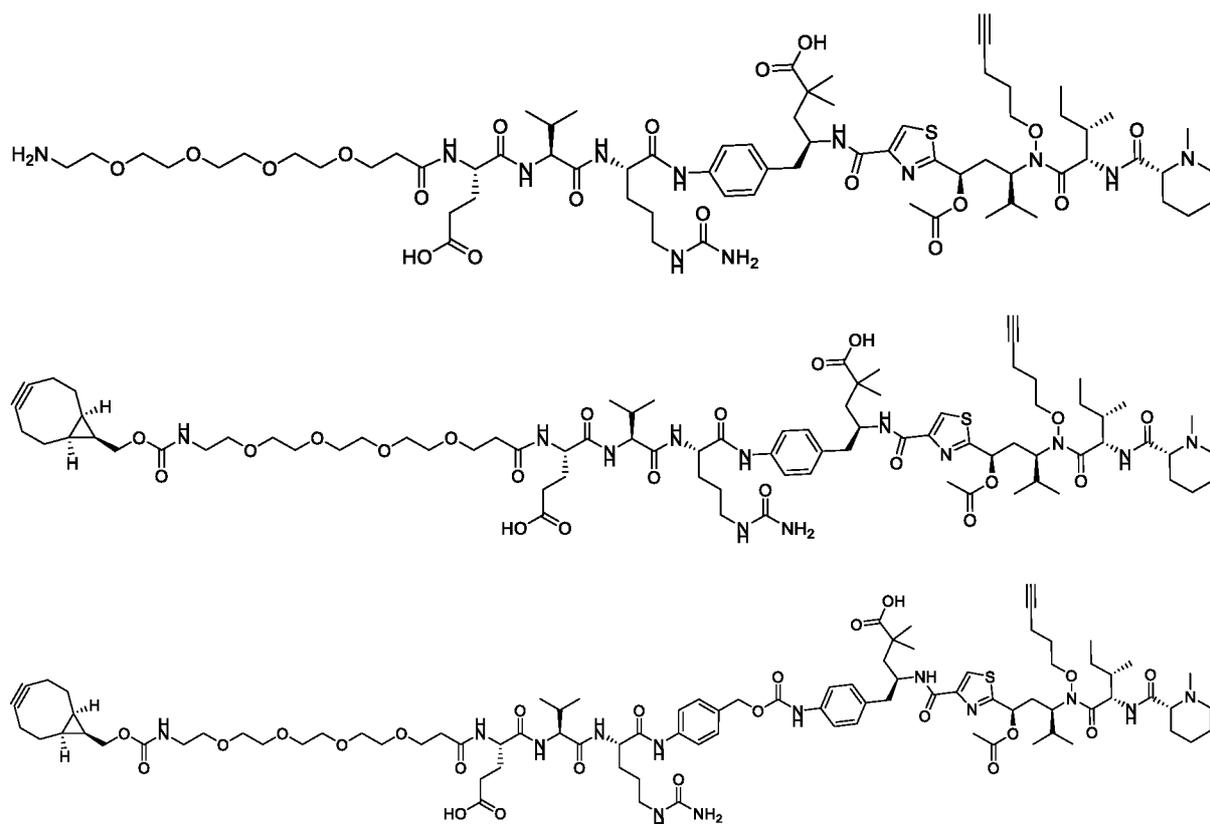
[00185] В любом из представленных выше вариантов осуществления **ВА** представляет собой антитело к PRLR. В определенных вариантах осуществления **ВА** представляет собой антитело к PRLR H1H6958N2, описанное далее в разделе "Примеры". В определенных вариантах осуществления **ВА** представляет собой антитело к PRLR H1H6958N2 N297Q, описанное далее в разделе "Примеры". В определенных вариантах осуществления **ВА** представляет собой антитело к PRLR, содержащее HCVR согласно SEQ ID № 9 и LCVR согласно SEQ ID № 13. В определенных вариантах осуществления **ВА** представляет собой антитело N297Q, содержащее HCVR согласно SEQ ID № 9 и LCVR согласно SEQ ID № 13. В определенных вариантах осуществления **ВА** представляет собой антитело к PRLR, содержащее одну, две, три, четыре, пять или шесть HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID № 10, 11, 12, 14, 15 и 16, соответственно. В определенных вариантах осуществления **ВА** представляет собой антитело N297Q, содержащее одну, две, три, четыре, пять или шесть HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно SEQ ID № 10, 11, 12, 14, 15 и 16, соответственно. N297Q указывает, что один или более остатков 297 мутированы из аспарагина (N) в глутамин (Q). В определенных вариантах осуществления каждый остаток 297 мутирован в Q. В определенных вариантах осуществления нумерация соответствует системе нумерации EU. В определенных вариантах осуществления данного пункта **k** находится в диапазоне от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления **k** имеет значение 1, 2, 3 или 4. В определенных вариантах осуществления **k** имеет значение 4.

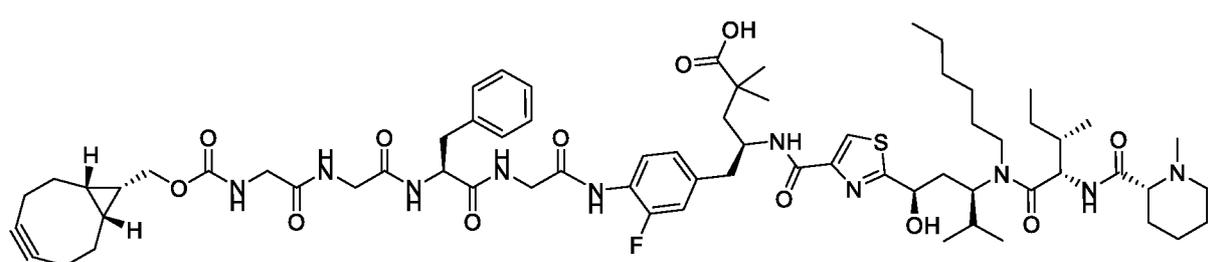
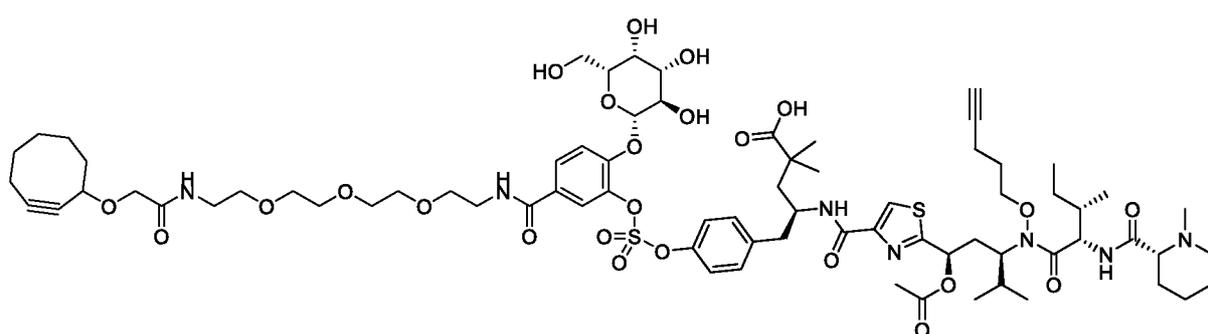
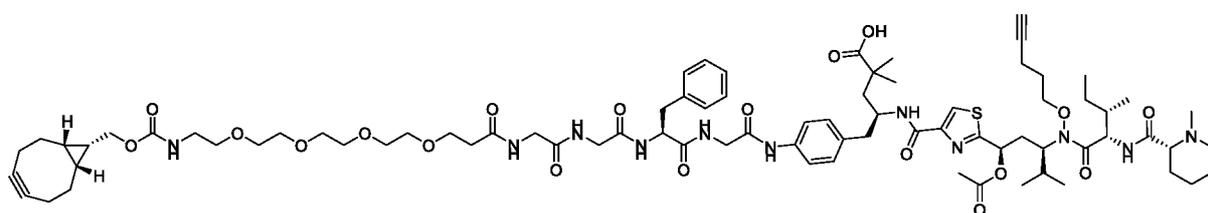
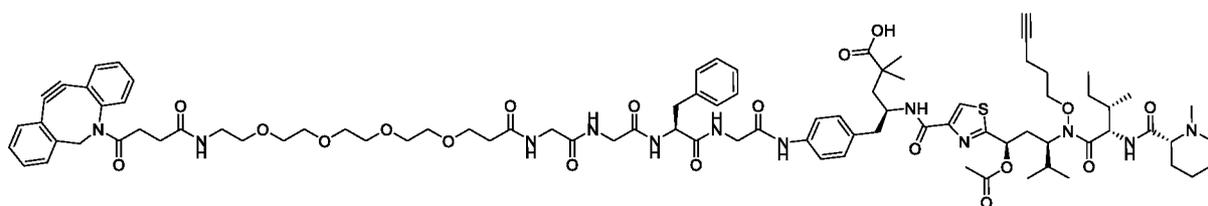
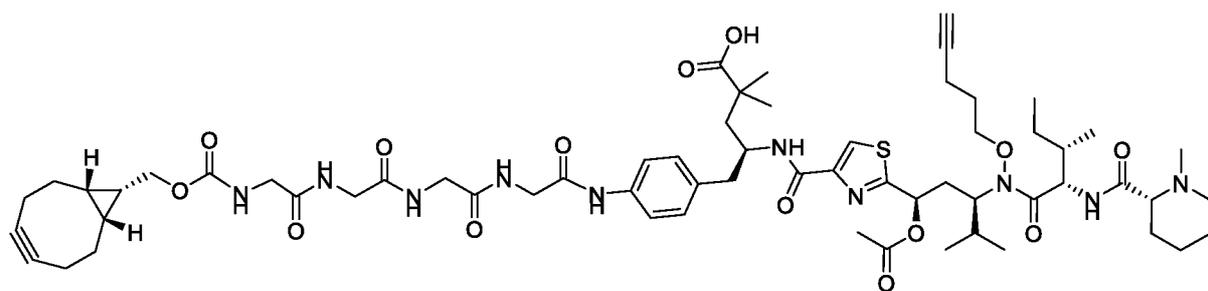
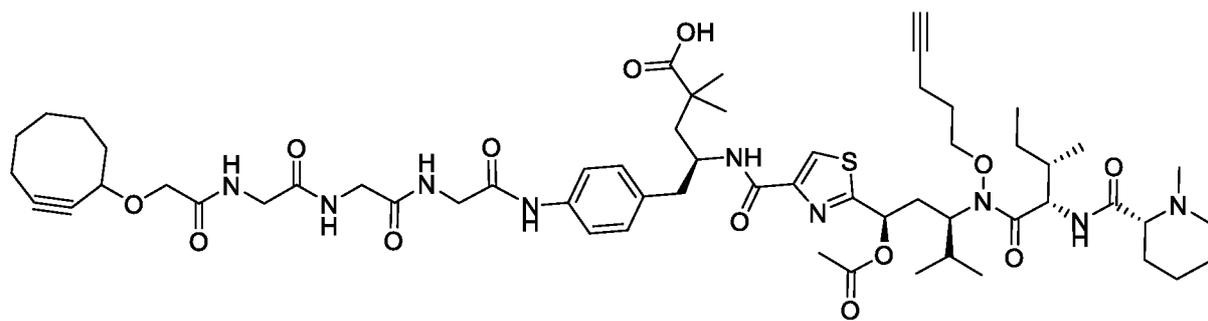
[00186] В любом предшествующем варианте осуществления в данном разделе R^7 представляет собой $-NR^{7a}R^{7b}$, при этом R^{7a} и R^{7b} представляет собой независимо в каждом случае водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил, ацил и аминокислотный остаток, при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены. В определенных вариантах осуществления R^{7a} представляет собой водород и R^{7b} представляет собой аминокислотный остаток.

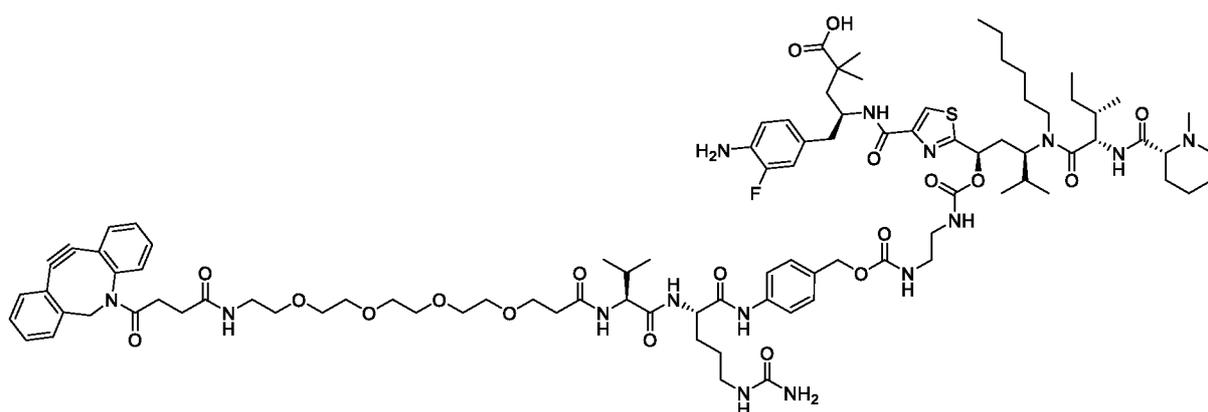
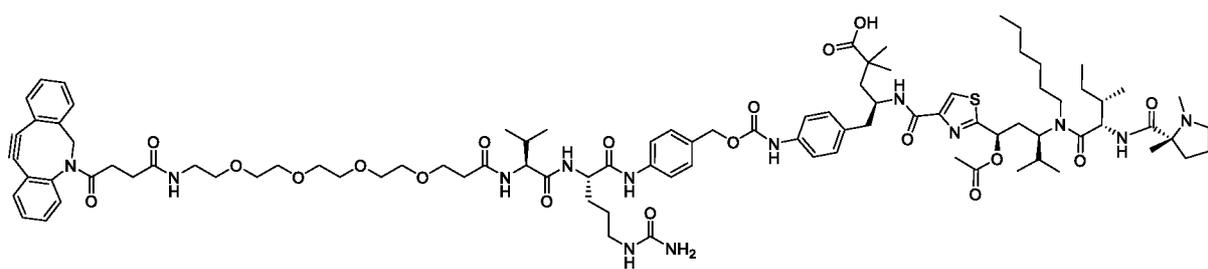
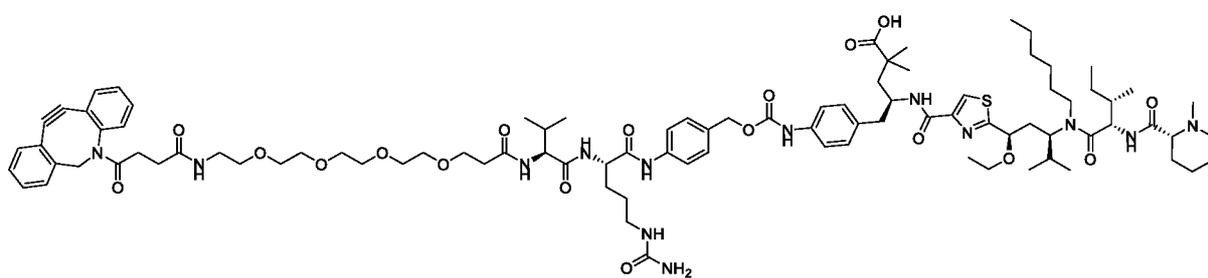
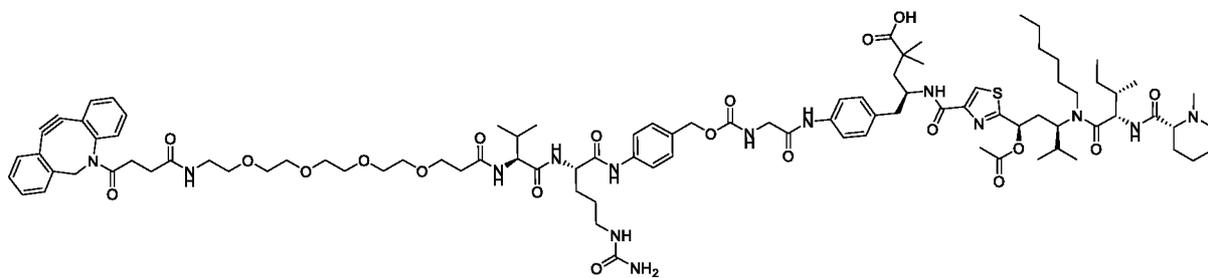
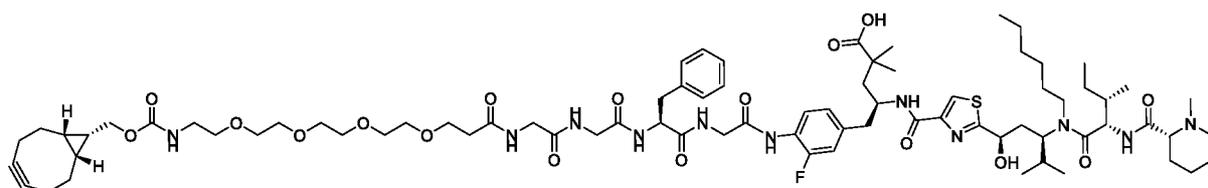
Способы приготовления соединений или нагрузок и линкер-нагрузок

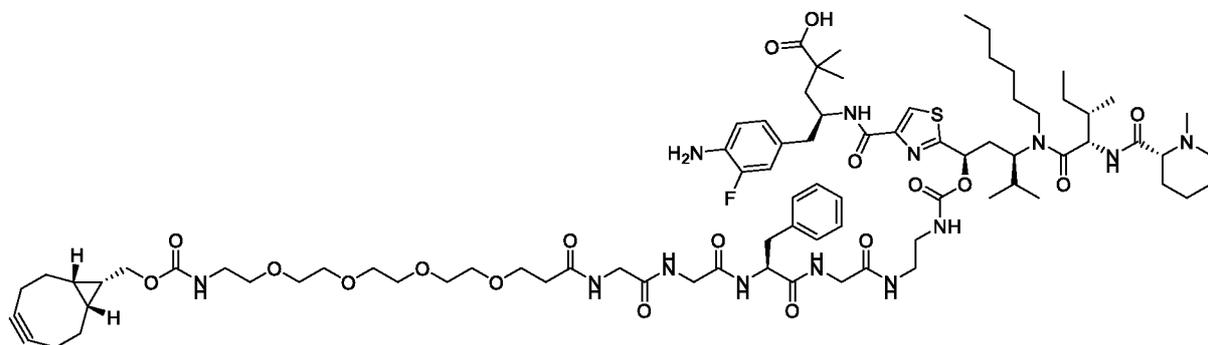
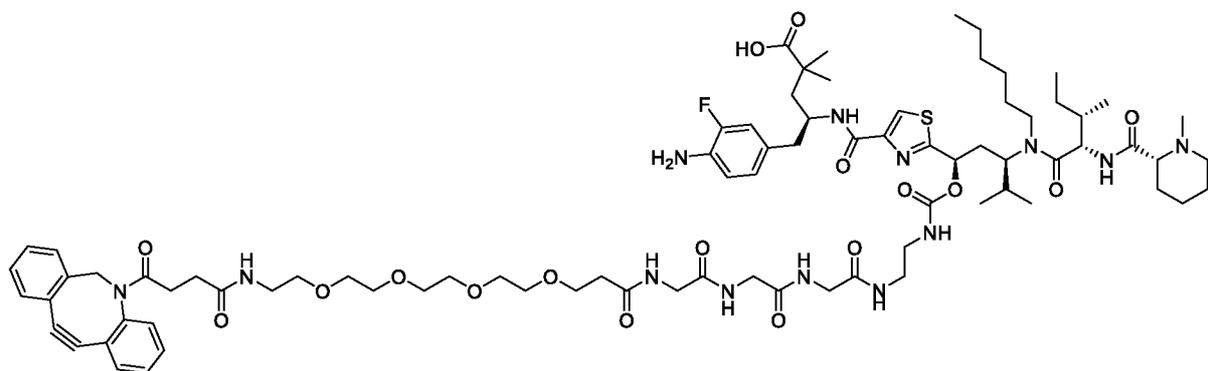
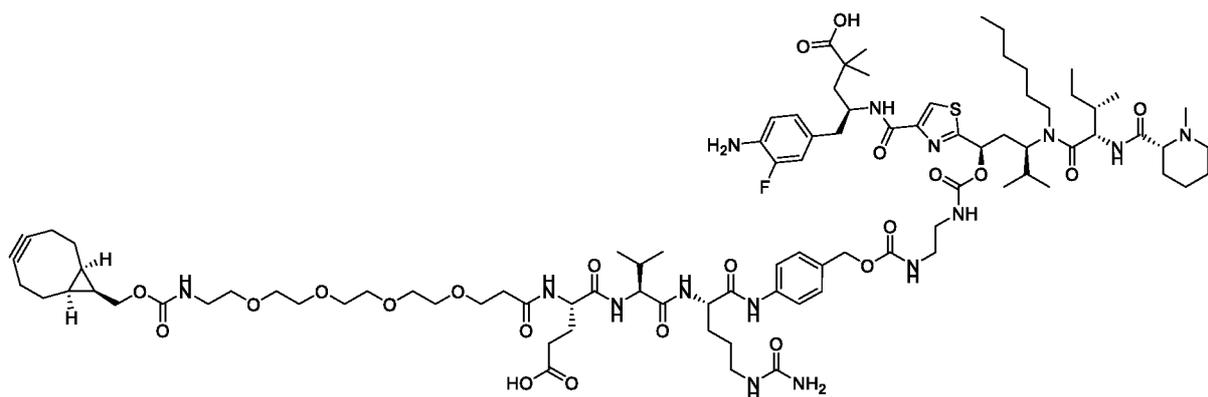
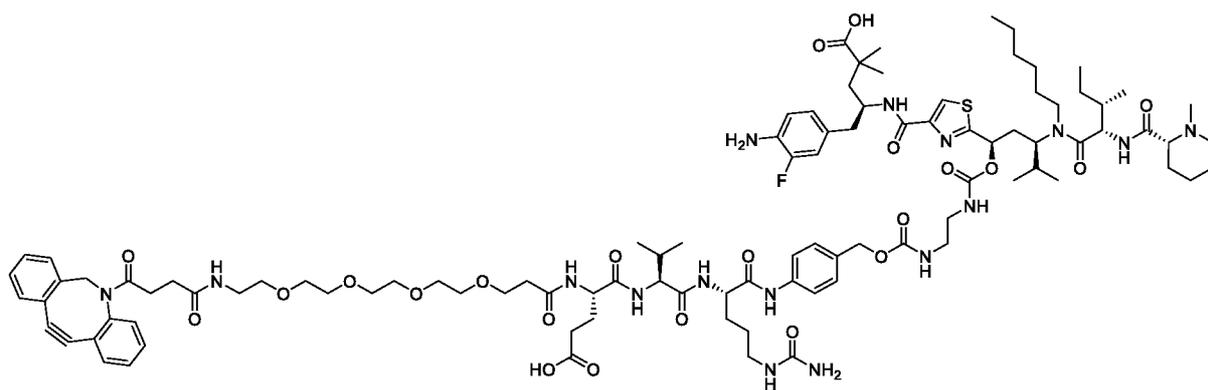
[00187] Представленные здесь соединения можно приготовить, выделить или получить любым способом, известным специалистам в данной области. Примеры способов приготовления подробно описаны далее в разделе "Примеры".

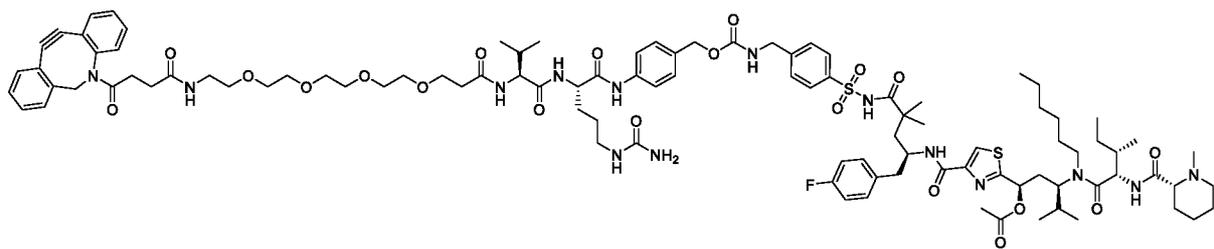
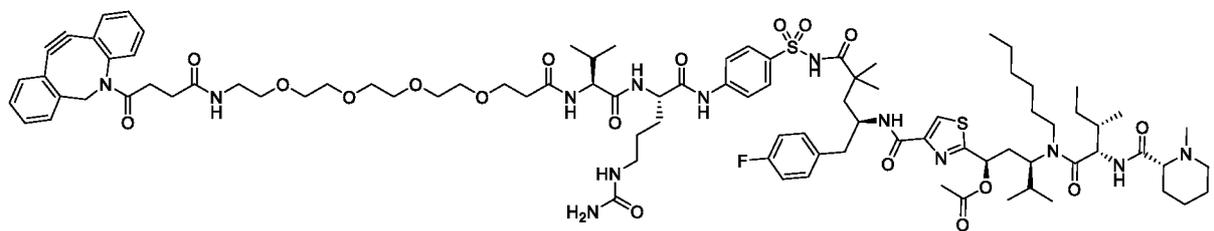
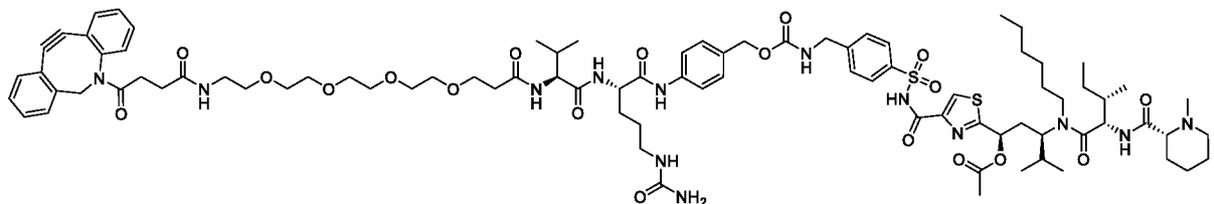
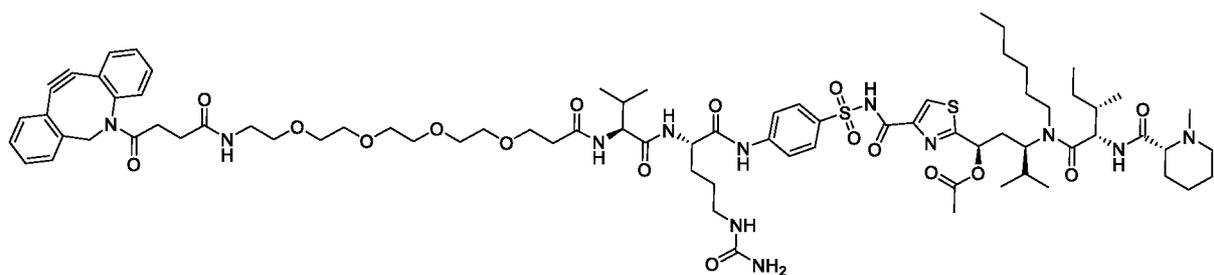
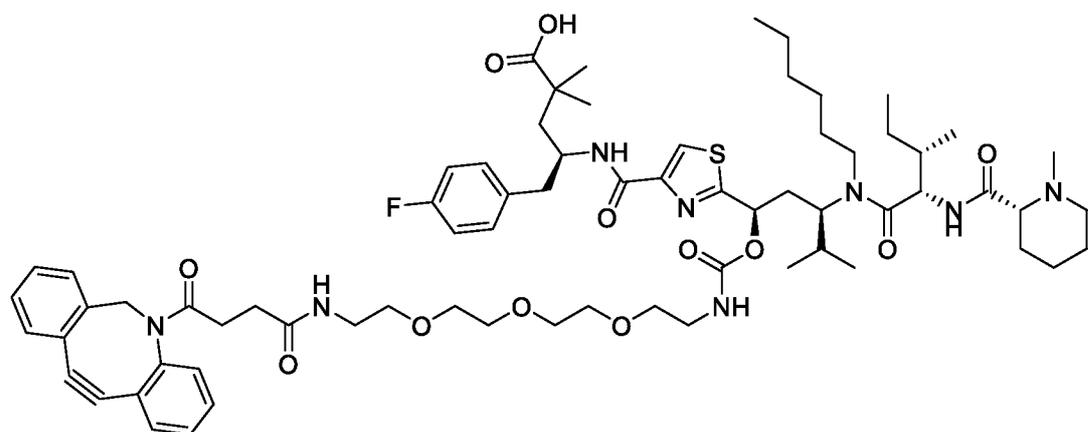
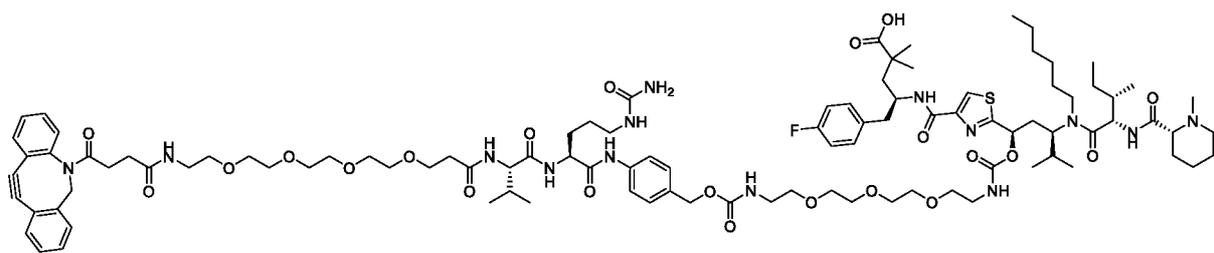
[00188] В определенных вариантах осуществления здесь представлены соединения (например, линкер-нагрузки или линкер-пролекарственные нагрузки), выбираемые из группы, состоящей из

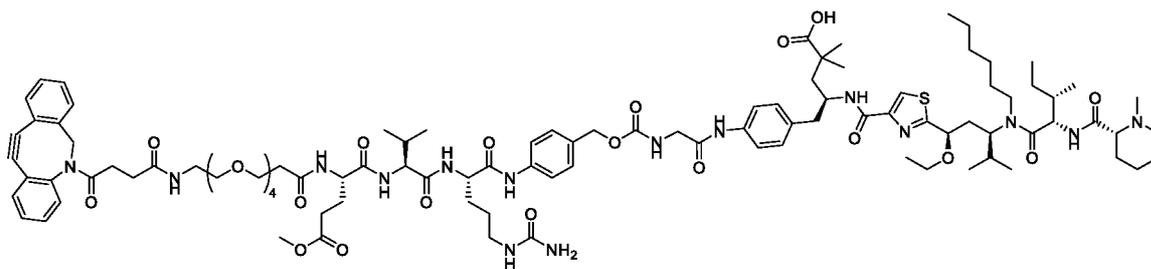




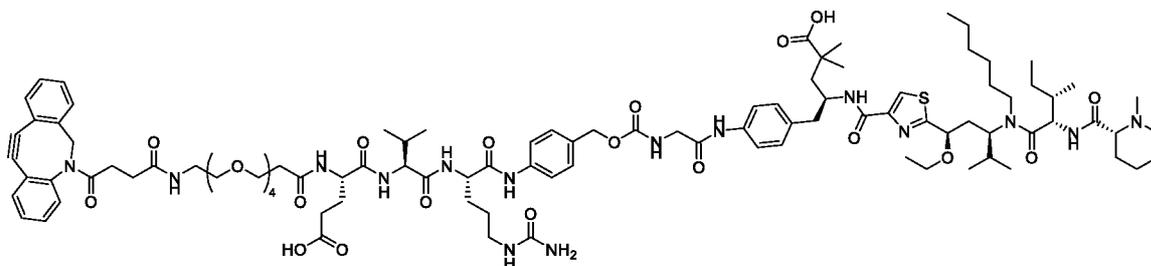




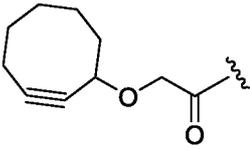


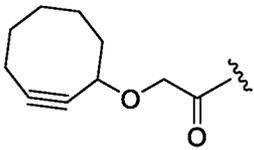


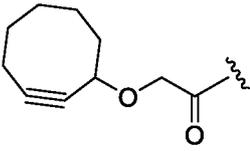
И

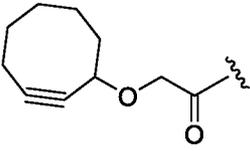


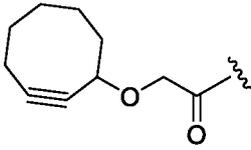
или их фармацевтически приемлемой соли. В определенных вариантах осуществления в данном пункте рассматриваются все диастереомеры. Например, в одном варианте

осуществления стереохимия в  является неопределенной или рацемической. В качестве следующего примера в одном варианте осуществления

стереохимия в  представляет собой (*R*)-. В качестве следующего

примера в одном варианте осуществления стереохимия в  представляет собой (*S*)-. В качестве следующего примера, в одном варианте осуществления стереохимия

в  представляет собой (*R*)- более (*S*)-. В качестве следующего примера, в

одном варианте осуществления стереохимия в  (*S*)- более (*R*)-.

[00189] Описанные здесь конъюгаты можно синтезировать посредством связывания описанных здесь линкер-нагрузок или линкер-пролекарственных нагрузок со связующим

агентом, например, антителом, в стандартных условиях конъюгации (см., например, публикацию *Doronina et al. Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 778, содержание которой включается в настоящий документ полностью посредством ссылки). Когда связующим агентом является антитело, это антитело может быть связано с линкер-нагрузкой посредством одного или более цистеиновых или лизиновых остатков антитела. Линкер-нагрузки могут связываться с цистеиновыми остатками, например, посредством воздействия на антитело восстанавливающим агентом, например, дитиотреитолом, для расщепления дисульфидных связей антитела, очистки восстановленного антитела, например, гель-фильтрацией, и последующего воздействия на антитело линкер-нагрузкой, содержащей подходящую реакционноспособную группу, например, малеимидо группу. Подходящие растворители включают, помимо прочего, воду, DMA, DMF и DMSO. Линкер-нагрузки ли линкер-пролекарственные нагрузки, содержащие реакционноспособную группу, например, активированную сложноэфирную или галоидангидридную группу, могут быть связаны с лизиновыми остатками антитела. Подходящие растворители включают, помимо прочего, воду, DMA, DMF и DMSO. Конъюгаты можно очищать при помощи известных белковых методов, включающих, например, эксклюзионную хроматографию, диализ и ультрафильтрацию/диафильтрацию.

[00190] Связующие агенты, например, антитела, также могут быть конъюгированы посредством реакций клик-химии. В некоторых вариантах осуществления указанных реакций клик-химии линкер-нагрузка включает реакционноспособную группу, например, алкин, способный вступать в реакцию региоизомерного 1,3-циклоприсоединения с азидом. Такие подходящие реакционноспособные группы описаны выше. Антитело включает одну или более азидных групп. Такие антитела включают антитела, функционализованные, например, азидо-полиэтиленгликольными группами. В определенных вариантах осуществления такое функционализованное антитело получают воздействием на антитело минимум с одним глутаминовым остатком, например, Gln297 тяжелой цепи, первичным аминным соединением в присутствии фермента трансглутаминазы (например, для получения модифицированного трансглутаминазой антитела или его антигенсвязывающего фрагмента). В определенных вариантах осуществления такое функционализованное или модифицированное трансглутаминазой антитело получают воздействием на антитело минимум с одним глутаминовым остатком, например, Gln297 тяжелой цепи, первичным аминным соединением в присутствии фермента трансглутаминазы. Такие антитела включают мутанты Asn297Gln (N297Q). В определенных вариантах осуществления такое функционализованное антитело получают воздействием на антитело минимум с двумя

глутаминовыми остатками, например, Gln295 тяжелой цепи и Gln297 тяжелой цепи, первичным аминным соединением в присутствии фермента трансглутаминазы. Такие антитела включают мутанты Asn297Gln (N297Q). В определенных вариантах осуществления у антитела есть две тяжелые цепи, описанные в данном пункте, в результате чего получается всего два или всего четыре глутаминовых остатка.

[00191] В определенных вариантах осуществления антитело содержит два глутаминовых остатка, один в каждой тяжелой цепи. В конкретных вариантах осуществления антитело содержит остаток Q295 в каждой тяжелой цепи. В дальнейших вариантах осуществления антитело содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или более глутаминовых остатков. Эти глутаминовые остатки могут быть в тяжелых цепях, легких цепях или как в тяжелых, так и в легких цепях. Эти глутаминовые остатки могут быть остатками дикого типа или сконструированными остатками. Антитела можно приготовить с использованием стандартных методов.

[00192] Специалистам в данной области известно, что антитела часто гликозилируют на остатке N297, рядом с остатком Q295 в последовательности тяжелой цепи. Гликозилирование на остатке N297 может мешать трансглутаминазе на остатке Q295 (Dennler *et al.*, *supra*). Соответственно, в предпочтительных вариантах осуществления антитело не гликозилировано. В определенных вариантах осуществления антитело дегликозилировано или агликозилировано. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь антитела имеет мутацию N297. Иначе говоря, антитело мутировано и более не имеет аспарагинового остатка в позиции 297. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь антитела имеет мутацию N297Q. Такое антитело можно приготовить посредством сайт-направленного мутагенеза для удаления или блокировки последовательности гликозилирования либо посредством сайт-направленного мутагенеза для вставки глутаминового остатка в сайт в стороне от любого интерферирующего сайта гликозилирования или любой другой интерферирующей структуры. Такое антитело также можно выделить из природных или искусственных источников.

[00193] Затем антитело без интерферирующего гликозилирования вступает в реакцию с первичным аминным соединением или на него воздействуют первичным аминным соединением. В определенных вариантах осуществления агликозилированное антитело вступает в реакцию с первичным аминным соединением или на него воздействуют первичным аминным соединением, в результате чего образуется модифицированное глутамином антитело или модифицированное трансглутаминазой антитело. В

определенных вариантах осуществления дегликозилированное антитело вступает в реакцию с первичным аминным соединением или на него воздействуют первичным аминным соединением, в результате чего образуется модифицированное глутаминилом антитело или модифицированное транsgлутаминазой антитело.

[00194] Таким первичным амином может быть любой первичный амин, способный образовывать ковалентную связь с глутаминовым остатком в присутствии транsgлутаминазы. Полезные первичные амины описаны в настоящем документе. Такой транsgлутаминазой может быть любая транsgлутаминаза, которую считают подходящей специалисты в данной области. В определенных вариантах осуществления транsgлутаминаза представляет собой фермент, который катализирует образование изопептидной связи между свободной аминной группой на первичном аминном соединении и ацильной группой на боковой цепи глутаминового остатка. Транsgлутаминаза также известна как протеин-глутамин- γ -глутамилтрансфераза. В конкретных вариантах осуществления транsgлутаминаза классифицируется как ЕС 2.3.2.13. Транsgлутаминаза может быть получена из любого источника, считающегося подходящим. В определенных вариантах осуществления транsgлутаминаза является микробной. Полезные транsgлутаминазы выделили из *Streptomyces mobaraense*, *Streptomyces cinnamoneum*, *Streptomyces griseo-carneum*, *Streptomyces lavendulae* и *Bacillus subtilis*. Также можно использовать немикробные транsgлутаминазы, включая транsgлутаминазы млекопитающих. В определенных вариантах осуществления транsgлутаминазу можно получить при помощи любого метода или из любого источника, который специалисты в данной области считают подходящим. В конкретных вариантах осуществления транsgлутаминазу получают из коммерческого источника.

[00195] В конкретных вариантах осуществления первичное аминное соединение содержит реакционноспособную группу, способную к дальнейшей реакции после транsgлутаминирования. В этих вариантах осуществления модифицированное глутаминилом антитело или модифицированное транsgлутаминазой антитело может вступать в реакцию с реакционноспособным соединением нагрузки или пролекарственной нагрузки или линкер-нагрузки или линкер-пролекарственной нагрузки или на него можно воздействовать реакционноспособным соединением нагрузки или пролекарственной нагрузки или линкер-нагрузки или линкер-пролекарственной нагрузки, в результате чего образуется конъюгат антитело-нагрузка или конъюгат антитело-линкер-нагрузка. В определенных вариантах осуществления первичное аминное соединение содержит азид.

[00196] В определенных вариантах осуществления модифицированное глутаминилом антитело или модифицированное трансглутаминазой антитело может вступать в реакцию с реакционноспособной линкер-нагрузкой или на него можно воздействовать реакционноспособной линкер-нагрузкой, в результате чего образуется конъюгат антитело-линкер-нагрузка. Такая реакция может продолжаться в условиях, которые специалисты в данной области считают подходящими. В определенных вариантах осуществления на модифицированное глутаминилом антитело или модифицированное трансглутаминазой антитело воздействуют реакционноспособным соединением линкер-нагрузки или линкер-пролекарственной нагрузки в условиях, подходящих для образования связи между модифицированным глутаминилом антителом или модифицированным трансглутаминазой антителом и соединением линкер-нагрузки или линкер-пролекарственной нагрузки. Подходящие условия реакции известны специалистам в данной области. Примеры реакций представлены далее в разделе "Примеры".

Фармацевтические композиции и способы лечения

[00197] Здесь представлены способы лечения и профилактики заболеваний, состояний или нарушений, включающие введение терапевтически или профилактически эффективного количества одного или более описанных здесь соединений, например, одного или более соединений представленной здесь формулы. Заболевания, нарушения и/или состояния включают, помимо прочего, заболевания, нарушения и/или состояния, ассоциированные с указанными здесь антигенами.

[00198] Описанные здесь соединения можно вводить по-отдельности или вместе с одним или более дополнительными терапевтическими средствами. Такие одно или более дополнительных терапевтических средств можно вводить до, одновременно и сразу после введения описанных здесь соединений. Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции, содержащие любые из описанных здесь соединений в комбинации с одним или более терапевтическими средствами, и способы лечения, включающие введение таких комбинаций нуждающимся в этом субъектам.

[00199] Подходящие дополнительные терапевтические средства включают, помимо прочего: второй тубулизин, аутоиммунное терапевтическое средство, гормон, биопрепарат или моноклональное антитело. Подходящие терапевтические средства также включают, помимо прочего, любые фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные представленного здесь соединения.

[00200] 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 терапевтических средств) могут вводиться субъекту в течение определенного периода времени. Способы согласно данному варианту осуществления изобретения включают последовательное введение субъекту нескольких доз описанного здесь соединения. В контексте настоящего документа “последовательное введение” означает, что все дозы соединения вводятся субъекту в разные временные точки, например, в разные дни, разделенные заранее определенным интервалом (например, в часах, днях, неделях или месяцах). Настоящее изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту одной первоначальной дозы описанного здесь соединения и последующих одной или более вторичных доз этого соединения и необязательно последующих одной или более третичных доз этого соединения.

[00201] Термины “первоначальная доза”, “вторичные дозы” и “третичные дозы” означают временную последовательность введения описанных здесь соединений. Таким образом, “первоначальная доза” представляет собой доза, которая вводится в начале режима лечения (также называемая “базовая доза”); “вторичные дозы” представляет собой дозы, которые вводятся после первоначальной дозы; а “третичные дозы” представляет собой дозы, которые вводятся после вторичных доз. Первоначальная, вторичные и третичные дозы все могут включать одинаковое количество описанного здесь соединения, но обычно могут различаться друг от друга частотой введения. В определенных вариантах осуществления количество соединения, входящее в первоначальную, вторичные и/или третичные дозы, различается (например, увеличивается или уменьшается в зависимости от ситуации) в ходе лечения. В определенных вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводятся в начале курса лечения в качестве “ударных доз”, а последующие дозы вводятся не так часто (например, “поддерживающие дозы”).

[00202] В определенных иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения каждая вторичная и/или третичная доза вводится в период от 1 до 26 (например, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. 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.

[00203] Способы согласно настоящему варианту осуществления изобретения могут включать введение пациенту любого числа вторичных и/или третичных доз соединения. Например, в определенных 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 определенных 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. Курс введения может проводиться неопределенное время на протяжении всей жизни конкретного субъекта либо до того момента, как такое лечение более не потребуется в терапевтическом плане или пока оно не перестанет приносить пользу.

[00204] 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 в течение периода от 1 до 2 недель или от 1 до 2 месяцев после непосредственно предшествующей дозы. Аналогичным образом, в вариантах осуществления, включающих несколько третичных доз, каждая третичная доза может вводиться с такой же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту в течение периода от 2 до 12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В определенных вариантах осуществления изобретения частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводятся пациенту, может меняться на протяжении курса лечения. Частота введения также может корректироваться на протяжении лечения врачом в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического осмотра.

[00205] Настоящее изобретение включает курсы введения, при которых от 2 до 6 ударных доз вводятся пациенту с первой частотой (например, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, один раз в два месяца и т.д.), а затем пациенту вводятся две или более поддерживающих доз с меньшей частотой. Например, в соответствии с настоящим вариантом осуществления изобретения, если ударные дозы вводятся с частотой один раз в месяц, тогда поддерживающие дозы могут вводиться пациенту один раз в шесть недель, один раз в два месяца, один раз в три месяца и т.д.

[00206] Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции описанных здесь соединений и/или конъюгатов, например, соединений Формул I, II, III, IV, V и VI, например, композиции, содержащие описанное здесь соединение, его соль, стереоизомер, региоизомер, полиморф и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или вспомогательное вещество. Примеры подходящих носителей, разбавителей и вспомогательных веществ включают, помимо прочего, буферы для поддержания необходимого pH композиции (например, цитратные буферы, сукцинатные буферы, ацетатные буферы, фосфатные буферы, лактатные буферы, оксалатные буферы и подобные им), белки-носители (например, альбумин человеческой сыворотки), физраствор, полиолы (например, трегалозу, сахарозу, ксилит, сорбитол и подобные), поверхностно-активные вещества (например, полисорбат 20, полисорбат 80, полиоксолат и подобные), противомикробные препараты и антиоксиданты.

[00207] В некоторых примерах здесь представлен способ лечения рака, включающий введение пациенту с упомянутым раком терапевтически эффективного количества соединения Формул I, II, III, IV, V и VI или фармацевтической композиции с указанным соединением. В некоторых вариантах осуществления здесь представлен способ лечения рака, включающий введение пациенту с упомянутым раком терапевтически эффективного количества описанного здесь конъюгата антитело-тубулизин или фармацевтической композиции с этим конъюгатом. В некоторых вариантах осуществления связующий агент, например, антитело, конъюгатов, например, описанных здесь конъюгатов антитело-лекарственное средство взаимодействует или связывается с антигенами опухоли, включая антигены, специфические к типу опухоли, или антигены, которые являются общими, сверхэкспрессированными или модифицированными на определенном типе опухоли. Примеры включают, помимо прочего, альфа-актинин-4 с раком легких, ARTC1 с меланомой, слитый белок BCR-ABL с хроническим миелоидным лейкозом, B-RAF, CLPP или Cdc27 с меланомой, CASP-8 с плоскоклеточной карциномой и hsp70-2 с почечно-клеточной карциномой, а также следующие общие опухолеспецифические антигены, например, BAGE-1, GAGE, GnTV, KK-LC-1, MAGE-A2, NA88-A, TRP2-INT2. Другие примеры опухолевых антигенов включают, помимо прочего, PSMA, PRLR, MUC16, HER2, EGFRvIII и анти-STEAP2 и MET.

[00208] Описанные здесь соединения могут использоваться для лечения первичных и/или метастатических опухолей, появляющихся в головном мозге и оболочке головного мозга, ротоглотке, легких и бронхиальном дереве, желудочнокишечном тракте, мужском и

женском репродуктивном тракте, мышцах, костях, коже и придатках, соединительной ткани, селезенке, иммунной системе, кроветворных клетках и костном мозге, печени и мочевыводящих путях и специализированных органах чувств, таких как глаза. В определенных вариантах осуществления представленные здесь соединения используются для лечения одного или более следующих видов рака: почечно-клеточной карциномы, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи (например, плоскоклеточного рака головы и шеи [HNSCC]), рака простаты, кастрационно-резистентного рака простаты, злокачественной глиомы, остеосаркомы, колоректального рака, рака желудка (например, рака желудка с амплификацией MET), мезотелиомы, злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичников, рака легких, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы, рака молочной железы, PRLR-положительного (PRLR+) рака молочной железы, меланомы, острого миелоцитарного лейкоза, Т-клеточного лейкоза взрослых, астроцитом, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, холангиокарциномы, рака эндометрия, рака пищевода, глиобластомы, саркомы Капоши, рака почки, лейомиосаркомы, рака печени, лимфом, злокачественной фиброзной гистиоцитомы/фибросаркомы, рака носоглотки, рабдомиосаркомы, рака ободочной кишки, рака желудка, рака матки, остаточного рака, при этом “остаточный рак” означает существование или сохранение одной или более раковых клеток у субъекта после противоопухолевой терапии, и опухоли Вильмса. В некоторых вариантах осуществления таким раком является рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления таким раком является рак простаты.

[00209] В некоторых примерах здесь представлен способ профилактики рака простаты, включающий введение пациенту с упомянутым раком профилактически эффективного количества соединения Формул I, II, III, IV, V и VI или фармацевтической композиции с указанным соединением.

ПРИМЕРЫ

[00210] Здесь представлены новые тубулизины, их белковые конъюгаты и способы лечения заболеваний, нарушений и состояний, включающие введение тубулизинов и конъюгатов.

[00211] Определенные варианты осуществления изобретения проиллюстрированы следующими неограничивающими примерами. В контексте настоящего документа символы и обозначения, используемые в процессах, схемах и примерах, независимо от того, приводится ли конкретное определение определенному сокращению, соответствуют

используемым в современной научной литературе, например, Журнале Американского химического сообщества (Journal of the American Chemical Society) или Журнале биологической химии (Journal of Biological Chemistry). В частности, но без ограничений, в Примерах и по тексту описания изобретения могут использоваться следующие сокращения:

Сокращение	Термин или фраза
ADC	Конъюгат антитело-лекарственное средство
Англикозилированное антитело	Антитело, у которого не гликанов
API	Ионизация при атмосферном давлении
aq (вод.)	Водный
Woc	<i>трет</i> -бутоксикарбонил
COT	Циклооктинол
CTRL	Изотипический контроль антитела
Da (Да)	Дальтон
DAD	Диодно-матричный детектор
Отношение DAR	Отношение лекарственное средство-антитело
DCM	Дихлорметан
DIBAC	11,12-дидегидро-5,6-дигидро-дибенз[<i>b,f</i>]азоцин
DIBAC-Suc	11,12-дидегидро-5,6-дигидро-дибенз[<i>b,f</i>]азоцин сукцинамовая кислота
DIBAC-Suc-PEG4-VC-pAB-PNP	{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0 ^{4,9}]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
DIBACT	3 <i>H</i> -бензо[<i>c</i>]-1,2,3-триазоло[4,5- <i>e</i>][1]бензазоцин, 8,9-дигидро-
DIPEA	Диизопропилэтиламин
DMF	<i>N,N</i> -диметилформамид
DMSO	Диметилсульфоксид

Сокращение	Термин или фраза
ЕС	Комиссия по ферментам
ELSD	Испарительный детектор светорассеяния
ESI (ИЭР)	Ионизация электрораспылением
Fmoc	<i>N</i> -(9-флуоренилметилоксикарбонил)
Fmoc-vcPAB-PNP	<i>N</i> -Fmoc-L-валин-L-цитруллин- <i>p</i> -аминобензиловый спирт <i>p</i> -нитрофенил карбонат
г	грамм
HATU	2-(7-аза-1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат
НС	Тяжелая цепь иммуноглобулина
НЕК	Клетки эмбриональных почек человека
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ч или час	часов
LC	Легкая цепь иммуноглобулина
МС	Малеимидакапроил
мг	миллиграмм
мин	минут
мл	миллилитров
mmh	<i>тус-тус</i> -гексагистидиновая метка
мкл	микролитров
мМ	миллимолярный
мкМ	микромольный
ММАЕ	Монометил ауристатин Е
МС	Масс-спектрометрия
MsCl	Метансульфонилхлорид
MSD (МСД)	Масс-селективный детектор
MTG	Микробная трансклутаминаза (MTG ЕС 2.3.2.13, Zedira, Дармштадт, Германия)
МВ	Молекулярный вес
ncADC	Нецитотоксичный конъюгат антитело-лекарственное средство
NHS	<i>N</i> -гидроксисукцинимид

Сокращение	Термин или фраза
нМ	нанолярный
NMR (ЯМР)	Ядерный магнитный резонанс
PAB	Пара-аминобензилокси(карбонил)
PBS	10 мМ натрий-фосфатный буфер и 150 мМ хлорид натрия
PBSg	10 мМ фосфат, 150 мМ хлорид натрия, 5% глицерин
PEG (ПЭГ)	Полиэтиленгликоль
PNP	<i>p</i> -нитрофенил
MC-VC-PAB-PNP	Малеимидокапроил-L-валин-L-цитруллин- <i>p</i> -аминобензиловый спирт <i>p</i> -нитрофенилкарбонат
ppm	Частей на миллион (химический сдвиг, δ)
RP (ОФ)	Обращенная фаза
КТ или кт	комнатная температура
SDS-PAGE	Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия
SEC	Эксклюзионная хроматография
Suc	Янтарная кислота
TCEP	Трис(2-карбоксиэтил)фосфингидрохлорид
TEA	Триэтиламин
TMS	Тетраметилсилан
TFA	Трифторуксусная кислота
TG	Трансглутаминаза
THF	Тетрагидрофуран
TOF	Время пролета
TRSQ	Трастузумаб N297Q
UPLC (СЭЖХ)	Сверхэффективная жидкостная хроматография
UV (УФ)	Ультрафиолетовый
VA	Валин-аланин
VC	Валин-цитруллин
VC-PAB	Валин-цитруллин-пара-аминобензилокси(карбонил)
ZP3A	Азидо-PEG ₃ -NH ₂ или его остаток

[00212] Реактивы и растворители могут быть получены из коммерческих источников, таких как Sinopharm Chemical Reagent Co. (SCRC), Sigma-Aldrich, Alfa, или от других поставщиков, если открыто не указано иное. ¹H ЯМР и другие ЯМР спектры могут быть записаны на Bruker AVIII 400 или Bruker AVIII 500. Данные могут быть обработаны при помощи программного обеспечения Nuts или программного обеспечения MestReNova, с измерением протонных сдвигов в частях на миллион (ppm) в сторону слабого поля от внутреннего стандарта тетраметилсилана (TMS).

[00213] ВЭЖХ-МС измерения могут проводиться при помощи системы Agilent 1200 HPLC/6100 SQ с применением следующих условий: Способ А для ВЭЖХ-МС измерений включает, в качестве Подвижной фазы: А: Вода (0.01% трифторуксусная кислота (TFA)), В: ацетонитрил (0.01% TFA); Градиентная фаза: 5% В повышают до 95% В в течение 15 мин; Расход: 1.0 мл/мин; Колонка: SunFire C18, 4.6x50 мм, 3.5 мкм; Температура колонки: 50 °С. Детекторы: испарительный детектор светорассеяния (ELSD) с аналого-цифровым преобразователем (ADC), диодно-матричный детектор (DAD) (214 нм и 254 нм), ионизация электрораспылением-ионизация при атмосферном давлении (ES-API). Способ В для ВЭЖХ-МС измерений включает, в качестве Подвижной фазы: А: Вода (10 мМ NH₄HCO₃), В: ацетонитрил; Градиентная фаза: от 5% до 95% В в течение 15 мин; расход: 1.0 мл/мин; Колонка: XBridge C18, 4.6x50 мм, 3.5 мкм; Температура колонки: 50 °С. Детекторы: ADC ELSD, DAD (214 нм и 254 нм), масс-селективный детектор (MSD) (ES-API).

[00214] ЖХ-МС измерения могут проводиться при помощи системы Agilent 1200 HPLC/6100 SQ с применением следующих условий: Способ А для ЖХ-МС измерений включает, в качестве Прибора: WATERS 2767; колонка: Shimadzu Shim-Pack, PRC-ODS, 20x250 мм, 15 мкм, две, соединенные последовательно; Подвижная фаза: А: Вода (0.01% TFA), В: ацетонитрил (0.01% TFA); Градиентная фаза: 5% В повышают до 95% В в течение 3 мин; расход: 1.8-2.3 мл/мин; колонка: SunFire C18, 4.6x50 мм, 3.5 мкм; температура колонки: 50 °С. Детекторы: ADC ELSD, DAD (214 нм и 254 нм), ES-API. Способ В для ЖХ-МС измерений включает, в качестве Прибора: Gilson GX-281; колонка: Xbridge Prep C18 10 мкм OBD, 19x250 мкм; Мобильная фаза: А: Вода (10 мМ NH₄HCO₃), В: ацетонитрил; градиентная фаза: от 5% до 95% В в течение 3 мин; расход: 1.8-2.3 мл/мин; колонка: XBridge C18, 4.6x50 мм, 3.5 мкм; температура колонки: 50 °С. Детекторы: ADC ELSD, DAD (214 нм и 254 нм), MSD (ES-API).

[00215] Можно применить препаративную жидкостную хроматографию высокого давления (Преп-ВЭЖХ) в системе кислого или основного растворителя на приборе Gilson

GX–281. Для системы кислого растворителя применяют колонку Waters SunFire 10 мкм C18 (100 Å, 250x19 мм), и растворителем А для преп-ВЭЖХ является вода/0.05% TFA, а растворителем В представляет собой ацетонитрил. Условиями элюирования могут быть линейное градиентное повышение растворителя В с 5% до 100% в течение 20 мин при расходе в 30 мл/мин. Для системы основного растворителя применяют колонку Waters Xbridge 10 мкм C18 (100 Å, 250x19 мм), и растворителем А для преп-ВЭЖХ были вода/10 мМ бикарбонат аммония (NH_4HCO_3), а растворителем В является ацетонитрил. Условиями элюирования могут быть линейное градиентное повышение растворителя В с 5% до 100% в течение 20 мин при расходе в 30 мл/мин.

[00216] Флэш-хроматографию может быть проведена на приборе Biotage, с картриджами для колонки Agela Flash Column silica–CS; обращенно-фазовую флэш-хроматографию можно проводить на приборе Biotage, с картриджами Boston ODS или Agela C18.

[00217] Метод анализа хиральной ВЭЖХ представляет собой условия хроматографии со сверхкритической подвижной фазой (SFC)

- a) Прибор: SFC Method Station (Thar, Waters)
- b) Колонка: CHIRALPAK AD-H/AS-H/OJ-H/OD-H 4.6×100 мм, 5 мкм (Daicel)
- c) Температура колонки: 40 °C
- d) Подвижная фаза: CO_2 / IPA (0.1% DEA) = 55/45
- e) Расход: 4.0 мл/мин
- f) Обратное давление: 120 бар
- g) Объем вводимой пробы: 2 мкл

[00218] Метод препаративной хиральной ВЭЖХ представляет собой условия хроматографии со сверхкритической подвижной фазой (SFC)

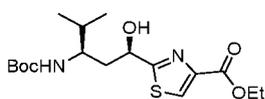
- a) Прибор: SFC-80 (Thar, Waters)
- b) Колонка: CHIRALPAK AD-H/AS-H/OJ-H/OD-H 20×250 мм, 10 мкм (Daicel)
- c) Температура колонки: 35 °C
- d) Подвижная фаза: CO_2 / IPA (0.2% метанол-аммиак) = 30/70
- e) Расход: 80 г/мин
- f) Обратное давление: 100 бар
- g) Длина волны детектирования: 214 нм
- h) Время цикла: 6.0 мин
- i) Раствор образца: 1500 мг, растворенных в 70 мл метанола
- j) Объем вводимой пробы: 2 мл (нагрузка: 42.86 мг/ввод пробы)

СПОСОБЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ

[00219] Промежуточное соединение **1A** синтезировали так, как показано на ФИГ. 1.

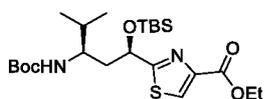
[00220] Соединение **1A-1** (ФИГ. 1) синтезировали в соответствии с изданием *Organic & Biomolecular Chemistry* (2013), 11(14), 2273-2287, а соединение **1A-7** (ФИГ. 1) синтезировали в соответствии с WO 2008/138561 A1. В результате стереоспецифического восстановления кетона **1A-1** с использованием (*R,R*)-Ru-катализатора получили (*R,R*)-изомер **1A-2** (ФИГ. 1). В результате стереоспецифического восстановления кетона **1A-1** с использованием (*S,S*)-Ru-катализатора получили (*S,R*)-изомер **1C-2** (ФИГ. 3).

[00221] Этил **2-[(1*R*,3*R*)-3-{{(*трет*-бутоксикарбонил)амино}-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (1A-2)**



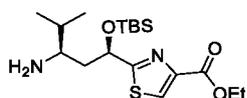
[00222] К раствору соединения **1A-1** (0,30 кг, 0,81 моль) в этаноле (4,5 л) добавили *R,R*-Ru-катализатор (CAS: 192139-92-7, 26 г, 41 ммоль) и гидроксид калия (4,5 г, 81 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 3 часов и контроля посредством ЖХМС реакционную смесь охладил *нас. вод.* хлоридом аммония (1,5 л). Летучие вещества удалили *in vacuo* и остаток разбавили водой (1,2 л). Водную смесь экстрагировали этилацетатом (2,0 л x 2) и объединенные органические экстракты промыли рассолом (0,50 л), высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Сырой продукт очистили посредством колоночной хроматографии на силикагеле (9-15% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **1A-2** (0,13 кг, выход 42%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 373 ($M + H$)⁺, 395 ($M + Na$)⁺. ТЛХ (силикагель): R_f = 0.4 (33% этилацетат в петролейном эфире; R_f значение для другого диастереоизомера составило 0.2.), ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8.12 (s, 1H), 5.20 (d, J = 4.4 Гц, 1H), 5.05-4.97 (m, 1H), 4.55 (d, J = 10 Гц, 1H), 4.42 (q, J = 7.2 Гц, 2H), 3.81-3.66 (m, 1H), 2.14-2.03 (m, 1H), 1.82-1.69 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.40 (t, J = 7.2 Гц, 3H), 0.96 (d, J = 2.0 Гц, 3H), 0.95 (d, J = 2.4 Гц, 3H) ppm. >99.9% ЭИ после хроматографии с колонками AS, AD, OD и OJ.

[00223] Этил **2-[(1*R*,3*R*)-3-{{(*трет*-бутоксикарбонил)амино}-1-[(*трет*-бутилдиметилсилил)окси]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (1A-3)**



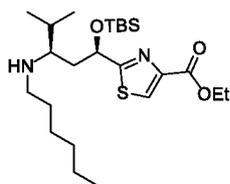
[00224] К раствору соединения **1A-2** (0,11 кг, 0,30 моль) в DCM (1,1 л) в атмосфере азота затем добавили имидазол (0,12 кг, 1,8 моль) по частям и *трет*-бутилдиметилсилилхлорид (TBSCl) (0,14 кг, 0,90 моль) по каплям в течение 15 минут. Реакционную смесь нагревали с обратным холодильником (35 °С) в течение 4 часов до полного разрушения соединения **1A-2** под контролем ЖХМС. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь охладили *нас. вод.* хлоридом аммония (0,40 л) и экстрагировали DCM (0,40 л x 2). Объединенный органический раствор промыли рассолом, высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток растворили в этилацетате (0,40 л) и сконцентрировали *in vacuo*, что повторили 10 раз и в результате получили сырое соединение **1A-3** (0,14 кг, сырое) в виде желтого масла. Сырое соединение **1A-3** применили на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 487 (M + H)⁺, 509 (M + Na)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8.09 (s, 1H), 5.18 (dd, J = 9.2 и 2.0 Гц, 1H), 4.64 (d, J = 9.2 Гц, 1H), 4.41 (q, J = 7.2 Гц, 2H), 3.81-3.66 (m, 1H), 1.89-1.77 (m, 2H), 1.71-1.61 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.39 (t, J = 7.2 Гц, 3H), 0.92 (s, 9H), 0.85-0.81 (m, 6H), 0.13 (s, 3H), -0.10 (s, 3H) ppm.

[00225] Этил **2-[(1R,3R)-3-амино-1-[(трет-бутилдиметилсилил)окси]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (1A-4)**



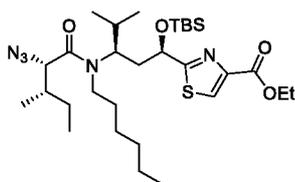
[00226] Раствор сырого соединения **1A-3** (0,14 кг, 0,29 моль) в DCM (1,4 л) охладили до 0 °С. К охлажденному раствору добавили TFA (0,24 л) по каплям в течение 30 минут. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов до полного разрушения соединения **1A-3** по результатам ЖХМС. Затем смесь охладили до 0 °С и затем охладили *нас. вод.* бикарбонатом натрия (2,8 л). Органический слой промыли водой (0,28 л x 2) и рассолом (0,28 л), высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*, в результате чего получили сырое соединение **1A-4** (0,14 кг, сырое соединение) в виде полутвердого вещества. Сырое соединение **1A-4** применили на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 387 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8.09 (s, 1H), 5.58-5.53 (m, 1H), 4.37 (q, J = 7.2 Гц, 2H), 3.15-3.02 (m, 1H), 2.32-2.20 (m, 1H), 2.16-1.95 (m, 2H), 1.38 (t, J = 7.2 Гц, 3H), 0.98-0.95 (m, 6H), 0.94 (s, 9H), 0.20 (s, 3H), 0.06 (s, 3H) ppm.

[00227] Этил **2-[(1R,3R)-1-[(трет-бутилдиметилсилил)окси]-3-(гексиламино)-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (1A-6)**



[00228] К раствору сырого соединения **1A-4** (90 г, 0,23 моль) в DCM (0,12 л) добавили гексанал (**1A-5**, 20 г, 0,20 моль) по каплям в течение 10 минут в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов и затем добавили триацетоксиборогидрид натрия (0,15 кг, 0,70 моль) по частям в реакционную смесь в атмосфере азота при 0 °С. Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Полученную смесь охладили *нас. вод.* бикарбонатом натрия (0,20 л) и разбавили водой (0,20 л). Органический раствор промыли водой (0,20 л) и рассолом (0,20 л), высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии на силикагеле (9-50% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **1A-6** (45 г, выход 41% за 3 этапа) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 471 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8.12 (s, 1H), 5.27 (t, J = 5.6 Гц, 1H), 4.46-4.36 (m, 2H), 3.00-2.87 (m, 2H), 2.80-2.68 (m, 1H), 2.20-2.06 (m, 3H), 1.75-1.62 (m, 1H), 1.40 (t, J = 7.2 Гц, 3H), 1.34-1.21 (m, 8H), 0.94 (s, 9H), 0.93-0.85 (m, 9H), 0.20 (s, 3H), 0.06 (s, 3H) ppm.

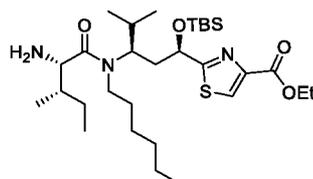
[00229] **Этил 2-[(1R,3R)-3-[(2S,3S)-2-азидо-N-гексил-3-метилпентанамидо]-1-[(трет-бутилдиметилсилил)окси]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (1A-8)**



[00230] К охлажденному раствору соединения **1A-6** (6,0 г, 13 ммоль) в DCM (60 мл) при 0 °С затем добавили DIPEA (8,2 г, 64 ммоль) по каплям в течение 2 минут и соединение **1A-7** (7,9 г, 45 ммоль) по каплям в течение 5 минут в атмосфере азота. Реакционную смесь медленно нагрели до комнатной температуры и перемешивали в течение часа до полного разрушения **1A-6** по результатам ЖХМС. К полученной смеси добавили рассол (12 мл). Водный слой экстрагировали DCM (18 мл) и объединенный раствор DCM высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Сырой продукт очистили посредством колоночной хроматографии на силикагеле (10% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **1A-8** (5,0 г, выход 64%) в виде белого желтого масла. ИЭР м/з: 610 (M + H)⁺, 632 (M + Na)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8.10 (s, 1H), 4.99-4.91 (m, 1H),

4.47-4.32 (m, 3H), 3.32-3.16 (m, 2H), 2.88-3.02 (m, 1H), 2.29-2.19 (m, 1H), 2.10-2.06 (m, 1H), 1.88-1.73 (m, 2H), 1.39 (t, $J = 7.2$ Гц, 3H), 1.35-1.20 (m, 10H), 1.03-0.95 (m, 6H), 0.94 (s, 9H), 0.93-0.85 (m, 9H), 0.16 (s, 3H), -0.10 (s, 3H) ppm. Оптическое вращение: $+99,5^\circ$ (Температура: $19,8^\circ\text{C}$, концентрация: 1,25 мг/мл в метаноле).

[00231] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-2-амино-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-1-[(*трет*-бутилдиметилсилил)окси]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (1A)

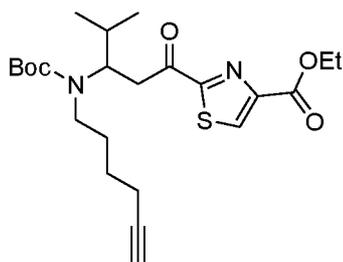


[00232] К раствору соединения **1A-8** (5,0 г, 8,2 ммоль) в THF (50 мл) и воды (2,5 мл) добавили трифенилфосфин (15 г, 57 ммоль) по каплям в течение 5 минут при комнатной температуре в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при 35°C в течение 16 часов под контролем ЖХМС. Затем летучие соединения удалили *in vacuo* и остаток растворили в этилацетате (10 мл). К смеси добавили хлорид цинка (3,3 г, 25 ммоль), и суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Полученную суспензию отфильтровали и фильтрат сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии на силикагеле (50% этилацетат в петролейном эфире) и получили промежуточное соединение **1A** (3,0 г, выход 63%) в виде желтого твердого вещества. ИЭР м/з: 584 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8.50 (s, 1H), 4.86-4.77 (m, 1H), 4.39-4.23 (m, 2H), 3.74-3.64 (m, 1H), 3.29-3.16 (m, 1H), 3.12-2.99 (m, 2H), 2.19-2.03 (m, 2H), 1.98-1.88 (m, 1H), 1.86-1.74 (m, 1H), 1.68-1.54 (m, 2H), 1.32 (t, $J = 7.2$ Гц, 3H), 1.35-1.20 (m, 10H), 1.03-0.94 (m, 6H), 0.90 (s, 9H), 0.88-0.77 (m, 9H), 0.13 (s, 3H), -0.11 (s, 3H) ppm. Оптическое вращение: $+41,3^\circ$ (Температура: $19,8^\circ\text{C}$, концентрация: 1,16 мг/мл в метаноле).

[00233] Промежуточное соединение **1B** синтезировали так, как показано на ФИГ. 2.

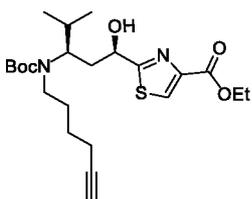
[00234] Соединение **1B-1** синтезировали в соответствии с WO 2008/138561 A1.

[00235] Этил 2-(3-[(*трет*-бутоксикарбонил)(гекс-5-ин-1-ил)амино]-4-метилпентаноил)-1,3-тиазол-4-карбоксилат (1B-3)



[00236] К раствору $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ соединения **1B-2** с $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ (73 г, 0,37 моль) в сухом THF (1,2 л) затем добавили по каплям KHMDS (1 М в THF, 0,37 л, 0,37 моль) в течение 30 минут, а затем раствор соединения **1B-1** (62 г, 0,25 моль) в THF (0,20 л) в течение 30 минут, поддерживая температуру ниже $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Реакционную смесь перемешивали при $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 4 часов до полного разрушения **1B-1** под контролем ТЛХ. Полученную смесь охладили *нас. вод.* хлоридом аммония (0,30 л). Водный раствор экстрагировали этилацетатом (0,5 л x 3). Все органические соединения объединили и промыли рассолом (0,5 л), высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии на силикагеле (10% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **1B-3** (55 г, выход 50%) в виде желтого масла. ИЭР м/з: 351 (M – Boc + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8.42 (s, 1H), 4.44 (q, $J = 7.2$ Гц, 2H), 4.09 (br s, 1H), 3.70-3.42 (m, 2H), 3.30-2.99 (m, 2H), 2.25-2.15 (m, 2H), 2.12-1.90 (m, 2H), 1.70-1.55 (m, 2H), 1.55-1.43 (m, 5H), 1.42 (s, 9H), 1.00 (d, $J = 6.6$ Гц, 3H), 0.93 (d, $J = 6.6$ Гц, 3H) ppm.

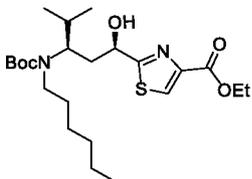
[00237] Этил 2-[(1R,3R)-3-{{(трет-бутокси)карбонил}(гекс-5-ин-1-ил)амино}-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**1B-4**)



[00238] К раствору соединения **1B-3** (54 г, 0,12 моль) в изопропанол (0,60 л) добавили *R,R*-Ru-катализатор (CAS: 192139-92-7, 3,9 г, 6,0 ммоль) и гидроксид калия (0,73 г, 12 ммоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 6 часов до полного разрушения **1B-3** под контролем ТЛХ реакционную смесь охладили *нас.вод.* хлоридом аммония (0,3 л). Смесь экстрагировали этилацетатом (0,5 л x 3) и объединенные органические экстракты промыли рассолом (0,5 л), высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Сырой продукт очистили посредством колоночной хроматографии на силикагеле (10-20% этилацетат в петролейном эфире) и получили

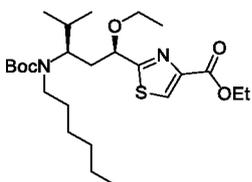
соединение **1B-4** (15 г, выход 28%) в виде желтого масла. ИЭР м/з: 453 (M + H)⁺, 475 (M + Na)⁺.

[00239] **Этил 2-[(1R,3R)-3-{{(трет-бутокси)карбонил}(гексил)амино}-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (1B-5)**



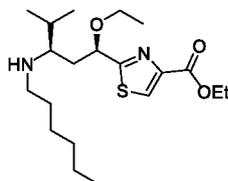
[00240] К раствору соединения **1B-4** (0,45 г, 1,0 ммоль) в метаноле (10 мл) добавили 10% палладий на угле (50 мг, 11 мас.%) в атмосфере азота. Суспензию дегазировали и продули водородом 3 раза, после чего перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение часа. Реакцию контролировали посредством ЖХМС. Полученную суспензию отфильтровали через целит и фильтрат сконцентрировали *in vacuo*, в результате чего получили сырое соединение **1B-5** (0,45 г, сырое соединение) в виде белого твердого вещества. Сырое соединение **1B-5** применили на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 457 (M + H)⁺, 479 (M + Na)⁺.

[00241] **Этил 2-[(1R,3R)-3-{{(трет-бутокси)карбонил}(гексил)амино}-1-этокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (1B-6)**



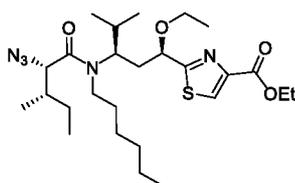
[00242] К раствору соединения **1B-5** (0,44 г, 1,0 ммоль) и 18-краун-6 (0,53 г, 2,0 ммоль) в THF (10 мл) добавили раствор KNMDS в THF (1,0 M, 2,0 мл, 2,0 ммоль) по каплям в течение 5 минут при -78 °C в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при -78 °C в течение 30 минут и затем добавили этилийодид (0,78 г, 5,0 ммоль). Затем смесь медленно нагрели до комнатной температуры, перемешивали в течение часа под контролем ЖХМС. После охлаждения до -10 °C полученную смесь охладили водой (20 мл) и экстрагировали этилацетатом (20 мл x 3). Объединенный органический раствор промыли рассолом (20 мл), высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Сырой продукт очистили посредством преп-ВЭЖХ (5-95% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 mM)) и получили соединение **1B-6** (0,29 г, выход 60% за 2 этапа) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 485 (M + H)⁺, 507 (M + Na)⁺.

[00243] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-1-этокси-3-(гексиламино)-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (1*B*-7)



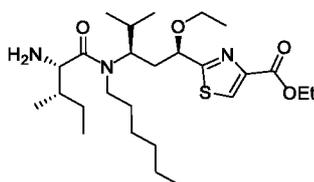
[00244] К раствору соединения **1B-6** (0,20 г, 0,41 ммоль) в DCM (5,0 мл) добавили TFA (1,0 мл) по каплям при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Вос согласно ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo* и получили сырой продукт **1B-7** (0,12 г, сырое соединение) в виде белого твердого вещества. Сырое соединение **1B-7** применили на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 385 (M + H)⁺.

[00245] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-2-азидо-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-1-этокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (1*B*-8)



[00246] В соответствии с процедурой для соединения **1A-8**, за исключением применения **1B-6** (0,15 г, 0,39 ммоль) вместо **1A-6**, получили соединение **1B-8** (0,12 г, выход 60%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 520 (M + H)⁺, 542 (M + Na)⁺.

[00247] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-2-амино-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-1-этокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (1*B*)

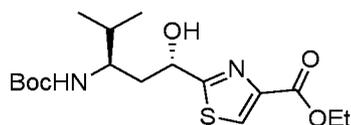


[00248] К раствору соединения **1B-8** (0,10 г, 0,19 ммоль) в метаноле (10 мл) добавили 10% палладий на угле (50 мг, 50 мас.%) в атмосфере азота. Суспензию дегазировали и продули водородом 3 раза. Реакционную смесь затем при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение часа под контролем ЖХМС. Полученную суспензию отфильтровали через целит и фильтрат сконцентрировали *in vacuo*, в результате чего получили промежуточное соединение **1B** (0,16 г, выход 85%) в виде белого твердого

вещества. Промежуточное соединение **1B** применили на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 498 (M + H)⁺.

[00249] Промежуточное соединение **1C** синтезировали так, как показано на ФИГ. 3.

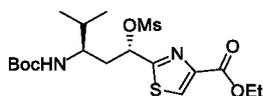
[00250] Этил 2-[(1*S*,3*R*)-3-{{(*трет*-бутокси)карбонил]амино}-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**1C-2**)



[00251] В соответствии с процедурой для соединения **1A-2**, за исключением использования *S,S*-Ru-катализатора (CAS: 192139-90-5) вместо *R,R*-Ru-катализатора, получили соединение **1C-2** (1,7 г, выход 45%, 80 ЭИ %) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 373 (M + H)⁺. ТЛХ (силикагель): R_f = 0,3 (33% этилацетат в петролейном эфире; R_f значение для другого диастереоизомера составило 0,4).

[00252] Небольшое количество продукта отделили посредством хиральной ВЭЖХ (колонка: R'R WHELK 20*250 мм, 10 μm (Daicel), подвижная фаза: CO₂/MeOH (0,2% метанл аммиак) = 90/10) и получили энантиоочищенный продукт **1C-2** (>99,9% ЭИ). Хиральная ВЭЖХ: >99,9% с использованием колонки AS, AD, OD и OJ. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8.42 (s, 1H), 6.53 (d, J = 9.3 Гц, 1H), 6.25 (d, J = 4.7 Гц, 1H), 4.81 (d, J = 4.8 Гц, 1H), 4.30-4.27 (m, 2H), 3.53 (s, 1H), 2.06-1.89 (m, 1H), 1.77-1.70 (m, 2H), 1.34 (s, 9H), 1.30 (t, J = 7.2 Гц, 3H), 0.81 (d, J = 3.4 Гц, 3H), 0.78 (d, J = 3.4 Гц, 3H) ppm.

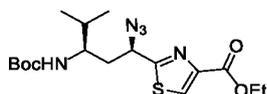
[00253] Этил 2-[(1*S*,3*R*)-3-{{(*трет*-бутокси)карбонил]амино}-1-(метансульфонилокси)-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**1C-3**)



[00254] К суспензии соединения **1C-2** (1,4 г, 4,0 ммоль, 80% ЭИ) в DCM (50 мл) затем добавили триэтиламин (0,60 г, 6,0 ммоль) и метансульфонилхлорид (0,55 г, 4,8 ммоль) по каплям при 0 °С. После того, как реакционная смесь стала прозрачной, ее перемешивали при 0 °С в течение часа, затем при комнатной температуре в течение 30 минут под контролем ТЛХ. Раствор успешно промыли вод. гидрохлоридом (1 N, 50 мл), водой (50 мл), вод. карбонатом натрия (10%, 50 мл) и рассолом (50 мл). Полученный органический раствор высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*, в результате чего получили сырое соединение **1C-3** (1,6 г, сырое соединение) в виде желтого

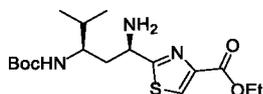
масла. Сырое соединение **1C-3** применили на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 451 (M + H)⁺.

[00255] Этил **2-[(1R,3R)-1-азидо-3-{{(трет-бутокси)карбонил}амино}-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (1C-4)**



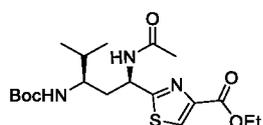
[00256] К перемешанной смеси соединения **1C-3** (1,6 г, сырое соединение) в DMF (10 мл) добавили азид натрия (1,2 г, 18 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Затем смесь разбавили водой (50 мл) и экстрагировали этилацетатом (50 мл x 3). Объединенный органический раствор промыли водой (50 мл) и рассолом (50 мл), высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*, в результате чего получили сырое соединение **1C-4** (1,3 г, сырое соединение) в виде желтого масла. ИЭР м/з: 398 (M + H)⁺.

[00257] Этил **2-[(1R,3R)-1-амино-3-{{(трет-бутокси)карбонил}амино}-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (1C-5)**



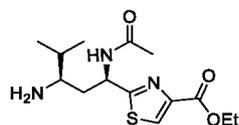
[00258] К раствору соединения **1C-4** (1,3 г, сырое соединение) в метаноле (50 мл) добавили 10% палладий на угле (0,12 г, 10 мас.%) в атмосфере азота. Суспензию дегазировали и продули водородом 3 раза. Реакционную смесь затем при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение часа под контролем ЖХМС. Полученную суспензию отфильтровали через целит и фильтрат сконцентрировали *in vacuo*, в результате чего получили сырое соединение **1C-5** (1,0 г, сырое соединение) в виде желтого масла. Сырое соединение **1C-5** применили на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 371 (M + H)⁺.

[00259] Этил **2-[(1R,3R)-3-{{(трет-бутокси)карбонил}амино}-1-ацетиламино-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (1C-6)**



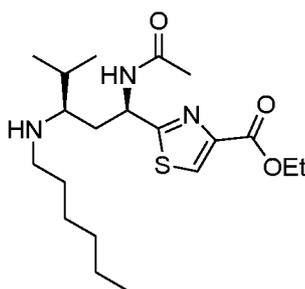
[00260] К перемешанной суспензии соединения **1C-5** (1,0 г, сырое соединение) в DCM (50 мл) затем добавили триэтиламин (0,45 г, 4,5 ммоль) и ацетилхлорид (0,28 г, 3,6 ммоль) при 0 °С. После того, как реакционная смесь стала прозрачной, ее перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 часов под контролем ЖХМС. Полученный раствор затем промыли вод. гидрохлоридом (1 N, 50 мл), водой (50 мл), вод. карбонатом натрия (10%, 50 мл), рассолом (50 мл), высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии на силикагеле (15-20% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **1C-6** (1,0 г, выход 66% за 4 этапа) в виде желтого масла. ИЭР м/з: 413 (M + H)⁺.

[00261] Этил 2-[(1R,3R)-3-амино-1-ацетамидо-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**1C-7**)



[00262] К раствору соединения **1C-6** (1,3 г, 3,0 ммоль) в DCM (20 мл) добавили TFA (4 мл) при 0 °С. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo* и получили сырое соединение **1C-7** (1,0 г, сырое соединение) в виде желтого твердого вещества. Сырое соединение **1C-7** применили на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 314 (M + H)⁺.

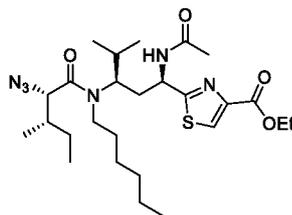
[00263] Этил 2-[(1R,3R)-1-ацетамидо-3-(гексиламино)-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**1C-8**)



[00264] К раствору сырого соединения **1C-7** (0,70 г, 2,2 ммоль) в DCM (30 мл) в атмосфере азота затем добавили гексанал (**1A-5**, 0,26 г, 2,6 ммоль) по каплям в течение 5 минут, триацетоксиборогидрид натрия (0,70 г, 3,3 ммоль) и 2 капли TFA. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Полученную смесь промыли водой (20 мл), вод. карбонатом натрия (10%, 20 мл), рассолом (20 мл), высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток

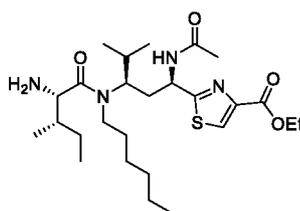
очистили посредством хиральной ВЭЖХ (колонка: IG 20*250мм, 10 μ м, подвижная фаза: CO₂/метанол (0,2% метанол аммиак) = 80/20) и получили соединение **1C-8** (0,52 г, выход 60% за 2 этапа) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 398 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 8.77 (d, *J* = 7.8 Гц, 1H), 8.39 (s, 1H), 5.33-5.26 (m, 1H), 4.38-4.18 (m, 2H), 2.56-2.50 (m, 1H), 2.39-2.30 (m, 2H), 1.89 (s, 3H), 1.83-1.70 (m, 2H), 1.37-1.19 (m, 12H), 0.85-0.79 (m, 9H) ppm. >99.9% ЭИ с использованием колонок IG.

[00265] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-2-азидо-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-1-ацетамидо-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**1C-9**)



[00266] К смеси соединения **1C-8** (0,20 г, 0,50 ммоль) в DCM (5 мл) затем добавили DIPEA (0,13 г, 1,0 ммоль) и соединение **1A-7** (0,18 г, 1,0 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством колоночной хроматографии на силикагеле (15-20% этилацетат в петролейном эфире) и получили соединение **1C-9** (0,19 г, выход 70%) в виде желтого масла. ИЭР м/з: 537 (M + H)⁺.

[00267] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-2-амино-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-1-ацетамидо-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**1C**)

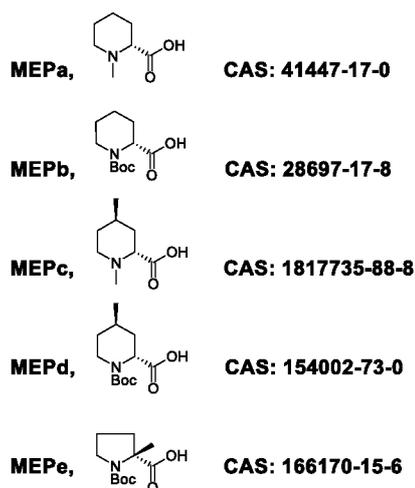


[00268] К раствору соединения **1C-9** (0,19 г, 0,35 ммоль) в метаноле (10 мл) добавили 10% палладий на угле (20 мг, 10 мас.%) в атмосфере азота. Суспензию дегазировали и продули водородом 3 раза. Реакционную смесь затем перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Полученную суспензию отфильтровали через целит и фильтрат сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством колоночной хроматографии на силикагеле (50% этилацетат в петролейном эфире) и получили промежуточное соединение **1C** (0,15 г, выход 90%) в виде желтого масла. ИЭР м/з: 511 (M + H)⁺.

[00269] Промежуточное соединение **1G** синтезировали так, как показано на ФИГ. 4, и так, как описано в Патентной заявке США № 16/724,164, поданной 20 декабря 2019 года. Синтез соответствующего соединения из Патентной заявки США № 16/724,164 включается в настоящий документ посредством ссылки.

[00270] **Промежуточные соединения: МЕР**

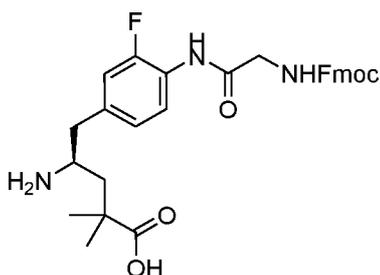
[00271] Промежуточные соединения **МЕРа-е** были коммерчески доступными. CAS номера и структуры приведены далее.



[00272] **Промежуточные соединения: ТУР**

[00273] Промежуточные соединения **ТУРа-л** синтезировали так, как показано на ФИГ. 5. Промежуточные соединения **ТУРа-е** синтезировали так, как показано на ФИГ. 4, и так, как описано в Патентной заявке США № 16/724,164, поданной 20 декабря 2019 года. Синтез соответствующих соединений из Патентной заявки США № 16/724,164 включается в настоящий документ посредством ссылки. Промежуточные соединения **ТУРf-l** синтезировали в соответствии с нижеприведенными процедурами.

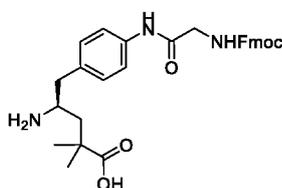
[00274] **(4S)-4-амино-5-[4-(2-{{(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил}амино}ацетиламино)-3-фторфенил]-2,2-диметилпентановая кислота (ТУРf)**



[00275] К раствору Fmoc-Gly-OH (0,25 г, 0,85 ммоль) в DCM (10 мл) добавили оксалилхлорид (0,16 г, 1,3 ммоль) и каплю DMF. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo* и остаток растворили в DMF (4 мл). К раствору добавили **TUP-6a** (30 мг, 85 мкмоль) и DIPEA (0,11 г, 0,85 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили напрямую посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* TFA (0,01%)) и получили соединение **TUP-8aa** (45 мг, выход 84%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 656 (M + Na)⁺, 534 (M – Boc + H)⁺.

[00276] К раствору соединения **TUP-8aa** (45 мг, 71 ммоль) в DCM (0,6 мл) добавили TFA (0,2 мл). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 3 часов под контролем ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-30% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 мМ)), в результате чего получили **TUPf** (36 мг, выход 94%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 534 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 9.77 (s, 1H), 7.90 (d, J = 7.6 Гц, 2H), 7.74-7.71 (m, 3H), 7.67 (t, J = 6.0 Гц, 1H), 7.43 (t, J = 7.6 Гц, 2H), 7.34 (t, J = 7.2 Гц, 2H), 7.20 (d, J = 10.4 Гц, 1H), 7.05 (t, J = 8.4 Гц, 1H), 4.33-4.29 (m, 2H), 4.25 (d, J = 6.4 Гц, 1H), 3.86 (d, J = 5.6 Гц, 2H), 3.44-3.39 (m, 3H), 2.78 (d, J = 6.4 Гц, 2H), 1.77-1.74 (m, 2H), 1.10 (s, 3H), 1.07 (s, 3H) ppm.

[00277] **(4S)-4-амино-5-[4-(2-[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино)ацетиламино]фенил]-2,2-диметилпентановая кислота (TUPg)**

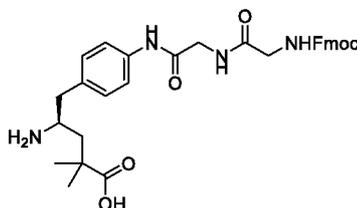


[00278] К раствору **TUP-6b** (0,34 г, 1,0 ммоль) в DCM (5,0 мл) добавили 2,6-лутидин (21 мг, 2,0 ммоль), DMAP (12 мг, 0,10 ммоль) и Fmoc-Gly-Cl (**TUP-7a**) (0,38 г, 1,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь разбавили этилацетатом (50 мл), промыли водой и рассолом, высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100%

ацетонитрил в *вод.* TFA (0,3%)) и получили соединение **TUP-8ba** (0,28 г, выход 45%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 516 (M – Вос + H)⁺.

[00279] К раствору **TUP-8ba** (61 мг, 0,10 ммоль) в DCM (5 мл) добавили TFA (1,0 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Вос *in vacuo* по результатам ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo* и получили сырой продукт **TUPg** (51 мг, выход сырого соединения >100%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 516 (M + H)⁺.

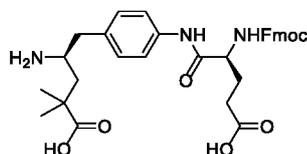
[00280] **(4S)-4-амино-5-{4-[2-(2-{{(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил}амино}ацетида)ацетида]фенил}-2,2-диметилпентановая кислота (TUPh)**



[00281] К раствору Fmoc-Gly-Gly-OH (0,30 г, 0,85 ммоль) в сухом DCM (10 мл) добавили оксалилхлорид (0,17 г, 1,3 ммоль) и DMF (3 мг, 43 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение получаса под контролем ЖХМС и ТЛХ (10% метанол в DCM). Летучие соединения удалили *in vacuo* и остаток добавили к раствору **TUP-6b** (0,34 г, 1,0 ммоль) в сухом DMF (5 мл). К перемешанной реакционной смеси добавили DIPEA (0,33 г, 2,6 ммоль) по каплям. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили сразу посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-30% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 mM)) и получили **TUP-8bb** (0,15 г) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 695 (M + Na)⁺.

[00282] К раствору **TUP-8bb** (0,15 г) в DCM (6 мл) добавили TFA (2 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-30% ацетонитрил в *вод.* TFA (0.01%)), в результате чего получили промежуточное соединение **TUPh** (80 мг, выход 14% из **TUP-6b**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 573 (M + H)⁺.

[00283] **(4S)-4-амино-5-{4-[(2S)-4-карбокси-2-[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}бутанамидо]фенил}-2,2-диметилпентановая кислота (TUPi)**

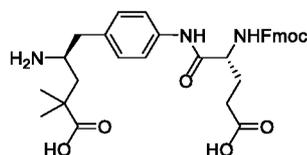


[00284] К раствору Fmoc-Glu(O^tBu)-OH (0,16 г, 0,37 ммоль) в сухом DCM (6 мл) добавили оксалилхлорид (0,15 г, 1,2 ммоль) при 0 °С. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo* и получили сырое соединение Fmoc-Glu(O^tBu)-Cl (0,16 г), которое применили на следующем этапе без дальнейшей очистки.

[00285] К смеси **TUP-6b** (66 мг, 0,20 ммоль) и DIPEA (52 мг, 0,40 ммоль) в DMF (2 мл) добавили сырое соединение Fmoc-Glu(O^tBu)-Cl (0,13 г). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили сразу посредством флэш-хроматографии (0-10% метанол в DCM) и получили **TUP-8bc** (0,20 г) в виде желтого масла. ИЭР м/з: 766 (M + Na)⁺.

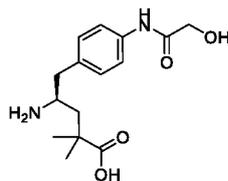
[00286] К раствору **TUP-8bc** (0,18 г) в DCM (4 мл) добавили TFA (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo* и получили **TUPi** (0,14 г, выход сырого соединения > 100%, соль TFA) в виде желтого твердого вещества. ИЭР м/з: 588 (M + H)⁺.

[00287] **(4S)-4-амино-5-{4-[(2R)-4-карбокси-2-[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}бутанамидо]фенил}-2,2-диметилпентановая кислота (TUPj)**



[00288] В соответствии с процедурой для соединения **TUPi**, за исключением того, что начали с Fmoc-D-Glu(O^tBu)-OH, получили **TUPj** (0,13 г, выход сырого соединения > 100%, соль TFA) в виде желтого твердого вещества. ИЭР м/з: 588 (M + H)⁺.

[00289] **(4S)-4-амино-5-[4-(2-гидроксиацетидамо)фенил]-2,2-диметилпентановая кислота (TUPk)**

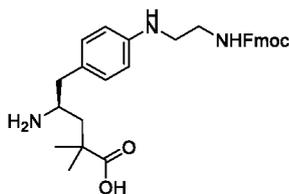


[00290] К раствору **TUP-6b** (0,34 г, 1,0 ммоль) в DCM (5,0 мл) добавили 2,6-лутидин (21 мг, 2,0 ммоль), DMAP (12 мг, 0,10 ммоль) и бензилоксиацетилхлорид (**TUP-7e**) (0,22 г, 1,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь разбавили этилацетатом (50 мл), промыли водой и рассолом, высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* TFA (0.3%)) и получили соединение **TUP-8be'** (0,22 г, выход 45%) в виде белого твердого вещества. ИЭР m/z 385 (M – Вос + H)⁺.

[00291] К раствору соединения **TUP-8be'** (0,10 г, 0,21 ммоль) в метаноле (5 мл) добавили 10% палладий на угле (20 мг) в атмосфере азота. Смесь дегазировали и продули водородом 3 раза. Реакционную смесь затем перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение 3 часов под контролем ЖХМС. Реакционную смесь разбавили метанолом и отфильтровали через целит. Фильтрат сконцентрировали *in vacuo* и получили сырое соединение **TUP-8be** (80 мг, выход сырого соединения >100%) в виде белого твердого вещества. ИЭР m/z 395 (M + H)⁺.

[00292] К раствору сырого соединения **TUP-8be** (39 мг, 0,10 ммоль) в DCM (5 мл) добавили TFA (1,0 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Вос *in vacuo* по результатам ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo* и получили сырое соединение **TUPk** (30 мг, выход сырого соединения >100%) в виде белого твердого вещества. ИЭР m/z 295 (M + H)⁺.

[00293] **(4S)-4-амино-5-{4-[(2-{{(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил}амино}этил)амино]фенил}-2,2-диметилпентановая кислота (TUPl)**



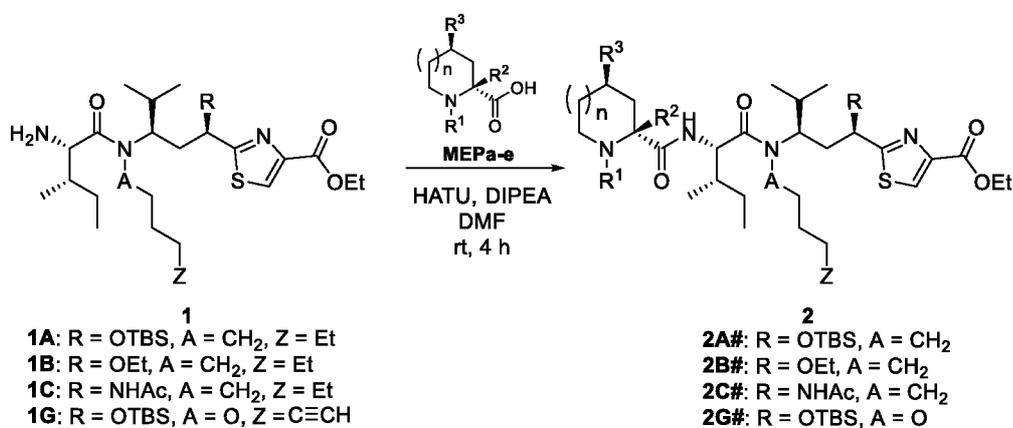
[00294] К раствору **TUP-6b** (0,20 г, 0,60 ммоль) в DCE (25 мл) затем добавили Fmoc-аминоацетальдегид (0,17 г, 0,60 ммоль) и триацетоксиборогидрид натрия (0,13 г, 0,60

ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Полученную смесь охладили *нас. вод.* бикарбонатом натрия при 0 °С. Органический слой промыли *нас. вод.* бикарбонатом натрия, рассолом, высушили над безводным сульфатом магния и отфильтровали. Фильтрат сконцентрировали *in vacuo* и сырой продукт очистили посредством колоночной хроматографии на силикагеле (0-50% этилацетат в петролейном эфире), в результате чего получили **TUP-8bf** (70 мг, выход 19%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 602 (M + H)⁺.

