

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392704** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.12.13**

(22) Дата подачи заявки  
**2022.03.30**

(51) Int. Cl. *A61K 47/54* (2017.01)  
*A61K 47/62* (2017.01)  
*A61K 47/68* (2017.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*C07D 455/03* (2006.01)  
*C07D 471/14* (2006.01)  
*C07D 498/14* (2006.01)  
*C07H 15/26* (2006.01)

---

(54) **АКТИВИРУЕМЫЙ ФЕРМЕНТАМИ АУТОРЕАКТИВНЫЙ ЛИНКЕР,  
ОБЛАДАЮЩИЙ УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫМИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ И  
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ**

---

(31) **21305405.9; 63/167,915**

(32) **2021.03.30**

(33) **EP; US**

(86) **PCT/EP2022/058402**

(87) **WO 2022/207699 2022.10.06**

(71) Заявитель:

**МАБЛИНК БИОСЬЯНС;  
САНТР НАСЪОНАЛЬ ДЕ ЛЯ  
РЕШЕРШ СЪЕНТИФИК - СНРС;  
ЮНИВЕРСИТЕ КЛОД БЕРНАР  
ЛИОН 1 (FR)**

(72) Изобретатель:

**Вирикель Уоррен, Джозеф Бенуа,  
Фурне Ги (FR)**

(74) Представитель:

**Фелицына С.Б. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к соединениям с активируемым ферментами аутореактивным звеном, к химическим промежуточным продуктам, используемым для получения таких соединений, и к их применению, в частности, в разработке пролекарств и технологиях конъюгации. Настоящее изобретение также относится к конъюгату лиганд-лекарственное средство (LDC), содержащему такие активируемые ферментами аутореактивные звенья.

**A1**

**202392704**

**202392704**

**A1**

АКТИВИРУЕМЫЙ ФЕРМЕНТАМИ АУТОРЕАКТИВНЫЙ ЛИНКЕР, ОБЛАДАЮЩИЙ  
УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫМИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ И  
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к соединениям, содержащим активируемое ферментами аутореактивное звено, к химическим промежуточным продуктам, используемым для получения таких соединений, и к их применению, в частности, в разработке пролекарств и технологиях конъюгации.

Настоящее изобретение также относится к конъюгату лиганд-лекарственное средство (LDC), содержащему такое активируемое ферментом аутореактивное звено.

Предшествующий уровень техники

Конъюгаты лиганд-лекарственное средство (LDC) предназначены для направленной доставки активных соединений в ткани-мишени, минуя здоровые ткани. Например, в случае LDC, предназначенного для доставки цитотоксического противоопухолевого средства к опухолевым клеткам, формат LDC может быть использован для усовершенствования профиля токсичности и улучшения переносимости лечения.

LDC содержат по меньшей мере одну лигандную единицу, которая обычно представляет собой полипептид, белок или малую молекулу-мишень, которая ковалентно связана по меньшей мере с одним терапевтическим, диагностическим или маркирующим соединением (далее именуемым лекарственным средством или D) посредством синтетического линкера. Этот синтетический линкер может содержать одно или несколько моно- или двухвалентных звеньев для соединения лигандной единицы (единиц) и лекарственной единицы (единиц), которые могут быть выбраны из спейсеров, соединителей и чувствительных к ферментам расщепляемых фрагментов. Указанный линкер может также ортогонально нести любой фрагмент, который позволяет улучшить характеристики LDC, такие как стабильность при хранении, стабильность в плазме или фармакокинетические свойства. Когда лигандная единица конъюгата является антителом или фрагментом антитела и ассоциирована с иммуностимулирующим, цитотоксическим или химиотерапевтическим лекарственным средством, обычно используют термин «конъюгат антитело-лекарственное средство» (ADC).

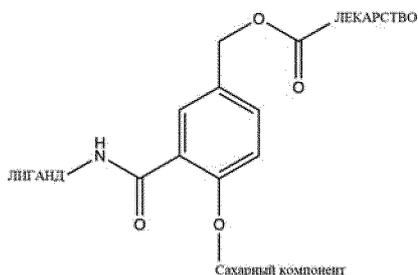
При разработке LDC существует потребность в ковалентном присоединении конечного активного лекарственного средства к единице нацеливания лиганда, обеспечивая при этом окончательное высвобождение лекарственной единицы с помощью

селективного ферментативного механизма после интернализации в клетку или в микроокружение пораженной ткани. В связи с этим было разработано несколько химических стратегий расщепления линкеров, чувствительных к пептидазе и гликозидазе (связанных с химией саморасщепления). Эти расщепляемые линкеры и соответствующие им механизмы расщепления хорошо известны и были описаны в нескольких публикациях (например, Bargh JG et al., Chem. Soc. Rev., 2019, 48, 4361, Toki et al. J. Org. Chem. 2002, 67, 6, 1866–1872, Scott et al. Bioconjugate Chem. 2006, 17, 3, 831–840).

Например, в WO2011145068 описано применение чувствительного к гликозидазе расщепляемого конъюгата лекарственного средства-линкера на основе 4-(1-гидроксипент-3-ин-1-ил)фенольного саморасщепляемого химического спейсера, с обеспечением, таким образом, терминального алкинового фрагмента для возможностей клик-химии (см. формулу ниже).



В WO2017089895 описано применение чувствительного к гликозидазе расщепляемого конъюгата лекарственного средства-линкера на основе саморасщепляемого химического спейсера 2-гидрокси-5-(гидроксиметил)бензойной кислоты (см. формулу ниже).



Однако всегда необходимо разрабатывать альтернативные чувствительные к ферментам саморасщепляемые линкеры, которые позволяют улучшить физико-химические и фармакологические свойства LDC.

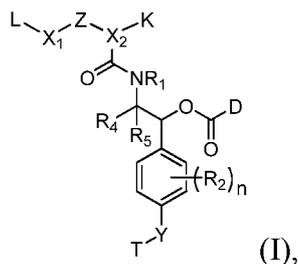
Таким образом, в данном контексте одной из целей настоящего изобретения является обеспечение чувствительного к ферментам саморасщепляемого линкера, который может быть использован для получения LDC.

Другой целью настоящего изобретения является чувствительный к ферментам самрасщепляемый линкер, который позволяет улучшить физико-химические и/или фармакологические свойства LDC.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение соединений, которые могут быть использованы для получения LDC.

Изложение сущности изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к соединению - конъюгату лиганд-лекарственное средство (LDC), имеющему следующую формулу (I)



где

L представляет собой лиганд;

X1 представляет собой соединительную единицу;

Z представляет собой необязательный спейсер;

X2 представляет собой соединительную единицу;

K представляет собой необязательный компонент, маскирующий гидрофобность, предпочтительно выбранный из полисаркозина и полиэтиленгликоля;

R1 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации;

указанный алкила и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR'', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

D представляет собой активный агент, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из лекарственных средств, средств визуализации и флуорофоров;

каждый R2 независимо выбран из группы, состоящей из электроноакцепторных групп и C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкила;

n составляет 0, 1 или 2;

R4 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими

гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)- и -NR''-;

R5 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)- и -NR''-;

T представляет собой сахарную расщепляемую единицу или полипептидную расщепляемую единицу;

Y представляет собой O, когда T является сахарной расщепляемой единицей, или NR3, когда T является полипептидной расщепляемой единицей;

R3 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанный алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR'', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

R'' и R''' независимо выбраны из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

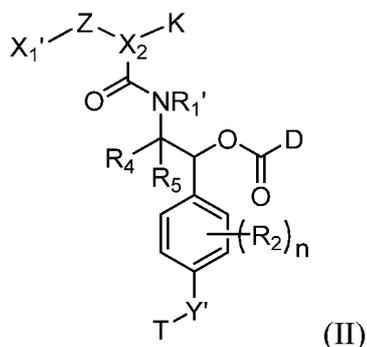
и его фармацевтически приемлемым солям.

Неожиданно было обнаружено, что при использовании саморасщепляющегося линкера на основе 2-амино-1-(4-аминофенил)этан-1-ола или 2-амино-1-(4-оксофенил)этан-1-ола, как в формуле (I), получены LDC, имеющие улучшенную гидрофильность и усовершенствованные фармакокинетические профили *in vivo*. Этот саморасщепляющийся линкер также облегчает производство, очистку и приготовление композиции соединения формулы (I) и, следовательно, повышает выход. Соединение формулы (I) также обладает меньшим потенциалом агрегации из-за присутствия этого специфического линкера.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение по настоящему изобретению, предпочтительно соединение формулы (I), и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к соединению по настоящему изобретению, предпочтительно к соединению формулы (I), для применения в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение также относится к промежуточному соединению формулы (II):



где

$X_1'$  представляет собой группу, которая может вступать в реакцию с лигандом с образованием соединительной единицы;

$Z$  представляет собой необязательный спейсер;

$X_2$  представляет собой соединительную единицу;

$K$  представляет собой необязательный компонент, маскирующий гидрофобность, предпочтительно выбранный из полисаркозина и полиэтиленгликоля;

$R_1'$  выбран из группы, состоящей из амино защитных групп,  $H$ ,  $C_1$ - $C_{24}$  алкила,  $C_2$ - $C_6$  алкенила; необязательно замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов,  $C_3$ - $C_8$  циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-NR''-$ ,  $-C(O)NR''-$ ,  $-NR''-C(O)-$ ,  $-NR''-C(O)-NR'''-$ ,  $-NR''-C(O)-O-$ ,  $-O-C(O)NR''-$  и триазола;

$D$  представляет собой активный агент, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из лекарственных средств, средств визуализации и флуорофоров;