[00295] К раствору **TUP-8bf** (70 мг, 0,12 ммоль) в DCM (5 мл) добавили TFA (1,0 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Вос *in vacuo* по результатам ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo*. Остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили соединение **TUP1** (56 мг, выход 96%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 502 (M + H)⁺.

[00296] Общая процедура I

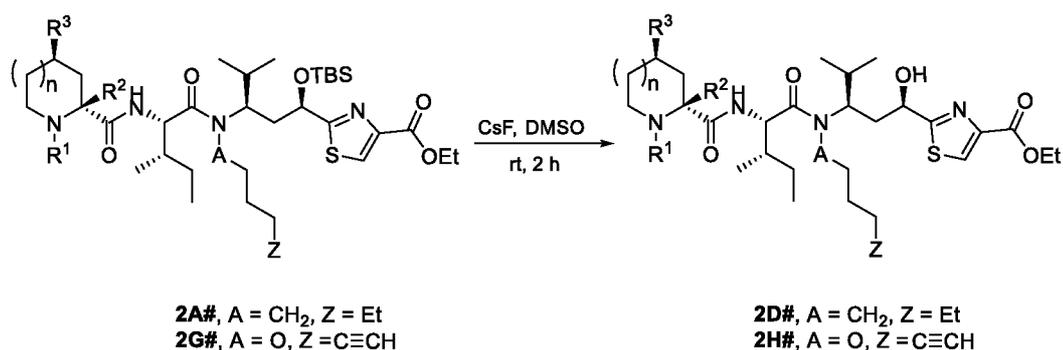
[00297] Амидирование МЕР: синтез промежуточного соединения 2



[00298] К раствору промежуточного соединения **1A-C,G** (1,0 эквив.) в DMF (20 мМ) последовательно добавили DIPEA (2,0 эквив.), HATU (1,5 эквив.) и кислоту **MEPA-e** (1,2 эквив.) при 0 °С. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного разрушения исходного материала по результатам ЖХМС. Полученную смесь охладили водой и экстрагировали этилацетатом (x 3). Объединенный органический раствор промыли рассолом, высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*, в результате чего получили сырой амид **2**. Сырой амид **2** применили на следующем этапе без дальнейшей очистки.

[00299] Общая процедура II

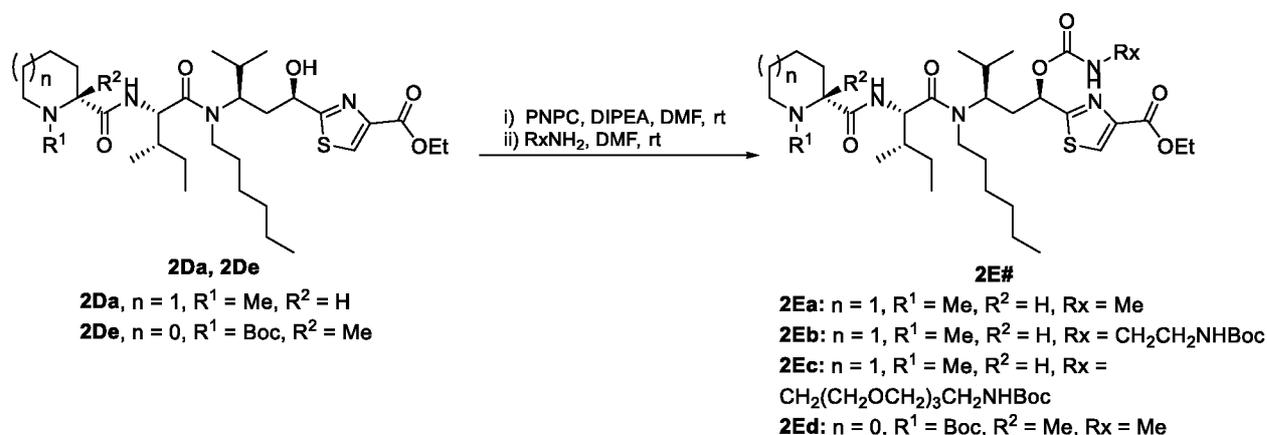
[00300] Удаление TBS-защиты: Из **2A#** в **2D#** и из **2G#** в **2H#**



[00301] К раствору соединений с TBS защитой **2A#** или **2G#** (1,0 эквив.) в DMSO (0,15-0,20 мМ) добавили фторид цезия (2,0 эквив.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Смесь отфильтровали и фильтрат сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-70% ацетонитрил в воде) и получили спирты **3D#** или **2H#** в виде масел.

[00302] **Общая процедура III**

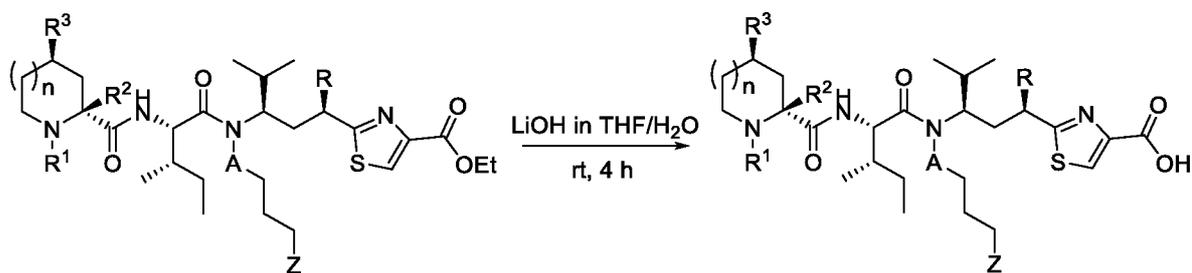
[00303] Синтез карбаматов **2E#**



[00304] К раствору соединения **2Da** или **2De** (1,0 эквив.) в DMF (25 мМ) добавили DIPEA (3,0 эквив.) и 4-нитробензойный ангидрид (5,0 эквив.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов под контролем ЖХМС. Реакционный раствор разбавили водой и экстрагировали этилацетатом (x 3). Объединенный органический раствор высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток растворили в DMF (50 мМ). К раствору добавили амин (RxNH₂) (2,0 эквив.) и DIPEA (2,0 эквив.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (5-95% ацетонитрил в воде) и получили соединение **2E#** (выход 60-71% за 2 этапа из **2D#**) в виде светло-желтого твердого вещества.

[00305] **Общая процедура IV**

[00306] Гидролиз для получения кислот **3**



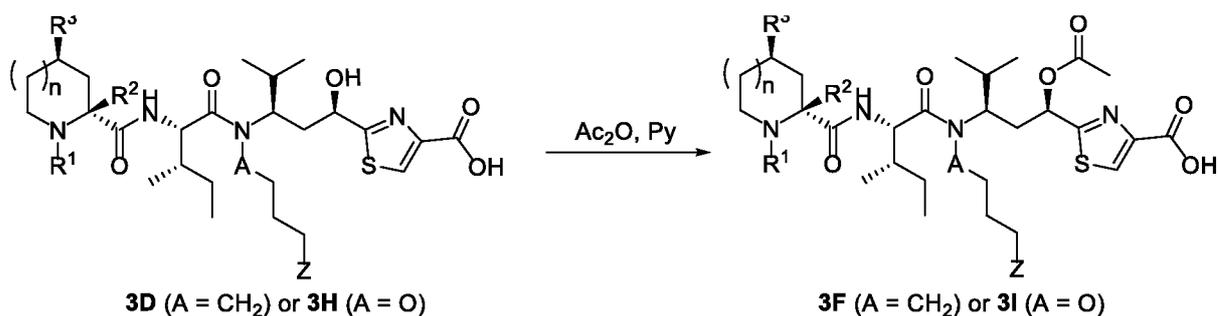
2A, A = CH₂, R = OTBS
2B, A = CH₂, R = OEt
2C, A = CH₂, R = NHAc
2D, A = CH₂, R = OH
2E, A = CH₂, R = OCONHR_x
2H, A = O, R = OH

3A, A = CH₂, R = OTBS
3B, A = CH₂, R = OEt
3C, A = CH₂, R = NHAc
3D, A = CH₂, R = OH
3E, A = CH₂, R = OCONHR_x
3H, A = O, R = OH

[00307] К раствору этилэфира **2A-E,H** (1,0 эквив.) в THF (0,1 M) добавили вод. гидроксид лития (0,5 M, 6,0 эквив.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов до завершения гидролиза по результатам ЖХМС. Затем реакционную смесь окислили уксусной кислотой до pH 3 и сконцентрировали до 1/3 объема. Остаточный водный раствор экстрагировали этилацетатом (x3) и объединенный органический слой промыли рассолом, высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*, в результате чего получили соответствующую кислоту **3A-E,H**. Кислоту **3A-E,H** применили на следующем этапе без дальнейшей очистки.

[00308] **Общая процедура V**

[00309] Ацетилирование **3F** и **3I**



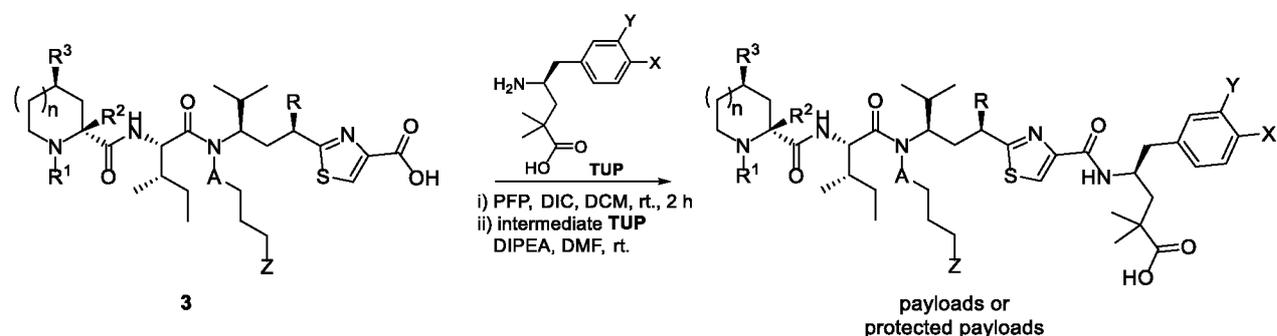
3D (A = CH₂) or **3H** (A = O)

3F (A = CH₂) or **3I** (A = O)

[00310] К раствору соединения **3D** или **3H** (1,0 эквив.) в пиридине (50-60 mM) добавили ангидрид уксусной кислоты (2,0 эквив.) и DMAP (0,02 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4-16 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-25% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (0,08%)) и получили соединение **3F** или **3I** в виде белого твердого вещества.

[00311] **Общая процедура VI**

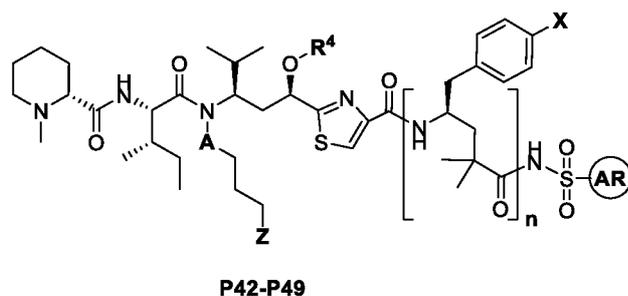
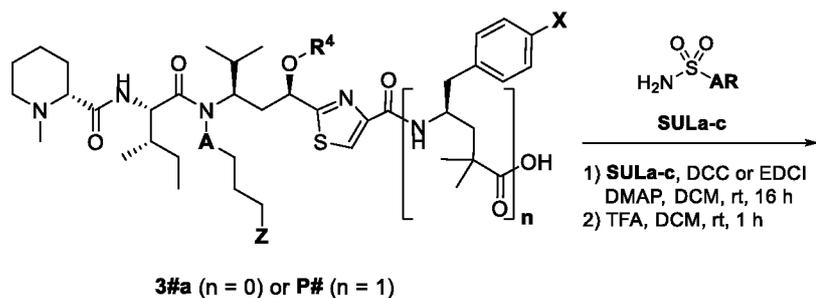
[00312] Синтез тубулизиновых нагрузок или защищенных тубулизиновых нагрузок



[00313] К раствору кислоты **3** (1,0 эквив.) в DCM (30 мМ) добавили пентафторфенол (PFP) (2,5 эквив.) и *N,N'*-диизопропилкарбодиимид (DIC) (2,5 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и получили пентафторофеноловый эфир, который растворили в DCM (50 мМ). К раствору добавили промежуточное соединение **TUP** (1,5 эквив.) и DIPEA (4,0 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили напрямую посредством преп-ВЭЖХ и получили соответствующий амид (выход 7-57%, защищенная тубулизиновая нагрузка или непосредственно тубулизиновая нагрузка) в виде белого твердого вещества.

[00314] **Общая процедура VII**

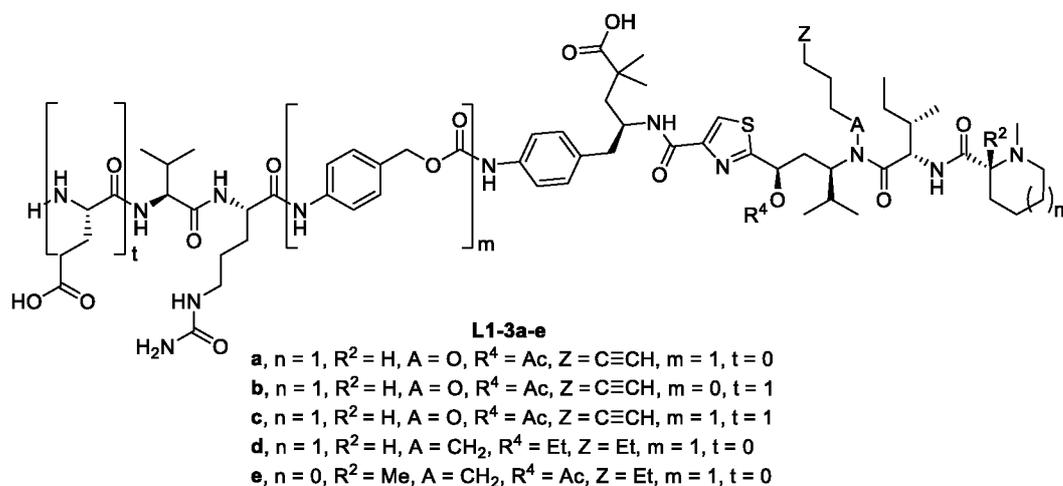
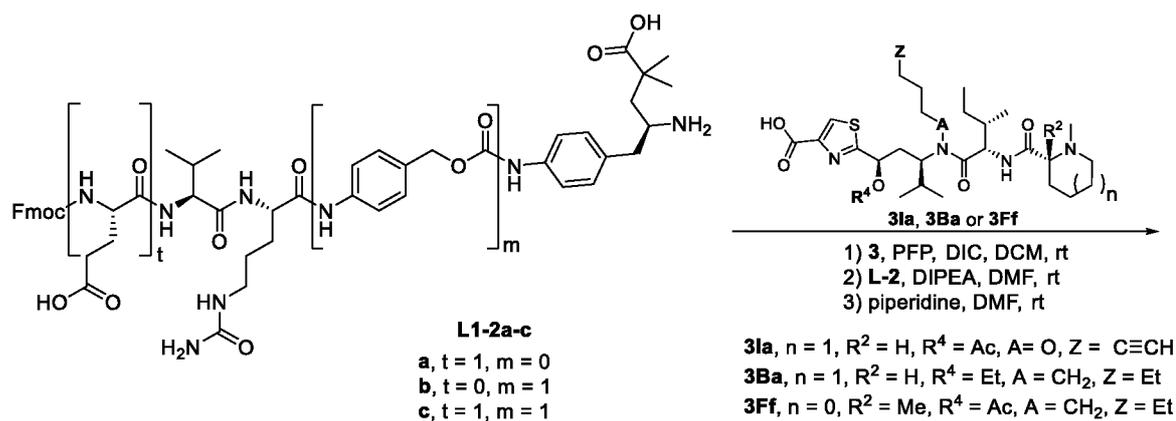
[00315] Синтез *N*-ацилсульфонамидов



[00316] К перемешанной смеси сульфонида **SULa-c** (1,0 эквив.), кислоты **3#a** или **P#** (1,0 эквив.) и DMAP (1,5 эквив.) в DCM (25 мМ) добавили DCC (1,5 эквив.) или EDCI (1,2 эквив.) при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи под контролем ЖХМС. Реакционную смесь сконцентрировали и остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде) и получили сырые *N*-ацилсульфонамиды, содержащие DCU. Сырое соединение повторно очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили чистую Вос-нагрузку в виде белого твердого вещества, которое растворили в DCM (2,5 мМ). К раствору добавили TFA ($V_{\text{TFA}}/V_{\text{DCM}} = 1:1$) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (5-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили нагрузку **P42-49** в виде белого твердого вещества.

[00317] **Общая процедура VIII**

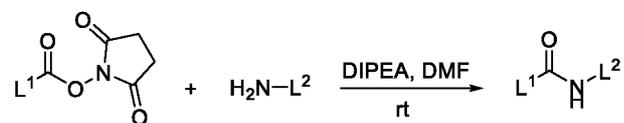
[00318] Синтез *vc*-Tub и *vc*PAB-Tub (**L1-3a-d**)



[00319] К раствору кислоты **3** (1,0 эквив.) в DCM (30 мМ) добавили пентафторфенол (PFP) (2,5 эквив.) и *N,N'*-диизопропилкарбодиимид (DIC) (2,5 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и получили соответствующий пентафторфеноловый эфир, который добавили в смесь соединения **L1-2** (1,0 эквив.) и DIPEA (3,0 эквив.) в DMF (15 мМ). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде) и получили соединение **Fmoc-L1-3** в виде белого твердого вещества, которое растворили в DMF (40 мМ). К раствору добавили пиперидин (3,0 эквив.) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Fmoc по результатам ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,01%)) и получили соединение **L1-3** (выход 25-67% за 3 этапа из кислоты **3**).

[00320] **Общая процедура IX**

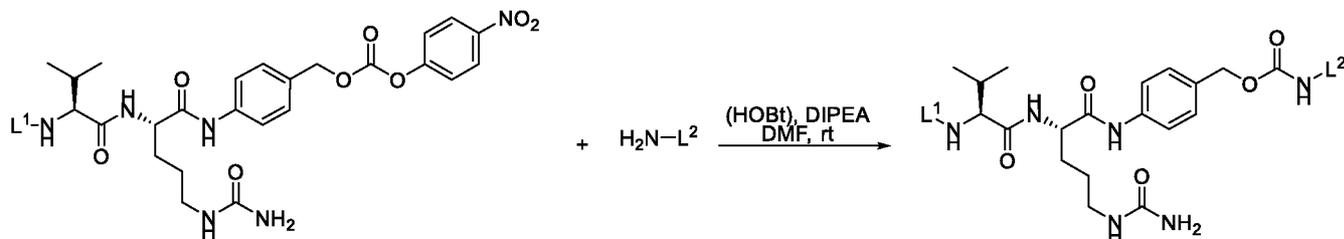
[00321] Амидирование из аминов со сложными эфирами OSu



[00322] К раствору амина (L²-NH₂) (1,0 эквив.) в DMF (10 мМ) добавили сложный эфир OSu (L¹-COOSu) (1,2-1,3 эквив.) и DIPEA (2,5-3,0 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Полученный раствор очистили сразу посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили амид (L¹-CONH-L²) в виде белого твердого вещества.

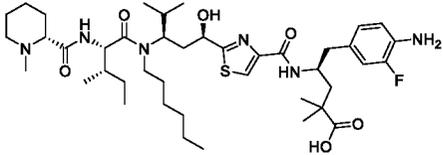
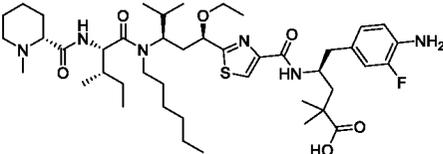
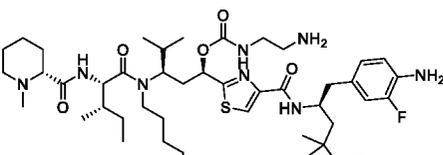
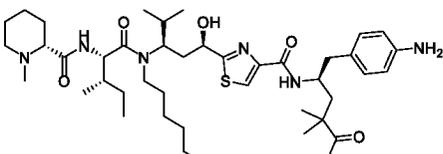
[00323] **Общая процедура X**

[00324] Синтез карбаматов из аминов со сложными эфирами vsPAB-PNP



[00325] К раствору амина (L²-NH₂) (1,0 эквив.) в DMF (16 мМ) добавили L¹-vsPAB-PNP (1,0 эквив.), HOBT (1,0 эквив. или без HOBT) и DIPEA (3,0 эквив.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1-4 часов под контролем ЖХМС. Реакционную смесь очистили сразу посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили необходимый карбамат в виде белого твердого вещества.

Таблица 1-1. Список соединений тубулизинов

№	Структуры	cLogP	МФ	МВ	Масс. м/з	ВЭЖХ чистота (%)	ВЭЖХ КТ (мин)
P1		4,04	C ₄₂ H ₆₇ FN ₆ O ₆ S	803,1	402 (M/2+H)	>99	6,93 (A)
P3		5,04	C ₄₄ H ₇₁ FN ₆ O ₆ S	831,1	831,5 (M+H)	>99	9,18 (B)
P5		3,87	C ₄₅ H ₇₃ FN ₈ O ₇ S	889,2	445 (M/2+H)	>99	8,09 (B)
P6		3,90	C ₄₂ H ₆₈ N ₆ O ₆ S	785,1	393 (M/2+H)	99	6,13 (A)

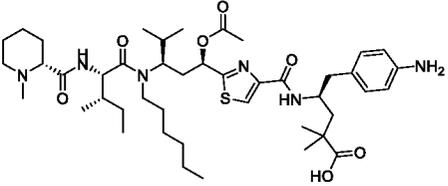
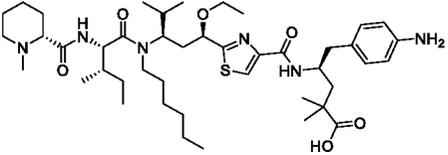
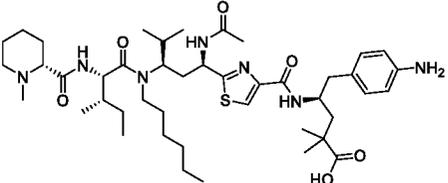
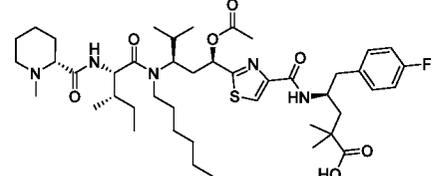
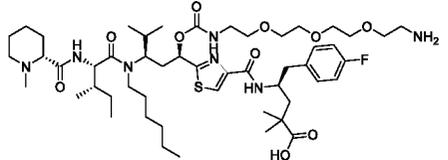
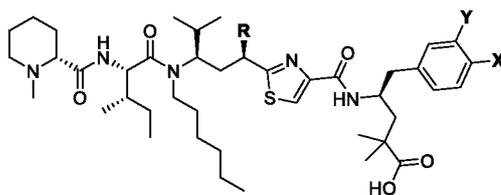
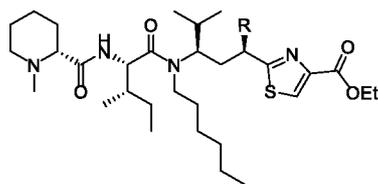
№	Структуры	cLogP	МФ	МВ	Масс. м/з	ВЭЖХ чистота (%)	ВЭЖХ КТ (мин)
P7		4,34	C ₄₄ H ₇₀ N ₆ O ₇ S	827,1	828 (M+H)	99	5,59 (A)
P8		4,90	C ₄₄ H ₇₂ N ₆ O ₆ S	813,2	813,5 (M+H)	99	8,93 (B)
P9		3,62	C ₄₄ H ₇₁ N ₇ O ₆ S	826,2	826 (M+H)	>99	7,98 (B)
P10		5,31	C ₄₄ H ₆₈ FN ₅ O ₇ S	830,1	830,5 (M+H)	>99	9,63 (B)
P11		4,57	C ₅₁ H ₈₄ FN ₇ O ₁₀ S	1006	504 (M/2+H)	99	6,62 (A)

Таблица 1-2. Цитотоксичность тубулизиновых нагрузок, модифицированных на R группе

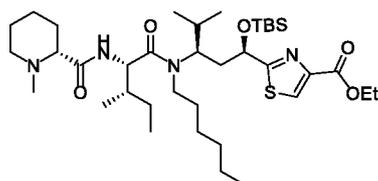


№	Структуры			НСТ-15 IC ₅₀ (нМ)	НСТ-15 с верапамиллом IC ₅₀ (нМ)
	R	X	Y		
P1	OH	NH ₂	F	3,00	0,26
P3	OEt	NH ₂	F	0,07	0,01
P5	OCONHCH ₂ CH ₂ NH ₂	NH ₂	F	38,6	4,44
P6	OH	NH ₂	H	16,3	0,78
P7	OAc	NH ₂	H	0,02	0,02
P8	OEt	NH ₂	H	0,24	0,06
P9	NHAc	NH ₂	H	2,07	0,30
P10	OAc	F	H	0,24	0,09
P11	OCONH(CH ₂ CH ₂ O) ₃ CH ₂ CH ₂ NH ₂	F	H	157	

[00326] Синтез промежуточных соединений **2Aa**, **2B**, **2C** и **2Da**

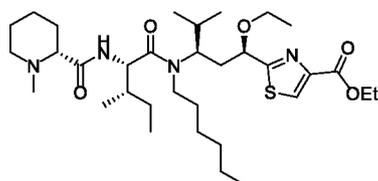


[00327] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-1-[(*трет*-бутилдиметилсилил)окси]-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**2Aa**)



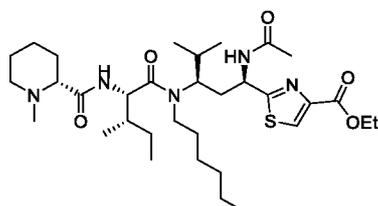
[00328] В соответствии с Общей процедурой I, начиная с промежуточного соединения **1A** (54 мг, 92 моль) с кислотой **МЕРа**, получили сырое соединение **2Aa** (60 мг, сырое соединение) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 710 (M + H)⁺.

[00329] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-1-этокси-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**2B**)



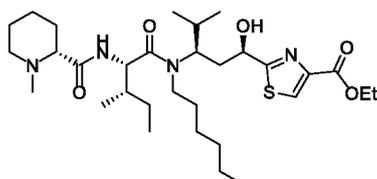
[00330] В соответствии с Общей процедурой I, начиная с промежуточного соединения **1B** (50 мг, 0,10 моль) с кислотой **МЕРа**, получили соединение **2B** (31 мг, выход 50%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством преп-ВЭЖХ (Способ В). ИЭР м/з: 623 (M + H)⁺.

[00331] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-1-ацетамидо-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**2C**)



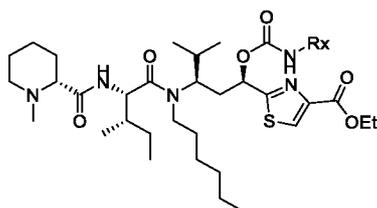
[00332] В соответствии с Общей процедурой I, начиная с промежуточного соединения **1C** (50 мг, 98 мкмоль) с кислотой **МЕРА**, получили соединение **2C** (50 мг, 80% выход сырого соединения) в виде желтого масла. ИЭР м/з: 636 (M + H)⁺.

[00333] Этил **2-[(1R,3R)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (2Da)**

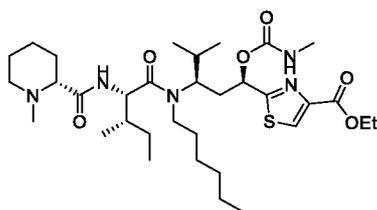


[00334] В соответствии с Общей процедурой II, начиная с сырого соединения **2Aa** (0,50 г) в DMSO (6 мл), получили соединение **2Da** (0,32 г, выход 75% за 2 этапа) в виде светло-желтого масла. ИЭР м/з: 595 (M + H)⁺.

[00335] Синтез карбаматов **2Ea**, **2Eb** и **2Ec**

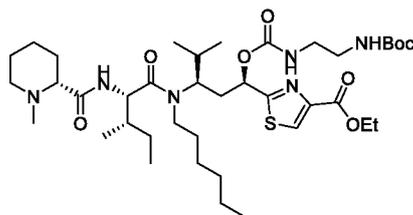


[00336] Этил **2-[(1R,3R)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метил-1-[(метилкарбамоил)окси]пентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (2Ea)**



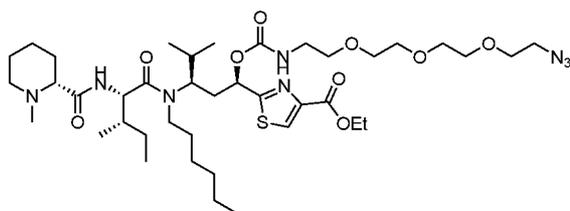
[00337] В соответствии с Общей процедурой III с использованием метиламина получили карбамат **2Ea** (30 мг, выход 71% за 2 этапа из **2Da**) в виде светло-желтого твердого вещества. ИЭР м/з: 652 (M + H)⁺.

[00338] Этил **2-[(1R,3R)-1-[(2-[(трет-бутокси)карбонил]амино}этил)карбамоил]окси]-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (2Eb)**



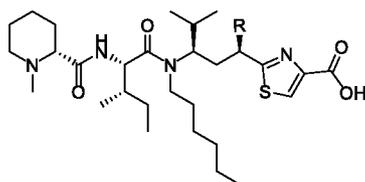
[00339] В соответствии с Общей процедурой III с использованием *N*-Вос-этилендиамина получили карбамат **2Eb** (78 мг, выход 60% за 2 этапа из **2Da**) в виде светло-желтого твердого вещества (загрязненного следовым количеством **2Da** по результатам ЖХМС). ИЭР м/з: 781 (M + H)⁺.

[00340] Этил **2-[(1*R*,3*R*)-1-{{(2-{2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси}этил)карбамоил]окси}-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формаидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**2Ec**)**

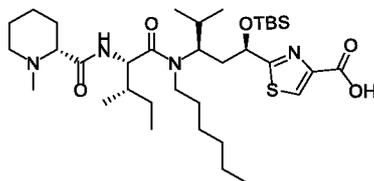


[00341] В соответствии с Общей процедурой III с использованием 11-азидо-3,6,9-триоксаундекан-1-амина получили карбамат **2Ec** (0,22 г, выход 64% за 2 этапа из **2Da**) в виде светло-желтого масла. ИЭР м/з: 839 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.40 (s, 1H), 7.62 (d, *J* = 7.2 Гц, 1H), 7.55 (t, *J* = 4.8 Гц, 1H), 5.55 (d, *J* = 10.0 Гц, 1H), 4.48 (t, *J* = 7.6 Гц, 1H), 4.30 (q, *J* = 5.6 Гц, 2H), 3.61-3.58 (m, 2H), 3.55-3.50 (m, 8H), 3.40-3.37 (m, 4H), 3.32-3.30 (m, 1H), 3.14-3.07 (m, 2H), 2.99-2.94 (m, 1H), 2.83-3.80 (m, 1H), 2.48-2.45 (m, 1H), 2.15-2.09 (m, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.95-1.77 (m, 4H), 1.62-1.41 (m, 6H), 1.36-1.23 (m, 12H), 1.13-1.05 (m, 2H), 0.92 (d, *J* = 7.5 Гц, 3H), 0.89-0.81 (m, 9H), 0.69 (br s, 3H) ppm.

[00342] Синтез промежуточного соединения **3Aa**, **3Ba**, **3C**, **3Da**, **3Ea**, **3Eb**, **3Ec** и **3Fa**

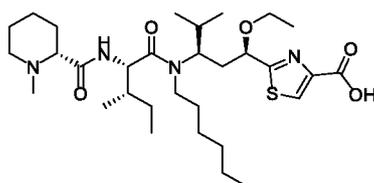


[00343] **2-[(1*R*,3*R*)-1-[(*трет*-бутилдиметилсилил)окси]-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3*Aa*)**



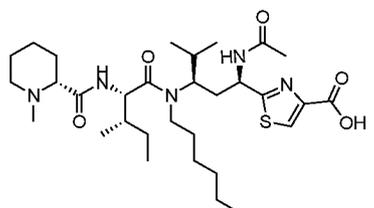
[00344] В соответствии с Общей процедурой IV из **2*Aa*** (0,27 г, сырое соединение) получили кислоту **3*Aa*** (0,18 г, выход 70% за 2 этапа из промежуточного соединения **1*A***) в виде желтого твердого вещества после очистки посредством преп-ВЭЖХ (Способ А). ИЭР *m/z*: 681 (M + H)⁺.

[00345] **2-[(1*R*,3*R*)-1-этокси-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3*Ba*)**



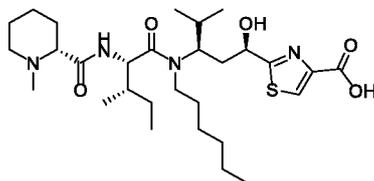
[00346] В соответствии с Общей процедурой IV из **2*Ba*** (62 мг, 0,10 ммоль) получили кислоту **3*Ba*** (46 мг, выход 80%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (5-100% ацетонитрил в *вод*. TFA (0,03%)). ИЭР *m/z*: 595 (M + H)⁺.

[00347] **2-[(1*R*,3*R*)-1-ацетамидо-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3*C*)**



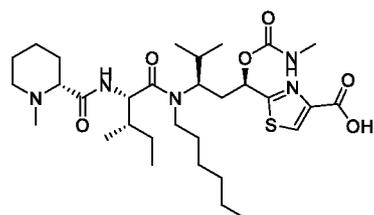
[00348] В соответствии с Общей процедурой IV из **2*C*** (50 мг, 79 ммоль) получили кислоту **3*C*** (40 мг, выход 84%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством преп-ВЭЖХ (Способ А). ИЭР *m/z*: 608 (M + H)⁺.

[00349] **2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-[(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо]пентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3*Da*)**



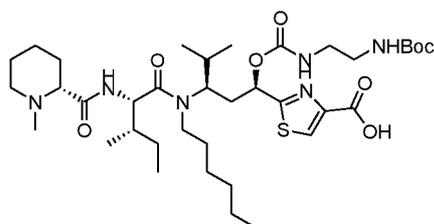
[00350] В соответствии с Общей процедурой IV из **2*Da*** (0,15 г, 0,24 ммоль) получили сырую кислоту **3*Da*** (0,14 г, выход 94%) в виде грязно-белого твердого вещества, которую использовали на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 567 (M + H)⁺.

[00351] **2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-[(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо]пентанамидо]-4-метил-1-[(метилкарбамоил)окси]пентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3*Ea*)**



[00352] В соответствии с Общей процедурой IV из **2*Ea*** получили кислоту **3*Ea*** (0,10 г, выход 85%) в виде белого твердого вещества, которую использовали на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 624 (M + H)⁺.

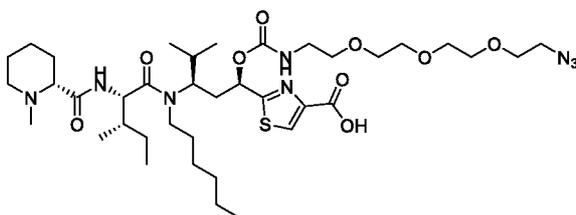
[00353] **2-[(1*R*,3*R*)-1-[(2-[(*tert*-бутоксикарбонил)амино]этил)карбамоил]окси]-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-[(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо]пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3*Eb*)**



[00354] В соответствии с Общей процедурой IV из **2*Eb*** получили кислоту **3*Eb*** (52 мг, выход 70%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством преп-ВЭЖХ (Способ В). ИЭР м/з: 753 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 7.74 (s, 1H),

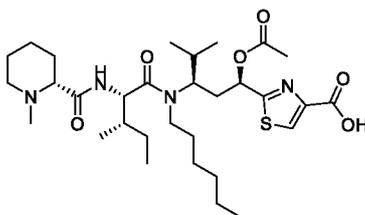
7.60 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 5.50 (d, $J = 8.4$ Гц, 1H), 4.48 (t, $J = 9.2$ Гц, 1H), 3.65-3.57 (m, 1H), 2.97 (s, 5H), 2.81 (d, $J = 11.6$ Гц, 1H), 2.49-2.45 (m, 1H), 2.20-2.11 (m, 2H), 2.08 (s, 3H), 1.94-1.88 (m, 3H), 1.82-1.75 (m, 1H), 1.70-1.44 (m, 6H), 1.37 (s, 10H), 1.29 (s, 6H), 1.22-1.04 (m, 2H), 0.93 (d, $J = 6.4$ Гц, 3H), 0.88-0.80 (m, 10H), 0.72 (br s, 3H) ppm.

[00355] **2-[(1*R*,3*R*)-1-{{(2-{2-[2-(2-азидоэтокси)этокси}этил)карбамоил}окси}-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Ес)**



[00356] В соответствии с Общей процедурой IV из **2Ес** получили кислоту **3Ес** (0,20 г, выход 94%) в виде бесцветного вязкого масла, которую использовали на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 811.5 (M + H)⁺.

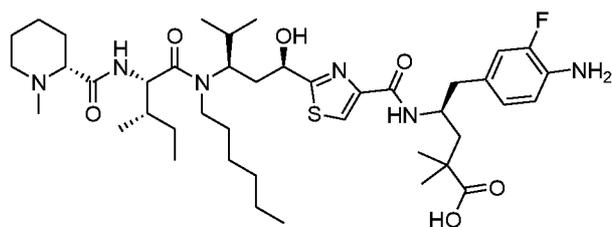
[00357] **2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Фа)**



[00358] В соответствии с Общей процедурой V из соединения **3Да** (0,13 г, 0,22 ммоль) получили кислоту **3Фа** (0,12 г, выход 90%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-25% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (0,08%)). ИЭР м/з: 609 (M + H)⁺.

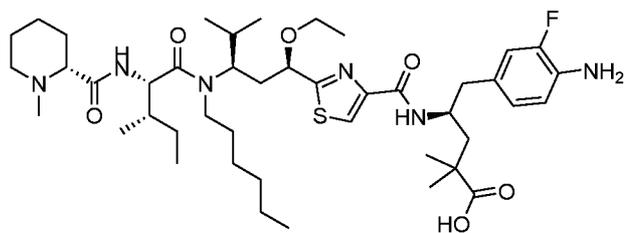
[00359] Синтез тубулизиновых нагрузок в **Таблице 1**

[00360] **P1: (4*S*)-5-(4-амино-3-фторфенил)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (P1)**



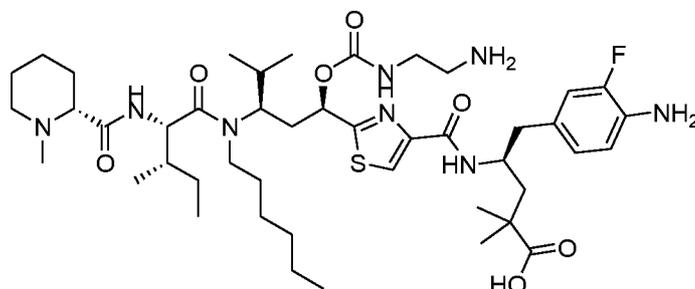
[00361] К раствору **P2** (см. **P2**) (20 мг, 23 ммоль) в *вод.* THF (80 об.%, 2,0 мл) добавили гидроксид лития (11 мг, 0,23 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи под контролем ЖХМС. Затем реакционную смесь окислили *вод.* HCl (1 M) до pH 3 и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический раствор высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 mM)) и получили нагрузку **P1** (17 мг, выход 90%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 402 (M/2 + H)⁺, 804.5 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, метанол-*d*₄) δ 8.05(s, 1H), 6.88-6.74 (m, 3H), 4.69-4.61 (m, 2H), 4.33-4.31 (m, 1H), 3.82-3.76 (m, 1H), 3.02-2.95 (m, 1H), 2.81-2.70 (m, 3H), 2.30-2.29 (m, 1H), 2.20-2.14 (m, 5H), 2.00-1.94 (m, 3H), 1.76-1.55 (m, 9H), 1.40-1.21 (m, 9H), 1.19 (s, 3H), 1.16-1.13 (m, 4H), 1.05-0.90 (m, 15H) ppm.

[00362] **P3**: (4*S*)-5-(4-амино-3-фторфенил)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-этокси-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (**P3**)



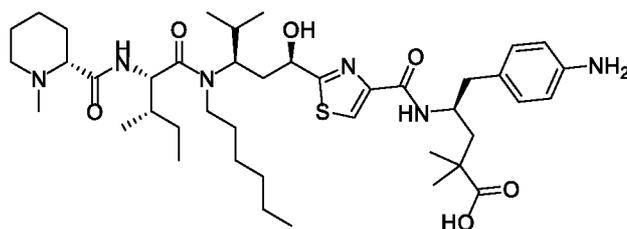
[00363] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Ba** с соединением **TUPa** получили нагрузку **P3** (23 мг, выход 70%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 831.5 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, метанол-*d*₄) δ 7.96 (s, 1H), 6.71-6.58 (m, 3H), 4.56 (d, *J* = 9.6 Гц, 1H), 4.28 (d, *J* = 12.8 Гц, 1H), 4.24-4.17 (m, 1H), 3.78-3.68 (m, 1H), 3.62-3.55 (m, 1H), 3.49-3.35 (m, 2H), 3.10-3.07 (m, 2H), 2.88-2.82 (m, 1H), 2.62-2.60 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 1.94-1.78 (m, 5H), 1.77-1.70 (m, 4H), 1.53-1.41 (m, 4H), 1.24 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 1.18-1.17 (m, 4H), 1.14-1.11 (m, 3H), 1.02 (d, *J* = 10.0 Гц, 6H), 0.89-0.87 (m, 6H), 0.82-0.79 (m, 6H), 0.72 (d, *J* = 6.0 Гц, 3H) ppm.

[00364] **P5:** (4*S*)-5-(4-амино-3-фторфенил)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-{{(2-аминоэтил)карбамоил}окси}-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (**P5**)



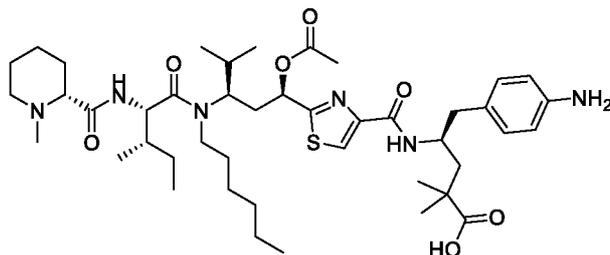
[00365] В соответствии с Общей процедурой VI из **3Еб** с **TUPa** получили **Вос-P5** (20 мг, ИЭР м/з: 445 (M/2 + H)⁺) после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде в течение 30 минут и затем 100% метанол в течение 20 минут). К суспензии **Вос-P5** в DCM (3,6 мл) добавили TFA (0,4 мл) и смесь перемешивали до прозрачности. Полученную смесь перемешивали еще в течение 2 часов до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Реакционную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде) и затем посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили нагрузку **P5** (9 мг, выход 19% из **3Еб**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 445 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8.14 (s, 1H), 7.88 (br s, 2H), 7.75 (d, J = 12.4 Гц, 1H), 6.68-6.61 (m, 2H), 5.56-5.53 (m, 1H), 4.94 (s, 2H), 4.47 (t, J = 9.6 Гц, 1H), 4.19-4.14 (m, 1H), 3.73-3.65 (m, 1H), 3.07-2.92 (m, 3H), 2.84-2.55 (m, 5H), 2.17-1.73 (m, 10H), 1.61-1.41 (m, 7H), 1.36 (d, J = 4.0 Гц, 2H), 1.33-1.27 (m, 7H), 1.20-1.02 (m, 9H), 0.94 (d, J = 6.0 Гц, 3H), 0.85-0.79 (m, 11H), 0.69 (br s, 3H) ppm.

[00366] **P6:** (4*S*)-5-(4-аминофенил)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (**P6**)



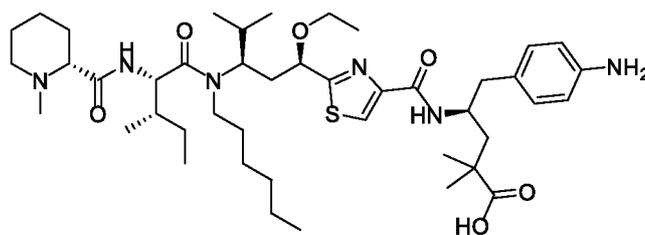
[00367] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Aa** (60 мг, сырое соединение) с соединением **TUPb** получили **TBS-P6**. Без дальнейшей очистки **TBS-P6** растворили в DMSO (3,0 мл). К раствору добавили фторид цезия (28 мг, 0,19 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь отфильтровали и фильтрат очистили посредством преп-ВЭЖХ (Способ А) и получили нагрузку **P6** (23 мг, выход 47% из **2Aa**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 393 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO_{д6}) δ 8.07 (s, 1H), 7.92-7.66 (m, 1H), 7.51-7.20 (m, 1H), 6.79 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 6.44 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 6.32 (d, J = 5.6 Гц, 1H), 4.99-4.77 (m, 2H), 4.64-4.43 (m, 2H), 4.43-4.12 (m, 1H), 3.76 (t, J = 14.4 Гц, 1H), 3.10-2.93 (m, 1H), 2.91-2.77 (m, 1H), 2.06 (s, 3H), 2.02-1.72 (m, 6H), 1.64-1.40 (m, 7H), 1.38-1.23 (m, 8H), 1.19-1.07 (m, 2H), 1.03 (d, J = 9.2 Гц, 7H), 0.92-0.75 (m, 15H), 0.72 (br s, 3H) ppm.

[00368] **P7**: (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-аминофенил)-2,2-диметилпентановая кислота (**P7**)



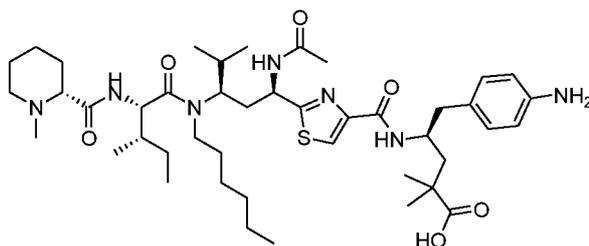
[00369] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Fa** с соединением **TUPb** получили нагрузку **P7** (4,0 мг, выход 50% из **3Fa**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 828 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{д6}) δ 8.19 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.65 (d, J = 8.9 Гц, 1H), 6.81 (d, J = 8.1 Гц, 2H), 6.44 (d, J = 8.2 Гц, 2H), 5.64 (d, J = 13.0 Гц, 1H), 4.84 (s, 2H), 4.49 (t, J = 9.3 Гц, 1H), 4.43-4.20 (m, 1H), 4.11 (s, 1H), 3.67 (d, J = 14.8 Гц, 2H), 3.01 (d, J = 11.0 Гц, 2H), 2.83 (d, J = 11.4 Гц, 1H), 2.68 (d, J = 4.7 Гц, 2H), 2.28 (dd, J = 24.7, 12.1 Гц, 2H), 2.13 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.98-1.88 (m, 2H), 1.87-1.81 (m, 2H), 1.73 (s, 1H), 1.59 (s, 2H), 1.54 (s, 2H), 1.45 (s, 2H), 1.29 (s, 6H), 1.19-1.06 (m, 2H), 1.00 (d, J = 9.8 Гц, 6H), 0.95 (d, J = 6.4 Гц, 3H), 0.83 (dd, J = 16.5, 9.4 Гц, 10H), 0.68 (d, J = 5.8 Гц, 3H) ppm.

[00370] **P8**: (4S)-5-(4-аминофенил)-4-({2-[(1R,3R)-1-этокси-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (**P8**)



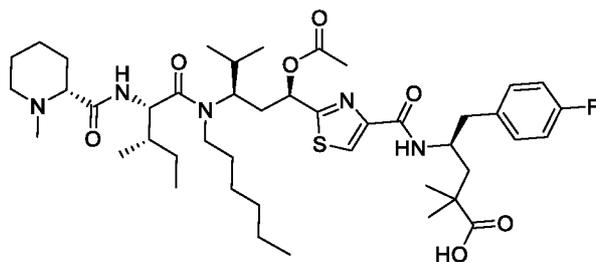
[00371] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Ba** с соединением **TUPb** получили нагрузку **P8** (16 мг, выход 23%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 813.5 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.14 (s, 1H), 7.80-7.67 (br s, 1H), 7.48-7.41 (br s, 1H), 6.79 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 6.44 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 4.93-4.81 (br s, 2H), 4.51 (t, J = 9.6 Гц, 1H), 4.34-4.28 (m, 1H), 4.17-4.12 (m, 1H), 3.79-3.71 (m, 2H), 3.03-2.94 (m, 2H), 2.86-2.83 (m, 1H), 2.64-2.59 (m, 2H), 2.08 (s, 3H), 1.99-1.74 (m, 7H), 1.68-1.37 (m, 9H), 1.33-1.23 (m, 9H), 1.17 (t, J = 7.2 Гц, 3H), 1.03 (d, J = 8.0 Гц, 6H), 0.91-0.82 (m, 12H), 0.74-0.65 (m, 3H) ppm.

[00372] **P9:** (4S)-5-(4-аминофенил)-4-({2-[(1R,3R)-1-ацетиамидо-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формаидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формаидо)-2,2-диметилпентановая кислота (**P9**)



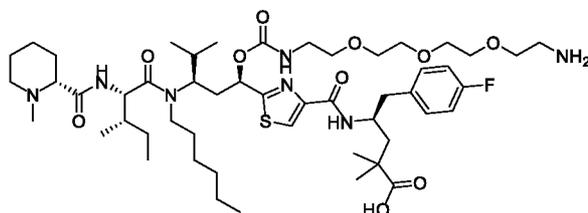
[00373] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3C** с соединением **TUPb** получили нагрузку **P9** (6,4 мг, выход 12% из соединения **3C**) в виде белого твердого вещества после очистки посредством преп-ВЭЖХ (Способ А). ИЭР м/з: 826 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.66 (d, J = 7.3 Гц, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.81 (d, J = 8.2 Гц, 2H), 6.45 (d, J = 8.2 Гц, 2H), 4.91-4.80 (m, 2H), 4.46 (t, J = 9.3 Гц, 1H), 4.20 (s, 1H), 3.68-3.62 (m, 1H), 3.01-2.58 (m, 4H), 2.15-1.98 (m, 5H), 1.97-1.71 (m, 9H), 1.68-1.40 (m, 6H), 1.40-1.16 (m, 9H), 1.10-1.00 (m, 8H), 0.97 (d, J = 6.4 Гц, 3H), 0.92-0.73 (m, 10H), 0.68 (s, 3H) ppm.

[00374] **P10:** (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формаидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формаидо)-5-(4-фторфенил)-2,2-диметилпентановая кислота (**P10**)



[00375] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Fa** с соединением **TUPc** получили нагрузку **P10** (7,0 мг, выход 26% из **3Fa**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 830.5 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.16 (s, 1H), 7.75 (br s, 1H), 7.67 (d, J = 9.6 Гц, 1H), 7.19 (dd, J = 8.0 и 6.0 Гц, 2H), 7.06 (t, J = 8.8 Гц, 2H), 5.64 (d, J = 12.0 Гц, 1H), 4.48 (t, J = 9.2 Гц, 1H), 4.27-4.23 (m, 1H), 3.73-3.65 (m, 1H), 3.02-2.93 (m, 1H), 2.84-2.75 (m, 3H), 2.33-1.83 (m, 11H), 1.90-1.40 (m, 8H), 1.28-1.23 (m, 11H), 1.17-1.13 (m, 1H), 1.06 (d, J = 4.0 Гц, 6H), 0.96 (d, J = 6.4 Гц, 3H), 0.87-0.79 (m, 9H), 0.68 (d, J = 6.0 Гц, 3H) ppm.

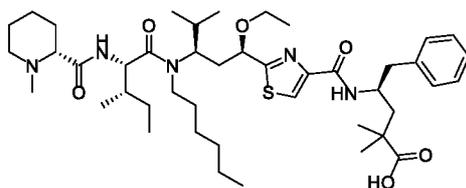
[00376] **P11**: (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-{{(2-{2-[2-(2-аминоэтокси)этокси}этокси}этил)карбамоил]окси}-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-фторфенил)-2,2-диметилпентановая кислота (**P11**)



[00377] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Ec** с соединением **TUPc** получили **азидо-P11** (40 мг, ИЭР м/з 1032 (M + H)⁺) после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% метанол в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)). **Азидо-P11** растворили в этилацетате (20 мл) и к раствору добавили 10% палладий на угле (40 мг) в атмосфере азота. Суспензию дегазировали и продули водородом. Смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Затем смесь отфильтровали через целит. Фильтрат сконцентрировали и остаток очистили посредством обращенно-фазово флэш-хроматографии (0-100% метанол в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили нагрузку **P11** (28 мг, выход 20% из **3Ec**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 504 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.24-8.22 (m, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.67-7.61 (m, 2H), 7.21-7.19 (m, 2H), 7.10-7.06 (m, 2H),

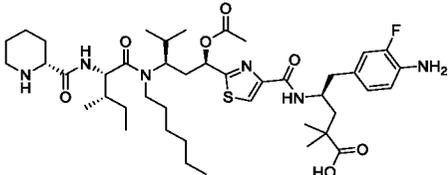
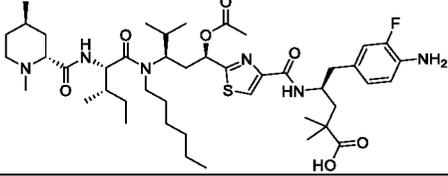
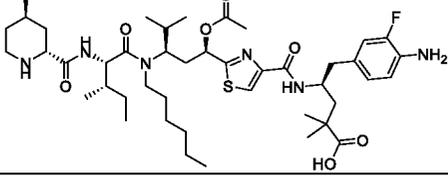
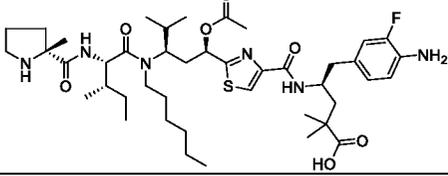
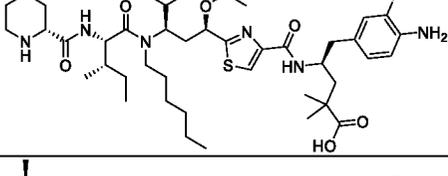
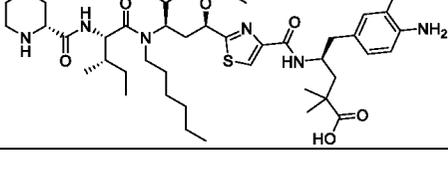
5.58-5.55 (m, 1H), 4.48 (t, $J = 9.2$ Гц, 1H), 4.15 (br s, 1H), 3.83-3.69 (m, 10H), 3.35-3.32 (m, 2H), 3.23-3.17 (m, 1H), 3.04-2.94 (m, 3H), 2.87-2.82 (m, 2H), 2.74-2.67 (m, 3H), 2.15-2.12 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.03-1.61 (m, 6H), 1.63-1.37 (m, 8H), 1.31-1.24 (m, 9H), 1.17-1.05 (m, 2H), 1.01 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.94 (d, $J = 6.4$ Гц, 3H), 0.87-0.81 (m, 10H), 0.71 (br s, 3H) ppm.

[00378] **P50**: (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-этоксипентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметил-5-фенилпентановая кислота (**P50**)



[00379] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Ba** с соединением **TURe** получили **P50** (30 мг, выход 60% из **3Ba**) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% метанол в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)). ИЭР м/з: 798 (M + H)⁺.

Таблица 2-1. Список соединений тубулизинов, модифицированных на МЕР

№	Структуры	cLogP	МФ	МВ	Масс. м/з	Чистота ВЭЖХ (%)	ВЭЖХ КТ (мин)
P12		4,26	C ₄₃ H ₆₇ FN ₆ O ₇ S	831,1	416 (M/2+H)	>99	7,28 (A)
P13		4,74	C ₄₅ H ₇₁ FN ₆ O ₇ S	859,2	430 (M/2+H)	96	7,39 (A)
P14		4,54	C ₄₄ H ₆₉ FN ₆ O ₇ S	845,1	847 (M+H)	99	7,57 (A)
P15		4,25	C ₄₃ H ₆₇ FN ₆ O ₇ S	831,1	416 (M/2+H)	>99	7,51 (A)
P16		4,82	C ₄₃ H ₆₉ FN ₆ O ₆ S	817,1	817 (M+H)	99	9,56 (B)
P17		5,10	C ₄₄ H ₇₁ FN ₆ O ₆ S	831,1	831 (M+H)	99	7,49 (A)

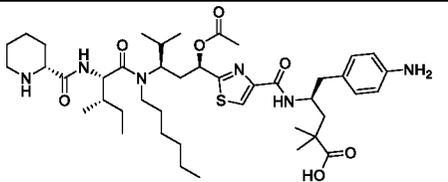
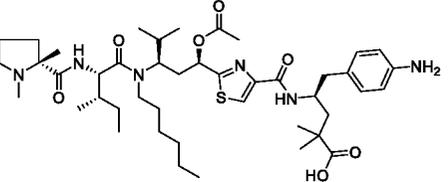
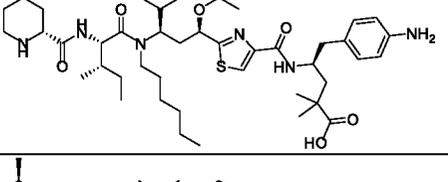
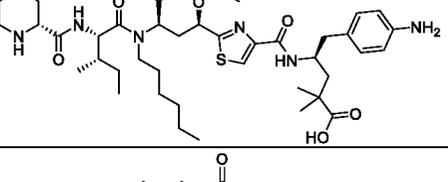
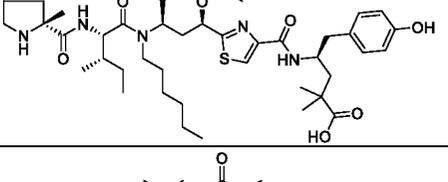
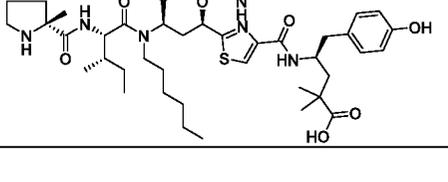
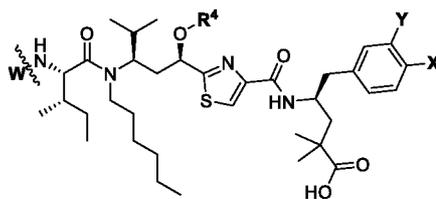
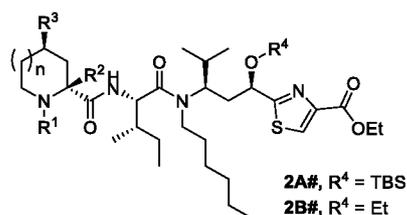
№	Структуры	cLogP	МФ	МВ	Масс. м/з	Чистота ВЭЖХ (%)	ВЭЖХ КТ (мин)
P18		4,11	C ₄₃ H ₆₈ N ₆ O ₇ S	813,1	813 (M+H)	99	8,88 (B)
P19		4,26	C ₄₄ H ₇₀ N ₆ O ₇ S	827,1	827 (M+H)	>99	8,90 (B)
P20		4,66	C ₄₃ H ₇₀ N ₆ O ₆ S	799,1	799 (M+H)	>99	8,92 (B)
P21		4,95	C ₄₄ H ₇₂ N ₆ O ₆ S	813,2	814 (M+H)	99	6,29 (A)
P22		4,63	C ₄₃ H ₆₇ N ₅ O ₈ S	814,1	815 (M+H)	>99	8,57 (B)
P23		4,52	C ₄₃ H ₆₈ N ₆ O ₈ S	829,11	829 (M+H)	>99	8,93 (B)

Таблица 2-2. Цитотоксичность тубулизиновых нагрузок, модифицированных на МЕР

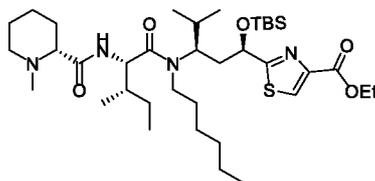


№	Структуры				НСТ-15 IC ₅₀ (нМ)	НСТ-15 с верапамилом IC ₅₀ (нМ)
	W	R ⁴	X	Y		
P12		Ac	NH ₂	F	0,34	0,03
P13		Ac	NH ₂	F	0,15	0,13
P14		Ac	NH ₂	F	1,21	0,10
P15		Ac	NH ₂	F	1,01	0,19
P3		Et	NH ₂	F	0,07	0,01
P16		Et	NH ₂	F	1,96	0,18
P17		Et	NH ₂	F	5,17	0,67
P18		Ac	NH ₂	H	0,98	0,05
P19		Ac	NH ₂	H	0,20	0,01
P20		Et	NH ₂	H	6,97	0,52
P21		Et	NH ₂	H	11,1	1,47
P22		Ac	OH	H	0,27	0,08
P23		CONHMe	OH	H	3,60	0,06

[00380] Синтез промежуточных соединений **2A** и **2B**

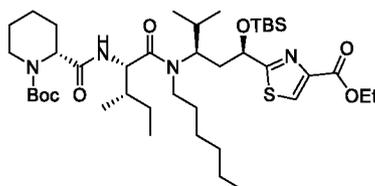


[00381] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-1-[(*трет*-бутилдиметилсилил)окси]-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-[[2(*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**2Aa**)



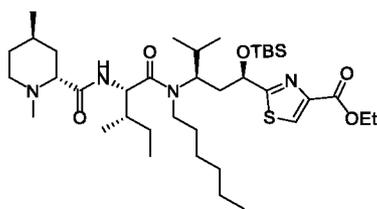
[00382] В соответствии с Общей процедурой I, начиная с промежуточного соединения **1A** (54 мг, 92 моль) с кислотой **MEPa**, получили сырое соединение **2Aa** (60 мг, сырое соединение) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 710 (M + H)⁺.

[00383] *трет*-бутил (2*R*)-2-[[1(*S*,2*S*)-1-[[1(*R*,3*R*)-1-[(*трет*-бутилдиметилсилил)окси]-1-[4-(этоксикарбонил)-1,3-тиазол-2-ил]-4-метилпентан-3-ил](гексил)карбамоил}-2-метилбутил]карбамоил}пиперидин-1-карбоксилат (**2Ab**)



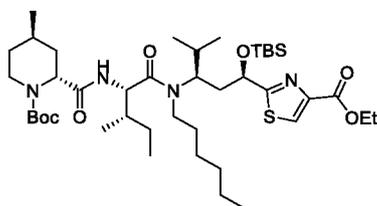
[00384] В соответствии с Общей процедурой I, начиная с промежуточного соединения **1A** с кислотой **MEPb**, получили сырое соединение **2Ab** (0,30 г) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 795.5 (M + H)⁺.

[00385] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-1-[(*трет*-бутилдиметилсилил)окси]-3-[(2*S*,3*S*)-2-[[2(*R*,4*R*)-1,4-диметилпиперидин-2-ил]формамидо}-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**2Ac**)



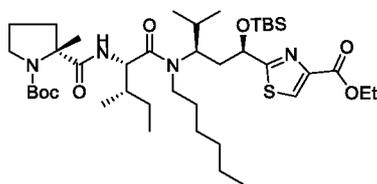
[00386] В соответствии с Общей процедурой I, начиная с промежуточного соединения **1A** с кислотой **MEPc**, получили сырое соединение **2Ac** (0,28 г) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 723 (M + H)⁺.

[00387] *трет*-бутил (2*R*,4*R*)-2-{{[(1*S*,2*S*)-1-{{[(1*R*,3*R*)-1-[(*трет*-бутилдиметилсилил)окси]-1-[4-(этоксикарбонил)-1,3-тиазол-2-ил]-4-метилпентан-3-ил](гексил)карбамоил}-2-метилбутил]карбамоил}-4-метилпиперидин-1-карбоксилат (**2Ad**)



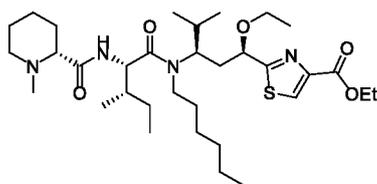
[00388] В соответствии с Общей процедурой I, начиная с промежуточного соединения **1A** (0,10 г, 0,17 ммоль) с кислотой **MEPd**, получили соединение **2Ad** (0,10 г, выход 72%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде). ИЭР м/з: 809.5 (M + H)⁺.

[00389] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-2-{{(2*R*)-1-[(*трет*-бутокси)карбонил]-2-метилпирролидин-2-ил]формамидо}-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-1-[(*трет*-бутилдиметилсилил)окси]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**2Ae**)



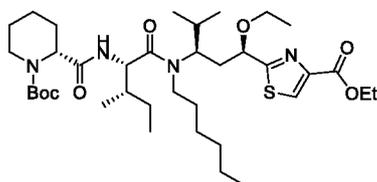
[00390] В соответствии с Общей процедурой I, начиная с промежуточного соединения **1A** с кислотой **MEPe**, получили сырое соединение **2Ae** (0,30 г, сырое соединение) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 795.5 (M + H)⁺.

[00391] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-1-этокси-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**2Ba**)



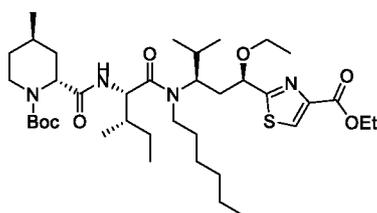
[00392] В соответствии с Общей процедурой I, начиная с промежуточного соединения **1B** (50 мг, 0,10 ммоль) с кислотой **MEPa**, получили соединение **2Ba** (31 мг, выход 50%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством преп-ВЭЖХ (Способ В). ИЭР м/з: 623 (M + H)⁺.

[00393] *трет*-бутил (2R)-2-{{[(1S,2S)-1-{{[(1R,3R)-1-этокси-1-[4-(этоксикарбонил)-1,3-тиазол-2-ил]-4-метилпентан-3-ил](гексил)карбамоил}-2-метилбутил]карбамоил}пиперидин-1-карбоксилат (**2Bb**)



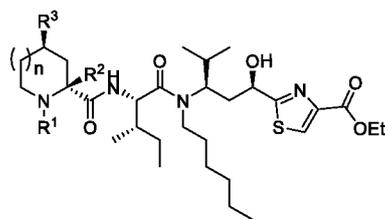
[00394] В соответствии с Общей процедурой I, начиная с промежуточного соединения **1B** (50 мг, 0,10 ммоль) с кислотой **MEPb**, получили соединение **2Bb** (60 мг, выход 84%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством преп-ВЭЖХ (Способ В). ИЭР м/з: 709 (M + H)⁺.

[00395] *трет*-бутил (2R,4R)-2-{{[(1S,2S)-1-{{[(1R,3R)-1-этокси-1-[4-(этоксикарбонил)-1,3-тиазол-2-ил]-4-метилпентан-3-ил](гексил)карбамоил}-2-метилбутил]карбамоил}-4-метилпиперидин-1-карбоксилат (**2Bc**)

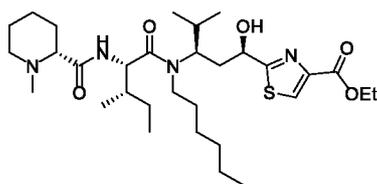


[00396] В соответствии с Общей процедурой I, начиная с промежуточного соединения **1B** (0,10 г, 0,20 ммоль) с кислотой **MEPd**, получили соединение **2Bc** (0,10 г, выход 69%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством преп-ВЭЖХ (Способ В). ИЭР м/з: 724 (M + H)⁺.

[00397] Синтез промежуточного соединения **2D**

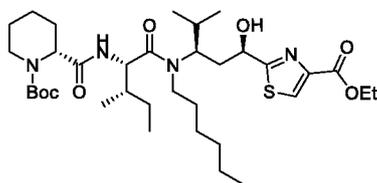


[00398] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**2Da**)



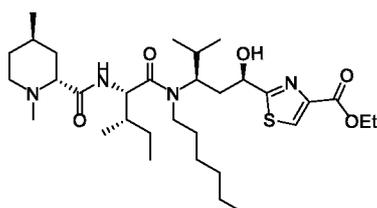
[00399] В соответствии с Общей процедурой II, начиная с сырого соединения **2Aa** (0,50 г) в DMSO (6 мл), получили соединение **2Da** (0,32 г, выход 75% за 2 этапа) в виде светло-желтого масла. ИЭР m/z : 595 ($M + H$)⁺.

[00400] *трет*-бутил (2*R*)-2-{{(1*S*,2*S*)-1-{{(1*R*,3*R*)-1-[4-(этоксикарбонил)-1,3-тиазол-2-ил]-1-гидрокси-4-метилпентан-3-ил}(гексил)карбамоил}-2-метилбутил}карбамоил}пиперидин-1-карбоксилат (**2Db**)



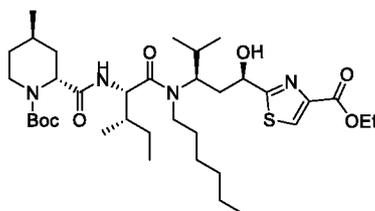
[00401] В соответствии с Общей процедурой II, начиная с сырого соединения **2Ab**, получили соединение **2Db** (0,21 г, выход 99%) в виде грязно-белого твердого вещества. ИЭР m/z : 681 ($M + H$)⁺.

[00402] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-2-{{(2*R*,4*R*)-1,4-диметилпиперидин-2-ил}формамидо}-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**2Dc**)



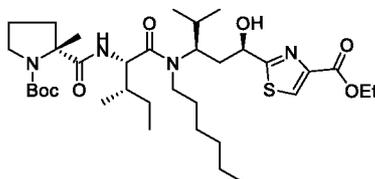
[00403] В соответствии с Общей процедурой II, начиная с сырого соединения **2Ac** (0,21 г, 0,35 ммоль), получили соединение **2Dc** (0,21 г, выход 99% за 2 этапа) в виде грязно-белого твердого вещества. ИЭР м/з: 609 (M + H)⁺.

[00404] *трет*-бутил (2*R*,4*R*)-2-{{(1*S*,2*S*)-1-{{(1*R*,3*R*)-1-[4-(этоксикарбонил)-1,3-тиазол-2-ил]-1-гидрокси-4-метилпентан-3-ил}(гексил)карбамоил}-2-метилбутил]карбамоил}-4-метилпиперидин-1-карбоксилат (**2Dd**)



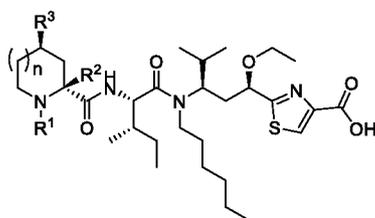
[00405] В соответствии с Общей процедурой II, начиная с соединения **2Ad** (0,10 г, 0,12 ммоль), получили соединение **2Dd** (75 мг, выход 87%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 695 (M + H)⁺.

[00406] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-2-{{(2*R*)-1-[(*трет*-бутокси)карбонил]-2-метилпирролидин-2-ил]формамино}-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**2De**)

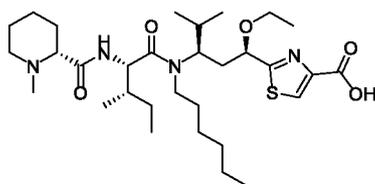


[00407] В соответствии с Общей процедурой II, начиная с сырого соединения **2Ae** (0,30 г), получили соединение **2De** (0,18 г, выход 90% за 2 этапа) в виде грязно-белого твердого вещества. ИЭР м/з: 681 (M + H)⁺.

[00408] Синтез промежуточного соединения **3B**

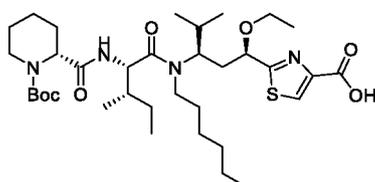


[00409] 2-[(1*R*,3*R*)-1-этокси-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамино}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (**3Ba**)



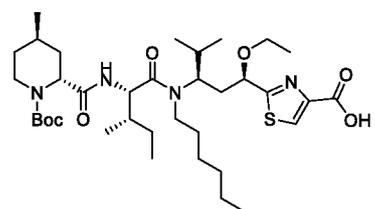
[00410] В соответствии с Общей процедурой IV из **2Ba** (62 мг, 0,10 ммоль) получили кислоту **3Ba** (46 мг, выход 80%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (5-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,03%)). ИЭР м/з: 595 (M + H)⁺.

[00411] **2-[(1R,3R)-3-[(2S,3S)-2-[(2R)-1-[(*tert*-бутоксикарбонил]пиперидин-2-ил]формамидо]-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-1-этокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Bb)**



[00412] В соответствии с Общей процедурой IV из **2Bb** (60 мг, 85 ммоль), получили кислоту **3Bb** (35 мг, выход 57%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (5-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)). ИЭР м/з: 681 (M + H)⁺.

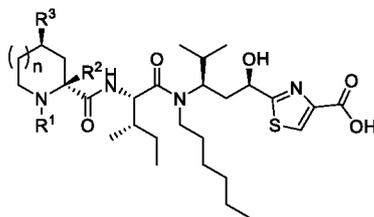
[00413] **2-[(1R,3R)-3-[(2S,3S)-2-[(2R,4R)-1-[(*tert*-бутоксикарбонил]-4-метилпиперидин-2-ил]формамидо]-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-1-этокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Bc)**



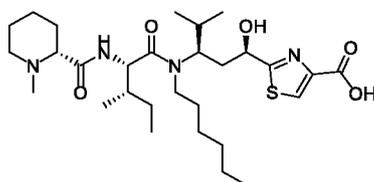
[00414] В соответствии с Общей процедурой IV из **2Bc** (0,10 г, 89 ммоль) получили кислоту **3Bc** (64 мг, выход 71%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-30% ацетонитрил в воде). ИЭР м/з: 695 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.31 (s, 1H), 7.98 (d, J = 9.6 Гц, 1H), 4.62-4.57 (m, 2H), 4.32-4.29 (m, 1H), 3.90-3.82 (m, 1H), 3.81-3.73 (m, 1H), 3.52-3.48 (m, 1H), 3.46-3.42 (m, 1H), 3.10-3.01 (m, 1H), 2.14-2.05 (m, 1H), 1.97-1.84 (m, 4H),

1.61-1.52 (m, 2H), 1.49-1.42 (m, 1H), 1.37 (s, 5H), 1.32 (m, 9H), 1.27-1.24 (m, 1H), 1.16-1.12 (m, 5H), 0.92-0.80 (m, 20H), 0.74-0.69 (m, 3H) ppm.

[00415] Синтез промежуточного соединения **3D**

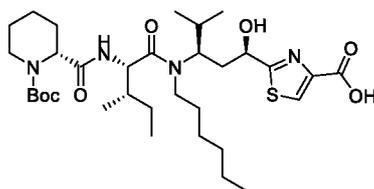


[00416] **2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-[(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо]пентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (**3Da**)**



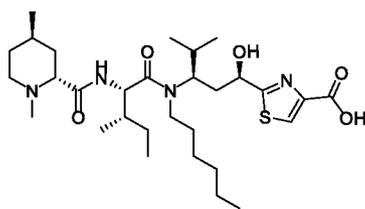
[00417] В соответствии с Общей процедурой IV из **2Da** (0,15 г, 0,24 ммоль) получили сырую кислоту **3Da** (0,14 г, выход 94%) в виде грязно-белого твердого вещества, которую использовали на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 567 (M + H)⁺.

[00418] **2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-2-[(2*R*)-1-[(*tert*-бутоксикарбонил]пиперидин-2-ил]формамидо]-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (**3Db**)**



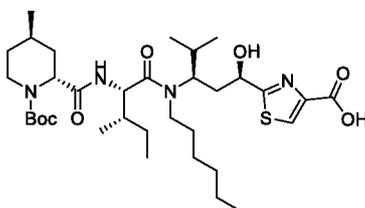
[00419] В соответствии с Общей процедурой IV из **2Db** (0,21 г, 0,31 ммоль), получили сырую кислоту **3Db** (0,18 г, выход сырого соединения 89%) в виде грязно-белого твердого вещества, которую использовали на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 653 (M + H)⁺.

[00420] **2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-2-[(2*R*,4*R*)-1,4-диметилпиперидин-2-ил]формамидо]-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (**3Dc**)**



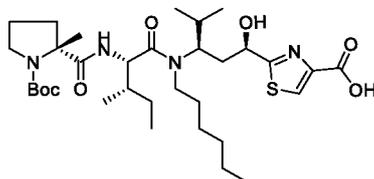
[00421] В соответствии с Общей процедурой IV из **2Dc** (0,21 г, 0,35 ммоль) получили сырую кислоту **3Dc** (0,18 г, выход сырого соединения 89%) в виде грязно-белого твердого вещества, которую использовали на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 580 (M + H)⁺.

[00422] **2-[(1R,3R)-3-[(2S,3S)-2-[(2R,4R)-1-(*tert*-бутоксикарбонил)-4-метилпиперидин-2-ил]формамидо}-N-гексил-3-метилпентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Dd)**



[00423] В соответствии с Общей процедурой IV из **2Dd** (75 мг, 0,11 ммоль) получили кислоту **3Dd** (50 мг, выход 69%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-70% ацетонитрил в воде). ИЭР м/з: 689 (M + Na)⁺, 567 (M – Boc + H)⁺.

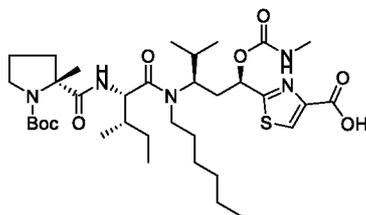
[00424] **2-[(1R,3R)-3-[(2S,3S)-2-[(2R)-1-(*tert*-бутоксикарбонил)-2-метилпирролидин-2-ил]формамидо}-N-гексил-3-метилпентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3De)**



[00425] В соответствии с Общей процедурой IV из **2De** (75 мг, 0,11 ммоль) получили сырую кислоту **3De** (66 мг, выход 92%) в виде грязно-белого твердого вещества, которую использовали на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 653 (M + H)⁺.

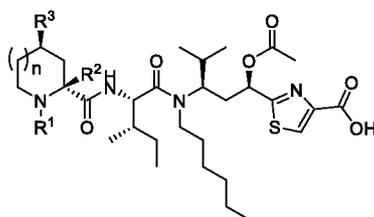
[00426] Синтез промежуточного соединения **3Ed**

[00427] **2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-2-[(2*R*)-1-[(*трет*-бутоксикарбонил)-2-метилпирролидин-2-ил]формамидо}-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-4-метил-1-[(метилкарбамоил)окси]пентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Ed)**

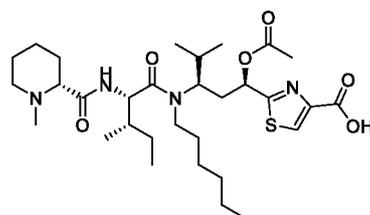


[00428] Далее в соответствии с Общей процедурой III и IV, начиная с **2De** (0,10 г, 0,15 ммоль), получили кислоту **3Ed** (63 мг, выход 68%) в виде грязно-белого твердого вещества, которую использовали на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР m/z 710 ($M + H$)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 12.98 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.37 (d, $J = 4.4$ Гц, 1H), 7.25-7.21 (m, 1H), 5.56-5.52 (m, 1H), 4.48-4.46 (m, 1H), 3.63 (br s, 1H), 3.47 (br s, 1H), 3.17-2.67 (m, 2H), 2.55 (d, $J = 4.4$ Гц, 3H), 2.15-2.11 (m, 1H), 2.06-1.99 (m, 1H), 1.93-1.58 (m, 8H), 1.51-1.31 (m, 19H), 1.08-1.02 (m, 1H), 0.92 (d, $J = 6.4$ Гц, 3H), 0.88-0.78 (m, 10H), 0.70 (br s, 3H) ppm.

[00429] Синтез промежуточного соединения **3F**

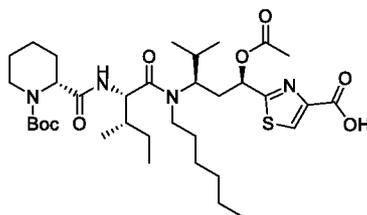


[00430] **2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-[(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Fa)**



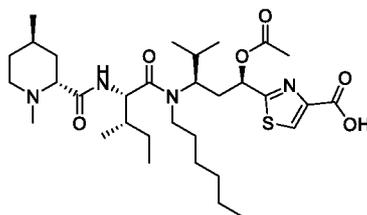
[00431] В соответствии с Общей процедурой V из соединения **3Da** (0,13 г, 0,22 ммоль) получили кислоту **3Fa** (0,12 г, выход 90%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-25% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (0,08%)). ИЭР m/z : 609 ($M + H$)⁺.

[00432] **2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-3-[(2*S*,3*S*)-2-[(2*R*)-1-[(*трет*-бутокси)карбонил]пиперидин-2-ил]формамидо}-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Fb)**



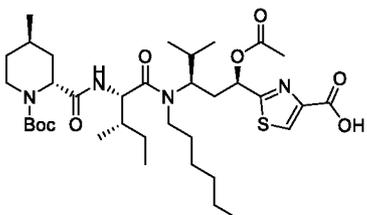
[00433] В соответствии с Общей процедурой V из соединения **3Db** (0,18 г, 0,28 ммоль), получили кислоту **3Fb** (0,18 г, выход 94%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-25% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (0,08%). ИЭР м/з: 695 (M + H)⁺.

[00434] **2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-3-[(2*S*,3*S*)-2-[(2*R*,4*R*)-1,4-диметилпиперидин-2-ил]формамидо}-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Fc)**



[00435] В соответствии с Общей процедурой V из соединения **3Dc** (0,18 г, 0,31 ммоль) получили кислоту **3Fc** (0,17 г, выход 88%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-50% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 мМ)). ИЭР м/з: 623 (M + H)⁺.

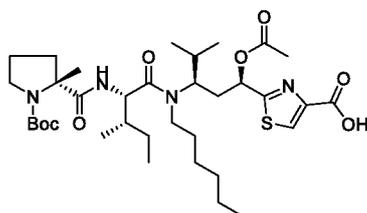
[00436] **2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-3-[(2*S*,3*S*)-2-[(2*R*,4*R*)-1-[(*трет*-бутокси)карбонил]-4-метилпиперидин-2-ил]формамидо}-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Fd)**



[00437] В соответствии с Общей процедурой V из соединения **3Dd** (50 мг, 75 ммоль) получили кислоту **3Fd** (42 мг, выход 45%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-75%

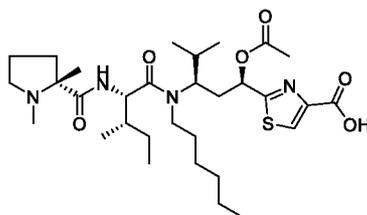
ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (0,08%). ИЭР m/z : 709 ($M + H$)⁺, 609 ($M - Boc + H$)⁺, 731 ($M + Na$)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.24 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 5.64 (d, $J = 12.0$ Гц, 1H), 4.62-4.47 (m, 2H), 3.90-3.81 (m, 1H), 3.80-3.72 (m, 1H), 3.30 (s, 1H), 3.05-2.99 (m, 1H), 2.34-2.28 (m, 1H), 2.22-2.15 (m, 1H), 2.01 (s, 3H), 2.07-1.96 (m, 1H), 1.93-1.87 (m, 1H), 1.57-1.51 (m, 2H), 1.48-1.44 (m, 1H), 1.38 (s, 4H), 1.32 (s, 7H), 1.30-1.26 (m, 5H), 1.24-1.22 (m, 1H), 0.97-0.93 (m, 4H), 0.87-0.65 (m, 18H) ppm.

[00438] **2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-3-[(2S,3S)-2-[(2R)-1-[(*трет*-бутокси)карбонил]-2-метилпирролидин-2-ил]формамидо]-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Fe)**



[00439] В соответствии с Общей процедурой V из соединения **3De** (66 мг, 0,10 ммоль) получили кислоту **3Fe** (50 мг, выход 71%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 мМ)). ИЭР m/z : 695 ($M + H$)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 13.11 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.40-7.32 (m, 1H), 5.63 (d, $J = 13.2$ Гц, 1H), 4.51-4.45 (m, 1H), 4.41-4.40 (m, 1H), 3.75-3.42 (m, 2H), 3.36-3.29 (m, 1H), 3.04-2.89 (m, 1H), 2.27-2.20 (m, 1H), 2.11-2.08 (m, 4H), 2.02-1.51 (m, 9H), 1.46-1.43 (m, 3H), 1.39-1.36 (m, 9H), 1.34-1.28 (m, 6H), 1.07-0.98 (m, 1H), 0.93 (d, $J = 6.4$ Гц, 3H), 0.88-0.82 (m, 9H), 10.67 (d, $J = 4.4$ Гц, 3H) ppm.

[00440] **2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-3-[(2S,3S)-2-[(2R)-1,2-диметилпирролидин-2-ил]формамидо]-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Ff)**



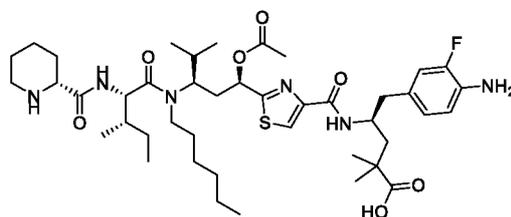
[00441] К раствору соединения **3Fe** (0,40 г, 0,58 ммоль) в DCM (3 мл) добавили TFA (1 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Boc по результатам ЖХМС. Смесь сконцентрировали *in vacuo* и

остаток очистили посредством обращенно-фазовой хроматографии (10-30% ацетонитрил в воде), в результате чего получили промежуточное соединение (0,32 г, выход 78%, соль TFA, ИЭР м/з 595 (M + H)⁺) в виде белого твердого вещества.

[00442] К раствору промежуточного соединения (50 мг, 84 ммоль) в метаноле (2 мл) и H₂O (2 мл) добавили параформальдегид (76 мг, 0,84 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут, а затем добавили 10% палладий на угле (50 мг) в атмосфере азота. Полученную суспензию дегазировали, продули водородом 3 раза, перемешивали в атмосфере водорода при комнатной температуре на протяжении ночи под контролем ЖХМС. Затем реакционную смесь отфильтровали через целит и фильтрат сконцентрировали *in vacuo* и получили соединение **3Ff** (36 мг, выход 71%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 609 (M + H)⁺.

[00443] Синтез тубулизиновых нагузков в **Таблице 2**

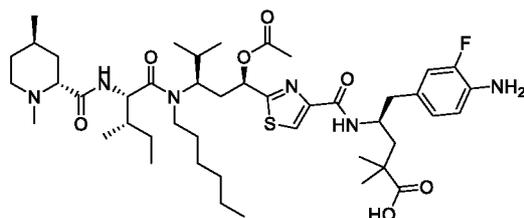
[00444] **P12: (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-пиперидин-2-илформамидо]пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-амино-3-фторфенил)-2,2-диметилпентановая кислота (P12)**



[00445] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Fb** (0,10 г, 0,14 ммоль) с соединением **TUPa**, получили **Вос-P12** (30 мг, ИЭР м/з: 416 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества, которое растворили в DCM (3 мл). К раствору добавили TFA (1 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (5-100% ацетонитрил в вод. муравьиной кислоте (0,1%)), в результате получили **P12** (8,8 мг, выход 7,5% из **3Fb**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 831.4 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 8.37 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.76-7.60 (m, 2H), 6.75 (d, J = 12.4 Гц, 1H), 6.68-6.59 (m, 2H), 5.66 (d, J = 12.8 Гц, 1H), 4.93-4.89 (m, 2H), 4.49 (t, J = 9.2 Гц, 1H), 4.21 (s, 1H), 3.80-3.67 (m, 2H), 3.22-3.17 (m, 2H), 3.10-3.02 (m, 2H), 2.87-2.82 (m, 1H), 2.67-2.56 (m, 2H), 2.32-2.23 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.84-1.80

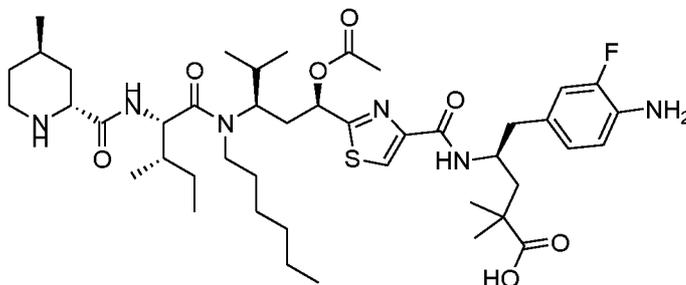
(m, 3H), 1.70-1.60 (m, 4H), 1.49-1.44 (m, 2H), 1.36-1.20 (m, 8H), 1.06-1.05 (m, 7H), 0.95 (d, $J = 6.8$ Гц, 3H), 0.88-0.73 (m, 10H), 0.65 (d, $J = 6.0$ Гц, 3H) ppm. ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO_{d6}) δ -135.5 ppm.

[00446] **P13**: (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-3-[(2*S*,3*S*)-2-{{(2*R*,4*R*)-1,4-диметилпиперидин-2-ил]формамидо}-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-амино-3-фторфенил)-2,2-диметилпентановая кислота (**P13**)



[00447] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Fc** с соединением **TUPa** получили **P13** (11 мг, выход 13%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 430 ($\text{M}/2 + \text{H}$)⁺. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.17 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 6.75 (d, $J = 12.0$ Гц, 1H), 6.67-6.60 (m, 2H), 5.65 (d, $J = 12.4$ Гц, 1H), 4.94 (s, 2H), 4.48 (t, $J = 9.6$ Гц, 1H), 4.20 (s, 1H), 3.78-3.71 (m, 1H), 3.22-3.13 (m, 1H), 2.98-2.87 (m, 2H), 2.66-2.58 (m, 2H), 2.39-2.32 (m, 2H), 2.3 (s, 4H), 2.14 (s, 3H), 1.91-1.82 (m, 3H), 1.66-1.60 (m, 3H), 1.48-1.42 (m, 3H), 1.33-1.24 (m, 9H), 1.18-1.01 (m, 8H), 0.95 (d, $J = 6.4$ Гц, 3H), 0.85-0.79 (m, 13H), 0.70 (d, $J = 4.8$ Гц, 3H) ppm. ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO_{d6}) δ -135.5 ppm.

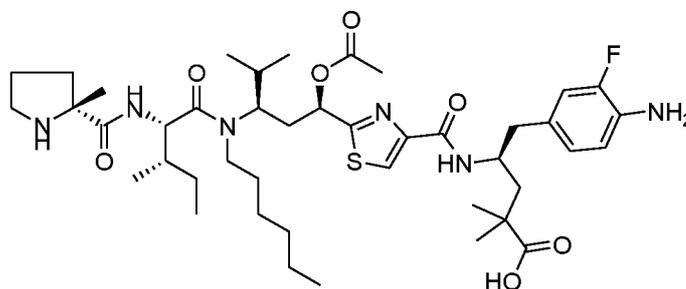
[00448] **P14**: (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*,4*R*)-4-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-амино-3-фторфенил)-2,2-диметилпентановая кислота (**P14**)



[00449] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Fd** (21 мг, 30 ммоль) с соединением **TUPa** получили **Вос-P14** (15 мг, ИЭР м/з: 946 ($\text{M} + \text{H}$)⁺) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-60% ацетонитрил в воде). **Вос-P14** (15 мг) растворили в DCM (3

мл) и к раствору добавили TFA (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (10-95% ацетонитрил в вод. муравьиной кислоте (0,1%)), в результате чего получили **P14** (8,1 мг, выход 32% из **3Fd**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 847 (M + H)⁺, 423 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.50 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.58-7.50 (m, 1H), 6.75 (d, J = 12.8 Гц, 1H), 6.67-6.60 (m, 2H), 5.68-5.63 (m, 1H), 4.92 (s, 2H), 4.54 (t, J = 9.6 Гц, 1H), 4.26-4.18 (m, 1H), 3.7-3.72 (m, 1H), 3.66 (t, J = 11.6 Гц, 1H), 3.09-2.98 (m, 2H), 2.97-2.79 (m, 3H), 2.64-2.58 (m, 2H), 2.34-2.21 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.92-1.79 (m, 5H), 1.69-1.63 (m, 2H), 1.60-1.52 (m, 2H), 1.49-1.43 (m, 1H), 1.34-1.21 (m, 7H), 1.09-1.04 (m, 7H), 0.98-0.93 (m, 6H), 0.89-0.78 (m, 10H), 0.71 (d, J = 6.4 Гц, 3H) ppm.

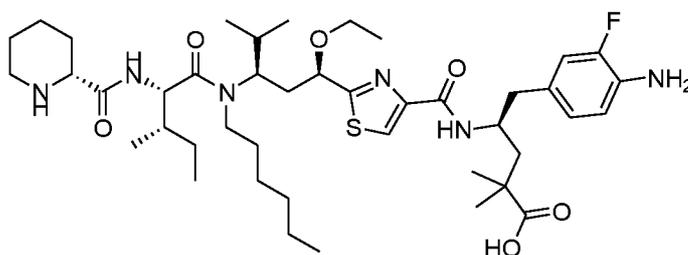
[00450] **P15**: (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-2-метилпирролидин-2-ил]формамино}пентанамино]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формаино)-5-(4-амино-3-фторфенил)-2,2-диметилпентановая кислота (**P15**)



[00451] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Fe** (100 мг, 0,14 ммоль) с соединением **TUPa** получили **Вос-P15** (30 мг, ИЭР м/з: 931.5 (M + H)⁺) в виде грязно-белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-30% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 mM)). **Вос-P15** (30 мг) растворили в DCM (3 мл) и к раствору добавили TFA (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. муравьиной кислоте (0,1%)), в результате чего получили **P15** (8,8 мг, выход 7,6% из **3Ff**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 416 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.17 (s, 1H), 8.12 (d, J = 10.4 Гц, 1H), 7.61-7.56 (m, 1H), 6.75 (d, J = 12.4 Гц, 1H), 6.68-6.59 (m, 2H), 5.65 (d, J = 11.6 Гц, 1H), 4.95 (s, 2H), 4.41 (t, J = 9.6 Гц, 1H),

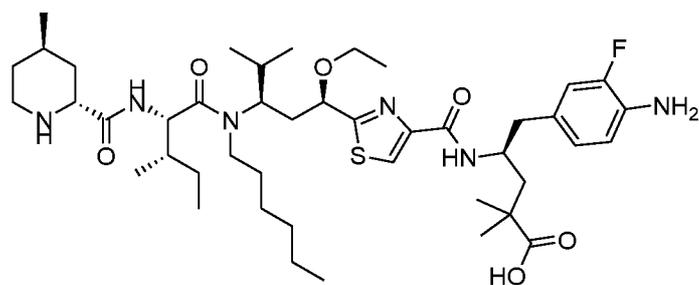
4.21 (s, 1H), 3.80-3.67 (m, 2H), 3.22-3.17 (m, 2H), 3.10-3.02 (m, 2H), 2.87-2.82 (m, 1H), 2.67-2.56 (m, 2H), 2.33-2.22 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.84-1.80 (m, 3H), 1.70-1.60 (m, 4H), 1.49-1.44 (m, 2H), 1.36-1.20 (m, 8H), 1.06-1.05 (m, 7H), 0.95 (d, $J = 6.8$ Гц, 3H), 0.88-0.73 (m, 10H), 0.65 (d, $J = 5.6$ Гц, 3H) ppm. ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO_{d6}) δ -135.5 ppm.

[00452] **P16**: (4S)-5-(4-амино-3-фторфенил)-4-({2-[(1R,3R)-1-этокси-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-пиперидин-2-илформамидо]пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (P16)



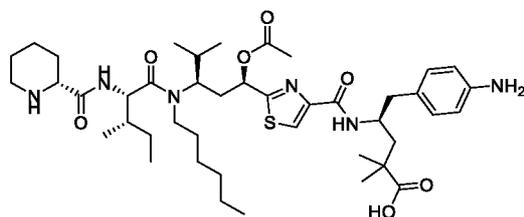
[00453] В соответствии с Общей процедурой VI для нагрузок из соединения **3Bb** (35 мг, 51 ммоль) с соединением **TUPa** получили **Вос-P16** (50 мг, ИЭР м/з: 917.5 ($\text{M} + \text{H}$)⁺) в виде желтого масла. **Вос-P16** растворили в DCM (4 мл). К раствору добавили TFA (1 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,1%)), в результате чего получили **P16** (10 мг, выход 21% из **3Bb**, двойная TFA соль) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 817 ($\text{M} + \text{H}$)⁺. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 12.03 (br s, 1H), 8.84 (d, $J = 9.2$ Гц, 2H), 8.66 (d, $J = 9.9$ Гц, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 6.73 (d, $J = 13.0$ Гц, 1H), 6.69-6.52 (m, 2H), 4.92 (s, 2H), 4.60 (t, $J = 13.2$ Гц, 1H), 4.32 (d, $J = 10.6$ Гц, 1H), 4.22-4.20 (m, 1H), 3.74 (s, 1H), 3.68-3.55 (m, 2H), 3.22-2.90 (m, 5H), 2.64-2.54 (m, 2H), 2.27-2.21 (m, 2H), 2.12-1.37 (m, 13H), 1.40-1.22 (m, 7H), 1.18 (t, $J = 6.8$ Гц, 3H), 1.06 (d, $J = 5.1$ Гц, 6H), 0.94-0.78 (m, 13H), 0.74 (d, $J = 6.1$ Гц, 3H) ppm. ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO_{d6}) δ -73.5, -135.4 ppm.

[00454] **P17**: (4S)-5-(4-амино-3-фторфенил)-4-({2-[(1R,3R)-1-этокси-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R,4R)-4-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (P17)



[00455] В соответствии с Общей процедурой VI для нагрузок из соединения **3Bc** (32 мг, 46 ммоль) с соединением **TUPa** получили **Вос-P17** (25 мг, ИЭР м/з: 931.5 (M + H)⁺) в виде белого твердого вещества. **Вос-P17** растворили в DCM (3 мл). К раствору добавили TFA (1 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (5-90% ацетонитрил в вод. муравьиной кислоте (0,01%)), в результате чего получили **P17** (9,7 мг, выход 26% из **3Bc**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 831 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.19-8.16 (m, 1H), 6.74 (d, J = 12.8 Гц, 1H), 6.67-6.60 (m, 2H), 4.96-4.90 (m, 2H), 4.58-4.51 (m, 1H), 4.32-4.28 (m, 1H), 4.23-4.14 (m, 1H), 3.08-2.99 (m, 3H), 2.94-2.87 (m, 2H), 2.81-2.74 (m, 1H), 2.65-2.59 (m, 2H), 2.00-1.82 (m, 7H), 1.64-1.53 (m, 4H), 1.51-1.46 (m, 1H), 1.33-1.25 (m, 6H), 1.20-1.15 (m, 4H), 1.13-1.11 (m, 1H), 1.07 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 0.94-0.80 (m, 19H), 0.77-0.70 (m, 3H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO_{d6}) δ -135.4 ppm.

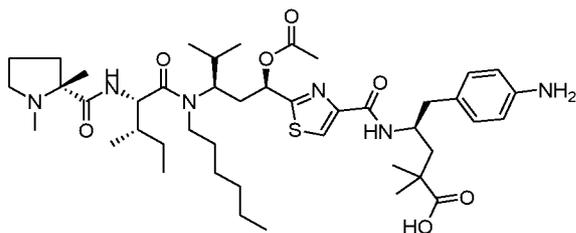
[00456] **P18: (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-пиперидин-2-илформаидо]пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формаидо)-5-(4-аминофенил)-2,2-диметилпентановая кислота (P18)**



[00457] В соответствии с Общей процедурой VI для нагрузок из соединения **3Fb** (20 мг, 29 ммоль) с соединением **TUPb** получили **Вос-P18** (15 мг, ИЭР м/з: 913 (M + H)⁺) в виде белого твердого вещества после очистки посредством преп-ВЭЖХ (5-95% ацетонитрил в вод. TFA (0,01%)). К раствору **Вос-P18** (15 мг) в DCM (0,6 мл) добавили TFA (0,2 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученную смесь

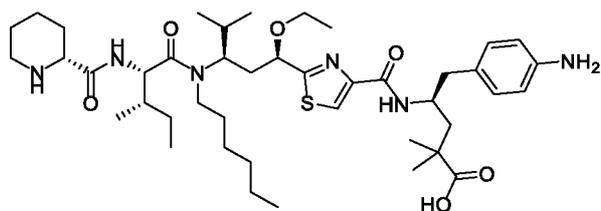
сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 мМ)), в результате чего получили **P18** (4,2 мг, выход 18% из **3Fb**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 813 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 8.36 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.81-7.54 (m, 2H), 6.80 (d, J = 8.3 Гц, 2H), 6.44 (d, J = 8.3 Гц, 2H), 5.65 (d, J = 13.3 Гц, 1H), 4.98-4.71 (m, 2H), 4.48 (t, J = 9.5 Гц, 1H), 4.25-4.08 (m, 2H), 3.02-2.94 (m, 2H), 2.90-2.80 (m, 2H), 2.68-2.59 (m, 1H), 2.30-2.21 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.03-1.95 (m, 2H), 1.86-1.79 (m, 2H), 1.71-1.55 (m, 4H), 1.49-1.41 (m, 2H), 1.34-1.21 (m, 12H), 1.04 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.96 (d, J = 6.4 Гц, 3H), 0.88-0.79 (m, 9H), 0.69 (d, J = 6.2 Гц, 3H) ppm. >99,9% ЭИ при помощи колонки R'R WHELK.

[00458] **P19**: (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-3-[(2*S*,3*S*)-2-[(2*R*)-1,2-диметилпирролидин-2-ил]формаидо]-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формаидо)-5-(4-аминофенил)-2,2-диметилпентановая кислота (**P19**)



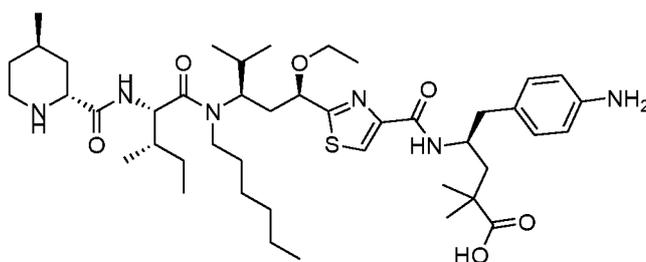
[00459] В соответствии с Общей процедурой VI для нагрузок из соединения **3Ff** (36 мг, 59 ммоль) с соединением **TUPb** получили **P19** (3,2 мг, выход 6,7%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством преп-ВЭЖХ (5-95% ацетонитрил в *вод.* TFA (0,1%)). ИЭР м/з: 827 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-*d*₆) δ 8.43 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.75-7.72 (d, J = 10.4 Гц, 1H), 7.66 (s, 1H), 6.81-6.79 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 6.45-6.43 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 5.66-5.63 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.48-4.42 (d, J = 9.2 Гц, 1H), 4.17 (s, 1H), 3.62-3.54 (m, 1H), 3.06-2.96 (m, 2H), 2.68-2.55 (m, 2H), 2.45-2.41 (m, 2H), 2.33-2.27 (m, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.85-1.88 (m, 1H), 1.77-1.75 (m, 4H), 1.62-1.54 (m, 3H), 1.51-1.45 (m, 3H), 1.29-1.24 (m, 6H), 1.08 (s, 3H), 1.03-1.02 (d, J = 3.6 Гц, 7H), 0.96-0.95 (d, J = 6.4 Гц, 3H), 0.88-0.79 (m, 10H), 0.68-0.66 (d, J = 6.0 Гц, 3H) ppm.

[00460] **P20**: (4*S*)-5-(4-аминофенил)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-этокси-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-[(2*R*)-пиперидин-2-ил]формаидо]пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формаидо)-2,2-диметилпентановая кислота (**P20**)



[00461] В соответствии с Общей процедурой VI для нагрузок из соединения **3Bb** (35 мг, 51 ммоль) с соединением **TUPb** получили **Вос-P20** (50 мг, ИЭР м/з: 899 (M + H)⁺) в виде желтого масла. **Вос-P20** растворили в DCM (4 мл). К раствору добавили TFA (1 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 mM)), в результате чего получили **P20** (9,1 мг, выход 22% из **3Bb**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 799 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.38 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 6.79 (d, J = 8.1 Гц, 2H), 6.44 (d, J = 8.1 Гц, 2H), 4.56-4.20 (m, 6H), 3.05-2.89 (m, 5H), 2.70-2.60 (m, 2H), 1.99-1.78 (m, 5H), 1.65-1.40 (m, 8H), 1.30-1.16 (m, 9H), 1.15-1.10 (m, 4H), 1.03-1.00 (m, 6H), 0.91-0.81 (m, 14H), 0.72 (s, 3H) ppm.

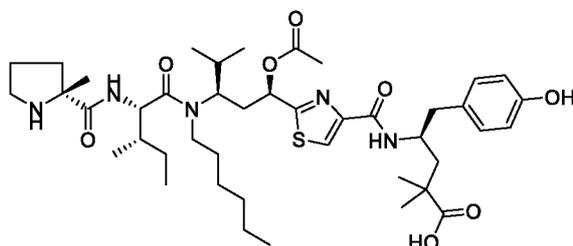
[00462] **P21**: (4S)-5-(4-аминофенил)-4-({2-[(1R,3R)-1-этокси-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R,4R)-4-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (**P21**)



[00463] В соответствии с Общей процедурой VI для нагрузок из соединения **3Bc** (32 мг, 46 ммоль) с соединением **TUPb** получили **Вос-P21** (25 мг, ИЭР м/з: 914 (M + H)⁺) в виде белого твердого вещества. **Вос-P21** растворили в DCM (3 мл). К раствору добавили TFA (1 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (10-95% ацетонитрил в вод. муравьиной кислоте (0,01%)), в результате чего получили **P21** (11 мг, выход 29%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 407 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.86-8.74 (m, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.15 (s, 1H),

8.79 (d, $J = 8.4$ Гц, 2H), 8.44 (d, $J = 8.0$ Гц, 2H), 4.62-4.54 (m, 1H), 4.34-4.29 (m, 1H), 4.22-4.14 (m, 1H), 4.98-3.88 (m, 1H), 3.72-3.63 (m, 1H), 3.57-3.53 (m, 1H), 3.52-3.46 (m, 2H), 3.10-3.00 (m, 4H), 2.64-2.57 (m, 1H), 2.55-2.52 (m, 1H), 2.00-1.83 (m, 7H), 1.80-1.72 (m, 3H), 1.68-1.62 (m, 1H), 1.50-1.44 (m, 1H), 1.36-1.26 (m, 7H), 1.20-1.16 (m, 3H), 1.13-1.09 (m, 1H), 1.06-0.98 (m, 10H), 0.94-0.92 (m, 3H), 0.90-0.85 (m, 7H), 0.84-0.79 (m, 4H), 0.77-0.72 (m, 3H) ppm.

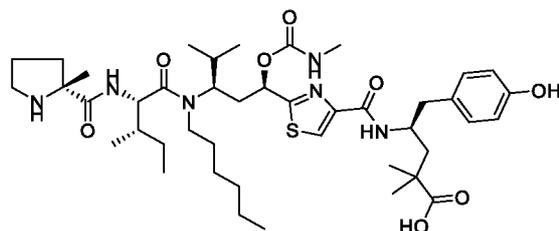
[00464] **P22**: (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-2-метилпирролидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-гидроксифенил)-2,2-диметилпентановая кислота (**P22**)



[00465] В соответствии с Общей процедурой VI для нагрузок из соединения **3Fd** (49 мг, 70 ммоль) с соединением **TUPd** получили **Вос-P22** (22 мг, ИЭР м/з: 814 ($M + H$)⁺) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,01%)). К суспензии **Вос-P22** в DCM (4,5 мл) добавили TFA (0,5 мл). После того, как суспензия стала прозрачной, реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)), в результате чего получили **P22** (10 мг, выход 50%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 814 ($M + H$)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 9.26 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.12 (d, $J = 10.0$ Гц, 1H), 7.74 (br s, 1H), 6.94 (d, $J = 8.4$ Гц, 2H), 6.63 (d, $J = 8.4$ Гц, 2H), 5.65 (d, $J = 13.2$ Гц, 1H), 4.40 (t, $J = 9.6$ Гц, 1H), 4.22 (br s, 1H), 3.67-3.60 (m, 1H), 3.05-2.89 (m, 2H), 2.72-2.59 (m, 2H), 2.33-2.23 (m, 1H), 2.14 (br s, 4H), 1.98-1.91 (m, 1H), 1.92-1.80 (m, 3H), 1.76-1.40 (m, 8H), 1.26 (br s, 10H), 1.06-0.99 (m, 7H), 0.96 (d, $J = 6.4$ Гц, 3H), 0.88-0.81 (m, 10H), 0.65 (d, $J = 5.6$ Гц, 3H) ppm.

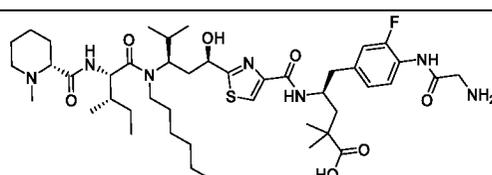
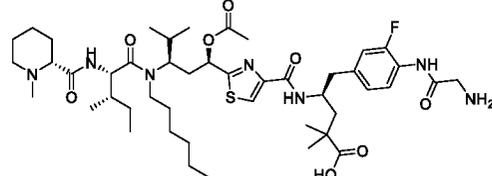
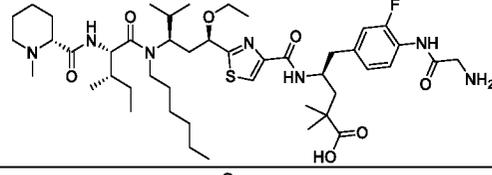
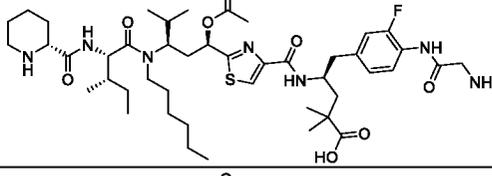
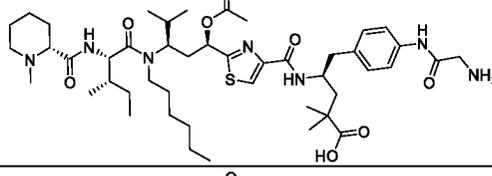
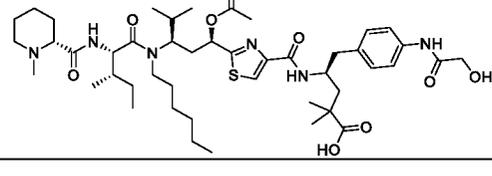
[00466] **P23**: (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-2-метилпирролидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метил-1-

**[(метилкарбамоил)окси]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-
гидроксифенил)-2,2-диметилпентановая кислота (P23)**



[00467] В соответствии с Общей процедурой VI для нагрузок из соединения **3Ed** с соединением **TUPd** получили **Вос-P23** (25 мг) в виде белого твердого вещества. **Вос-P23** затем суспендировали в DCM (3,6 мл). К суспензии добавили TFA (0,4 мл), и смесь стала прозрачной. Реакционный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и сырое соединение очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)), в результате чего получили **P23** (15 мг, выход 22% из **3Ed**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 829 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 9.23 (s, 1H), 8.16-8.12 (m, 2H), 7.43-7.42 (m, 2H), 6.93 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 6.63 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 5.58-5.54 (m, 1H), 4.40 (t, J = 9.6 Гц, 1H), 4.25 (br s, 1H), 3.58 (br s, 1H), 3.04-2.91 (m, 2H), 2.73-2.61 (m, 3H), 2.57 (d, J = 4.4 Гц, 3H), 2.17-1.96 (m, 3H), 1.90-1.72 (m, 4H), 1.66-1.42 (m, 6H), 1.26 (br s, 10H), 1.05 (br s, 7H), 0.95 (d, J = 6.4 Гц, 3H), 0.88-0.81 (m, 9H), 0.67 (br s, 3H) ppm.

Таблица 3-1. Список тубулизинов, модифицированных на замещенном-Тур-анилине

№	Структуры	cLogP	МФ	МВ	Масс. м/з	Чистота ВЭЖХ (%)	ВЭЖХ КТ (мин)
P24		3,23	C ₄₄ H ₇₀ FN ₇ O ₇ S	860,1	861 (M+H)	95	7,68 (B)
P25		3,68	C ₄₆ H ₇₂ FN ₇ O ₈ S	902,2	452 (M/2+H)	98	6,27 (A)
P26		4,23	C ₄₆ H ₇₄ FN ₇ O ₇ S	888,2	889 (M+H)	99	8,26 (B)
P27		3,16	C ₄₅ H ₇₀ FN ₇ O ₈ S	888,2	889 (M+H)	98	5,91 (A)
P28		3,53	C ₄₆ H ₇₃ N ₇ O ₈ S	884,2	443 (M/2+H)	95	7,99 (B)
P29		3,57	C ₄₆ H ₇₂ N ₆ O ₉ S	885,2	885 (M+H)	98	8,06 (B)

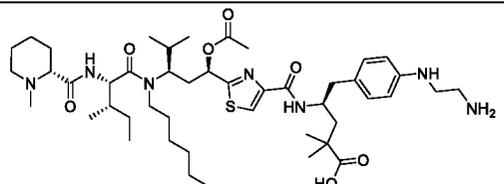
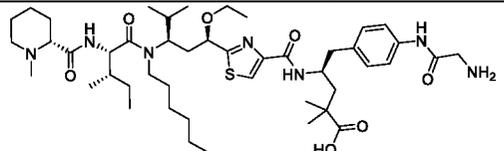
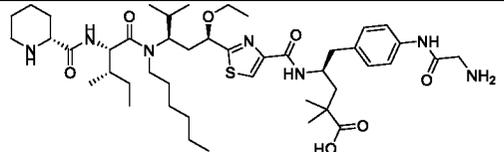
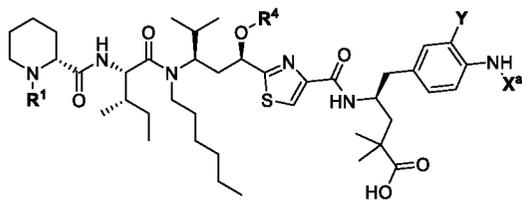
№	Структуры	cLogP	МФ	МВ	Масс. м/з	Чистота ВЭЖХ (%)	ВЭЖХ КТ (мин)
P30		4,15	C ₄₆ H ₇₅ N ₇ O ₇ S	870,2	436 (M/2+H)	96	5,76 (A)
P31		4,09	C ₄₆ H ₇₅ N ₇ O ₇ S	870,2	436 (M/2+H)	99	8,42 (B)
P32		3,58	C ₄₅ H ₇₃ N ₇ O ₇ S	856,2	857 (M+H); 429 (M/2+H)	99	8,66 (B)

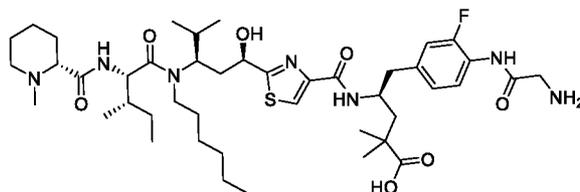
Таблица 3-2. Модификация на замещенном-Тур-анилине



№	Структуры				cLogP	НСТ-15		НСТ-15 с верапамилом		СК-ВР-3	
	R ¹	R ⁴	X ^a	Y		IC ₅₀ (нМ)	Кратность к X ^a = H	IC ₅₀ (нМ)	Кратность к X ^a = H	IC ₅₀ (нМ)	Кратность к X ^a = H
P24	Me	H	COCH ₂ NH ₂	F	3,23	15,5	5,2x	0,82	3,2x	0,86	22x
P25	Me	Ac	COCH ₂ NH ₂	F	3,68	0,08	4,0x	0,04	4,0x	0,03	1,9x
P26	Me	Et	COCH ₂ NH ₂	F	4,23	0,25	4,9x	0,05	2,8x	0,05	2,6x
P27	H	Ac	COCH ₂ NH ₂	F	3,16	1,48	6,4x	0,09	3,8x	0,11	3,9x
P28	Me	Ac	COCH ₂ NH ₂	H	3,53	0,17	6,9x	0,11	5,8x	0,03	2,5x
P29	Me	Ac	COCH ₂ OH	H	3,57	4,68	104x	0,67	35x		
P30	Me	Ac	CH ₂ CH ₂ NH ₂	H	4,15	2,64	155x	0,42	22x	0,45	34x
P31	Me	Et	COCH ₂ NH ₂	H	4,09	0,81	9,7x	0,29	4,3x	0,07	2,4x
P32	H	Et	COCH ₂ NH ₂	H	3,58	>100		>100		>1	

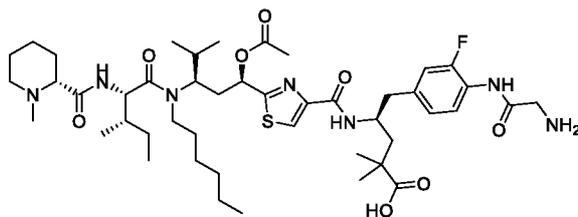
[00468] Синтез тубулизиновых нагрузок в Таблице 3

[00469] **P24: (4S)-5-[4-(2-аминоацетиамидо)-3-фторфенил]-4-({2-[(1R,3R)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (P24)**



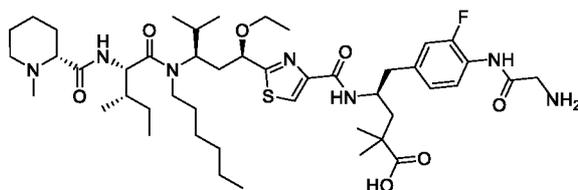
[00470] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Da** (45 мг, 79 мкмоль) с промежуточным соединением **TUPf** получили **Фмос-P24** (45 мг, ИЭР м/з: 542 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,01%)). К раствору **Фмос-P24** (45 мг) в DMF (3 мл) добавили пиперидин (14 мг, 0,17 мкмоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Фмос по результатам ЖХМС. Полученную смесь сразу очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-50% ацетонитрил в вод. муравьиной кислоте (0,01%)), в результате чего получили **P24** (10 мг, выход 15% из **3Da**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 861 (M + H)⁺, 431 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.12 (s, 1H), 8.04 (t, J = 8.4 Гц, 1H), 7.84-7.72 (m, 1H), 7.07 (d, J = 12.4 Гц, 1H), 6.96 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.30 (s, 1H), 4.54-4.44 (m, 2H), 4.14 (s, 1H), 3.73 (t, J = 10.8 Гц, 1H), 3.26 (s, 2H), 3.03 (s, 1H), 2.84-2.78 (m, 2H), 2.76-2.71 (m, 1H), 2.02 (s, 3H), 1.94-1.90 (m, 2H), 1.87-1.79 (m, 3H), 1.58-1.52 (m, 3H), 1.49-1.44 (m, 2H), 1.30-1.22 (m, 8H), 1.20-1.16 (m, 1H), 1.16-1.08 (m, 3H), 1.01-0.95 (m, 7H), 0.91 (d, J = 6.4 Гц, 3H), 0.88-0.79 (m, 12H), 0.74 (s, 3H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO_{d6}) δ -129.7 ppm.

[00471] **P25: (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-[4-(2-аминоацетиамидо)-3-фторфенил]-2,2-диметилпентановая кислота (P25)**



[00472] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Fa** (23 мг, 38 ммоль) с промежуточным соединением **TUPf** получили **Fmoc-P25** (40 мг, ИЭР м/з: 1124 (M + H)⁺) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,01%)). К раствору **Fmoc-P25** (40 мг) в DMF (4 мл) добавили диэтиламин (1 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Fmoc по результатам ЖХМС. Полученную смесь очистили напрямую посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,01%)), в результате чего получили **P25** (15 мг, выход 39% из **3Fa**, соль TFA) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 452 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 10.15 (s, 1H), 9.72 (s, 1H), 9.12 (d, J = 9.3 Гц, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.08 (s, 2H), 7.93-7.82 (m, 1H), 7.78 (t, J = 8.3 Гц, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.14-7.08 (m, 1H), 7.05-6.96 (m, 1H), 5.68-5.59 (m, 1H), 4.52 (t, J = 9.0 Гц, 1H), 4.31-4.22 (m, 1H), 3.81 (s, 2H), 3.68-3.55 (m, 1H), 3.11-3.03 (m, 2H), 2.97-2.89 (m, 1H), 2.83-2.71 (m, 2H), 2.69-2.60 (m, 3H), 2.35-2.25 (m, 2H), 2.13 (s, 3H), 2.02-1.90 (m, 3H), 1.83-1.72 (m, 3H), 1.63-1.54 (m, 2H), 1.49-1.21 (m, 11H), 1.16 (t, J = 7.3 Гц, 2H), 1.09 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 0.96 (d, J = 6.4 Гц, 3H), 0.91-0.78 (m, 9H), 0.71 (d, J = 6.1 Гц, 3H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO_{d6}) δ -73.5, -125.6 ppm. >99,9% ЭИ с использованием колонок AD, AS, OD и OJ.

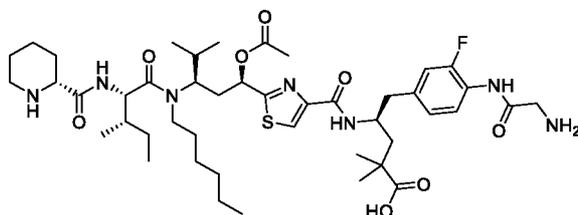
[00473] **P26: (4S)-5-[4-(2-аминоацетиламино)-3-фторфенил]-4-({2-[(1R,3R)-1-этокси-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамино}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамино)-2,2-диметилпентановая кислота (P26)**



[00474] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Ba** (50 мг, 84 ммоль) с промежуточным соединением **TUPf** получили **Fmoc-P26** (30 мг, ИЭР м/з: 556 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества после очистки посредством

обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,01%)). К раствору **Fmoc-P26** (65 мг) в DMF (4 мл) добавили пиперидин (20 мкл) и реакцию перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Fmoc по результатам ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)), в результате чего получили **P26** (10 мг, выход 13% из **3Ba**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 889 (M + H)⁺, 445 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.14 (s, 1H), 8.04 (t, J = 8.3 Гц, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.06 (d, J = 11.0 Гц, 1H), 6.95 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 4.59-4.43 (m, 1H), 4.32-4.27 (m, 2H), 3.76-3.72 (m, 1H), 3.59-3.50 (m, 2H), 2.97-2.84 (m, 3H), 2.76 (d, J = 6.0 Гц, 2H), 2.09 (s, 3H), 1.97-1.79 (m, 7H), 1.74-1.69 (m, 1H), 1.68-1.35 (m, 8H), 1.25-1.23 (m, 7H), 1.17 (t, J = 7.0 Гц, 4H), 1.09 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 1.06-0.82 (m, 14H), 0.70 (s, 3H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO_{d6}) δ -129.5 ppm.

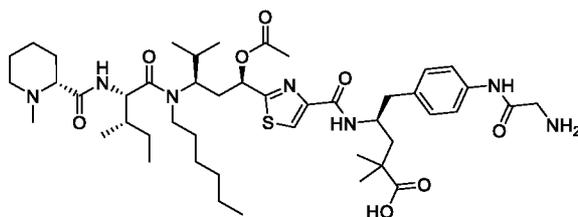
[00475] **P27: (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-пиперидин-2-илформамидо]пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-[4-(2-аминоацетиламино)-3-фторфенил]-2,2-диметилпентановая кислота (P27)**



[00476] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Fb** (46 мг, 66 ммошь) с промежуточным соединением **TUPf** получили **Fmoc-Вос-P27** (65 мг, ИЭР м/з: 1111 (M – Вос + H)⁺, 1233 (M + Na)⁺) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,01%)). К раствору **Fmoc-Вос-P27** (65 мг) в DCM (6 мл) добавили TFA (2 мл) и реакцию перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов под контролем ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo* и получили сырое соединение **Fmoc-P27** (ИЭР м/з: 1110 (M + H)⁺) в виде белого твердого вещества. **Fmoc-P27** растворили в DMF (5 мл). К раствору добавили диэтиламин (1 мл) и реакцию перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили напрямую посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,01%)), в результате чего получили **P27** (12

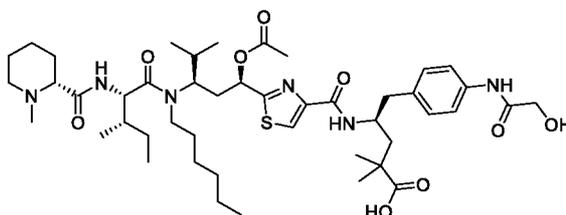
мг, соль TFA, выход 20% из **3Fb**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 889 (M + H)⁺, 445 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.29 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.07-8.00 (m, 1H), 7.87-7.79 (m, 1H), 7.76-7.67 (m, 1H), 7.07 (dd, J = 12.1 и 1.5 Гц, 1H), 6.97 (dd, J = 8.8 и 0.6 Гц, 1H), 5.66 (d, J = 13.0 Гц, 1H), 4.52-4.45 (m, 1H), 4.33-4.21 (m, 2H), 2.91-2.81 (m, 3H), 2.80-2.74 (m, 2H), 2.70-2.62 (m, 1H), 2.35-2.31 (m, 1H), 2.28-2.19 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.04-1.96 (m, 2H), 1.92-1.79 (m, 3H), 1.77-1.66 (m, 3H), 1.64-1.54 (m, 2H), 1.53-1.42 (m, 3H), 1.36-1.18 (m, 12H), 1.15-1.10 (m, 7H), 0.95 (d, J = 6.5 Гц, 3H), 0.89-0.74 (m, 9H), 0.70 (d, J = 6.7 Гц, 3H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO_{d6}) δ -73.41, -129.5 ppm.

[00477] **P28: (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-[4-(2-аминоацетиамидо)фенил]-2,2-диметилпентановая кислота (P28)**



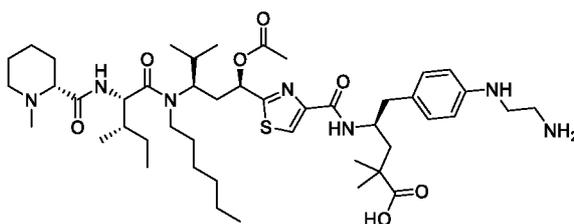
[00478] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Fa** с промежуточным соединением **TUPg** получили **Fmoc-P28** (26 мг, выход 23%, ИЭР м/з: 554 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества. **Fmoc-P28** растворили в DMF (3 мл). К раствору добавили пиперидин (10 мг, 0,12 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Fmoc по результатам ЖХМС. Полученный раствор очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили нагрузку **P28** (12 мг, выход 11% из **3Fa**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 443 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.16 (s, 1H), 7.66 (br s, 1H), 7.64 (br s, 1H), 7.51 (d, J = 8.5 Гц, 2H), 7.20 (br s, 1H), 7.09 (d, J = 8.5 Гц, 2H), 5.64 (d, J = 13 Гц, 1H), 5.32 (t, J = 5.0 Гц, 1H), 4.74 (t, J = 8.5, 1H), 4.30-4.23 (m, 1H), 3.71-3.62 (m, 1H), 3.22 (s, 2H), 3.01-2.94 (m, 1H), 2.84-2.81 (m, 1H), 2.74-2.69 (m, 2H), 2.65-2.63 (m, 1H), 2.37-2.34 (m, 1H), 2.29-2.22 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.02-1.96 (m, 2H), 1.93-1.84 (m, 3H), 1.69-1.59 (m, 3H), 1.54-1.43 (m, 4H), 1.27-1.21 (m, 11H), 1.06 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 0.95 (d, J = 6.0 Гц, 3H), 0.86-0.79 (m, 9H), 0.68 (d, J = 6.0 Гц, 3H) ppm.

[00479] **P29: (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-[4-(2-гидроксиацетидамо)фенил]-2,2-диметилпентановая кислота (P29)**



[00480] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Fa** с промежуточным соединением **TUPk** получили **P29** (22 мг, выход 25%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 885.3 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO_{d6}) δ 12.10 (br s, 1H), 9.53 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.65 (br s, 1H), 7.62 (br s, 1H), 7.58 (d, J = 8.5 Гц, 2H), 7.08 (d, J = 8.5 Гц, 2H), 5.66-5.61 (m, 2H), 4.48 (t, J = 10 Гц, 1H), 4.30-4.22 (m, 1H), 3.94 (d, J = 5.0 Гц, 2H), 3.72-3.60 (m, 1H), 3.00-2.96 (m, 1H), 2.84-2.81 (m, 1H), 2.78-2.67 (m, 2H), 2.30-2.23 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.07 (s, 1H), 2.02-1.85 (m, 5H), 1.73-1.60 (m, 5H), 1.55-1.33 (m, 5H), 1.31-1.23 (m, 9H), 1.18-1.08 (m, 2H), 1.06 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 0.95 (d, J = 6.5 Гц, 3H), 0.86-0.80 (m, 9H), 0.68 (d, J = 6.5 Гц, 3H) ppm.

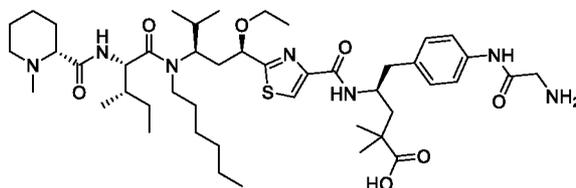
[00481] **P30: (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-{4-[(2-аминоэтил)амино]фенил}-2,2-диметилпентановая кислота (P30)**



[00482] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Fa** (42 мг, 69 моль) с промежуточным соединением **TUPI** получили **Fmoc-P30** (52 мг, ИЭР м/з: 1094 (M + H)⁺) в виде белого твердого вещества. **Fmoc-P30** растворили в DMF (1 мл). К раствору добавили диэтиламин (1 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Fmo по результатам ЖХМС. Реакционную смесь очистили напрямую посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,03%)), в результате чего получили **P30** (33 мг, выход 49%

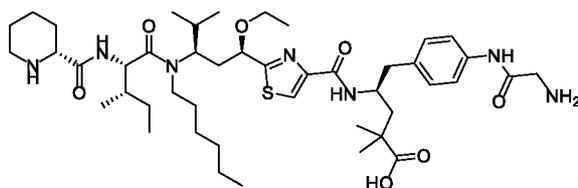
из **3Fa**, соль TFA) в виде белого твердого вещества. ИЭР m/z : 872 ($M + H$)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.17 (s, 1H), 7.74 (d, $J = 8.9$ Гц, 1H), 7.64 (d, $J = 8.5$ Гц, 1H), 6.93 (d, $J = 8.4$ Гц, 2H), 6.50 (d, $J = 8.4$ Гц, 2H), 5.65 (d, $J = 12.8$ Гц, 1H), 5.58 (s, 1H), 4.48 (t, $J = 9.3$ Гц, 1H), 4.20 (s, 1H), 3.76-3.66 (m, 1H), 2.98-2.87 (m, 12H), 2.14 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.92-1.80 (m, 3H), 1.69-1.59 (m, 3H), 1.32-1.29 (m, 4H), 1.19-1.12 (m, 14H), 1.05 (d, $J = 4.9$ Гц, 6H), 0.95 (d, $J = 6.4$ Гц, 3H), 0.90-0.79 (m, 9H), 0.69 (d, $J = 5.6$ Гц, 3H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO_{d6}) δ -73.56 ppm.

[00483] **P31: (4S)-5-[4-(2-аминоацетида)фенил]-4-({2-[(1R,3R)-1-этокси-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо)-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (P31)**



[00484] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Ba** с промежуточным соединением **TUPg** получили **Фмос-P31** (27 мг, ИЭР m/z : 557 ($M/2 + H$)⁺) в виде белого твердого вещества. **Фмос-P31** растворили в DMF (3 мл). К раствору добавили пиперидин (10 мг, 0,12 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Фмос по результатам ЖХМС. Полученный раствор очистили напрямую посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,03%)) и получили нагрузку **P31** (12 мг, выход 11%) в виде белого твердого вещества. ИЭР m/z 435.7 ($M/2 + H$)⁺, 870.5 ($M + H$)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 12.10 (s, 1H), 10.37 (s, 1H), 9.80-9.68 (br s, 1H), 9.13 (d, $J = 8.4$ Гц, 1H), 8.18-8.11 (m, 3H), 7.72-7.56 (br s, 1H), 7.46 (d, $J = 8.4$ Гц, 2H), 7.16 (d, $J = 8.0$ Гц, 2H), 4.55 (t, $J = 8.8$ Гц, 1H), 4.34-4.31 (m, 1H), 4.26-4.22 (m, 1H), 3.78-3.66 (m, 3H), 3.24-3.09 (m, 3H), 2.79-2.74 (m, 1H), 2.69-2.65 (m, 4H), 2.12-1.57 (m, 14H), 1.47-1.36 (m, 11H), 1.16 (t, $J = 6.8$ Гц, 3H), 1.05 (d, $J = 8.4$ Гц, 6H), 0.93-0.82 (m, 12H), 0.77-0.67 (m, 3H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO_{d6}) δ -73.5 ppm.

[00485] **P32: (4S)-5-[4-(2-аминоацетида)фенил]-4-({2-[(1R,3R)-1-этокси-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-пиперидин-2-ил]формамидо]пентанамидо)-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (P32)**



[00486] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Bb** с промежуточным соединением **TUPg** получили **Fmoc-Boc-P32** (50 мг, сырое соединение, ИЭР м/з: 1178.5 (M + H)⁺) в виде желтого масла. **Fmoc-Boc-P32** растворили в DCM (4 мл). К раствору добавили TFA (1 мл) и реакционный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Boc по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток (ИЭР м/з: 1079 (M + H)⁺) растворили в DCM (4 мл). К раствору добавили пиперидин (20 мкл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до удаления Fmoc *in vacuo* по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,03%)), в результате чего получили **P32** (10 мг, выход 18% из **3Bb**, двойная TFA соль) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 857 (M + H)⁺, 429 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 12.01 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 8.83 (d, *J* = 9.3 Гц, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.35-8.06 (m, 4H), 7.62 (s, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.5 Гц, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.4 Гц, 2H), 4.60 (t, *J* = 14 Гц, 1H), 4.50-4.25 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.68-3.43 (m, 3H), 3.22-3.10 (m, 1H), 3.09-2.90 (m, 2H), 2.77-2.63 (m, 2H), 2.17-2.02 (m, 1H), 2.02-1.37 (m, 23H), 1.17 (t, *J* = 7.0 Гц, 3H), 1.04 (d, *J* = 8.8 Гц, 6H), 0.93-0.75 (m, 12H), 0.74 (d, *J* = 6.1 Гц, 3H) ppm.

Таблица 4-1. Список N-O тубулизиновых нагрузок

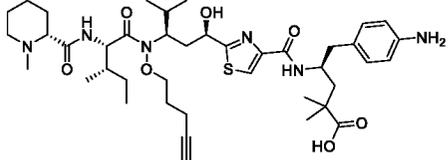
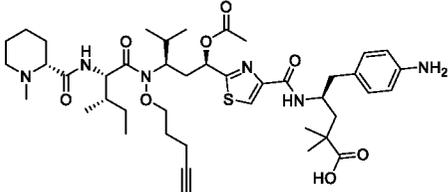
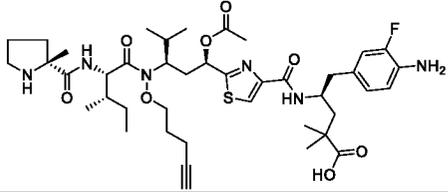
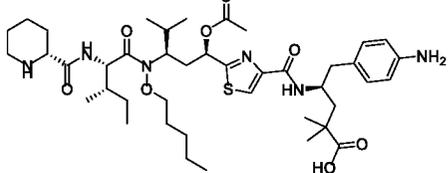
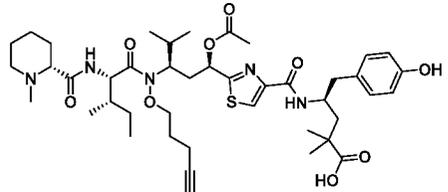
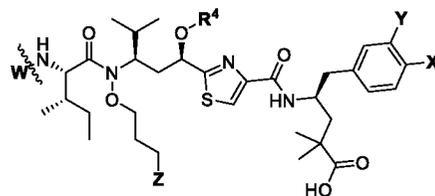
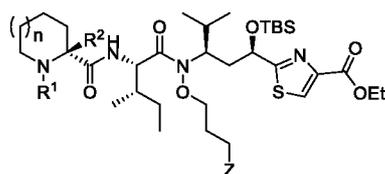
№	Структуры	cLogP	МФ	МВ	Масс. м/з	Чистота ВЭЖХ (%)	ВЭЖХ КТ (мин)
P33		2,80	C ₄₁ H ₆₂ N ₆ O ₇ S	783,0	783 (M+H)	>99	7,37 (B)
P34		3,24	C ₄₃ H ₆₄ N ₆ O ₈ S	825,1	413 (M/2+H)	95	6,98 (A)
P35		3,14	C ₄₂ H ₆₁ FN ₆ O ₈ S	829,0	415 (M/2+H)	99	7,80 (B)
P36		3,81	C ₄₂ H ₆₆ N ₆ O ₈ S	815,1	408 (M/2+H)	99	6,35 (A)
P51		3,93	C ₄₃ H ₆₃ N ₅ O ₉ S	826,1	826 (M + H)	95	6,50 (A)

Таблица 4-2. Цитотоксичность тубулизиновых нагрузок в Таблице 4

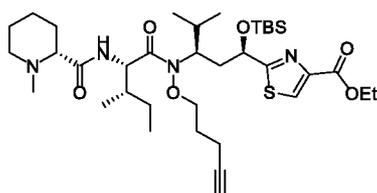


№	Структуры					cLogP	НСТ-15 IC ₅₀ (нМ)	НСТ-15 с верапамилом IC ₅₀ (нМ)
	W	R ⁴	Z	X	Y			
P33		H	C≡CH	NH ₂	H	2,80	81,7	28,1
P34		Ac	C≡CH	NH ₂	H	3,24	0,41	0,24
P35		Ac	C≡CH	NH ₂	F	3,14	4,87	
P36		Ac	Et	NH ₂	H	3,81	12,2	
P51		Ac	C≡CH	OH	H	3,93	0,41	0,16

[00487] Синтез промежуточного соединения **2G**

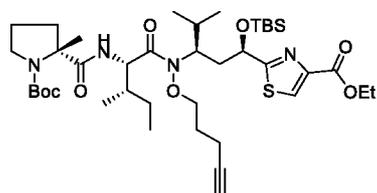


[00488] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-1-[(*трет*-бутилдиметилсилил)окси]-4-метил-3-[(2*S*,3*S*)-3-метил-2-[(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамино]-*N*-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамино]пентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**2Ga**)



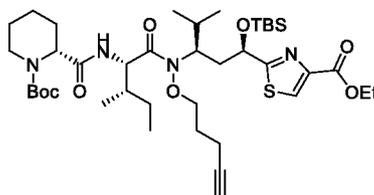
[00489] В соответствии с Общей процедурой I из промежуточного соединения **1G** (1,8 г, 3,1 ммоль) с **МЕРа** получили соединение **2Ga** (1,7 г, выход 78%) в виде вязкого масла. ИЭР м/з: 707 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (500 МГц, метанол-d₄) δ 8.38 (s, 1H), 5.03 (d, J = 8.1 Гц, 1H), 4.85 (t, J = 6.3 Гц, 1H), 4.40 (q, J = 7.5 Гц, 3H), 4.13-4.07 (m, 1H), 4.03-3.86 (m, 2H), 3.52-3.45 (m, 1H), 3.35-3.29 (m, 1H), 2.87 (s, 3H), 2.51-2.35 (m, 3H), 2.25 (t, J = 2.4 Гц, 1H), 2.23-2.15 (m, 1H), 2.10-1.53 (m, 11H), 1.40 (t, J = 7.1 Гц, 3H), 1.27-1.19 (m, 1H), 1.08-0.94 (m, 12H), 0.94 (s, 9H), 0.13 (s, 3H), -0.16 (s, 3H) ppm.

[00490] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-2-[(2*R*)-1-[(*трет*-бутокси)карбонил]-2-метилпирролидин-2-ил]формамино]-3-метил-*N*-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамино]-1-[(*трет*-бутилдиметилсилил)окси]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (**2Gb**)



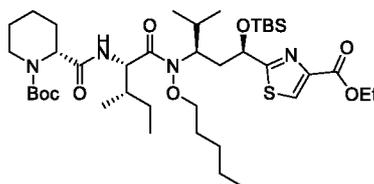
[00491] В соответствии с Общей процедурой I из промежуточного соединения **1G** (0,14 г, 0,24 ммоль) с кислотой **МЕРф** (56 мг, 0,24 ммоль) получили соединение **2Gb** (0,15 г, выход 80%) в виде желтого масла после очистки посредством колоночной хроматографии на силикагеле (0-20% этилацетат в петролейном эфире). ИЭР м/з: 793 (M + H)⁺.

[00492] *трет*-бутил (2*R*)-2-{{(1*S*,2*S*)-1-{{(1*R*,3*R*)-1-[(*трет*-бутилдиметилсилил)окси]-1-[4-(этоксикарбонил)-1,3-тиазол-2-ил]-4-метилпентан-3-ил](пент-4-ин-1-илокси)карбамоил}-2-метилбутил]карбамоил}пиперидин-1-карбоксилат (2*Gc'*)



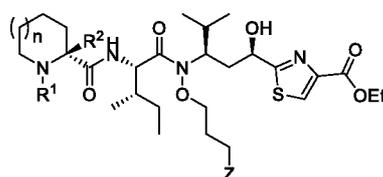
[00493] В соответствии с Общей процедурой I из промежуточного соединения **1G** (0,11 г, 0,19 ммоль) с кислотой **MEPb** (43 мг, 0,19 ммоль) получили соединение **2Gc'** (0,11 г, выход 78%) в виде белого твердого вещества, и использовали на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 793 (M + H)⁺.

[00494] *трет*-бутил (2*R*)-2-{{(1*S*,2*S*)-1-{{(1*R*,3*R*)-1-[(*трет*-бутилдиметилсилил)окси]-1-[4-(этоксикарбонил)-1,3-тиазол-2-ил]-4-метилпентан-3-ил](пентилокси)карбамоил}-2-метилбутил]карбамоил}пиперидин-1-карбоксилат (2*Gc*)

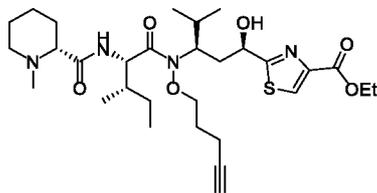


[00495] К раствору соединения **2Gc'** (0,11 г, 0,14 ммоль) в этилацетате (10 мл) добавили влажный палладий на угле (10% Pd, 11 мг, 10 мас.%) в атмосфере азота. Смесь дегазировали, продули водородом 3 раза, перемешивали в атмосфере водорода при комнатной температуре в течение 30 минут под контролем ЖХМС. Полученную суспензию отфильтровали через целит и фильтрат сконцентрировали *in vacuo*, в результате чего получили сырое соединение **2Gc** (0,11 г, сырое соединение) в виде белого твердого вещества. Сырое соединение **2Gc** применили на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 797 (M + H)⁺.

[00496] Синтез промежуточного соединения **2H**

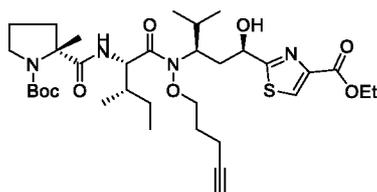


[00497] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-1-гидрокси-4-метил-3-[(2*S*,3*S*)-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}-*N*-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (2Ha)



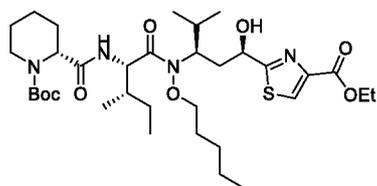
[00498] В соответствии с Общей процедурой II из соединения **2Ga** получили соединение **2Ha** (43 мг, выход 86%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 593 (M + H)⁺.

[00499] Этил 2-[(1*R*,3*R*)-3-[(2*S*,3*S*)-2-{{(2*R*)-1-[(*tert*-бутоксикарбонил]-2-метилпирролидин-2-ил}формамидо}-3-метил-*N*-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксилат (2Hb)



[00500] В соответствии с Общей процедурой II из **2Gb** (0,13 г, 0,16 ммоль) получили соединение **2Hb** (95 мг, выход 88%) в виде желтого масла после очистки посредством колоночной хроматографии на силикагеле (0-20% этилацетат в петролейном эфире). ИЭР м/з: 679 (M + H)⁺, 701 (M + Na)⁺.

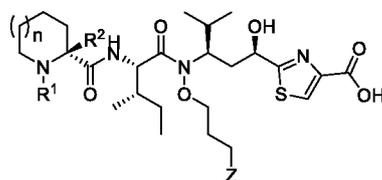
[00501] *tert*-бутил (2*R*)-2-{{(1*S*,2*S*)-1-{{(1*R*,3*R*)-1-[4-(этоксикарбонил)-1,3-тиазол-2-ил]-1-гидрокси-4-метилпентан-3-ил}(пентилокси)карбамоил}-2-метилбутил}карбамоил}пиперидин-1-карбоксилат (2Hc)



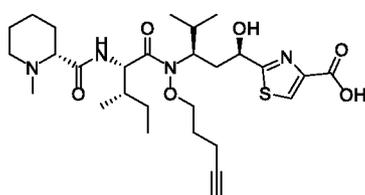
[00502] В соответствии с Общей процедурой II из сырого соединения **2Gc** (0,11 г) получили соединение **2Hc** (96 мг, выход 74% за 3 этапа из промежуточного соединения **1G**) в виде белого твердого вещества после очистки посредством

обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-60% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)). ИЭР м/з: 683 (M + H)⁺.

[00503] Синтез промежуточного соединения **3H**

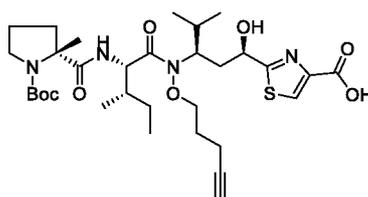


[00504] **2-[(1R,3R)-1-гидрокси-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Ha)**



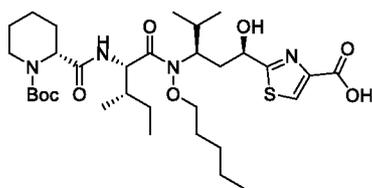
[00505] В соответствии с Общей процедурой IV из **2Ha** получили соединение **3Ha** (37 мг, выход 90%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 565 (M + H)⁺.

[00506] **2-[(1R,3R)-3-[(2S,3S)-2-[(2R)-1-[(*tert*-бутоксикарбонил]-2-метилпирролидин-2-ил]формамидо}-3-метил-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Hb)**



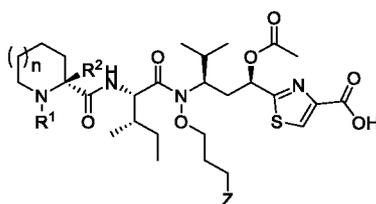
[00507] В соответствии с Общей процедурой IV из **2Hb** (80 мг, 0,11 ммоль) получили сырое соединение **3Hb** (70 мг, выход сырого соединения 90%) в виде желтого масла. ИЭР м/з: 673 (M + Na)⁺, 551.3 (M – Boc + H)⁺.

[00508] **2-[(1R,3R)-3-[(2S,3S)-2-[(2R)-1-[(*tert*-бутоксикарбонил]пиперидин-2-ил]формамидо}-3-метил-N-(пентилокси)пентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Hc)**

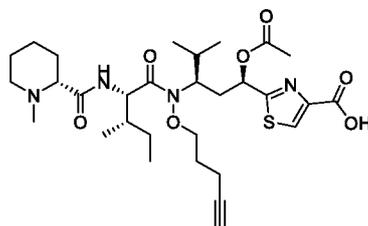


[00509] В соответствии с Общей процедурой IV из соединения **2Hc** (96 мг, 0,14 ммоль) получили соединение **3Hc** (69 мг, сырое соединение) в виде белого твердого вещества, которое использовали на следующем этапе без очистки. ИЭР м/з: 677 (M + Na)⁺.

[00510] Синтез промежуточного соединения **3I**

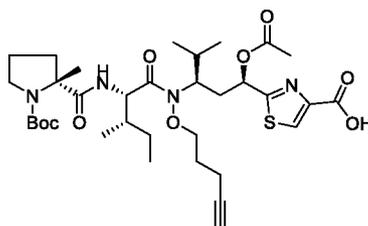


[00511] **2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Ia)**



[00512] В соответствии с Общей процедурой V из **3Ha** получили соединение **3Ia** (18 мг, выход 93%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 607 (M + H)⁺.

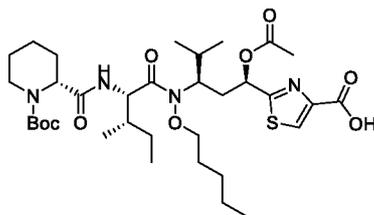
[00513] **2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-3-[(2S,3S)-2-[(2R)-1-[(*трет*-бутокси)карбонил]-2-метилпирролидин-2-ил]формамидо}-3-метил-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Ib)**



[00514] В соответствии с Общей процедурой V из соединения **3Hb** (65 мг, 0,10 ммоль) получили соединение **3Ib** (55 мг, выход 72% из **2Hb**) в виде белого твердого

вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* TFA (0,01%)). ИЭР м/з: 693 (M + H)⁺, 593 (M – Boc + H)⁺.

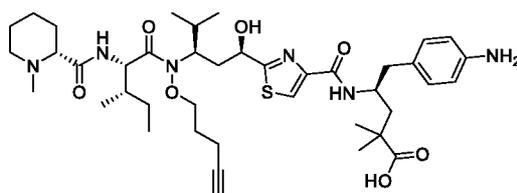
[00515] **2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-3-[(2S,3S)-2-{(2R)-1-[(*трет-*бутокси)карбонил]пиперидин-2-ил]формамидо}-3-метил-N-(пентилокси)пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоновая кислота (3Ic)**



[00516] В соответствии с Общей процедурой V из сырого соединения **3Hc** (69 мг) получили соединение **3Ic** (63 мг, выход 65% за 2 этапа из **2Hc**) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-20% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 мМ)). ИЭР м/з: 719 (M + Na)⁺.

[00517] Синтез тубулизиновых нагрузок в **Таблице 4**

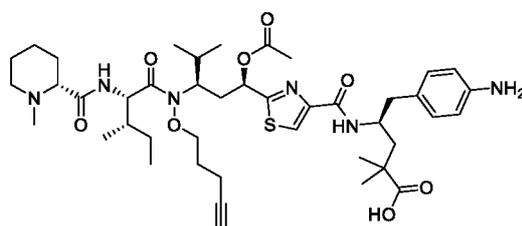
[00518] **P33:** (4S)-5-(4-аминофенил)-4-({2-[(1R,3R)-1-гидрокси-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (**P33**)



[00519] К раствору **P34** (9,4 мг, 11 ммоль, см. далее) в *вод.* THF (80 об.%, 2,0 мл) добавили гидроксид лития (5,5 мг, 0,23 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи под контролем ЖХМС. Затем реакционную смесь окислили *вод.* HCl (1 М) до pH 3 и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический раствор высушили над сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили нагрузку **P33** (8,0 мг, выход 90%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 783.4 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 8.08 (s,

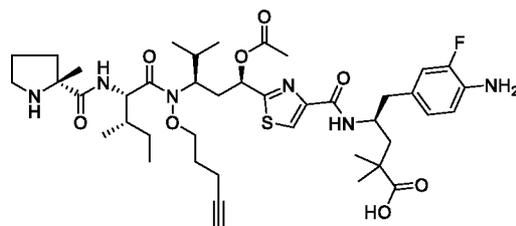
1H), 7.64 (d, $J = 9.6$ Гц, 1H), 6.82 (d, $J = 8.4$ Гц, 2H), 6.45 (d, $J = 8.0$ Гц, 2H), 6.33-6.32 (br s, 1H), 4.85-4.83 (br s, 1H), 4.77-4.75 (m, 1H), 4.73-4.66 (m, 1H), 4.31-4.29 (m, 1H), 4.14-4.07 (m, 3H), 2.84-2.81 (m, 2H), 2.68-2.64 (m, 1H), 2.45-2.31 (m, 4H), 2.07 (s, 3H), 2.01-1.95 (m, 3H), 1.91-1.81 (m, 5H), 1.61-1.58 (m, 3H), 1.54-1.35 (m, 5H), 1.23 (s, 1H), 1.19-1.07 (m, 2H), 1.02-0.99 (m, 6H), 0.96-0.90 (m, 9H), 0.88-0.80 (m, 3H) ppm.

[00520] **P34:** (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2*S*,3*S*)-3-метил-2-[(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}-*N*-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-аминофенил)-2,2-диметилпентановая кислота (P34)



[00521] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Ia** с соединением **TUPb** получили нагрузку **P34** (5,3 мг, выход 27%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 413.3 (M/2 + H)⁺, 825.3 (M + H)⁺ (30%). ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-*d*₆) δ 8.16 (s, 1H), 7.78 (d, $J = 8.5$ Гц, 1H), 7.56 (d, $J = 10.0$ Гц, 1H), 6.81 (d, $J = 8.5$ Гц, 2H), 6.44 (d, $J = 8.0$ Гц, 2H), 5.81 (d, $J = 11.0$ Гц, 1H), 4.90-4.74 (m, 3H), 4.26-4.23 (m, 1H), 4.15-4.05 (m, 3H), 2.85-2.82 (m, 2H), 2.77 (br s, 1H), 2.68-2.64 (m, 1H), 2.36-2.31 (m, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.03-1.96 (m, 2H), 1.89-1.78 (m, 4H), 1.62-1.35 (m, 9H), 1.19-1.05 (m, 2H), 1.04 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.96 (d, $J = 5.5$ Гц, 3H), 0.89-0.82 (m, 9H) ppm.

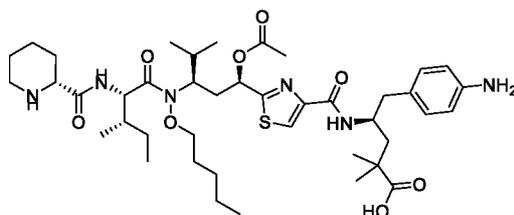
[00522] **P35:** (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2*S*,3*S*)-3-метил-2-[(2*R*)-2-метилпирролидин-2-ил]формамидо}-*N*-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-амино-3-фторфенил)-2,2-диметилпентановая кислота (P35)



[00523] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Ib** (30 мг, 43 ммоль) с **TUPa** получили **Вос-P35** (30 мг) в виде белого твердого вещества. **Вос-P35** растворили в DCM (2 мл). К раствору добавили TFA (0,5 мл) и смесь перемешивали

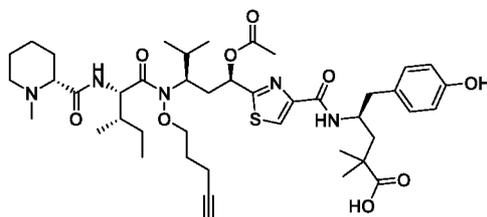
при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)), в результате чего получили **P35** (15 мг, выход 42% из **31b**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 415 (M/2 + H)⁺, 829.5 (M + H). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{д6}) δ 8.23 (d, J = 10.1 Гц, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.65 (d, J = 9.0 Гц, 1H), 6.80-6.75 (m, 1H), 6.68-6.59 (m, 2H), 5.84 (d, J = 8.7 Гц, 1H), 4.88 (s, 2H), 4.73-4.67 (m, 1H), 4.21-4.06 (m, 4H), 3.00-2.89 (m, 1H), 2.83 (t, J = 2.5 Гц, 1H), 2.71-2.54 (m, 3H), 2.46 (s, 1H), 2.42-2.23 (m, 4H), 2.13 (s, 3H), 2.02-1.98 (m, 2H), 1.94-1.53 (m, 7H), 1.51-1.38 (m, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 0.95 (d, J = 6.6 Гц, 3H), 0.88-0.82 (m, 9H) ppm.

[00524] **P36**: (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-N-(пентилокси)-2-[(2R)-пиперидин-2-илформамидо]пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-аминофенил)-2,2-диметилпентановая кислота (**P36**)



[00525] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **31c** (30 мг, 43 ммоль) получили соединение **Вос-P36** (19 мг, ИЭР м/з: 915.5 (M + H)⁺) после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,01%)). К раствору **Вос-P36** (19 мг) в DCM (0,6 мл) добавили TFA (0,2 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-30% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)), в результате чего получили **P36** (4,4 мг, выход 13% из **31c**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 815.5 (M + H)⁺, 408 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{д6}) δ 8.17 (s, 1H), 7.83-7.68 (m, 2H), 7.32-7.25 (m, 2H), 6.81 (d, J = 8.3 Гц, 2H), 6.44 (d, J = 8.3 Гц, 2H), 5.81 (dd, J = 10.4 и 1.9 Гц, 1H), 4.90-4.76 (m, 3H), 4.20-4.07 (m, 3H), 4.05-3.89 (m, 3H), 2.90-2.85 (m, 2H), 2.70-2.61 (m, 2H), 2.39-2.28 (m, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.07-1.95 (m, 3H), 1.93-1.82 (m, 2H), 1.81-1.71 (m, 2H), 1.70-1.55 (m, 6H), 1.51-1.40 (m, 3H), 1.03 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.97 (d, J = 6.6 Гц, 3H), 0.90-0.79 (m, 12H) ppm.

[00526] **P51**: (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2*S*,3*S*)-3-метил-2-[(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}-*N*-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-гидроксифенил)-2,2-диметилпентановая кислота (**P51**)



[00527] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Ia** с **TUPd** получили нагрузку **P51** (15 мг, выход 12% из **3Ia**) в виде белого твердого вещества. ИЭР m/z 826.5 ($M + H$)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 9.16 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.65 (d, $J = 8.4$ Гц, 1H), 7.59 (d, $J = 9.6$ Гц, 1H), 6.95 (d, $J = 8.4$ Гц, 2H), 6.62 (d, $J = 8.4$ Гц, 2H), 5.82 (d, $J = 10.0$ Гц, 1H), 4.76 (t, $J = 8.4$ Гц, 1H), 4.23-4.20 (m, 2H), 4.09-4.01 (m, 2H), 2.90-2.80 (m, 2H), 2.73-2.68 (m, 1H), 2.63-2.58 (m, 1H), 2.39-2.31 (m, 3H), 2.14-2.06 (m, 6H), 2.01-1.87 (m, 3H), 1.84-1.80 (m, 3H), 1.66-1.61 (m, 3H), 1.56-1.53 (m, 1H), 1.46-1.36 (m, 3H), 1.22-1.11 (m, 2H), 1.05-1.03 (m, 7H), 0.96 (d, $J = 6.4$ Гц, 3H), 0.88-0.81 (m, 10H) ppm.

Таблица 5-1. Список соединений аминокислота-Р34

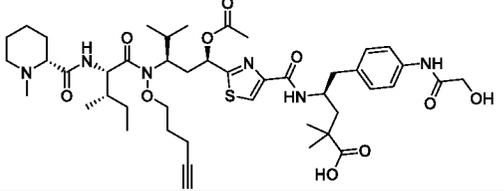
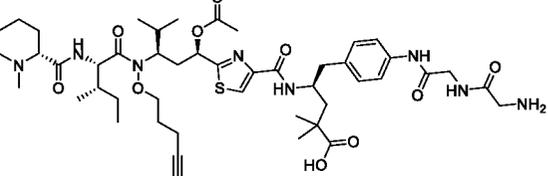
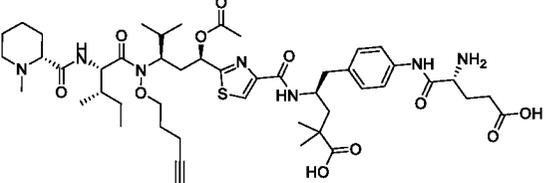
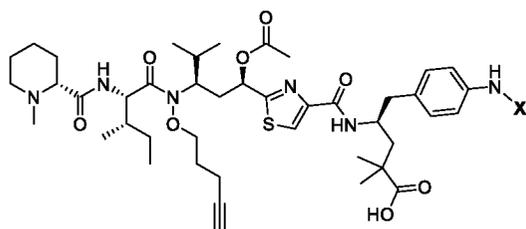
№	Структуры	cLogP	МФ	МВ	Масс. м/з	Чистота ВЭЖХ (%)	ВЭЖХ КТ (мин)
P37		2,47	C ₄₅ H ₆₆ N ₆ O ₁₀ S	883,1	442 (M/2+H)	99	7,03 (B)
P39		1,27	C ₄₇ H ₇₀ N ₈ O ₁₀ S	939,2	470 (M/2+H)	99	6,54 (B)
P41		0,39	C ₄₈ H ₇₁ N ₇ O ₁₁ S	954,2	478 (M/2+H)	96	5,95 (A)

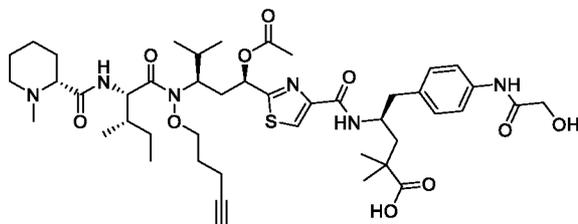
Таблица 5-2. Модификация на аминокислоте-Р34



№	Структуры	cLogP	НСТ-15 IC ₅₀ (нМ)	НСТ-15 с верапамилем IC ₅₀ (нМ)
P37	COCH ₂ OH	2,47	102	
P39	GlyGly	1,27	0,62	
P41	(D)-Glu	0,39	82,7	

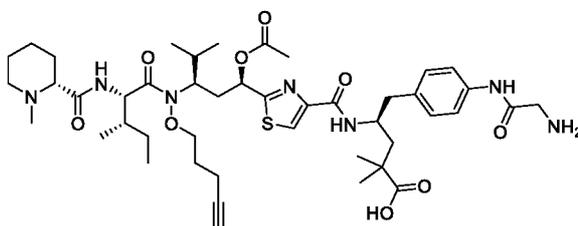
[00528] Синтез тубулизиновых нагрузок **P37-P41** в Таблице 5

[00529] **P37**: (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2*S*,3*S*)-3-метил-2-[(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамино]-*N*-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамино]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамино)-5-[4-(2-гидроксиацетино)фенил]-2,2-диметилпентановая кислота (**P37**)



[00530] В соответствии с Общей процедурой VI из соединения **3Ia** (30 мг, 50 ммоль) с промежуточным соединением **TUPk** (15 мг, 51 ммоль) получили нагрузку **P37** (21 мг, выход 48%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 883 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 9.54 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 9.0 Гц, 1H), 7.60-7.53 (m, 3H), 7.10 (d, *J* = 8.5 Гц, 2H), 5.82 (dd, *J* = 10.8 и 1.7 Гц, 1H), 5.63 (s, 1H), 4.80-4.70 (m, 1H), 4.29-4.20 (m, 2H), 4.11-4.01 (m, 2H), 3.95 (s, 2H), 2.88-2.65 (m, 5H), 2.41-2.26 (m, 4H), 2.13 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.05-1.89 (m, 4H), 1.86-1.78 (m, 3H), 1.70-1.59 (m, 3H), 1.56-1.51 (m, 1H), 1.48-1.34 (m, 3H), 1.23 (s, 1H), 1.19-1.13 (m, 1H), 1.07 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.96 (d, *J* = 6.6 Гц, 3H), 0.90-0.80 (m, 9H) ppm.

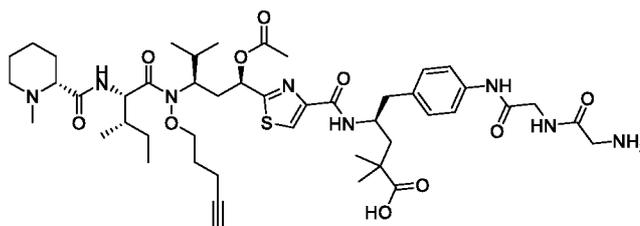
[00531] **P38**: (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2*S*,3*S*)-3-метил-2-[(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамино]-*N*-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамино]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамино)-5-[4-(2-аминоацетино)фенил]-2,2-диметилпентановая кислота (**P38**)



[00532] В соответствии с Общей процедурой VI из **3Ia** (15 мг, 25 ммоль) с промежуточным соединением **TUPg** получили **Fmoc-P38** (6,1 мг, ИЭР м/з: 553 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества. **Fmoc-P38** растворили в DMF (2 мл). К раствору добавили пиперидин (20 мкл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Fmoc по результатам ЖХМС. Полученную смесь очистили напрямую посредством преп-ВЭЖХ (0-100%

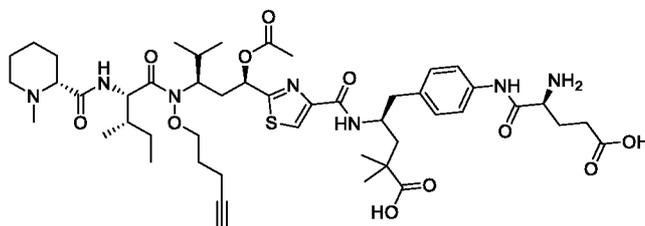
ацетонитрил в *вод.* TFA (0.01%), в результате чего получили **P38** (2,8 мг, выход 11% за 3 этапа из **3Ia**, соль TFA) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 442 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 10.33 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.14-8.04 (m, 3H), 7.83 (d, J = 9.5 Гц, 1H), 7.45 (d, J = 8.5 Гц, 2H), 7.17 (d, J = 8.5 Гц, 2H), 5.85-5.79 (m, 1H), 4.78-4.72 (m, 1H), 4.32-4.18 (m, 3H), 4.12-4.01 (m, 2H), 3.74 (s, 2H), 2.85 (t, J = 2.5 Гц, 1H), 2.83-2.75 (m, 2H), 2.72-2.65 (m, 2H), 2.64-2.57 (m, 2H), 2.41-2.30 (m, 5H), 2.13 (s, 3H), 2.09-2.00 (m, 3H), 2.01-1.92 (m, 2H), 1.89-1.82 (m, 3H), 1.78-1.72 (m, 2H), 1.71-1.64 (m, 2H), 1.58-1.51 (m, 1H), 1.49-1.35 (m, 3H), 1.17-1.12 (m, 1H), 1.06 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.97 (d, J = 6.5 Гц, 3H), 0.91-0.87 (m, 4H), 0.84 (t, J = 7.4 Гц, 3H) ppm.

[00533] **P39: (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-{4-[2-(2-аминоацетиламино)ацетиламино]фенил}-2,2-диметилпентановая кислота (P39)**



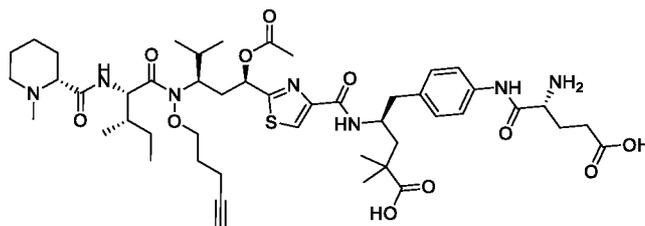
[00534] В соответствии с Общей процедурой VI из **3Ia** (60 мг, 99 мкмоль) с промежуточным соединением **TUPh** получили **Fmoc-P39** (70 мг, ИЭР м/з: 1162 (M + H)⁺) в виде белого твердого вещества. **Fmoc-P39** растворили в DMF (2 мл). К раствору добавили пиперидин (18 мг, 0,21 мкмоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Fmoc по результатам ЖХМС. Полученную смесь очистили сразу посредством преп-ВЭЖХ (10-95% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 мМ)), в результате чего получили **P39** (24 мг, выход 26% за 3 этапа из **3Ia**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 470 (M/2 + H)⁺, 939 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 9.89 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.84 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 7.58 (d, J = 9.2 Гц, 1H), 7.45 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 7.10 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 5.81 (d, J = 10.0 Гц, 1H), 4.76 (t, J = 8.4 Гц, 1H), 4.29-4.20 (m, 2H), 4.10-4.01 (m, 2H), 3.90 (s, 2H), 3.16 (s, 2H), 2.88-2.76 (m, 3H), 2.71-2.64 (m, 1H), 2.40-2.30 (m, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.10 (m, 3H), 2.00-1.90 (m, 3H), 1.86-1.78 (m, 3H), 1.68-1.58 (m, 3H), 1.54-1.49 (m, 1H), 1.47-1.32 (m, 3H), 1.19-1.10 (m, 1H), 1.06-1.02 (m, 7H), 0.96 (d, J = 6.4 Гц, 3H), 0.90-0.80 (m, 11H) ppm.

[00535] **P40**: (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2*S*,3*S*)-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}-*N*-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-{4-[(2*S*)-2-амино-4-карбоксибутанамидо]фенил}-2,2-диметилпентановая кислота (**P40**)



[00536] В соответствии с Общей процедурой VI из **3Ia** (20 мг, 33 ммоль) с промежуточным соединением **TUPi** получили **Fmoc-P40** (30 мг, ИЭР м/з: 589 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества. **Fmoc-P40** растворили в DMF (2 мл). К раствору добавили пиперидин (5,0 мг, 59 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Fmoc по результатам ЖХМС. Полученную смесь очистили сразу посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 mM)), в результате чего получили **P40** (15 мг, выход 48% за 3 этапа из **3Ia**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 478 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 8.16 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.6 Гц, 1H), 7.56 (d, *J* = 9.4 Гц, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.4 Гц, 2H), 7.11 (d, *J* = 8.5 Гц, 2H), 5.82 (d, *J* = 9.3 Гц, 1H), 4.75 (t, *J* = 8.4 Гц, 1H), 4.27-4.19 (m, 3H), 4.09-4.02 (m, 3H), 2.91-2.76 (m, 4H), 2.72-2.64 (m, 1H), 2.44-2.22 (m, 6H), 2.13 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.04-1.74 (m, 7H), 1.69-1.60 (m, 4H), 1.51-1.35 (m, 5H), 1.05 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.96 (d, *J* = 6.6 Гц, 3H), 0.88-0.81 (m, 9H) ppm.

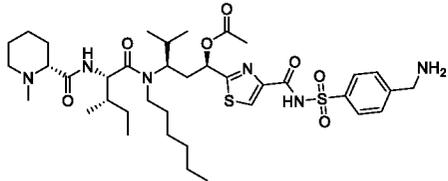
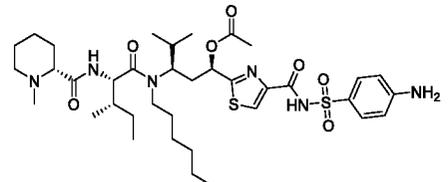
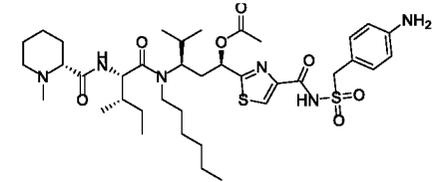
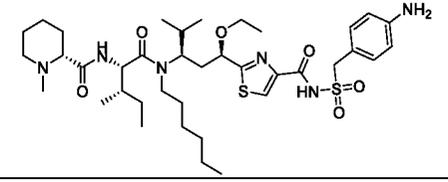
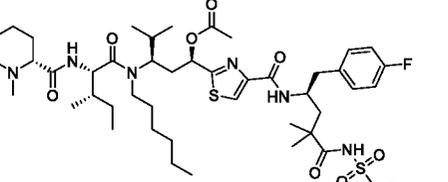
[00537] **P41**: (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2*S*,3*S*)-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}-*N*-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-{4-[(2*R*)-2-амино-4-карбоксибутанамидо]фенил}-2,2-диметилпентановая кислота (**P41**)



[00538] В соответствии с Общей процедурой VI из **3Ia** (80 мг, 0,13 ммоль) с промежуточным соединением **TUPj** получили **Fmoc-P40** (65 мг, ИЭР м/з: 589 (M/2 +

H)⁺) в виде белого твердого вещества. **Fmoc-P40** растворили в DMF (2 мл). К раствору добавили пиперидин (5,0 мг, 59 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Fmoc по результатам ЖХМС. Полученную смесь очистили сразу посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 мМ)), в результате чего получили **P40** (30 мг, выход 24% за 3 этапа из **3Ia**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 478 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 8.16 (s, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.6 Гц, 1H), 7.62 (d, *J* = 9.4 Гц, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.4 Гц, 2H), 7.11 (d, *J* = 8.5 Гц, 2H), 5.82 (d, *J* = 9.3 Гц, 1H), 4.75 (t, *J* = 8.4 Гц, 1H), 4.26-4.05 (m, 6H), 2.96-2.50 (m, 5H), 2.44-2.22 (m, 6H), 2.13 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.04-1.74 (m, 7H), 1.69-1.60 (m, 4H), 1.51-1.35 (m, 5H), 1.05 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.96 (d, *J* = 6.6 Гц, 3H), 0.88-0.81 (m, 9H) ppm.

Таблица 6-1. Список соединений *N*-ацилсульфонамидов

№	Структуры	cLogP	МФ	МВ	Масс. м/з	Чистота ВЭЖХ (%)	ВЭЖХ КТ (мин)
P42		4,19	C ₃₈ H ₆₀ N ₆ O ₇ S ₂	777,05	777 (M+H)	96	8,24 (B)
P43		3,80	C ₃₇ H ₅₈ N ₆ O ₇ S ₂	763,03	763 (M+H)	92	8,06 (B)
P44		3,64	C ₃₈ H ₆₀ N ₆ O ₇ S ₂	777,05	777 (M+H)	95	7,46 (B)
P45		4,19	C ₃₈ H ₆₂ N ₆ O ₆ S ₂	763,07	763 (M+H)	96	7,78 (B)
P46		6,93	C ₅₁ H ₇₆ FN ₇ O ₈ S ₂	998,33	500 (M/2+H)	98	8,56 (B)

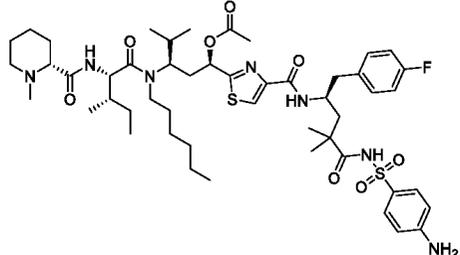
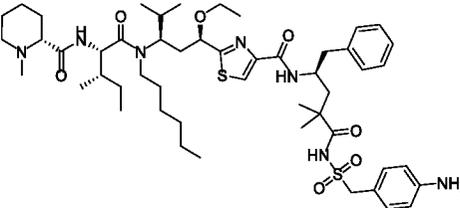
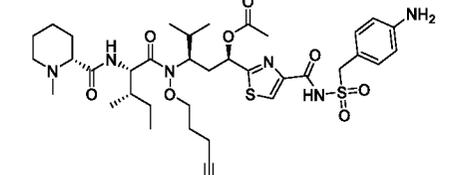
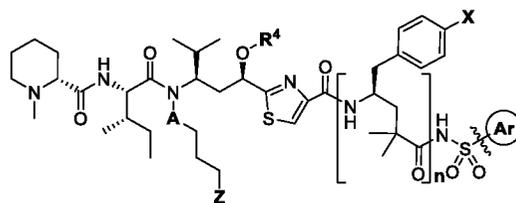
№	Структуры	cLogP	МФ	МВ	Масс. м/з	Чистота ВЭЖХ (%)	ВЭЖХ КТ (мин)
P47		6,66	C ₅₀ H ₇₄ FN ₇ O ₈ S ₂	984,30	985 (M+H)	99	8,44 (B)
P48		6,79	C ₅₁ H ₇₉ N ₇ O ₇ S ₂	966,36	966 (M+H)	99	7,83 (B)
P49		2,53	C ₃₇ H ₅₄ N ₆ O ₈ S ₂	774,99	775 (M+H)	99	7,54 (B)

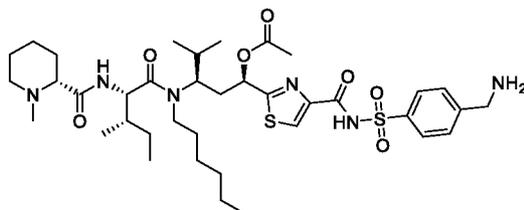
Таблица 6-2. N-ацилсульфонамиды



№	Структуры						cLogP	НСТ-15 IC ₅₀ (нМ)	НСТ-15 с верапамилом IC ₅₀ (нМ)
	A	Z	R ⁴	n	X	Ar			
P42	CH ₂	Et	Ac	0	/		4,19	>100	48,4
P43	CH ₂	Et	Ac	0	/		3,80	4,99	1,42
P44	CH ₂	Et	Ac	0	/		3,64	25,8	
P45	CH ₂	Et	Et	0	/		4,19	75,7	
P46	CH ₂	Et	Ac	1	F		6,93	>100	
P47	CH ₂	Et	Ac	1	F		6,66	53,5	
P48	CH ₂	Et	Et	1	H		6,79	65,8	
P49	O	C≡CH	Ac	0	/		2,53	163	

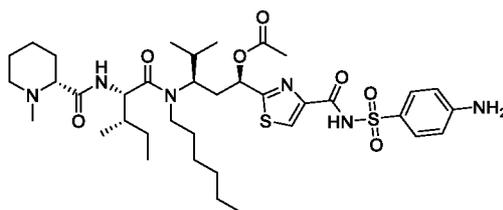
[00539] Синтез тубулизиновых нагрузок **P37-P41** в Таблице 5

[00540] **P42**: (1*R*,3*R*)-1-(4-{[4-(аминометил)бензолсульфонил]карбамоил}-1,3-тиазол-2-ил)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил ацетат (**P42**)



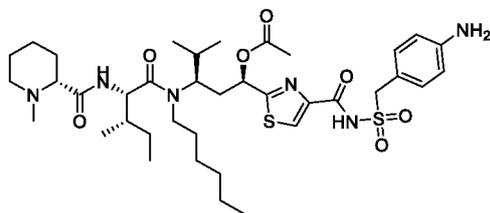
[00541] В соответствии с Общей процедурой VII для *N*-ацилсульфонамидов из соединения **3Fa** с сульфонамидом **SULa** получили нагрузку **P42** (8 мг, выход 21% из **3Fa**) в виде белого твердого вещества. ИЭР m/z 777 ($M + H$)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 8.23 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.82 (d, $J = 8.4$ Гц, 2H), 7.75 (br s, 1H), 7.44 (d, $J = 8.4$ Гц, 2H), 5.54 (d, $J = 13.2$ Гц, 1H), 4.48 (t, $J = 9.2$ Гц, 1H), 4.05 (s, 2H), 3.62-3.57 (m, 1H), 3.02-2.94 (m, 1H), 2.85 (d, $J = 11.2$ Гц, 1H), 2.58 (br s, 1H), 2.21-1.99 (m, 9H), 1.88-1.82 (m, 2H), 1.64-1.63 (m, 3H), 1.53-1.40 (m, 5H), 1.37-1.24 (m, 7H), 1.18-1.05 (m, 2H), 0.92 (d, $J = 6.4$ Гц, 3H), 0.88-0.80 (m, 9H), 0.69 (br s, 3H) ppm.

[00542] **P43**: (1*R*,3*R*)-1-{4-[(4-аминобензолсульфонил)карбамоил]-1,3-тиазол-2-ил}-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил ацетат (**P43**)



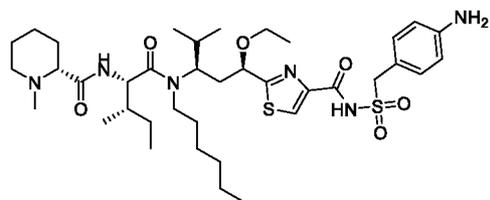
[00543] В соответствии с Общей процедурой VII из соединения **3Fa** с сульфонамидом **SULb** получили нагрузку **P43** (3 мг, выход 34% из **3Fa**) в виде белого твердого вещества. ИЭР m/z 763 ($M + H$)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 7.99 (s, 1H), 7.51 (d, $J = 8.4$ Гц, 2H), 6.48 (d, $J = 8.0$ Гц, 2H), 5.54 (d, $J = 11.2$ Гц, 2H), 7.51 (t, $J = 14.4$ Гц, 1H), 3.63-3.55 (m, 2H), 3.17-2.99 (m, 7H), 2.14-2.07 (m, 6H), 2.14 (br s, 2H), 1.91-1.39 (m, 9H), 1.35-1.20 (m, 7H), 1.14-1.07 (m, 2H), 0.94-0.79 (m, 15H) ppm.

[00544] **P44:** (1*R*,3*R*)-1-(4-{{(4-аминофенил)метансульфонил}карбамоил}-1,3-тиазол-2-ил)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил ацетат (P44)



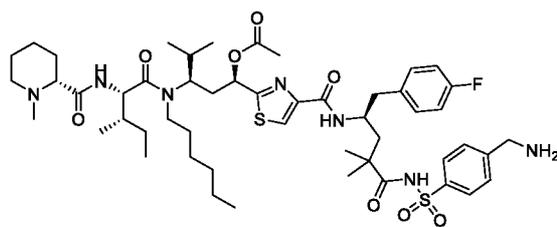
[00545] В соответствии с Общей процедурой VII из соединения **3Fa** с сульфонамидом **SULc** получили нагрузку **P44** (6,1 мг, выход 20% из **3Fa**) в виде белого твердого вещества. ИЭР m/z 777 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 7.93 (s, 1H), 6.90 (d, $J = 8.3$ Гц, 2H), 6.43 (d, $J = 8.4$ Гц, 2H), 5.56 (d, $J = 9.8$ Гц, 1H), 4.51 (t, $J = 9.4$ Гц, 1H), 4.30-4.16 (m, 2H), 3.68-3.57 (m, 1H), 3.09-2.95 (m, 3H), 2.70-2.65 (m, 1H), 2.37-2.30 (m, 1H), 2.25-2.13 (m, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.03-1.87 (m, 3H), 1.84-1.70 (m, 2H), 1.69-1.36 (m, 8H), 1.36-1.17 (m, 9H), 1.16-1.03 (m, 2H), 0.94 (d, $J = 6.5$ Гц, 3H), 0.91-0.60 (m, 13H) ppm.

[00546] **P45:** *N*-[(4-аминофенил)метансульфонил]-2-[(1*R*,3*R*)-1-этокси-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-карбоксамид (P45)



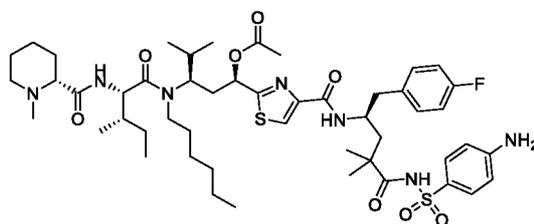
[00547] В соответствии с Общей процедурой VII из соединения **3Ba** (30 мг, 51 ммоль) с сульфонамидом **SULc** получили нагрузку **P45** (5,0 мг, выход 13% из **3Ba**) в виде белого твердого вещества. ИЭР m/z 763 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO_{d6}) δ 9.21 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 6.91 (d, $J = 8.3$ Гц, 2H), 6.44 (d, $J = 8.3$ Гц, 2H), 4.52 (t, $J = 9.6$ Гц, 1H), 4.41-4.14 (m, 3H), 3.76-3.67 (m, 1H), 3.34-3.29 (m, 4H), 2.92-2.81 (m, 3H), 2.49-2.37 (m, 3H), 2.07-1.81 (m, 5H), 1.67-1.50 (m, 5H), 1.33-1.23 (m, 9H), 1.11-1.07 (m, 5H), 0.91-0.78 (m, 16H) ppm.

[00548] **P46:** (1*R*,3*R*)-1-(4-{{(2*S*)-4-{{4-(аминометил)бензолсульфонил}карбамоил}-1-(4-фторфенил)-4,4-диметилбутан-2-ил}карбамоил}-1,3-тиазол-2-ил)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил ацетат (P46)



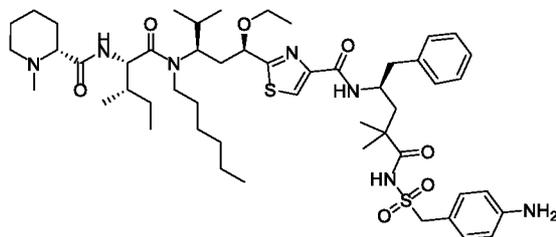
[00549] В соответствии с Общей процедурой VII из нагрузки **P10** с сульфонамидом **SULa** получили нагрузку **P46** (6 мг, выход 67% из **P10**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 500 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.17 (s, 1H), 8.00 (br s, 2H), 7.83 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 7.72 (d, J = 8.0 Гц, 3H), 7.38 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 7.17-7.13 (m, 2H), 7.04-7.00 (m, 2H), 5.61 (d, J = 13.2 Гц, 1H), 4.48 (t, J = 8.8 Гц, 1H), 4.14-4.08 (m, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.71-3.62 (m, 1H), 3.03-2.67 (m, 5H), 2.34-2.27 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.10-1.76 (s, 7H), 1.68-1.52 (m, 10H), 1.50-1.40 (m, 7H), 1.36-1.04 (m, 2H), 0.96 (d, J = 6.0 Гц, 3H), 0.92 (d, J = 3.6 Гц, 6H), 0.91-0.82 (m, 9H), 0.68 (br s, 3H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO_{d6}) δ -117.5 ppm.

[00550] **P47**: (1*R*,3*R*)-1-(4-{{(2*S*)-4-[(4-аминобензолсульфонил)карбамоил]-1-(4-фторфенил)-4,4-диметилбутан-2-ил]карбамоил}-1,3-тиазол-2-ил)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формаидо}пентанамидо]-4-метилпентил ацетат (**P47**)



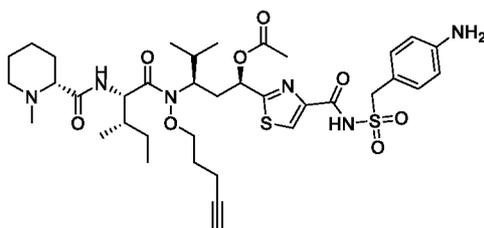
[00551] В соответствии с Общей процедурой VII из нагрузки **P10** с сульфонамидом **SULb** получили нагрузку **P47** (6,5 мг, выход 72% из **P10**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 985 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 11.11 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.79 (s, 2H), 7.48 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 7.11-7.07 (m, 2H), 7.04-6.99 (m, 2H), 6.53 (d, J = 7.6 Гц, 2H), 6.08-6.02 (m, 2H), 5.61 (d, J = 12.8 Гц, 1H), 4.48 (t, J = 9.2 Гц, 1H), 4.06-4.03 (m, 1H), 3.64 (t, J = 8.4 Гц, 1H), 3.01-2.86 (m, 2H), 2.75-2.63 (m, 2H), 2.36-2.30 (m, 1H), 2.20-2.10 (m, 6H), 2.05-1.97 (m, 1H), 1.88-1.84 (m, 2H), 1.78-1.75 (m, 2H), 1.66 (m, 3H), 1.55 (m, 2H), 1.51-1.46 (m, 2H), 1.39-1.36 (m, 1H), 1.25-1.24 (m, 9H), 1.14-1.05 (m, 1H), 1.00-0.95 (m, 9H), 0.84-0.80 (m, 10H), 0.70-0.68 (d, J = 6.0 Гц, 3H) ppm. ¹⁹F ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) -117.3 ppm.

[00552] **P48:** (2*S*,3*S*)-*N*-[(1*R*,3*R*)-1-(4-[(2*S*)-4-[(4-аминофенил)метансульфонил]карбамоил}-4,4-диметил-1-фенилбутан-2-ил]карбамоил]-1,3-тиазол-2-ил)-1-этокси-4-метилпентан-3-ил]-*N*-гексил-3-метил-2-[(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формаидо} пентанамид (**P48**)



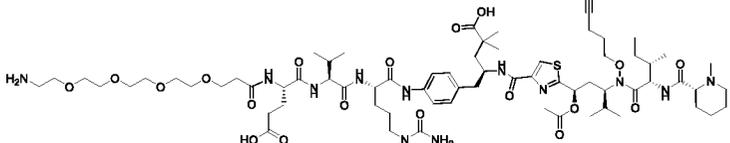
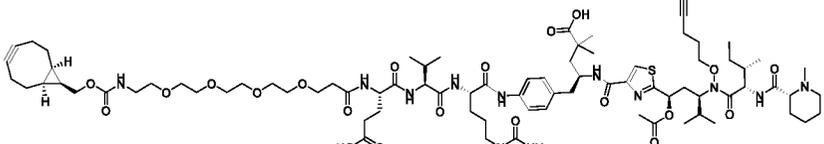
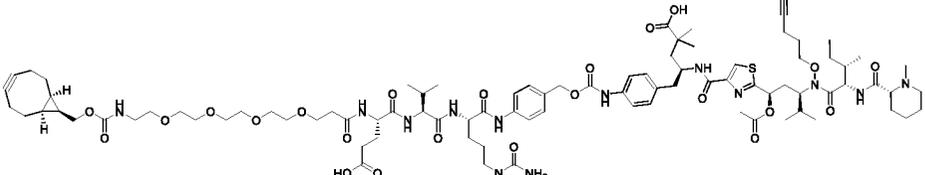
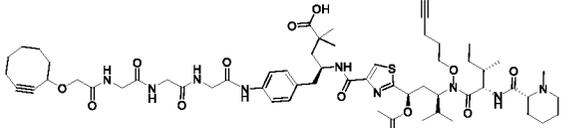
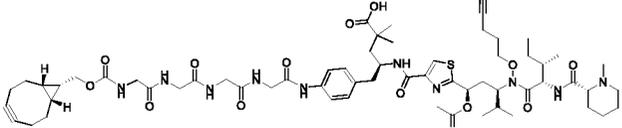
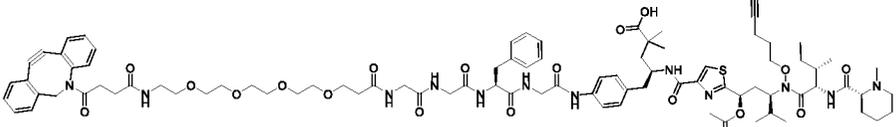
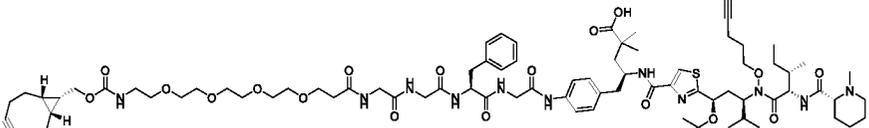
[00553] В соответствии с Общей процедурой VII из нагрузки **P50** с сульфонамидом **SULc** получили нагрузку **P48** (5,0 мг, выход 6,5% из **P50**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 966 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.16 (s, 1H), 7.80 (br s, 1H), 7.44-7.07 (m, 7H), 6.71 (d, *J* = 7.8 Гц, 2H), 6.38 (d, *J* = 8.1 Гц, 2H), 5.01 (br s, 1H), 4.52 (t, *J* = 9.5 Гц, 1H), 4.24-4.18 (m, 2H), 4.10-4.00 (m, 1H), 3.76-3.65 (m, 1H), 3.01-2.67 (m, 6H), 2.27-2.21 (m, 3H), 1.94-1.81 (m, 6H), 1.70-1.44 (m, 6H), 1.34-1.22 (m, 9H), 1.05-0.98 (m, 10H), 0.91-0.81 (m, 15H), 0.72-0.63 (m, 3H) ppm.

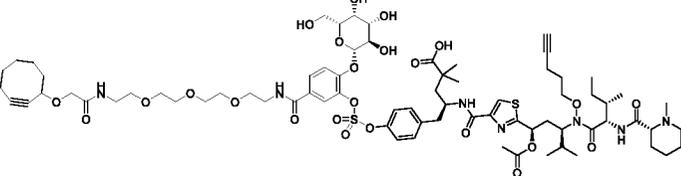
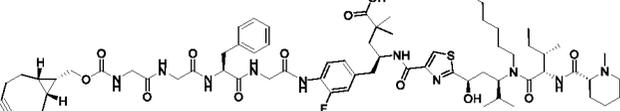
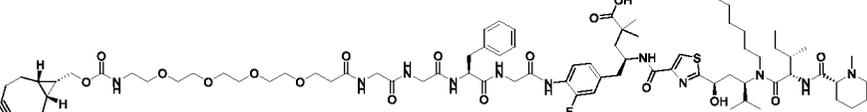
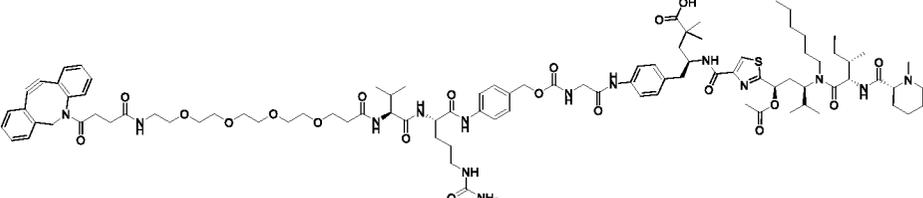
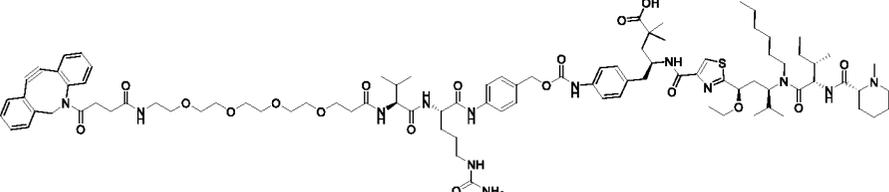
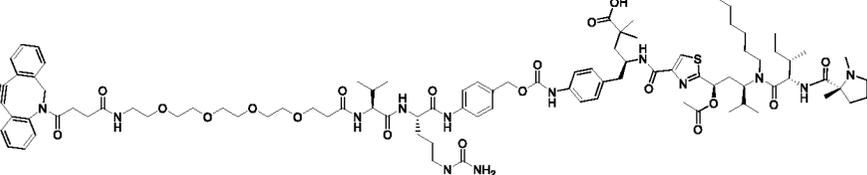
[00554] **P49:** (1*R*,3*R*)-1-(4-[(4-аминофенил)метансульфонил]карбамоил)-1,3-тиазол-2-ил)-4-метил-3-[(2*S*,3*S*)-3-метил-2-[(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формаидо}-*N*-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил ацетат (**P49**)

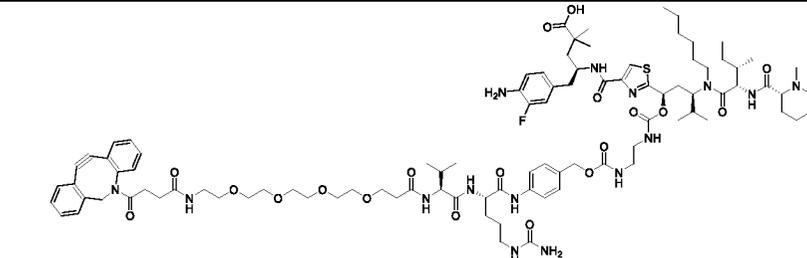
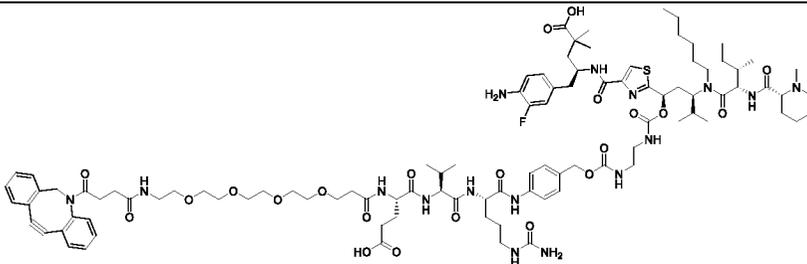
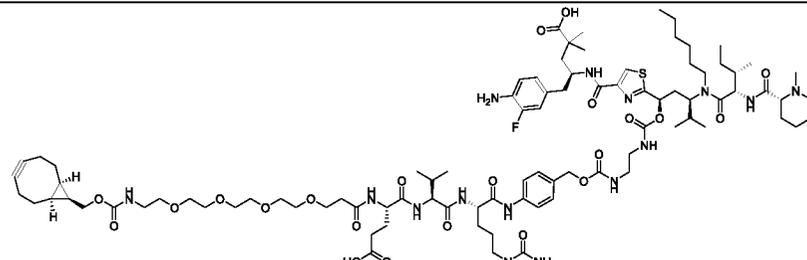
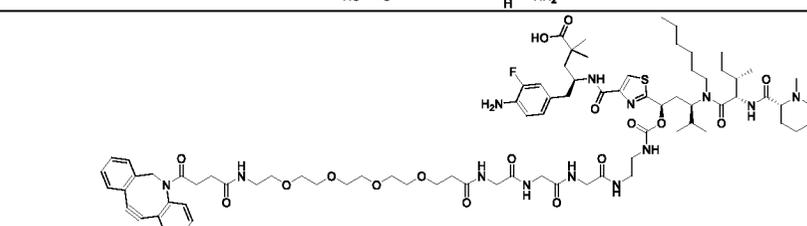
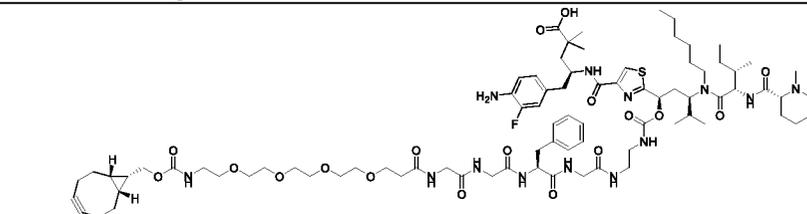


[00555] В соответствии с Общей процедурой VII из промежуточного соединения **3Ia** (30 мг, 49 ммоль) с сульфонамидом **SULc** получили нагрузку **P49** (1,2 мг, выход 3,1% из **3Ia**) в виде белого твердого вещества после очистки посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 mM)) дважды. ИЭР м/з 775 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, метанол_{d4}) δ 8.09 (s, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.4 Гц, 2H), 6.64 (d, *J* = 8.4 Гц, 2H), 5.92 (d, *J* = 10.8 Гц, 1H), 5.36 (t, *J* = 4.4 Гц, 1H), 4.82 (d, *J* = 11.2 Гц, 1H), 4.59-4.46 (m, 2H), 4.30-4.24 (m, 1H), 4.02-3.95 (m, 1H), 2.64-2.58 (m, 3H), 2.48-2.39 (m, 1H), 2.38 (t, *J* = 2.8 Гц, 1H), 2.33-2.29 (m, 3H), 2.23-2.17 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 2.10-2.04 (m, 2H), 1.98-1.87 (m, 2H), 1.83-1.52 (m, 7H), 1.22-1.13 (m, 1H), 1.04 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.99-0.90 (m, 8H) ppm.

Таблица 7. Структуры линкер-тубулизинов.