каждый  $R_2$  независимо выбран из группы, состоящей из электроноакцепторных групп и  $C_1$ - $C_4$  алкила;

$n$  составляет 0, 1 или 2;

$R_4$  выбран из группы, состоящей из  $H$ ,  $C_1$ - $C_6$  алкила и  $C_2$ - $C_6$  алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ , и  $-NR''-$ ;

$R_5$  выбран из группы, состоящей из  $H$ ,  $C_1$ - $C_6$  алкила и  $C_2$ - $C_6$  алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$  и  $NR''-$ ;

$T$  представляет собой сахарную расщепляемую единицу или полипептидную

расщепляемую единицу;

Y' представляет собой O, когда T является сахарной расщепляемой единицей, или NR3', когда T является полипептидной расщепляемой единицей;

R3' выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

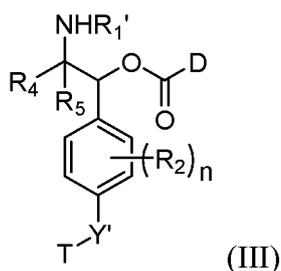
указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

R'' и R''' независимо выбраны из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

и его фармацевтически приемлемым солям.

Настоящее изобретение также относится к промежуточному соединению формулы

(III)



где

R1' выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

D представляет собой активный агент, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из лекарственных средств, средств визуализации и флуорофоров;

каждый R2 независимо выбран из группы, состоящей из электроноакцепторных групп и C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкила;

n составляет 0, 1 или 2;

R4 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, и -NR''-;

R5 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из O-, -S-, -C(O)-, и -NR''-;

T представляет собой сахарную расщепляемую единицу или полипептидную расщепляемую единицу;

Y' представляет собой O, когда T является сахарной расщепляемой единицей, или NR<sub>3</sub>', когда T является полипептидной расщепляемой единицей;

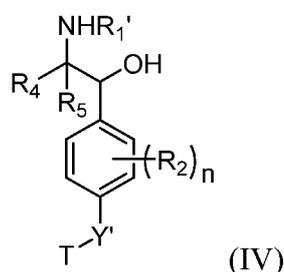
R<sub>3</sub>' выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR'', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

R'' и R''' независимо выбраны из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

и его фармацевтически приемлемым солям.

Настоящее изобретение также относится к промежуточному соединению формулы (IV)



где

R<sub>1</sub>' выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

каждый R<sub>2</sub> независимо выбран из группы, состоящей из электроноакцепторных групп;

n составляет 0, 1 или 2;

R<sub>4</sub> выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)- и -NR''-;

R<sub>5</sub> выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)- и -NR''-;

T представляет собой сахарную расщепляемую единицу или полипептидную расщепляемую единицу;

Y' представляет собой O, когда T является сахарной расщепляемой единицей, или NR<sub>3</sub>', когда T является полипептидной расщепляемой единицей;

R<sub>3</sub>' выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

R'' и R''' независимо выбраны из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

и его фармацевтически приемлемым солям.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 и 2 представлены хроматограммы гидрофобного взаимодействия в соответствии с примером 3.

На фиг. 3 и 4 представлены анализы цитотоксичности конъюгатов *in vitro* в соответствии с примером 4.

На фиг. 5 представлены анализы цитотоксичности конъюгатов *in vitro* в соответствии с примером 5.

На фиг. 6, 7, 8 и 9 представлены фармакокинетические профили *in vivo* у крыс и фармакокинетические параметры в соответствии с примером 6.

На фиг. 10 представлены объемы опухоли в зависимости от времени на модели ксенотрансплантата рака желудка у мышей, согласно примеру 7.

Подробное описание изобретения

Определения

Здесь описаны различные варианты осуществления изобретения. Следует понимать, что признаки, указанные в каждом варианте осуществления, могут быть объединены с другими указанными признаками для обеспечения дальнейших вариантов осуществления.

Настоящее изобретение охватывает соединения по настоящему изобретению, их таутомеры, энантиомеры, диастереомеры, рацематы или их смеси, а также их гидраты, сложные эфиры, сольваты или фармацевтически приемлемые соли.

Любая формула, приведенная в настоящей заявке, также предназначена для представления немеченых, а также изотопно меченых форм соединений, таких как соединения, меченные дейтерием, или соединения, меченные  $^{14}\text{C}$ .

Термины «фармацевтически приемлемые соли» относятся к солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства соединений по настоящему изобретению и которые, как правило, не являются биологически или иным образом нежелательными. Во многих случаях соединения по изобретению способны формировать кислотные и/или щелочные соли благодаря присутствию amino- и/или карбоксильных групп или аналогичных им групп. Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот могут быть получены с органическими кислотами и/или неорганическими кислотами. Фармацевтически приемлемые соли присоединения оснований могут быть образованы с органическими основаниями и/или неорганическими основаниями. Такие соли хорошо известны специалистам в данной области техники.