№	Структуры	Название линкера	Нагрузка
LP2		NH ₂ -PEG ₄ -Evc	P34
LP3		BCN-PEG ₄ -Evc	P34
LP4		BCN-PEG ₄ -EvcPAB	P34
LP5		COT-GGG	P34
LP6		BCN-GGGG	P34
LP7		DIBAC-PEG ₄ -GGFG	P34
LP8		BCN-PEG ₄ -GGFG	P34

№	Структуры	Название линкера	Нагрузка
LP9	 <p>The structure shows a cyclooctatetraene (COT) ring connected via an amide bond to a PEG3 chain (three ethylene glycol units). The PEG3 chain is further linked to a HOPAS (1-hydroxy-3-oxopropyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyridin-5-yl) moiety, which is connected to a complex peptide backbone containing a thiazolidine ring and various side chains.</p>	COT-PEG ₃ -HOPAS	P51
LP10	 <p>The structure features a bicyclic BCN (bicyclo[1.1.0]butane) ring connected to a GGFG peptide sequence (Glycyl-Glycyl-Glycyl-Fluorenyl). The GGFG sequence is linked to a thiazolidine-containing peptide backbone.</p>	BCN-GGFG	P1
LP11	 <p>The structure shows a BCN ring connected to a PEG4 chain (four ethylene glycol units), which is then linked to a GGFG peptide sequence. The GGFG sequence is connected to a thiazolidine-containing peptide backbone.</p>	BCN-PEG ₄ -GGFG	P1
LP12	 <p>The structure features a DIBAC (dibenzylideneammonium) moiety connected to a PEG4 chain. The PEG4 chain is linked to a vcPAB (vinyl carbonyl peptide) sequence, which is connected to a thiazolidine-containing peptide backbone.</p>	DIBAC-PEG ₄ -vcPAB	P28
LP13	 <p>The structure is similar to LP12, showing a DIBAC moiety connected to a PEG4 chain, which is linked to a vcPAB sequence and a thiazolidine-containing peptide backbone.</p>	DIBAC-PEG ₄ -vcPAB	P8
LP14	 <p>The structure is similar to LP12, showing a DIBAC moiety connected to a PEG4 chain, which is linked to a vcPAB sequence and a thiazolidine-containing peptide backbone.</p>	DIBAC-PEG ₄ -vcPAB	P19

№	Структуры	Название линкера	Нагрузка
LP15		DIBAC-PEG ₄ -vcPAB	P5
LP16		DIBAC-PEG ₄ -EvcPAB	P5
LP17		BCN-PEG ₄ -EvcPAB	P5
LP18		DIBAC-PEG ₄ -GGG	P5
LP19		BCN-PEG ₄ -GGFG	P5

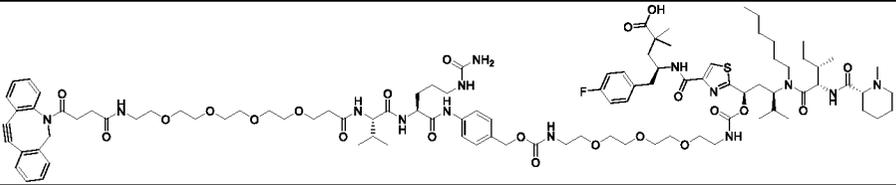
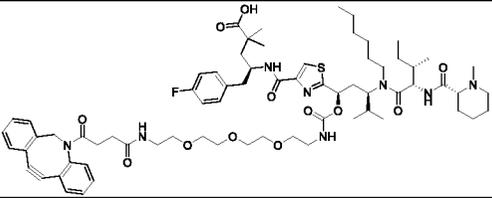
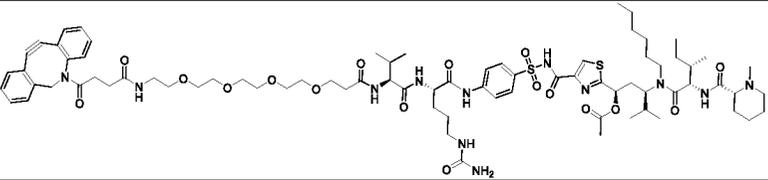
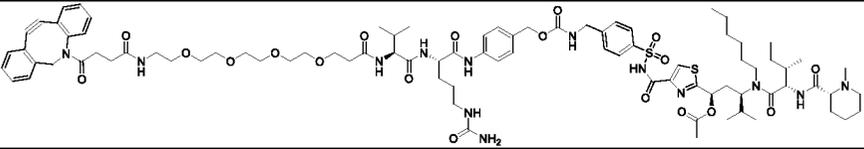
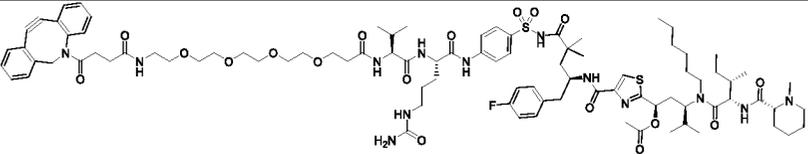
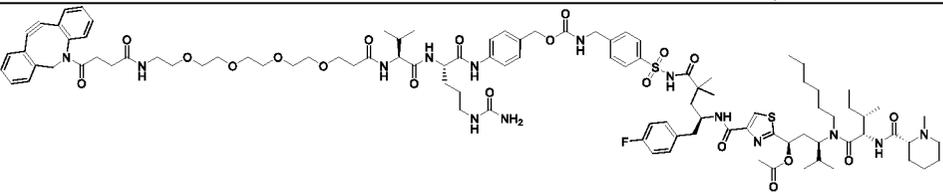
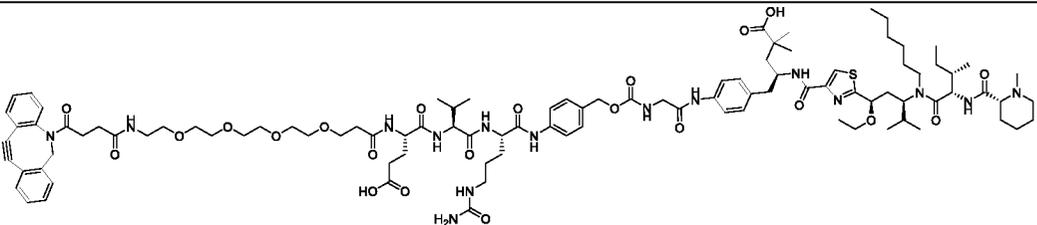
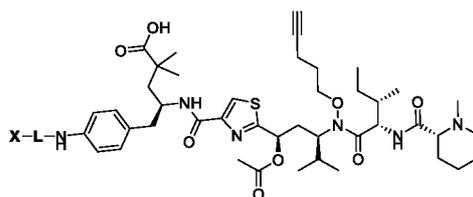
№	Структуры	Название линкера	Нагрузка
LP20		DIBAC-PEG ₄ -vcPAB	P11
LP21		DIBAC	P11
LP22		DIBAC-PEG ₄ -vc	P43
LP23		DIBAC-PEG ₄ -vcPAB	P42
LP24		DIBAC-PEG ₄ -vc	P47
LP25		DIBAC-PEG ₄ -vcPAB	P46
LP26		DIBAC-PEG ₄ -EvcPAB-Gly	P8

Таблица 8. Химические свойства тубулизиновых линкер-нагрузок.

№	Линкер-нагрузки	cLogP	МФ	МВ	Масс. м/з	Чистота ВЭЖХ (%)	ВЭЖХ КТ (мин)
LP2	NH ₂ -PEG ₄ -Evc-P34	-1,98	C ₇₀ H ₁₁₂ N ₁₂ O ₁₉ S	1457,8	729 (M/2+H)	99	6,63 (B)
LP3	BCN-PEG ₄ -Evc-P34	2,62	C ₈₁ H ₁₂₄ N ₁₂ O ₂₁ S	1634,0	817 (M/2+H)	99	7,06 (B)
LP4	BCN-PEG ₄ -EvcPAB-P34	4,19	C ₈₉ H ₁₃₁ N ₁₃ O ₂₃ S	1783,2	893 (M/2+H)	99	6,95 (A)
LP5	COT-GGG-P34	2,22	C ₅₉ H ₈₅ N ₉ O ₁₃ S	1160,4	1161 (M+H)	99	7,76 (B)
LP6	BCN-GGGG-P34	1,74	C ₆₂ H ₈₈ N ₁₀ O ₁₄ S	1229,5	615 (M/2+H)	99	7,51 (B)
LP7	DIBAC-PEG ₄ -GGFG-P34	3,03	C ₈₈ H ₁₁₆ N ₁₂ O ₁₉ S	1678,0	839 (M/2+H)	99	7,94 (B)
LP8	BCN-PEG ₄ -GGFG-P34	2,91	C ₈₀ H ₁₁₅ N ₁₁ O ₁₉ S	1566,9	784 (M/2+H)	99	7,34 (B)
LP9	COT-PEG ₃ -HOPAS-P51	2,92	C ₇₄ H ₁₀₇ N ₇ O ₂₄ S ₂	1542,8	772 (M/2+H)	99	8,01 (B)
LP10	BCN-GGFG-P1	4,77	C ₆₈ H ₉₇ FN ₁₀ O ₁₂ S	1297,6	649 (M/2+H)	99	8,56 (B)
LP11	BCN-PEG ₄ -GGFG-P1	3,71	C ₇₉ H ₁₁₈ FN ₁₁ O ₁₇ S	1544,9	773 (M/2+H)	97	7,20 (A)
LP12	DIBAC-PEG ₄ -vcPAB-G-P7	5,52	C ₉₅ H ₁₃₄ N ₁₄ O ₂₀ S	1824,3	913 (M/2+H)	99	8,13 (B)
LP13	DIBAC-PEG ₄ -vcPAB-P8	7,19	C ₉₃ H ₁₃₃ N ₁₃ O ₁₈ S	1753,2	877 (M+H)	99	8,78 (B)
LP14	DIBAC-PEG ₄ -vcPAB-P19	6,57	C ₉₃ H ₁₃₁ N ₁₃ O ₁₉ S	1767,2	884 (M/2+H)	99	8,99 (B)
LP15	DIBAC-PEG ₄ -vcPAB-P5	5,64	C ₉₄ H ₁₃₄ FN ₁₅ O ₁₉ S	1829,3	611 (M/3+H); 915 (M/2+H)	95	8,39 (B)
LP16	DIBAC-PEG ₄ -EvcPAB-P5	4,41	C ₉₉ H ₁₄₁ FN ₁₆ O ₂₂ S	1958,4	653 (M/3+H); 980 (M/2+H)	99	7,79 (B)

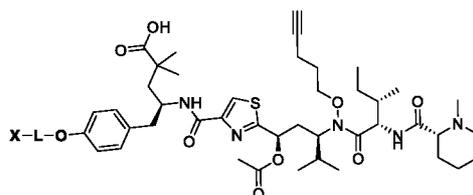
№	Линкер-нагрузки	cLogP	МФ	МВ	Масс. м/з	Чистота ВЭЖХ (%)	ВЭЖХ КТ (мин)
LP17	BCN-PEG ₄ -EvcPAB-P5	4,29	C ₉₁ H ₁₄₀ FN ₁₅ O ₂₂ S	1847,3	925 (M/2+H)	99	7,50 (B)
LP18	DIBAC-PEG ₄ -GGG-P5	2,02	C ₈₁ H ₁₁₆ FN ₁₃ O ₁₇ S	1595,0	798 (M/2+H)	99	8,50 (B)
LP19	BCN-PEG ₄ -GGFG-P5	3,02	C ₈₂ H ₁₂₄ FN ₁₃ O ₁₈ S	1631,0	816 (M/2+H)	99	7,72 (B)
LP20	DIBAC-PEG ₄ -vcPAB-P11	6,33	C ₁₀₀ H ₁₄₅ FN ₁₄ O ₂₂ S	1946,4	649 (M/3+H); 974 (M/2+H)	99	9,44 (B)
LP21	DIBAC-P11	4,41	C ₇₀ H ₉₇ FN ₈ O ₁₂ S	1293,7	647 (M/2+H)	95	11,75 (B)
LP22	DIBAC-PEG ₄ -vc-P43	4,53	C ₇₈ H ₁₁₂ N ₁₂ O ₁₇ S ₂	1553,9	777 (M/2+H)	99	8,15 (B)
LP23	DIBAC-PEG ₄ -vcPAB-P42	5,82	C ₈₇ H ₁₂₁ N ₁₃ O ₁₉ S ₂	1717,8	573 (M/3+H); 859 (M/2+H)	95	8,32 (B)
LP24	DIBAC-PEG ₄ -vc-P47	7,34	C ₉₁ H ₁₂₈ FN ₁₃ O ₁₈ S ₂	1775,2	888 (M/2+H)	99	8,76 (B)
LP25	DIBAC-PEG ₄ -vcPAB-P46	8,63	C ₁₀₀ H ₁₃₇ FN ₁₄ O ₂₀ S	1938,4	647 (M/3+H)	99	8,41 (B)
LP26	DIBAC-PEG ₄ -EvcPAB-Gly-P8	4,87	C ₁₀₀ H ₁₄₃ N ₁₅ O ₂₂ S	1939,4	647 (M/3+H)	99,9	7,35 (A)

Таблица 9А. Линкер-Р34



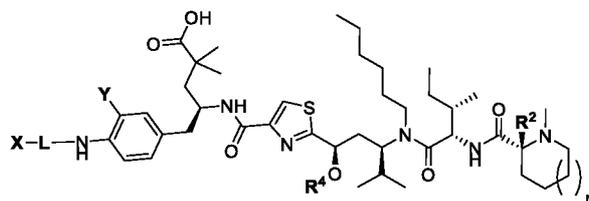
Нагрузка				X-L-P			
№				№		X-L-	
P34				LP2		NH ₂ -PEG ₄ -Evc-	
				LP3		BCN-PEG ₄ -Evc-	
				LP4		BCN-PEG ₄ - EvcPAB-	
				LP5		COT-GGG-	
				LP6		BCN-GGGG-	
				LP7		DIBAC-PEG ₄ - GGFG-	
				LP8		BCN-PEG ₄ -GGFG-	

Таблица 9В. Линкер-нагрузки посредством Тир-фенола



Нагрузка				X-L-P			
№				№		X-L-	
P51				LP9		COT-PEG ₃ - HOPAS-	

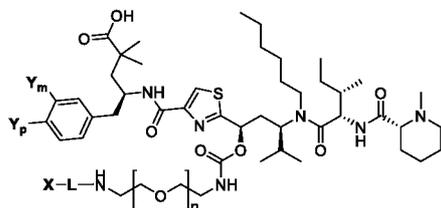
Таблица 9С. Другие линкер-нагрузки посредством Тир-анилина



Нагрузка						X-L-P			
№		n	R ²	R ⁴	Y	№		X-L-	
P1		1	H	H	F	LP10		BCN-GGFG-	
						LP11		BCN-PEG ₄ - GGFG-	
P7		1	H	Ac	H	LP12		DIBAC-PEG ₄ - vcPAB-G-	
P8		1	H	Et	H	LP13		DIBAC-PEG ₄ - vcPAB-	
	LP26						DIBAC-PEG ₄ -		

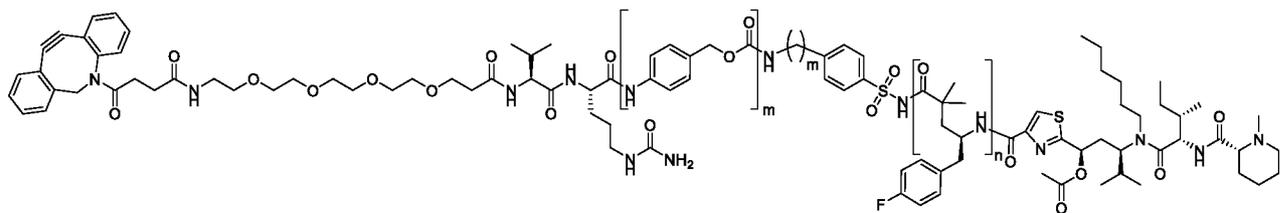
Нагрузка							X-L-P		
									EvcPAB-Gly-P8
P19		0	Me	Ac	H		LP14		DIBAC-PEG ₄ -vcPAB-

Таблица 9D. Линкер-карбамат-Tub



Нагрузка						X-L-P			
№		n	Y _p	Y _m		№		X-L-	
P5		0	NH ₂	F		LP15		DIBAC-PEG ₄ -vcPAB-	
					LP16		DIBAC-PEG ₄ -EvcPAB-		
					LP17		BCN-PEG ₄ -EvcPAB		
					LP18		DIBAC-PEG ₄ -GGG-		
					LP19		BCN-PEG ₄ -GGFG		
P11		3	F	H		LP20		DIBAC-PEG ₄ -vcPAB-	
					LP21		DIBAC-		

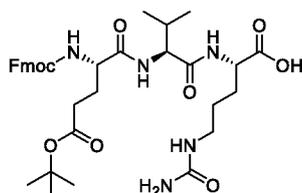
Таблица 9E. Линкер-N-ацилсульфонамид-Tub



Нагрузка					X-L-P				
№					№		X-L	m	n
P43					LP22		DIBAC-PEG ₄ -vc-	0	0
P42					LP23		DIBAC-PEG ₄ -vcPAB-	1	0
P47					LP24		DIBAC-PEG ₄ -vc-	0	1
P46					LP25		DIBAC-PEG ₄ -vcPAB-	1	1

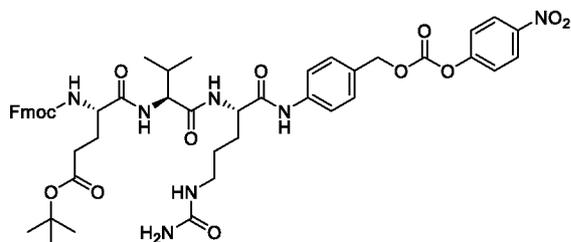
[00556] Синтез *vs*РАВ-линкер-нагрузок **LP2-LP4** и **LP13-LP14** в соответствии с ФИГ. 12А.

[00557] **(2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-5-(*tert*-бутокси)-2-[[9H-флуорен-9-илметокси]карбонил]амино]-5-оксопентанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентановая кислота (L1-1a)**



[00558] В соответствии с Общей процедурой IX с использованием H-Val-Cit-OH (0,73 г, 2,1 ммоль) с Fmoc-Glu(O^tBu)-OSu (1,2 г, 2,3 ммоль) получили Fmoc-Glu(O^tBu)-Val-Cit-OH (**L1-1a**) (0,60 г, выход 33%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 682 (M + H)⁺.

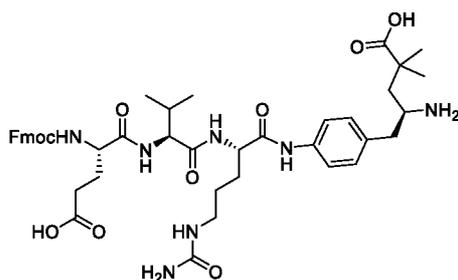
[00559] *tert*-бутил **(4S)-4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-[[4-нитрофеноксикарбонил]окси]метил]фенил]карбамоил]бутил]карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил]-4-[[[9H-флуорен-9-илметокси]карбонил]амино]бутаноат (L1-1c)**



[00560] К раствору Fmoc-Glu(O^tBu)-OH (0,56 г, 1,3 ммоль) в DMF (5 мл) добавили HATU (0,50 г, 1,3 ммоль) и DIPEA (0,34 г, 2,6 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут и затем добавили *vs*РАВ (0,50 г, 1,3 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 мМ)), в результате чего получили Fmoc-Glu-Val-Cit-РАВ (ИЭР м/з: 787 (M + H)⁺) в виде белого твердого вещества. Fmoc-Glu-Val-Cit-РАВ растворили в DMF (5 мл). К раствору добавили бис(4-нитрофенил) карбонат (0,52 г, 1,7 ммоль), DMAP (0,16 г, 1,3 ммоль) и DIPEA (0,84 г, 6,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной

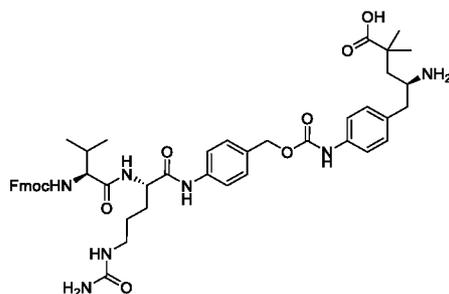
температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде) и получили соединение **L1-1c** (0,78 г, выход 63%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 952 (M + H)⁺.

[00561] **(4S)-4-амино-5-{4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[(2S)-4-карбокси-2-[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}бутанамидо]-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}-2,2-диметилпентановая кислота (L1-2a)**



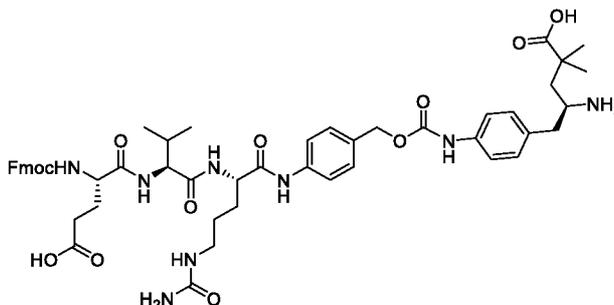
[00562] К раствору Fmoc-Glu(O^tBu)-Val-Cit-OH (**L1-1a**) (0,60 г, 0,88 ммоль) в метаноле (15 мл) добавили EEDQ (0,23 г, 0,93 ммоль) и **TUP-6b** (0,61 г, 1,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 50 °С в течение 4 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь отфильтровали и фильтрат сконцентрировали *in vacuo*. Остаток (0,80 г) растворили в DCM (9 мл). К раствору добавили TFA (3 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Boc и ^tBu по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-40% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)), в результате чего получили **L1-2a** (0,36 г, выход 48% из **L1-1a**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 844 (M + H)⁺.

[00563] **(4S)-4-амино-5-(4-[[[(4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил]метокси)карбонил]амино}фенил)-2,2-диметилпентановая кислота (L1-2b)**



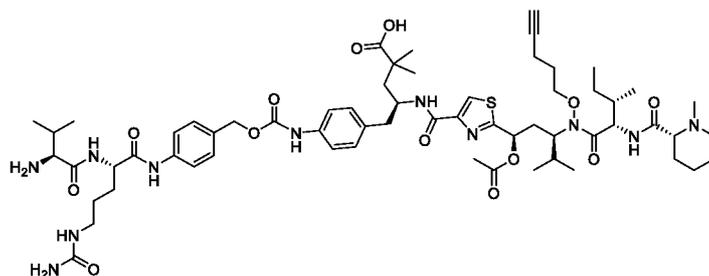
[00564] В соответствии с Общей процедурой X с использованием Fmoc-vcPAB-PNP (**L1-1b**) (50 мг, 65 μ моль) и амина **TUP-6b** (20 мг, 59 μ моль) с HOBT получили **Вос-L1-2b** (31 мг, ИЭР м/з 964 (M + H)⁺) в виде белого твердого вещества. **Вос-L1-2b** растворили в DCM (4 мл). К раствору добавили TFA (0,5 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение получаса до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo* и получили соединение **L1-2b** (37 мг, выход 54%, соль TFA) в виде коричневого масла. ИЭР м/з 433 (M/2 + H)⁺.

[00565] **(4S)-4-амино-5-(4-(((4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[(2S)-4-карбокси-2-((9H-флуорен-9-илметокси)карбонил)амино]бутанамидо]-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}фенил)-2,2-диметилпентановая кислота (L1-2c)**



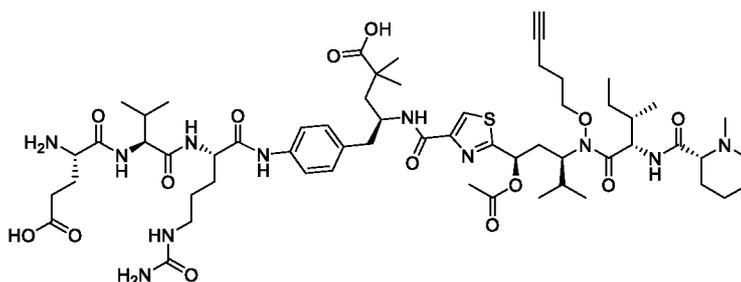
[00566] В соответствии с Общей процедурой X с использованием Fmoc-Glu(O^tBu)-Val-Cit-PAB-PNP (**L1-1c**) (0,10 г, 0,11 ммоль) и амина **TUP-6b** с HOBT получили **Вос-L1-2c** (ИЭР м/з: 1151 (M + H)⁺) в виде белого твердого вещества. **Вос-L1-2c** растворили в DCM (5 мл). К раствору добавили TFA (1 мл), реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,01%)), в результате чего получили **L1-2c** (16 мг, выход 15% из **L1-1c**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 994 (M + H)⁺.

[00567] **(4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-((2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формаидо)}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формаидо)-5-(4-(((4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}фенил)-2,2-диметилпентановая кислота (L1-3a)**



[00568] В соответствии с Общей процедурой VIII из **L1-2b** с **3Ia** получили соединение **L1-3a** (17 мг, выход 67% из **3Ia**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 615.8 (M/2 + H)⁺.

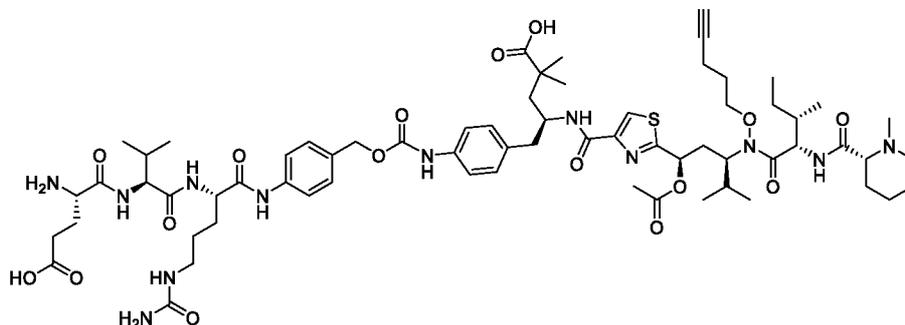
[00569] **(4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-4-карбоксибутанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}-2,2-диметилпентановая кислота (L1-3b)**



[00570] В соответствии с Общей процедурой VIII из **L1-2a** с **3Ia** (80 мг, 0,13 ммоль) получили **Fmoc-L1-3b** (50 мг, ИЭР м/з: 717 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде). К раствору **Fmoc-L1-3b** (16 мг) в DMF (1 мл) добавили пиперидин (4 мг, 47 ммоль, избыток) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Fmoc по результатам ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-70% ацетонитрил в воде) и получили соединение **L1-3b** (11 мг, выход 22% из **3Ia**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 606 (M/2 + H)⁺.

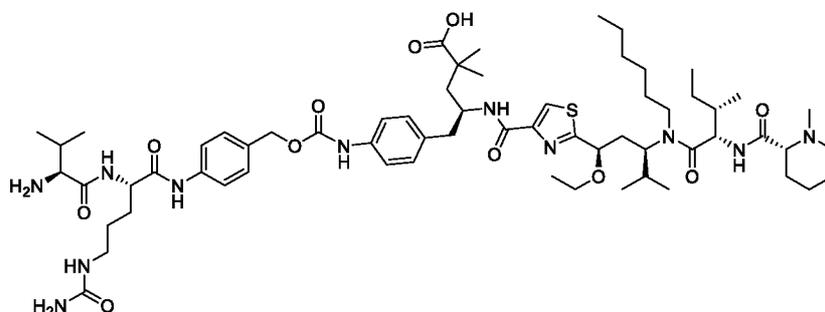
[00571] **(4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-{{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-4-карбоксибутанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-**

**(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}фенил)-2,2-
диметилпентановая кислота (L1-3c)**



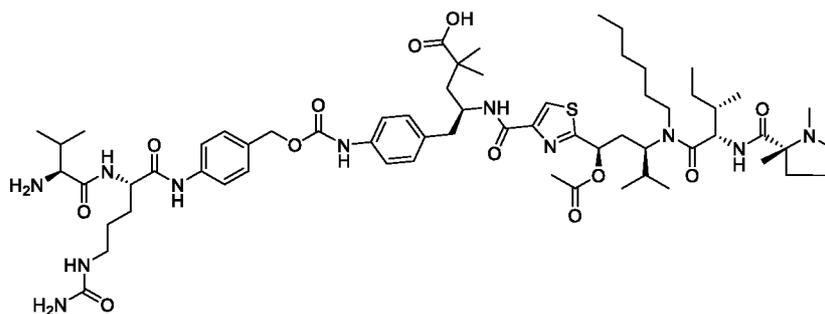
[00572] В соответствии с Общей процедурой VIII из **L1-2c** с **3Ia** получили соединение **L1-3c** (75 мг, выход 50% из **3Ia**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 680.5 (M/2 + H)⁺.

**(4S)-5-(4-(((4-((2S)-2-((2S)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}фенил)-4-((2-((1R,3R)-1-этокси-3-((2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-((2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил]формамидо)-2,2-
диметилпентановая кислота (L1-3d)**



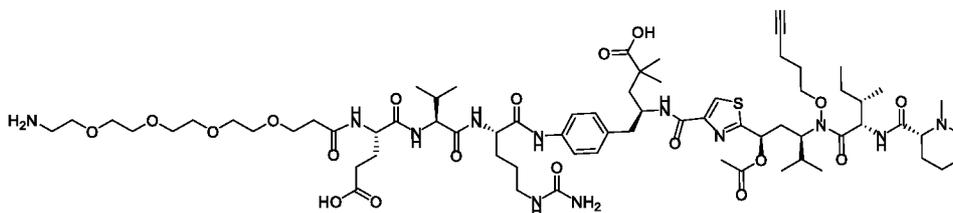
[00574] В соответствии с Общей процедурой VIII из **L1-2b** с **3Ba** получили соединение **L1-3d** (17 мг, выход 66% из **3Ba**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 610 (M/2 + H)⁺.

**(4S)-4-((2-((1R,3R)-1-(ацетилокси)-3-((2S,3S)-2-((2R)-1,2-
диметилпирролидин-2-ил]формамидо}-N-гексил-3-метилпентанамидо]-4-
метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил]формамидо)-5-(4-(((4-((2S)-2-((2S)-2-амино-3-
метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}фенил)-2,2-
диметилпентановая кислота (L1-3e)**



[00576] В соответствии с Общей процедурой VIII из **L1-2b** с **3Ff** получили соединение **L1-3e** (20 мг, выход 37% из **3Ff**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 617 (M/2 + H)⁺.

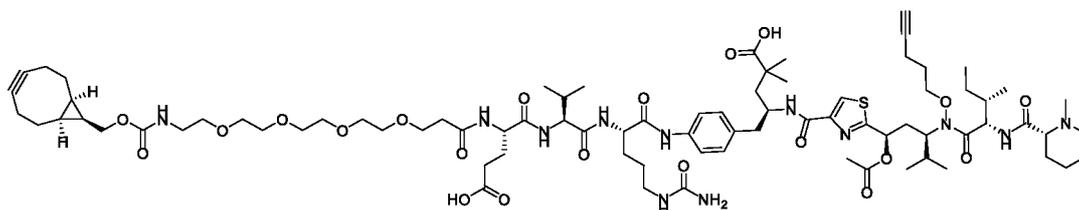
[00577] **LP2**: (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-{4-[(2S)-2-[(2S)-2-(1-амино-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо)-4-карбоксибутанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}-2,2-диметилпентановая кислота (**LP2**)



[00578] В соответствии с Общей процедурой IX из амина **L1-3b** (28 мг, 23 ммоль) и эфира OSu **L0-1a** получили **Вос-LP2** (26 мг) в виде белого твердого вещества. **Вос-LP2** растворили в DCM (4 мл). К раствору добавили TFA (1 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (10-95% ацетонитрил в вод. муравьиной кислоте (0,01%)), в результате чего получили линкер-нагрузку **LP2** (11 мг, выход 33% из **L1-3b**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з 729 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{д6}) δ 9.90 (s, 1H), 8.46-8.42 (m, 1H), 8.36-8.30 (m, 1H), 8.18-8.16 (m, 1H), 7.89-7.79 (m, 2H), 7.61 (d, J = 9.6 Гц, 2H), 7.48 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 7.10 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 6.31 (s, 1H), 5.82 (d, J = 10.4 Гц, 1H), 5.55 (s, 1H), 4.76 (t, J = 8.0 Гц, 1H), 4.34-4.30 (m, 1H), 4.28-4.24 (m, 2H), 4.19-4.16 (m, 1H), 4.09-4.03 (m, 2H), 3.65-3.61 (m, 2H), 3.59-3.53 (m, 9H), 3.52-3.47 (m, 10H), 2.99-2.94 (m, 2H), 2.89 (t, J = 5.2 Гц, 2H), 2.87-2.83 (m, 2H), 2.80-2.76 (m, 1H), 2.70-2.66 (m, 1H), 2.43-2.41 (m, 1H), 2.38-2.32 (m, 3H), 2.13 (s, 4H), 2.10 (s, 3H), 2.03-1.93

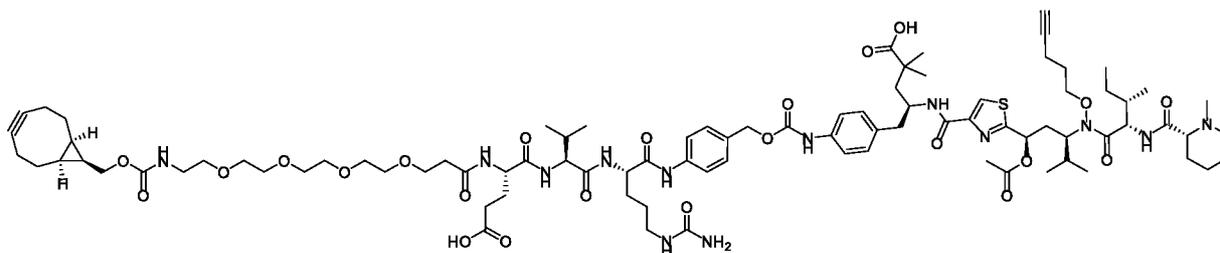
(m, 4H), 1.86-1.80 (m, 4H), 1.68-1.59 (m, 5H), 1.54-1.50 (m, 1H), 1.48-1.41 (m, 3H), 1.40-1.32 (m, 3H), 1.18-1.12 (m, 1H), 1.07-1.02 (m, 7H), 0.95 (d, $J = 6.4$ Гц, 3H), 0.89-0.80 (m, 18H) ppm.

[00579] **LP3:** (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил} формамидо)-5-{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-({эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси]карбонил}амино)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-4-карбоксібутанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}-2,2-диметилпентановая кислота (LP3)



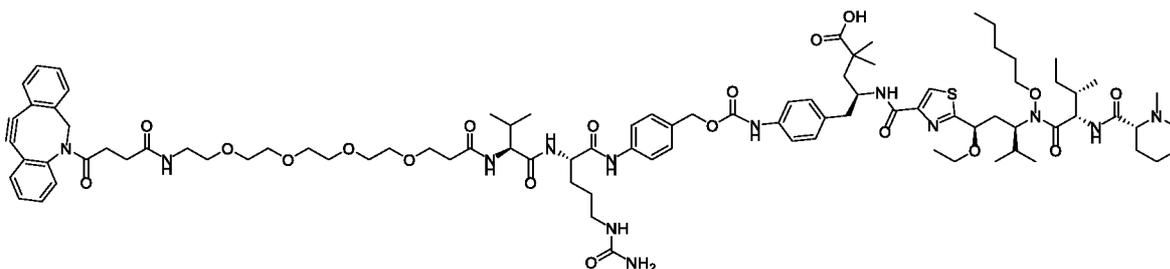
[00580] В соответствии с Общей процедурой IX из амина **L1-3b** (50 мг, 41 ммоль) с эфиром OSu **L0-1b** получили линкер-нагрузку **LP3** (15 мг, выход 22%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 817 ($M/2 + H$)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 9.91-9.89 (m, 1H), 8.17 (s, 2H), 8.08 (d, $J = 7.6$ Гц, 1H), 7.79-7.70 (m, 2H), 7.70-7.60 (m, 1H), 7.47 (d, $J = 8.4$ Гц, 2H), 7.13-7.08 (m, 3H), 6.00 (t, $J = 7.6$ Гц, 1H), 5.82 (d, $J = 10.4$ Гц, 1H), 5.43 (s, 2H), 4.76 (t, $J = 8.0$ Гц, 1H), 4.38-4.31 (m, 2H), 4.30-4.22 (m, 2H), 4.21-4.16 (m, 1H), 4.08-4.00 (m, 4H), 3.61-3.55 (m, 2H), 3.51-3.46 (m, 13H), 3.41-3.36 (m, 4H), 3.14-3.09 (m, 2H), 3.06-2.99 (m, 1H), 2.96-2.90 (m, 1H), 2.86-2.84 (m, 1H), 2.82-2.76 (m, 1H), 2.70-2.64 (m, 1H), 2.44-2.40 (m, 1H), 2.39-2.30 (m, 5H), 2.26-2.20 (m, 4H), 2.18-2.10 (m, 11H), 2.03-1.92 (m, 4H), 1.86-1.80 (m, 3H), 1.70-1.62 (m, 4H), 1.56-1.50 (m, 3H), 1.44-1.35 (m, 4H), 1.29-1.23 (m, 1H), 1.09-1.02 (m, 7H), 0.96 (d, $J = 6.4$ Гц, 3H), 0.90-0.79 (m, 20H) ppm.

[00581] **LP4:** (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил} формамидо)-5-(4-({4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-({эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси]карбонил}амино)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-4-карбоксібутанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}фенил)-2,2-диметилпентановая кислота (LP4)



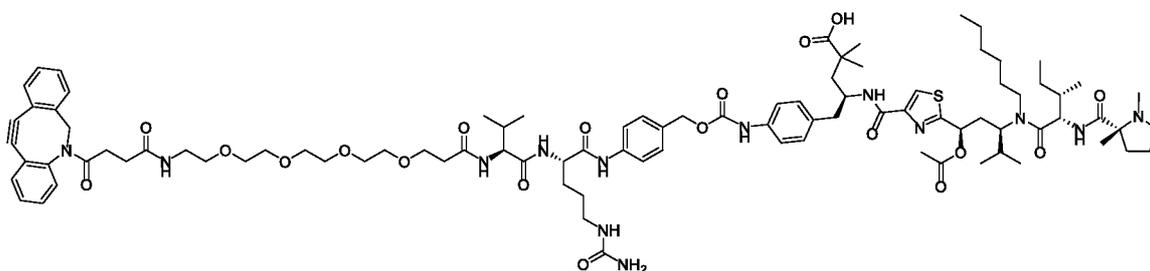
[00582] В соответствии с Общей процедурой IX из амина **L1-3c** и эфира OSu **L0-1a** получили **Вос-L1-4c** (35 мг, ИЭР м/з: 854 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества. **Вос-L1-4c** растворили в DCM (4 мл). К раствору добавили TFA (1 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0.01%)), в результате чего получили **L1-4c** (36 мг, ИЭР м/з: 804 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества. **L1-4c** растворили в DMF (3 мл). К раствору добавили **L0-0b** (9,0 мг, 29 ммоль), HOBT (2,0 мг, 10 ммоль) и DIPEA (5,0 мг, 39 ммоль), реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили напрямую посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,01%)), в результате чего получили **LP4** (4,0 мг, выход 7,8% из **L1-3c**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 893 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 10.05 (s, 1H), 9.64 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.10 (d, *J* = 7.7 Гц, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.2 Гц, 1H), 7.72 (d, *J* = 9.0 Гц, 1H), 7.61 (m, 3H), 7.34 (m, 4H), 7.12-7.06 (m, 3H), 5.82 (d, *J* = 11.4 Гц, 1H), 5.48 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 4.79-4.72 (m, 1H), 4.40-4.15 (m, 6H), 4.03 (m, 4H), 3.61-3.55 (m, 3H), 3.48 (d, *J* = 5.5 Гц, 14H), 3.13-3.09 (m, 3H), 3.06-2.88 (m, 3H), 2.87-2.72 (m, 3H), 2.79-2.64 (m, 2H), 2.43-2.29 (m, 7H), 2.26-2.20 (m, 4H), 2.15-2.10 (m, 10H), 2.05-1.78 (m, 9H), 1.69-1.60 (m, 5H), 1.55-1.47 (m, 3H), 1.38-1.34 (m, 2H), 1.28-1.24 (m, 2H), 1.06 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.96 (d, *J* = 6.5 Гц, 3H), 0.90-0.79 (m, 18H) ppm.

[00583] **LP13:** (4*S*)-5-(4-{{(4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]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]амино}фенил)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-этокси-4-метил-3-[(2*S*,3*S*)-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}-*N*-(пентилокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (**LP13**)



[00584] В соответствии с Общей процедурой IX из амина **L1-3d** и эфира OSu **L0-1c** получили линкер-нагрузку **LP13** (24 мг, выход 33%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 877 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-*d*₆) δ 10.0 (s, 1H), 9.66 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 7.5 Гц, 1H), 7.87 (d, *J* = 9.0 Гц, 1H), 7.66 (t, *J* = 5.5 Гц, 1H), 7.68-7.66 (m, 1H), 7.62-7.60 (m, 3H), 7.51-7.45 (m, 4H), 7.39-7.32 (m, 7H), 7.30-7.28 (m, 1H), 7.04 (d, *J* = 8.5 Гц, 2H), 5.99 (t, *J* = 6.0 Гц, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.04-5.01 (m, 3H), 4.51 (t, *J* = 9.0 Гц, 1H), 4.40-4.36 (m, 1H), 4.30-4.27 (m, 2H), 4.23-4.20 (m, 1H), 5.04-5.01 (m, 3H), 3.74-3.68 (m, 2H), 3.62-3.55 (m, 4H), 3.47-3.45 (m, 11H), 3.30-3.28 (m, 3H), 3.10-2.54 (m, 9H), 2.47-2.44 (m, 1H), 2.39-2.35 (m, 1H), 2.25-2.20 (m, 1H), 2.10-2.07 (m, 2H), 2.02-1.34 (m, 19H), 1.28-1.21 (m, 9H), 1.17 (t, *J* = 7.0 Гц, 3H), 1.06 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 0.91 (d, *J* = 6.5 Гц, 3H), 0.87-0.80 (m, 15H), 0.70 (s, 3H) ppm.

[00585] **LP14:** (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-3-[(2*S*,3*S*)-2-{{(2*R*)-1,2-диметилпирролидин-2-ил}формамидо}-*N*-гексил-3-метилпентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-{{(4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0⁴,⁹]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]амино}фенил)-2,2-диметилпентановая кислота (**LP14**)

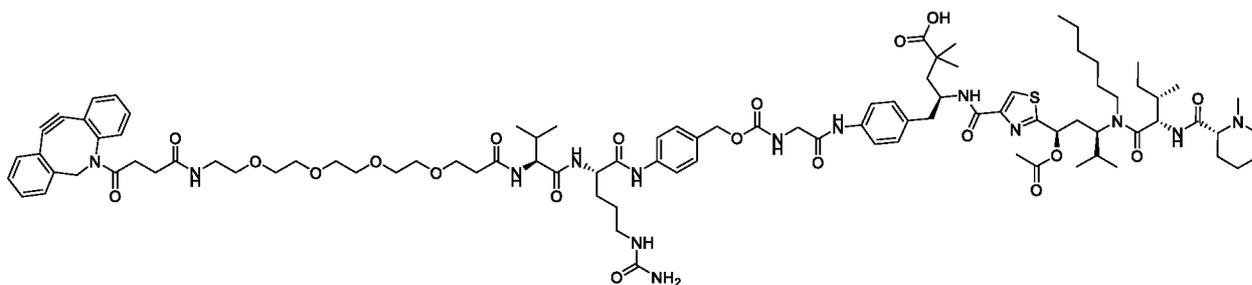


[00586] В соответствии с Общей процедурой IX из амина **L1-3e** и эфира OSu **L0-1c** получили линкер-нагрузку **LP14** (6 мг, выход 54%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 884 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-*d*₆) δ 10.0 (s, 1H), 9.67 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 7.0 Гц, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.5 Гц, 1H), 7.75-7.72 (m, 2H), 7.68-7.66 (m, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.0 Гц, 3H), 7.37-7.32 (m, 6H), 7.30-7.28 (m, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.5 Гц, 2H), 5.98-

5.96 (m, 1H), 5.66-5.64 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.04 (s, 2H), 4.44 (t, $J = 9.5$ Гц, 1H), 4.40-4.36 (m, 1H), 4.32-4.26 (m, 1H), 4.24-4.21 (m, 1H), 3.62-2.92 (m, 30H), 2.70-2.19 (m, 10H), 2.13 (s, 3H), 2.02-1.33 (m, 18H), 1.31-1.12 (m, 12H), 1.08 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 0.96 (d, $J = 6.5$ Гц, 3H), 0.86-0.81 (m, 15H), 0.67 (d, $J = 5.0$ Гц, 3H) ppm.

[00587] Синтез **LP12** в соответствии с ФИГ. 12В.

[00588] **LP12**: (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-[(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-[4-(2-{{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0⁴,⁹]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]амино}ацетамидо)фенил]-2,2-диметилпентановая кислота (**LP12**)

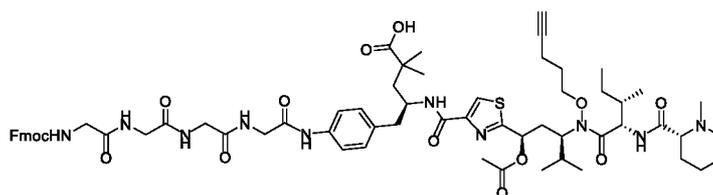


[00589] К раствору нагрузки **P28** (70 мг, 79 ммоль) в DMF (5 мл) добавили соединение **L2-1** (86 мг, 79 ммоль), HOBT (11 мг, 79 ммоль) и DIPEA (31 мг, 0,24 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Реакционную смесь очистили сразу посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (30-70% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 mM)), в результате чего получили линкер-нагрузку **LP12** (27 мг, выход 19%) в виде белого твердого вещества. ИЭР: 913 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 12.13 (s, 1H), 9.99 (s, 1H), 9.87 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.12 (d, $J = 4.0$ Гц, 1H), 7.87 (d, $J = 8.8$ Гц, 1H), 7.75 (t, $J = 5.2$ Гц, 1H), 7.69-7.57 (m, 6H), 7.52-7.44 (m, 5H), 7.40-7.27 (m, 5H), 7.10 (d, $J = 8.4$ Гц, 2H), 5.97 (t, $J = 5.6$ Гц, 1H), 5.65 (d, $J = 12.8$ Гц, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.05-5.01 (d, $J = 13.6$ Гц, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.49 (t, $J = 9.2$ Гц, 1H), 4.41-4.35 (m, 1H), 4.27-4.21 (m, 2H), 3.76 (d, $J = 6.4$ Гц, 2H), 3.64-3.56 (m, 3H), 3.48-3.45 (m, 13H), 3.29-3.28 (m, 2H), 3.11-3.06 (m, 2H), 3.05-2.93 (m, 4H), 2.84-2.67 (m, 3H), 2.59-2.54 (m, 1H), 2.46-2.44 (m, 1H), 2.40-2.32 (m, 2H), 2.25-2.20 (m, 2H), 2.13 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.03-1.86 (m, 7H), 1.80-1.70 (m,

4H), 1.62-1.60 (m, 4H), 1.54-1.51 (m, 1H), 1.46-1.36 (m, 4H), 1.29 (m, 7H), 1.06-1.05 (m, 7H), 0.96-0.94 (m, 3H), 0.87-0.80 (m, 17H), 0.69-0.68 (m, 3H) ppm.

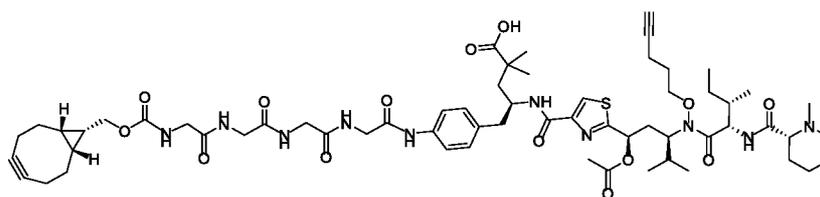
[00590] Синтез пептид-линкер-нагрузок **LP6-LP8** и **LP10-LP11** в соответствии с ФИГ. 13А.

[00591] **(4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-[4-(2-{2-[2-(2-{{(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил}амино)ацетамидо)ацетамидо]ацетамидо}ацетамидо)фенил]-2,2-диметилпентановая кислота (L3-2a)**



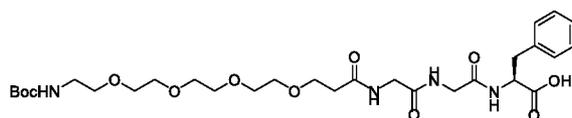
[00592] К раствору Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH (**L3-1a**) (0,40 г, 1,0 ммоль) в DCM (40 мл) добавили HOSu (0,25 г, 2,2 ммоль) и EDCI (0,42 г, 2,2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов. Полученную смесь разбавили DCM (50 мл) и промыли водой (50 мл). Органическую фазу высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали, в результате чего получили эфир OSu (0,30 г, ИЭР м/з: 509 (M + H)⁺). Эфир OSu использовали сразу без дальнейшей очистки. В соответствии с Общей процедурой IX с использованием эфира OSu (51 мг) и амина **P38** (88 мг, 0,10 ммоль) получили соединение **L3-2a** (63 мг, выход 49% из **P38**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 638 (M/2 + H)⁺.

[00593] **LP6:** **(4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-{4-[2-(2-{2-[2-{{эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси}карбонил}амино)ацетамидо]ацетамидо}ацетамидо)ацетамидо]фенил]-2,2-диметилпентановая кислота (LP6)**



[00594] К раствору **L3-2a** (25 мг, 20 ммоль) в DMF (1 мл) добавили пиперидин (3,4 мг, 40 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Fmoc по результатам ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (10-95% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 mM)), в результате чего получили амин (20 мг, ИЭР м/з: 527 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества. Амин растворили в DMF (1 мл). К раствору добавили DIPEA (5,9 мг, 46 ммоль) и соединение **L0-0b** (6,0 мг, 19 ммоль), смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-70% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 mM)), в результате чего получили линкер-нагрузку **LP6** (20 мг, выход 81%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 615 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 9.80 (s, 1H), 8.25-8.20 (m, 2H), 8.15-8.10 (m, 2H), 7.85-7.80 (m, 1H), 7.65-7.60 (m, 1H), 7.50 (d, J = 6.8 Гц, 2H), 7.45-7.40 (m, 1H), 7.10 (d, J = 6.8 Гц, 2H), 5.85 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 4.75 (t, J = 7.6 Гц, 1H), 4.30-4.25 (m, 2H), 4.10-4.00 (m, 3H), 3.90-3.85 (m, 2H), 3.75-3.70 (m, 3H), 3.65-3.60 (m, 2H), 2.80-2.60 (m, 5H), 2.30-2.10 (m, 5H), 2.10-2.00 (m, 11H), 2.00-1.65 (m, 8H), 1.70-1.10 (m, 13H), 1.07 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.98-0.95 (m, 3H), 0.90-0.80 (m, 10H) ppm.

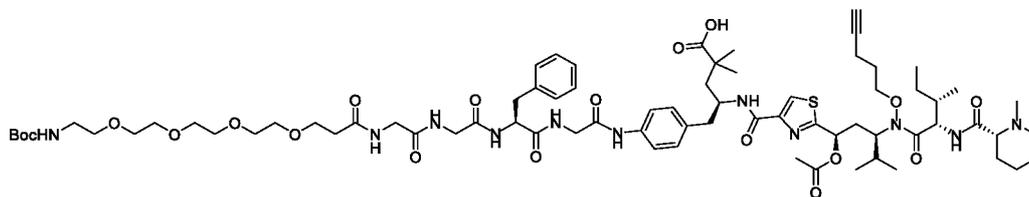
[00595] **(2S)-2-{2-[2-(1-{{(трет-бутокси)карбонил}амино}-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо)ацетамидо]ацетамидо}-3-фенилпропановая кислота (L3-1c)**



[00596] К раствору Fmoc-Gly-Gly-Phe-OH (**L3-1b**) (0,62 г, 1,2 ммоль) в ацетонитриле (5 мл) добавили диэтиламин (1 мл), реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов под контролем ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo* и остаток (0,35 г, ИЭР м/з: 280 (M + H)⁺) использовали напрямую для амидирования. В соответствии с Общей процедурой IX с использованием остатка и эфира OSu **L0-1a** получили Boc-PEG4-Gly-Gly-Phe-OH (**L3-1c**) (0,25 г, выход 32%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* TFA (0,05%)). ИЭР м/з: 627 (M + H)⁺.

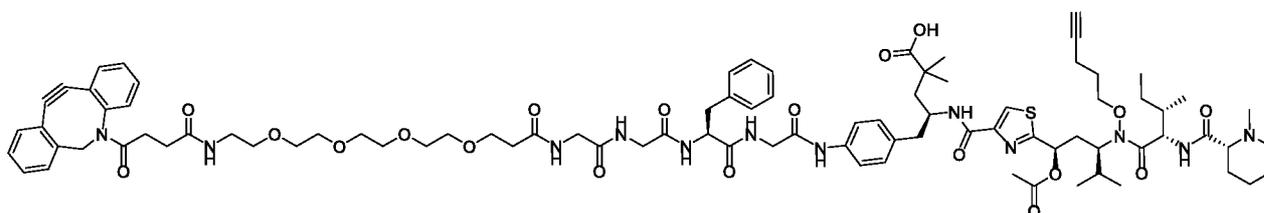
[00597] **(4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-{2-[(2S)-2-{2-[2-(1-{{(трет-**

бутокси)карбонил]амино}-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо)ацетида]ацетида}-3-фенилпропанамида]ацетида}фенил)-2,2-диметилпентановая кислота (L3-2b**)**



[00598] К раствору Boc-PEG4-Gly-Gly-Phe-OH (**L3-1c**) (0,12 г, 0,20 ммоль) в DCM (10 мл) добавили HOSu (46 мг, 0,40 ммоль) и EDCI (77 мг, 0,40 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Полученную смесь разбавили DCM (100 мл) и промыли водой (50 мл). Органическую фазу высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали, в результате чего получили эфир OSu (0,14 г, ИЭР м/з: 746 (M + Na)⁺). Эфир OSu использовали сразу без дальнейшей очистки. В соответствии с Общей процедурой IX с использованием эфира OSu (98 мг) и амина **P38** (80 мг, 91 ммоль) получили соединение **L3-2b** (0,10 г, выход 74% из **P38**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 696 ((M представляет собой Boc)/2 + H)⁺.

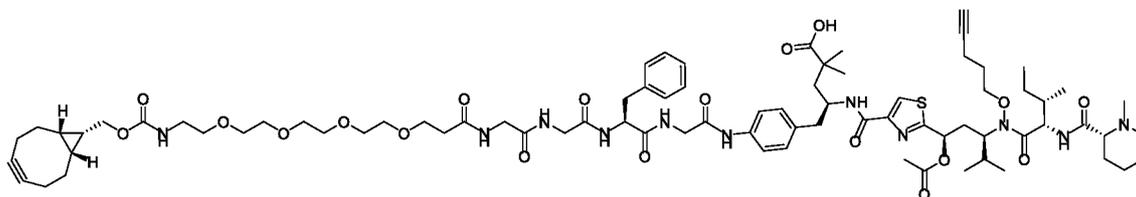
[00599] **LP7**: (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формаидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанаидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формаидо)-5-(4-{2-[(2S)-2-(2-{2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанаидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]ацетида}ацетида)-3-фенилпропанамида]ацетида}фенил)-2,2-диметилпентановая кислота (**LP7**)



[00600] К раствору **L3-2b** (1,0 г, 0,67 ммоль) в DCM (20 мл) добавили TFA (5 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Boc по результатам ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,05%)), в результате чего получили амин **L3-3b** (0,30 г, ИЭР м/з: 696 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества. В соответствии с Общей процедурой IX с использованием амина

L3-3b (80 мг) и соединения **L0-0c** (24 мг, 60 ммоль) получили линкер-нагрузку **LP7** (25 мг, выход 8% из **L3-2b**) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (0,05%)). ИЭР m/z : 839 ($M/2 + H$)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 9.77 (s, 1H), 8.41-8.40 (m, 1H), 8.21-8.17 (m, 3H), 8.06-8.05 (m, 1H), 7.79-7.77 (m, 1H), 7.69-7.67 (m, 1H), 7.63-7.56 (m, 2H), 7.51-7.43 (m, 5H), 7.40-7.28 (m, 3H), 7.25-7.24 (m, 4H), 7.19-7.16 (m, 1H), 7.13-7.11 (m, 2H), 5.90-5.75 (m, 1H), 5.05-5.00 (m, 1H), 4.78-4.73 (m, 1H), 4.52-4.49 (m, 1H), 4.26-4.24 (m, 1H), 4.17-4.03 (m, 3H), 3.87-3.84 (m, 2H), 3.79-3.74 (m, 1H), 3.69-3.68 (m, 2H), 3.62-3.57 (m, 4H), 3.46-3.42 (m, 13H), 3.29-3.27 (m, 2H), 3.10-3.03 (m, 3H), 2.86-2.79 (m, 4H), 2.68-2.54 (m, 2H), 2.40-2.32 (m, 6H), 2.27-2.20 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.03-1.92 (m, 4H), 1.84-1.72 (m, 4H), 1.63-1.05 (m, 10H), 1.02-0.95 (m, 9H), 0.89-0.80 (m, 9H) ppm.

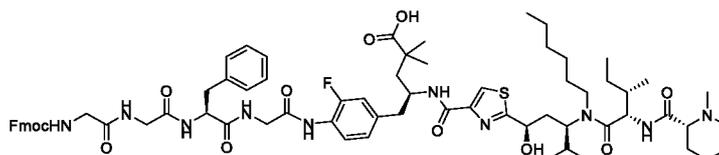
[00601] **LP8**: (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2*S*,3*S*)-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формаидо}-*N*-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формаидо)-5-(4-{2-[(2*S*)-2-(2-{2-[1-{{эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси}карбонил}амино)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]ацетамидо}ацетамидо)-3-фенилпропанамидо]ацетамидо}фенил)-2,2-диметилпентановая кислота (**LP8**)



[00602] К раствору амина **L3-3b** (27 мг, 19 ммоль; полученному ранее) в DMF (3 мл) добавили HOBT (1,4 мг, 10 ммоль), DIPEA (8,0 мг, 62 ммоль) и соединение **L0-0b** (13 мг, 41 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (0,05%)), в результате чего получили линкер-нагрузку **LP8** (24 мг, выход 25% из **L3-2b**) в виде белого твердого вещества. ИЭР m/z : 784 ($M/2 + H$)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 9.76 (d, $J = 4.8$ Гц, 1H), 8.41-8.38 (m, 1H), 8.20-8.16 (m, 2H), 8.05-8.04 (m, 1H), 7.87-7.84 (m, 1H), 7.57 (d, $J = 10.0$ Гц, 1H), 7.48 (d, $J = 8.8$ Гц, 2H), 7.26-7.24 (m, 4H), 7.21-7.15 (m, 1H), 7.13-7.10 (m, 3H), 5.81 (d, $J = 10.4$ Гц, 1H), 4.78-4.74 (m, 1H), 4.53-4.47 (m, 1H), 4.28-4.20 (m, 2H), 4.07-4.02 (m, 4H), 3.89-3.78 (m, 3H), 3.70-3.68 (m, 2H), 3.63-3.56 (m, 3H), 3.48-

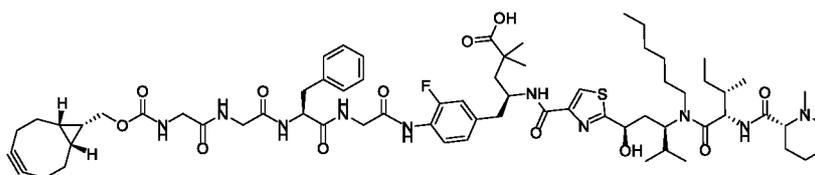
3.47 (m, 14H), 3.21-3.03 (m, 4H), 2.85-2.78 (m, 4H), 2.43-2.30 (m, 8H), 2.26-2.10 (m, 11H), 2.05-1.91 (m, 6H), 1.84-1.76 (m, 4H), 1.66-1.60 (m, 3H), 1.55-1.33 (m, 8H), 1.06-1.03 (m, 6H), 0.96-0.95 (m, 3H), 0.89-0.81 (m, 9H) ppm.

[00603] **(4S)-5-(4-{2-[(2S)-2-[2-(2-{{(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил}амино}ацетида)ацетида]-3-фенилпропанамида]ацетида}-3-фторфенил)-4-({2-[(1R,3R)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формамида}пентанамида]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамида)-2,2-диметилпентановая кислота (L3-2c)**



[00604] К раствору Fmoc-Gly-Gly-Phe-OH (**L3-1b**) (0,10 г, 0,20 ммоль) в DCM (10 мл) добавили HOSu (46 мг, 0,40 ммоль) и EDCI (77 мг, 0,40 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Полученную смесь разбавили DCM (50 мл) и промыли водой (50 мл). Органическую фазу высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-50% ацетонитрил в воде), в результате чего получили эфир OSu (54 мг, ИЭР м/з: 599 (M + H)⁺) в виде белого твердого вещества. В соответствии с Общей процедурой IX с использованием эфира OSu (54 мг) и амина **P24** (75 мг, 87 ммоль) получили соединение **L3-2c** (25 мг, выход 21% из **P24**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 672 (M/2 + H)⁺.

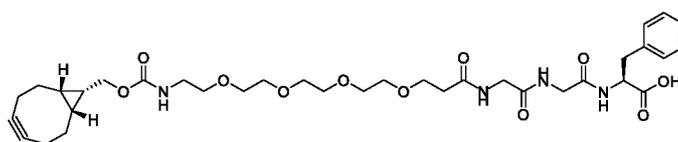
[00605] **LP10:** **(4S)-5-(4-{2-[(2S)-2-{2-[2-({эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси}карбонил}амино)ацетида]ацетида}-3-фенилпропанамида]ацетида}-3-фторфенил)-4-({2-[(1R,3R)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формамида}пентанамида]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамида)-2,2-диметилпентановая кислота (LP10)**



[00606] К раствору **L3-2c** (25 мг, 19 ммоль) в DMF (1 мл) добавили пиперидин (6,0 мг, 74 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Fmoc по результатам ЖХМС. Полученную смесь очистили

посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (10-95% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 мМ)), в результате чего получили амин (17 мг, ИЭР м/з: 561 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества. Амин растворили в DMF (3 мл). К раствору добавили НОВt (3,0 мг, 22 ммоль), DIPEA (8,0 мг, 62 ммоль) и соединение **L0-0b** (10 мг, 30 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (10-95% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 мМ)), в результате чего получили линкер-нагрузку **LP10** (7,8 мг, выход 40%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 649 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 9.64 (s, 1H), 8.42 (t, J = 5.6 Гц, 1H), 8.17 (d, J = 9.2 Гц, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.99 (t, J = 6.0 Гц, 1H), 7.78 (t, J = 8.0 Гц, 2H), 7.36 (t, J = 6.0 Гц, 1H), 7.26-7.22 (m, 5H), 7.19-7.15 (m, 1H), 7.06 (d, J = 12.0 Гц, 1H), 6.97 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 4.56-4.51 (m, 3H), 4.26-4.19 (m, 1H), 4.05 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 3.95-3.91 (m, 2H), 3.78 (d, J = 5.6 Гц, 1H), 4.05 (d, J = 6.0 Гц, 1H), 3.61-3.58 (m, 3H), 3.10-3.08 (m, 1H), 3.06-3.04 (m, 1H), 2.85-2.75 (m, 5H), 2.23-2.21 (m, 1H), 2.18-2.16 (m, 1H), 2.15-2.12 (m, 3H), 2.11-2.09 (m, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.95-1.90 (m, 2H), 1.87-1.79 (m, 3H), 1.57-1.47 (m, 6H), 1.33-1.29 (m, 6H), 1.26-1.23 (m, 3H), 1.16-1.11 (m, 2H), 1.07-1.01 (m, 7H), 0.92-0.79 (m, 19H), 0.75-0.70 (m, 3H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO_{d6}) δ -132.9 ppm.

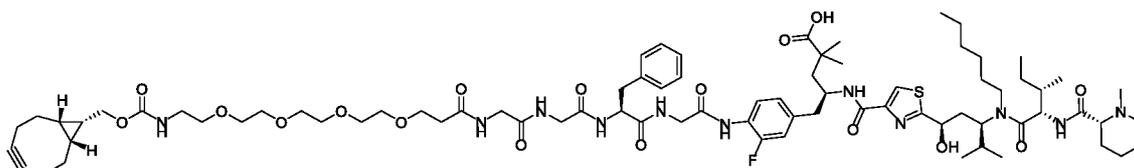
[00607] **(2S)-2-(2-{2-[1-({эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси}карбонил)амино]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}ацетамидо}ацетамидо)-3-фенилпропановая кислота (L3-1d)**



[00608] К раствору Вос-PEG4-Gly-Gly-Phe-OH (**L3-1c**) (50 мг, 80 ммоль) в DCM (3 мл) добавили TFA (1 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и лиофилизировали, в результате чего получили остаток (ИЭР м/з: 527 (M + H)⁺). Остаток растворили в DMF (3 мл). К раствору добавили НОВt (12 мг, 85 ммоль), DIPEA (22 мг, 0,17 ммоль) и соединение **L0-0b** (27 мг, 85 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили напрямую посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-70% ацетонитрил в воде), в результате чего получили BCN-

PEG4-Gly-Gly-Phe-OH (25 мг, выход 44%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 703 (M + H)⁺.

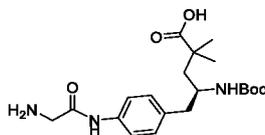
[00609] **LP11:** (4S)-5-(4-{2-[(2S)-2-(2-{2-[1-({эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси]карбонил}амино)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]ацетамидо}ацетамидо)-3-фенилпропанамидо]ацетамидо}-3-фторфенил)-4-({2-[(1R,3R)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-1-гидрокси-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (LP11)



[00610] К раствору BCN-PEG4-Gly-Gly-Phe-OH (**L3-1d**) (25 мг, 36 ммоль) в DCM (3 мл) добавили HOSu (8,0 мг, 72 ммоль) и EDCI (14 мг, 72 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством обращенно-фазовой хроматографии (0-50% ацетонитрил в воде), в результате чего получили эфир OSu (13 мг, ИЭР м/з: 822 (M + Na)⁺) в виде белого твердого вещества. В соответствии с Общей процедурой IX с использованием эфира OSu (13 мг) и амина **P24** (14 мг, 16 ммоль) получили линкер-нагрузку **LP11** (3,8 мг, выход 15% из **P24**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 773 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 9.62 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.18 (t, J = 4.4 Гц, 1H), 8.12 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.04-7.97 (m, 1H), 7.78 (t, J = 8.4 Гц, 1H), 7.26-7.22 (m, 4H), 7.19-7.15 (m, 1H), 7.12-7.08 (m, 1H), 7.05 (d, J = 12.8 Гц, 1H), 6.96 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 6.73-6.63 (m, 1H), 6.31-6.26 (m, 1H), 5.76 (s, 1H), 4.56-4.51 (m, 2H), 4.02 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 3.95-3.91 (m, 2H), 3.76 (d, J = 6.0 Гц, 1H), 3.73 (d, J = 6.0 Гц, 1H), 3.69 (d, J = 5.6 Гц, 2H), 3.62-3.57 (m, 3H), 3.50-3.46 (m, 13H), 3.18-3.16 (m, 1H), 3.14-3.08 (m, 4H), 3.06-3.03 (m, 1H), 2.84-2.75 (m, 4H), 2.39 (t, J = 6.8 Гц, 3H), 2.35-2.31 (m, 1H), 2.24-2.21 (m, 1H), 2.20-2.18 (m, 1H), 2.17-2.12 (m, 4H), 2.10-2.07 (m, 1H), 2.06 (s, 2H), 2.01-1.99 (m, 1H), 1.86-1.81 (m, 2H), 1.55-1.47 (m, 5H), 1.40-1.38 (m, 1H), 1.37-1.34 (m, 1H), 1.33-1.28 (m, 6H), 1.27-1.22 (m, 5H), 1.08-1.02 (m, 7H), 0.93-0.78 (m, 19H), 0.76-0.67 (m, 3H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO_{d6}) δ -135.4 ppm.

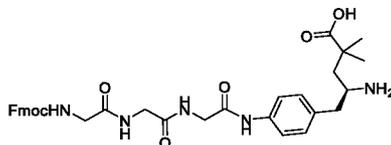
[00611] Синтез пептид-линкер-нагрузки **LP5** в соответствии с ФИГ. 13В.

[00612] **(4S)-5-[4-(2-аминоацетиамидо)фенил]-4-{{(трет-бутокси)карбонил}амино}-2,2-диметилпентановая кислота (TUP-9ba)**



[00613] К раствору **TUP-8ba** (0,80 г, 1,3 ммоль) в DMF (3 мл) добавили пиперидин (0,33 г, 3,9 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Fmoc по результатам ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-30% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)) и получили соединение **TUP-9ba** (0,50 г, выход 97%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 787 (2M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9.85 (s, 1H), 7.51 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 7.06 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 6.60 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 3.67-3.61 (m, 1H), 3.25 (s, 2H), 2.85-2.81 (m, 1H), 1.74-1.65 (m, 1H), 1.55-1.48 (m, 2H), 1.30 (s, 9H), 1.21 (s, 2H), 1.01 (s, 6H) ppm.

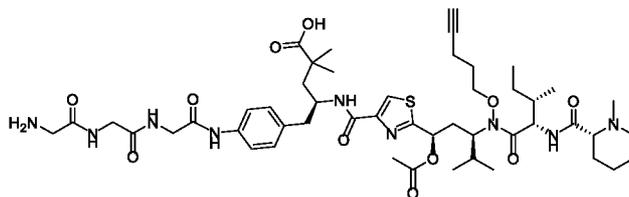
[00614] **(4S)-4-амино-5-(4-{2-[2-(2-{{(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил}амино}ацетиамидо)ацетиамидо]ацетиамидо}фенил)-2,2-диметилпентановая кислота (TUPm)**



[00615] К раствору Fmoc-Gly-Gly-OH (**L3-1e**) (0,25 г, 0,64 ммоль) в DCM (5 мл) добавили HOSu (0,16 г, 1,4 ммоль) и EDCI (0,27 г, 1,4 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством обращенно-фазовой хроматографии (0-40% ацетонитрил в воде), в результате чего получили эфир OSu (0,32 г, ИЭР м/з: 452 (M + H)⁺) в виде белого твердого вещества. В соответствии с Общей процедурой IX с использованием эфира OSu (0,32 г) и амина **TUP-9ba** (0,25 г, 0,64 ммоль) получили соединение **TUPm** (0,16 г, выход 35% из **TUP-9ba**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 630 (M + H)⁺.

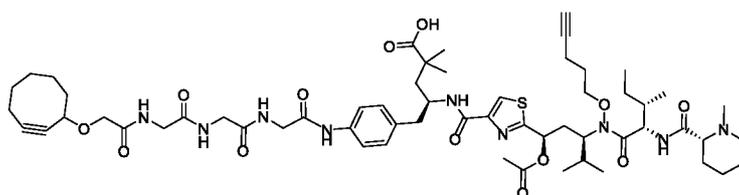
[00616] **(4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-{2-[2-(2-**

аминоацетида)ацетида)ацетида)фенил)-2,2-диметилпентановая кислота (L3-2e)



[00617] В соответствии с Общей процедурой VI из **3Ia** (90 мг, 0,15 ммоль) с **TUPm** получили соединение **Fmoc-L3-2e** (90 мг, ИЭР м/з: 610 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества. **Fmoc-L3-2e** растворили в DMF (3 мл). К раствору добавили пиперидин (25 мг, 0,30 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Fmoc по результатам ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-50% ацетонитрил в воде) и получили соединение **L3-2e** (50 мг, выход 33% из **3Ia**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 997 (M + H)⁺.

[00618] **LP5:** (4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-{4-[2-(2-{2-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетида)ацетида)ацетида)ацетида)фенил]-2,2-диметилпентановая кислота (LP5)

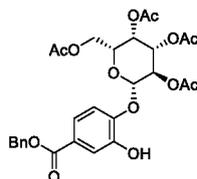


[00619] В соответствии с Общей процедурой IX с использованием амина **L3-2e** (50 мг, 50 ммоль) с эфиром OSu **L0-0d** (28 мг, 0,10 ммоль) получили линкер-нагрузку **LP5** (23 мг, выход 41%) в виде белого твердого вещества после очистки посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)). ИЭР м/з: 1161 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 9.70 (s, 1H), 8.30 (t, J = 4.8 Гц, 1H), 8.24 (t, J = 5.2 Гц, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.86 (t, J = 4.8 Гц, 1H), 7.76 (d, J = 9.6 Гц, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.48 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 7.11 (d, J = 7.6 Гц, 2H), 5.82 (d, J = 10.0 Гц, 1H), 4.76 (t, J = 8.4 Гц, 1H), 4.34-4.30 (m, 1H), 4.28-4.22 (m, 2H), 4.10-4.04 (m, 2H), 3.96-3.91 (m, 1H), 3.87-3.84 (m, 2H), 3.83-3.74 (m, 6H), 2.87-2.83 (m, 2H), 2.81-2.76 (m, 1H), 2.71-2.66 (m, 1H), 2.39-2.32 (m, 3H), 2.2-2.19 (m, 1H), 2.18-2.15 (s, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.00-1.90 (m, 4H), 1.87-

1.55 (m, 13H), 1.45-1.35 (m, 4H), 1.08-1.03 (m, 7H), 0.96 (d, $J = 6.0$ Гц, 3H), 0.90-0.81 (m, 11H) ppm.

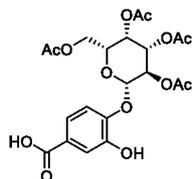
[00620] Синтез HOPAS-линкер-нагрузки **LP9** в соответствии с ФИГ. 14.

[00621] **Бензил 3-гидрокси-4-{{(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[(ацетилокси)метил]оксан-2-ил}окси}бензоат (L4-3)**



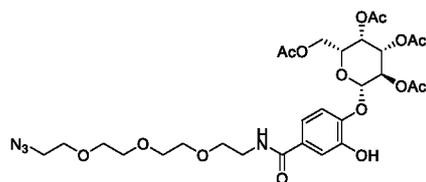
[00622] К раствору соединения **L4-1** (0,36 г, 1,0 ммоль) в ацетоне (5 мл) добавили соединение **L4-2** (CAS: 3068-32-4, 0,53 г, 1,3 ммоль) и вод. гидроксид натрия (1,1 М, 1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов под контролем ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo* и остаточный вод. раствор очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,01%)) и получили соединение **L4-3** (0,10 г, выход 17%) в виде бесцветного масла. ИЭР м/з: 592 (M + 18)⁺.

[00623] **3-гидрокси-4-{{(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[(ацетилокси)метил]оксан-2-ил}окси}бензойная кислота (L4-4)**



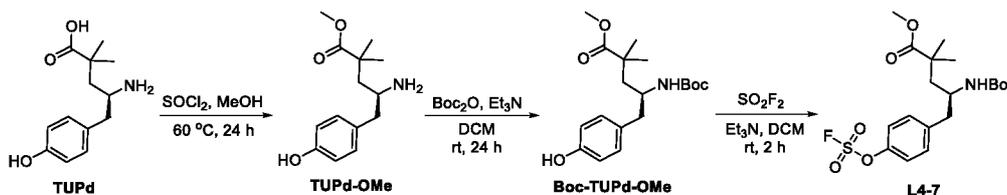
[00624] К раствору соединения **L4-3** (57 мг, 99 мкмоль) в THF (5 мл) добавили палладий на угле (содержащий 10% палладий, 6 мг, 10 мас.%) в атмосфере азота. Реакционную смесь продули водородом 3 раза, перемешивали при комнатной температуре в атмосфере водорода в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь отфильтровали через целит и фильтрат сконцентрировали *in vacuo*. Остаточное масло очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,01%)) и получили соединение **L4-4** (35 мг, выход 72%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 485 (M + H)⁺.

[00625] **[(2R,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-{4-[(2-{2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси}этил)карбамоил]-2-гидроксифенокси}оксан-2-ил]метил ацетат (L4-6)**



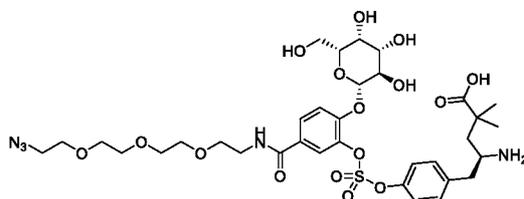
[00626] К раствору соединения **L4-4** (35 мг, 72 мкмоль) в DMF (1 мл) добавили HATU (16 мг, 72 мкмоль) и DIPEA (18 мг, 0,14 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут и затем добавили амин **L4-5** (16 мг, 72 мкмоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* TFA (0,01%)) и получили соединение **L4-6** (5,0 мг, выход 10%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 685 (M + H)⁺.

[00627] (Метил (4S)-4-{{(трет-бутокси)карбонил}амино}-5-{4-[(фторсульфонил)окси]фенил}-2,2-диметилпентаноат (**L4-7**)



[00628] К раствору **TUPd** (0,24 мг, 1,0 ммоль) в метаноле (3 мл) добавили тионилхлорид (24 мг). Реакционную смесь перемешивали при 60 °C в течение 24 часов под контролем ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo* и остаточное масло (0,26 г, ИЭР м/з: 296 (M + H)⁺) растворили в DCM (2 мл). К раствору добавили триэтиламин (0,22 г, 2,2 ммоль) и Boc₂O (0,44 г, 2,0 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов под контролем ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 mM)), в результате чего получили **Boc-TUPd-OMe** (0,26 г, ИЭР м/з: 352 (M + H)⁺) в виде бесцветного масла. **Boc-TUPd-OMe** растворили в DCM (20 мл). К раствору добавили триэтиламин (76 мг, 0,75 ммоль) и перемешиваемый раствор барботировали сульфурилфторидом (0,5-1,0 л) при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакцию контролировали посредством ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo*, в результате чего получили сырое соединение **L4-7** (0,26 г, выход 60% из **TUPd**) и применили на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 434 (M + H)⁺.

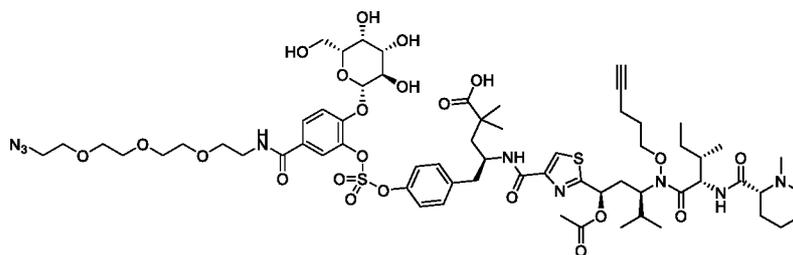
[00629] (4S)-4-амино-5-{4-[(5-[(2-{2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси)этил]карбамоил]-2-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)оксан-2-ил]окси}фенокси}сульфонил)окси]фенил}-2,2-диметилпентановая кислота (L4-8)



[00630] К раствору соединения **L4-6** (68 мг, 0,10 ммоль) в DCM (2 мл) добавили DBU (76 мг, 0,2 ммоль) и соединение **L4-7** (43 мг, 0,10 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 48 часов под контролем ЖХМС. Затем к реакционной смеси добавили метанол (2 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Летучие соединения удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* TFA (0,01%)), в результате чего получили бесцветное масло (40 мг, ИЭР м/з: 830 (M – Вос + H)⁺). Бесцветное масло растворили в этаноле (2 мл). К раствору добавили *вод.* гидроксид лития (2 мл, 66 mM) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. К полученной смеси добавили разбавленный *вод.* гидрохлорид (1 M) для коррекции pH до pH 7,0. Летучие соединения удалили *in vacuo* и остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* TFA (0,01%)), в результате чего получили **Вос-L4-8** (30 мг, ИЭР м/з: 816 (M – Вос + H)⁺). **Вос-L4-8** растворили в DCM (2 мл). К раствору добавили TFA (0,2 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаточное масло очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* TFA (0,01%)) и получили соединение **L4-8** (24 мг, выход 29% из **L4-6**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 816 (M + H)⁺.

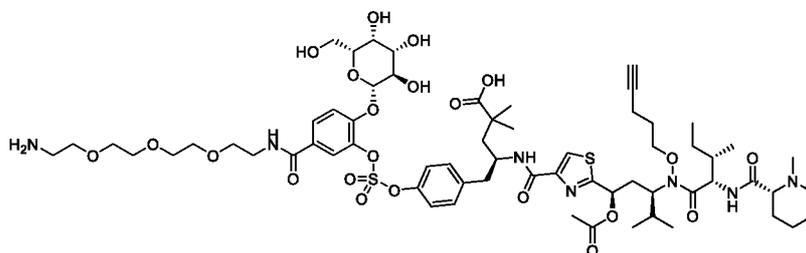
[00631] (4S)-4-((2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамино]-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил]формамино)-5-{4-[(5-[(2-{2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси)этил]карбамоил]-2-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-

**тригидрокси-6-(гидроксиметил)оксан-2-ил]окси} фенокси} сульфонилокси]фенил}-
2,2-диметилпентановая кислота (L4-9)**



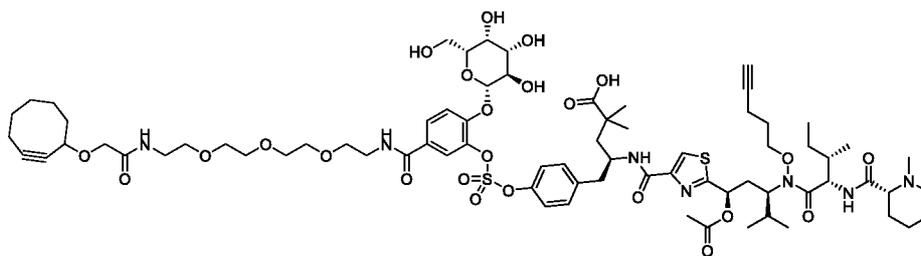
[00632] В соответствии с Общей процедурой VI из кислоты **3Ia** (15 мг, 25 мкмоль) с амином **L4-8** получили соединение **L4-9** (6,6 мг, выход 19% из **3Ia**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 703 (M/2 + H)⁺.

[00633] **(4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-{4-[(5-[(2-{{2-((2-аминоэтокси)этокси)этокси}этил)карбамоил]-2-{{(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)оксан-2-ил]окси} фенокси} сульфонилокси]фенил}-2,2-диметилпентановая кислота (L4-10)**



[00634] К раствору соединения **L4-9** (4,2 мг, 3,0 мкмоль) в DMF (1,0 мл) добавили трифенилфосфин (1,5 мг, 5,8 мкмоль) и каплю воды (~0,02 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов под контролем ЖХМС. Реакционную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. TFA (0,01%)) и получили соединение **L4-10** (3,0 мг, выход 73%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 691 (M/2 + H)⁺.

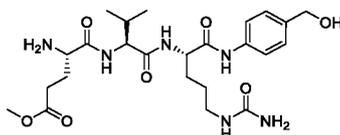
[00635] **LP9:** **(4S)-4-({2-[(1R,3R)-1-(ацетилокси)-4-метил-3-[(2S,3S)-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}-N-(пент-4-ин-1-илокси)пентанамидо]пентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-[4-({5-({2-[(2-((2-((циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиламино)этокси)этокси)этокси}этил)карбамоил]-2-{{(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)оксан-2-ил]окси} фенокси} сульфонилокси]фенил)-2,2-диметилпентановая кислота (LP9)**



[00636] В соответствии с Общей процедурой IX с использованием амина **L4-10** (20 мг, 15 мкмоль) с эфиром OSu **L0-0d** (6,0 мг, 21 мкмоль) получили линкер-нагрузку **LP9** (5,1 мг, выход 22%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 772 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 8.75 (s, 1H), 8.45 (s, 3H), 8.20 (s, 1H), 8.00-7.90 (m, 2H), 7.55-7.50 (m, 1H), 7.45-7.30 (m, 3H), 7.25-7.20 (m, 1H), 5.85-5.80 (m, 1H), 5.40-5.35 (m, 1H), 4.75-4.70 (m, 2H), 4.50-4.35 (m, 5H), 4.30-4.25 (m, 3H), 4.20-4.00 (m, 4H), 3.85-3.75 (m, 4H), 3.65-3.60 (m, 4H), 2.75-2.60 (m, 3H), 2.60-2.50 (m, 3H), 2.40-2.30 (m, 2H), 2.20-1.95 (m, 14H), 1.90-1.60 (m, 14H), 1.50-1.20 (m, 16H), 1.10-0.90 (m, 9H), 0.85-0.80 (m, 6H), 0.70-0.60 (m, 3H) ppm.

[00637] Синтез vsPAB-линкер-тубулизинов в соответствии с ФИГ. 15А.

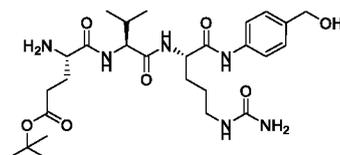
[00638] Метил (4S)-4-амино-4-{{(1S)-1-{{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутаноат (**L5-1b**)



[00639] К раствору Fmoc-Glu(OMe)-OH (0,30 г, 0,78 ммоль) в DMF (10 мл) добавили НАТУ (0,45 г, 1,2 ммоль) и DIPEA (0,30 г, 2,3 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут и затем добавили vsPAB (**L5-1a**) (0,30 г, 0,78 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь разбавили DCM (200 мл). Органический раствор промыли водой (100 мл) и рассолом (100 мл x 2), высушили над безводным сульфатом натрия и сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде) и получили соединение **Fmoc-L5-1b** (0,23 г, ИЭР м/з: 745 (M + H)⁺) в виде белого твердого вещества. К раствору **Fmoc-L5-1b** (0,15 г) в DMF (5 мл) добавили пиперидин (86 мг, 1,0 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Fmoc по результатам ЖХМС. Полученную смесь сразу очистили

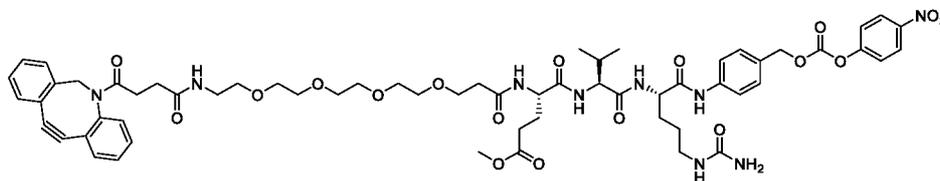
посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (0,05%)), в результате чего получили Glu(OMe)-vcPAB (**L5-1b**) (20 мг, выход 7%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 523 (M + H)⁺.

[00640] *трет*-бутил (4*S*)-4-амино-4-{{{(1*S*)-1-{{{(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутаноат (**L5-1c**)



[00641] В соответствии со схожей процедурой для **L5-1b**, за исключением использования Fmoc-Glu(OtBu)-OH вместо Fmoc-Glu(OMe)-OH, получили соединение **L5-1c** (0,12 г, выход 43% из vcPAB) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 565 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400МГц, DMSO_{d6}) δ 10.00 (s, 1H), 8.42 (d, *J* = 8.4 Гц, 1H), 8.31 (d, *J* = 7.2 Гц, 1H), 8.13 (br s, 3H), 7.54 (d, *J* = 8.4 Гц, 2H), 7.23 (d, *J* = 8.4 Гц, 2H), 8.03 (t, *J* = 5.6 Гц, 1H), 5.47 (s, 2H), 5.11 (br s, 1H), 4.45-4.42 (m, 3H), 4.26 (t, *J* = 7.6 Гц, 1H), 3.92-3.86 (m, 1H), 3.10-3.01 (m, 1H), 2.96-2.89 (m, 1H), 2.34-2.30 (m, 2H), 2.03-1.98 (m, 1H), 1.94-1.88 (m, 2H), 1.74-1.65 (m, 1H), 1.62-1.53 (m, 1H), 1.48-1.32 (m, 10H), 0.91 (d, *J* = 6.8 Гц, 3H), 0.88 (d, *J* = 6.8 Гц, 3H) ppm.

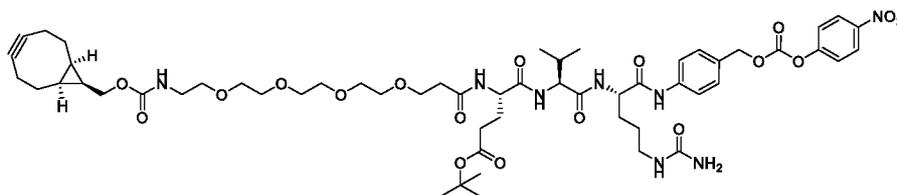
[00642] Метил (4*S*)-4-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-4-{{{(1*S*)-1-{{{(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[[4-{{(4-нитрофеноксикарбонил)окси]метил}фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутаноат (**L5-3b**)



[00643] В соответствии с Общей процедурой IX с использованием амина **L5-1b** (81 мг, 0,15 ммоль) с эфиром OSu **L0-1c** получили DIBAC-PEG4-Glu(OMe)-vcPAB (**L5-2b**) (94 мг, ИЭР м/з: 529.5 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества. Линкер vcPAB (20 мг) растворили в DMF (5 мл) и к раствору добавили бис(4-нитрофенил) карбонат (17 мг, 57 ммоль) и DIPEA (0,01 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь сразу очистили

посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (0,05%)), в результате чего получили **L5-3b** (24 мг, выход 61% из **L5-1b**) в виде желтого твердого вещества. ИЭР м/з: 612 (M/2 + H)⁺.

[00644] *трет*-бутил (4*S*)-4-[1-({эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси}карбонил)амино)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-4-{{(1*S*)-1-{{(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[(4-{{(4-нитрофеноксикарбонил)окси}метил}фенил)карбамоил]бутил}карбамоил}-2-метилпропил}карбамоил}бутаноат (**L5-3c**)

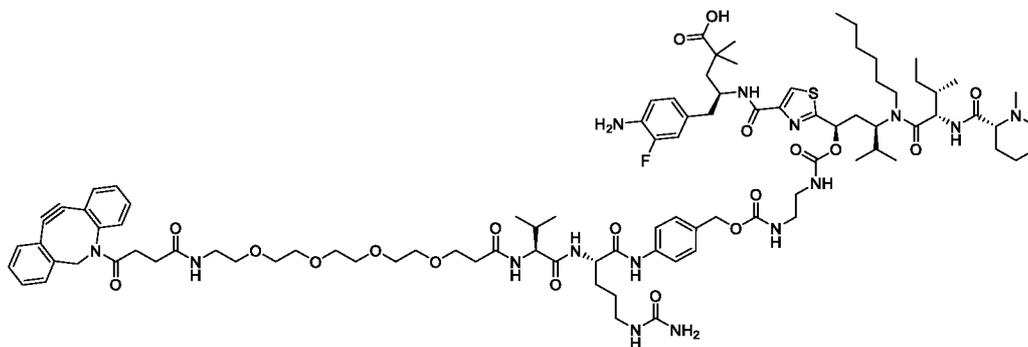


[00645] В соответствии с Общей процедурой IX с использованием амина **L5-1c** (25 мг, 45 ммоль) с **L0-1b** получили BСN-PEG₄-Glu(O^tBu)-Val-Cit-РАВ (**L5-2c**) (29 мг, ИЭР м/з: 989 (M + H)⁺) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* TFA (0,01%)). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 9.95 (s, 1H), 8.15 (d, *J* = 7.2 Гц, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.0 Гц, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.8 Гц, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.4 Гц, 2H), 7.23 (d, *J* = 8.4 Гц, 2H), 7.12 (t, *J* = 6.0 Гц, 1H), 6.00 (s, 1H), 5.44 (br s, 2H), 4.43 (s, 2H), 4.39-4.30 (m, 2H), 4.21-4.17 (m, 1H), 4.03 (d, *J* = 8.0 Гц, 2H), 3.62-3.56 (m, 2H), 3.49-3.46 (m, 12H), 3.39 (t, *J* = 5.6 Гц, 2H), 3.14-3.09 (m, 2H), 3.07-3.02 (m, 1H), 3.00-2.90 (m, 1H), 2.44-2.38 (m, 1H), 2.36-2.31 (m, 1H), 2.27-2.18 (m, 4H), 2.16-2.12 (m, 4H), 2.02-1.94 (m, 1H), 1.90-1.83 (m, 1H), 1.73-1.64 (m, 2H), 1.61-1.48 (m, 4H), 1.44-1.36 (m, 11H), 1.29-1.22 (m, 1H), 0.88-0.81 (m, 8H) ppm.

[00646] К раствору **L5-2c** (29 мг) в сухом DMF (3 мл) последовательно добавили НОВt (8,0 мг, 58 ммоль), DMAP (7,0 мг, 58 ммоль) и бис(4-нитрофенил) карбонат (18 мг, 58 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде), в результате чего получили **L5-3c** (17 мг, выход 33% из **L5-1c**) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 10.12 (s, 1H), 8.32 (d, *J* = 9.2 Гц, 2H), 8.19 (d, *J* = 6.8 Гц, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.0 Гц, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.0 Гц, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.8 Гц, 2H), 7.57 (d, *J* = 9.2 Гц, 2H), 7.41 (d, *J* = 8.8 Гц, 2H), 7.12 (t, *J* = 5.6 Гц, 1H), 6.00 (t, *J* = 5.2 Гц, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 4.42-4.30 (m, 2H), 4.22-4.18 (m, 1H), 4.03 (d, *J* = 8.0 Гц, 2H), 3.61-3.56 (m,

2H), 3.49-3.48 (m, 12H), 3.39 (t, $J = 6.0$ Гц, 2H), 3.13-3.09 (m, 2H), 3.06-3.02 (m, 1H), 2.98-2.91 (m, 1H), 2.46-2.38 (m, 1H), 2.35-2.31 (m, 1H), 2.23-2.12 (m, 8H), 2.02-1.95 (m, 1H), 1.91-1.83 (m, 1H), 1.73-1.65 (m, 2H), 1.61-1.42 (m, 4H), 1.38 (s, 9H), 1.28-1.19 (m, 2H), 0.87-0.81 (m, 8H) ppm.

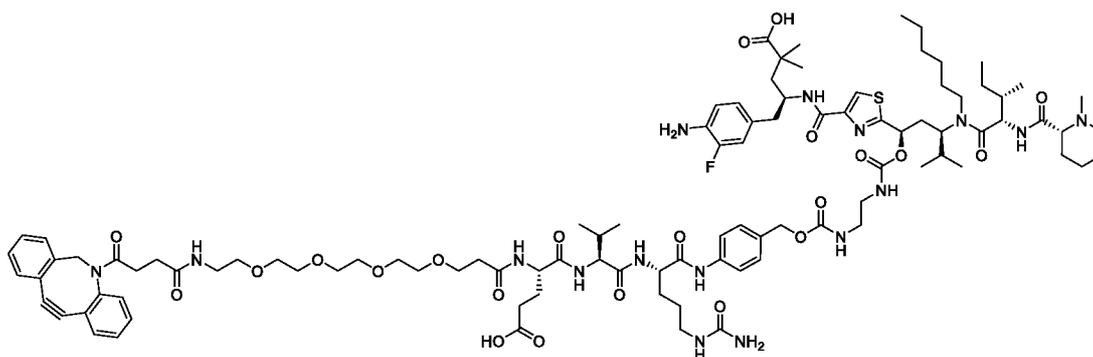
[00647] **LP15:** (4S)-5-(4-амино-3-фторфенил)-4-({2-[(1R,3R)-1-{{(2-[[{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}этил)карбамоил]окси}-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (LP15)



[00648] В соответствии с Общей процедурой X с использованием эфира PNP **L5-3a** с амином **P5** получили линкер-нагрузку **LP15** (6 мг с чистотой 95%; и 4 мг с чистотой 88%, выход 36%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 611 (M/3 + H)⁺, 915 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 12.18 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 8.19 (br s, 2H), 7.88 (d, $J = 8.0$ Гц, 1H), 7.77 (t, $J = 5.6$ Гц, 1H), 7.69-7.59 (m, 6H), 7.52-7.31 (m, 6H), 7.31-7.21 (m, 3H), 7.22-7.18 (m, 1H), 6.75 (d, $J = 12.8$ Гц, 1H), 6.68-6.61 (m, 2H), 5.99 (t, $J = 5.2$ Гц, 1H), 5.58-5.54 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.03 (d, $J = 14.0$ Гц, 1H), 4.95-4.93 (m, 4H), 4.48 (t, $J = 9.2$ Гц, 1H), 4.41-4.35 (m, 1H), 4.24-4.21 (m, 2H), 3.73 (br s, 1H), 3.63-3.56 (m, 3H), 3.48-3.45 (m, 14H), 3.30-3.28 (m, 2H), 3.09-2.91 (m, 9H), 2.85-2.81 (m, 1H), 2.62-2.54 (m, 3H), 2.48-2.44 (m, 1H), 2.40-2.13 (m, 3H), 2.08 (br s, 1H), 2.04 (s, 3H), 2.00-1.66 (m, 10H), 1.62-1.34 (m, 11H), 1.27-1.24 (m, 6H), 1.12 (d, $J = 6.8$ Гц, 1H), 1.07-1.06 (m, 6H), 0.95 (d, $J = 6.4$ Гц, 3H), 0.87-0.80 (m, 15H), 0.70 (br s, 3H) ppm.

[00649] **LP16:** (4S)-5-(4-амино-3-фторфенил)-4-({2-[(1R,3R)-1-{{(2-[[{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-

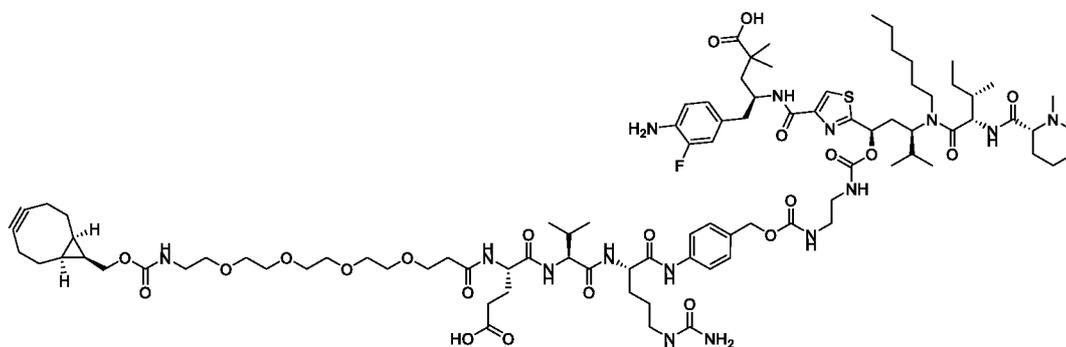
10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-4-карбоксібутаамидо]-3-метилбутаамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо[фенил}метокси)карбонил]амино}этил)карбамоил]окси}-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-[(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формаамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формаамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (LP16)



[00650] В соответствии с Общей процедурой X с использованием эфира PNP **L5-3b** с амином **P5** (10 мг, 12 ммоль) получили раствор линкер-нагрузки **LP16-OMe** (ИЭР м/з: 658 (M/3 + H)⁺) в DMF. К этому раствору добавили метанол (5 мл) и *вод.* гидроксид лития (3,0 мл, 10 mM). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи под контролем ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 mM)), в результате чего получили линкер-нагрузку **LP16** (4,0 мг, выход 10% из **P5**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 653 (M/3 + H)⁺, 980 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, метанол-*d*₄) δ 7.95 (s, 1H), 7.54-7.52 (m, 3H), 7.49-7.47 (m, 1H), 7.36-7.33 (m, 3H), 7.27-7.19 (m, 4H), 7.15-7.13 (m, 1H), 7.72 (d, *J* = 12.4 Гц, 1H), 6.68-6.60 (m, 2H), 5.53-5.50 (m, 1H), 5.02 (d, *J* = 14.4 Гц, 2H), 4.92 (s, 2H), 4.55 (d, *J* = 10.8 Гц, 1H), 4.47 (br s, 9H), 4.33-3.44 (m, 13H), 3.32-3.30 (m, 1H), 3.14-3.03 (m, 10H), 2.60-2.56 (m, 2H), 2.37-2.24 (m, 8H), 2.10-2.03 (m, 2H), 1.98-1.80 (m, 8H), 1.70-1.63 (m, 2H), 1.59-1.46 (m, 7H), 1.30-1.21 (m, 7H), 1.18 (s, 2H), 1.10-1.00 (m, 7H), 0.91-0.87 (m, 13H), 0.81-0.74 (m, 12H) ppm.