Используемые в настоящей заявке термины « $\text{C}_1\text{-C}_{24}$  алкил» сами по себе или как часть другого заместителя относятся к линейной или разветвленной алкильной функциональной группе, имеющей от 1 до 24 атомов углерода, предпочтительно от 1 до 20 атомов углерода, более предпочтительно от 1 до 12 или от 1 до 6 атомов углерода. Подходящие алкильные группы включают метил, этил, *n*-пропил, *i*-пропил, *n*-бутил, *i*-бутил, *s*-бутил и *t*-бутил, пентил и их изомеры (например, *n*-пентил, изо-пентил) и гексил и его изомеры (например, *n*-гексил, изо-гексил).

Алкилен, используемый отдельно или, например, как часть алкиленгликоля, относится к двухвалентной насыщенной, прямоцепочечной или разветвленной алкильной

группе, как определено в настоящей заявке.

Алкенил и алкинил относятся по меньшей мере к частично ненасыщенной, прямоцепочечной или разветвленной углеводородной группе, имеющей 2-20 атомов углерода, предпочтительно 2-12, более предпочтительно 2-6, особенно 2-4. Алкенильная группа содержит по меньшей мере одну двойную связь  $C=C$ ; алкинильная группа содержит по меньшей мере одну тройную связь  $C\equiv C$ .

Используемые в настоящей заявке термины « $C_3$ - $C_8$  циклоалкил» или «карбоцикл» относятся к насыщенной или ненасыщенной циклической группе, имеющей от 3 до 8 атомов углерода, предпочтительно от 3 до 6. Циклоалкил может иметь одно кольцо или несколько колец, слитых вместе. Циклоалкил может также включать спироциклические кольца. Подходящие циклоалкильные группы включают циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил.

Используемые в настоящей заявке термины « $C_3$ - $C_8$  циклоалкилен» или «карбоцикло» относятся к двухвалентному циклоалкилу, как определено здесь.

Используемый в настоящей заявке термин «галоген» относится к группе фтора (-F), хлора (-Cl), брома (-Br) или йода (-I).

Используемые в настоящей заявке термины « $C_1$ - $C_6$  галоалкил» относятся к  $C_1$ - $C_6$  алкилу, как определено здесь, который замещен одной или несколькими галогеновыми группами, как определено здесь. Подходящие  $C_1$ - $C_6$  галоалкильные группы включают трифторометил и дихлорометил.

Используемый в настоящей заявке термин «гетероалкил» относится к прямой или разветвленной углеводородной цепи, состоящей из 1-12 атомов углерода, предпочтительно от 1 до 10, более предпочтительно от 1 до 6 атомов углерода, и от одного до трех гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N, Si и S, и где атомы азота и серы при необходимости могут быть окислены (например, сульфоксид или сульфон), а гетероатом азота при необходимости может быть кватернизирован. Гетероатом (гетероатомы) O, N и S могут быть расположены в любом внутреннем положении гетероалкильной группы или в положении, в котором алкильная группа присоединена к остальной части молекулы.

Гетероалкилен относится к двухвалентному гетероалкилу, как определено выше. Для гетероалкиленовых групп гетероатомы также могут занимать один или оба конца цепи.

Используемый в настоящей заявке термин « $C_1$ - $C_6$  алкокси» относится к -O-алкильной группе, где алкильная группа представляет собой  $C_1$ - $C_6$  алкил, как определено здесь. Подходящие  $C_1$ - $C_6$  алкокси группы включают метокси, этокси, пропокси.

Используемый в настоящей заявке термин «С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub> галоалкокси» относится к С<sub>1</sub>-С<sub>6</sub> алкокси группе, как определено здесь, которая замещена одной или несколькими галогеновыми группами, как определено здесь. Подходящие галоалкокси включают трифторметокси.

Используемый в настоящей заявке термин «арил, имеющий от 6 до 10 кольцевых атомов» относится к полиненасыщенной ароматической гидрокарбильной группе, имеющей одно кольцо или множество ароматических колец, конденсированных вместе, содержащих от 6 до 10 кольцевых атомов, причем по меньшей мере одно кольцо является ароматическим. Ароматическое кольцо может при необходимости включать одно-два дополнительных кольца (циклоалкильное, гетероциклическое или гетероарильное, как определено здесь), конденсированных с ним. Подходящие арильные группы включают фенил, нафтил и фенильное кольцо, конденсированное с гетероциклом, таким как бензопиранил, бензодиоксолил, бензодиоксанил и тому подобное.

Арилен относится к двухвалентной арильной группе, как определено выше.

Используемый в настоящей заявке термин «гетероарил, имеющий от 5 до 10 кольцевых атомов» относится к полиненасыщенной ароматической кольцевой системе, имеющей одно кольцо или множество ароматических колец, конденсированных вместе или связанных ковалентно, содержащих от 5 до 10 атомов, где по меньшей мере одно кольцо является ароматическим и по меньшей мере один кольцевой атом является гетероатомом, выбранным из N, O и S. Гетероатомы азота и серы при необходимости могут быть окислены, а гетероатомы азота при необходимости могут быть кватернизированы. Такие кольца могут быть конденсированным с арильным, циклоалкильным или гетероциклическим кольцом. Неограничивающие примеры такого гетероарила включают фуранил, тиофенил, пирролил, пиразолил, имидазолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, изотиазолил, триазолил, оксадиазолил, тиадиазолил, тетразолил, оксатриазолил, тиатриазолил, пиридинил, пиримидил, пиразинил, пиридазинил, оксазинил, диоксинил, тиазинил, триазинил, индолил, изоиндолил, бензофуранил, изобензофуранил, бензотиофенил, изобензотиофенил, индазолил, бензимидазолил, бензоксазолил, пуринил, бензотиадиазолил, хинолинил, изохинолинил, циннолинил, хиназолинил и хиноксалинил.

Используемый в настоящей заявке термин «гетероциклил, имеющий от 3 до 10 кольцевых атомов», «гетероциклоалкил, имеющий от 3 до 10 кольцевых атомов» или «гетероциклил» относятся к насыщенной или ненасыщенной циклической группе, имеющей от 3 до 10 кольцевых атомов, предпочтительно от 3 до 8 кольцевых атомов, где по меньшей мере один кольцевой атом является гетероатомом, выбранным из N, O и S.

Гетероатомы азота и серы при необходимости могут быть окислены, а гетероатомы азота при необходимости могут быть кватернизированы. Гетероцикл может включать конденсированные или мостиковые кольца, а также спироциклические кольца. Примеры гетероцикла включают, без ограничения указанными, тетрагидропиридил, пиперидинил, морфолинил, тетрагидрофуранил, тетрагидротиенил, пиперазинил, 1-азепанил, имидазолинил, 1,4-диоксанил и тому подобное.

Используемые в настоящей заявке термины «гетероцикло» или «гетероциклоалкилен» относятся к двухвалентному гетероциклу, как определено здесь.

Кроме того, термины алкил, алкенил, алкинил, арил, алкилен, арилен, гетероалкил, гетероалкилен, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикл, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикл, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло, полиэфир относятся к необязательно замещенным группам с одним или несколькими заместителями, выбранными из -X, -R', -O', -OR', =O, -SR', -S', -NR'<sub>2</sub>, -NR'<sub>3</sub>, =NR', -CX<sub>3</sub>, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO<sub>2</sub>, =N<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -NRC(=O)R', -C(=O)R', -C(=O)NR'<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -S(=O)<sub>2</sub>R', -OS(=O)<sub>2</sub>OR', -S(=O)<sub>2</sub>NR', -S(=O)R', -OP(=O)(OR')<sub>2</sub>, -P(=O)(OR')<sub>2</sub>, -PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -C(=O)R', -C(=O)X, -C(=S)R', -CO<sub>2</sub>R', -CO<sub>2</sub>, -C(=S)OR', C(=O)SR', C(=S)SR', C(=O)NR'<sub>2</sub>, C(=S)NR'<sub>2</sub> и C(=NR')NR'<sub>2</sub>, где каждый X независимо является галогеном: -F, -Cl, -Br или -I; и каждый R' независимо представляет собой -H, -C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> алкил, -C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> арил или -C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> гетероцикл.

Ацильная группа относится к -CO-алкилу, где алкил имеет приведенное выше определение.

Используемый в настоящей заявке термин «полиэфир» относится к полимеру, содержащему эфирную связь. Количество эфирных фрагментов в полиэфире может составлять от 2 до 100, предпочтительно от 2 до 25, в частности от 2 до 10. Примеры простых полиэфиров включают полиэтиленгликоль, такой как полиэтиленгликоль, имеющий от 2 до 100 эфирных фрагментов, предпочтительно от 2 до 25 и, в частности, от 2 до 10.

Термины «при необходимости замещенный полиэфир» могут относиться к полиэфиру и, в частности, полиэтиленгликолю, который при необходимости замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из галогена, оксо, -OH, -NO<sub>2</sub>, -CN, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> циклоалкила, гетероциклила, имеющего 5 до 10 атомов кольца, арила, имеющего от 6 до 10 атомов кольца, гетероарила, имеющего от 5 до 10 атомов кольца, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> галоалкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> галоалкокси, -(CO)-R', -O-(CO)-R', -(CO)-O-R', -(CO)-NR''R''', -NR''-(CO)-R' и -NR''R'''; R', R'' и R''', независимо выбранных из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила.