[00651] **LP17:** (4*S*)-5-(4-амино-3-фторфенил)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-[(2-[(4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-({эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси]карбонил}амино)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-4-карбоксібутаамидо]-3-метилбутаамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо[фенил}метокси)карбонил]амино}этил)карбамоил]

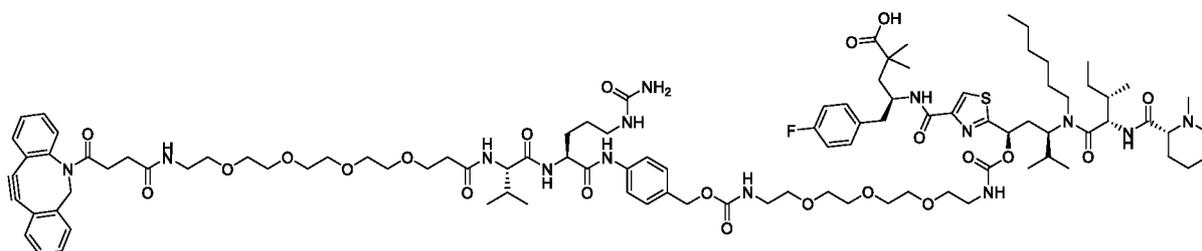
окси}-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-[[*(2R)*-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо]пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (LP17)



[00652] В соответствии с Общей процедурой X с использованием эфира PNP **L5-3c** с амином **P5** (13 мг, 11 ммоль) получили линкер-нагрузку **LP17-O'Bu** (10 мг, ИЭР м/з: 953 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества после очистки посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде). К раствору **LP17-O'Bu** (7,0 мг, 3,7 ммоль) в THF (1,8 мл) добавили *вод.* гидроксид лития (0,6 мл, 2 М). Смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи под контролем ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* для удаления THF и остаточную водную смесь нейтрализовали *вод.* TFA (2 М) до pH 7,0 при 0 °С. Смесь очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (10 мМ)), в результате чего получили линкер-нагрузку **LP17** (2,0 мг, выход 14% из **P5**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 925 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 10.06 (s, 1H), 8.24-8.21 (m, 1H), 8.13-8.09 (m, 2H), 7.75 (d, *J* = 8.4 Гц, 1H), 7.66 (t, *J* = 5.6 Гц, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.4 Гц, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.4 Гц, 2H), 7.25-7.21 (m, 1H), 7.14-7.11 (m, 1H), 6.75 (d, *J* = 12.0 Гц, 1H), 6.68-6.60 (m, 2H), 8.05-5.98 (m, 1H), 5.59-5.53 (m, 1H), 5.46 (s, 2H), 5.02-4.90 (m, 4H), 4.50-4.44 (m, 1H), 4.37-4.31 (m, 2H), 4.24-4.17 (m, 2H), 4.03 (d, *J* = 8.0 Гц, 2H), 3.77-3.69 (m, 1H), 3.61-3.56 (m, 2H), 3.49-3.47 (m, 12H), 3.13-3.02 (m, 10H), 2.86-2.82 (m, 1H), 2.61-2.59 (m, 1H), 2.44-2.29 (m, 2H), 2.25-2.08 (m, 12H), 2.03-1.94 (m, 3H), 1.93-1.82 (m, 5H), 1.73-1.36 (m, 17H), 1.33-1.23 (m, 12H), 1.18-1.06 (m, 7H), 0.95 (d, *J* = 6.0 Гц, 3H), 0.85-0.78 (m, 17H), 0.72-0.64 (m, 3H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO-*d*₆) δ -135 ppm.

[00653] **LP20:** (4*S*)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-{{(2-[[2-((4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0⁴,⁹]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]амино}этокси)этокси]эт

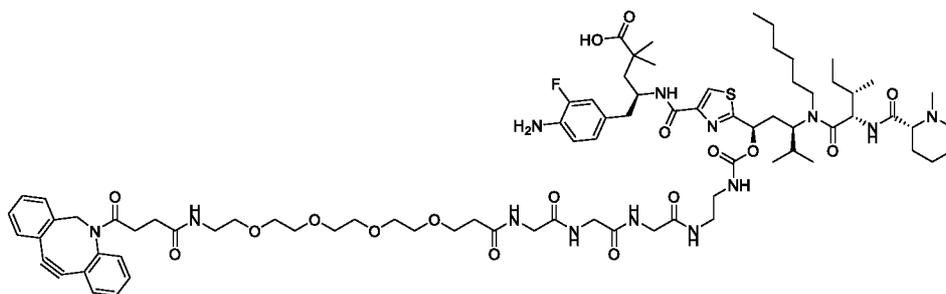
окси}этил)карбамоил]окси}-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-фторфенил)-2,2-диметилпентановая кислота (LP20)



[00654] В соответствии с Общей процедурой X с использованием эфира PNP **L5-3a** с амином **P11** (11 мг, 9,8 ммоль, соль TFA) получили линкер-нагрузку **LP20** (10 мг, выход 52%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 649 (M/3 + H)⁺, 974 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) δ 10.02 (s, 1H), 8.17-8.16 (m, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.90 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 7.77 (t, J = 5.6 Гц, 1H), 7.69-7.67 (m, 2H), 7.63-7.55 (m, 4H), 7.52-7.45 (m, 3H), 7.40-7.32 (m, 2H), 7.31-7.26 (m, 3H), 7.23-7.17 (m, 3H), 7.06 (t, J = 8.8 Гц, 2H), 6.02-5.99 (m, 1H), 5.58-5.54 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.33 (t, J = 4.8 Гц, 1H), 5.03 (d, J = 14.0 Гц, 1H), 4.98-4.93 (br s, 2H), 4.48 (t, J = 9.6 Гц, 1H), 4.41-4.35 (m, 1H), 4.31-4.21 (m, 2H), 3.63-3.57 (m, 3H), 3.50-3.45 (m, 22H), 3.30-3.28 (m, 1H), 3.15-3.07 (m, 4H), 3.01-2.92 (m, 3H), 2.85-2.74 (m, 3H), 2.60-2.55 (m, 1H), 2.46-2.33 (m, 2H), 2.26-2.20 (m, 1H), 2.16-2.12 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.03-1.94 (m, 5H), 1.88-1.84 (m, 2H), 1.80-1.72 (m, 2H), 1.69-1.65 (m, 2H), 1.60-1.57 (m, 3H), 1.51-1.44 (m, 3H), 1.40-1.33 (m, 2H), 1.28-1.23 (m, 15H), 1.16-1.11 (m, 2H), 1.07 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 0.95 (d, J = 6.4 Гц, 3H), 0.87-0.79 (m, 16H), 0.71 (br s, 3H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO_{d6}) δ -117 ppm.

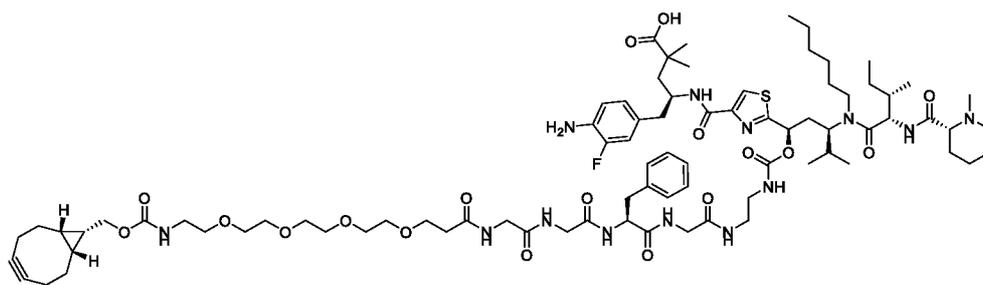
[00655] Синтез линкер-тубулизина посредством карбаматов в соответствии с ФИГ. 15B.

[00656] **LP18**: (4*S*)-5-(4-амино-3-фторфенил)-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-[(2-[[2-(2-[[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0⁴,⁹]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)ацетамидо]этил}карбамоил]окси]-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (LP18)



[00657] В соответствии с Общей процедурой IX с использованием эфира OSu **L0-1c** (1,0 г, 1,5 ммоль) с H-Gly-Gly-Gly-OH получили сырой линкер DIBAC-PEG4-Gly-Gly-Gly-OH (0,90 г, ИЭР м/з: 734 (M + H)⁺) в виде белого твердого вещества, которое использовали на следующем этапе без дальнейшей очистки. К раствору линкера (10 мг) в сухом DCM (5,0 мл) добавили пентафторфенол (5,1 мг, 28 ммоль) и DIC (5,2 мг, 41 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа под контролем ЖХМС. Летучие соединения удалили *in vacuo*, в результате чего получили сырой сложный эфир **L6-1a** (16 мг, ИЭР м/з: 890 (M + H)⁺), который добавили к смеси **P5** (7,0 мг, 7,9 ммоль) и DIPEA (3,1 мг, 24 ммоль) в DCM (5,0 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение получаса под контролем ЖХМС. Полученную смесь сконцентрировали *in vacuo* и остаток очистили посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 мМ)), в результате чего получили линкер-нагрузку **LP18** (10 мг, выход 79% из **P5**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 798 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, метанол-d₄) δ 7.98 (s, 1H), 7.54 (d, J = 6.8 Гц, 1H), 7.50-7.48 (m, 1H), 7.37-7.34 (m, 3H), 7.27-7.20 (m, 2H), 7.15-7.13 (m, 1H), 6.74-6.60 (m, 3H), 5.55 (d, J = 12.4 Гц, 1H), 5.03 (d, J = 14.0 Гц, 1H), 4.57-4.45 (m, 6H), 4.22 (br s, 1H), 3.80-3.75 (m, 5H), 3.65-3.58 (m, 3H), 3.49 (s, 8H), 3.45-3.43 (m, 2H), 3.34-3.30 (m, 2H), 3.16-3.08 (m, 4H), 2.88-2.86 (m, 1H), 2.67-2.55 (m, 4H), 2.42 (t, J = 6.0 Гц, 2H), 2.29-2.22 (m, 1H), 2.17-2.03 (m, 6H), 1.94-1.83 (m, 4H), 1.74-1.70 (m, 2H), 1.60-1.42 (m, 7H), 1.26-1.23 (m, 9H), 1.18-1.15 (m, 2H), 1.05 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.92-0.87 (m, 6H), 0.82-0.79 (m, 7H), 0.74-0.70 (m, 3H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO-d₆) δ -137 ppm.

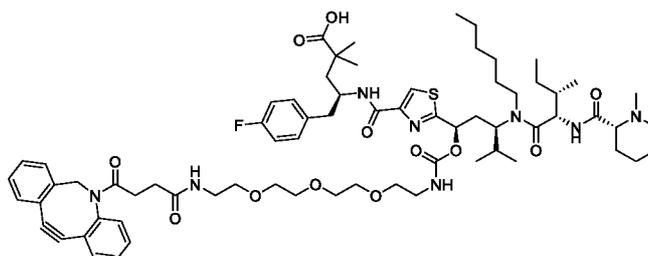
[00658] **LP19**: (4S)-5-(4-амино-3-фторфенил)-4-({2-[(1R,3R)-1-{{2-{{2-[(2S)-2-(2-{{2-[[1-{{эндо-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси}карбонил}амино)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]ацетамидо}ацетамидо)-3-фенилпропанамидо]ацетамидо}этил)карбамоил]окси}-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (LP19)



[00659] В соответствии со схожей процедурой для **LP18**, за исключением того, что начали с эфира OSu **L0-1b** вместо **L0-1c**, получили линкер-нагрузку **LP19** (12 мг, соль TFA, выход 40% из **P5**) в виде белого твердого вещества после очистки посредством преп-ВЭЖХ (0-100% ацетонитрил в *вод.* TFA (0,01%)). ИЭР m/z : 816 ($M/2 + H$)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 8.36 (s, 1H), 8.32-8.27 (m, 1H), 8.23-8.19 (m, 1H), 8.17-8.13 (m, 2H), 8.10-8.04 (m, 1H), 7.83-7.79 (m, 1H), 7.78-7.69 (m, 1H), 7.66-7.61 (m, 1H), 7.53-7.42 (m, 1H), 7.28-7.24 (m, 4H), 7.21-7.17 (m, 1H), 7.12 (t, $J = 2.4$ Гц, 1H), 6.75 (d, $J = 12.0$ Гц, 1H), 6.68-6.60 (m, 2H), 5.59-5.54 (m, 1H), 4.94 (s, 2H), 4.53-4.45 (m, 2H), 4.27-4.18 (m, 1H), 4.03 (d, $J = 8.0$ Гц, 2H), 3.79-3.68 (m, 7H), 3.62-3.58 (m, 4H), 3.49-3.47 (m, 14H), 3.15-3.10 (m, 3H), 3.09-3.05 (m, 4H), 2.84-2.78 (m, 2H), 2.61-2.60 (m, 2H), 2.40 (d, $J = 6.4$ Гц, 2H), 2.26-2.15 (m, 8H), 2.07 (s, 3H), 1.98-1.76 (m, 5H), 1.67-1.45 (m, 8H), 1.38-1.34 (m, 2H), 1.28-1.24 (m, 8H), 1.17-1.10 (m, 1H), 1.06 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 0.94 (d, $J = 5.6$ Гц, 3H), 0.85-0.79 (m, 11H), 0.69-0.65 (m, 3H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO-*d*₆) δ -135 (Ar-F), -73.0 (CF₃CO₂H) ppm.

[00660] Синтез линкер-тубулизина **LP21** в соответствии с ФИГ. 15С.

[00661] **LP21**: (4S)-4-((2-[(1R,3R)-1-({2-(2-{2-[2-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)этокси]этокси}этокси)этил]карбамоил}окси)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-5-(4-фторфенил)-2,2-диметилпентановая кислота (**LP21**)

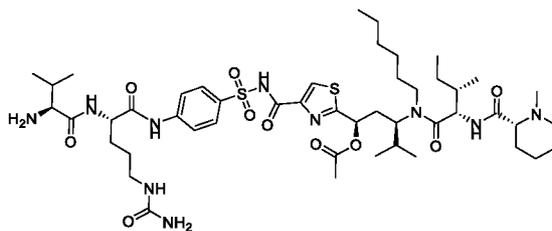


[00662] В соответствии с Общей процедурой IX с использованием амина **P11** (5,0 мг, 4,9 мкмоль) с эфиром OSu **L0-0c** (2,0 мг, 4,9 мкмоль) получили соединение **LP21** (1,1

мг, выход 17%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 647 (M/2 + H). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{д6}) δ 8.13 (s, 1H), 7.76 (t, J = 5.6 Гц, 1H), 7.69-7.67 (m, 1H), 7.64-7.61 (m, 1H), 7.56 (t, J = 6.0 Гц, 1H), 7.52-7.45 (m, 3H), 7.38-7.34 (m, 2H), 7.30-7.28 (m, 1H), 7.21-7.17 (m, 2H), 7.07 (t, J = 9.2 Гц, 2H), 5.58-5.54 (m, 1H), 5.03 (d, J = 13.6 Гц, 1H), 4.48 (t, J = 9.2 Гц, 1H), 4.28 (br s, 1H), 3.74-3.67 (m, 1H), 3.61 (d, J = 13.6 Гц, 1H), 3.49-3.43 (m, 10H), 3.11-3.07 (m, 4H), 3.00-2.92 (m, 2H), 2.86-2.76 (m, 3H), 2.62-2.56 (m, 1H), 2.28-2.11 (m, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.03-1.95 (m, 2H), 1.91-1.85 (m, 2H), 1.80-1.70 (m, 3H), 1.63-1.49 (m, 5H), 1.41-1.24 (m, 15H), 1.07 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 0.95 (d, J = 6.4 Гц, 3H), 0.88-0.79 (m, 10H), 0.70 (br s, 3H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO_{д6}) δ -117 ppm.

[00663] Синтез линкер-N-ацилсульфонамид-тубулизинов в соответствии с ФИГ. 16.

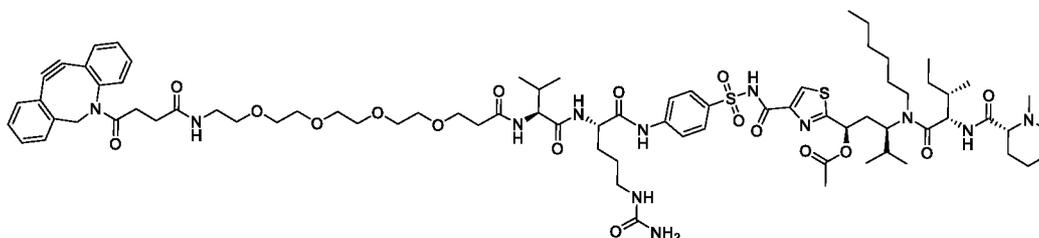
[00664] **(1R,3R)-1-[4-({4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]бензолсульфонил}карбамоил)-1,3-тиазол-2-ил]-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-[(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо]пентанамидо]-4-метилпентил ацетат (L7-1a)**



[00665] К раствору Fmoc-Val-Cit-OH (49 мг, 98 ммоль) в DMF (0,5 мл) и DCM (4 мл) добавили HOAt (14 мг, 98 ммоль) и EDCI (19 мг, 98 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут и затем добавили нагрузку **P43** (25 мг, 33 ммоль) и хлорид меди(II) (17 мг, 98 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 55 часов под контролем ЖХМС. Полученную смесь отфильтровали и фильтрат сконцентрировали *in vacuo*. Остаток очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-30% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 mM)) и получили соединение **Fmoc-L7-1a** (20 мг, ИЭР м/з: 621 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества. **Fmoc-L7-1a** растворили в DMF (1 мл). К раствору добавили пиперидин (6,0 мг, 64 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Fmoc по результатам ЖХМС. Полученную смесь очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (5-50% ацетонитрил в вод. бикарбонате аммония (10 mM)), в результате чего получили **L7-1a** (9,0 мг, выход 27% из **P43**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 510 (M/2 + H)⁺.

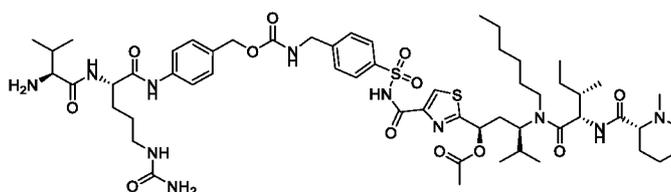
[00666] **LP22:**

(1*R*,3*R*)-1-[4-({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0⁴,⁹]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]бензолсульфонил}карбамоил)-1,3-тиазол-2-ил]-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил ацетат (LP22)



[00667] В соответствии с Общей процедурой IX с использованием амина **L7-1a** (9,0 мг, 8,8 ммоль) с эфиром OSu **L0-1c** получили линкер-нагрузку **LP22** (1,1 мг, выход 8%) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 777 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO_{d6}) δ 10.10 (s, 1H), 8.15-8.13 (d, J = 7.6 Гц, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.87-7.85 (d, J = 7.6 Гц, 1H), 7.78-7.72 (m, 4H), 7.71-7.56 (m, 5H), 7.52-7.44 (m, 3H), 7.40-7.28 (m, 3H), 6.00-5.95 (m, 1H), 5.54-5.51 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.03 (d, J = 14.0 Гц, 1H), 4.54-4.47 (m, 1H), 4.44-4.36 (m, 1H), 4.26-4.21 (t, J = 8.0 Гц, 2H), 3.65 (s, 1H), 3.61-3.57 (m, 3H), 3.50-3.33 (m, 13H), 3.11-3.05 (m, 2H), 3.03-3.00 (m, 1H), 2.96-2.91 (m, 1H), 2.60-2.55 (m, 1H), 2.35-2.32 (m, 2H), 2.28-2.20 (m, 2H), 2.06 (s, 3H), 2.03-1.95 (m, 5H), 1.81-1.75 (m, 1H), 1.75-1.65 (m, 4H), 1.62-1.55 (m, 2H), 1.48-1.38 (m, 6H), 1.30-1.28 (m, 5H), 1.21-1.25 (m, 6H), 0.93-0.91 (d, J = 6.8 Гц, 3H), 0.88-0.78 (m, 23H) ppm.

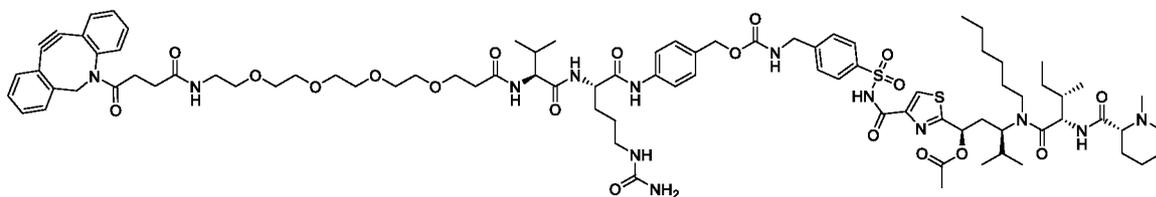
[00668] (1*R*,3*R*)-1-(4-{4-({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил}амино}метил)бензолсульфонил}карбамоил}-1,3-тиазол-2-ил)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил ацетат (**L7-1b**)



[00669] В соответствии с Общей процедурой X с использованием Вос-vcPAB-PNP (**L1-1e**) с амином **P42** получили соединение **Вос-L7-1b** (15 мг, ИЭР м/з: 642 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества. **Вос-L7-1b** растворили в DCM (4,5 мл). К раствору добавили TFA (0,5 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2

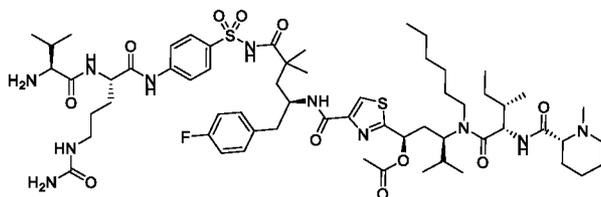
часов до полного удаления Вос по результатам ЖХМС. Полученный раствор сконцентрировали *in vacuo*, в результате чего получили сырое соединение **L7-1b** (15 мг, загрязненное **P42**). Сырое соединение **L7-1b** применили на следующем этапе без дальнейшей очистки. ИЭР м/з: 592 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) от **Вос-L7-1b** (ротамеры): δ 10.08 (s, 0.5H), 9.91 (s, 0.5H), 8.24 (d, J = 7.6 Гц, 0.5H), 8.11 (dd, J = 6.8 и 1.2 Гц, 1H), 7.99 (d, J = 7.6 Гц, 0.5H), 7.91 (s, 1H), 7.84-7.80 (m, 1H), 7.74 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 7.64-7.57 (m, 2H), 7.30 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 7.23 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 6.80-6.75 (m, 1H), 6.00-5.95 (m, 1H), 5.89-5.81 (m, 1H), 5.58-5.52 (m, 1H), 5.41 (s, 2H), 4.97 (s, 2H), 4.49 (t, J = 9.6 Гц, 1H), 4.48-4.37 (m, 1H), 4.20 (d, J = 5.6 Гц, 2H), 4.01-3.94 (m, 1H), 3.85-3.81 (m, 1H), 3.03-2.93 (m, 7H), 2.33-2.32 (m, 3H), 2.23-2.18 (m, 2H), 2.06 (s, 3H), 1.98-1.83 (m, 3H), 1.74-1.44 (m, 7H), 1.39-1.36 (m, 10H), 1.29 (s, 6H), 1.24 (s, 2H), 1.12-1.05 (m, 1H), 1.00-0.95 (m, 2H), 0.93 (d, J = 6.4 Гц, 3H), 0.86-0.79 (m, 16H), 0.74-0.68 (m, 3H) ppm.

[00670] **LP23:** (1R,3R)-1-(4-{{4-({4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0⁴,⁹]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]амино}метил)бензолсулффонил]карбамоил}-1,3-тиазол-2-ил)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формаидо}пентанамидо]-4-метилпентил ацетат (**LP23**)



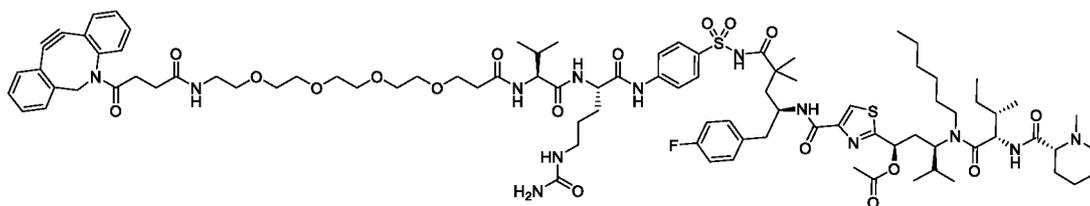
[00671] В соответствии с Общей процедурой IX с использованием амина **L7-1b** с эфиром OSu **L0-1c** получили линкер-нагрузку **LP23** (2 мг, выход 13% из **P42**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 573 (M/3 + H)⁺, 859 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{d6}) (ротамеры) δ 10.00 (s, 0.3H), 9.92 (s, 0.7H), 8.40 (d, J = 8.0 Гц, 0.7H), 8.13 (d, J = 6.8 Гц, 0.3H), 8.00-7.82 (m, 3H), 7.78-7.74 (m, 3H), 7.69-7.58 (m, 4H), 7.52-7.43 (m, 3H), 7.40-7.29 (m, 5H), 7.23(d, J = 8.0 Гц, 2H), 6.00-5.96 (m, 1H), 5.53 (d, J = 12.8 Гц, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.03 (d, J = 13.6 Гц, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.51 (t, J = 10.0 Гц, 1H), 4.41-4.35 (m, 1H), 4.24-4.16 (m, 3H), 3.63-3.57 (m, 4H), 3.48-3.41 (m, 14H), 3.29-3.27 (m, 1H), 3.09-2.91 (m, 7H), 2.62-2.56 (m, 1H), 2.50-2.44 (m, 1H), 2.40-2.32 (m, 2H), 2.28-2.20 (m, 4H), 2.11 (s, 3H), 2.06-1.88 (m, 5H), 1.80-1.55 (m, 8H), 1.44-1.39 (m, 5H), 1.29-1.24 (m, 11H), 1.12-1.05 (m, 1H), 0.93 (d, J = 6.4 Гц, 3H), 0.88-0.78 (m, 17H) ppm.

[00672] (1*R*,3*R*)-1-(4-{{(2*S*)-4-({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]бензолсульфонил}карбамоил)-1-(4-фторфенил)-4,4-диметилбутан-2-ил}карбамоил}-1,3-тиазол-2-ил)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил ацетат (L7-1c)



[00673] В соответствии со схожей процедурой для L7-1a, за исключением использования P47 (40 мг, 41 ммоль) вместо P43, получили соединение L7-1c (2,1 мг, выход 4,2% из P47) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 621 (M/2 + H)⁺.

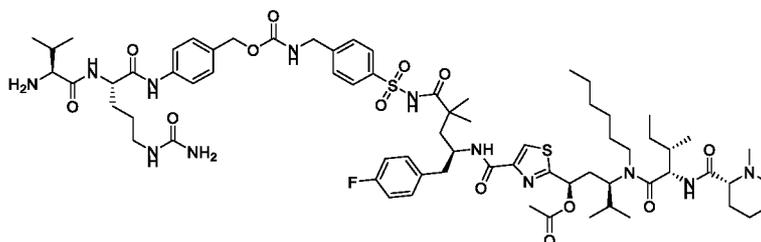
[00674] **LP24:** (1*R*,3*R*)-1-(4-{{(2*S*)-4-({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0⁴,⁹]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]бензолсульфонил}карбамоил)-1-(4-фторфенил)-4,4-диметилбутан-2-ил}карбамоил}-1,3-тиазол-2-ил)-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-{{(2*R*)-1-метилпиперидин-2-ил}формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил ацетат (LP24)



[00675] В соответствии с Общей процедурой IX с использованием амина L7-1c (2,1 мг, 1,7 ммоль) с эфиром OSu L0-1c получили линкер-нагрузку LP24 (1,2 мг, выход 40%) в виде белого твердого вещества. ИЭР: 888 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 10.11 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.15-8.13 (m, 1H), 7.87-7.83 (m, 2H), 7.76-7.73 (m, 2H), 7.69-7.66 (m, 3H), 7.63-7.61 (m, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.51-7.45 (m, 4H), 7.39-7.34 (m, 2H), 7.32-7.28 (m, 1H), 7.18-7.10 (m, 2H), 7.02-6.97 (m, 2H), 5.99-5.98 (m, 1H), 5.63-5.59 (m, 1H), 5.41 (m, 2H), 5.34-5.31 (m, 1H), 5.05-5.01 (m, 1H), 4.51-4.46 (m, 1H), 4.41-4.37 (m, 2H), 4.26-4.23 (m, 2H), 4.11-4.06 (m, 2H), 3.62 (m, 1H), 3.61-3.59 (m, 3H), 3.47 (m, 13H), 3.09-3.07 (m, 1H), 3.02-2.94 (m, 2H), 2.72-2.66 (m, 2H), 2.40-2.37 (m, 2H), 2.35-2.31 (m, 2H), 2.27-2.20 (m, 4H), 2.10 (s, 4H), 2.03-1.95 (m, 8H), 1.89-1.84 (m, 2H), 1.80-1.71 (m,

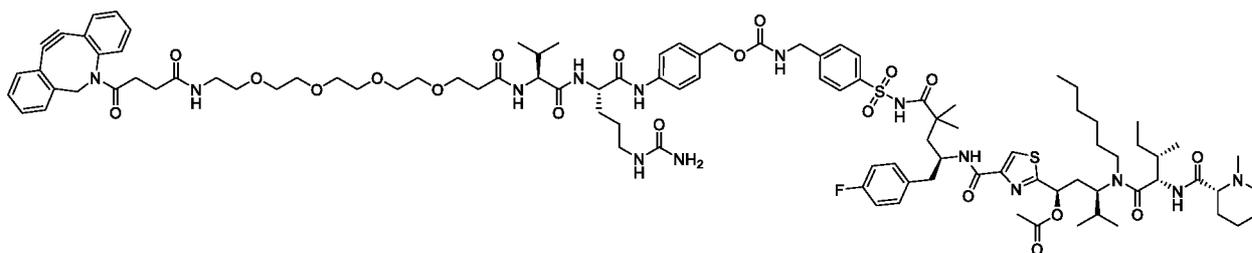
3H), 1.48-1.44 (m, 4H), 1.24 (m, 3H), 0.96-0.85 (m, 12H), 0.84-0.81 (m, 21H), 0.70-0.68 (m, 4H) ppm.

[00676] **(1R,3R)-1-(4-{{(2S)-4-{{[4-({{4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}метил}бензолсульфонил]карбамоил}-1-(4-фторфенил)-4,4-диметилбутан-2-ил]карбамоил}-1,3-тиазол-2-ил)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил ацетат (L7-1d)**



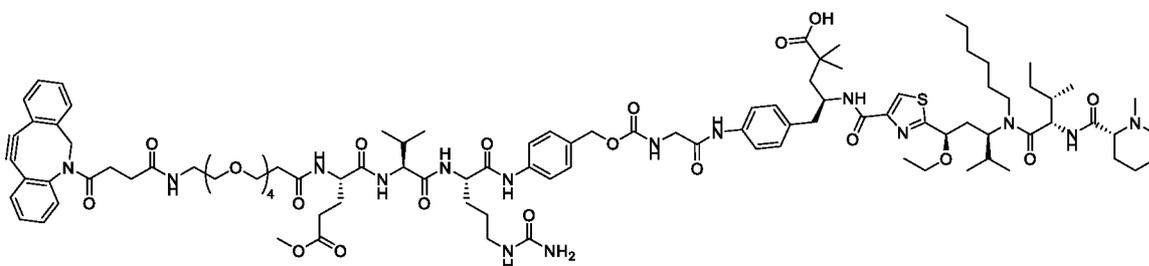
[00677] В соответствии с Общей процедурой X с использованием Fmoc-vcPAB-PNP (**L1-1a**) с амином **P46** (65 мг, 65 ммоль) получили соединение **Fmoc-L7-1d** (76 мг, ИЭР м/з: 813 (M/2 + H)⁺) в виде белого твердого вещества. **Fmoc-L7-1d** растворили в DMF (5 мл). К раствору добавили пиперидин (0,4 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение получаса под контролем ЖХМС. Реакционную смесь очистили сразу посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в воде), в результате чего получили **L7-1d** (50 мг, загрязнение 5% **P46**, выход 54% из **P46**) в виде белого твердого вещества. ИЭР м/з: 702 (M + H)⁺.

[00678] **LP25:** **(1R,3R)-1-(4-{{(2S)-4-{{[4-({{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]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]амино}метил}бензолсульфонил]карбамоил}-1-(4-фторфенил)-4,4-диметилбутан-2-ил]карбамоил}-1,3-тиазол-2-ил)-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил ацетат (LP25)**



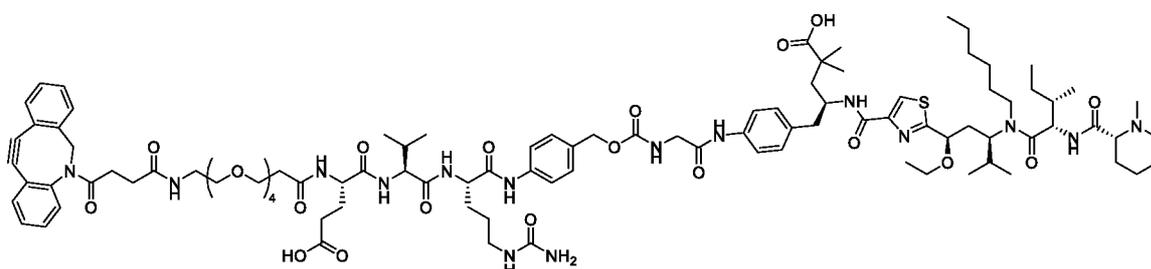
[00679] В соответствии с Общей процедурой IX с использованием амина **L7-1d** (40 мг, 29 ммоль) с эфиром OSu **L0-1d** получили линкер-нагрузку **LP25** (23 мг, выход 48%) в виде белого твердого вещества. ИЭР $m/z = 647 (M/3 + H)^+$. 1H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.02 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.15 (d, $J = 8.0$ Гц, 1H), 7.91-7.78 (m, 4H), 7.69-7.59 (m, 6H), 7.51-7.43 (m, 3H), 7.40-7.29 (m, 5H), 7.22 (br s, 2H), 7.15-7.12 (m, 2H), 7.05-7.00 (m, 2H), 6.01 (t, $J = 8.0$ Гц, 1H), 5.60 (d, $J = 12.0$ Гц, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.02 (t, $J = 12.0$ Гц, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.50 (t, $J = 12.0$ Гц, 1H), 4.38 (d, $J = 4.0$ Гц, 1H), 4.25-4.18 (m, 3H), 4.10-4.07 (m, 1H), 3.63-3.56 (m, 4H), 3.49-3.45 (m, 14H), 3.31-3.28 (m, 1H), 3.09-2.91 (m, 7H), 2.72-2.71 (m, 2H), 2.62-2.54 (m, 2H), 2.40-2.20 (m, 6H), 2.11 (s, 3H), 2.03-1.91 (m, 6H), 1.79-1.65 (m, 7H), 1.57-1.35 (m, 8H), 1.26-1.23 (m, 9H), 1.11-1.08 (m, 1H), 0.97-0.95 (m, 8H), 0.87-0.80 (m, 16H), 0.70 (br s, 3H) ppm. ^{19}F ЯМР (376 МГц, $DMSO_{d6}$) δ -117 ppm.

[00680] **LP26-1**: (4*S*)-5-[4-(2-[[[4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-5-метокси-5-оксопентанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}ацетамидо)фенил]-4-({2-[(1*R*,3*R*)-1-этокси-3-[(2*S*,3*S*)-*N*-гексил-3-метил-2-[[2(*R*)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (**LP26-1**)



В соответствии с Общей процедурой X, начиная с **P31** (33 мг, 38 мкмоль) с **L5-1b** (46 мг, 38 мкмоль), получили **LP26-1** (55 мг, выход 74%) в виде белого твердого вещества. ИЭР $m/z: 976.2 (M/2 + H)^+$.

[00681] **LP26:** (4S)-5-[4-(2-{{(4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2- (4S)-5-[4-(2-{{(4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-4-карбоксибутанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метокси)карбонил]амино}ацетамидо)фенил]-4-{{2-[(1R,3R)-1-этокси-3-[(2S,3S)-N-гексил-3-метил-2-{{(2R)-1-метилпиперидин-2-ил]формамидо}пентанамидо]-4-метилпентил]-1,3-тиазол-4-ил}формамидо)-2,2-диметилпентановая кислота (LP26)



[00682] К раствору **LP26-1** (40 мг, 0,02 ммоль) в метаноле (2 мл) добавили *вод.* гидроксид лития (2 мл, 0,04 М) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов под контролем ЖХМС. Реакционную смесь сразу очистили посредством обращенно-фазовой флэш-хроматографии (0-100% ацетонитрил в *вод.* бикарбонате аммония (0,05%)), в результате чего получили **LP104** (5 мг, выход 14%) в виде белого твердого вещества. ИЭР m/z : 647.2 ($M/3 + H$)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 10.03 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 8.20-8.13 (m, 2H), 8.07 (d, $J = 7.8$ Гц, 1H), 7.78-7.70 (m, 2H), 7.69-7.65 (m, 1H), 7.65-7.56 (m, 3H), 7.53-7.42 (m, 5H), 7.40-7.27 (m, 4H), 7.09 (d, $J = 8.4$ Гц, 2H), 6.52 (s, 1H), 6.02-5.95 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.09-4.93 (m, 4H), 4.56-4.47 (m, 2H), 4.42-4.16 (m, 7H), 3.73-3.80 (m, 4H), 3.65-3.54 (m, 5H), 3.52-3.42 (m, 12H), 3.12-2.84 (m, 8H), 2.80-2.64 (m, 5H), 2.43-2.30 (m, 3H), 2.28-2.19 (m, 3H), 2.17-2.06 (m, 3H), 2.05-1.77 (m, 10H), 1.75-1.53 (m, 8H), 1.51-1.36 (m, 5H), 1.35-1.22 (m, 7H), 1.20-1.13 (m, 3H), 1.07-1.00 (m, 5H), 0.93-0.77 (m, 18H), 0.70 (s, 3H) ppm. (2 активных протона не обнаружили.)

Конъюгация ADC

Общая процедура для конъюгации

[00683] В данном примере демонстрируется способ конъюгации малеимид-спейсер-нагрузки с межпочечными цистеинами антитела или антигенсвязывающего фрагмента посредством образования тиоэфирной связи.

[00684] Конъюгация через цистеины антитела может выполняться в два этапа с применением способов, схожих со способами для приготовления Adcetris®-подобных конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) (см. *Mol. Pharm.* **2015**, 12(6), 1863-71). Моноклональное антитело (mAb) (10 мг/мл в 50 mM HEPES, 150 mM NaCl) при pH 7-8 можно восстановить с помощью 1 mM дитиотреитола (6 молярный эквив. антитела) или TCEP (2,5 молярные эквиваленты антитела) при 37 °C в течение 30 мин. После гель-фильтрации (G-25, pH 6,3, ацетат натрия), линкер-нагрузку при 1-10 мг/мл в DMSO можно добавить к восстановленному антителу, и реакционную смесь перемешивают в течение 3-14 ч при КТ. Полученную смесь можно очистить посредством эксклюзионной хроматографии (SEC), в результате чего получают чистый конъюгат ADC.

Общая процедура для сайтспецифической конъюгации

[00685] В данном примере демонстрируется способ сайтспецифической конъюгации циклооктин-линкер-нагрузки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

[00686] В данном примере сайт-специфические конъюгаты можно получить в два этапа. Первый этап представляет собой ферментное присоединение на основе микробной трансглутаминазы (MTG) малой молекулы, например, азидо-PEG₃-амина, к антителу с мутацией N297Q (далее именуется “конъюгация на основе MTG”). Второй этап включает присоединение циклооктин-спейсер-нагрузки к азидо-функционализованному антителу посредством [2+3] циклоприсоединения, например, 1,3-диполярного циклоприсоединения между азидом и циклооктином (также известно как клик-химия без соединений меди). См. 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. В результате данного процесса получили сайтспецифические и стехиометрические конъюгаты с фактическим выходом 50–80%.

Этап 1: Приготовление азидо-функционализованного антитела.

[00687] Агликозилированное человеческое антитело IgG (IgG1, IgG4 и т.д.) или изотип человеческого IgG1с мутацией N297Q, в PBS (pH 6,5-8,0) смешивают с ≥ 200 молярными эквивалентами азидо-PEG₃-амина (**ZP3A**, МВ = 218,26 г/моль). Полученный раствор смешивают с MTG (ЕС 2.3.2.13 от Zedira, Дармштадт, Германия, или АСТИВА П1, который содержит Мальтодекстрин, от Ajinomoto, Япония) (25 ед/мл; 5ед MTG на мг антитела), в результате чего конечная концентрация составляет 0,5-5

мг/мл антитела, и затем раствор инкубируют при 37 °С в течение 4-24 ч с осторожным перемешиванием. Реакцию можно контролировать посредством ИЭР-МС. После завершения реакции избыточный амин и MTG можно удалить посредством эксклюзионной хроматографии (SEC) или колоночной хроматографии на основе белка А, в результате чего получают азидо-функционализованное антитело. Этот продукт можно охарактеризовать посредством электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE).

[00688] В определенных экспериментах антитело N297Q (24 мг) в 7 мл фосфатно-солевого буферного раствора без содержания калия (рН 7,3) инкубируют с > 200 молярными эквивалентами азидо-PEG₃-амина ZP3A (МВ = 218,26) в присутствии MTG (0,350 мл, 35 ед., mTGase, Zedira, Дармштадт, Германия). Реакционную смесь инкубируют при 37 °С на протяжении ночи с осторожным перемешиванием. Избыток азидо-PEG₃-амина и mTGase можно удалить посредством эксклюзионной хроматографии (SEC, Superdex 200 PG, GE Healthcare).

[00689] **Этап 2:** Приготовление сайтспецифических конъюгатов посредством [2+3] клик-реакции между азидо-функционализованными глутаминил-модифицированными антителами (IgG1, IgG4 и т.д.) и содержащими циклооктин линкер-нагрузками (LP). В общем, конъюгат азидо-функционализованное агликозилированное антитело-LP можно приготовить посредством инкубирования азидо-функционализованного глутаминил-модифицированного антитела (1 мг) в 1 мл водной среды (например, PBS, PBS с содержанием 5% глицерина, HBS) с ≥6 молярными эквивалентами LP, растворенными в подходящем органическом растворителе (например, DMSO, DMF или DMA; реакционная смесь содержит 10-20% органического растворителя, об/об) при 24 °С-32 °С в течение более 3 часов. Течение реакции можно контролировать посредством ИЭР-МС. Отсутствие азидо-функционализованного или модифицированного транслгутаминазой антитела (mAb-PEG₃-N₃) указывало на завершение конъюгации. Избыток линкер-нагрузки (LP) и органический растворитель можно удалить посредством эксклюзионной хроматографии (Waters, Superdex 200 Increase, 1,0 x 30 см, GE Healthcare, расход 0,8 мг/мл, PBS, рН 7,2) с элюированием PBS, или посредством колоночной хроматографии на основе белка А через элюирование кислым буфером с последующей нейтрализацией при помощи Tris (рН 8,0). Очищенные конъюгаты можно проанализировать посредством эксклюзионной хроматографии, электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и ИЭР-МС.

[00690] В определенных примерах азидо-функционализованное антитело (1 мг) в 0,800 мл PBSg (PBS, 5% глицерин, pH 7,4) можно подвергнуть воздействию шести эквивалентов DIBAC-Suc-PEG₄-VC-PABC-нагрузки (конц. 10 мг/мл в DMSO) в течение 6 часов при КТ, и избыток линкер-нагрузки (LP) можно удалить посредством эксклюзионной хроматографии (SEC, Superdex 200 HR, GE Healthcare). Конечный продукт можно сконцентрировать посредством ультрацентрифугирования и охарактеризовать посредством УФ, SEC, SDS-PAGE и/или ИЭР-МС.

Приготовление конъюгатов ADC 1-37

[00691] **Этап 1:** На данном этапе антитело сайт-специфически функционализуется на глутаминовых остатках с азидо-алкил амином. В частности, человеческое антитело IgG к Her2, содержащее мутацию N297Q (TRSQ), или антитело изотипического контроля, содержащее ту же мутацию (CTRL), смешали с избытком, например, 20-100 молярными эквивалентами соответствующего азидо-алкил амина. Полученный раствор смешали с трансклутаминазой (1ед mTG на мг антитела, Millipore-Sigma), в результате чего получили конечную концентрацию антитела в 1-20 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали при 25-37°C в течение 4-24 часов с осторожным встряхиванием. Реакцию контролировали посредством ИЭР-МС. По завершении реакции избыток амина и mTG удалили посредством эксклюзионной хроматографии (SEC) или колоночной хроматографии на основе белка А. Конъюгат проанализировали посредством спектроскопии в видимой и ультрафиолетовой областях спектра, эксклюзионной хроматографии и ИЭР-МС.

[00692] **Этап 2:** На данном этапе антитело, полученное на этапе 1, конъюгируют с линкер-нагрузкой посредством реакции циклоприсоединения. В частности, азидо-функционализованное антитело, полученное на этапе 1, инкубировали (1-20 мг/мл) в PBS (pH 7,4) с 10-20 молярными эквивалентами линкер-нагрузки, растворенной в органическом растворителе (например, DMSO или DMA (10мг/мл)), в результате чего получили реакционную смесь, которая является 5-15% органическим растворителем (об/об), при 25-37°C в течение 1-48 часов с осторожным встряхиванием. Реакцию контролировали посредством ИЭР-МС. По завершении реакции избыточное количество линкер-нагрузки и белковых агрегатов удалили посредством эксклюзионной хроматографии (SEC). Очищенный конъюгат сконцентрировали, подвергли стерилизующей фильтрации и проанализировали посредством спектроскопии в видимой и ультрафиолетовой областях спектра, эксклюзионной хроматографии и ИЭР-

МС. Чистота мономеров конъюгатов составила >99% согласно эксклюзионной хроматографии (SEC).

Общая процедура для анализа антитела и конъюгатов ADC

[00693] Очищенные конъюгаты можно проанализировать посредством SEC, ИЭР-МС и SDS-PAGE.

Анализ ADC посредством эксклюзионной хроматографии SEC

[00694] Аналитические эксперименты посредством SEC можно провести с использованием прибора Waters 1515, на колонке Superdex™ 200 Increase (1,0 x 30 см), с расходом 0,80 мл/мин с применением PBS pH 7,2 и под контролем при $\lambda = 280$ нм с использованием Waters 2998 PDA. Образец для анализа состоит из 200 мкл PBS (pH 7,4) с 30-100 мкл контрольного образца. Препаративные очистки посредством SEC можно выполнить с использованием прибора АКТА Avant от GE Healthcare, на колонке Superdex 200 PG (2,6 x 60 см), с расходом в 2 мл/мин с элюированием с использованием PBS pH 7,2, с контролем при $\lambda = 280$ нм. Результаты SEC обычно показывают типичное время удерживания для мономерных mAb и их конъюгатов, с минимальной агрегацией или деградацией.

Анализ ADC посредством ЖК-ИЭР-МС

[00695] Измерение массы исходного вещества для образцов ADC выполняют посредством ЖК-ИЭР-МС для определения профилей распределения лекарственное средство-нагрузка и вычисления среднего отношения DAR. Каждый анализируемый образец (20-50 нг, 5 мкл) загружают в колонку Acquity UPLC Protein BEH C₄ (10К фунтов на кв. дюйм, 300 Å, 1,7 мкм, 75 мкм × 100 мМ; кат. № 186003810). После обессоливания в течение 3 мин белок можно элюировать и масс-спектры можно получить при помощи масс-спектрометра Waters Synapt G2-Si. Большинство сайт-специфических конъюгатов ADC имеют около 4DAR.

Анализ ADC посредством SDS-PAGE

[00696] Для анализа целостности и чистоты конъюгатов ADC можно применить электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). Согласно одному способу, условия SDS-PAGE включают невозстановленные и восстановленные образцы (2-4 мкг) с набором предварительно окрашенных маркерных белков BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen, кат. № 10748-010; № партии

1671922.), которые вводят на дорожку в (1,0 мМ x 10 лунок) Novex 4-20% трис-глицинового геле, и анализ можно провести при 180 В, 300 мА в течение 80 мин. Образец для анализа готовят с использованием трис-глицинового SDS буфера Novex (2X) (Invitrogen, кат. № LC2676) и восстановленный образец готовят с использованием SDS буфера для образца (2X) с содержанием 10% 2-меркаптоэтанола.

Стабильность в плазме *in vitro*

[00697] Для определения стабильности в плазме репрезентативных конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), содержащих нагрузки или пролекарственные нагрузки тубулизина, ADC можно инкубировать *in vitro* с плазмой от различных видов, и отношение DAR оценивают после инкубации при физиологической температуре (37°C) на протяжении 3 дней.

[00698] В целях анализа каждый образец ADC в фосфатно-солевом буферном растворе добавляют к свежей объединенной плазме самца мыши, яванского макака, крысы или человека, по-отдельности, с конечной концентрацией в 50 мкг/мл в 96-луночной планшете и затем инкубируют при 37 °C в течение 72 часов. После инкубации каждый образец (конечный объем 100 мкл) по-отдельности замораживают при -80 °C до проведения анализа.

[00699] Аффинный захват конъюгатов ADC из образцов плазмы можно выполнить на процессоре магнитных частиц KingFisher 96 (Thermo Electron). Сначала биотинилированный внеклеточный домен человеческого PRLR, экспрессированного с тус-тус гексагистидиновой меткой (hPRLR ecto-ММН 100 мкг/мл) иммобилизируют на покрытых стрептавидином парамагнитных микроносителях (In vitrogen, кат. № 60210). Каждый образец плазмы, содержащий конъюгаты ADC с тубулизином (100 мкл), смешивают на 600 об/мин с 100 мкл микроносителей (стандартный носитель коммерческих микроносителей) при комнатной температуре в течение 2 часов в 96-луночной планшете. Затем микроносители промывают три раза 600 мкл HBS-EP (GE healthcare, кат. № BR100188), один раз 600 мкл H₂O и затем один раз 600 мкл 10% ацетонитрила в воде. После промывок конъюгаты ADC с тубулизином можно элюировать инкубированием микроносителей с 70 мкл 1% муравьиной кислоты в смеси 30% ацетонитрил/70% вода в течение 15 минут при комнатной температуре. Каждый образец элюата затем переносят в 96-луночный планшет с v-образным дном и затем восстанавливают 5 мМ TCEP (Thermo Fisher, кат. № 77720) при комнатной температуре в течение 20 минут.

[00700] Восстановленные образцы конъюгатов ADC с тубулизином (10 мкл/образец) можно вводить в колонку 1,7 мкм ВЕН300 С4 (Waters Corporation, кат. № 186005589), соединенную с масс-спектрометром Waters Synapt G2-Si. Расход составляет 0,1 мл/мин (подвижная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в воде; подвижная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле). LC градиент начинается с 20% В и повышается до 35% В за 16 минут, затем достигает 95% В за 1 минуту.

[00701] Деконволюция полученных спектров может быть выполнена с использованием программного обеспечения MaxEnt1 (Waters Corporation) со следующими параметрами: диапазон массы: 20-30 кДа для легкой цепи и 40-60 кДа для тяжелой цепи; диапазон м/з: 700 Да-3000 Да; разрешение: 1,0 Да/канал; ширина на полувысоте: 1,0 Да; минимальные коэффициенты интенсивности: 33%; макс. итерация: 25.

[00702] Значительной потери линкер-нагрузок по результатам наблюдений проанализированных конъюгатов ADC после инкубирования в течение 72 часов с плазмой человека, мыши, крысы и яванского макака обычно нет. Тем не менее, можно выполнить гидролиз ацетильной группы нагрузок тубулизина или пролекарственных нагрузок до гидроксильной группы (-43 Да) со значительным снижением токсичности. Следовательно, гидролизированные виды, наблюдаемые при ЖХ-МС, считаются потерей лекарственного средства. Отношение лекарственное средство/антитело (DAR) можно рассчитать на основании относительной интенсивности различных видов тяжелых цепей.

$$\text{Отношение лекарственное средство/антитело (DAR)} = \frac{2 \times \text{интенсивность (тяжелая цепь с 2 лекарственными средствами)} + 1 \times \text{интенсивность (тяжелая цепь с 1 лекарственным средством)}}{2 \times \text{Суммарная интенсивность (тяжелая цепь с 2, 1 и 0 лекарственных средств)}}$$

Исследование нагрузок тубулизина в клеточном киллинг-анализе

[00703] Для изучения способности описанных нагрузок тубулизина или пролекарственных нагрузок к киллингу человеческих клеточных линий можно провести анализ цитотоксичности *in vitro*. Цитотоксичность *in vitro* описанных нагрузок, а также контрольных соединений, оценивают с помощью набора для анализа CellTiter-Glo Assay Kit (Promega, кат. № G7573), в котором количество присутствующего АТФ используется для определения числа жизнеспособных клеток в

культуре. Для анализа клетки C4-2, НЕК293 или T47D высеивают с концентрацией 4000 клеток на лунку на белые 96-луночные планшеты Nunclon в готовую питательную среду (DME с высоким содержанием глюкозы: среда Хэма F12 с 4:1, 10% FBS, 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 53 мкг/мл глутатмина, 10 мкг/мл инсулина, 220 нг/мл биотина, 12.5 пг/мл Т3, 12.5 мкг/мл аденина, 4 мкг/мл трансферрина для клеток C42; DME с высоким содержанием глюкозы, 10% FBS, 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 53 мкг/мл глутатмина для НЕК293; RPMI, 10% FBS, 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 53 мкг/мл глутатмина, 10 мкг/мл инсулина, 10 мМ HEPES, 200 нМ пирувата натрия для клеток T47D) и выращивают на протяжении ночи при 37 °C в 5% CO₂. Для получения кривых жизнеспособности клеток 1:3 последовательно разбавленных нагрузок добавляют к клеткам с конечными концентрациями, варьирующимися от 100 нМ до 15 пМ, включая контрольную группу без лечения, и затем их инкубируют в течение 5 дней. После инкубации в течение 5 дней клетки инкубируют при комнатной температуре с 100 μ л реактивов CellTiter-Glo в течение 10 минут. Относительные единицы люминесценции (RLU) можно определить на планшет-ридере Victor (PerkinElmer). Значения IC₅₀ определяют на основании четырехпараметрического логистического уравнения по 10-точечной характеристике (GraphPad Prism). Все значения IC₅₀ выражаются в молярной (M) концентрации. Клеточный киллинг в процентах (% киллинг) при максимальной анализируемой концентрации определяют на основании следующей формулы (100 представляет собой % жизнеспособных клеток). Можно включить средние значения \pm стандартное отклонение (SD) в случае, когда выполняются повторные эксперименты.

[00704] Здесь нагрузки и пролекарственные нагрузки могут продемонстрировать киллинг клеток C4-2 со значениями IC₅₀ от 16,4 пМ до >100 нМ, и максимальный % клеточный киллинг от 8,9% до 96,7%. Подгруппа описанных нагрузок может продемонстрировать киллинг клеток НЕК293 со значениями IC₅₀ от 57 пМ до >100 нМ и максимальный % клеточный киллинг от 4% до 89%. Подгруппа описанных нагрузок может продемонстрировать киллинг клеток T47D со значениями IC₅₀ от 35 пМ до >100 нМ и максимальный % клеточный киллинг от 15% до 85%. Контрольное соединение, ММАЕ, демонстрирует киллинг клеток C4-2 со значениями IC₅₀ в 283 пМ и максимальный % клеточный киллинг в 93,7%.

Исследование нагрузок тубулизина в киллинг-анализе для клеток с МЛУ

[00705] Для определения способности описанных нагрузок тубулизина можно провести анализ цитотоксичности с использованием клеточной линии с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) с вепарамилом или без вепарамила, лекарственного средства, которое позволяет преодолеть лекарственную устойчивость (Cancer Res. 1989 Sep 15;49(18):5002-6). Цитотоксичность *in vitro* описанных нагрузок, а также контрольных соединений оценили так, как было описано выше, за исключением использования клеток 1000 НСТ15, клеточной линии колоректальной карциномы, в питательной среде (RPMI, 10% FBS, 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 53 мкг/мл глутатмина) с 5 мкг/мл верапамила и без него.

[00706] В отсутствие вепарамила нагрузки по настоящему изобретению могут продемонстрировать киллинг клеток НСТ15 со значениями IC_{50} от 20 пМ до >100 нМ и максимальный % клеточный киллинг от -3,8 до 99,7%. В присутствии верапамила нагрузки по настоящему изобретению могут продемонстрировать киллинг клеток НСТ15 со значениями IC_{50} от 15 пМ до >100 нМ и максимальный % клеточный киллинг от -0,4% до 99,1%. Для каждой нагрузки или пролекарственной нагрузки НСТ-15 IC_{50} в отсутствие верапамила разделяют на НСТ-15 IC_{50} в присутствии верапамила (НСТ-15 IC_{50} /НСТ-15 + Верапамил IC_{50}). У некоторых нагрузок коэффициенты могут быть < 2,0, что указывает на то, что влияние на эти нагрузки многокомпонентных эффлюксных насосов является минимальным. Контрольное соединение, (ММАЕ), может иметь отношение 23,7.

Исследование нагрузок тубулизина в панели клеточных линий с МЛУ

[00707] Для дальнейшего исследования способности описанных нагрузок тубулизина можно провести анализ цитотоксичности с использованием панели клеточных линий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Цитотоксичность *in vitro* описанных нагрузок и контрольных соединений оценивают так, как было описано выше, за исключением использования клеток НСТ-15, клеточной линии колоректальной карциномы; H69AR, резистентного к доксорубину производного клеточной линии мелкоклеточного рака легкого NCI-H69 с МЛУ; MES-SA/MX2, резистентного к митоксантрону производного клеточной линии саркомы матки MES-SA с МЛУ; и HL60/MX2, резистентного к митоксантрону производного клеточной линии острого промиелоцитарного лейкоза HL60 с МЛУ. В ходе этих анализов цитотоксичность оценивают в нормальной питательной среде (RPMI, 10% FBS, 100

единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 53 мкг/мл глутатмина для HCT-15 и HL60/MX2; RPMI, 20% FBS, 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 53 мкг/мл глутатмина для H69-AR; среда Веймаута: среда МакКоя (1:1), 10% FBS, 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 53 мкг/мл глутатмина для MES-SA/MX2) с 1000 клеток на лунку после 72 ч и 144 ч инкубации с нагрузками. Некоторые нагрузки могут обеспечивать киллинг всей панели клеточных линий с МЛЮ с суб нМ IC_{50} и до околоопорных уровней, что указывает на то, что эти нагрузки позволяют преодолеть МЛЮ в исследуемых линиях.

Исследование конъюгатов ADC, содержащих нагрузки тубулизина, при анализе клеточного киллинга

[00708] Можно разработать биоисследования для оценки эффективности антитела к PRLR, конъюгированного с описанными нагрузками тубулизина или пролекарственными нагрузками и контрольными нагрузками. В этих исследованиях можно оценить активность нагрузок тубулизина после интернализации конъюгатов антитела к PRLR-тубулизин в клетки, высвобождение нагрузки и последующую цитотоксичность. Для данного исследования можно создать линию HCT15, экспрессирующую человеческий полноразмерный PRLR (учетный номер NP_000940.1). Полученная стабильная клеточная линия называется здесь HCT15/PRLR. Цитотоксичность *in vitro* описанных нагрузок, контрольных соединений и анализируемых конъюгатов ADC оценивают так, как было описано в данном примере, с использованием клеток HCT15/PRLR с или без 5 мкг/мл верапамила, разведенного в нормальной культуральной среде. Соединения исследуют с концентрациями, начиная с 100 нМ с 3-кратным последовательным разведением. Все значения IC_{50} выражаются в нМ концентрации, и клеточный киллинг в процентах (% киллинг) при максимальной анализируемой концентрации определяли на основании следующей формулы (100 представляет собой % жизнеспособных клеток).

[00709] В отсутствие верапамила конъюгаты антитела к PRLR с описанными линкер-нагрузками могут демонстрировать цитотоксичность в исследовании для клеток HCT15/PRLR при значении IC_{50} в 0,5 нМ, с максимальным клеточным киллингом в 90%; и при значении IC_{50} в 3 нМ, с максимальным клеточным киллингом в 65%, соответственно. В этих условиях один конъюгат изотипического контроля продемонстрировал незначительный киллинг клеток HCT15/PRLR с максимальным киллингом в 51%, однако значение IC_{50} составляло >50 нМ. В отсутствие верапамила

другой изотипический контроль не продемонстрировал значительного киллинга клеток HCT15/PRLR. В этих условиях описанные свободные нагрузки могут демонстрировать киллинг клеток HCT15/PRLR со значениями IC_{50} в 0,04 нМ и 0,2 нМ, и максимальный клеточный киллинг в 99% и 99%, соответственно.

[00710] В присутствии верапамила конъюгаты антитела к PRLR с описанными линкер-нагрузками или линкер-пролекарственными нагрузками могут демонстрировать цитотоксичность в исследовании для клеток HCT15/PRLR при значении IC_{50} в 0,3 нМ, с максимальным клеточным киллингом в 91%; и при значении IC_{50} в 0,2 нМ, с максимальным клеточным киллингом в 91%, соответственно. В этих условиях два конъюгата изотипического контроля могут демонстрировать киллинг клеток HCT15/PRLR со значением IC_{50} более 50 нМ, и максимальный клеточный киллинг в 82%; и значением IC_{50} более 50 нМ и максимальный клеточный киллинг в 76%, соответственно. В этих условиях описанные свободные нагрузки могут демонстрировать киллинг клеток HCT15/PRLR со значениями IC_{50} в 0,015 нМ и 0,033 нМ, и максимальный клеточный киллинг в 99% и 99%, соответственно. Неконъюгированное антитело к PRLR не продемонстрировало киллинг клеток HCT15/PRLR в присутствии или в отсутствие верапамила.

[00711] Для дальнейшего исследования способности описанных нагрузок тубулизина, контрольных соединений и конъюгатов антитело-лекарственное средство с использованием этих нагрузок можно провести анализ цитотоксичности с использованием клеток C4-2 так, как было описано в данном примере. Для этих исследований антитела к STEAP2 конъюгируют с выбранными нагрузками тубулизина и соединения анализируют с концентрациями, начиная с 100 нМ, с 3-кратным последовательным разведением. Все значения IC_{50} выражаются в нМ концентрации, и клеточный киллинг в процентах при максимальной анализируемой концентрации определяют на основании следующей формулы (100 представляет собой % жизнеспособных клеток).

[00712] Конъюгаты антитела к STEAP2 с описанными линкер-нагрузками могут демонстрировать цитотоксичность в исследовании с использованием клеток C4-2 при значении IC_{50} в 0,1 нМ, с максимальным киллингом в 99%; значении IC_{50} в 0,15 нМ, с максимальным киллингом в 99%; и значении IC_{50} в 0,28 нМ с максимальным киллингом в 96%, соответственно. Контрольный конъюгат ADC, антитело к STEAP2-ММАЕ, может демонстрировать цитотоксичность в исследовании для клеток C4-2 со

значением IC_{50} в 0,53 нМ, с максимальным киллингом в 99%. Все три изотипических контроля могут демонстрировать незначительный киллинг клеток С4-2 только при максимальных анализируемых концентрациях с максимальным киллингом в 16%~48%, но значение $IC_{50} >100$ нМ. Свободная контрольная нагрузка ММАЕ может демонстрировать киллинг клеток С4-2 со значением IC_{50} в 0,22 нМ и максимальный киллинг в 99%. Неконъюгированное антитело к STEAP2 не продемонстрировало киллинг клеток С4-2.

Антитела к STEAP2

[00713] Для определения эффективности *in vivo* антител к STEAP2, конъюгированных с тубулизидами, можно провести исследования на иммуноскомпрометированных мышах с ксенотрансплантатами STEAP2-позитивных клеток С4-2 рака простаты.

[00714] Для данного исследования $7,5 \times 10^6$ клеток С4-2 (АТСС, кат. № CRL-3314), которые эндогенно экспрессируют STEAP2, суспендируют в матригеле Matrigel (BD Biosciences, кат. № 354234) и подкожно имплантируют в левый бок самцам мышей CB17 SCID (Taconic, Hudson NY). После того, как опухоли достигают среднего объема в 220 мм^3 (приблизительно на День 15), мышей рандомизируют в группы по 7 и вводят им по одной дозе либо конъюгированных антител к STEAP2, конъюгированных антител изотипического контроля или носителя с 2,5 мг/кг посредством инъекции в хвостовую вену. Опухоли измеряют два раза в неделю до того момента, когда средний размер опухоли в группе, получившей носитель, достигает 1500 мм^3 . Размер опухоли рассчитывают при помощи формулы $(\text{длина} \times \text{ширина}^2)/2$ и затем вычисляют средний размер опухоли +/- СОС. Ингибирование роста опухоли вычисляют в соответствии со следующей формулой: $(1 - ((T_{\text{кон.}} - T_{\text{перв.}})/(C_{\text{кон.}} - C_{\text{перв.}}))) * 100$, где получающая лечение группа (Т) и контрольная группа (С) представляют среднюю массу опухоли в день, когда размер в группе, получающей носитель, достигает 1500 мм^3 .

[00715] В данном исследовании антитело к STEAP2, конъюгированное с ММАЕ, сравнивают с антителом к STEAP2, конъюгированным с линкер-нагрузками тубулизина, в отношении их способности к уменьшению размера опухоли С4-2. Лечение контрольным конъюгатом антитело к STEAP2-ММАЕ обуславливает среднее ингибирование роста опухоли в 81% по завершении исследования. Лечение конъюгатами ADC изотипического контроля обуславливает среднее уменьшение роста опухоли в 31-33%. Антитела к STEAP2 содержат мутации N297Q.

Эффективность конъюгата STEAP2-тубулизин в моделях рака простаты PDX CTG-2440 и CTG-2441

Процедура эксперимента:

[00716] Фрагменты опухоли ксенотрансплантатов, полученных у пациентов с раком простаты (PDX), либо CTG-2440, либо CTG-2441 подкожно имплантируют в бок самцам мышей NOG. После того, как объемы опухоли достигают приблизительно 200 мм³, мышей рандомизируют в группы по восемь и вводят им соединения. Рост опухоли контролируют на протяжении 60 дней после имплантации.

Результаты и заключения:

[00717] Противоопухолевую эффективность конъюгатов STEAP2-тубулизин на модели STEAP2-положительных ксенотрансплантатов PDX оценивают относительно контрольных конъюгатов ADC. Опухоли CTG-2440, на которые воздействуют контрольным конъюгатом, могут вырастать до протокольных предельных размеров в пределах 28 дней. Рост опухолей, на которые воздействовали конъюгатом STEAP2-тубулизин ADC, может быть ингибирован в течение 60 дней без отрицательного влияния на изменение веса тела. Противоопухолевая эффективность является дозозависимой. Полное ингибирование опухоли наблюдается при общей дозе нагрузки в 240 мкг/кг, а регрессия опухоли начинается при общих дозах нагрузки 120 мкг/кг и 40 мкг/кг.

[00718] Опухоли CTG-2441, на которые воздействуют контрольным конъюгатом, могут вырастать до протокольных предельных размеров в пределах 30 дней. Рост опухолей, на которые воздействовали конъюгатом STEAP2-тубулизин ADC, может быть ингибирован в течение 60 дней с умеренным снижением веса тела. Противоопухолевая эффективность является дозозависимой. Полное ингибирование опухоли наблюдается при общей дозе нагрузки либо 120, либо 240 мкг/кг. Регрессия опухоли начинается после однократного введения общей дозы нагрузки 40 мкг/кг.

Информация о модели ксенотрансплантатов, полученных у пациентов (PDX), и экспрессии STEAP2

[00719] Модели рака простаты получают из метастаз в кости пациентов с метастатическим устойчивым к кастрации раком предстательной железы (mCRPC). Экспрессию STEAP2 подтверждают при помощи данных секвенирования РНК и гибридизации РНК in situ.

Исследование нагрузок тубулизина в панели клеточных линий SK-BR-3

[00720] Противопролиферационные исследования проводили с использованием человеческой клеточной линии аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 (плеврального выпота). Клетки выращивали в среде Мак-Коя 5а, дополненной 10% FBS, пенициллином/стрептомицином и L-глутамином. Клетки высевали в 96-луночный планшет с 1000/лунку в 80 мкл полной среды роста за один день до добавления конъюгатов ADC и инкубировали при 37°C 5% CO₂ на протяжении ночи.

[00721] Конъюгаты ADC последовательно разбавили в соотношении 1:3, 10 пунктов, в питательной среде (Opti-MEM+0,1% BSA). Концентрации анализируемых конъюгатов ADC охватывают диапазон от 1 нМ до ~1000 нМ, также начинают с различных концентраций на основании интенсивности клеточного киллинга для получения EC₅₀, при этом последнюю лунку (10-ю) оставляют пустой (без ADC или соединения). Конъюгаты ADC сначала последовательно разбавили в соотношении 1:3, 10 пунктов, в DMSO, начиная с 5,0 мкМ (начальная концентрация каждого ADC различается согласно EC₅₀), при этом последнюю лунку оставляли пустой (она содержала только DMSO). 10 мкл соединения, разбавленного DMSO, переносили в 990 мкл питательной среды (Opti-MEM+0,1% BSA) в 96-луночный планшет. К клеткам добавили 20 мкл конъюгатов ADC, разбавленных питательной средой. Клетки инкубировали при 37°C 5% CO₂ в течение 6 дней (144 часов). В планшеты добавили 100 мкл CTG реактива/лунку к клеткам CellTiter-Glo®, от Promega, кат. № G7573), встряхивали при комнатной температуре в течение 10 мин, запечатали белой адгезивной пленкой и определили люминесценцию при помощи Envision. Клеточный киллинг%=[1-(T144_{обр}-T144_{пуст})/(T144_{DMSO}- T144_{пуст})]×100%, где T144 представляет собой данные через 144 часа.

[00722] В нижеприведенной таблице представлены отношения лекарственное средство-антитело (DAR) для конъюгатов 1-37, а также результаты EC₅₀ из исследований SKBR для этих же конъюгатов. Были приготовлены следующие линкер-нагрузки (из Таблицы P1) так, как описано в документе PCT/US2019/068185, содержание которого включается в настоящий документ полностью посредством ссылки: LP4-Ve, LP4-Ve, LP25-Ve, LP25-Ve, LP26-Ve, LP26-Ve, LP17-Ve, LP13-Ve, LP19-Ve, LP20-Ve, LP21-Ve, LP6-Vb, LP24-Vb, LP23-Vb и LP15-VIh.

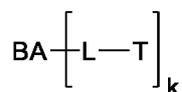
Таблица 6: Конъюгация ADC и анализ киллинга клеток SKBR

Нагрузка		Линкер-нагрузка		ADC		
№.	№.	Наименование	Наименование	№.	Отношение DAR	SKBR3 EC ₅₀ (нМ)
P34	LP4	BCN-PEG4-EvcPAB-P34	TRSQ-ZP3A-LP4	1	3.89	0.023
P34	LP5	COT-GGG-P34	TRSQ-ZP3A-LP5	2	3.83	0.090
P34	LP6	BCN-GGGG- P34	TRSQ-ZP3A-LP6	3	3.93	0.040
P34	LP7	DIBAC-PEG4-GGFG- P34	TRSQ-ZP3A-LP7	4	3.65	0.036
P34	LP8	BCN-PEG4-GGFG- P34	TRSQ-ZP3A-LP8	5	3.77	0.065
P51	LP9	COT-PEG3-HOPAS-P51	TRSQ-ZP3A-LP9	6	0.71	0.220
P1	LP11	BCN-PEG4-GGFG-P1	TRSQ-ZP3A-LP11	7	3.68	1.083
P1	LP10	BCN-GGFG-P1	TRSQ-ZP3A-LP10	8	3.66	1.591
P7	LP12	DIBAC-PEG4-vcPAB-Gly-P7	TRSQ-ZP3A-LP12	9	3.80	0.029
P8	LP13	DIBAC-PEG4-vcPAB-P8	TRSQ-ZP3A-LP13	10	3.86	0.083
P8	LP26	DIBAC-PEG4-EvcPAB-Gly-P8	TRSQ-ZP3A-LP26	11	4.00	0.078
P8	LP26	DIBAC-PEG4-EvcPAB-Gly-P8	CTRL-ZP3A-LP26	12	4.00	58.334
P5	LP16	DIBAC-PEG4-EvcPAB-P5	TRSQ-ZP3A-LP16	13	3.93	0.182
P5	LP18	DIBAC-PEG4-GGG-P5	TRSQ-ZP3A-LP18	14	3.94	0.118
P5	LP19	BCN-PEG4-GGFG-P5	TRSQ-ZP3A-LP19	15	3.91	0.135
P11	LP20	DIBAC-PEG4-vcPAB-P11	TRSQ-ZP3A-LP20	16	3.95	1.366
P11	LP21	DIBAC-P11	TRSQ-ZP3A-LP21	17	3.83	0.232
P43	LP22	DIBAC-PEG4-vc-P43	TRSQ-ZP3A-LP22	18	3.86	0.376
P43	LP22	DIBAC-PEG4-vc-P43	CTRL-ZP3A-LP22	19	2.18	461.721
P46	LP25	DIBAC-PEG4-vcPAB-P46	TRSQ-ZP3A-LP25	20	3.04	1.329
P47	LP24	DIBAC-PEG4-vc-P47	TRSQ-ZP3A-LP24	21	3.82	2.733
P47	LP24	DIBAC-PEG4-vc-P47	CTRL-ZP3A-LP24	22	4.00	321.547
P34	LP4-Ve	DIBAC-PEG4-vcPAB-CP1055	TRSQ-ZP3A- LP4-Ve	23	4.00	0.064

Нагрузка	Линкер-нагрузка		ADC			
№.	№.	Наименование	Наименование	№.	Отношение DAR	SKBR3 EC ₅₀ (HM)
P34	LP4-Ve	DIBAC-PEG4-vcPAB-CP1055	CTRL-ZP3A- LP4-Ve	24	4.00	23.401
P34	LP25-Ve	COT-EDA-(GLCA)PAB-CP1055	TRSQ-ZP3A- LP25-Ve	25	3.75	0.016
P34	LP25-Ve	COT-EDA-(GLCA)PAB-CP1055	CTRL-ZP3A- LP25-Ve	26	4.00	80.211
P34	LP26-Ve	COT-EDA-(GLC)PAB-CP1055	TRSQ-ZP3A- LP26-Ve	27	4.00	0.087
P34	LP26-Ve	COT-EDA-(GLC)PAB-CP1055	CTRL-ZP3A- LP26-Ve	28	4.00	3.282
P34	LP17-Ve	COT-GG-CP1055	TRSQ-ZP3A- LP17-Ve	29	3.95	0.098
P34	LP13-Ve	DIBAC-GGG-CP1055	TRSQ-ZP3A- LP13-Ve	30	4.00	0.078
P34	LP19-Ve	COT-GGGG-CP1055	TRSQ-ZP3A- LP19-Ve	31	3.51	0.029
P34	LP20-Ve	DIBAC-GGFG-CP1055	TRSQ-ZP3A- LP20-Ve	32	3.92	0.040
P34	LP21-Ve	COT-GGG ⁴ E-CP1055	TRSQ-ZP3A- LP21-Ve	33	1.58	0.023
Vb	LP6-Vb	DIBAC-PEG4-vc-CP1062	TRSQ-ZP3A- LP6-Vb	34	3.95	0.046
Vb	LP24-Vb	DIBAC-GGFG-CP1062	TRSQ-ZP3A- LP24-Vb	35	3.95	0.040
Vb	LP23-Vb	COT-GGGG-CP1062	TRSQ-ZP3A- LP23-Vb	36	3.92	0.063
Vlh	LP15-Vlh	DIBAC-PEG4-vcPAB-CP1080	TRSQ-ZP3A- LP15-Vlh	37	3.37	0.044

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

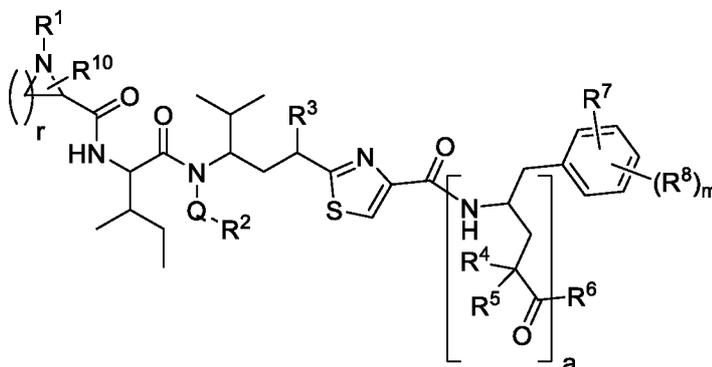
1. Соединение формулы



или его фармацевтически приемлемая соль, где

ВА представляет собой связующий агент;

L представляет собой линкер, ковалентно связанный с **ВА** и с **T**;



T представляет собой _____, где

R¹ представляет собой связь, водород, C₁-C₁₀ алкил, первый остаток *N*-концевой аминокислоты, первый аминокислотный остаток, -C₁-C₁₀ алкил-NR^{3a}R^{3b} или -C₁-C₁₀ алкил-OH;

R³ представляет собой гидроксил, -O-, -O-C₁-C₅ алкил, -OC(O)C₁-C₅ алкил, -OC(O)N(H)C₁-C₁₀ алкил, -OC(O)N(H)C₁-C₁₀ алкил-NR^{3a}R^{3b}, -NHC(O)C₁-C₅ алкил или -OC(O)N(H)(CH₂CH₂O)_nC₁-C₁₀ алкил-NR^{3a}R^{3b},

при этом **R^{3a}** и **R^{3b}** представляет собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил, при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R⁴ и **R⁵** представляют собой независимо в каждом случае водород или C₁-C₅ алкил;

R⁶ представляет собой -OH, -O-, -NHNH₂, -NHNH-, -NHSO₂(CH₂)_{a1}-арил-(CH₂)_{a2}NR^{6a}R^{6b},

при этом арил замещен или не замещен; и

R^{6a} и R^{6b} представляет собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил, где алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R^7 представляет собой независимо в каждом случае водород, $-OH$, $-O-$, галоген или $-NR^{7a}R^{7b}$,

где R^{7a} и R^{7b} представляет собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил, ацил, $-C(O)CH_2OH$, $-C(O)CH_2O-$, первый остаток *N*-концевой аминокислоты, первый аминокислотный остаток, первый остаток *N*-концевого пептида, первый пептидный остаток, $-CH_2CH_2NH_2$ и $-CH_2CH_2NH-$; при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R^8 представляет собой независимо в каждом случае водород, $-NHR^9$ или галоген,

при этом R^9 представляет собой водород, $-C_1-C_5$ алкил или $-C(O)C_1-C_5$ алкил; и m имеет значение 1 или 2;

R^{10} , если он присутствует, представляет собой $-C_1-C_5$ алкил;

Q представляет собой $-CH_2-$ или $-O-$, при этом

R^2 представляет собой алкил, алкилен, алкинил, алкинилен, региоизомерный триазол, региоизомерный триазолилен;

при этом указанный региоизомерный триазол или региоизомерный триазолилен не замещен или замещен алкилом, алкенилом, алкинилом, циклоалкилом, арилом, гетероарилом или ацилом;

при этом n представляет собой целое число от 1 до 10.

при этом r представляет собой целое число от 1 до 6;

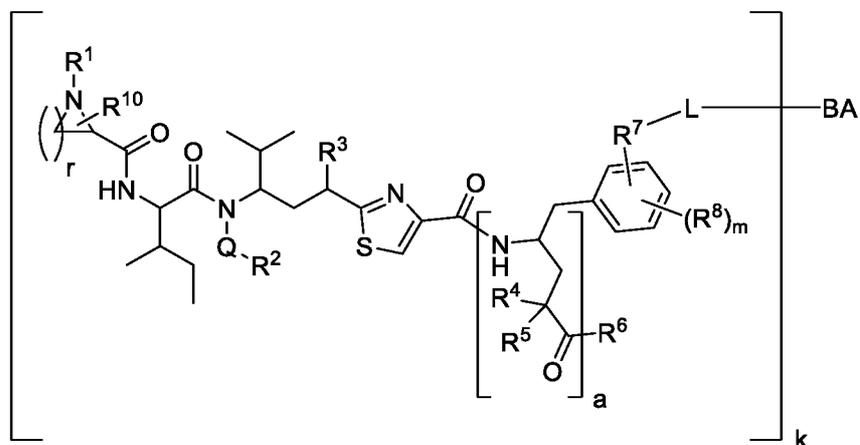
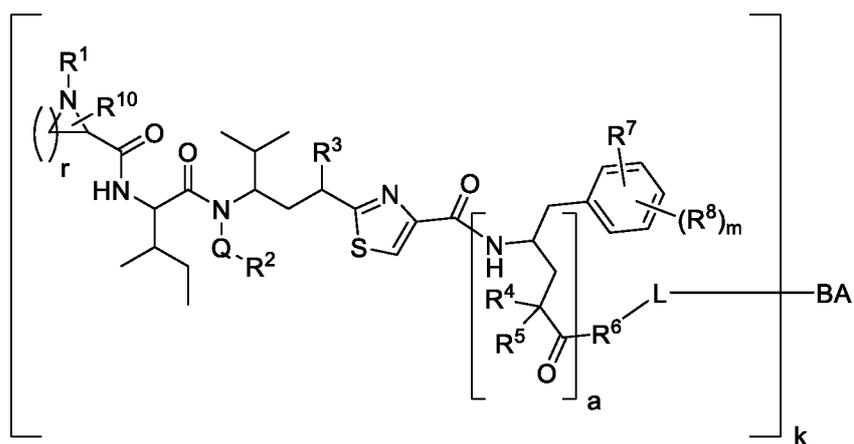
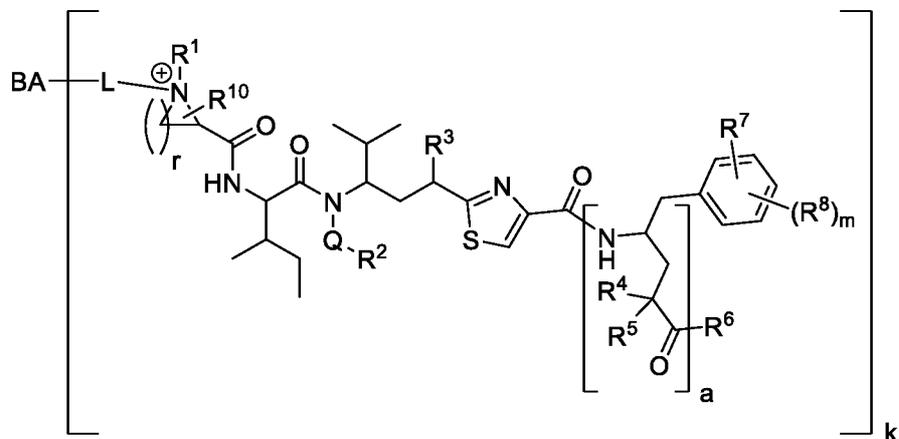
при этом a , a_1 и a_2 независимо имеют значение 0 или 1, и

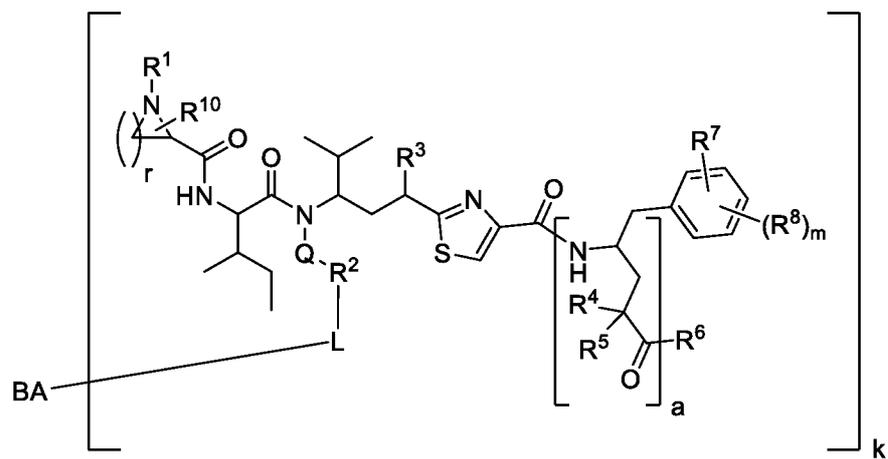
k представляет собой целое число от 1 до 30;

при этом T не является соединение IVa , IVa' , IVb , IVc , IVd , IVe , IVf , IVg , IVh , IVj , IVk , IVl , IVm , IVn , IVo , IVp , IVq , IVr , IVs , IVt , IVu , $IVvA$, $IVvB$, IVw , IVx , IVy , Va , Va' , Vb , Vc , Vd , Ve , Vf , Vg , Vh , Vi , Vj , Vk , VIa , IVb , VIc , $VI d$, VIe , $VI f$, $VI g$, $VI h$, VI ,

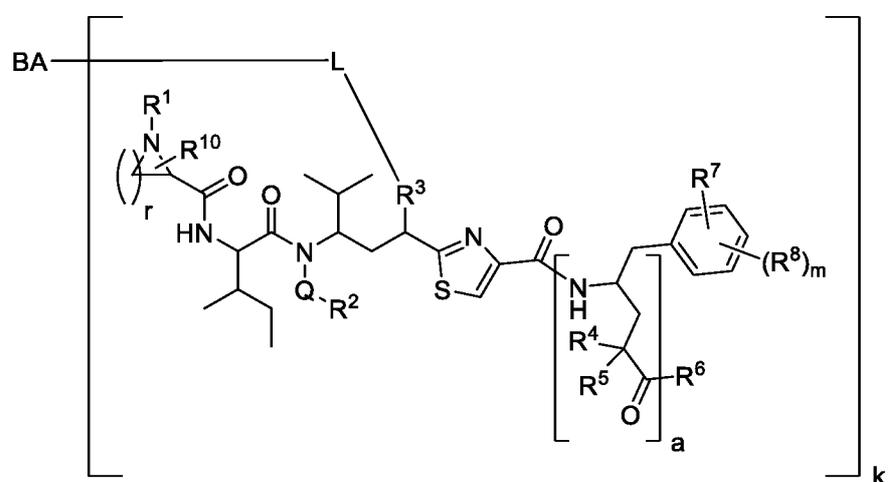
Vii, VII, VIII, IX, X, D-5a и D-5c или его фармацевтически приемлемая соль, ковалентно связанная с L.

2. Соединение по п.1, имеющее Формулу A, B, C, D или E





(D)



(E)

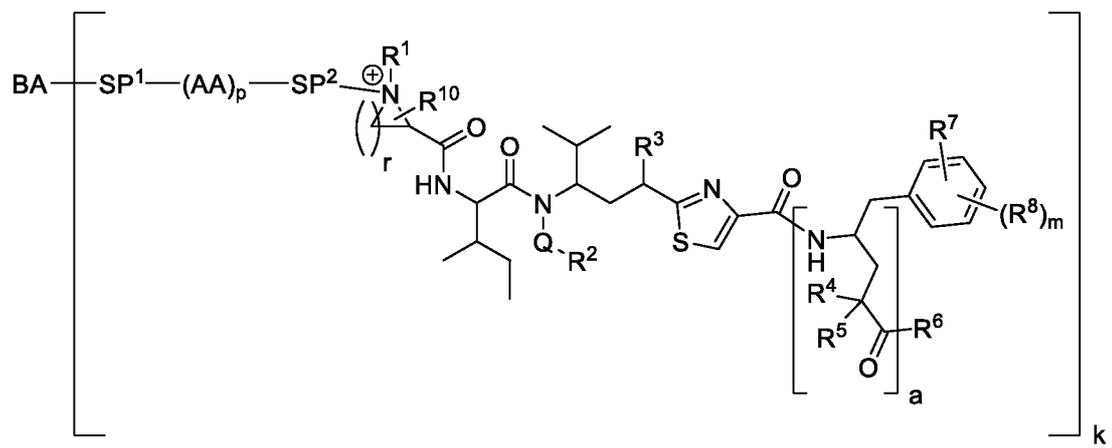
при этом **L** представляет собой линкер.

3. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где

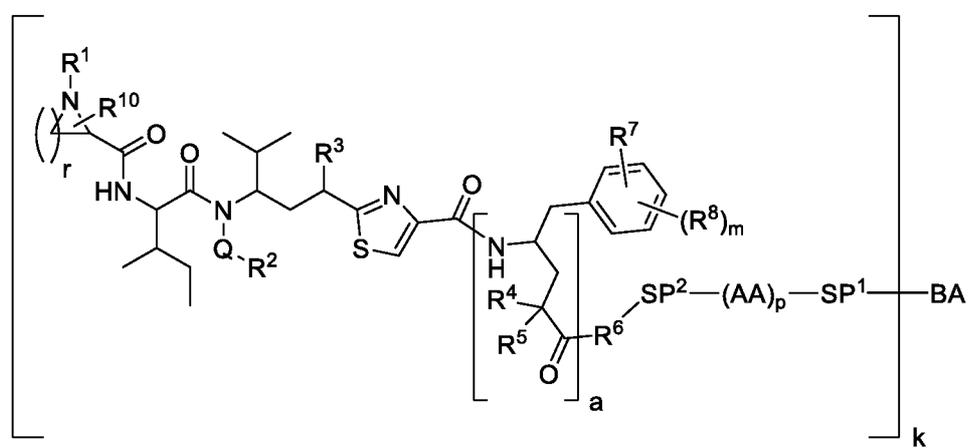
R⁷ представляет собой независимо в каждом случае водород, –OH, –O–, галоген или –NR^{7a}R^{7b},

при этом **R^{7a}** и **R^{7b}** представляют собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил, ацил, –C(O)CH₂OH, –C(O)CH₂O–, первый остаток *N*-концевой аминокислоты, первый остаток *N*-концевого пептида, –CH₂CH₂NH₂ и –CH₂CH₂NH–; при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

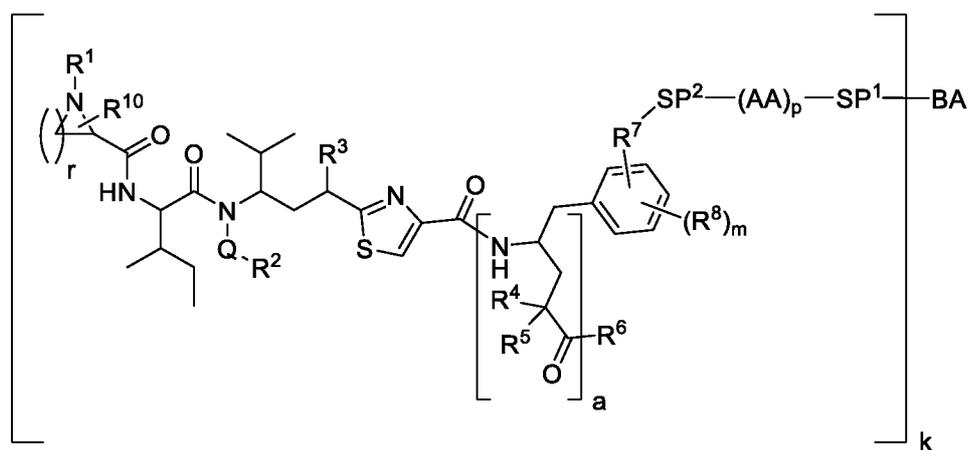
4. Соединение по п.2, где соединение имеет Формулу **A'**, **B'**, **C'**, **D'** или **E'**



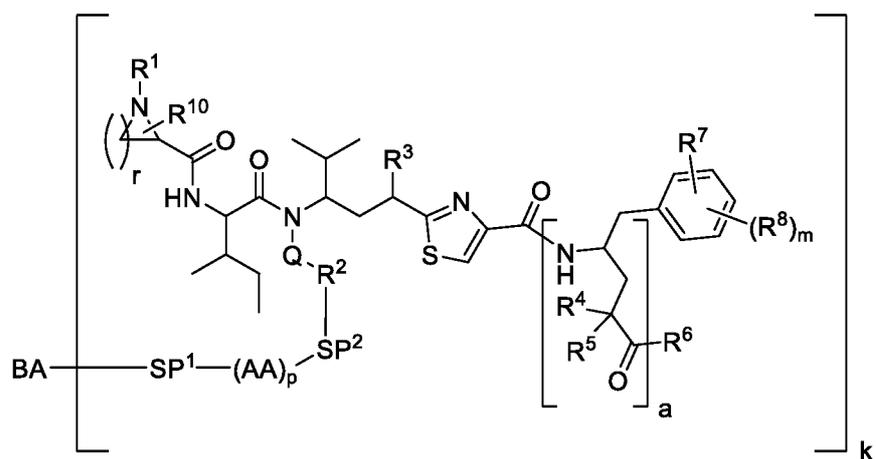
(A')



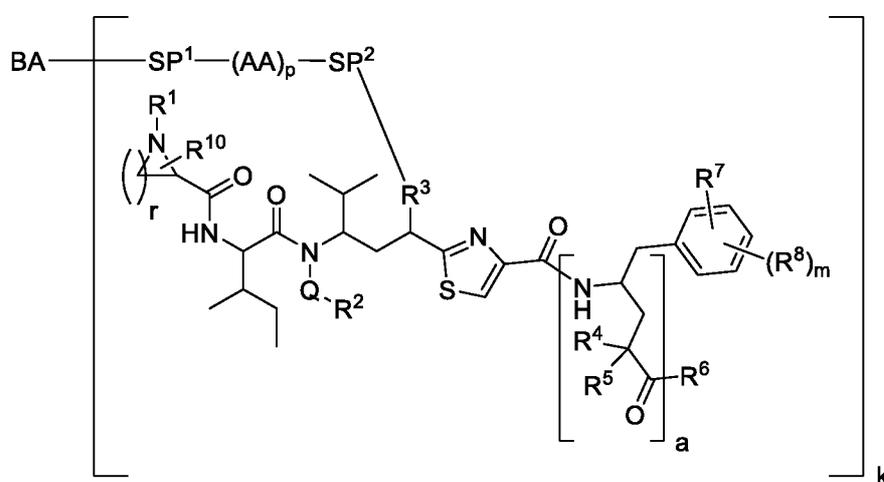
(B')



(C')



(D')



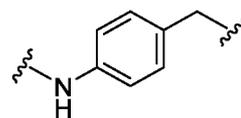
(E')

при этом SP^1 и SP^2 , если они присутствуют, представляют собой спейсерные группы; каждая AA , если она присутствует, представляет собой второй аминокислотный остаток; и

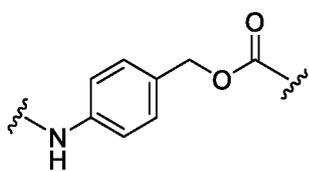
p представляет собой целое число от 0 до 10.

5. Соединение по п.4, где

$-SP^2-$ спейсер, если присутствует, представляет собой



или

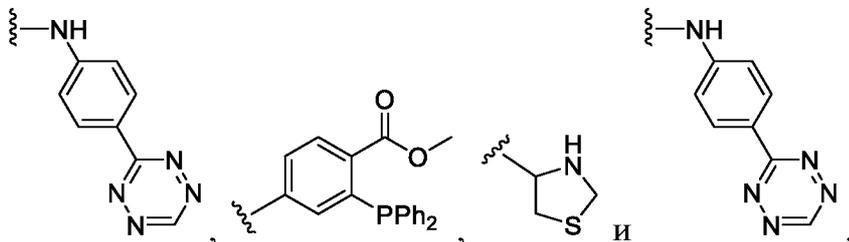


;

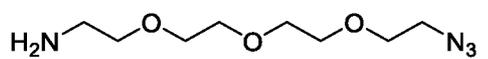
r представляет собой целое число, выбранное от 0 до 2; и



X выбирается из группы, состоящей из $-SH$, $-N_3$, $-C\equiv CH$, $-C(O)H$, тетразола,



7. Соединение по п.6, где связующий агент представляет собой антитело, модифицированное первичным амином, согласно следующей формуле:



8. Соединение по п.4, где Q представляет собой $-O-$.

9. Соединение по п.4, где

Q представляет собой $-CH_2-$;

R^1 представляет собой C_1-C_{10} алкил;

R^2 представляет собой алкил;

R^4 и R^5 представляют собой C_1-C_5 алкил;

R^6 представляет собой $-OH$;

R^{10} отсутствует;

при этом r имеет значение 4; и

при этом a имеет значение 1.

10. Соединение по п.9, имеющее структуру C' , или его фармацевтически приемлемая соль.

11. Соединение по п.10, где R^7 представляет собой $-NH-$; и R^8 представляет собой водород или фтор.

12. Соединение по п.9, имеющее структуру E' , или его фармацевтически приемлемая соль.

13. Соединение по п.12, где R^3 представляет собой $-OC(O)N(H)CH_2CH_2NH-$ или $-OC(O)N(H)CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2NH-$.

14. Соединение по п.4, где

Q представляет собой $-CH_2-$;

R^1 представляет собой водород или C_1-C_{10} алкил;

R^2 представляет собой алкил;

R^4 и R^5 представляет собой C_1-C_5 алкил;

R^6 представляет собой $-OH$;

при этом g имеет значение 3 или 4; и

при этом a имеет значение 1.

15. Соединение по п.14, имеющее структуру C' , или его фармацевтически приемлемая соль.

16. Соединение по п.15, где R^7 представляет собой $-NH-$; и R^8 представляет собой водород.

17. Соединение по п.4, где

Q представляет собой $-CH_2-$;

R^1 представляет собой водород или C_1-C_{10} алкил;

R^2 представляет собой алкил;

R^4 и R^5 представляет собой C_1-C_5 алкил;

R^6 представляет собой $-OH$;

R^{10} отсутствует;

при этом g имеет значение 4; и

при этом a имеет значение 1.

18. Соединение по п.17, имеющее структуру C' , или его фармацевтически приемлемая соль.

19. Соединение по п.18, где R^7 представляет собой $-NH-$; и R^8 представляет собой водород.

20. Соединение по п.4, где

Q представляет собой –O–;

R¹ представляет собой водород или C₁-C₁₀ алкил;

R² представляет собой алкил или алкинил;

R³ представляет собой гидроксил или –OC(O)C₁-C₅ алкил;

R⁴ и **R⁵** представляет собой C₁-C₅ алкил;

R⁶ представляет собой –OH;

R¹⁰, если он присутствует, представляет собой -C₁-C₅ алкил;

при этом **g** имеет значение 3 или 4; и

при этом **a** имеет значение 1.

21. Соединение по п.20, имеющее структуру **C'**, или его фармацевтически приемлемая соль.

22. Соединение по п.21, где **R⁷** представляет собой –NH–; и **R⁸** представляет собой водород.