Твердофазный пептидный синтез (SPPS) относится к хорошо известному способу,

в котором пептид, прикрепленный к носителю, нерастворимому полимеру, собирают путем последовательного добавления аминокислот, защищенных Fmoc или Boc, посредством повторяющихся циклов снятия защиты-промывания-связывания-промывания. Каждое добавление аминокислоты обозначается как цикл, состоящий из: (i) отщепления Na-защитной группы, (ii) стадий промывания, (iii) соединения флуороенилметоксикарбонил- (Fmoc-) или трет-бутилоксикарбонил- (Boc-) защищенной аминокислоты с использованием реагентов для связывания и ненуклеофильного основания, (iv) стадий промывания. Поскольку растущая цепочка связана с указанной подложкой, избыток реагентов и растворимых побочных продуктов может быть удален простой фильтрацией. Поскольку повторные реакции связывания с Fmoc- или Boc-защищенными N-метилированными аминокислотами являются сложными и часто неоптимальными, при использовании этого метода следует ожидать низкой чистоты продукта, трудной очистки и низких выходов. Примерами указанной подложки являются смола Ванга, амидная смола Ринка, тритил- и 2-хлортритиловые смолы, смола РАМ, смола РАL, амидная смола Зибера, смола МВНА, смола НМРВ, смола НМВА, которые коммерчески доступны, и с которыми прямо или опосредованно связывается пептид.

Конъюгат лиганд-лекарственное средство (LDC) относится к любому конъюгату, который ковалентно соединяет лиганд и лекарственное средство, как определено в настоящей заявке, и включает любое средство, подобное описанному здесь, и которое будет проиллюстрировано в примерах описания. Когда лигандом является антитело, можно сослаться на конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), который является предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения.

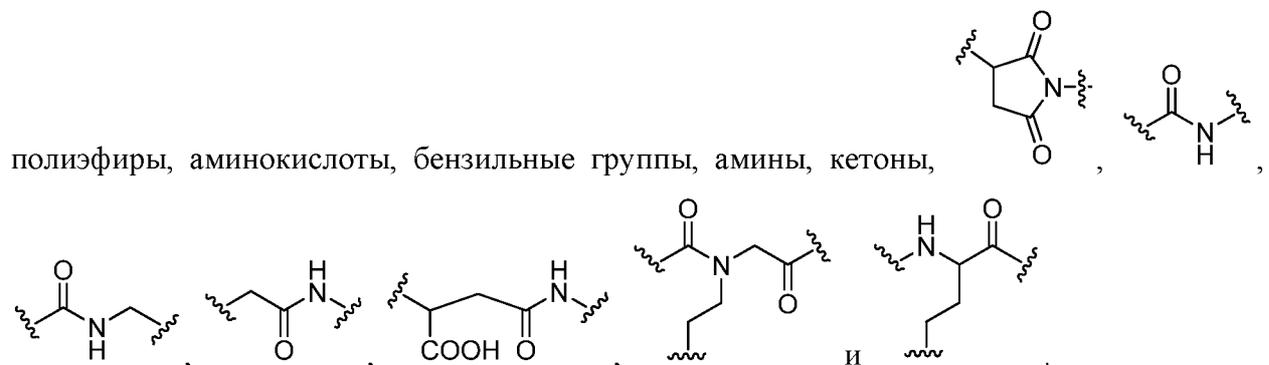
Термин «соединительная единица» относится к компоненту, который соединяет различные части соединения вместе, например, соединитель может соединять лиганд со спейсером или спейсер с амидной функцией  $-\text{CO}-\text{NR}1-$ . Соединитель представляет собой каркас, несущий участки присоединения компонентов конъюгата лиганд-лекарственное средство, а именно лиганда, спейсера, маскирующего гидрофобность компонента и/или амидной функции  $-\text{CO}-\text{NR}1-$ .

Исходя из своих знаний, специалист в данной области способен выбрать соединитель, соответствующий ожидаемому соединению LDC. Неполный перечень соединителей включает аминокислоты, например, лизин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, серин, тирозин, цистеин, селеноцистеин, глицин, гомоаланин; аминокспирты; аминокальдегиды; полиамины или любую их комбинацию. Предпочтительно соединительная единица X1 и/или X2 представляет собой одну или несколько природных или не природных аминокислот. В одном варианте осуществления соединительная

единица X1 и/или X2 выбрана из глутаминовой кислоты, лизина и глицина. Соединительные единицы X1 и X2 могут быть независимо выбраны из группы, состоящей из одной или нескольких аминокислот, одной или нескольких N-замещенных аминокислот, при необходимости замещенного полиэфира, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкилена, арилена, имеющего от 6 до 10 атомов кольца, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкилена, гетероциклоалкилена, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, гетероарилена, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкенилена и любой их комбинации, причем указанные алкилен и алкенилен при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR'' и триазола,

и указанные алкилен, арилен, циклоалкилен, гетероциклоалкилен, гетероарилен и алкенилен при необходимости замещены одним или несколькими заместителями, выбранными из галогена, оксо, -OH, -NO<sub>2</sub>, -CN, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> циклоалкила, гетероциклила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> галоалкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> галоалкокси, -(CO)-R', -O-(CO)-R', -(CO)-O-R', -(CO)-NR''R''', -NR''-(CO)-R', и -NR''R'''; причем R', R'' и R''' независимо выбраны из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила.