23. Соединение по п.4, где

Q представляет собой –CH₂– или –O–;

R¹ представляет собой C₁-C₁₀ алкил;

R² представляет собой алкил или алкинил;

R⁴ и **R⁵** представляет собой C₁-C₅ алкил;

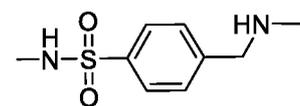
R⁶ представляет собой –NH₂SO₂(CH₂)_{a1}-арил-(CH₂)_{a2}NR^{6a}R^{6b};

R¹⁰ отсутствует;

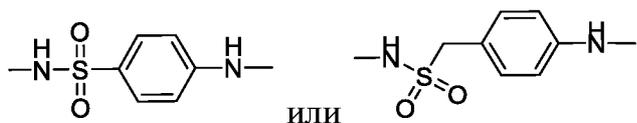
при этом **g** имеет значение 4; и

при этом **a**, **a1** и **a2** независимо имеют значение 0 или 1.

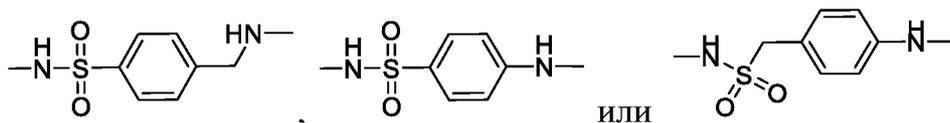
24. Соединение по п.23, имеющее структуру **B'**, или его фармацевтически приемлемая соль.



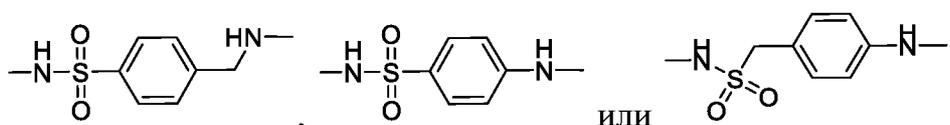
25. Соединение по п.24, где R^6 представляет собой



26. Соединение по п.24, где a имеет значение 0; и R^6 представляет собой

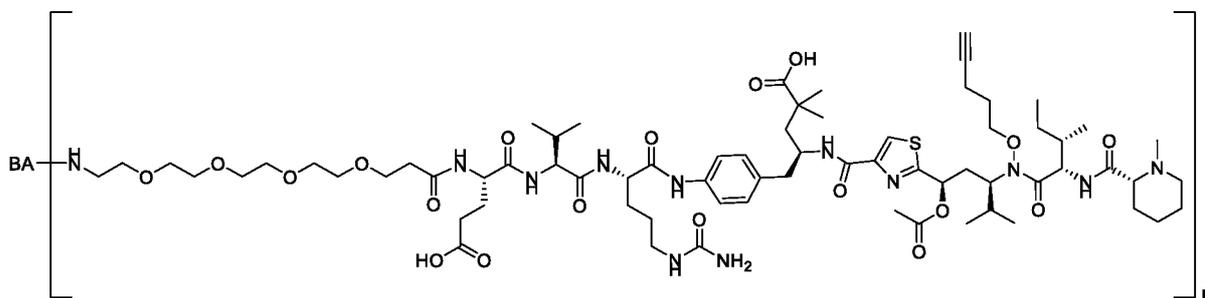


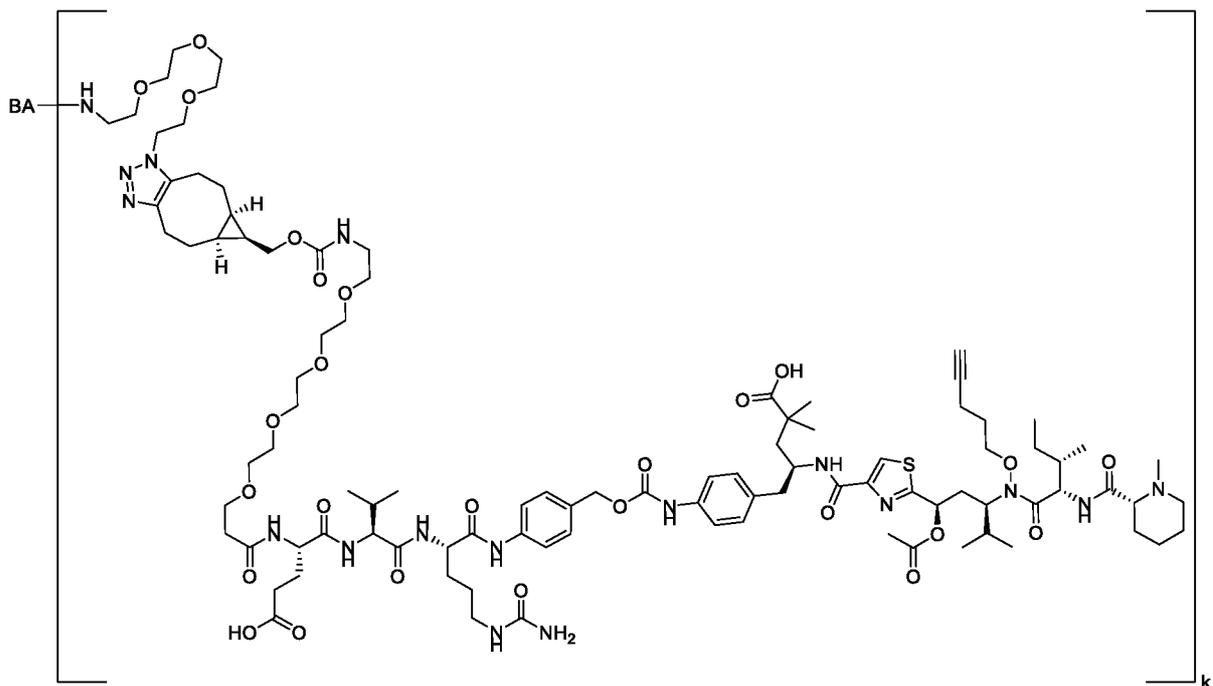
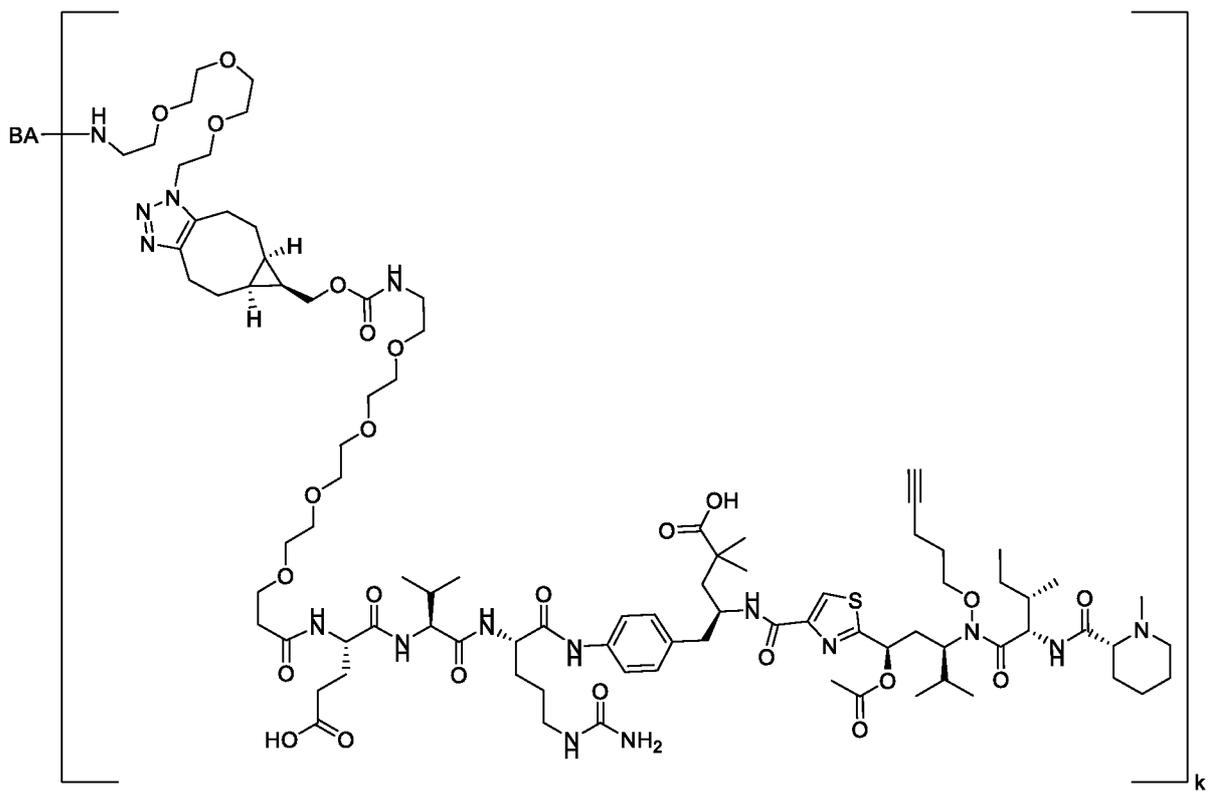
27. Соединение по п.24, где a имеет значение 1; и R^6 представляет собой

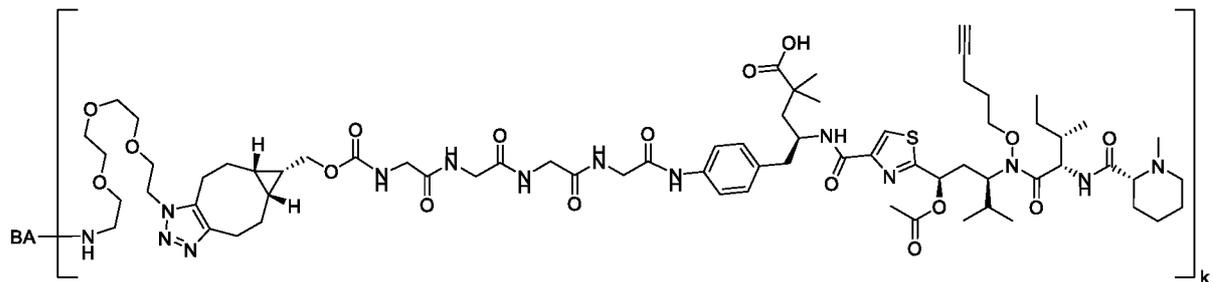
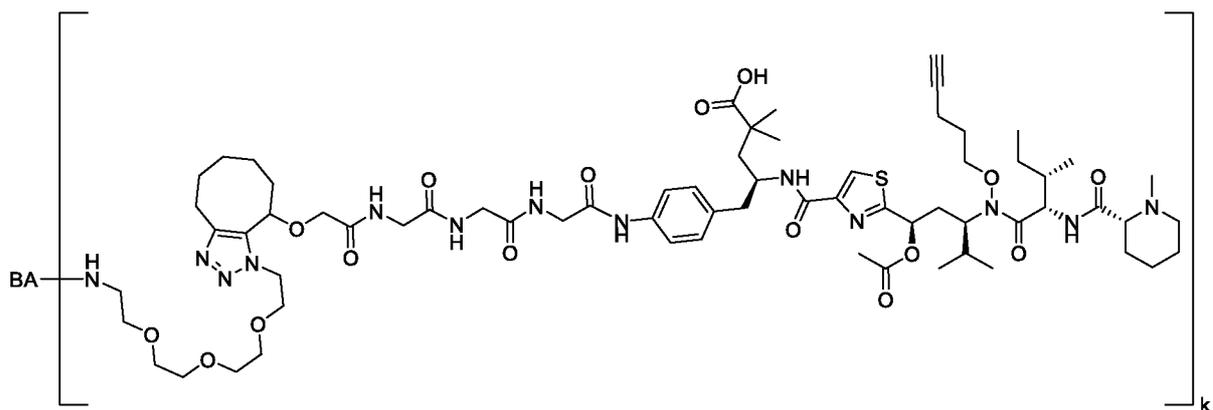
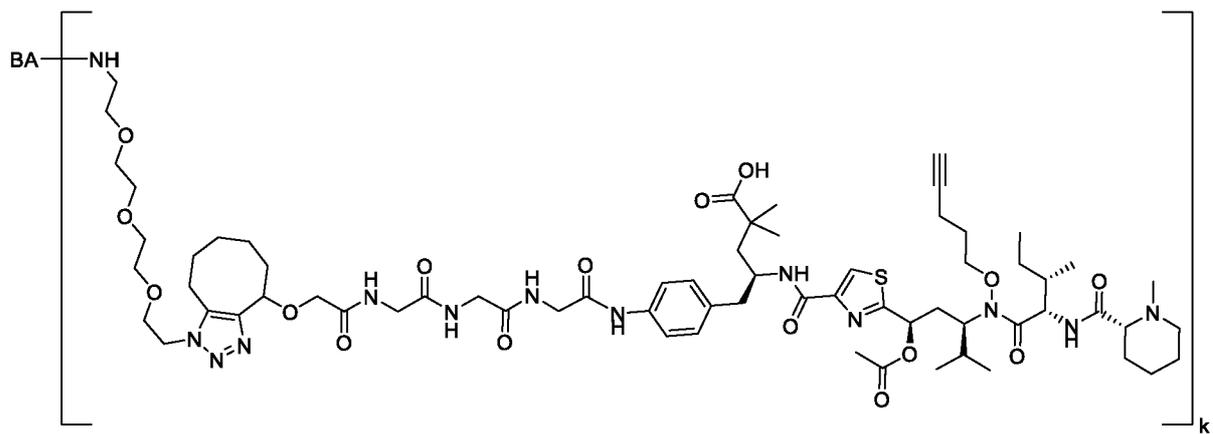


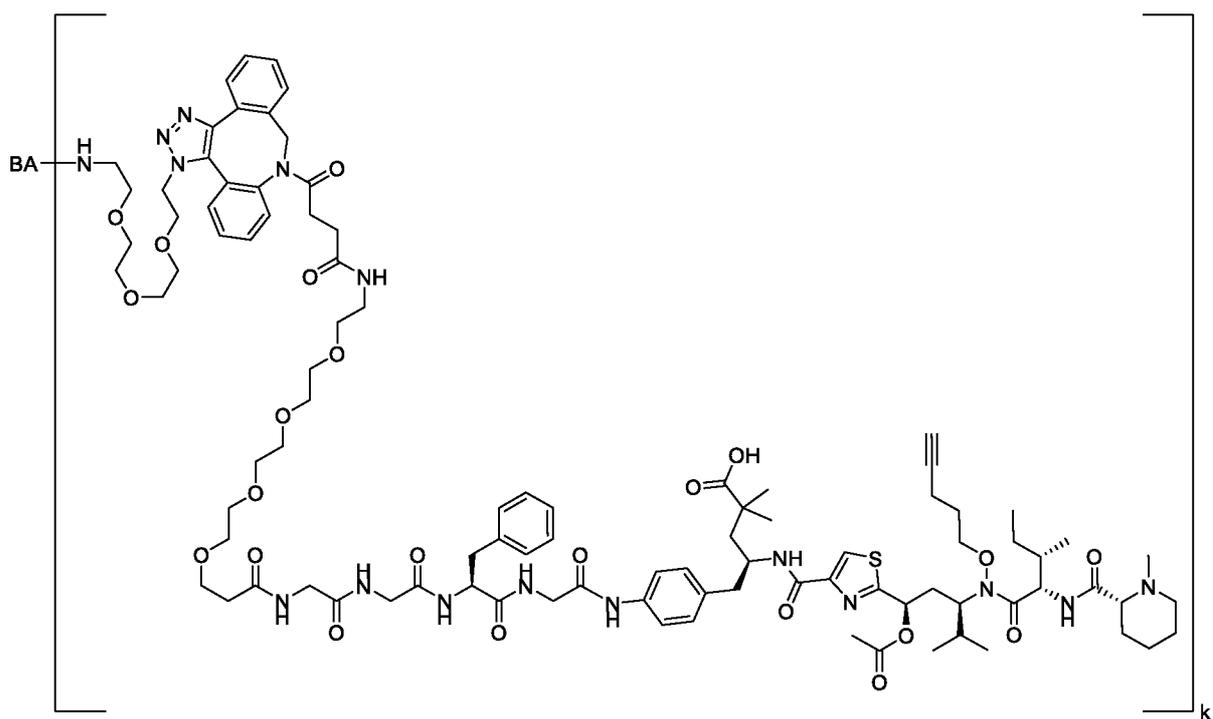
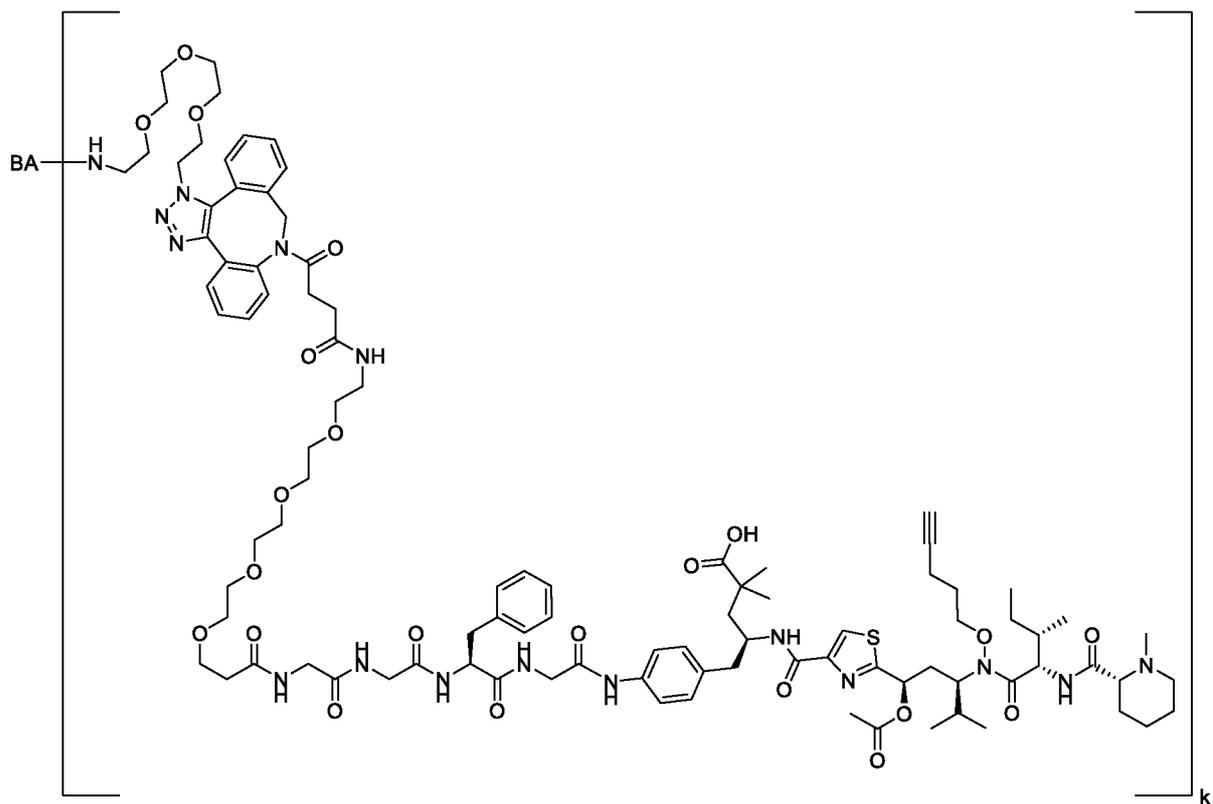
28. Соединение по п.21, где R^7 представляет собой $-O-$; и R^8 представляет собой водород.

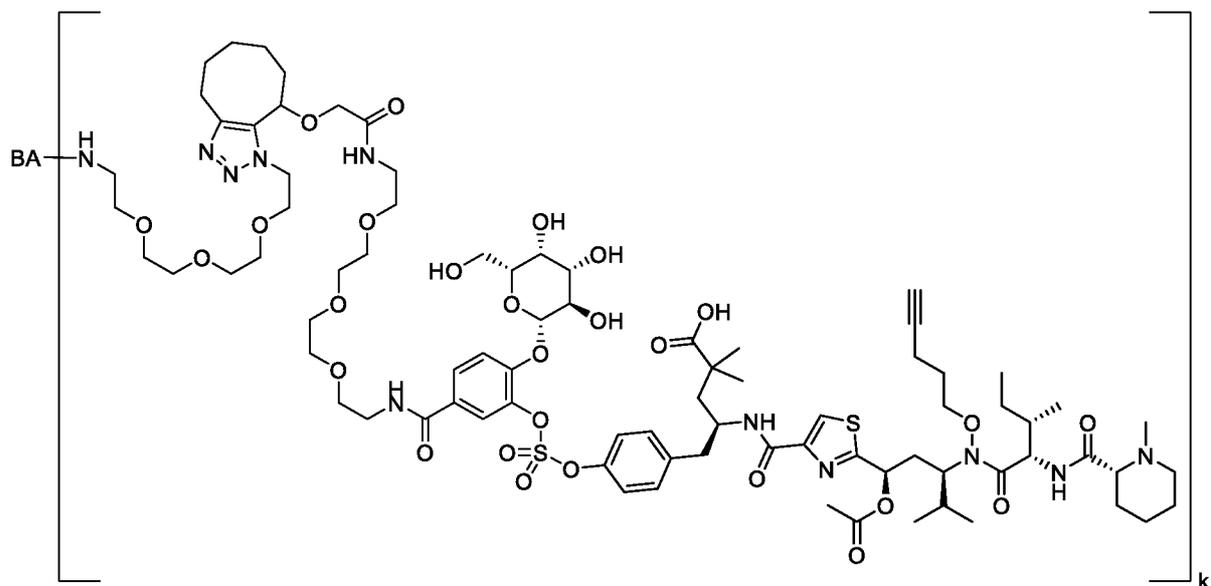
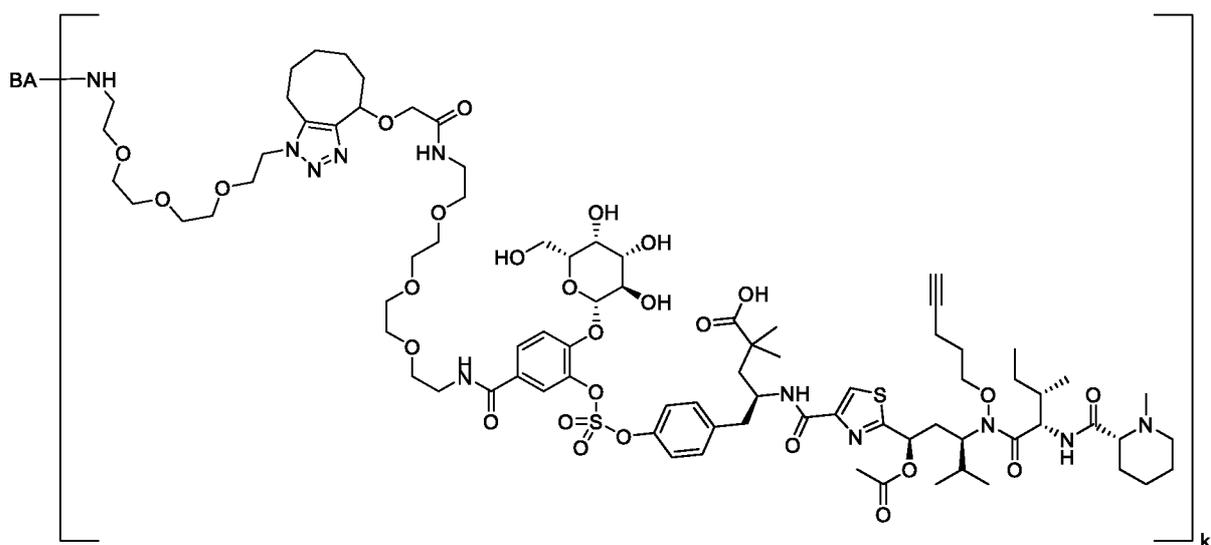
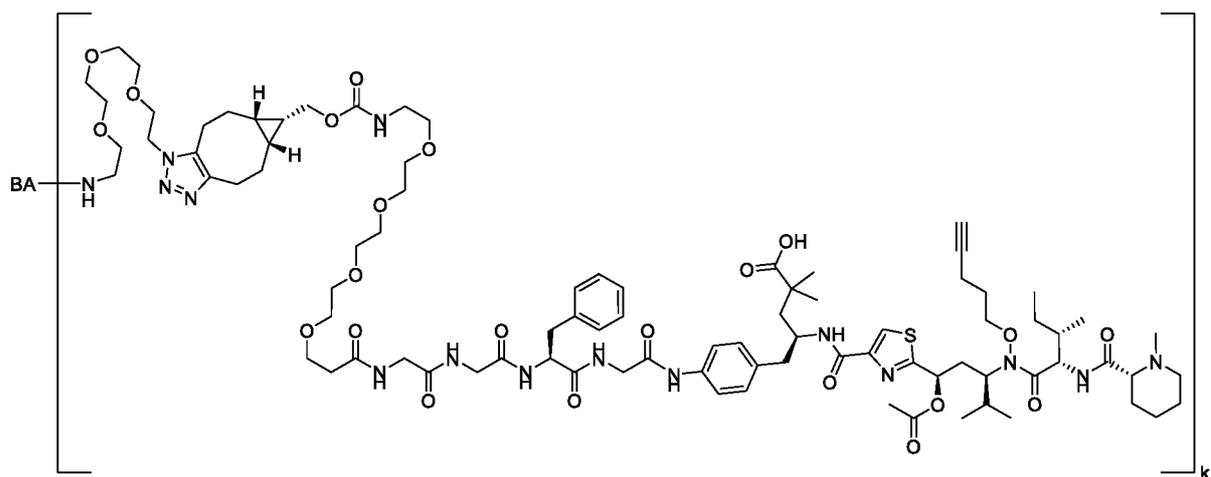
29. Соединение по п.4, выбранное из группы, состоящей из

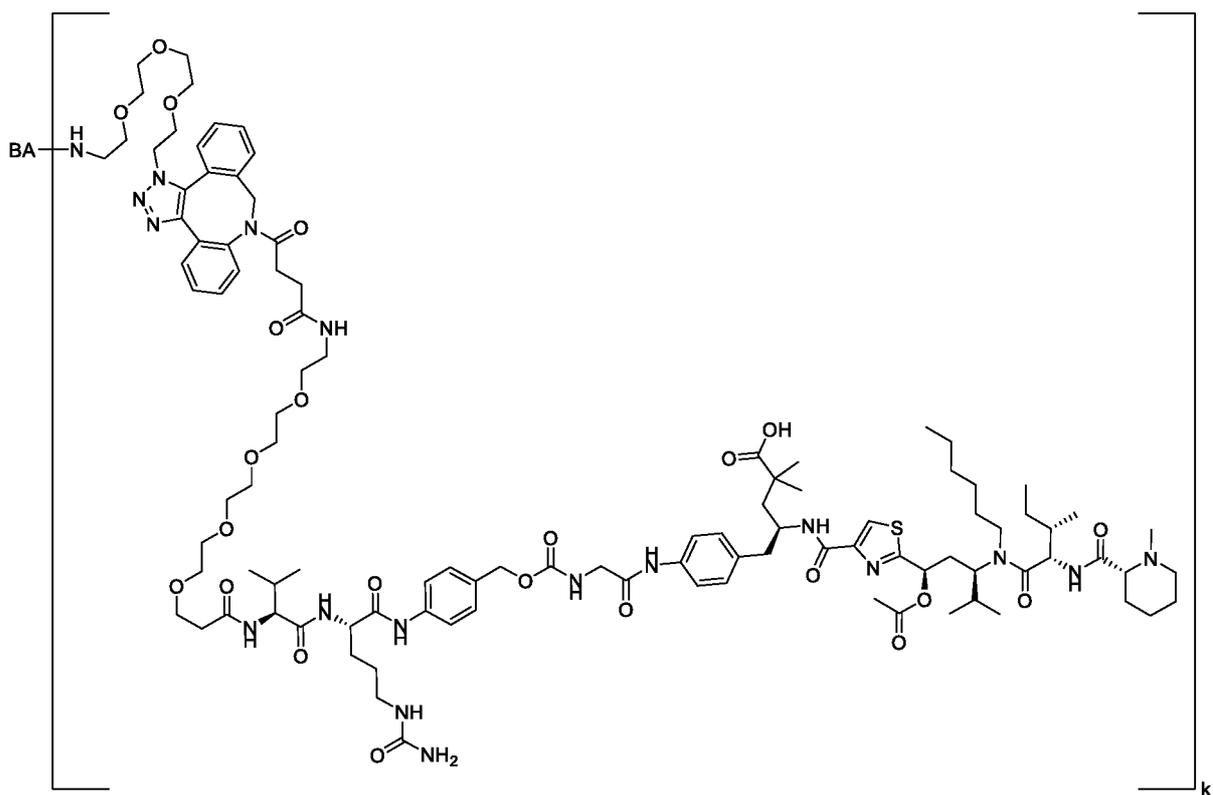
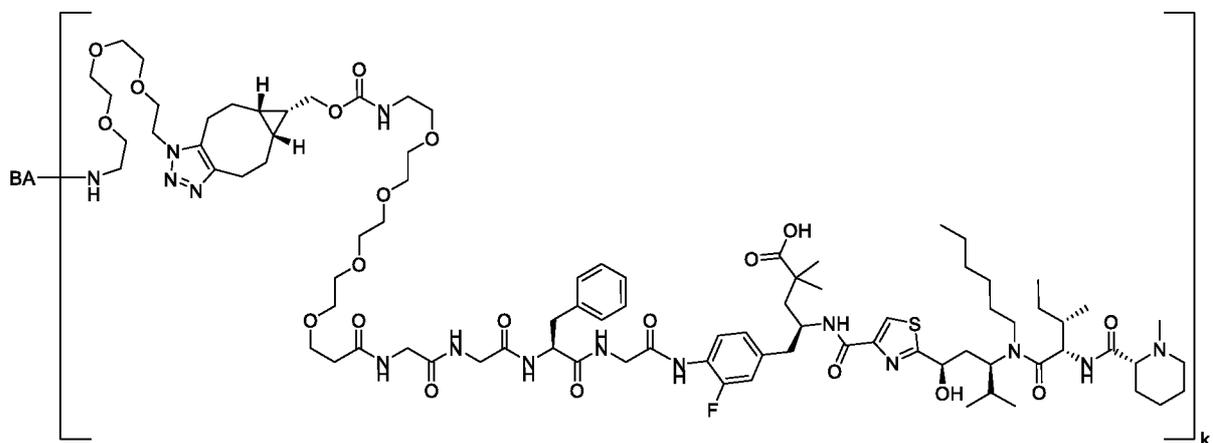
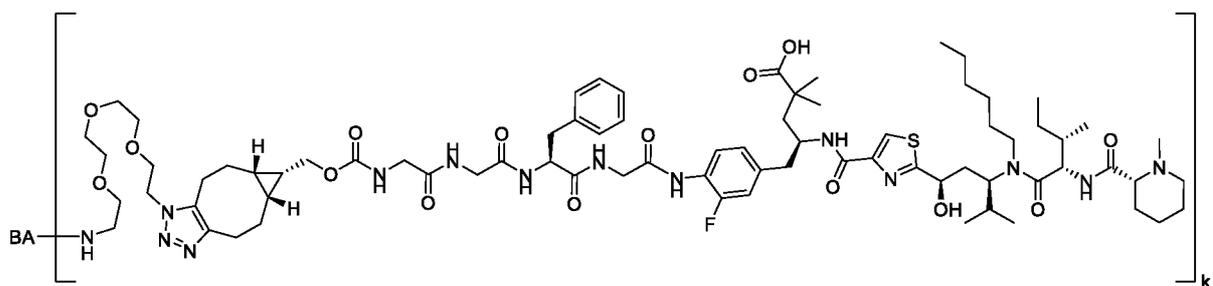


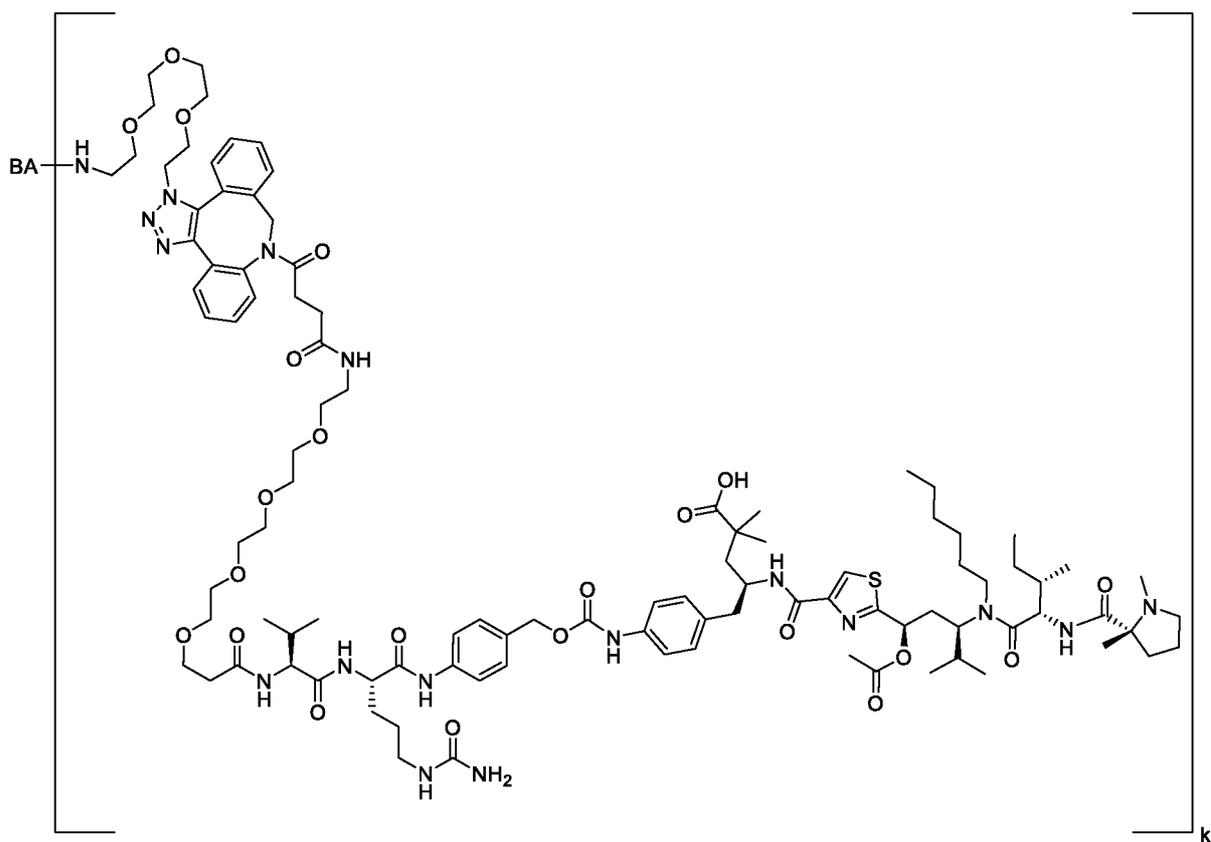
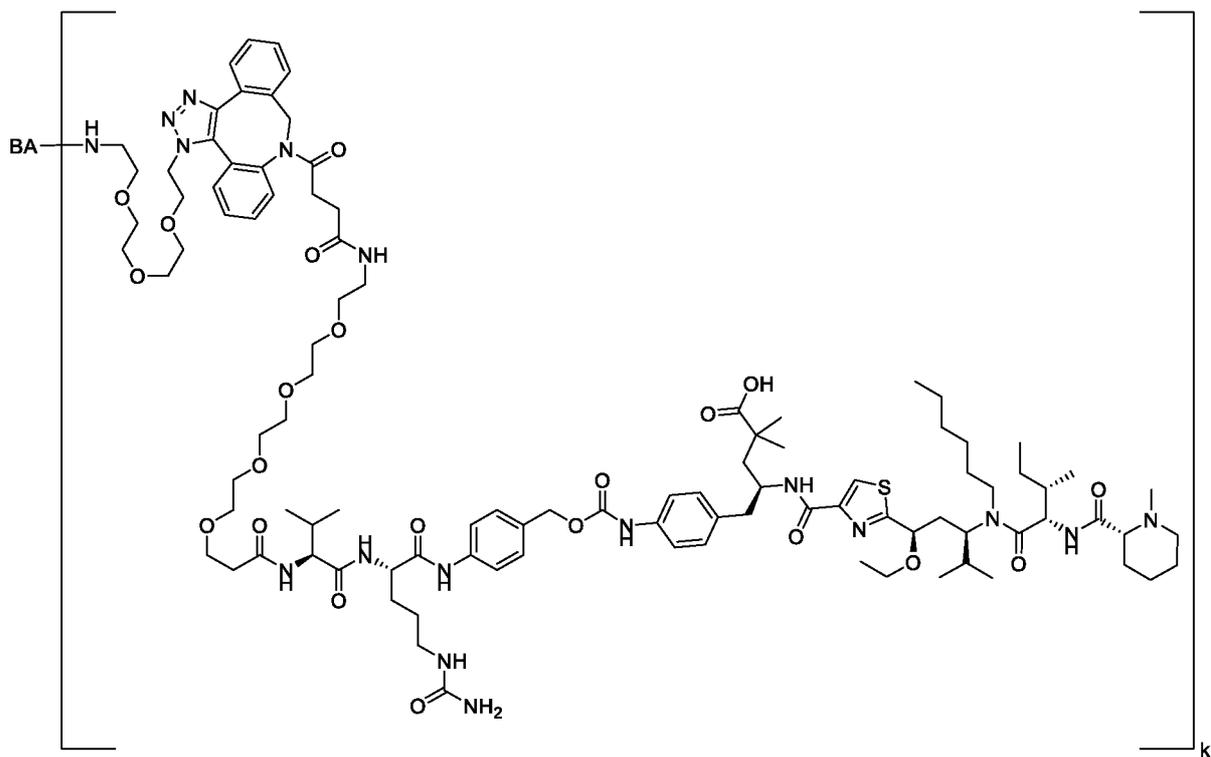


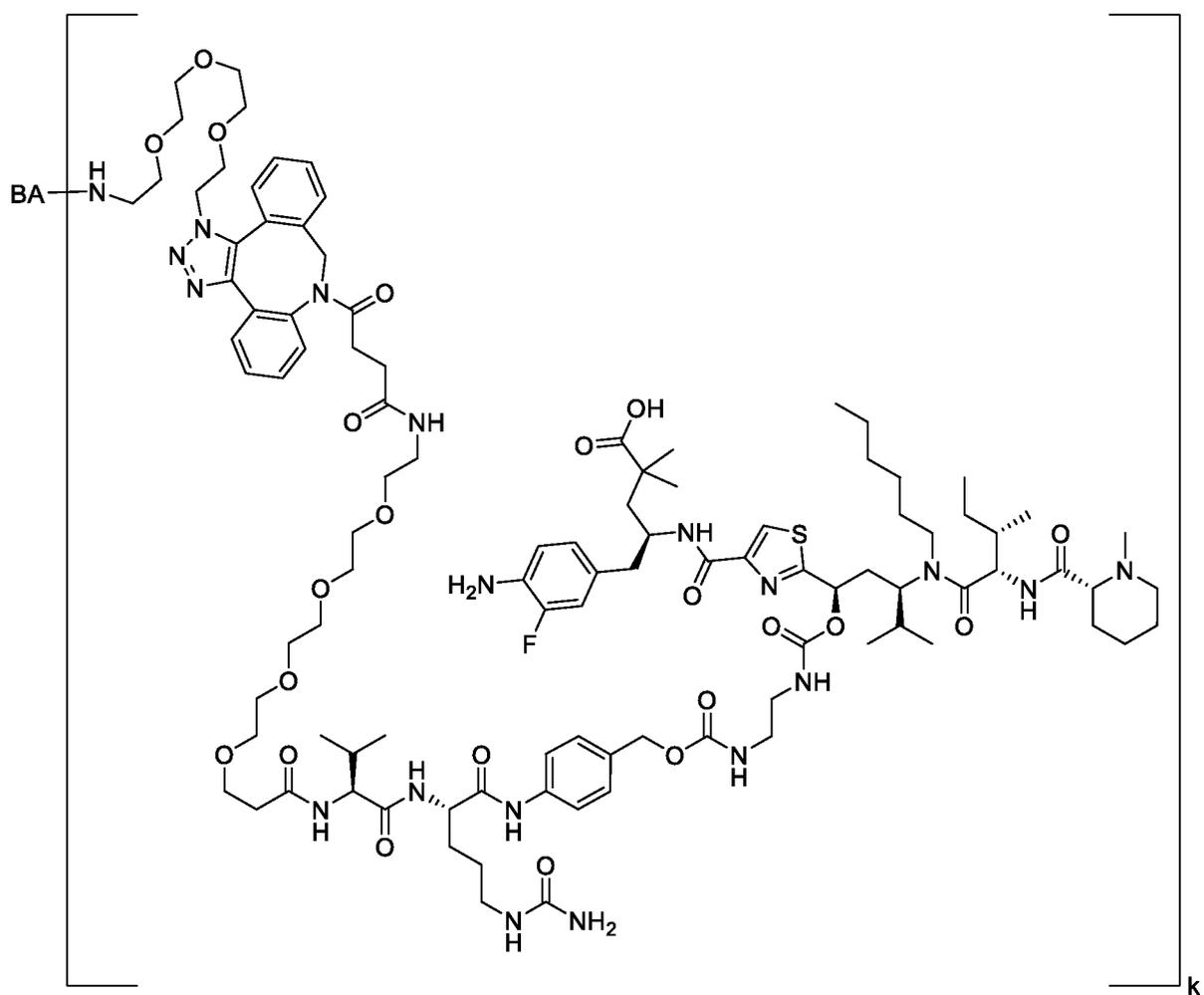
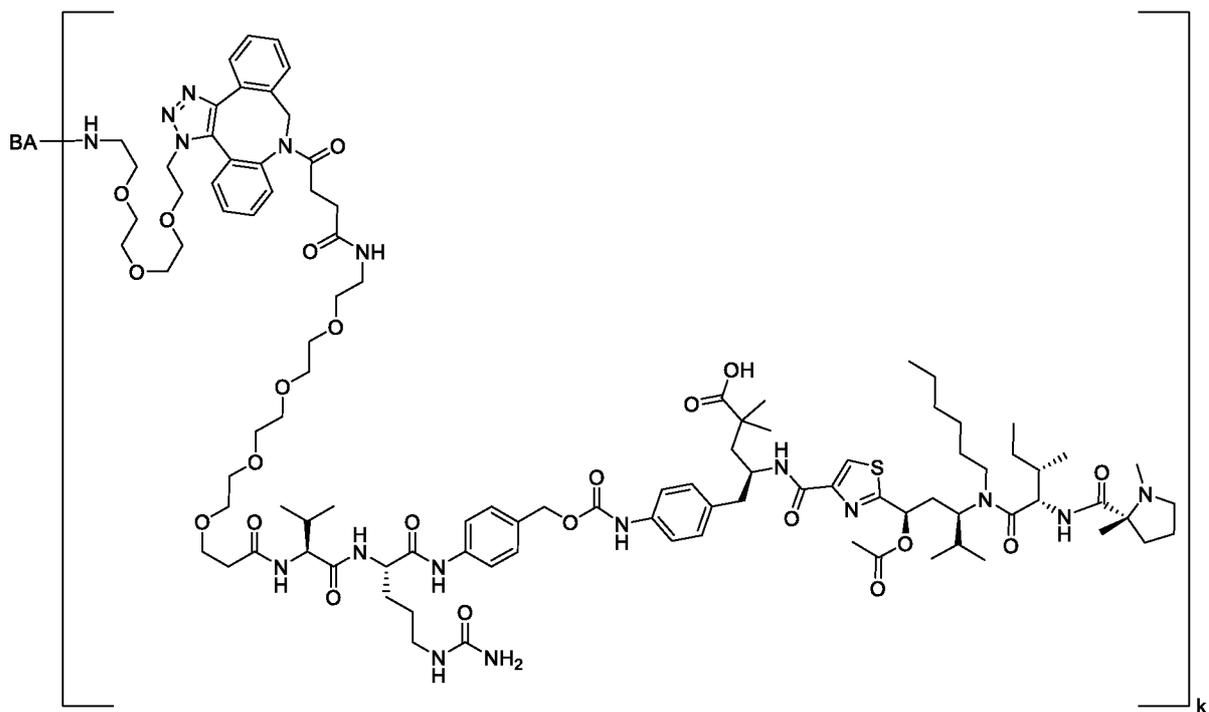


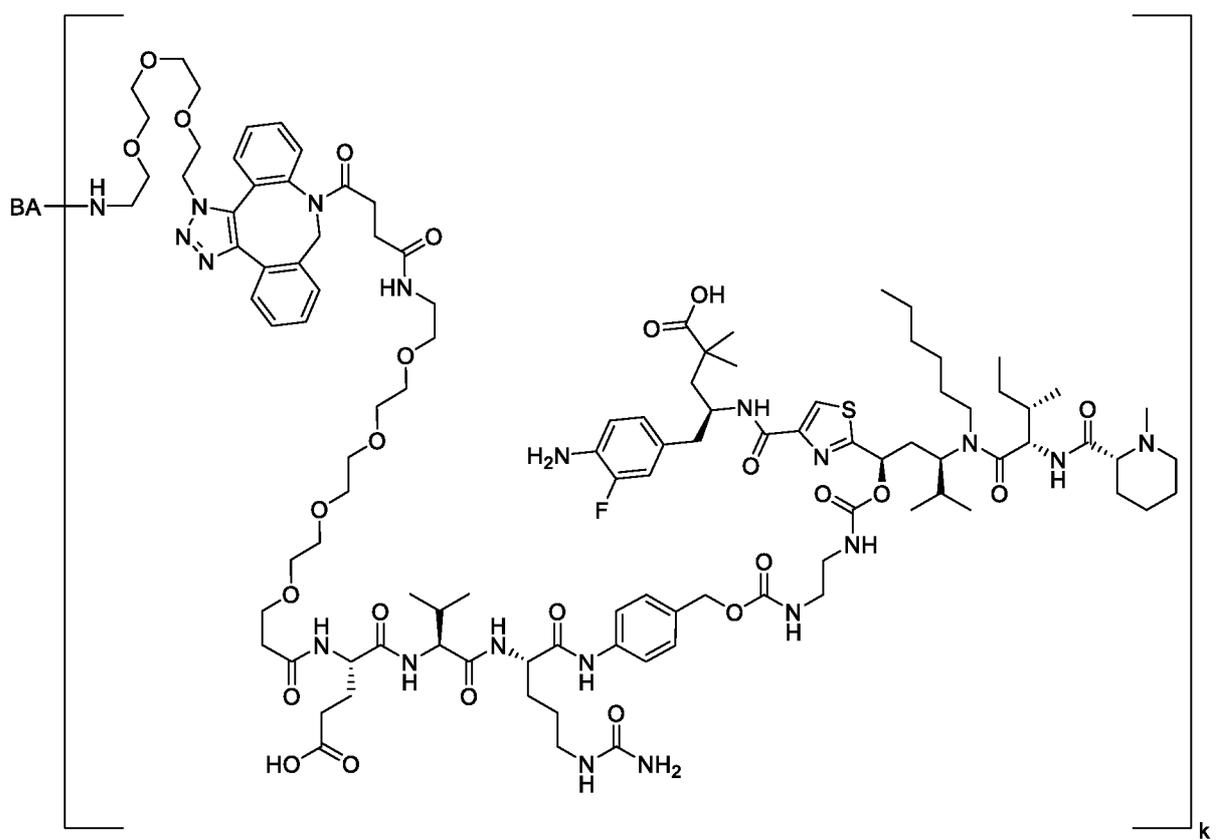
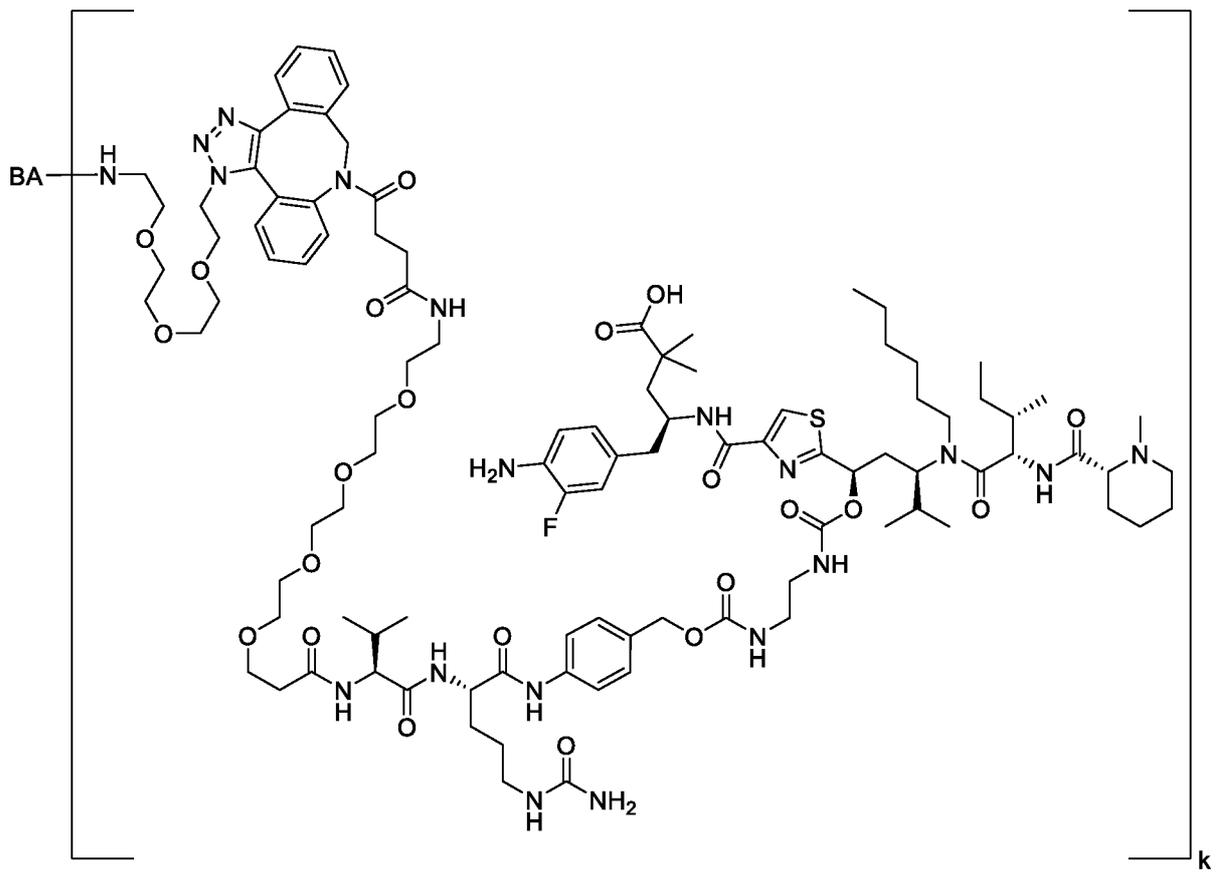


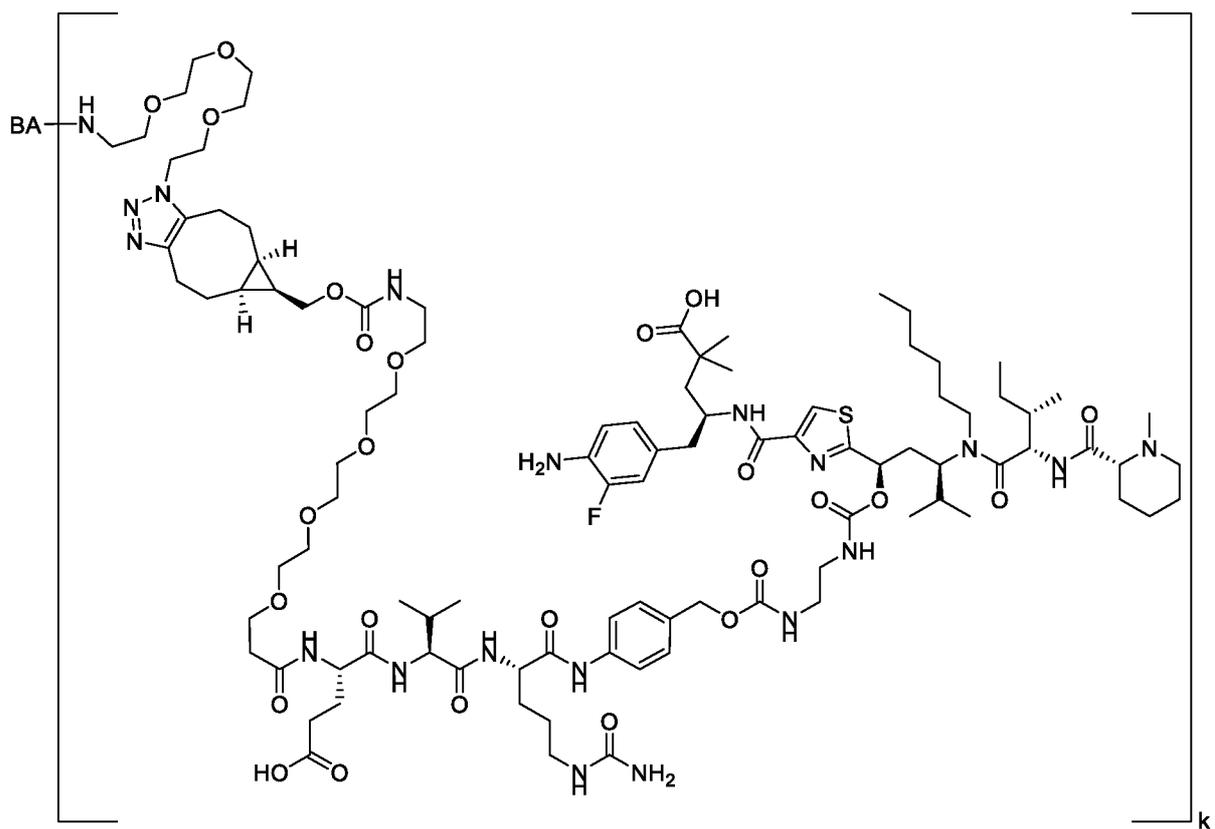
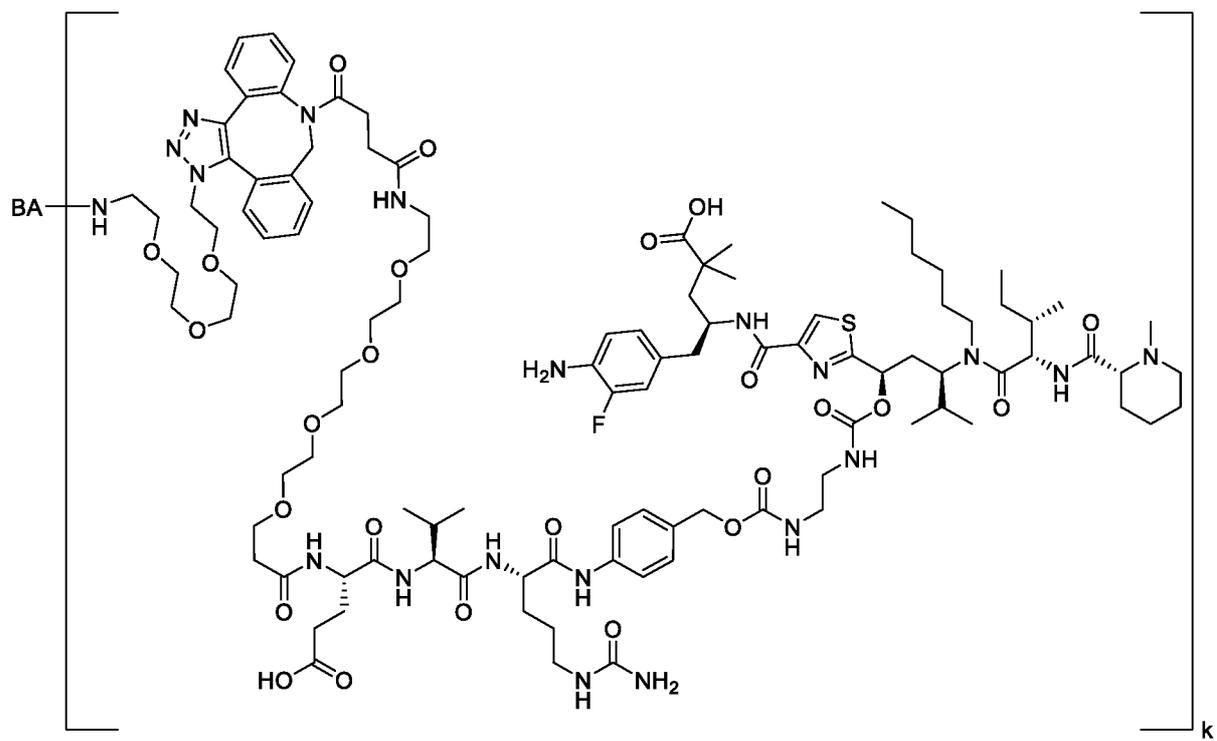


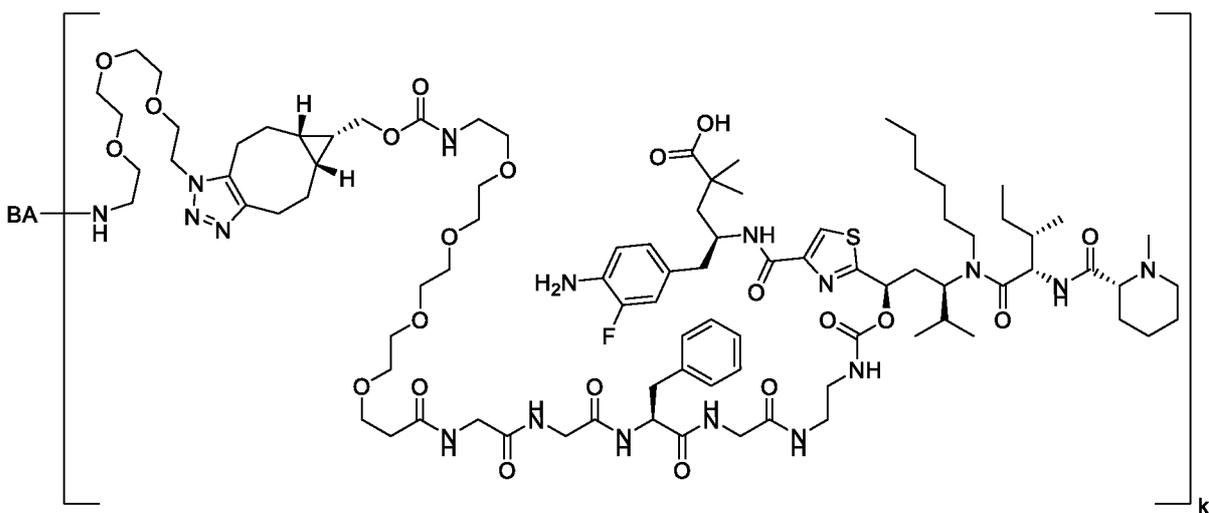
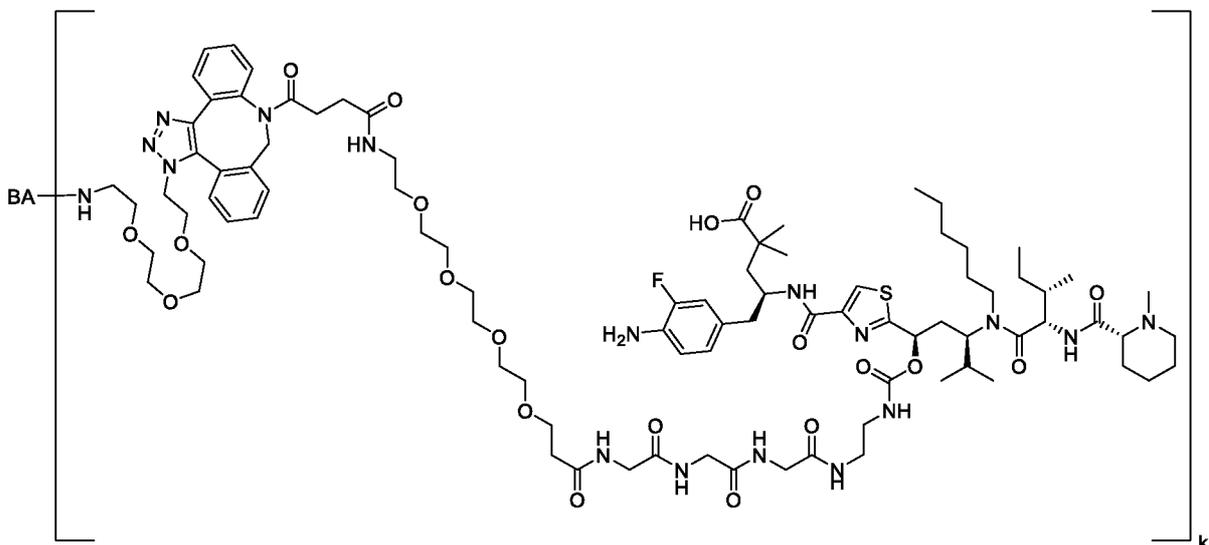
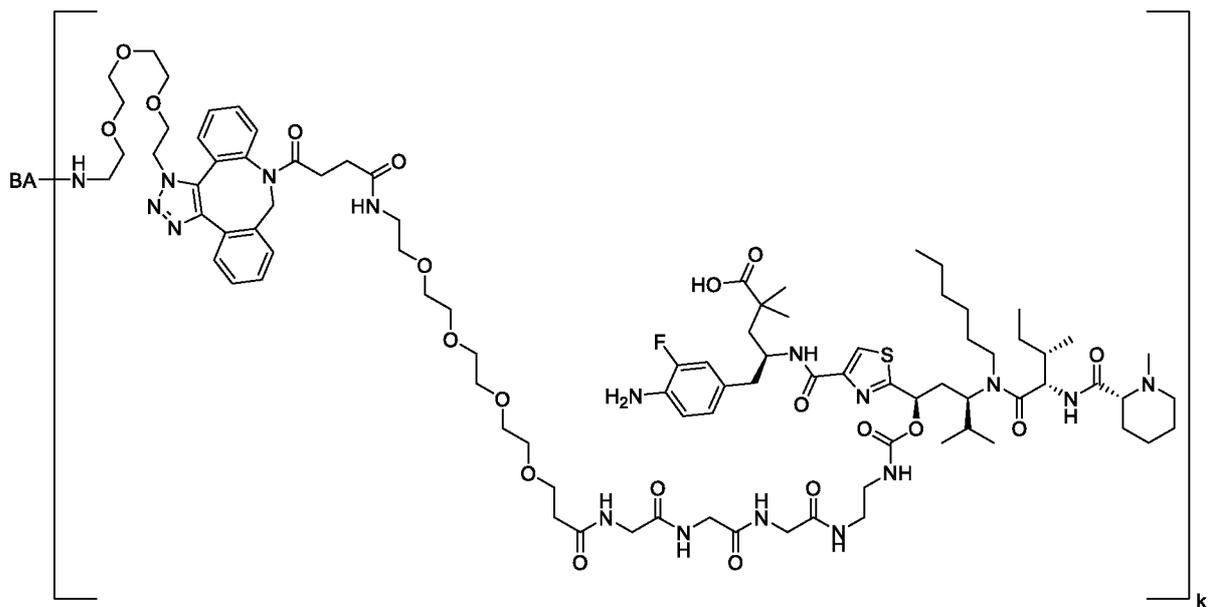


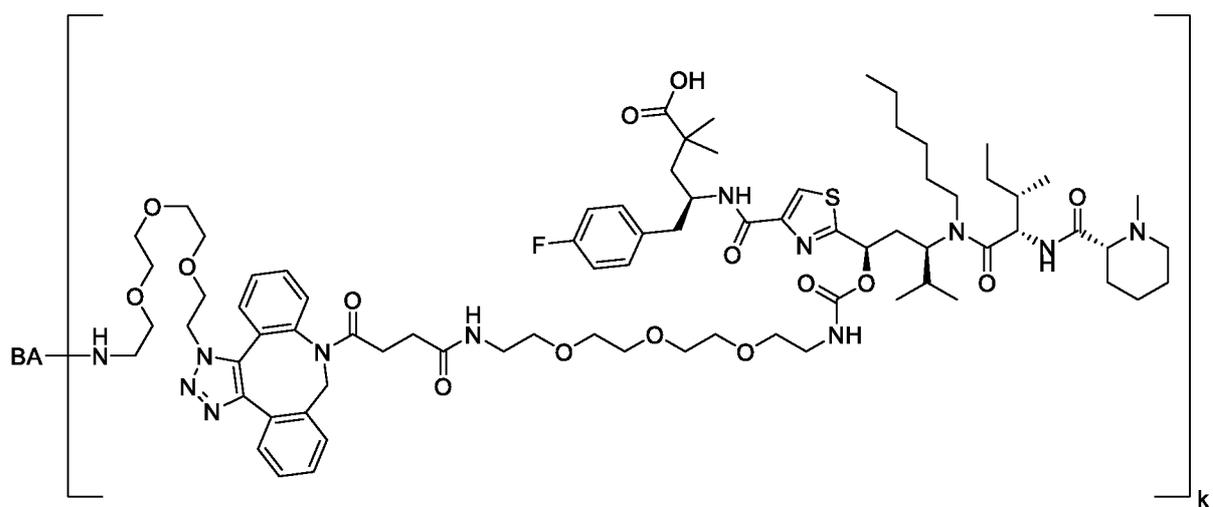
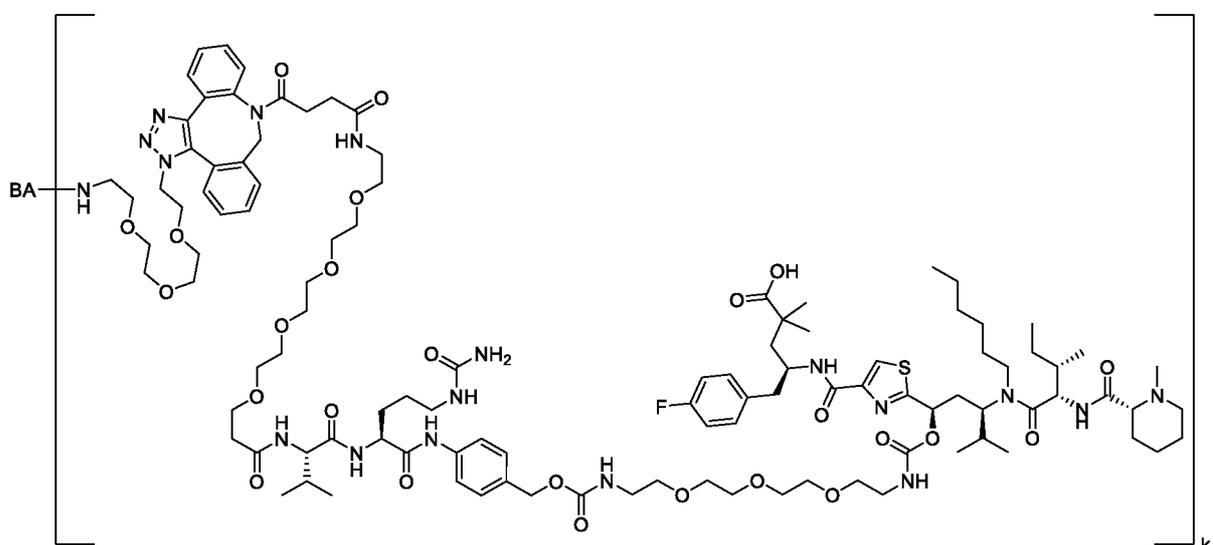
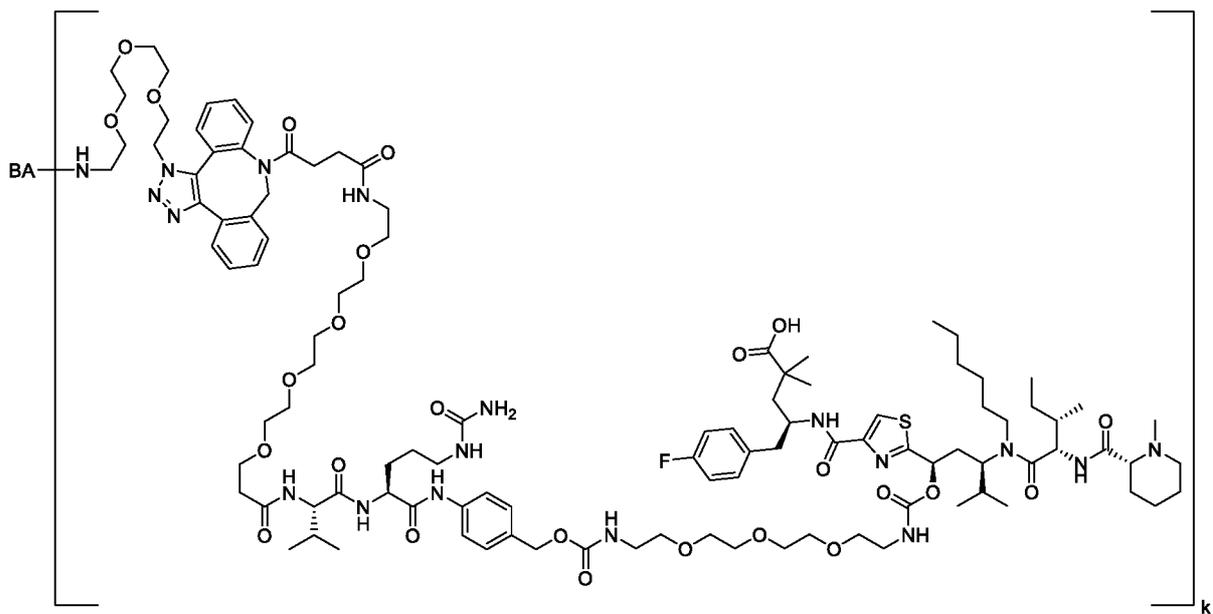


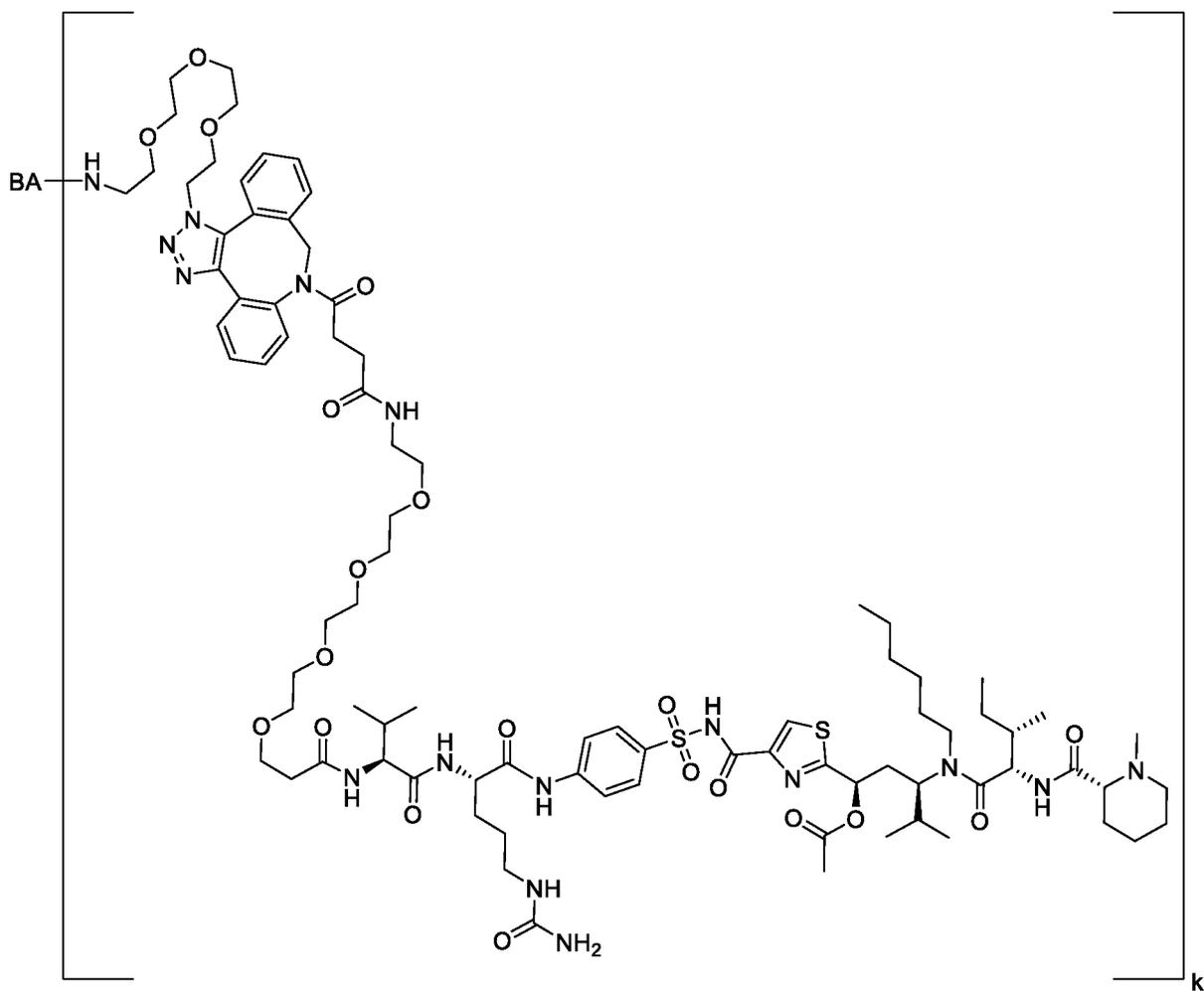
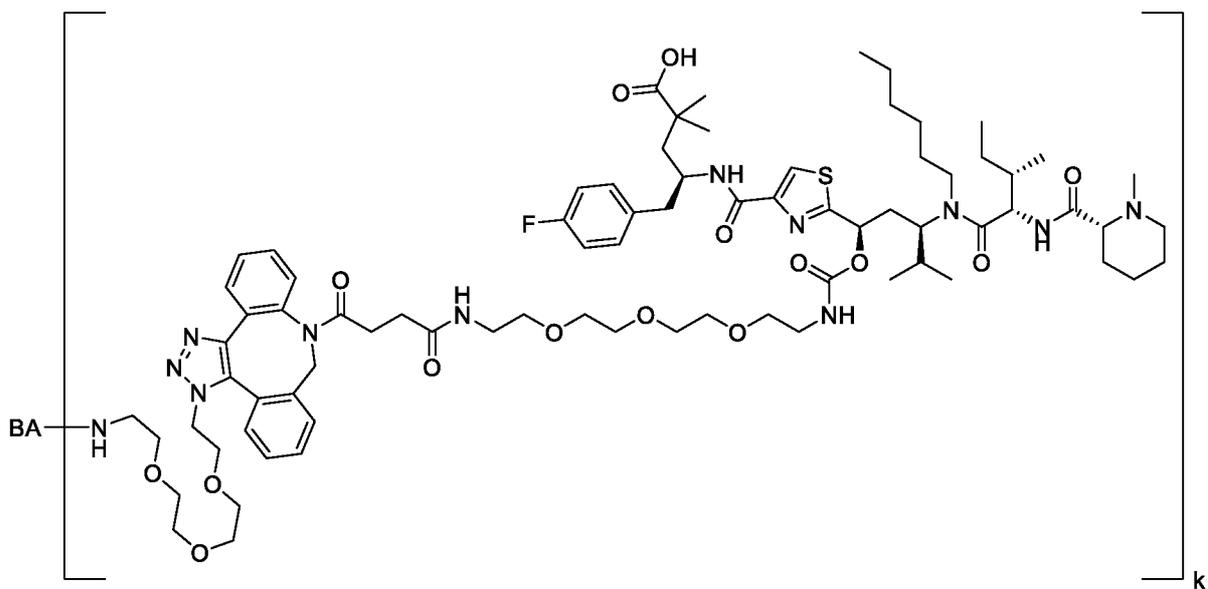


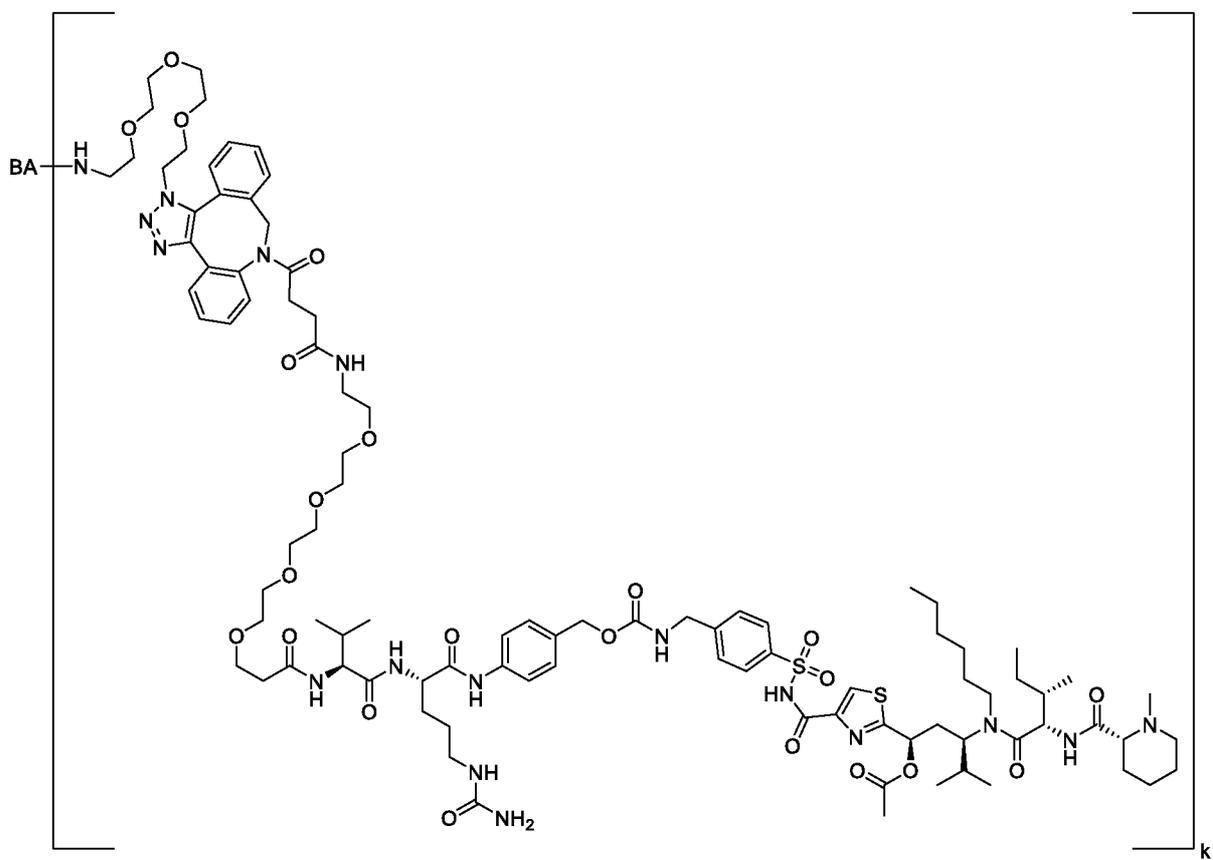
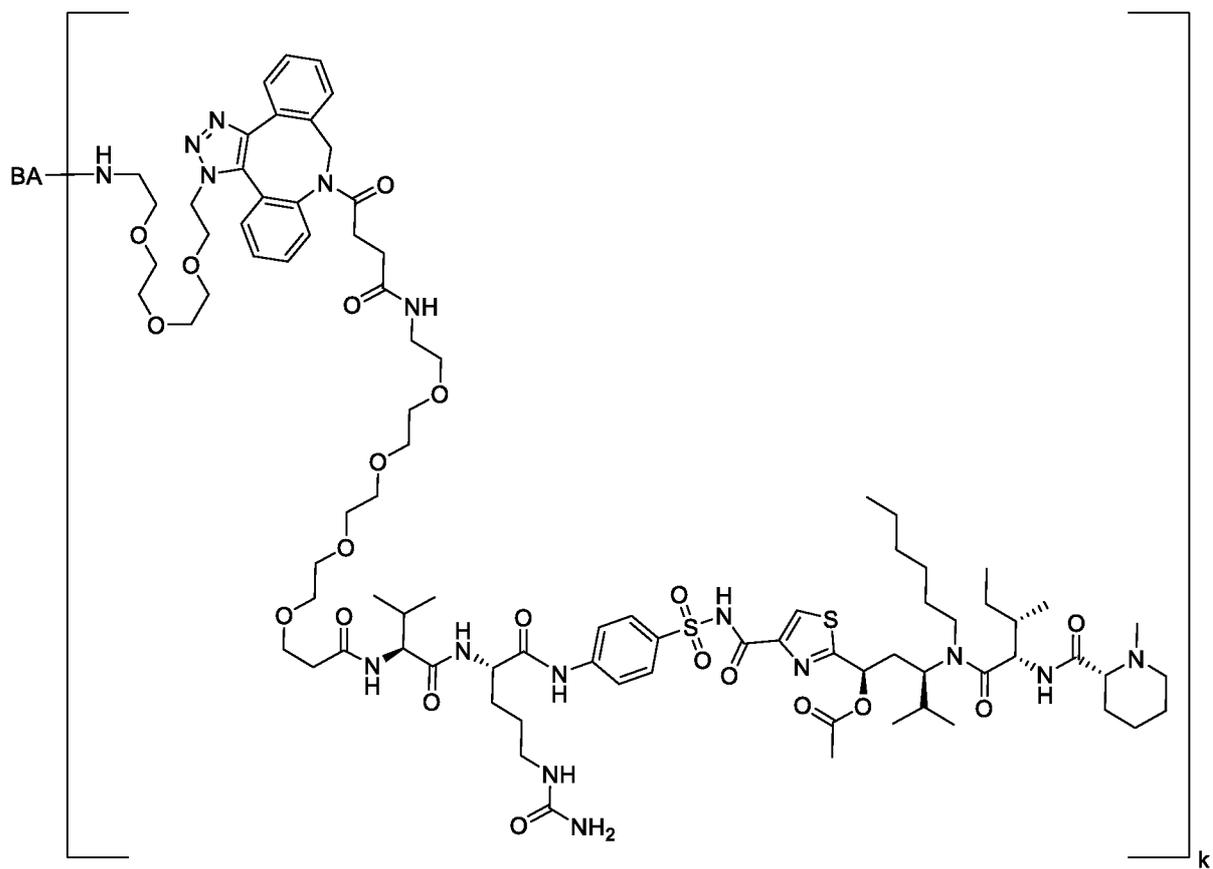


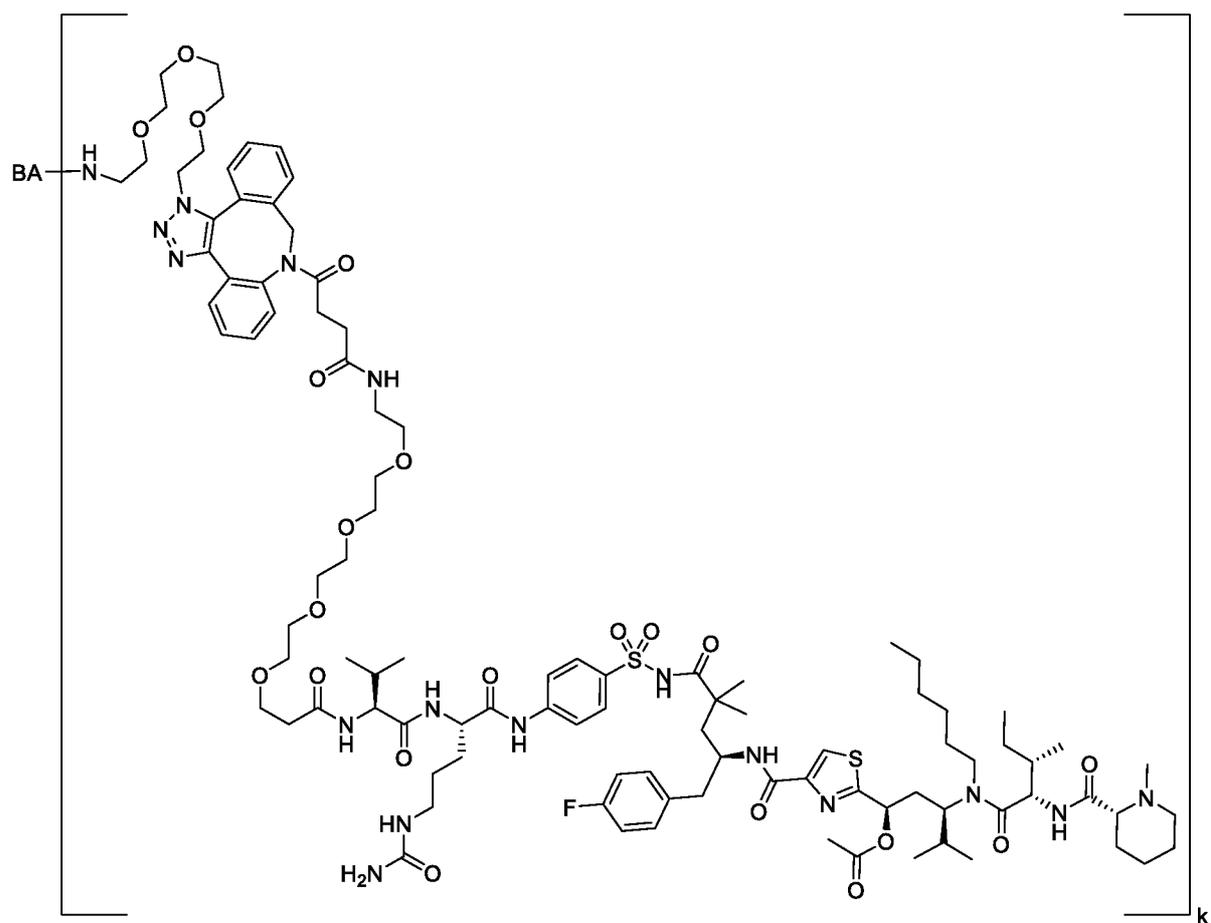
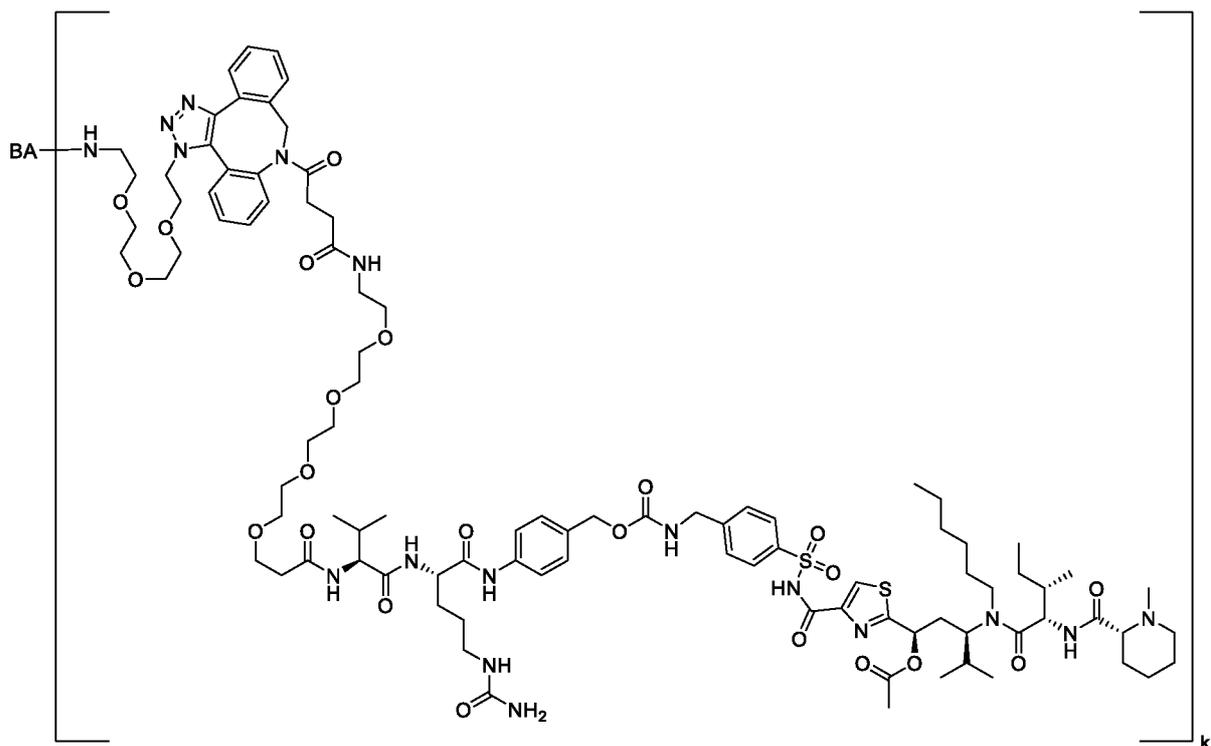


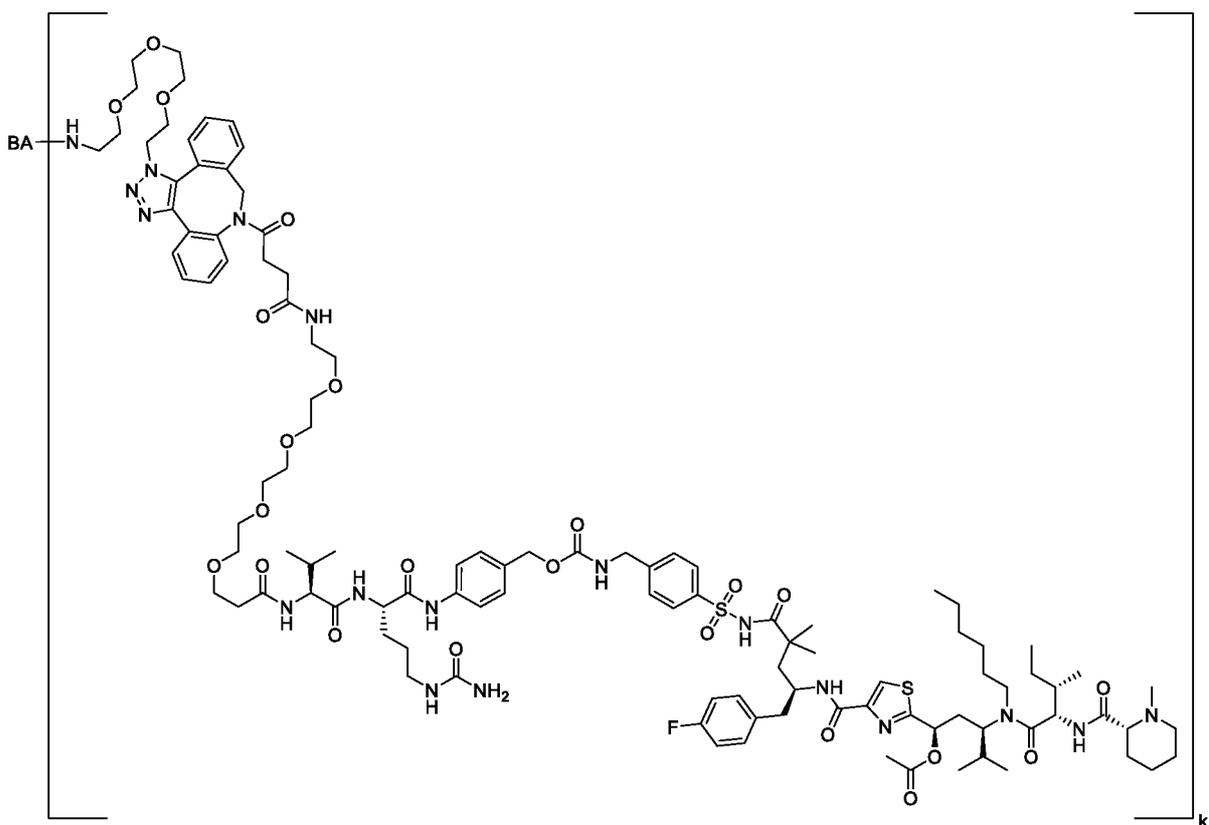
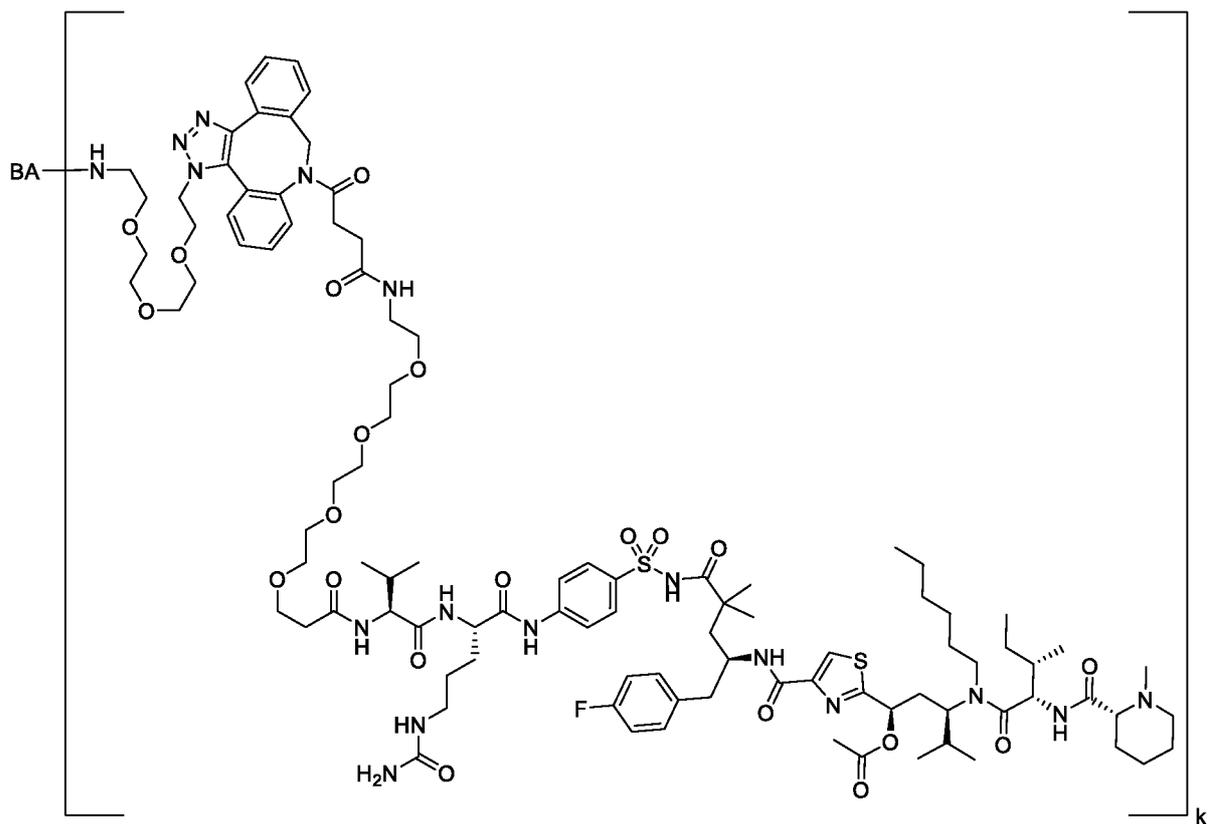


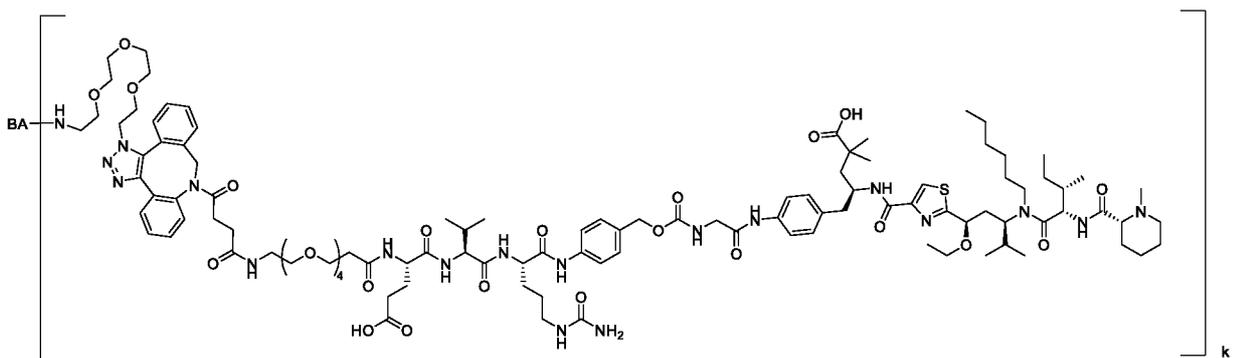
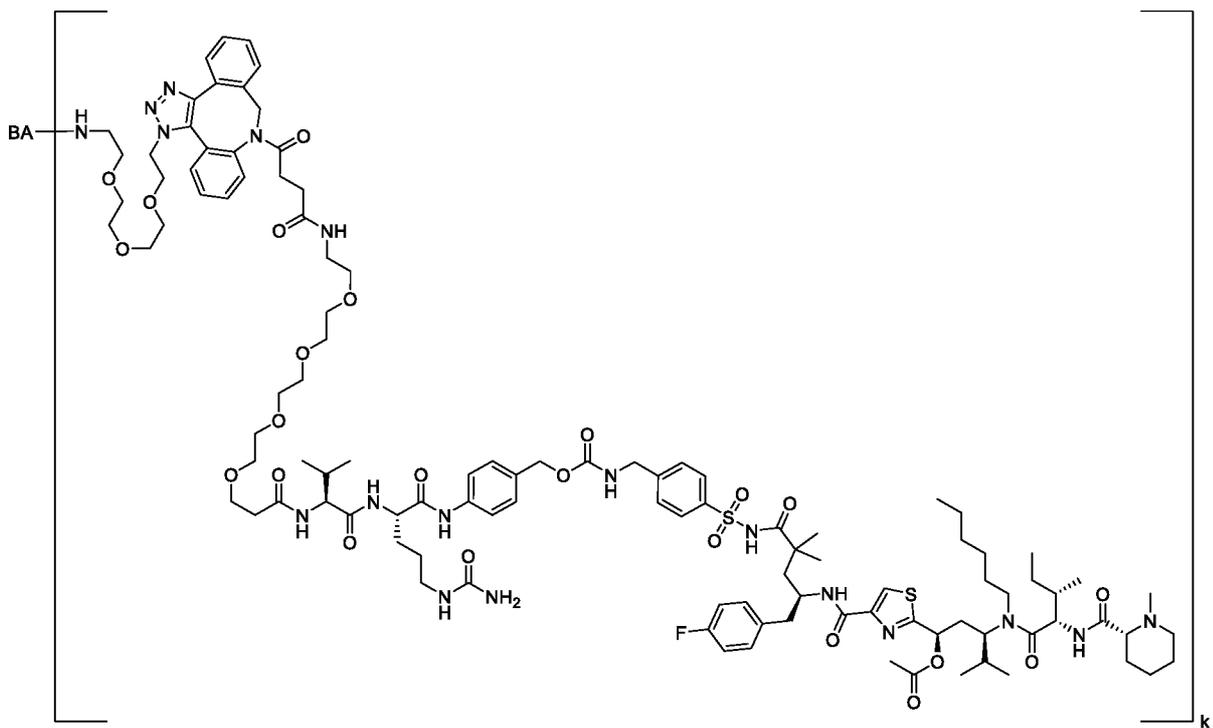




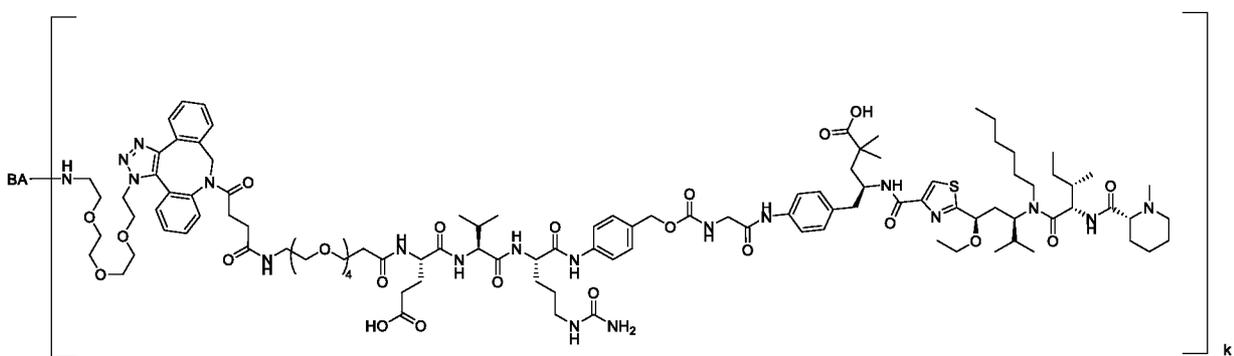








И



или его фармацевтически приемлемая соль,

при этом **ВА** представляет собой связующий агент; и **k** имеет значение 1, 2, 3 или 4.