Примеры соединительных единиц включают необязательно замещенные



В частности, соединительная единица может быть двухвалентной или трехвалентной. Например, X2 может быть трехвалентной соединительной единицей, когда присутствует компонент К, маскирующий гидрофобность.

Термин «аминокислоты» относится к природным или неприродным аминокислотам. CO фрагмент -CONR1- или -CONR1'-группы можно рассматривать как часть соединительной единицы X2, когда X2 состоит из одной или нескольких аминокислот. Неполный список аминокислот включает лизин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, серин, тирозин, цистеин, селеноцистеин, глицин и гомоаланин.

Спейсер представляет собой двухвалентное звено, которое ковалентно связывает два компонента конъюгата лиганд-лекарственное средство, такие как 2 соединительных

единицы. Спейсер Z может присутствовать или отсутствовать.

Неполный перечень спейсеров включает алкилен, гетероалкилен (таким образом, алкилен прерывается по меньшей мере одним гетероатомом, выбранным из Si, N, O и S); алкокси; простой полиэфир, такой как полиалкиленгликоль и, как правило, полиэтиленгликоль; одну или несколько природных или не природных аминокислот, таких как глицин, аланин, пролин, валин, N-метилглицин; C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло; C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло; арилен и любую их комбинацию. Например, спейсером является двухвалентная линейная алкиленовая группа, предпочтительно (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>.

Например, спейсер может быть выбран из группы, состоящей из -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> гетероалкилен-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил)-, -арилен-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-арилен-, -арилен-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло)-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло)-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-C(=O)-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> гетероалкилен-C(=O)-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло-C(=O)-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил)-C(=O)-, -арилен-C(=O)-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-арилен-C(=O)-, -арилен-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-C(=O)-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло)-C(=O)-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-C(=O)-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло-C(=O)-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло)-C(=O)-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-C(=O)-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-NH-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> гетероалкилен-NH-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло-NH-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил)-NH-, -арилен-NH-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-арилен-NH-, -арилен-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-NH-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло)-NH-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-NH-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло-NH-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло)-NH-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-NH-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-S-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> гетероалкилен-S-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло-S-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил)-S-, -арилен-S-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-арилен-S-, -арилен-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-S-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло)-S-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-S-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло-S-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло)-S-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-S-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-O-C(=O)-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло-O-C(=O)-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил)-O-C(=O)-, -арилен-O-C(=O)-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-арилен-O-C(=O)-, -арилен-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-O-C(=O)-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло)-O-C(=O)-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> карбоцикло)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-O-C(=O)-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло-O-C(=O)-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло)-O-C(=O)- и -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-O-C(=O)-.

Любая из упомянутых выше групп при необходимости замещается одним или несколькими заместителями, выбранными из -X, -R', -O', -OR', =O, -SR', -S', -NR'<sub>2</sub>, -NR'<sub>3</sub><sup>+</sup>, =NR', -CX<sub>3</sub>, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO<sub>2</sub>, =N<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -NR'C(=O)R', -C(=O)R', -C(=O)NR'<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -S(=O)<sub>2</sub>R', -OS(=O)<sub>2</sub>OR', -S(=O)<sub>2</sub>NR', -S(=O)R', -OP(=O)(OR')<sub>2</sub>, -P(=O)(OR')<sub>2</sub>, -PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -C(=O)X, -C(=S)R', -CO<sub>2</sub>R', -CO<sub>2</sub>, -C(=S)OR',

$C(=O)SR'$ ,  $C(=S)SR'$ ,  $C(=O)NR'_2$ ,  $C(=S)NR'_2$  и  $C(=NR')NR'_2$ , где каждый X независимо представляет собой галоген: -F, -Cl, -Br или -I; и каждый R' независимо представляет собой -H, -C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> алкил, -C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> арил, или -C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> гетероцикл.

Лиганд относится к любой макромолекуле (полипептиду, белку, пептидам, обычно антителам), обычно используемой в технологиях LDC (например, к конъюгатам антитело-лекарственное средство), или к малой молекуле, такой как фолиевая кислота или аптамер, которые могут быть ковалентно конъюгированы с синтетическими линкерами или лекарственными линкерами из настоящего изобретения, используя методы биоконъюгации (см. Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 3rd Edition, 2013, Academic Press). Лиганд традиционно представляет собой соединение, которое выбирают за его нацеливающие свойства. Неполный перечень лигандов включает белки, полипептиды, пептидосодержащие соединения, антитела, полноразмерные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, интерфероны, лимфокины, гормоны, факторы роста, витамины, трансферрин или любую другую молекулу или вещество, связывающее клетки. Основным классом лигандов, используемых для получения конъюгатов, являются антитела. Примером белка является человеческий сывороточный альбумин.