30. Соединение по п.29, где **ВА** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

31. Соединение по п.29, где **ВА** представляет собой модифицированное транsgлутаминазой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие по меньшей мере один глутаминовый остаток, используемый для конъюгации.

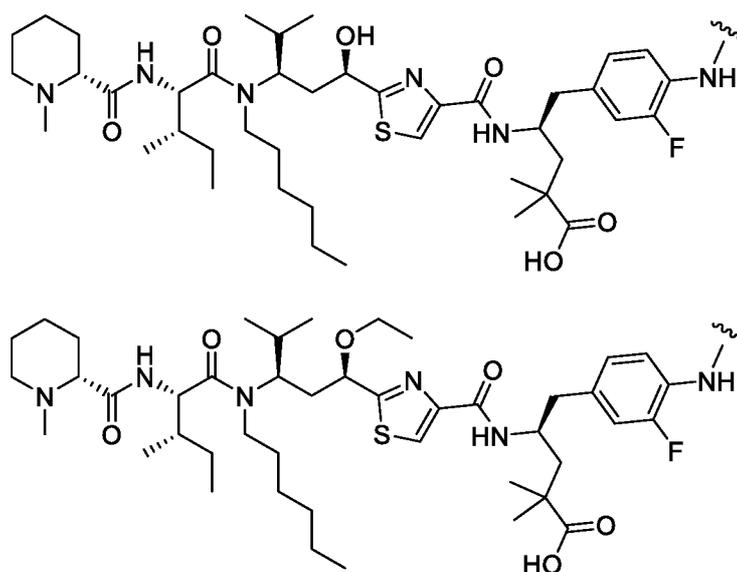
32. Соединение по п.29, где **ВА** представляет собой модифицированное транsgлутаминазой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие по меньшей мере два глутаминовых остатка, используемых для конъюгации.

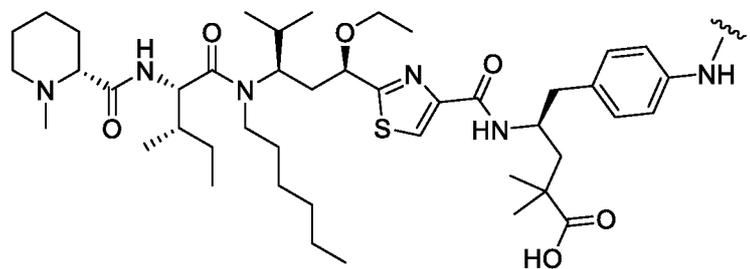
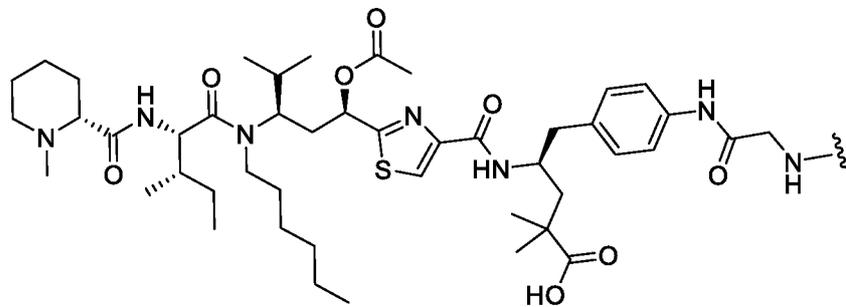
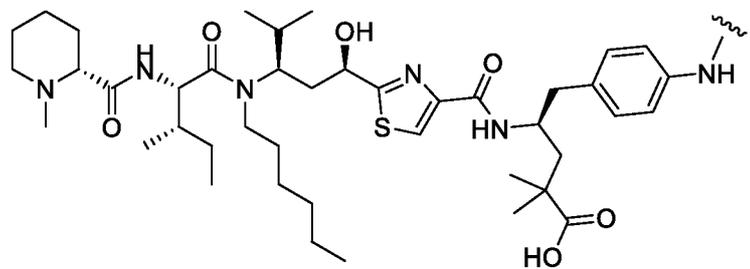
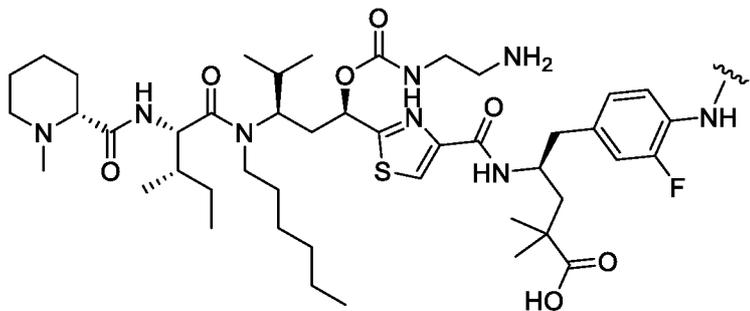
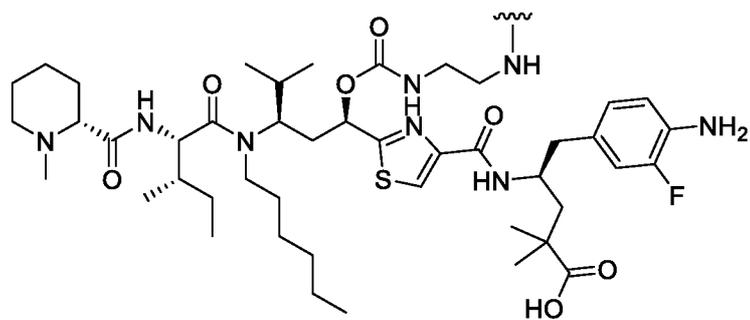
33. Соединение по п.29, где **ВА** представляет собой модифицированное транsgлутаминазой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие по меньшей мере четыре глутаминовых остатка, используемых для конъюгации.

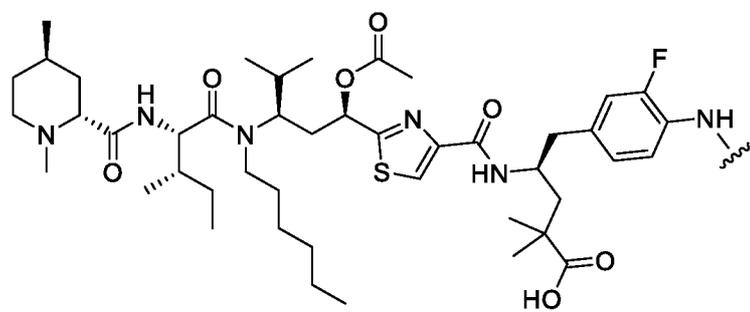
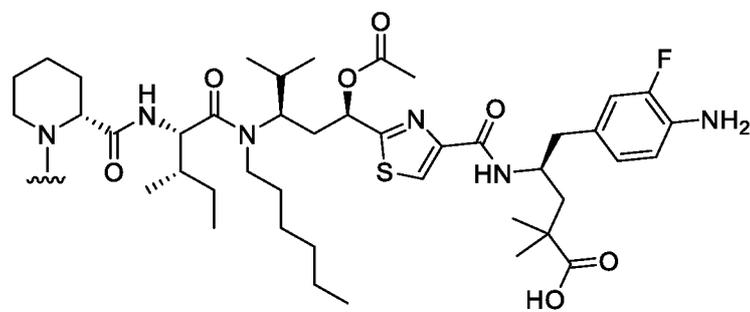
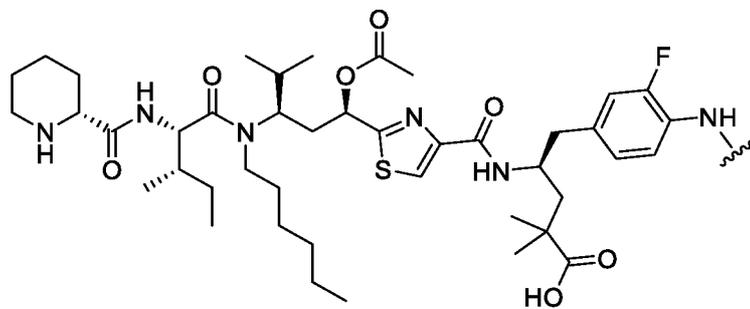
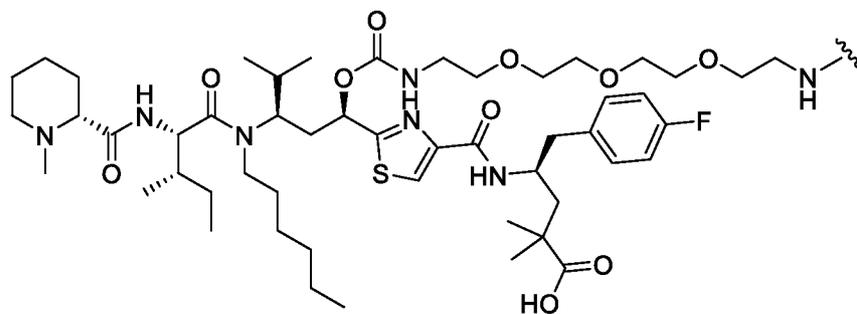
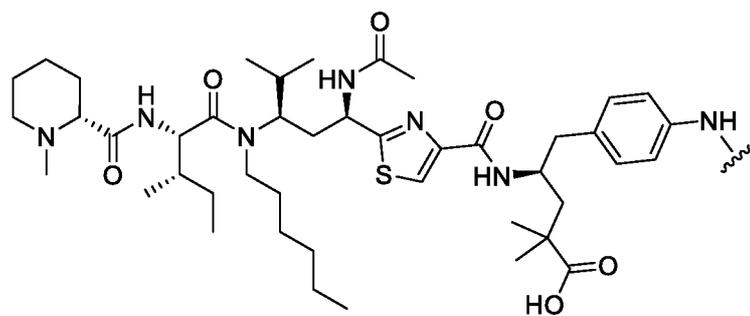
34. Соединение по п.33, где **ВА** представляет собой модифицированное транsgлутаминазой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом конъюгация осуществляется на двух остатках Q295; и **k** имеет значение 2.

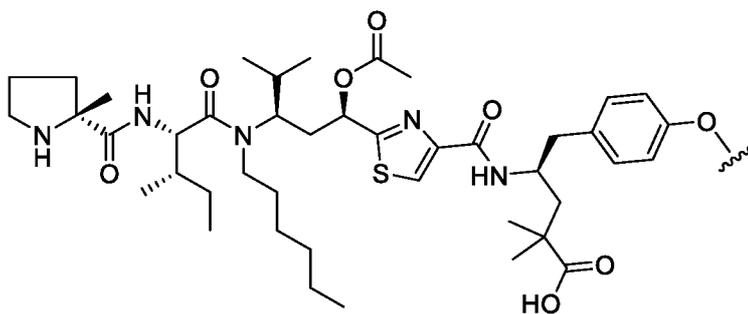
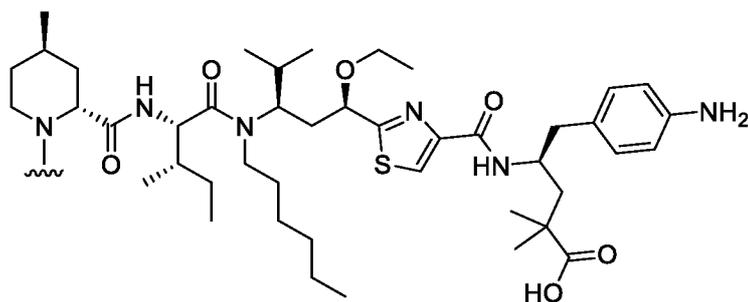
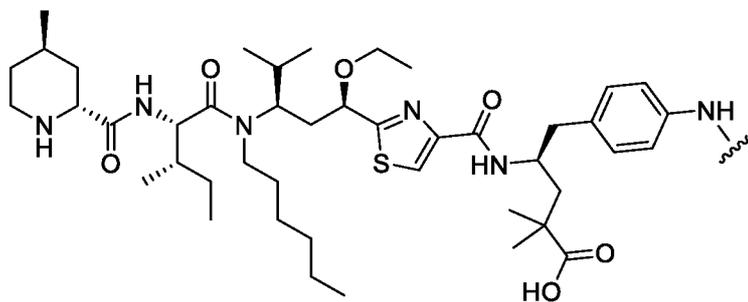
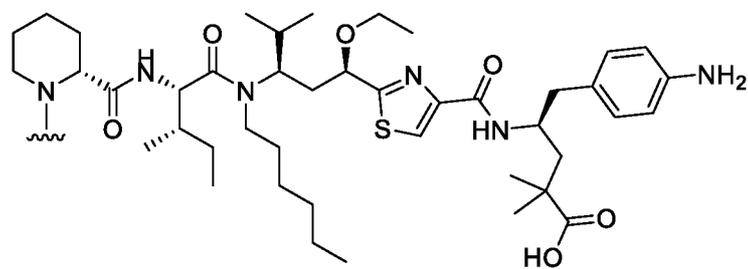
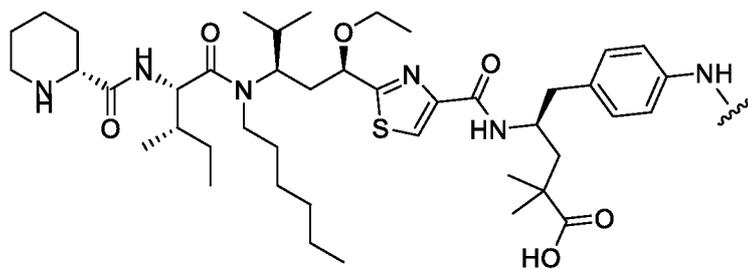
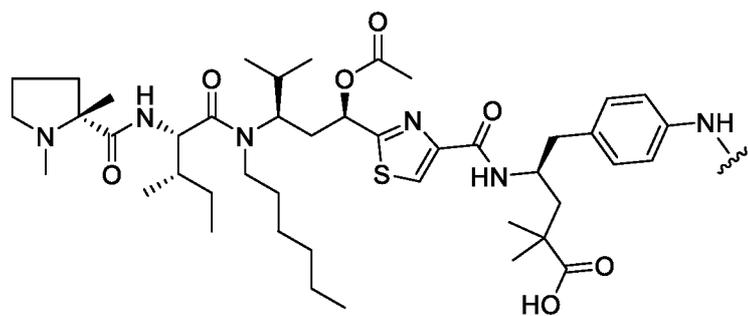
35. Соединение по п.33, где **ВА** представляет собой модифицированное транsgлутаминазой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом конъюгация осуществляется на двух остатках Q295 и двух остатках N297Q; и **k** имеет значение 4.

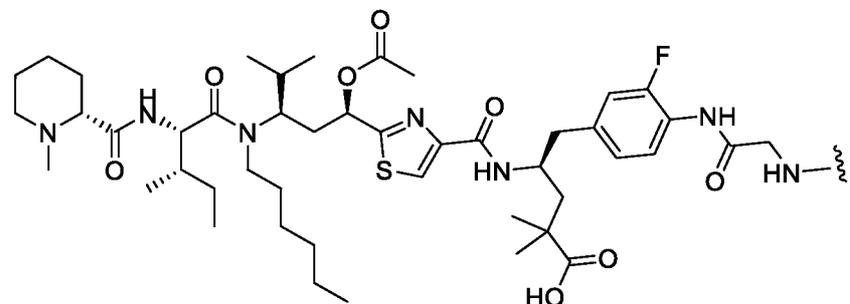
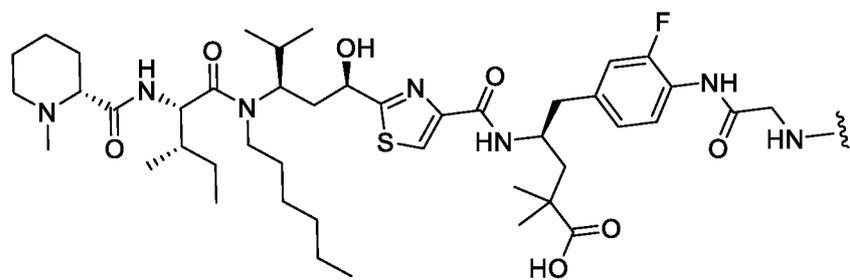
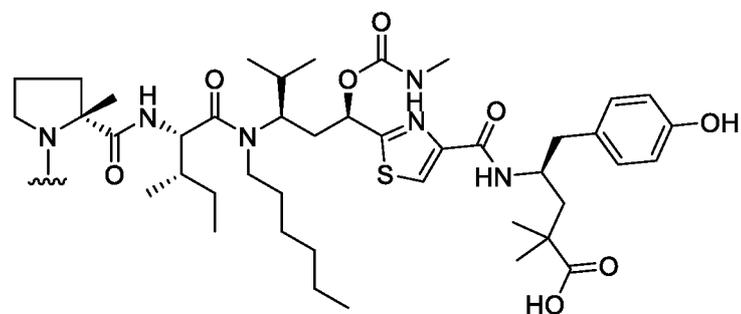
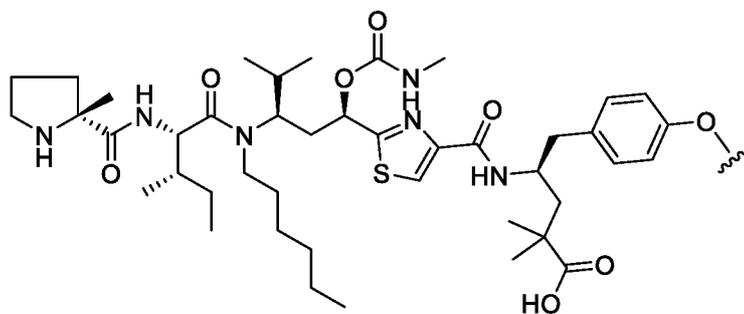
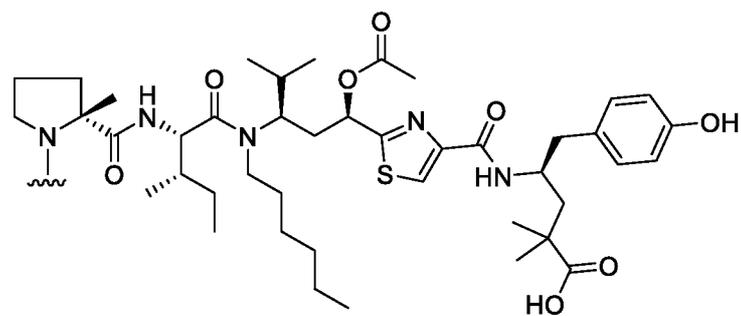
36. Соединение по п.1, где соединение является конъюгатом антитело-лекарственное средство, содержащим антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с соединением, выбранным из группы, состоящей из

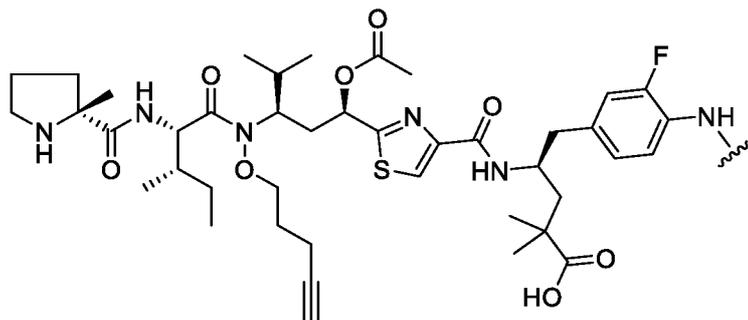
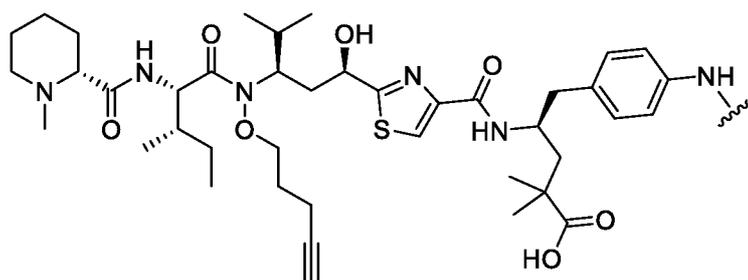
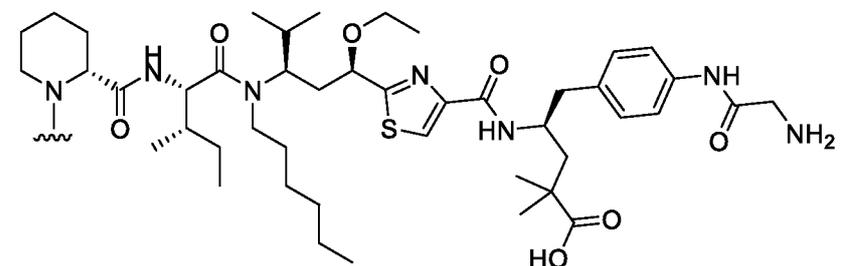
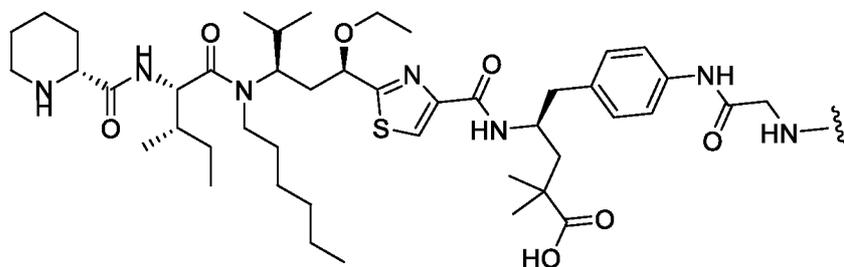
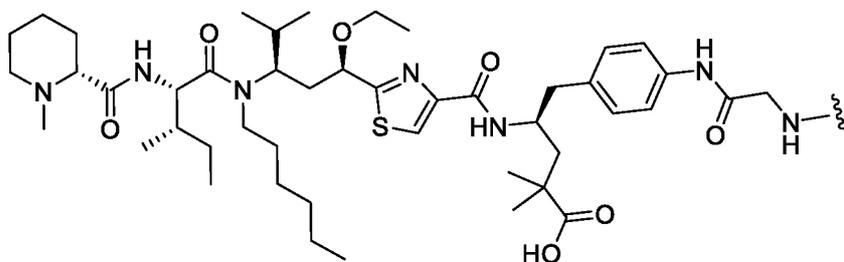
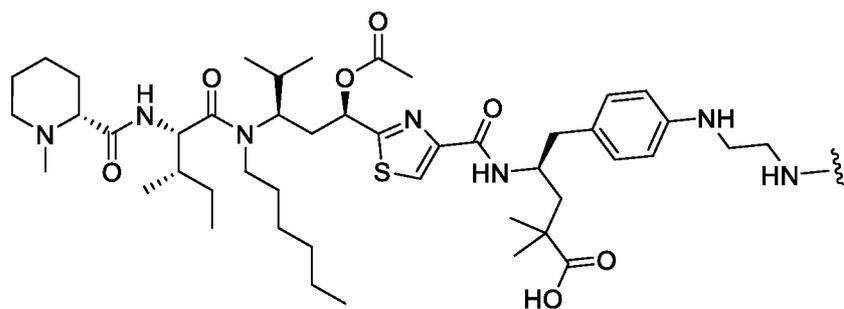


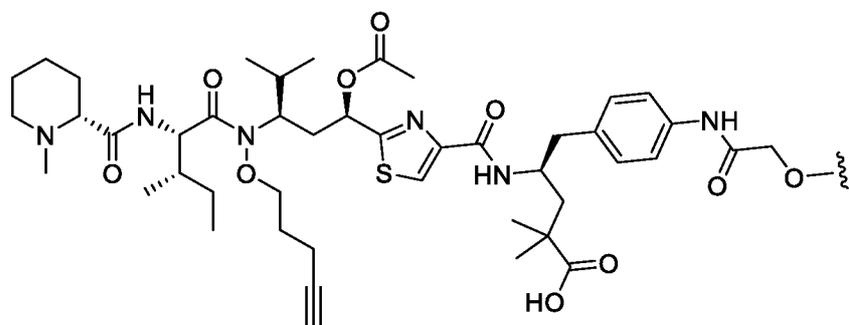
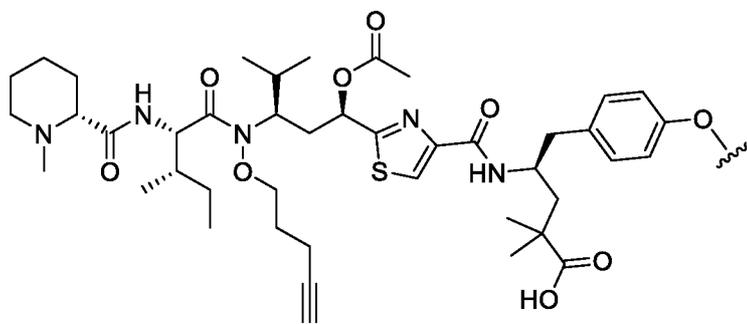
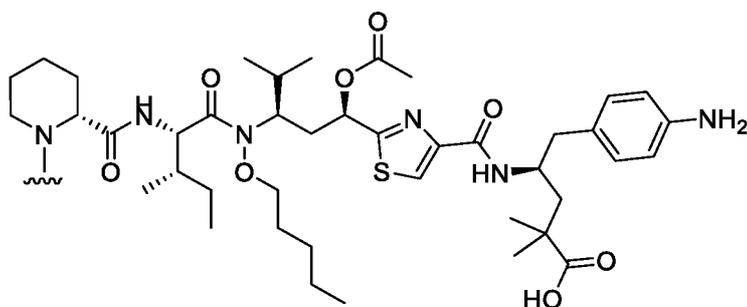
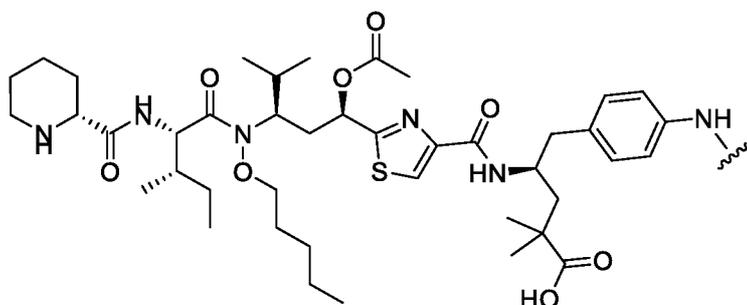
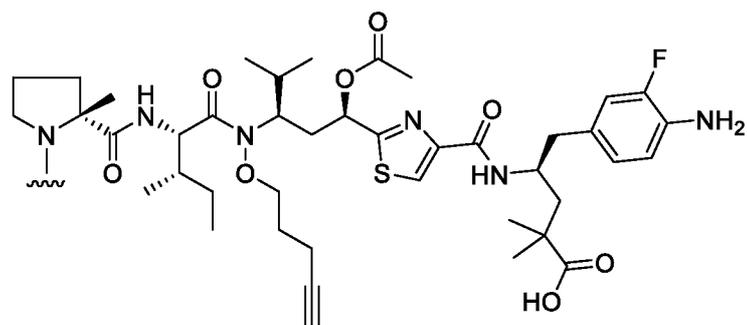


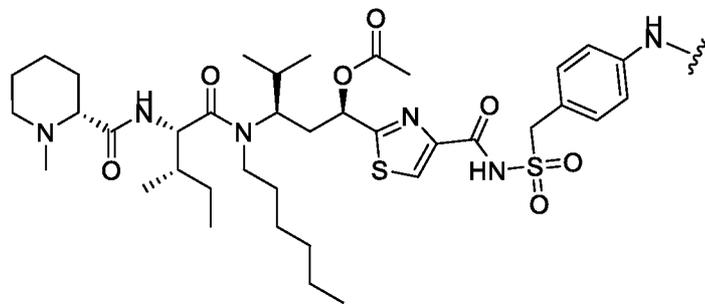
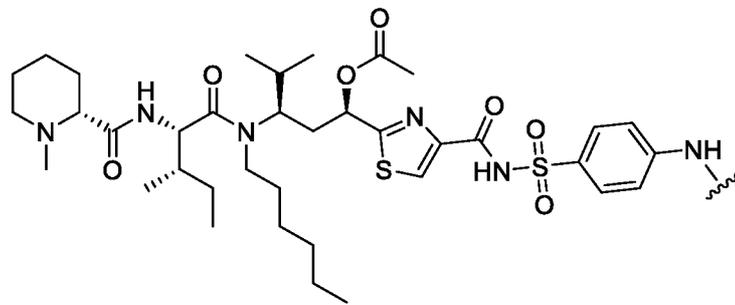
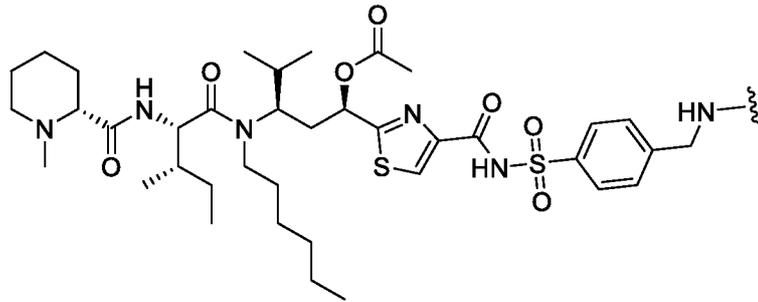
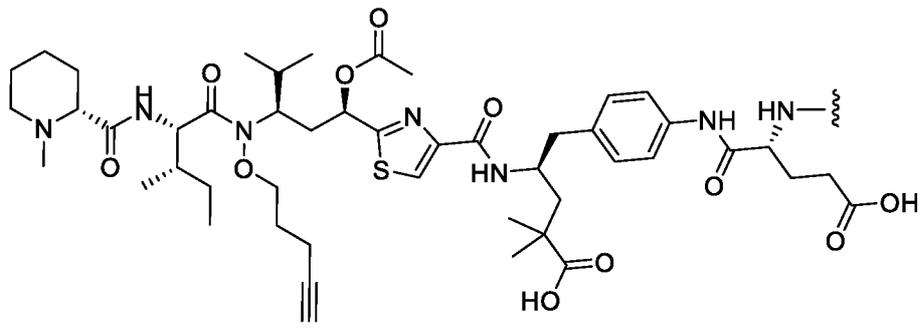
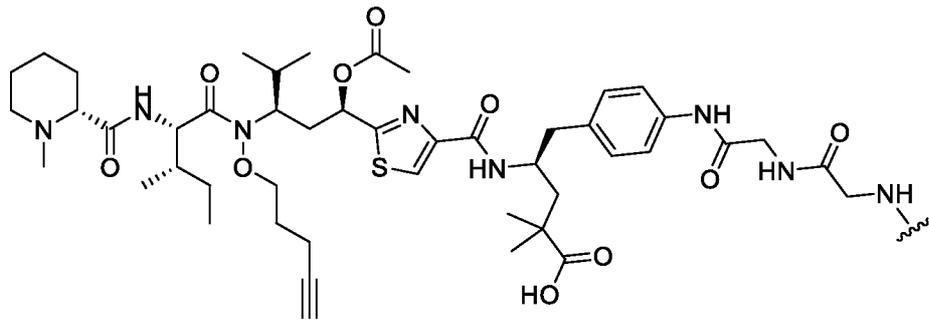


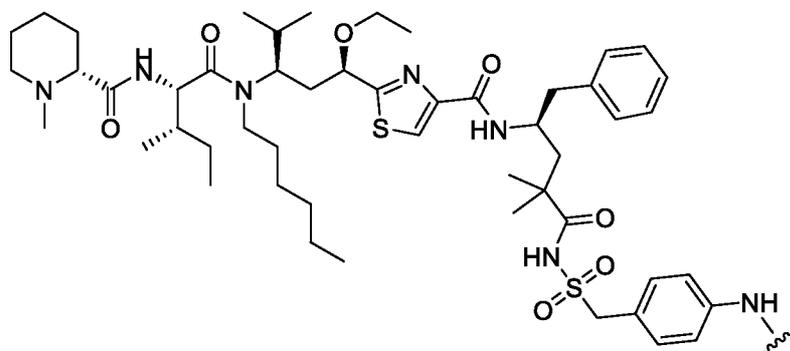
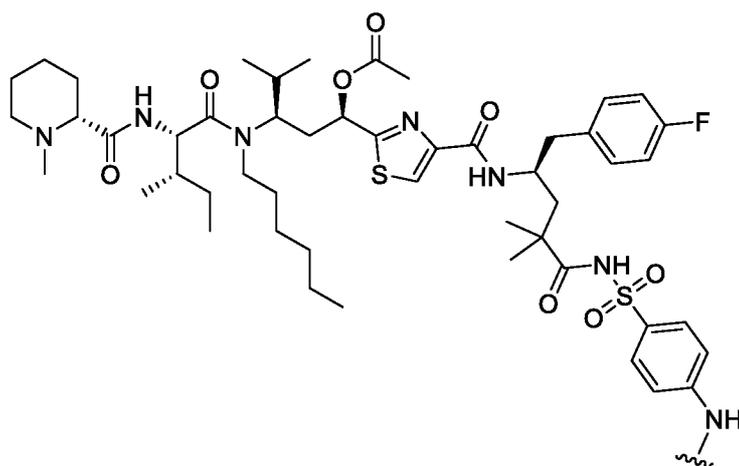
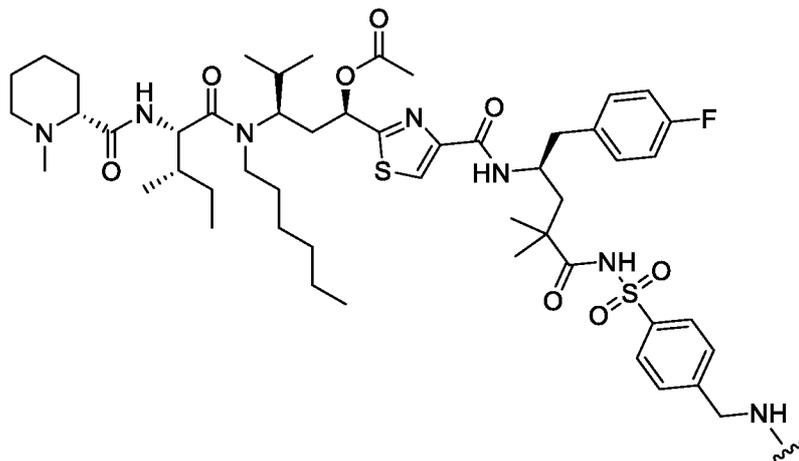
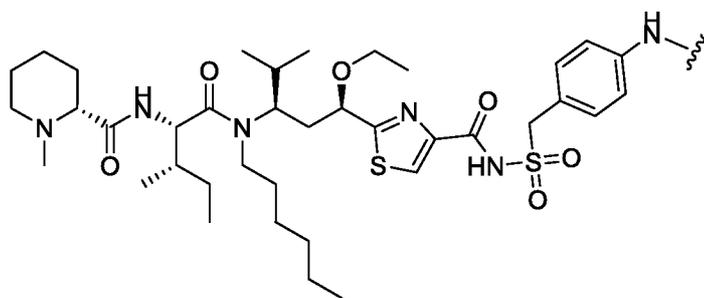




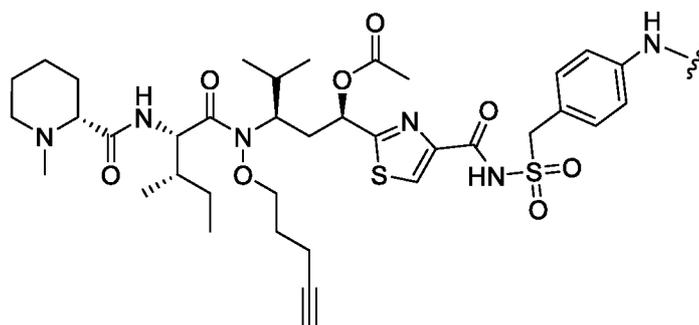








И



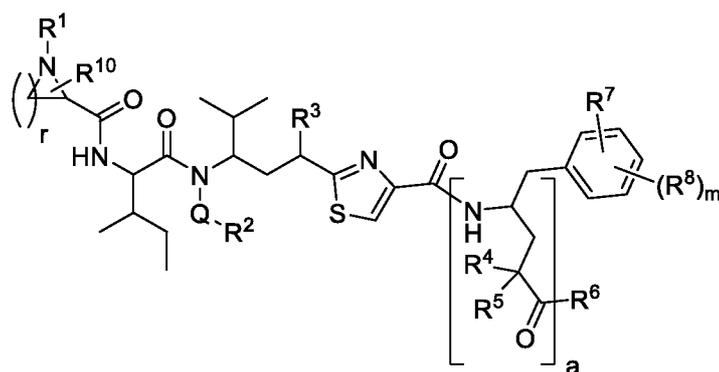
37. Соединение по п.29, где **ВА** или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбираются из группы, состоящей из анти-MUC16, анти-PSMA, анти-EGFRvIII, анти-HER2 и анти-MET.

38. Соединение по п.29, где **ВА** или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-PRLR или анти-STEAP2.

39. Соединение по п.29, где **ВА** или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из липопротин; альфа1-антитрипсина; цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного антигена (CTLA), такого, как CTLA-4 или CTLA4; фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF); рецепторов для гормонов или факторов роста; белка А или D; рецептора 2 фактора роста фибробластов (FGFR2), ЕpCAM или Ерсam, GD3, FLT3, PSCA, MUC1 или Muc1, MUC16 или Muc16, STEAP, STEAP2 или Steap-2, CEA, TENB2, EphA рецепторов, EphB рецепторов, рецептора фолиевой кислоты, FOLRI, мезотелина, крипто, альфавбетаб, VEGFR, EGFR, трансферринового рецептора, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5; CD белков, таких как CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, CD152; эритропоэтина; остеиндуктивных факторов; иммунотоксинов; костного морфогенетического белка (BMP); Т-клеточных рецепторов; поверхностных мембранных белков; интегринов, таких как CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 и VCAM; опухолеассоциированного антигена, такого как AFP, ALK, B7H4, BAGE белков, β-катенина, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9 (угольной ангидразы IX), каспазы-8, CD123, CDK4, CLEC12A, c-kit, cMET, c-MET, MET, циклин-B1, CYP1B1, EGFRvIII, эндоглина, EphA2, ErbB2/Her2, ErbB3/Her3, ErbB4/Her4, ETV6-AML, Fra-1, FOLR1, GAGE белков, таких как GAGE-1 и GAGE-2, GD2, GloboH, глипикана-3, GM3, gp100, Her2 или HER2, HLA/B-raf, HLA/EBNA1, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R,

LGR5, LMP2, MAGE белков, таких как MAGE-1, -2, -3, -4, -6 и -12, MART-1, ML-IAP, CA-125, MUM1, NA17, NGEP, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PDGFR- α , PDGFR- β , PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PLAC1, PRLR, PRAME, PSGR, PSMA (FOLH1), RAGE белков, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, STn, сурвивина, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, Tn, TNFRSF17, TRP-1, TRP-2, тирозиназы, уроплакина-3, фрагментов любых из перечисленных выше полипептидов; экспрессируемых клеточной поверхностью антигенов; молекул, таких как скавенджер-рецепторы класса А, включая скавенджер-рецептор А (SR-A), и других мембранных белков, таких как член, связанный с семейством В7, включая VSIG4, колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R), асиалогликопротеинового рецептора (ASGPR) и белка, подобного белку-предшественнику бета-амилоида 2 (APLP-2); BCMA; SLAMF7; GPNMB; и UPK3A.

40. Соединение, имеющее структуру Формулы I



Формула I

или его фармацевтически приемлемая соль, где

R^1 представляет собой водород, C_1 - C_{10} алкил, первый остаток *N*-концевой аминокислоты, $-C_1$ - C_{10} алкил- $NR^{3a}R^{3b}$ или $-C_1$ - C_{10} алкил-ОН;

R^3 представляет собой гидроксил, $-O$ - C_1 - C_5 алкил, $-OC(O)C_1$ - C_5 алкил, $-OC(O)N(H)C_1$ - C_{10} алкил, $-OC(O)N(H)C_1$ - C_{10} алкил- $NR^{3a}R^{3b}$, $-NHC(O)C_1$ - C_5 алкил или $-OC(O)N(H)(CH_2CH_2O)_n C_1$ - C_{10} алкил- $NR^{3a}R^{3b}$,

где R^{3a} и R^{3b} представляют собой независимо в каждом случае водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил, при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R^4 и R^5 представляют собой независимо в каждом случае водород или C_1 - C_5 алкил;

R^6 представляет собой $-OH$, $-NHNH_2$, $-NHSO_2(CH_2)_{a1}$ -арил- $(CH_2)_{a2}NR^{6a}R^{6b}$,

при этом арил замещен или не замещен; и

R^{6a} и R^{6b} представляют собой независимо в каждом случае водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил, при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R^7 представляет собой независимо в каждом случае водород, $-OH$, галоген или $-NR^{7a}R^{7b}$,

при этом R^{7a} и R^{7b} представляют собой независимо в каждом случае водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил, ацил, $-C(O)CH_2OH$, первый остаток *N*-концевой аминокислоты, первый остаток *N*-концевого пептида и $-CH_2CH_2NH_2$; при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R^8 представляет собой независимо в каждом случае водород, $-NHR^9$ или галоген,

при этом R^9 представляет собой водород, $-C_1-C_5$ алкил или $-C(O)C_1-C_5$ алкил; и

m имеет значение 1 или 2;

R^{10} , при наличии представляет собой $-C_1-C_5$ алкил;

Q представляет собой $-CH_2-$ или $-O-$, при этом

R^2 представляет собой алкил, алкинил или региоизомерный триазол;

при этом указанный региоизомерный триазол не замещен или замещен алкилом, алкенилом, алкинилом, циклоалкилом, арилом, гетероарилом и ацилом;

где *n* представляет собой целое число от 1 до 10.

где *r* представляет собой целое число от 1 до 6;

где *a*, *a1* и *a2* независимо имеют значение 0 или 1, и

где **T** представляет собой не соединение **IVa**, **IVa'**, **IVb**, **IVc**, **IVd**, **IVe**, **IVf**, **IVg**, **IVh**, **IVj**, **IVk**, **IVl**, **IVm**, **IVn**, **IVo**, **IVp**, **IVq**, **IVr**, **IVs**, **IVt**, **IVu**, **IVvA**, **IVvB**, **IVw**, **IVx**, **IVy**, **Va**, **Va'**, **Vb**, **Vc**, **Vd**, **Ve**, **Vf**, **Vg**, **Vh**, **Vi**, **Vj**, **Vk**, **VIa**, **IVb**, **VIc**, **VI d**, **VIe**, **VI f**, **VIg**, **VIh**, **VI**, **VIi**, **VII**, **VIII**, **IX**, **X**, **D-5a**, **D-5c**, Тубулизин А-I, U-X или Z, Претубулизин D или N^{14} -дезацетокситубулизин H.

41. Соединение по п.40, где r имеет значение 4.

42. Соединение по п.40, где

Q представляет собой $-CH_2-$;

R^1 представляет собой C_1-C_{10} алкил;

R^2 представляет собой алкил;

R^4 и R^5 представляют собой C_1-C_5 алкил;

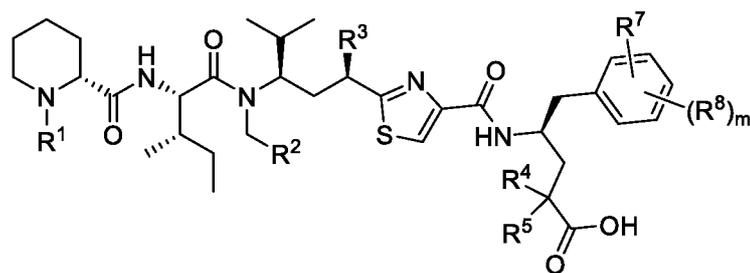
R^6 представляет собой $-OH$;

R^{10} отсутствует;

при этом r имеет значение 4; и

при этом a имеет значение 1.

43. Соединение по п.41, имеющее структуру Формулы II



Формула II

или его фармацевтически приемлемая соль.

44. Соединение по п.43, где R^3 представляет собой гидроксил, $-OEt$,

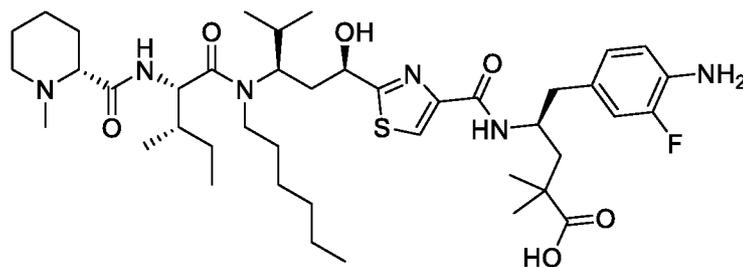
$-OC(O)N(H)CH_2CH_2NH_2$,

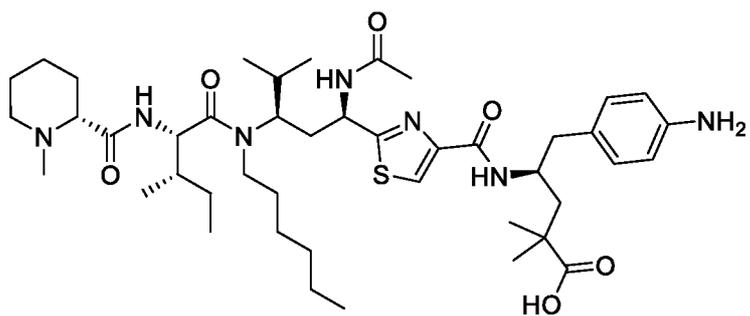
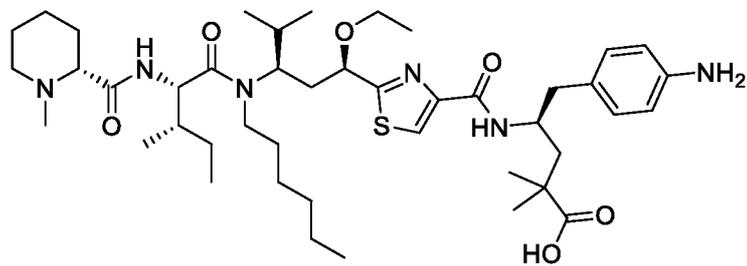
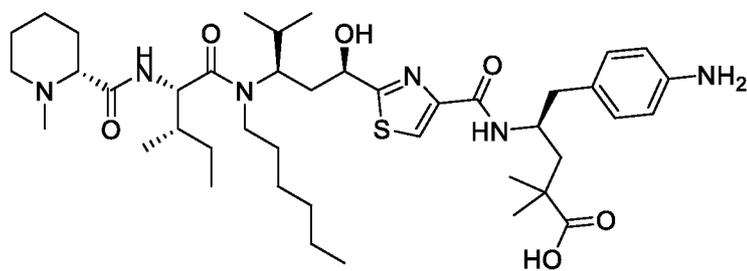
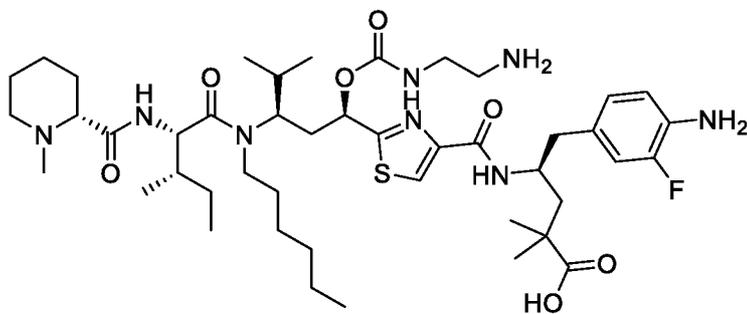
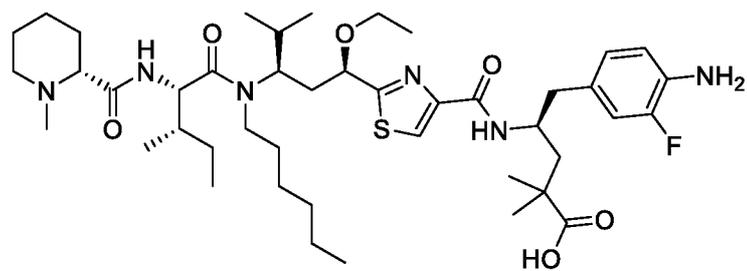
$-NHC(O)Me$

или

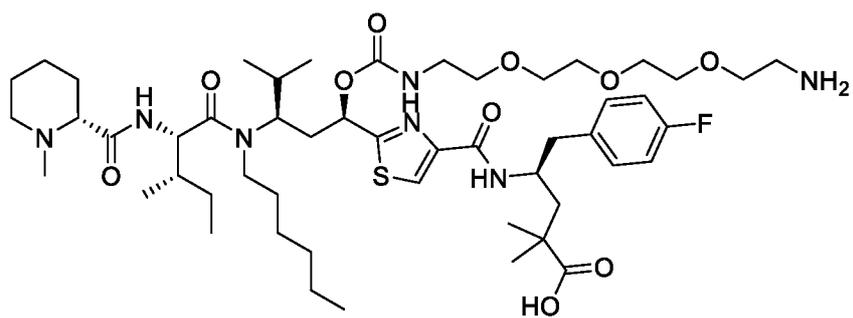
$-OC(O)N(H)CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2NH_2$.

45. Соединение по п.43, выбранное из группы, состоящей из





И



ИЛИ

его фармацевтически приемлемая соль.

46. Соединение по п.40, где

Q представляет собой $-\text{CH}_2-$;

R¹ представляет собой водород или C_1 - C_{10} алкил;

R² представляет собой алкил;

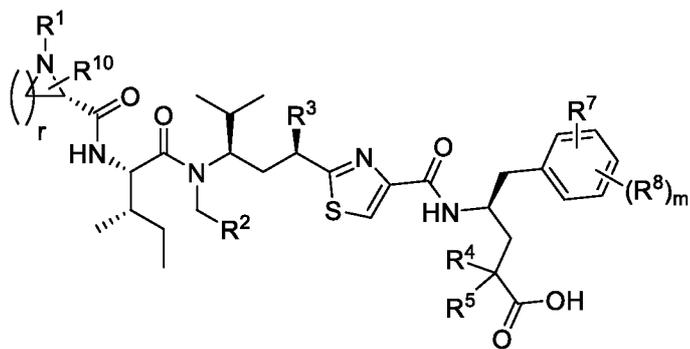
R⁴ и **R⁵** представляет собой C_1 - C_5 алкил;

R⁶ представляет собой $-\text{OH}$;

при этом **r** имеет значение 3 или 4; и

при этом **a** имеет значение 1.

47. Соединение по п.46, имеющее структуру Формулы III

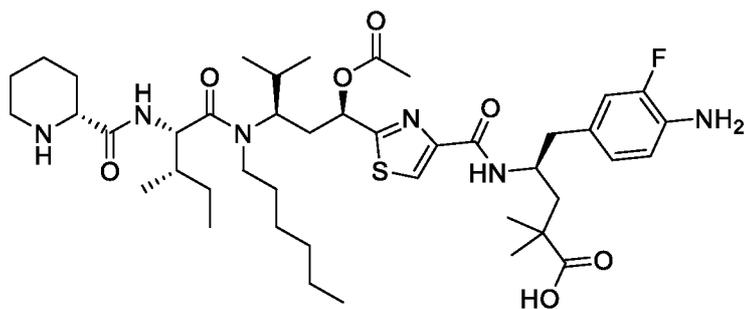


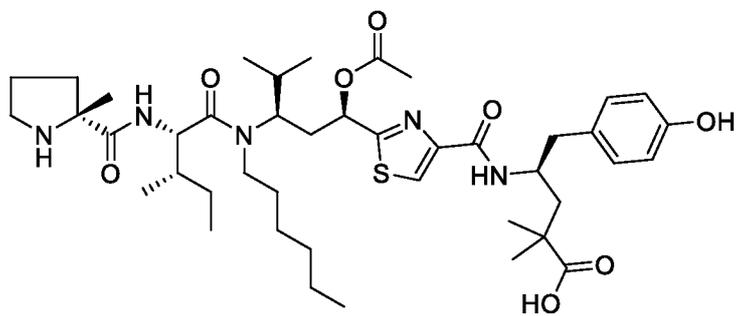
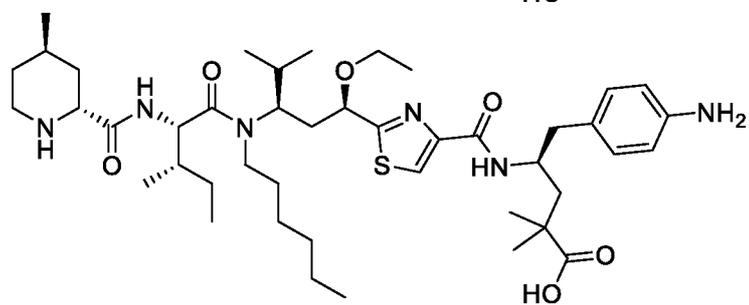
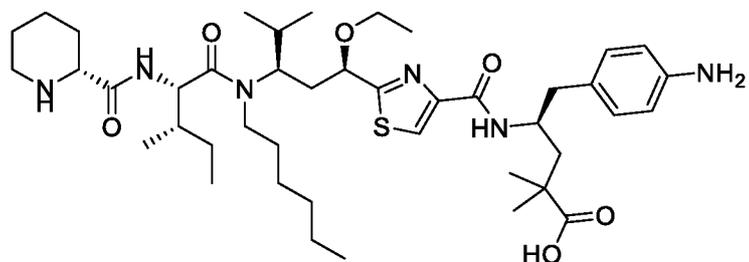
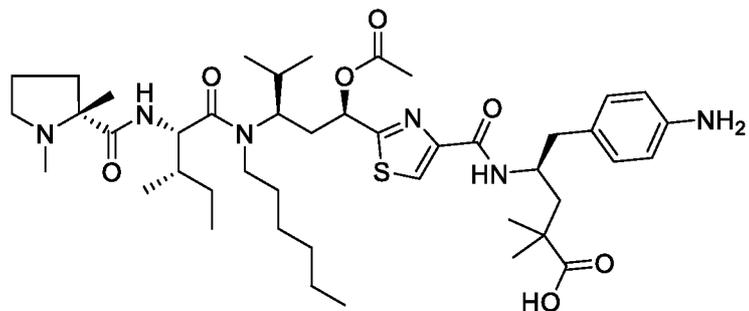
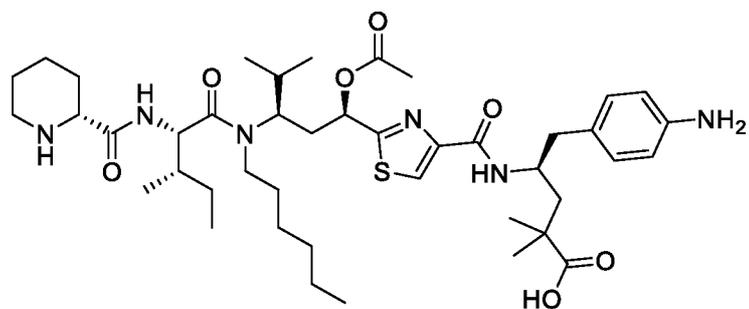
Формула III

или его фармацевтически приемлемая соль.

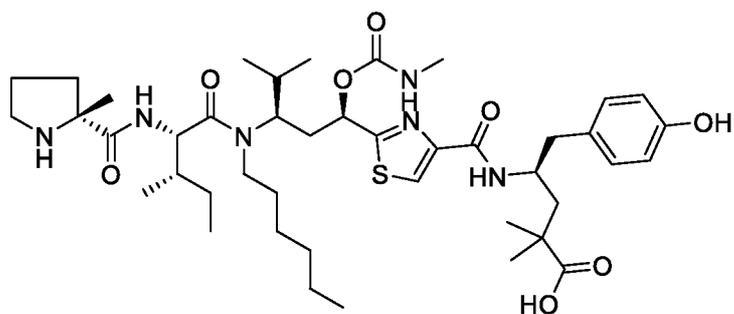
48. Соединение по п.47, где **R¹** представляет собой водород или метил; и **R¹⁰** представляет собой метил.

49. Соединение по п.47, выбранное из группы, состоящей из





и



или

его фармацевтически приемлемая соль.

50. Соединение по п.40, где

Q представляет собой $-\text{CH}_2-$;

R¹ представляет собой водород или C_1 - C_{10} алкил;

R² представляет собой алкил;

R⁴ и **R⁵** представляют собой C_1 - C_5 алкил;

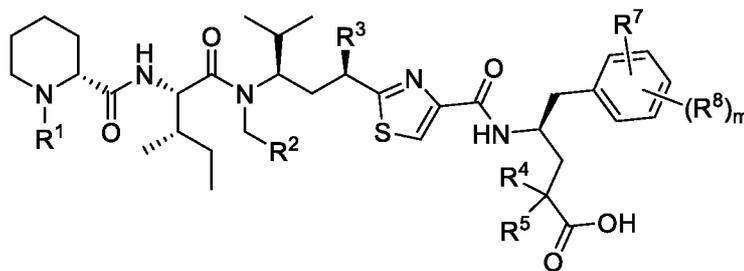
R⁶ представляет собой $-\text{OH}$;

R¹⁰ отсутствует;

где **r** имеет значение 4; и

где **a** имеет значение 1.

51. Соединение по п.50, имеющее структуру Формулы II

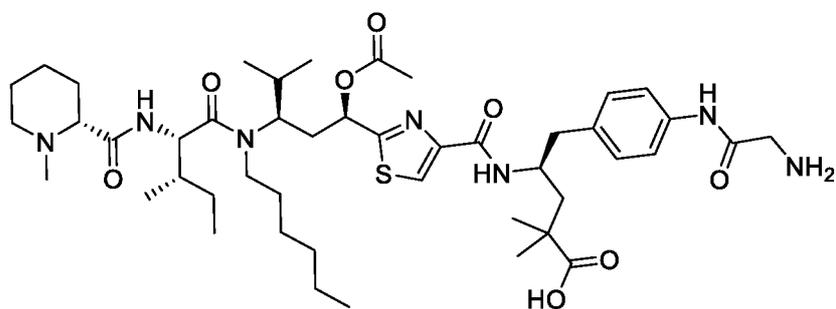
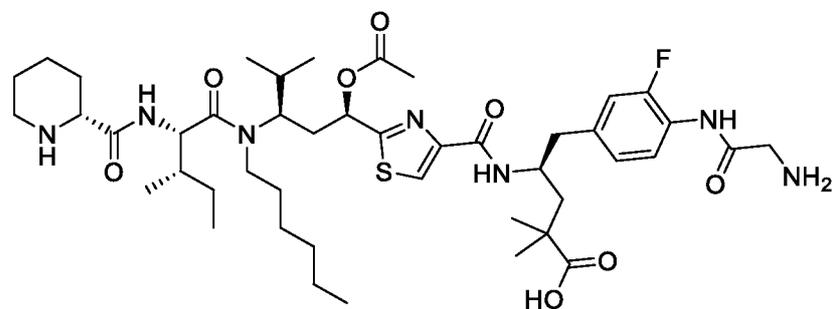
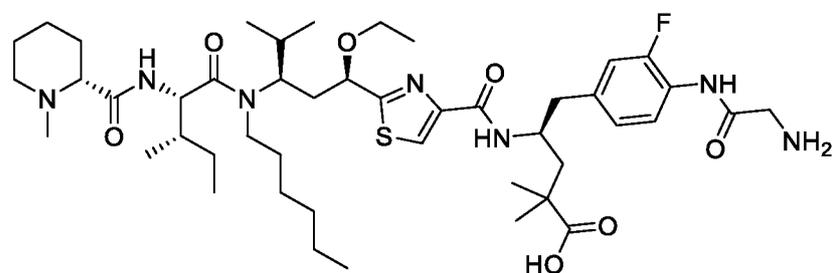
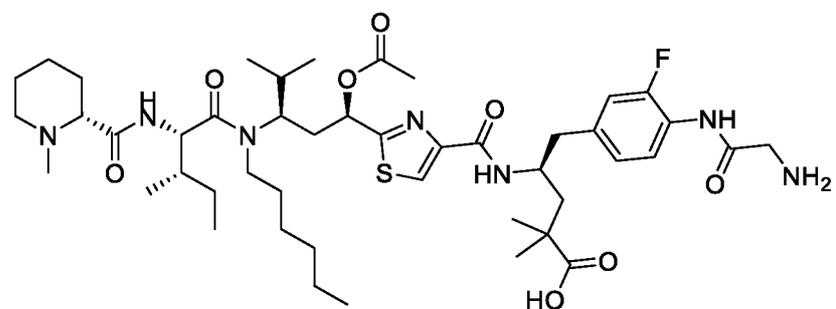
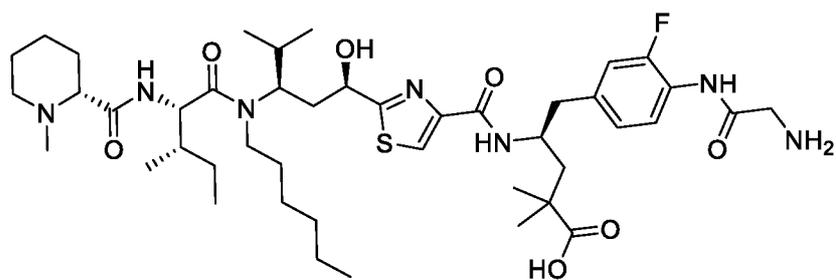


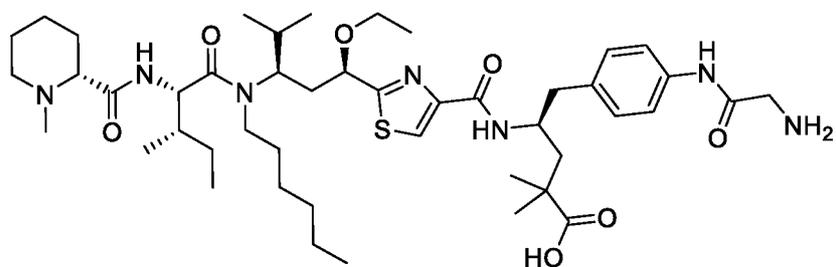
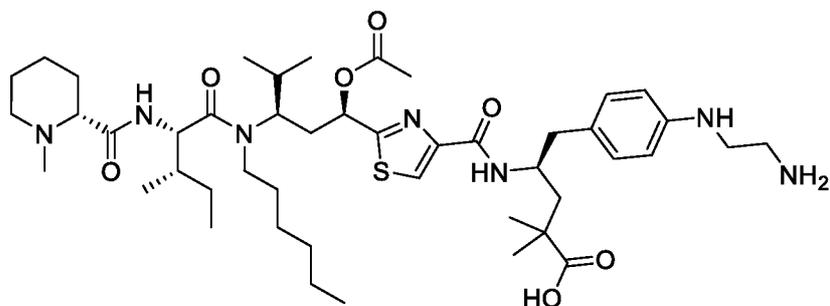
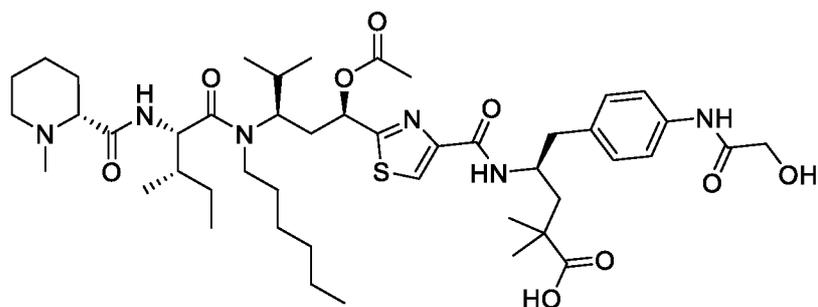
Формула II

или его фармацевтически приемлемая соль.

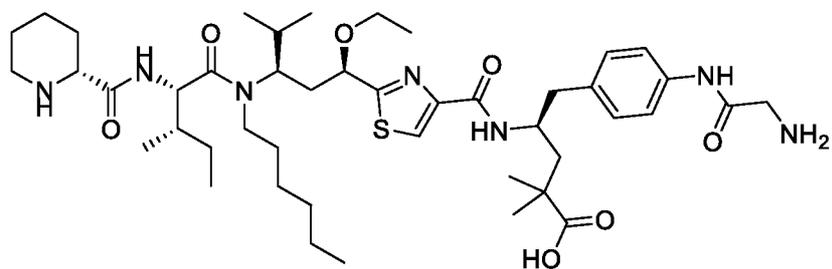
52. Соединение по п.51, где **R⁷** представляет собой водород, $-\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OH}$ или $-\text{N}(\text{H})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$; и **R⁸** представляет собой водород или фтор.

53. Соединение по п.51, выбранное из группы, состоящей из





и



или

его фармацевтически приемлемая соль.

54. Соединение по п.40, где

Q представляет собой –O–;

R¹ представляет собой водород или C₁-C₁₀ алкил;

R² представляет собой алкил или алкинил;

R³ представляет собой гидроксил или –OC(O)C₁-C₅ алкил;

R⁴ и **R⁵** представляют собой C₁-C₅ алкил;

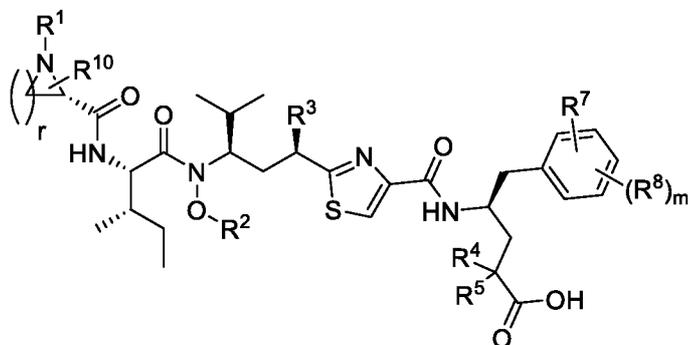
R⁶ представляет собой –OH;

R^{10} , при наличии, представляет собой $-C_1-C_5$ алкил;

при этом r имеет значение 3 или 4; и

при этом a имеет значение 1.

55. Соединение по п.54, имеющее структуру Формулы IV

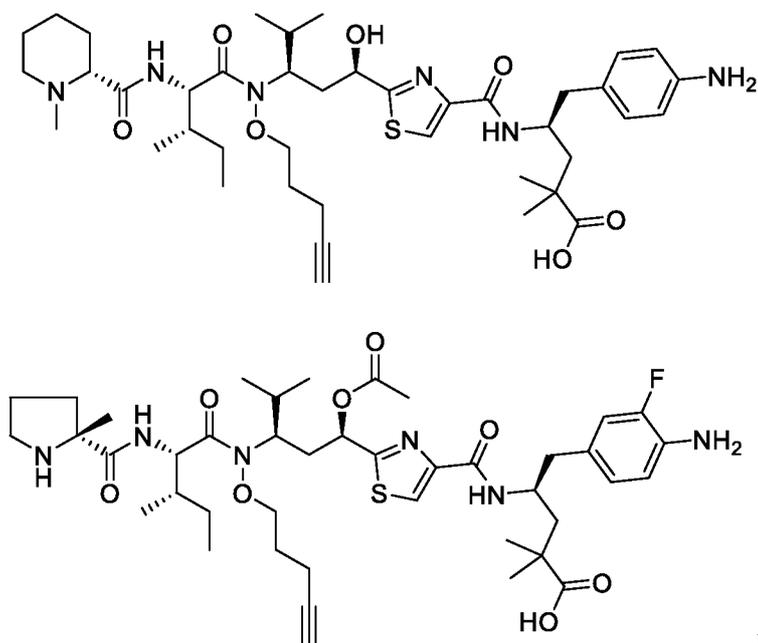


Формула IV

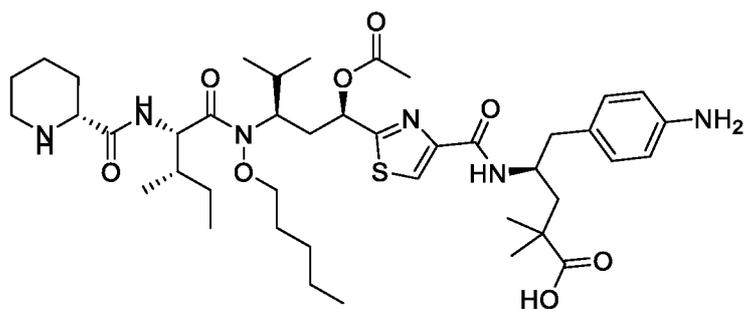
или его фармацевтически приемлемая соль.

56. Соединение по п.54, где R^7 представляет собой водород или $-NH_2$; и R^8 представляет собой водород или фтор.

57. Соединение по п.55, выбранное из группы, состоящей из



и



или

его фармацевтически приемлемая соль.

58. Соединение по п.40, где

Q представляет собой –O–;

R¹ представляет собой C₁-C₁₀ алкил;

R² представляет собой алкинил;

R³ представляет собой –OC(O)C₁-C₅ алкил;

R⁴ и **R⁵** представляют собой C₁-C₅ алкил;

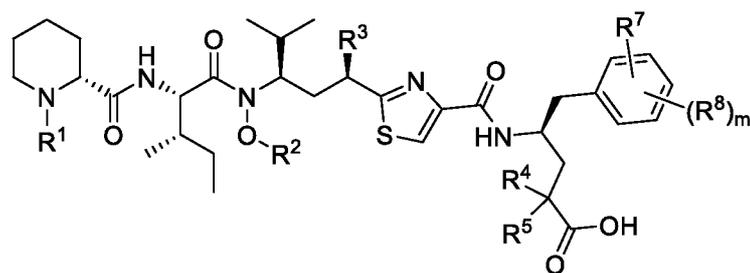
R⁶ представляет собой –OH;

R¹⁰ отсутствует;

где **r** имеет значение 4; и

где **a** имеет значение 1.

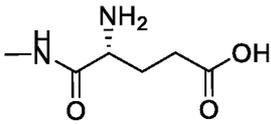
59. Соединение по п.58, имеющее структуру Формулы V



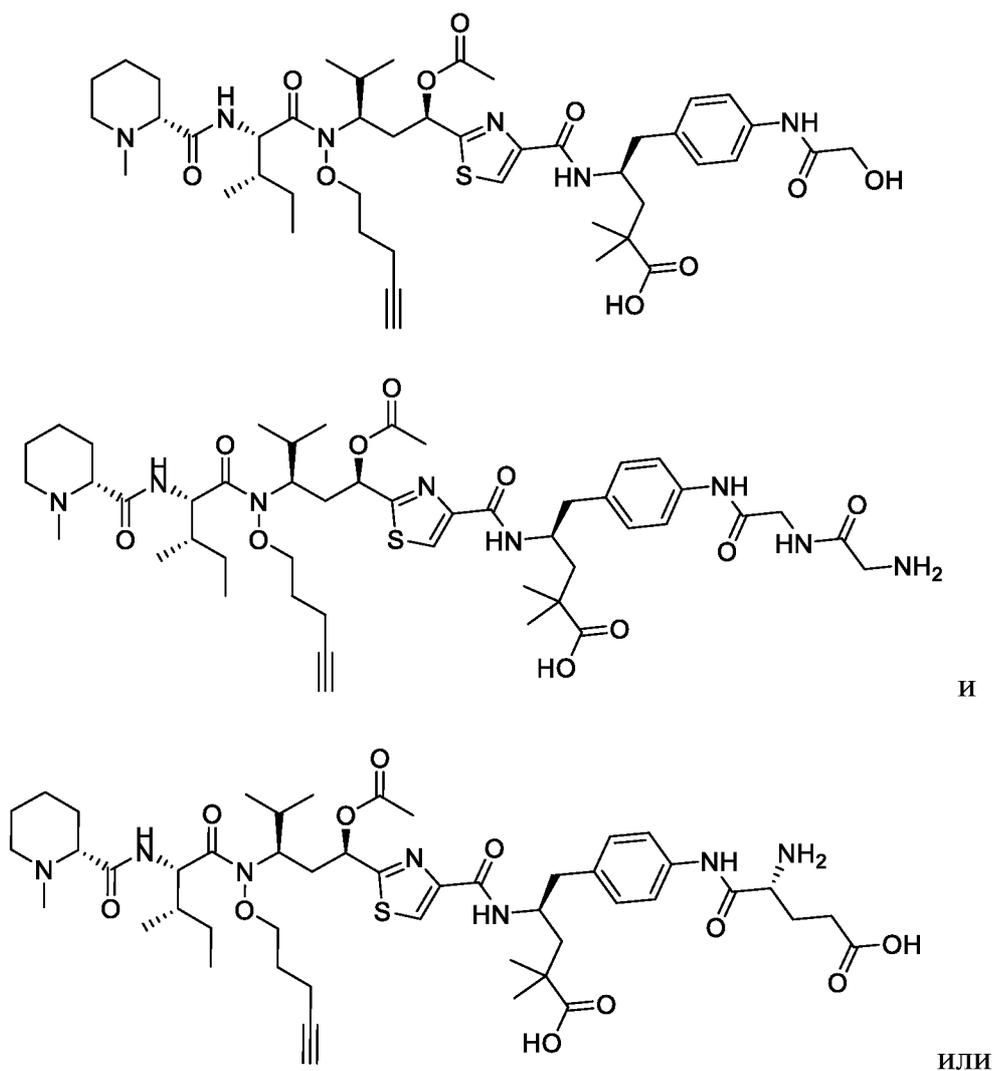
Формула V

или его фармацевтически приемлемая соль.

60. Соединение по п.59, где R^7 представляет собой водород или $-N(H)C(O)CH_2OH$,

$-N(H)C(O)CH_2NHC(O)CH_2NH_2$ или  ; и R^8 представляет собой водород.

61. Соединение по п.59, выбранное из группы, состоящей из



его фармацевтически приемлемая соль.

62. Соединение по п.40, где

Q представляет собой $-CH_2-$ или $-O-$;

R^1 представляет собой C_1-C_{10} алкил;

R^2 представляет собой алкил или алкинил;

R^4 и R^5 представляют собой C_1-C_5 алкил;

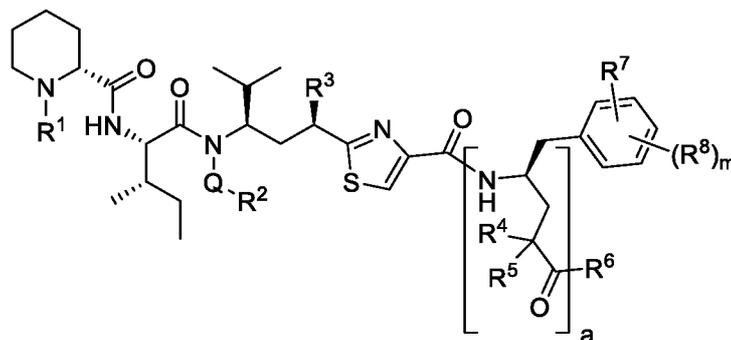
R^6 представляет собой $-NHSO_2(CH_2)_{a1}$ -арил- $(CH_2)_{a2}NR^{6a}R^{6b}$;

R^{10} отсутствует;

где r имеет значение 4; и

где a , $a1$ и $a2$ независимо имеют значение 0 или 1.

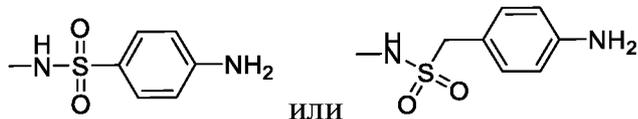
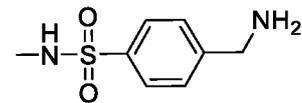
63. Соединение по п.62, имеющее структуру Формулы VI



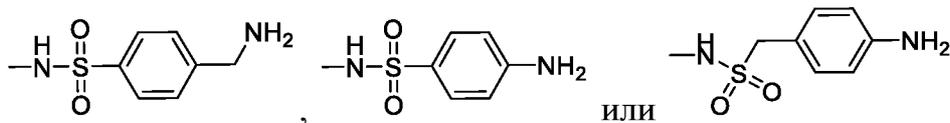
Формула VI

или его фармацевтически приемлемая соль.

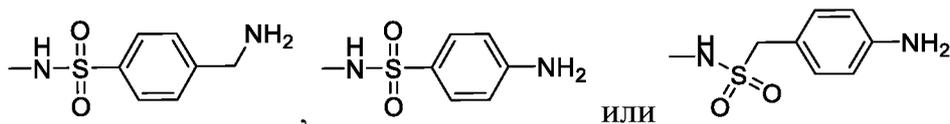
64. Соединение по п.63, где R^6 представляет собой



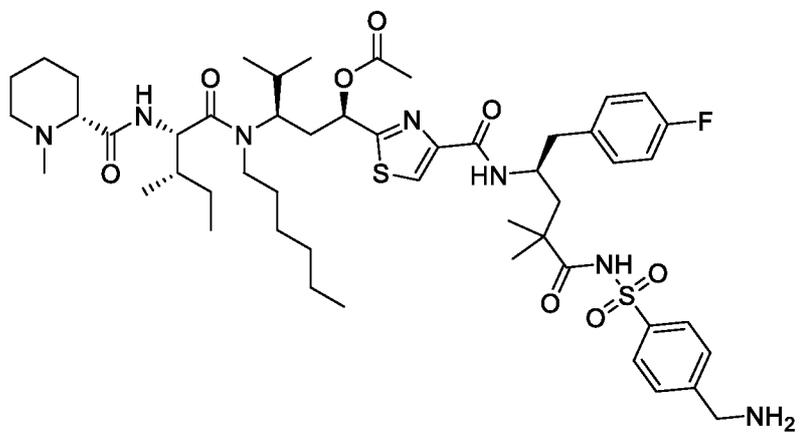
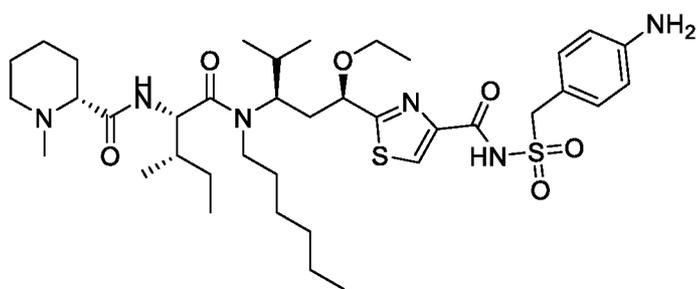
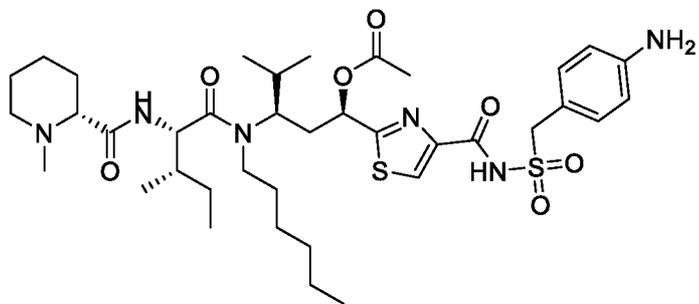
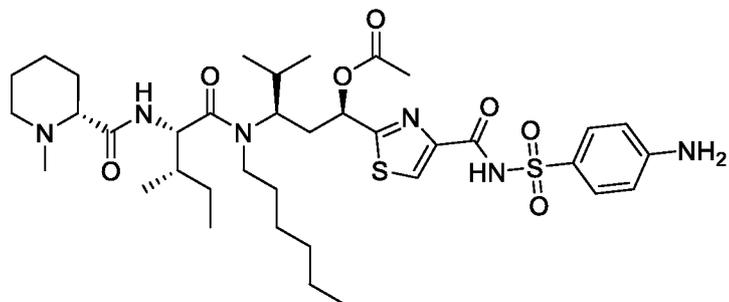
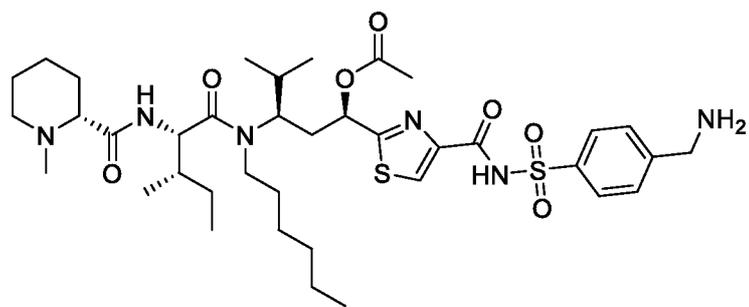
65. Соединение по п.63, где a имеет значение 0; и R^6 представляет собой

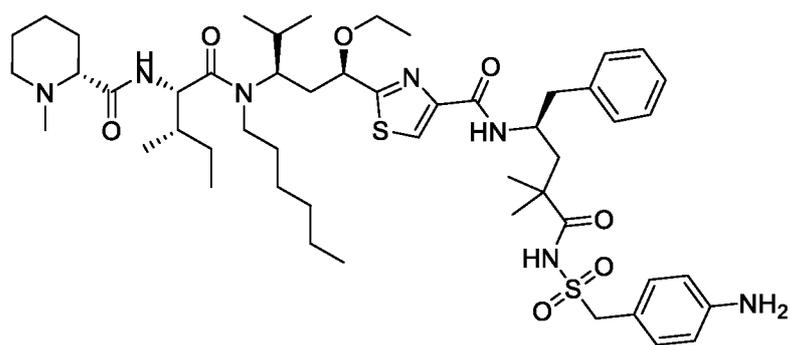
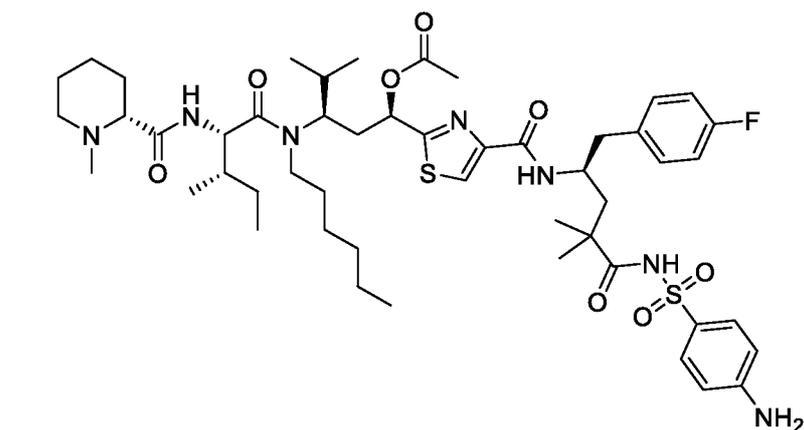


66. Соединение по п.63, где a имеет значение 1; и R^6 представляет собой

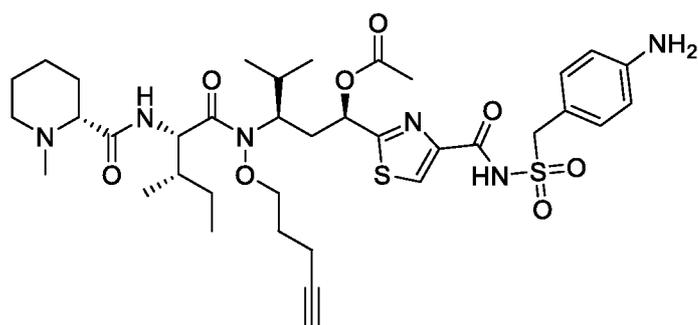


67. Соединение по п.63, выбранное из группы, состоящей из





и



или

его фармацевтически приемлемая соль.

68. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п.1 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или разбавитель.

69. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту эффективного терапевтического количества соединения или фармацевтической композиции по п.1.

70. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту эффективного терапевтического количества соединения или фармацевтической композиции по п.40.

71. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту эффективного терапевтического количества соединения или фармацевтической композиции по п.1, где рак выбирается из группы, состоящей из почечно-клеточной карциномы, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака простаты, кастрационно-

резистентного рака простаты, злокачественной глиомы, остеосаркомы, колоректального рака, рака желудка, мезотелиомы, злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичников, рака легких, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы, рака молочной железы, PRLR-положительного (PRLR+) рака молочной железы, меланомы, острого миелоцитарного лейкоза, Т-клеточного лейкоза взрослых, астроцитом, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, холангиокарциномы, рака эндометрия, рака пищевода, глиобластомы, саркомы Капоши, рака почки, лейомиосаркомы, рака печени, лимфом, злокачественной фиброзной гистиоцитомы/фибросаркомы, рака носоглотки, рабдомиосаркомы, рака ободочной кишки, рака желудка, рака матки, остаточного рака и опухоли Вильмса.

72. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту эффективного терапевтического количества соединения или фармацевтической композиции по п.40, отличающийся тем, что такой рак выбирается из группы, состоящей из почечно-клеточной карциномы, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака простаты, кастрационно- резистентного рака простаты, злокачественной глиомы, остеосаркомы, колоректального рака, рака желудка, мезотелиомы, злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичников, рака легких, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы, рака молочной железы, PRLR-положительного (PRLR+) рака молочной железы, меланомы, острого миелоцитарного лейкоза, Т-клеточного лейкоза взрослых, астроцитом, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, холангиокарциномы, рака эндометрия, рака пищевода, глиобластомы, саркомы Капоши, рака почки, лейомиосаркомы, рака печени, лимфом, злокачественной фиброзной гистиоцитомы/фибросаркомы, рака носоглотки, рабдомиосаркомы, рака ободочной кишки, рака желудка, рака матки, остаточного рака и опухоли Вильмса.

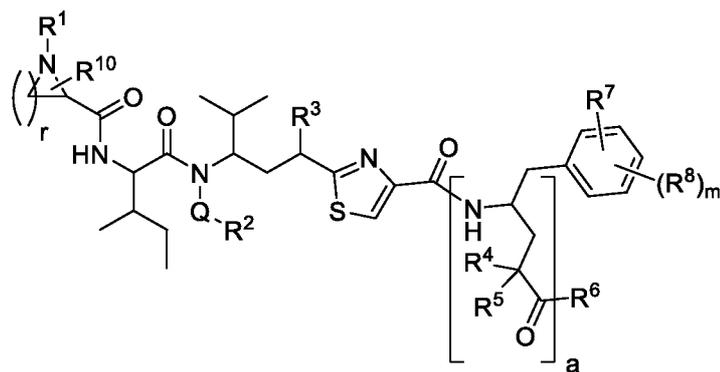
73. Способ лечения опухолей, которые экспрессируют антиген, выбираемый из группы, состоящей из PRLR и STEAP2.

74. Линкер-нагрузка, имеющая формулу



или ее фармацевтически приемлемая соль, при этом

L представляет собой линкер, ковалентно связанный с T;



T представляет собой _____, при этом

R¹ представляет собой связь, водород, C₁-C₁₀ алкил, первый остаток *N*-концевой аминокислоты, первый аминокислотный остаток, -C₁-C₁₀ алкил-NR^{3a}R^{3b} или -C₁-C₁₀ алкил-OH;

R³ представляет собой гидроксил, -O-, -O-C₁-C₅ алкил, -OC(O)C₁-C₅ алкил, -OC(O)N(H)C₁-C₁₀ алкил, -OC(O)N(H)C₁-C₁₀ алкил-NR^{3a}R^{3b}, -NHC(O)C₁-C₅ алкил или -OC(O)N(H)(CH₂CH₂O)_nC₁-C₁₀ алкил-NR^{3a}R^{3b},

где **R^{3a}** и **R^{3b}** представляет собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил, при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R⁴ и **R⁵** представляют собой независимо в каждом случае водород или C₁-C₅ алкил;

R⁶ представляет собой -OH, -O-, -NHNH₂, -NHNH-, -NHSO₂(CH₂)_{a1}-арил-(CH₂)_{a2}NR^{6a}R^{6b},

при этом арил замещен или не замещен; и

R^{6a} и **R^{6b}** представляют собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил, где алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

R⁷ представляет собой независимо в каждом случае водород, -OH, -O-, галоген или -NR^{7a}R^{7b},

где **R^{7a}** и **R^{7b}** представляют собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил, ацил, -C(O)CH₂OH, -C(O)CH₂O-, первый остаток *N*-концевой аминокислоты, первый аминокислотный остаток, первый остаток *N*-концевого пептида, первый пептидный остаток, -CH₂CH₂NH₂

и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$; при этом алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

\mathbf{R}^8 представляет собой независимо в каждом случае водород, $-\text{NHR}^9$ или галоген,

при этом \mathbf{R}^9 представляет собой водород, $-\text{C}_1\text{-C}_5$ алкил или $-\text{C}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_5$ алкил; и

m имеет значение 1 или 2;

\mathbf{R}^{10} , при его наличии представляет собой $-\text{C}_1\text{-C}_5$ алкил;

\mathbf{Q} представляет собой $-\text{CH}_2-$ или $-\text{O}-$, при этом

\mathbf{R}^2 представляет собой алкил, алкилен, алкинил, алкинилен, региоизомерный триазол, региоизомерный триазилилен;

где указанный региоизомерный триазол или региоизомерный триазилилен не замещен или замещен алкилом, алкенилом, алкинилом, циклоалкилом, арилом, гетероарилом или ацилом;

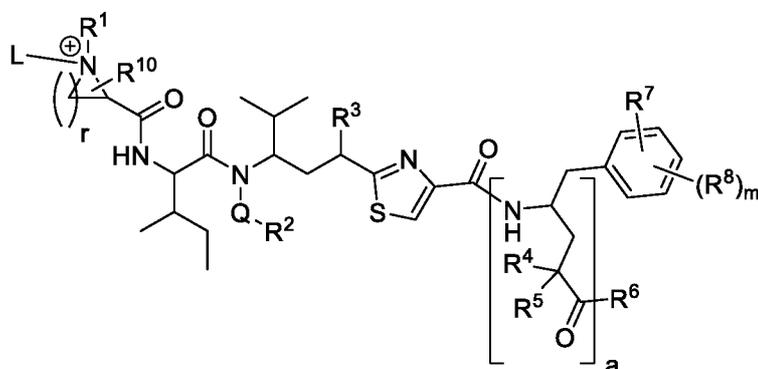
где n представляет собой целое число от 1 до 10.

где r представляет собой целое число от 1 до 6;

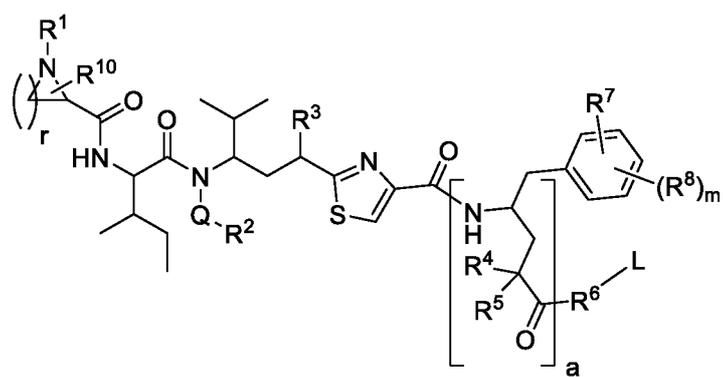
где a , $a1$ и $a2$ независимо имеют значение 0 или 1, и

где линкер-нагрузка не является **LP1-IVa**, **LP2-Va**, **LP3-IVd**, **LP4-Ve**, **LP5-IVd**, **LP6-Vb**, **LP7-IVd**, **LP9-IVvB**, **LP10-VIh**, **LP11-IVvB**, **LP12-VIi**, **LP13-Ve**, **LP14-Ve**, **LP15-VIh**, **LP16-Ve**, **LP17-Ve**, **LP18-Ve**, **LP19-Ve**, **LP20-Ve**, **LP21-Ve**, **LP22-Ve**, **LP23-Vb**, **LP24-Vb**, **LP25-Ve** и **LP26-Ve** или фармацевтически приемлемой солью.

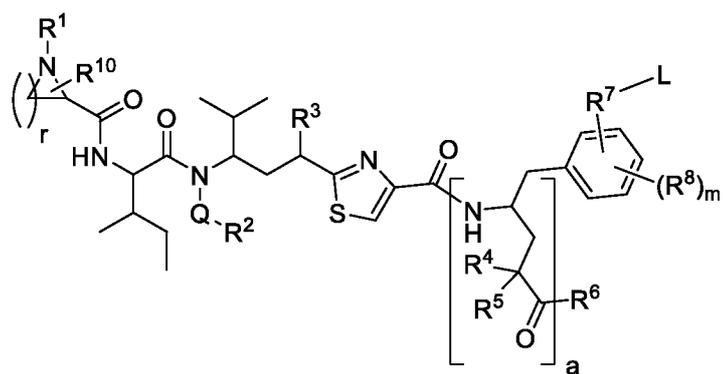
75. Линкер-нагрузка по п.74, имеющая Формулу **LPa**, **LPb**, **LPc**, **LPd** или **LPe**



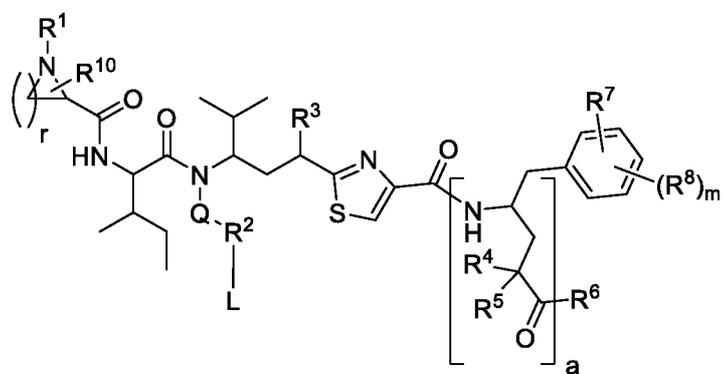
(LPa)



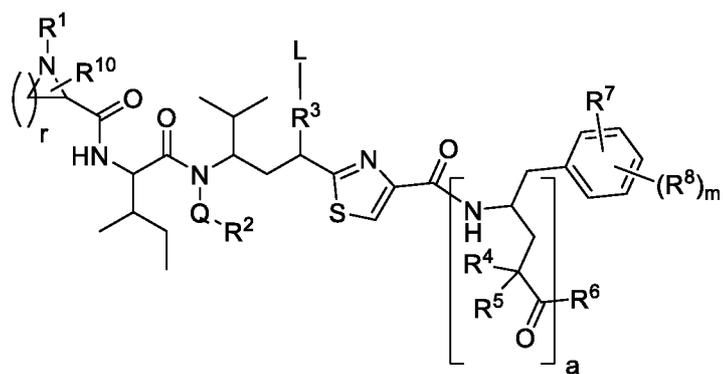
(LPb)



(LPc)



(LPd)



(LPe)

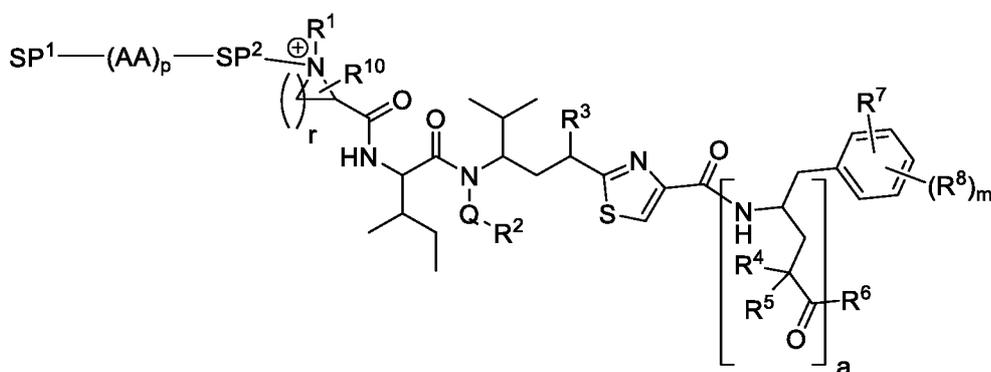
где **L** представляет собой линкер.

76. Линкер-нагрузка по п.75, где

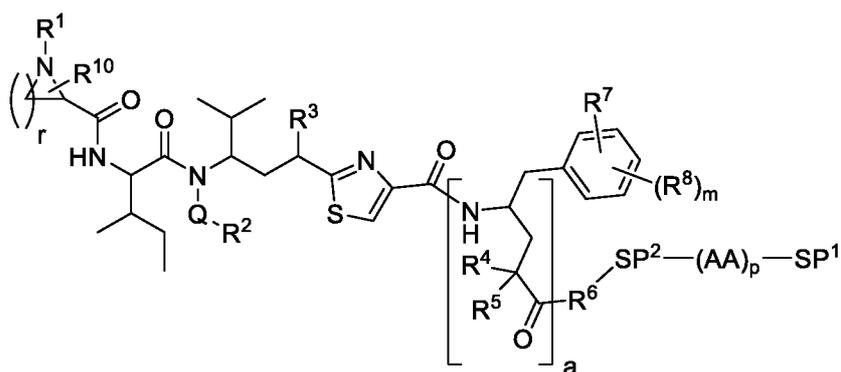
R⁷ представляет собой независимо в каждом случае водород, –ОН, –О–, галоген или –NR^{7a}R^{7b},

при этом **R^{7a}** и **R^{7b}** представляют собой независимо в каждом случае связь, водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил, ацил, –C(O)CH₂OH, –C(O)CH₂O–, первый остаток *N*-концевой аминокислоты, первый остаток *N*-концевого пептида, –CH₂CH₂NH₂ и –CH₂CH₂NH–; где алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, арил, гетероарил и ацил необязательно замещены;

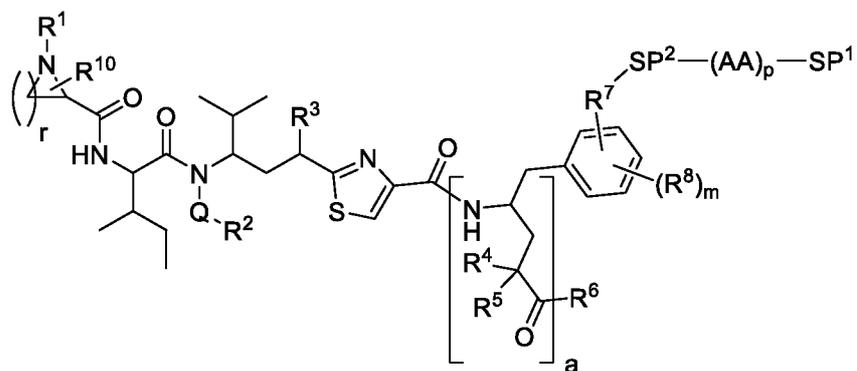
77. Линкер-нагрузка по п.76, имеющая Формулу **LPa'**, **LPb'**, **LPc'**, **LPd'** или **LPe'**



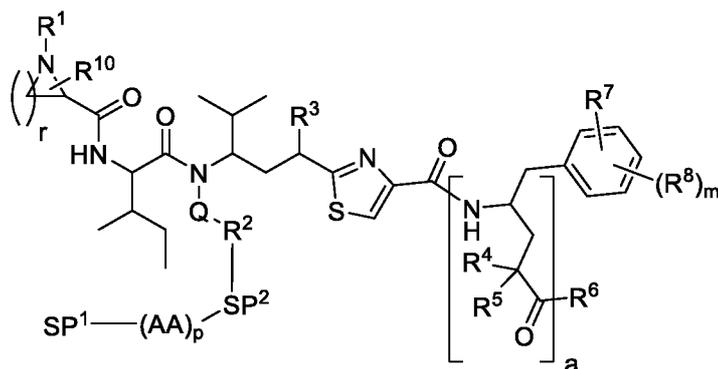
(LPa')



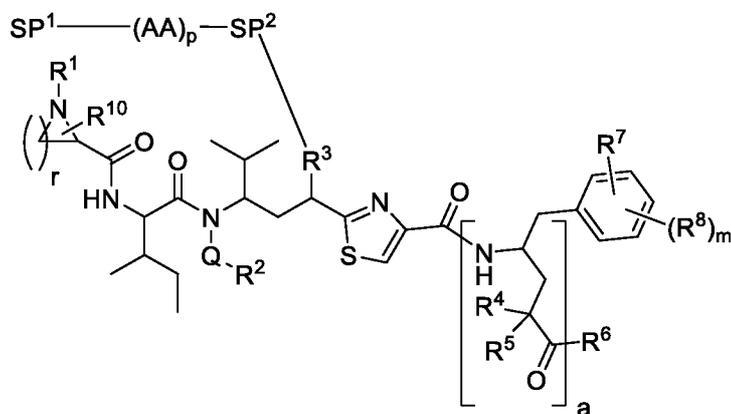
(LPb')



(LPc')



(LPd')



(LPe')

где

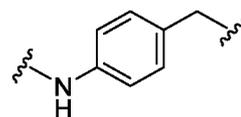
SP^1 и SP^2 , если они присутствуют, представляют собой спейсерные группы;

каждая AA , если присутствует, представляет собой второй аминокислотный остаток; и

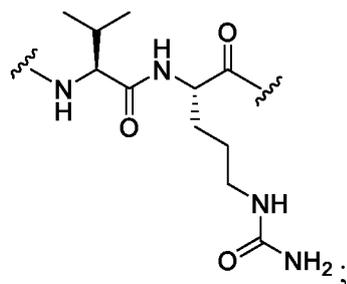
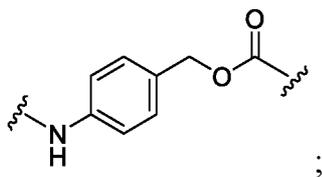
p представляет собой целое число от 0 до 10.

78. Линкер-нагрузка по п.77, где

–SP²– спейсер, если присутствует, представляет собой



или



вторая –(AA)_p– представляет собой

–SP¹– спейсер представляет собой $\text{---} \text{C}(=\text{O}) (\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b \text{---CH}_2\text{CH}_2\text{NH---RG}$,

где **RG** представляет собой реакционноспособную группу; и

b представляет собой целое число от 1 до 4.

79. Линкер-нагрузка по п.77, где **Q** представляет собой –O–.

80. Линкер-нагрузка по п.77, где

Q представляет собой –CH₂–;

R¹ представляет собой C₁-C₁₀ алкил;

R² представляет собой алкил;

R⁴ и **R⁵** представляют собой C₁-C₅ алкил;

R⁶ представляет собой –OH;

R¹⁰ отсутствует;

где **r** имеет значение 4; и

где **a** имеет значение 1.

81. Линкер-нагрузка по п.80, имеющая структуру **LPc'**, или ее фармацевтически приемлемая соль.

82. Линкер-нагрузка по п.81, где R^7 представляет собой $-NH-$; и R^8 представляет собой водород или фтор.

83. Линкер-нагрузка по п.80, имеющая структуру LPe' , или ее фармацевтически приемлемая соль.

84. Линкер-нагрузка по п.83, где R^3 представляет собой $-OC(O)N(H)CH_2CH_2NH-$ или $-OC(O)N(H)CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2NH-$.

85. Линкер-нагрузка по п.77, где

Q представляет собой $-CH_2-$;

R^1 представляет собой водород или C_1-C_{10} алкил;

R^2 представляет собой алкил;

R^4 и R^5 представляют собой C_1-C_5 алкил;

R^6 представляет собой $-OH$;

где r имеет значение 3 или 4; и

где a имеет значение 1.

86. Линкер-нагрузка по п.85, имеющая структуру LPc' , или ее фармацевтически приемлемая соль.

87. Линкер-нагрузка по п.86, где R^7 представляет собой $-NH-$; и R^8 представляет собой водород.

88. Линкер-нагрузка по п.77, где

Q представляет собой $-CH_2-$;

R^1 представляет собой водород или C_1-C_{10} алкил;

R^2 представляет собой алкил;

R^4 и R^5 представляют собой C_1-C_5 алкил;

R^6 представляет собой $-OH$;

R^{10} отсутствует;

где r имеет значение 4; и

где a имеет значение 1.

89. Линкер-нагрузка по п.88, имеющая структуру **LPc'**, или ее фармацевтически приемлемая соль.

90. Линкер-нагрузка по п.89, где **R⁷** представляет собой –NH–; и **R⁸** представляет собой водород.

91. Линкер-нагрузка по п.77, где

Q представляет собой –O–;

R¹ представляет собой водород или C₁-C₁₀ алкил;

R² представляет собой алкил или алкинил;

R³ представляет собой гидроксил или –OC(O)C₁-C₅ алкил;

R⁴ и **R⁵** представляют собой C₁-C₅ алкил;

R⁶ представляет собой –OH;

R¹⁰, при его наличии представляет собой -C₁-C₅ алкил;

где **r** имеет значение 3 или 4; и

где **a** имеет значение 1.

92. Линкер-нагрузка по п.91, имеющая структуру **LPc'**, или ее фармацевтически приемлемая соль.

93. Линкер-нагрузка по п.92, где **R⁷** представляет собой –NH–; и **R⁸** представляет собой водород.

94. Линкер-нагрузка по п.77, где

Q представляет собой –CH₂– или –O–;

R¹ представляет собой C₁-C₁₀ алкил;

R² представляет собой алкил или алкинил;

R⁴ и **R⁵** представляют собой C₁-C₅ алкил;

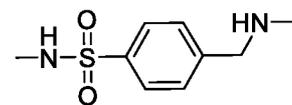
R⁶ представляет собой –NH₂SO₂(CH₂)_{a1}-арил-(CH₂)_{a2}NR^{6a}R^{6b};

R¹⁰ отсутствует;

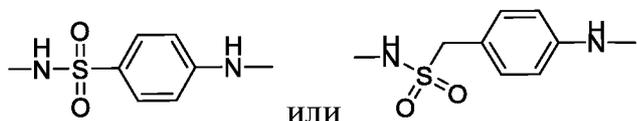
где **r** имеет значение 4; и

где **a**, **a1** и **a2** независимо имеют значение 0 или 1.

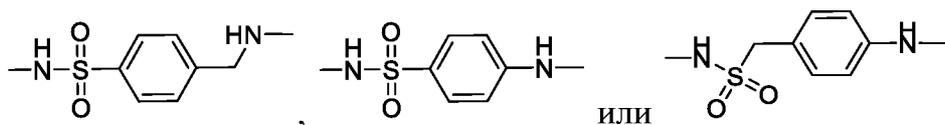
95. Линкер-нагрузка по п.94, имеющая структуру **LPb'**, или ее фармацевтически приемлемая соль.



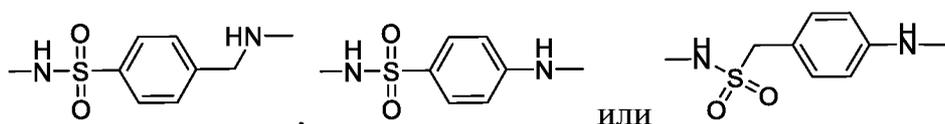
96. Линкер-нагрузка по п.95, где **R⁶** представляет собой



97. Линкер-нагрузка по п.95, где **a** имеет значение 0; и **R⁶** представляет собой

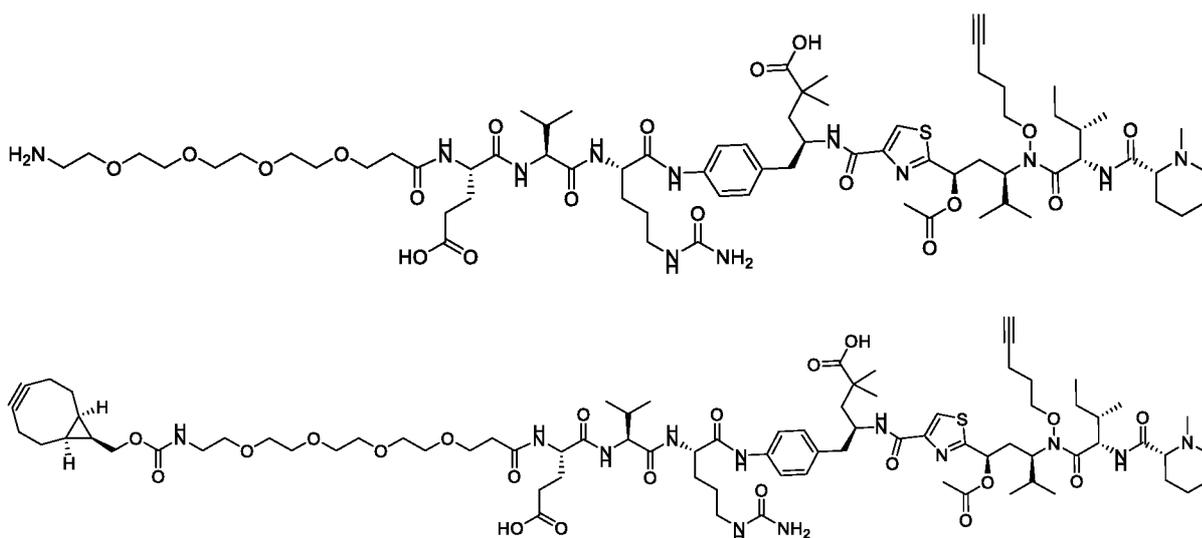


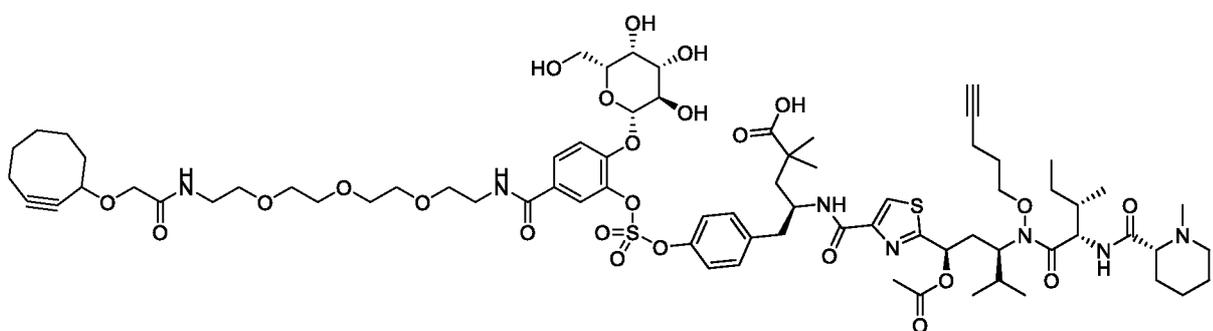
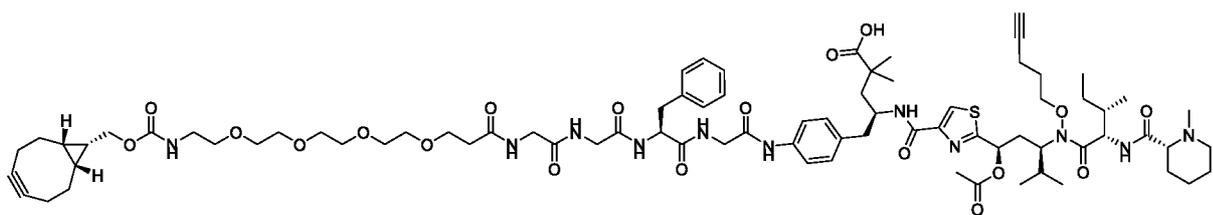
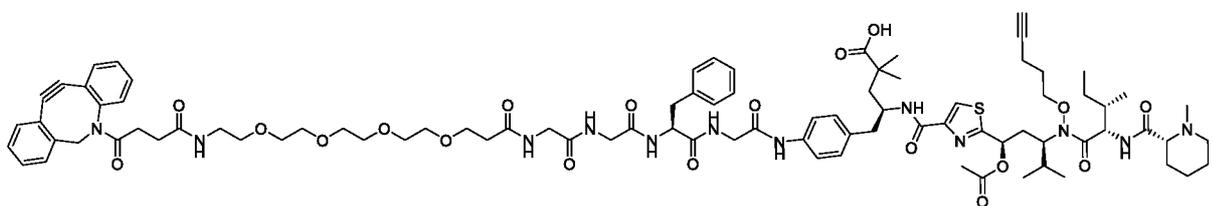
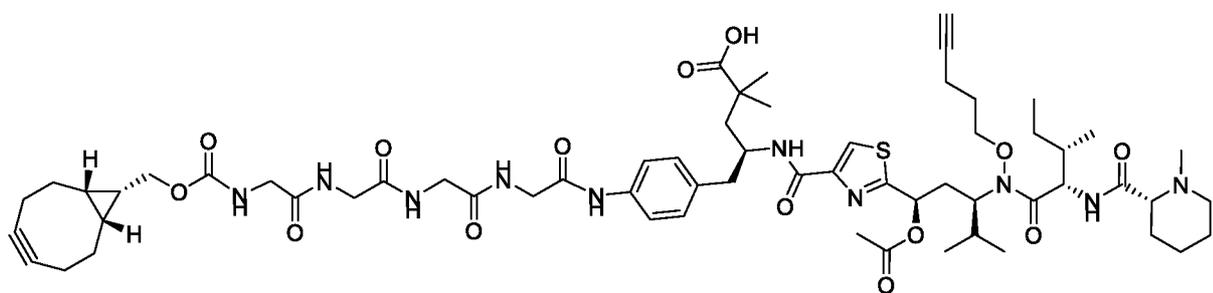
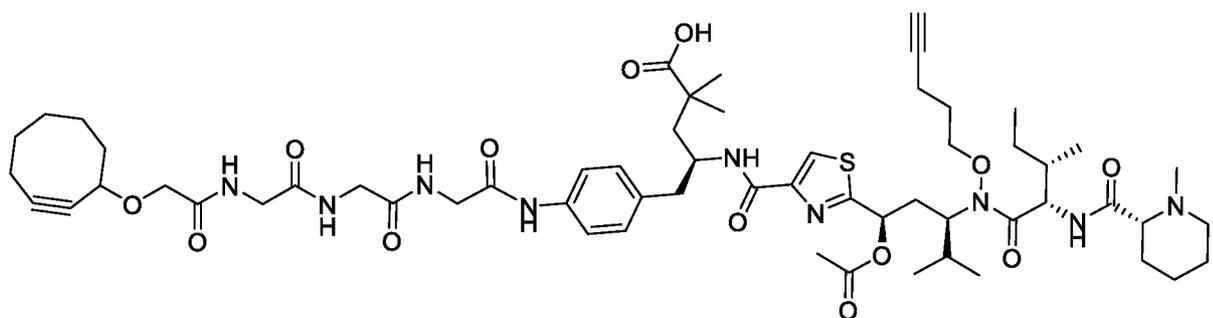
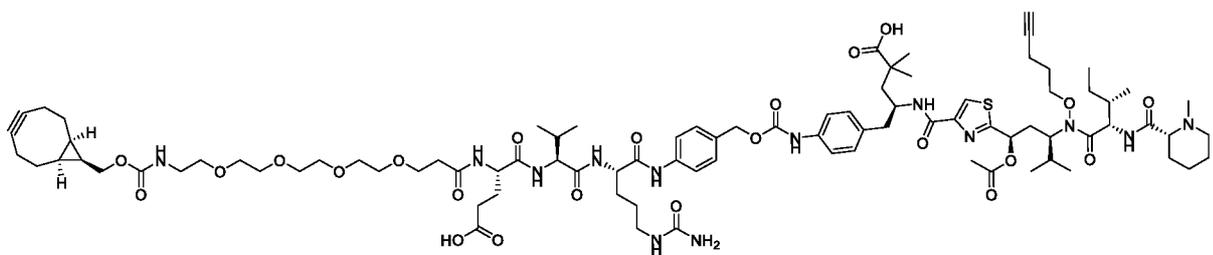
98. Линкер-нагрузка по п.95, где **a** имеет значение 1; и **R⁶** представляет собой

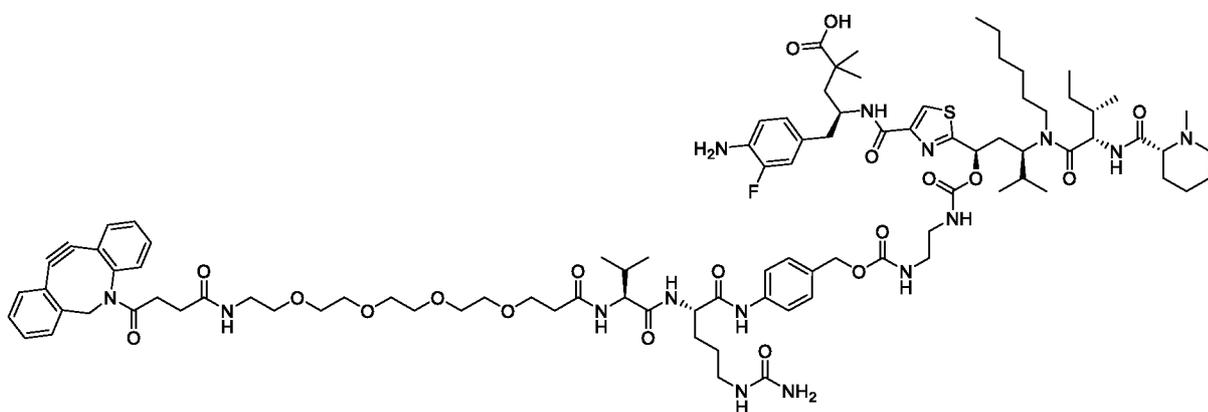
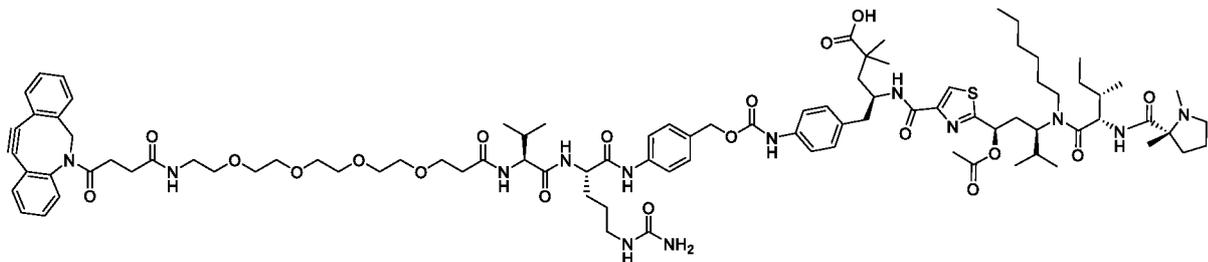
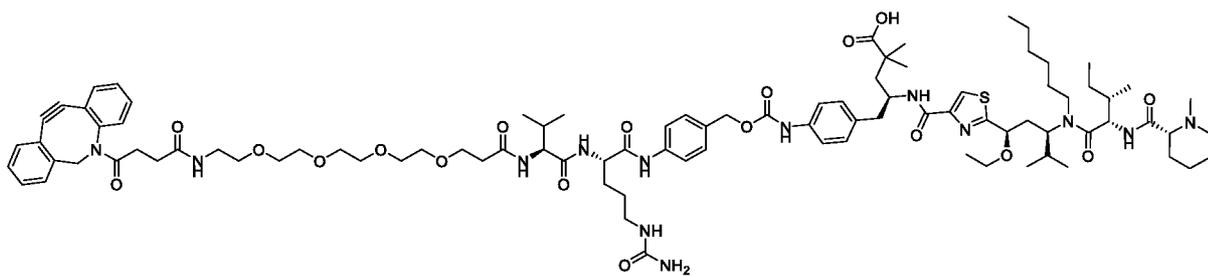
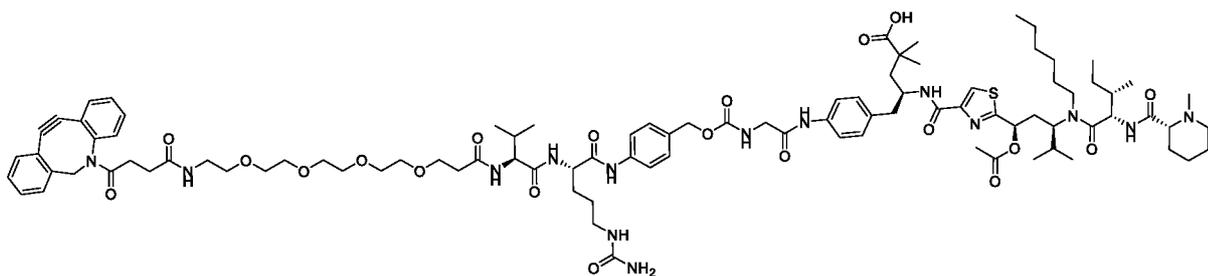
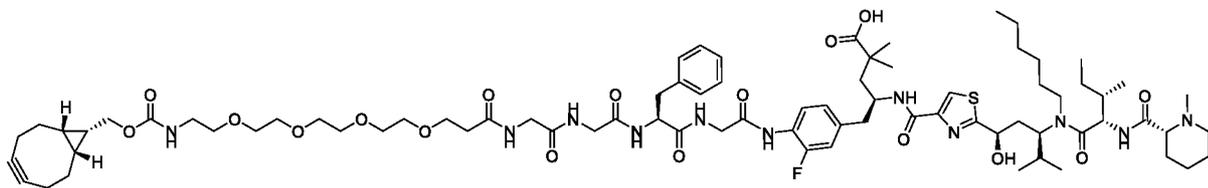
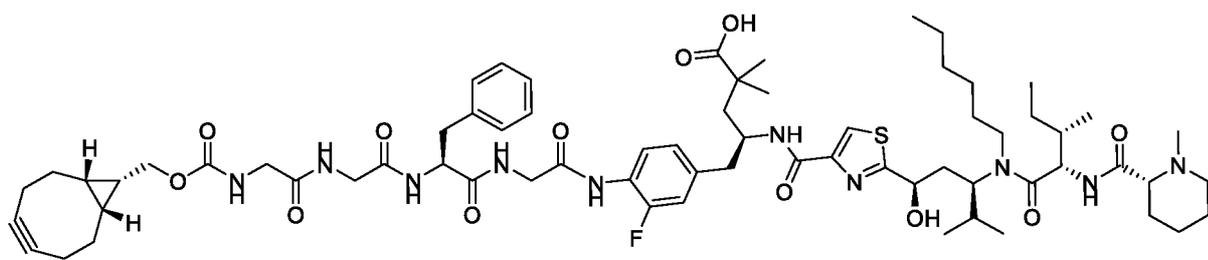


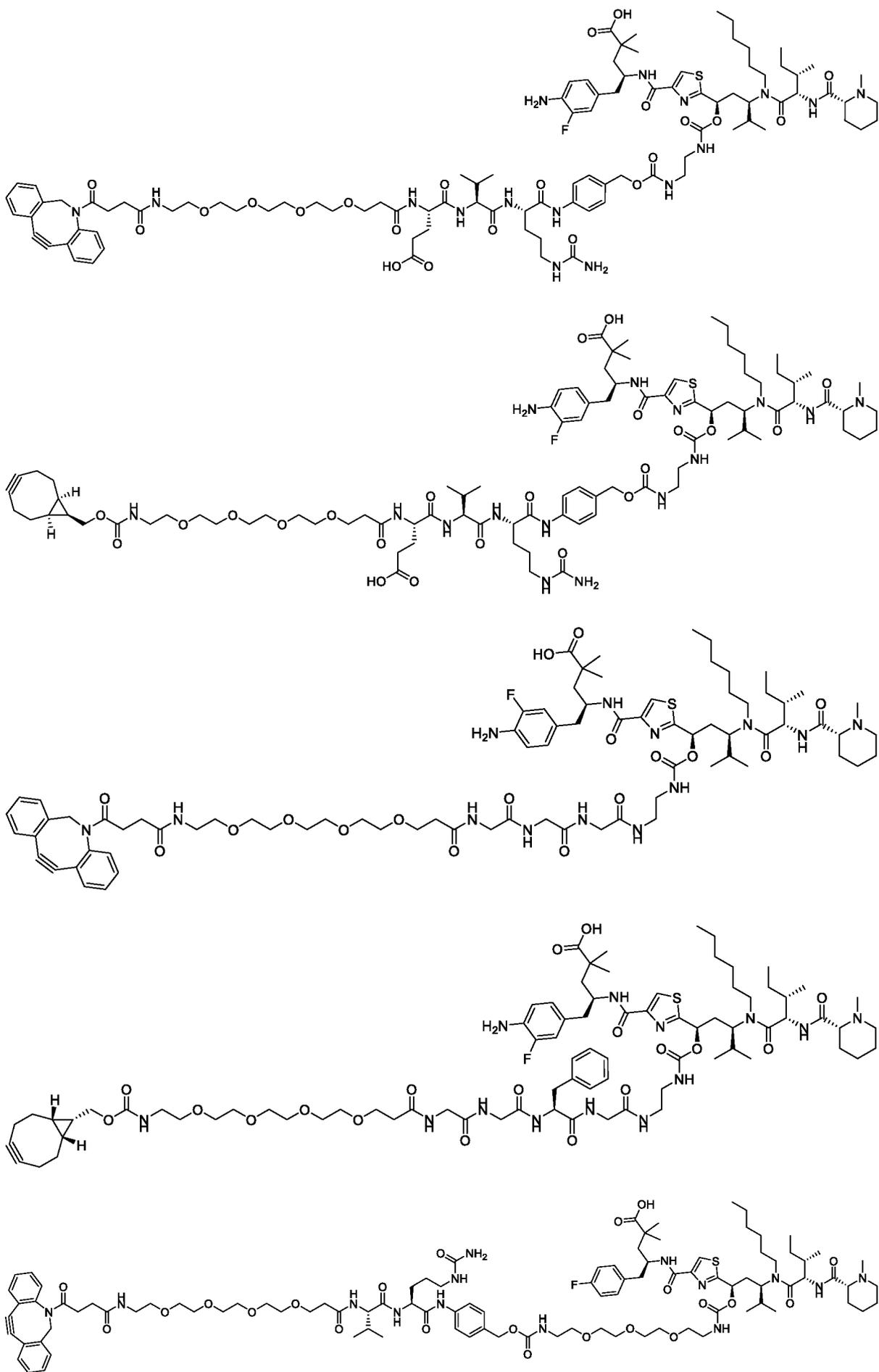
99. Линкер-нагрузка по п.92, где **R⁷** представляет собой -O-; и **R⁸** представляет собой водород.

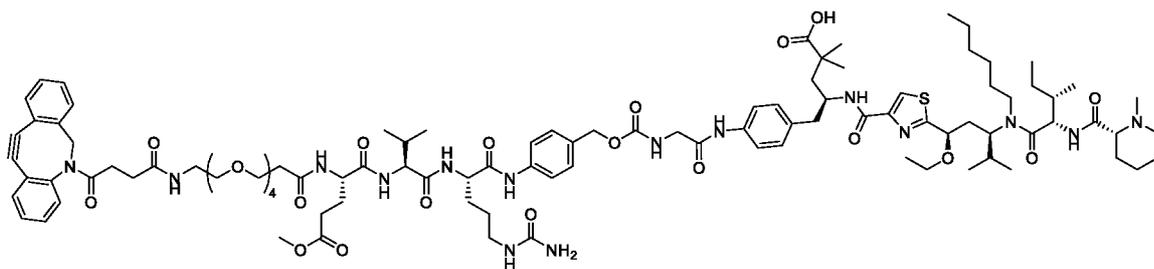
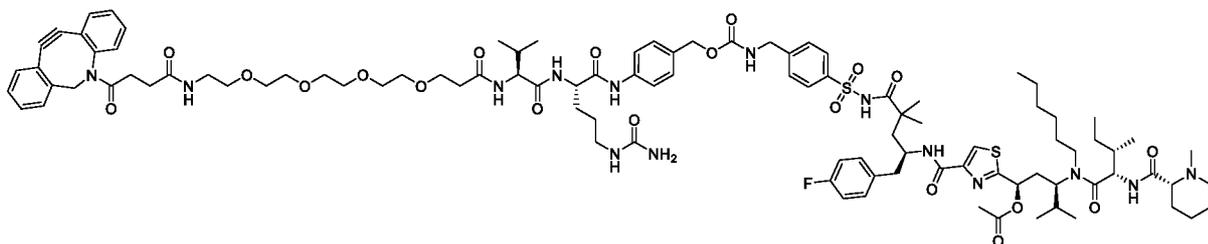
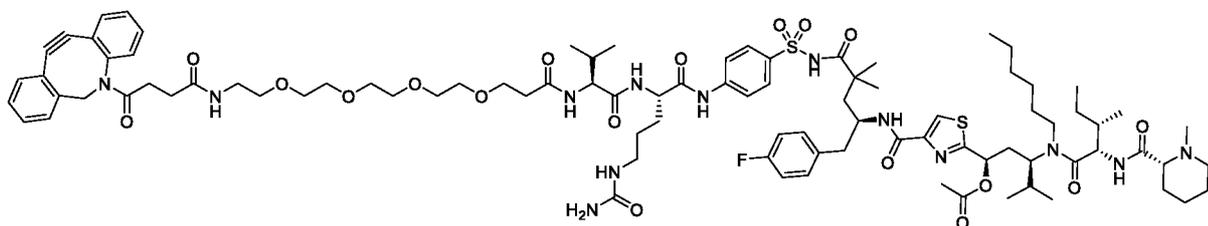
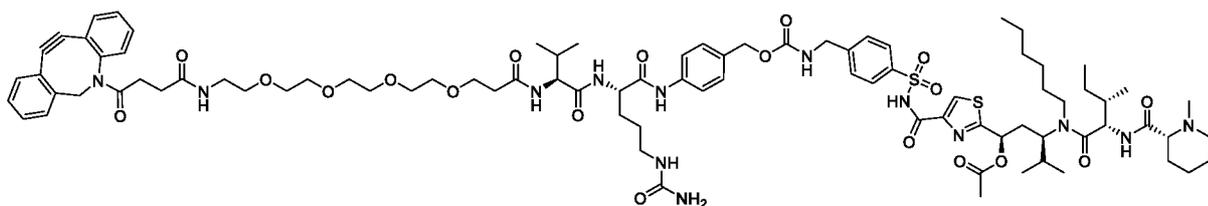
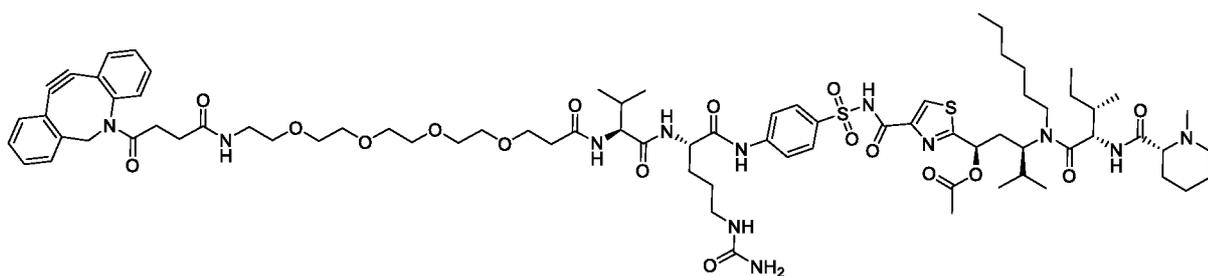
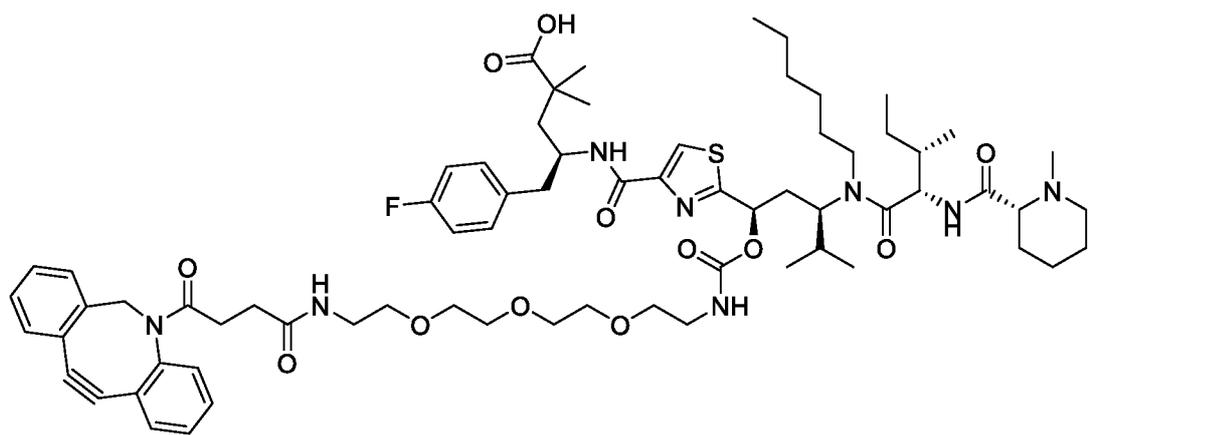
100. Линкер-нагрузка по п.77, где линкер-нагрузка выбирается из группы, состоящей из



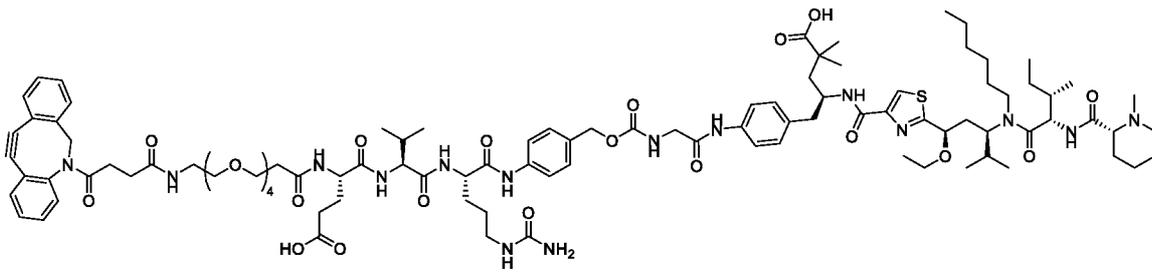




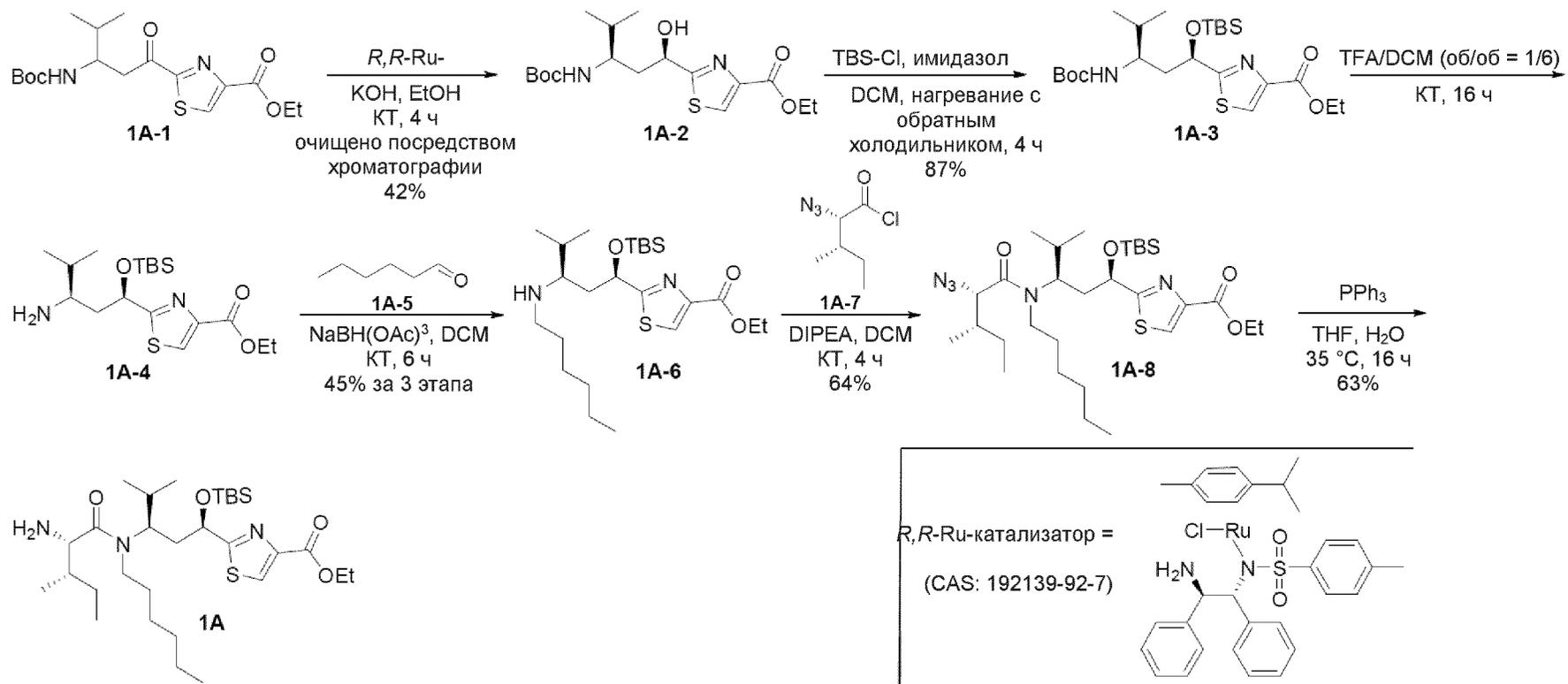




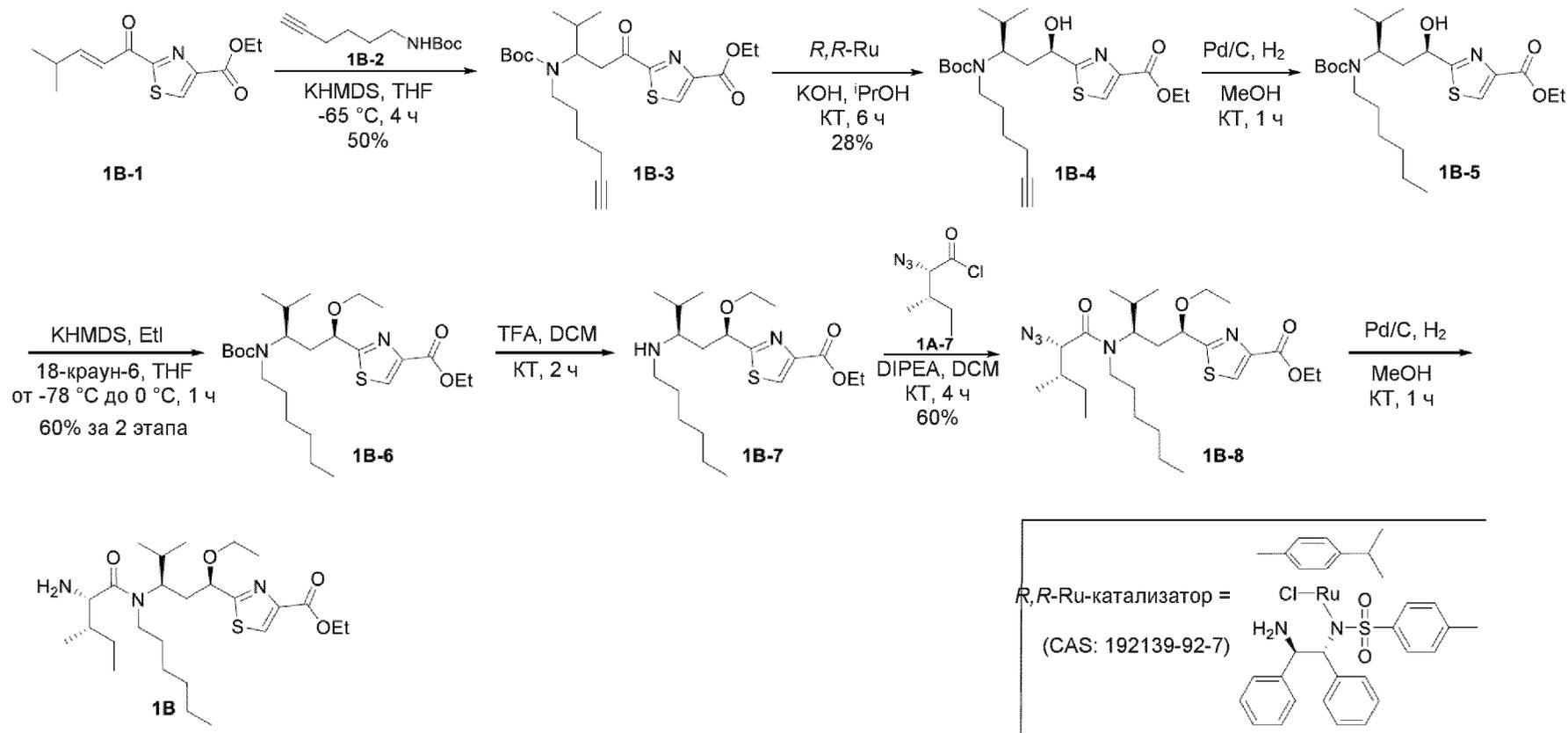
И



или ее фармацевтически приемлемая соль.

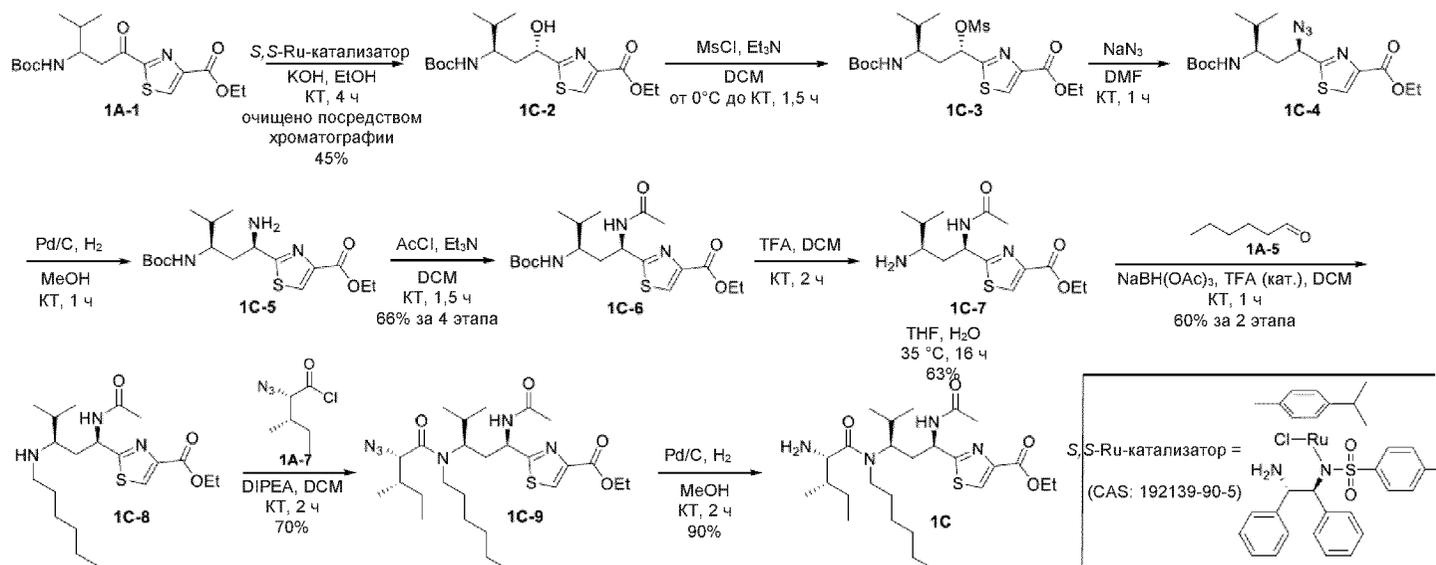


ФИГ. 1 Синтез промежуточного соединения 1A

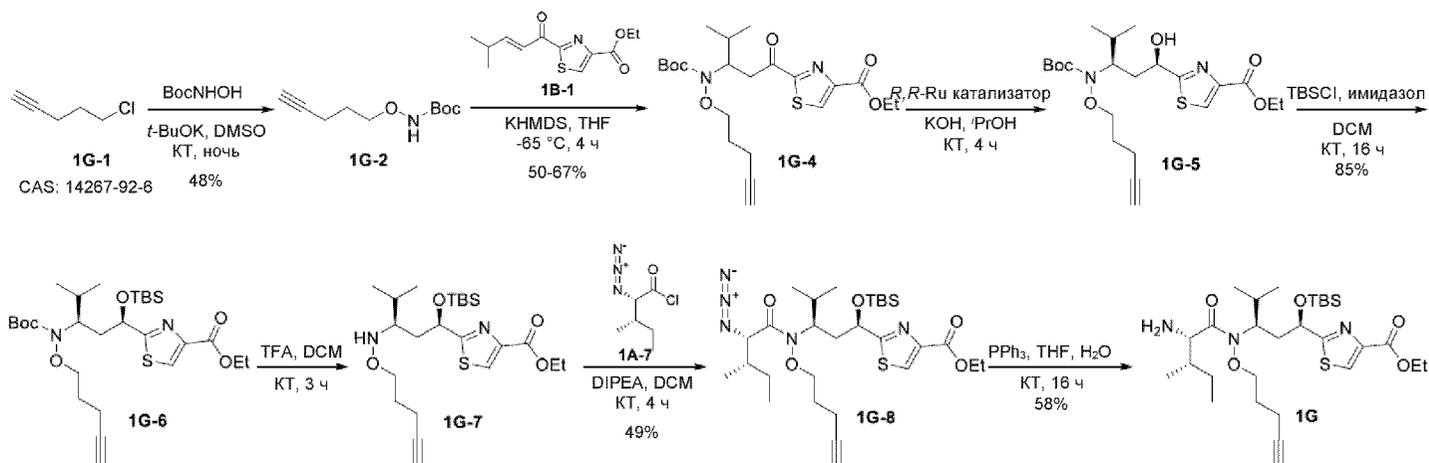


2 / 17

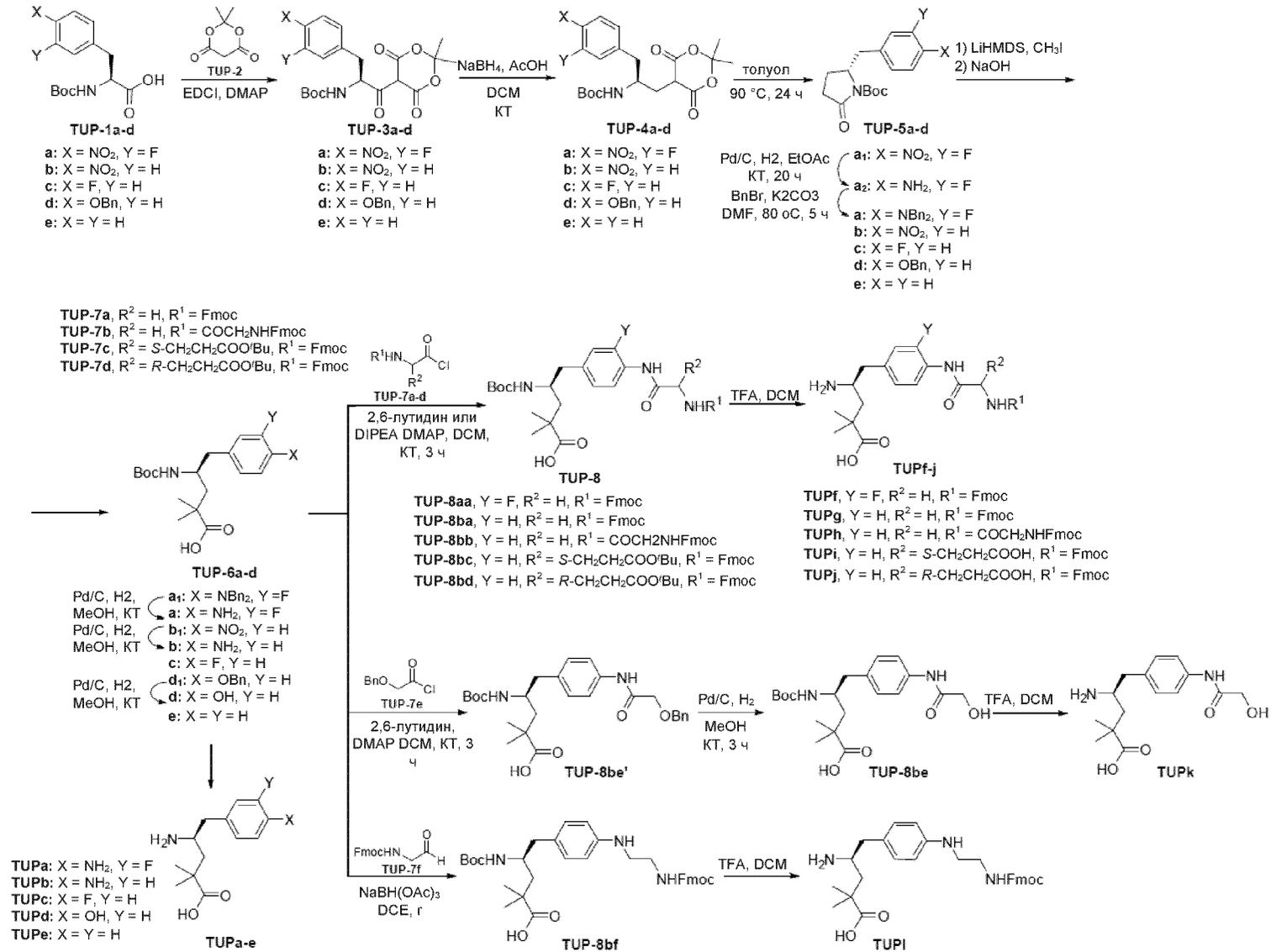
ФИГ. 2 Синтез промежуточного соединения 1B



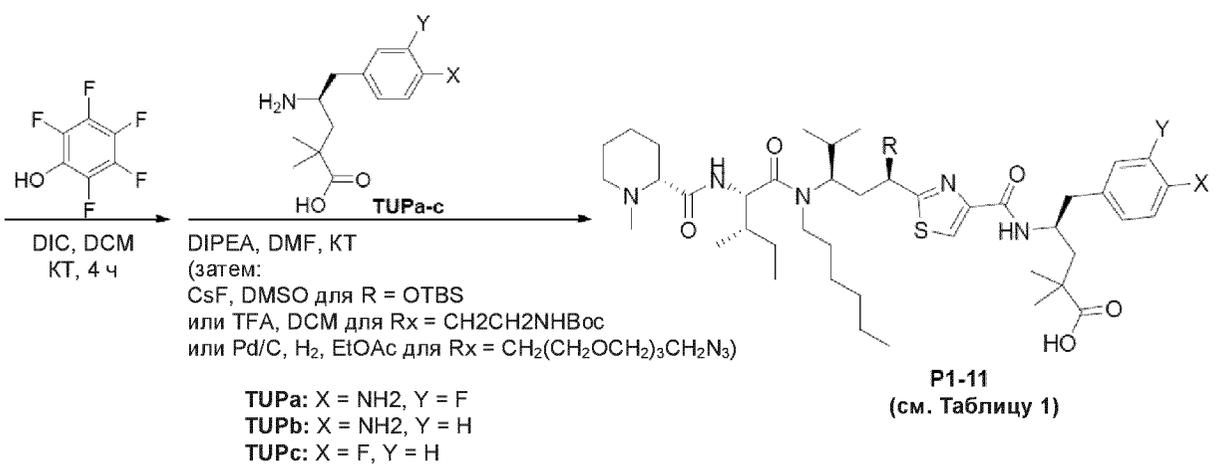
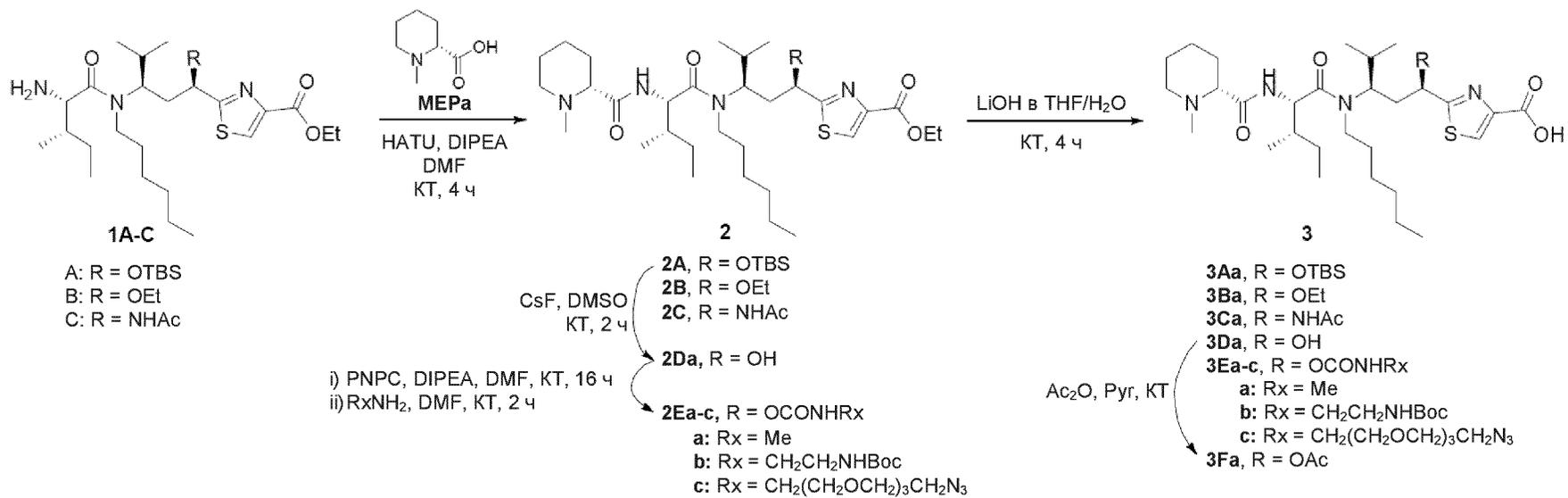
ФИГ. 3 Синтез промежуточного соединения 1C



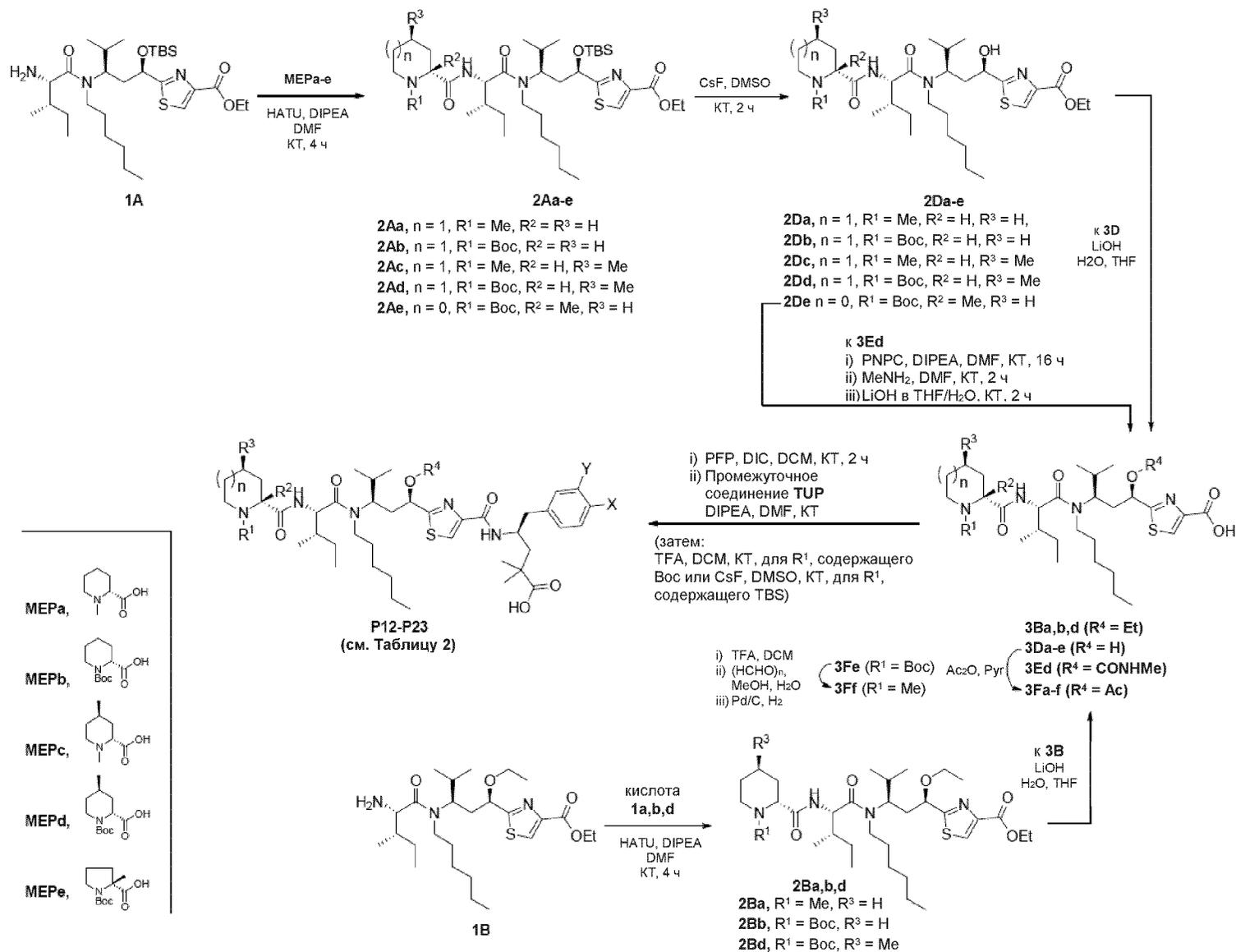
ФИГ. 4 Синтез промежуточного соединения 1G



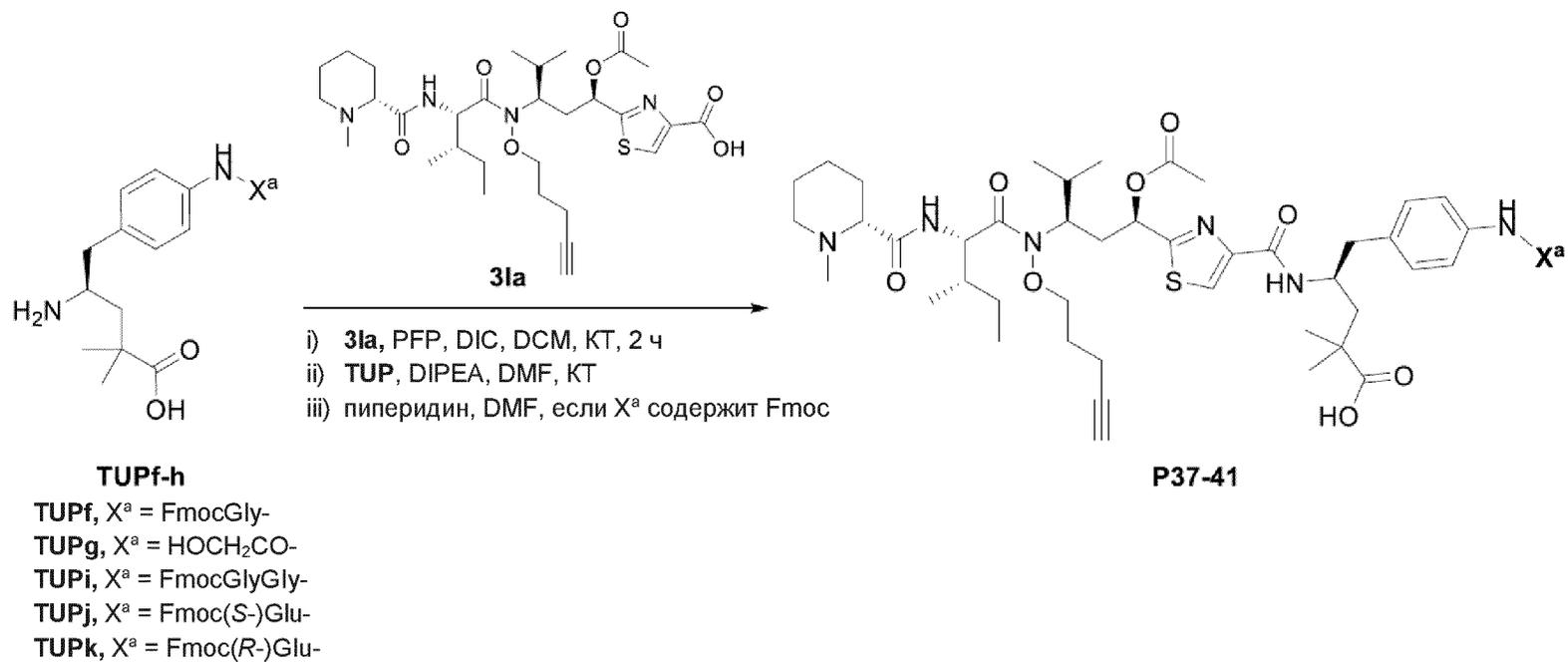
ФИГ. 5 Синтез промежуточного соединения TUP



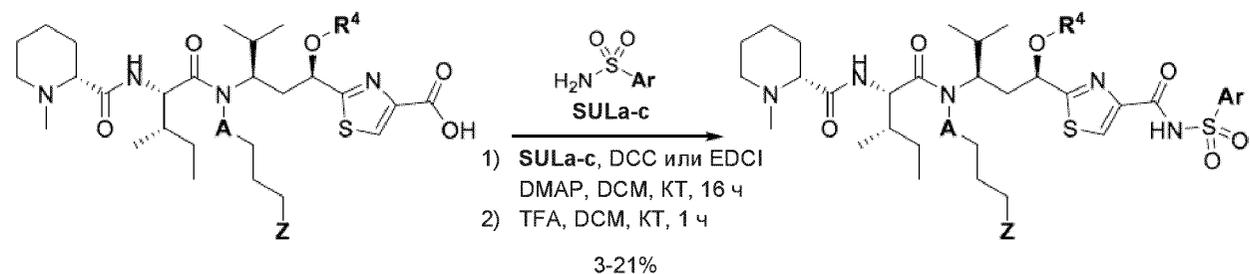
ФИГ. 6 Синтез тубулизиновых нагрузок в Таблице 1



ФИГ. 7 Синтез тубулизиновых нагрузок в Таблице 2



ФИГ. 10 Синтез тубулизиновых нагрузок в Таблице 5

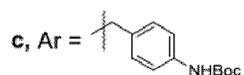
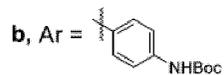
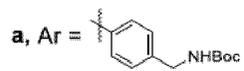


3#a

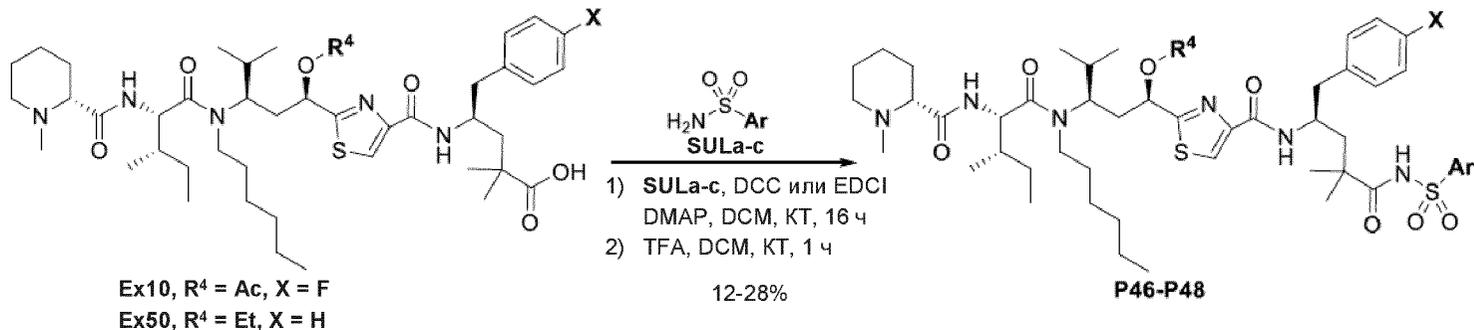
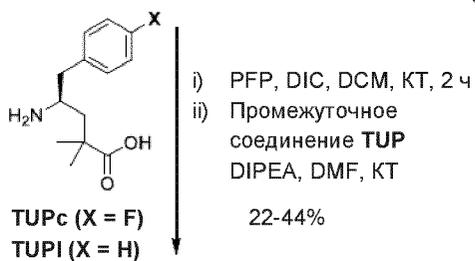
3Fa, R⁴ = Ac, A = CH₂, Z = CH₂CH₃

3Ba, R⁴ = Et, A = CH₂, Z = CH₂CH₃

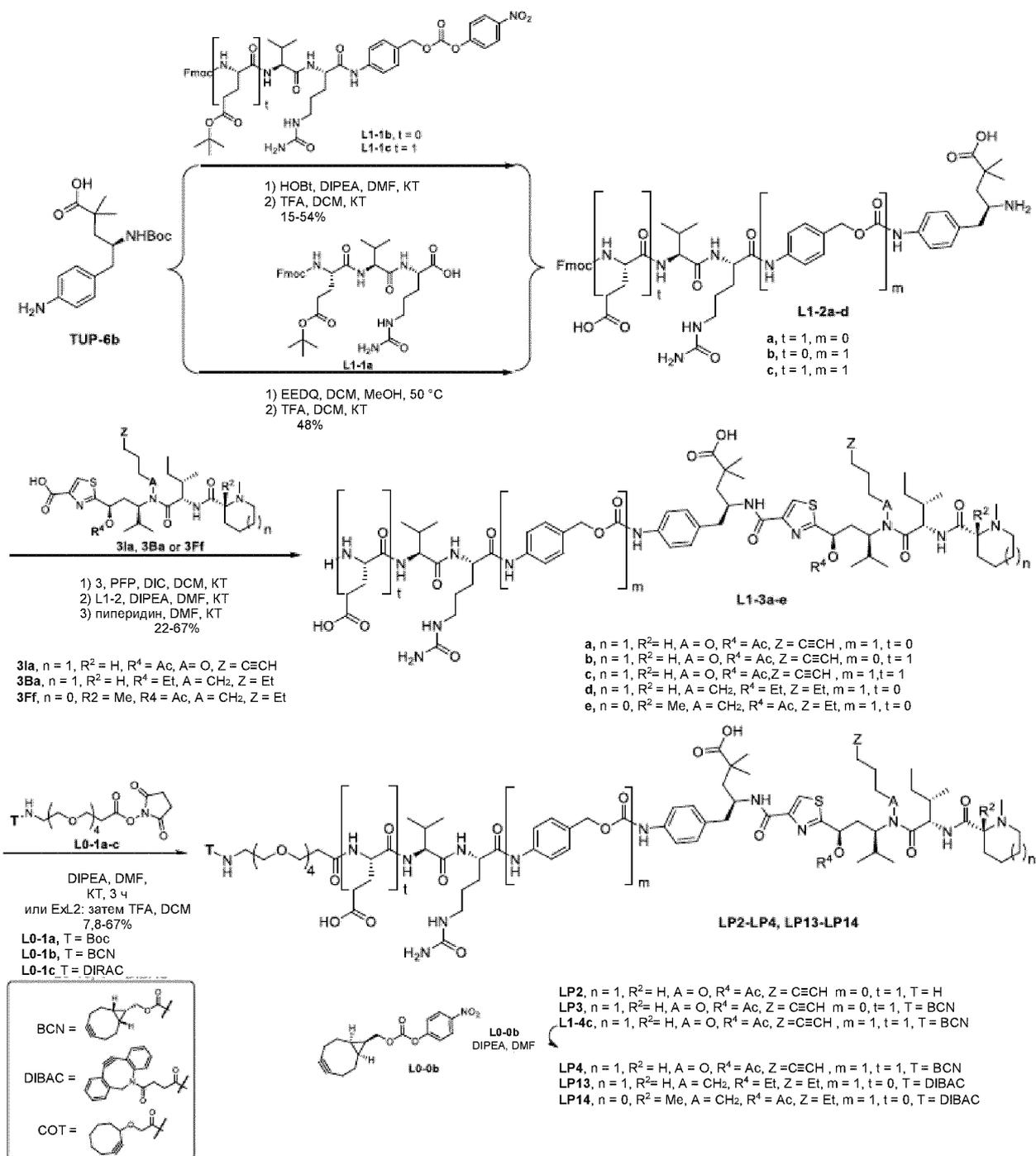
3la, R⁴ = Ac, A = O, Z = C=CH



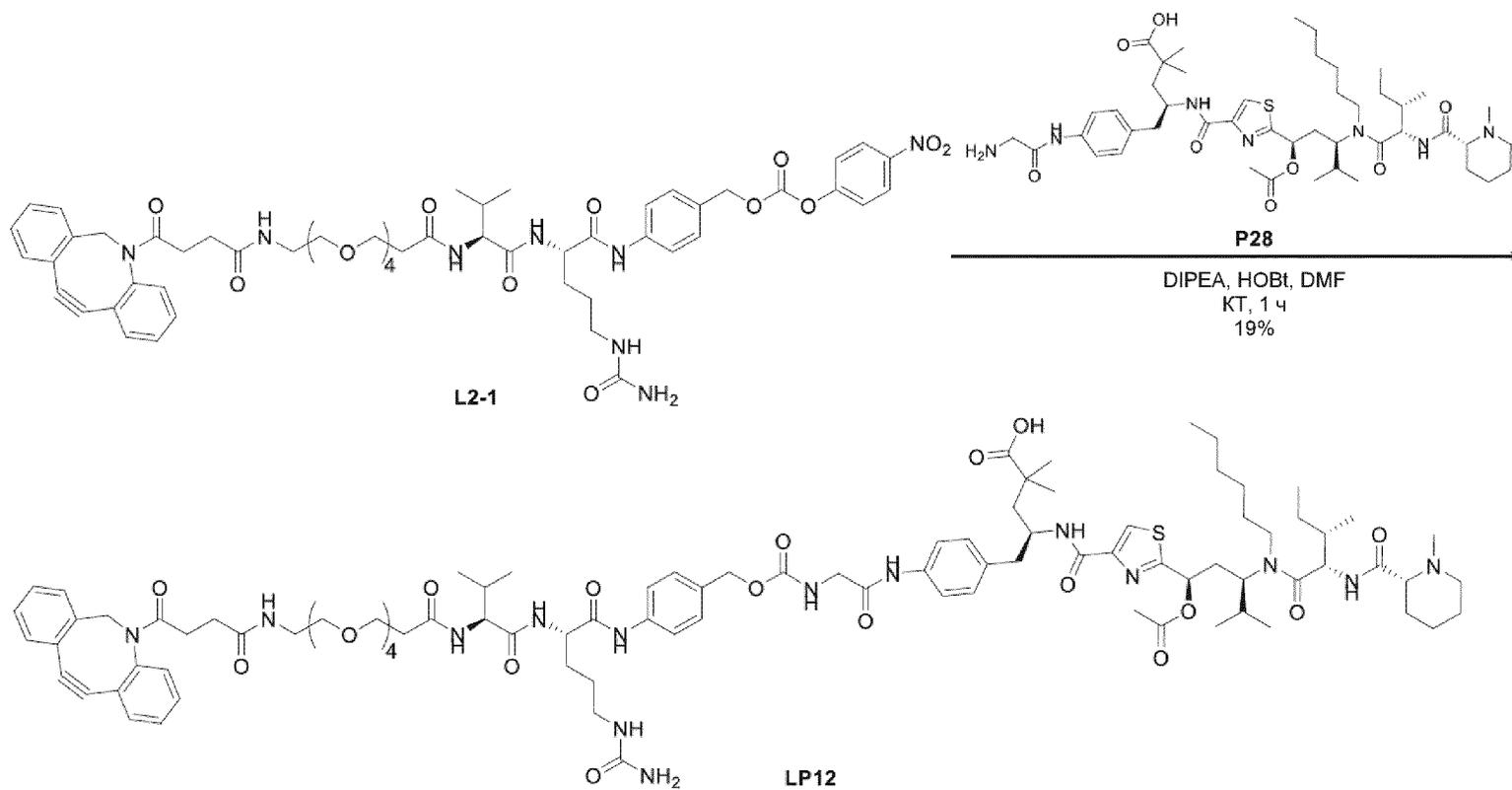
TFA, DCM $\left\{ \begin{array}{l} \text{Boc-P42-P45, P49} \\ \text{P42-P45, P49} \end{array} \right.$



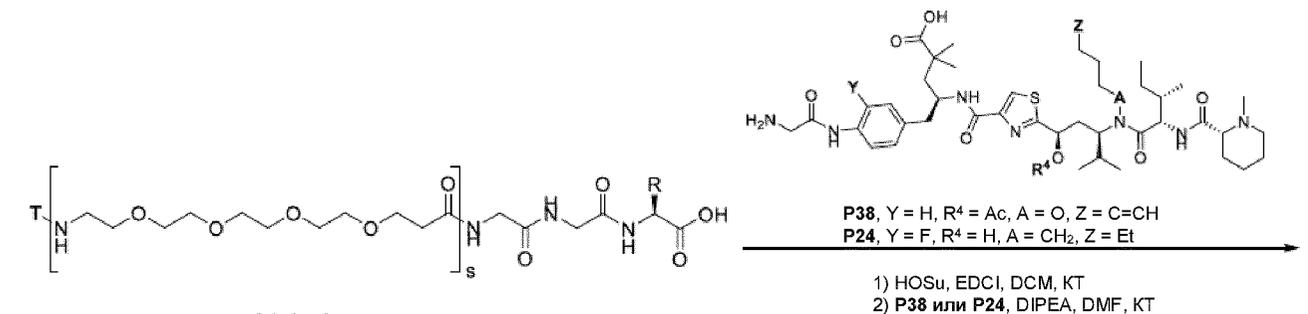
ФИГ. 11 Синтез тубулизиновых нагрузок в Таблице 6



ФИГ. 12А. Синтез линкер-нагрузок LP1-LP4, LP13-LP14

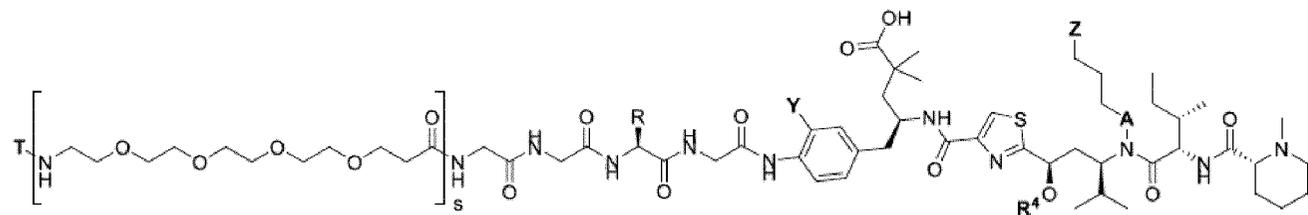


ФИГ. 12В. Синтез линкер-нагрузки LP12



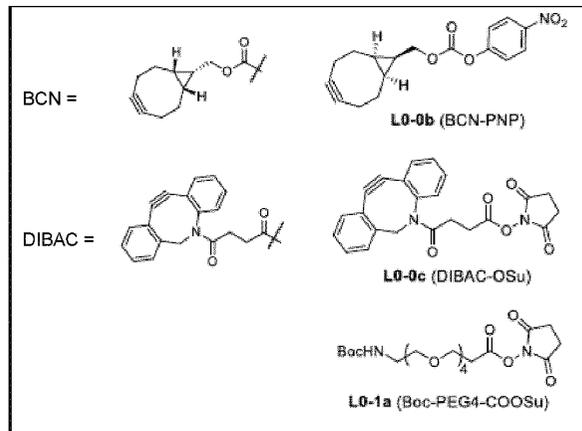
L3-1a-d

- 1) Et₃NH, CH₃CN, KT
 2) L0-1a, DIPEA, DMF, KT
- L3-1a:** Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH (T = Fmoc, s = 0, R = H)
L3-1b: Fmoc-Gly-Gly-Phe-OH (T = Fmoc, s = 0, R = Bn)
- 1) TFA, DCM, KT
 2) L0-0b, DIPEA, DMF, KT
- L3-1c:** Boc-PEG4-Gly-Gly-Phe-OH (T = Boc, s = 1, R = Bn)
L3-1d: BCN-PEG4-Gly-Gly-Phe-OH (T = BCN, s = 1, R = Bn)



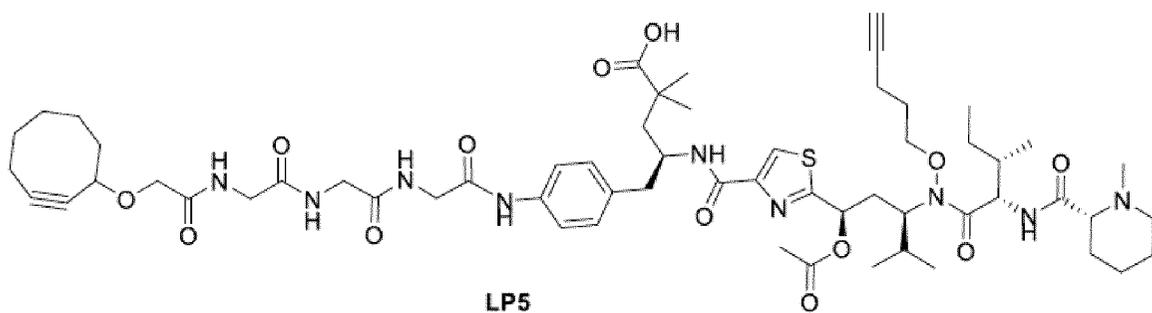
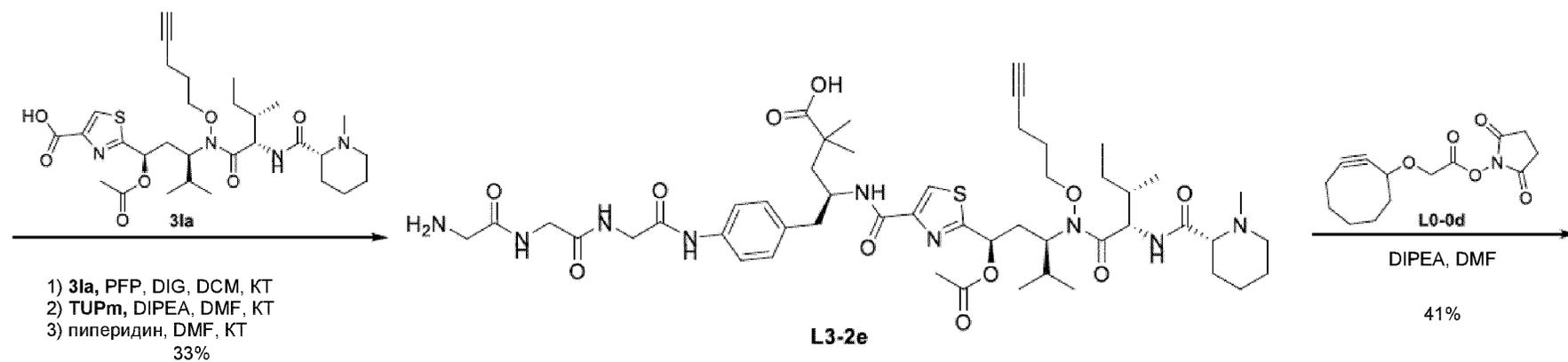
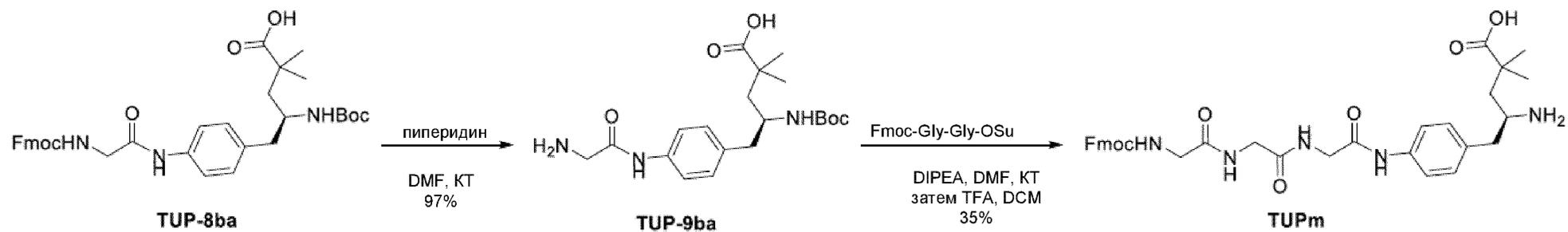
L3-2a-e
LP5-8,10-11

- 1) пиперидин, DMF
 2) L0-0b, DIPEA, DMF
- L3-2a:** T = Fmoc, s = 0, R = H, Y = H, R⁴ = Ac, A = O, Z = C≡CH
LP6: T = BCN, s = 0, R = H, Y = H, R⁴ = Ac, A = O, Z = C≡CH
- 1) TFA, DCM
 2) L0-0c, DIPEA, DMF
- L3-2b:** T = Boc, s = 1, R = Bn, Y = H, R⁴ = Ac, A = O, Z = C≡CH
LP7: T = DIBAC, s = 1, R = Bn, Y = H, R⁴ = Ac, A = O, Z = C≡CH
LP8: T = BCN, s = 1, R = Bn, Y = H, R⁴ = Ac, A = O, Z = C≡CH
- 1) пиперидин, DMF
 2) L0-0b, DIPEA, DMF
- L3-2c:** T = Fmoc, s = 0, R = Bn, Y = F, R⁴ = H, A = CH₂, Z = Et
LP10: T = BCN, s = 0, R = Bn, Y = F, R⁴ = H, A = CH₂, Z = Et
- LP11:** T = BCN, s = 1, R = Bn, Y = F, R⁴ = H, A = CH₂, Z = Et

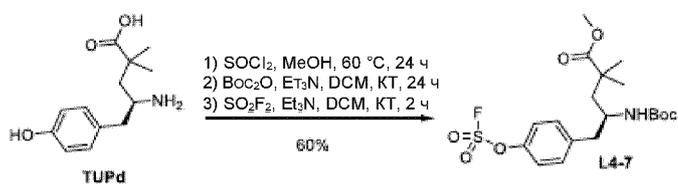
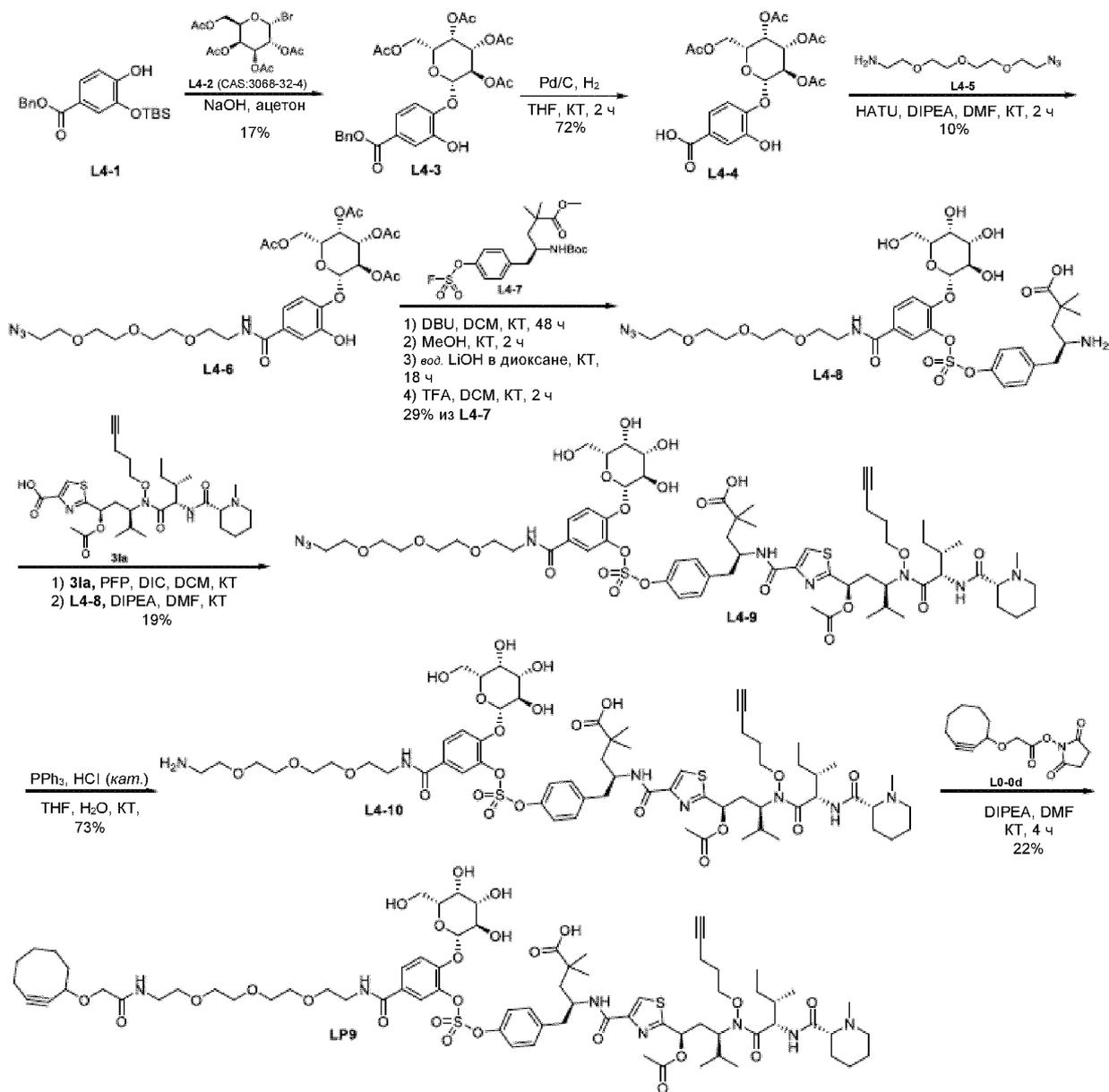


12/17

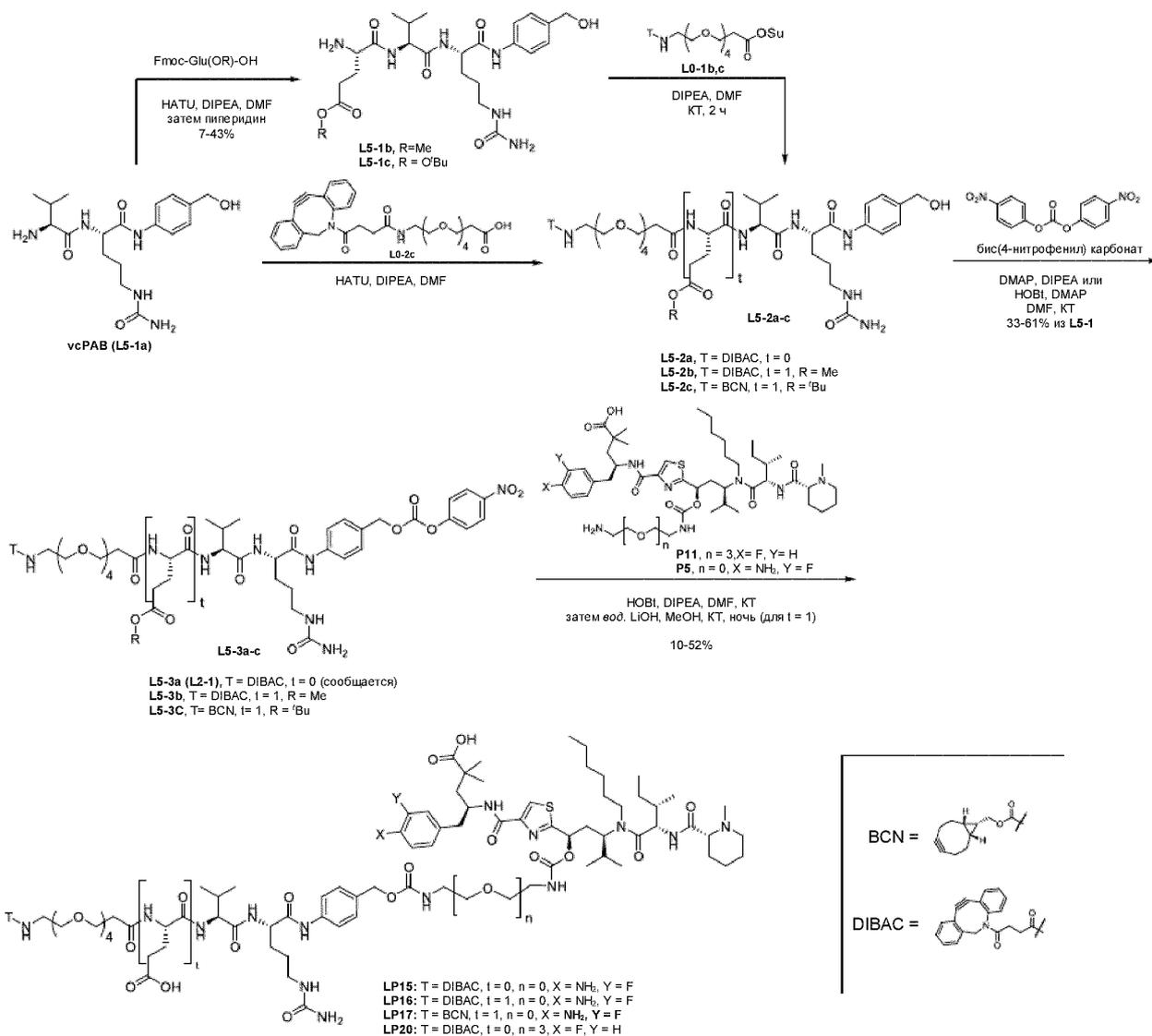
ФИГ. 13А. Синтез линкер-нагрузок LP6-LP8 и LP10-LP11



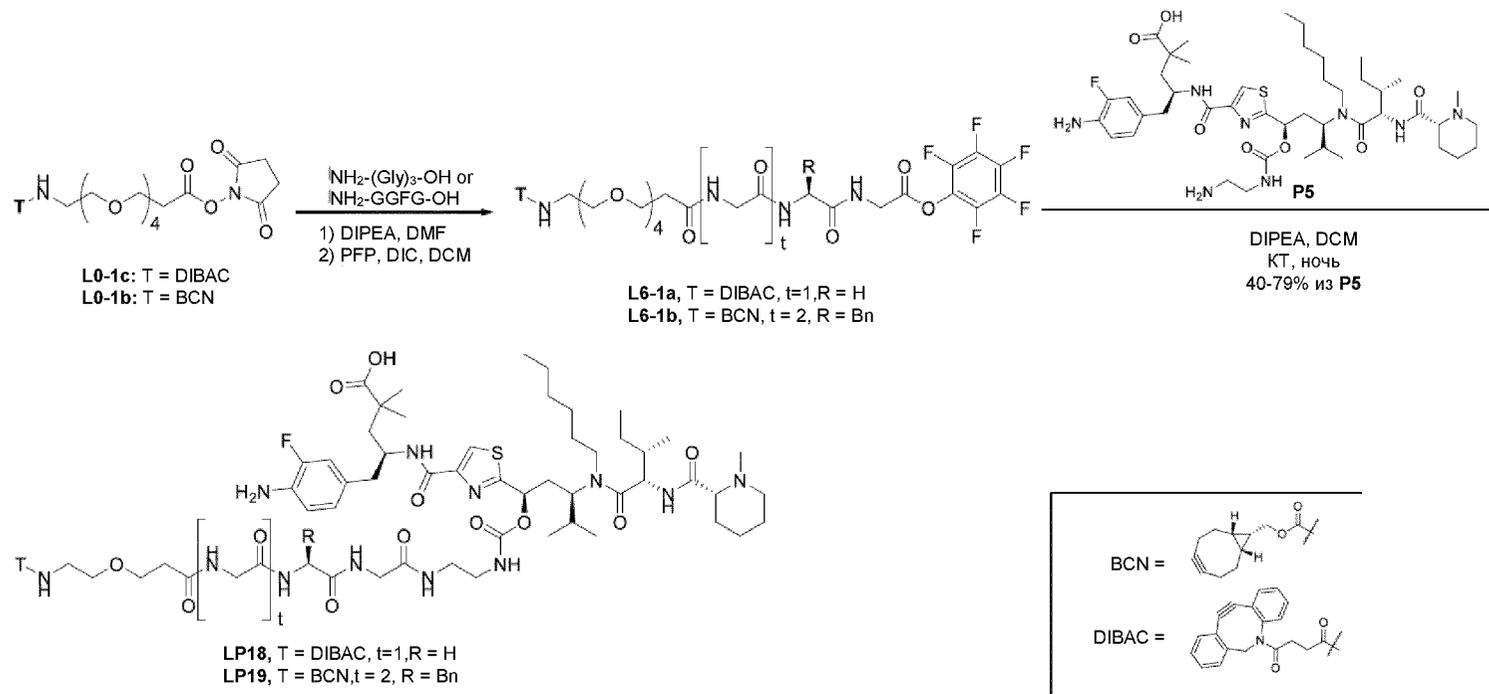
ФИГ. 13В. Синтез линкер-нагрузки LP5



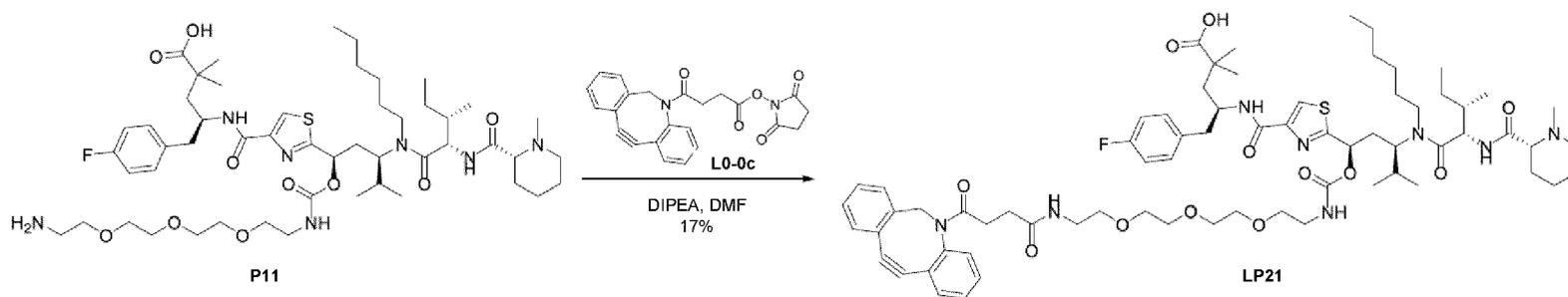
ФИГ. 14 Синтез линкер-нагрузки LP9



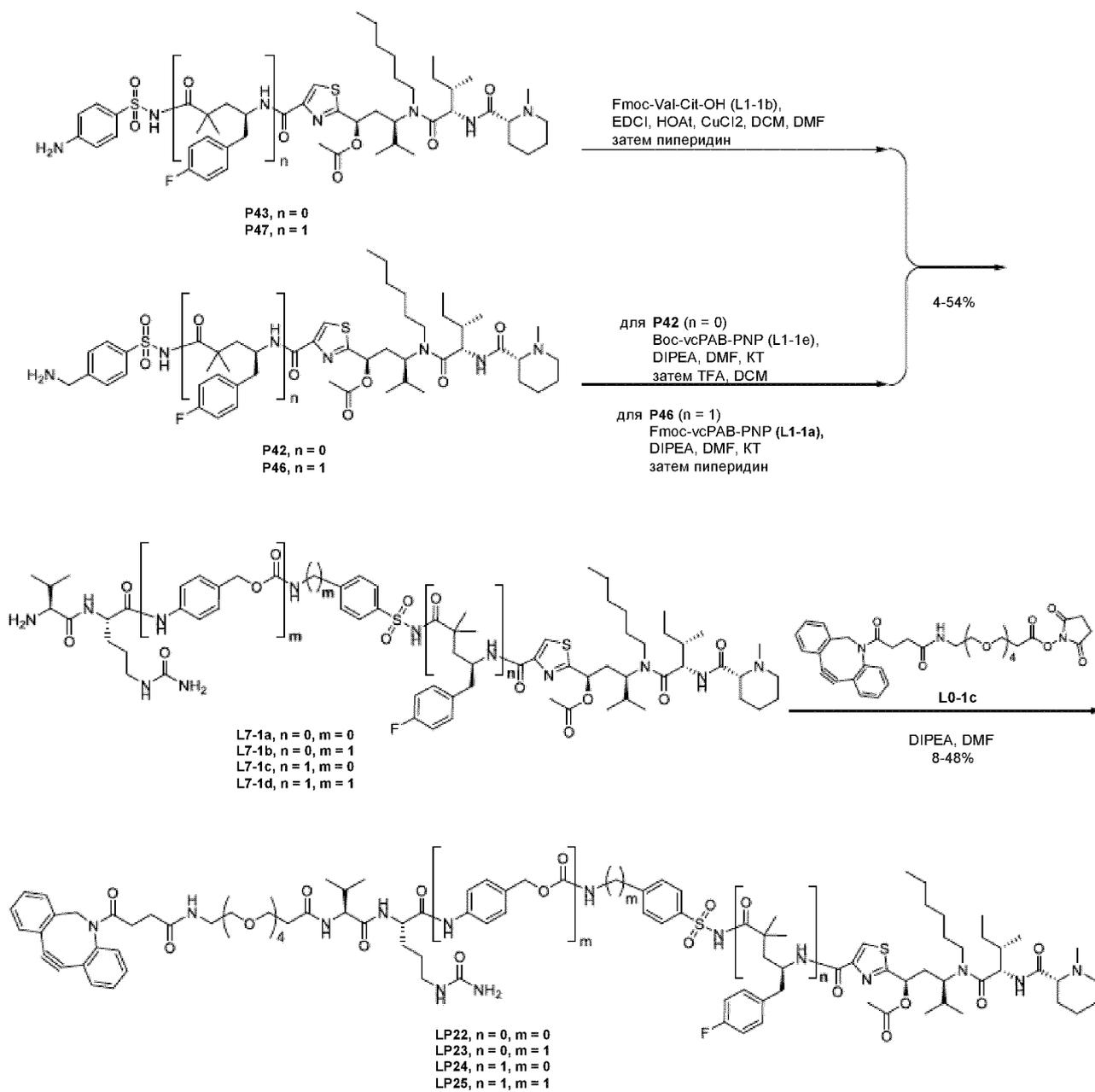
ФИГ. 15А. Синтез линкер-нагрузок LP15-LP17 и LP20



ФИГ. 15В. Синтез линкер-нагрузок LP18 и LP19



ФИГ. 15С. Синтез линкер-нагрузки LP21



ФИГ. 16 Синтез линкер-нагрузок LP22-LP25