Используемый в настоящей заявке термин «антитело» применяется в самом широком смысле и охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, модифицированные моноклональные и поликлональные антитела, моноспецифические антитела, полиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела, фрагменты антител и миметики антител (Affibody®, Affilin®, Affimer®, Nanofitin®, проникающий в клетку Alphabody®, Anticalin®, Avimer®, Fynommer®, монотела или nanoCLAMP®). Примером антитела является трастузумаб.

Термин «антитело», упомянутый в настоящей заявке, включает целые антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты (т.е. «антигенсвязывающую часть») или их отдельные цепи.

Природное «антитело» представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой здесь как V<sub>H</sub>) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой здесь как V<sub>L</sub>) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут быть дополнительно подразделены на области гиперварибельности, называемые областями, определяющими

комплементарность (CDR), которые разделены областями, являющимися более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термины «антигенсвязывающая часть» антитела (или просто «антигенная часть»), используемые в настоящей заявке, относятся к полноразмерному антителу, или к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающая часть» антитела, включают фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  и  $C_H1$ ; фрагмент  $F(ab)_2$ , двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; фрагмент Fd, состоящий из доменов  $V_H$  и  $C_H1$ ; фрагмент Fv, состоящий из доменов  $V_L$  и  $V_H$  одного плеча антитела; фрагмент dAb (Ward et al. al., 1989 Nature 341:544-546), который состоит из домена  $V_H$ ; и изолированную гипервариабельную область (CDR), или любые гибридные белки, содержащие такую антигенсвязывающую часть.

Более того, хотя два домена фрагмента Fv,  $V_L$  и  $V_H$ , кодируются отдельными генами, они могут быть соединены, используя рекомбинантные методы, синтетическим линкером, который позволяет получать их в виде одноцепочечного белка, в котором участки  $V_L$  и  $V_H$  соединяются, образуя одновалентные молекулы (известные как как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al., 1988 Science 242:423-426; и Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Предполагается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином «антигенсвязывающая часть» антитела. Эти фрагменты антител получают с использованием обычных методов, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты проверяют на пригодность таким же образом, как и интактные антитела.

В конкретных вариантах осуществления лигандом LDC является химерное, гуманизированное или человеческое антитело.

Термин «человеческое антитело», используемый в настоящей заявке, предназначен

для включения антител, имеющих переменные участки, в которых как каркасные, так и CDR-участки получены из последовательностей человеческого происхождения. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также получена из таких человеческих последовательностей, например, последовательностей зародышевой линии человека, или мутантных версий последовательностей зародышевой линии человека, или антитела, содержащего консенсусные каркасные последовательности, полученные из анализа каркасных последовательностей человека, например, как описано в Knappik, et al. (2000. *J Mol Biol* 296, 57-86).

Человеческие антитела могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими последовательностями (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфичным мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако используемый здесь термин «антитело человека» не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты к каркасным последовательностям человека.

Термин «моноклональное антитело человека» относится к антителам, проявляющим единственную специфичность связывания, которые имеют переменные участки, в которых как каркасные, так и CDR-области получены из человеческих последовательностей.

Используемый в настоящей заявке термин «изотип» относится к классу антител (например, IgM, IgE, IgG, такому как IgG1 или IgG4), который обеспечивается генами константной области тяжелой цепи.

Фразы «антитело, распознающее антиген» и «антитело, специфичное для антигена» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо с термином «антитело, которое специфически связывается с антигеном».

Активный агент относится к биологически активной молекуле или терапевтической молекуле. Примеры активных агентов включают лекарственные средства, средства для визуализации и флуорофоры. Среди визуализирующих агентов можно назвать флуорофоры, такие как индоцианиновый зеленый.

Лекарственное средство относится к любому типу лекарственных средств или соединений, обладающих присущими им фармакологическими или диагностическими свойствами, например, цитотоксическими, цитостатическими, иммуномодулирующими, иммуносупрессивными, иммуностимулирующими, противовоспалительными, ионизирующими или противомикробными соединениями. Среди цитотоксических соединений можно назвать калихеамицины; унциламицины; ауристатины (такие как монометил ауристатин

Е, известный как MMAE); производные галихондрина (такие как эрибулин), аналоги тубулизина; майтансины; криптофицины; димеры бензодиазепинов (включая пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепины, известные как PBD); псевдодимеры индолинобензодиазепинов (IGN); дуокармицины; антрациклины (такие как доксорубин или PNU159682); аналоги камптотецина (такие как 7-этил-10-гидрокси-камптотecin, известный как SN38 или экзатекан); ингибиторы Bcl2 и Bcl-x1; тайланстатины; аматоксины (включая  $\alpha$ -аманитин); ингибиторы кинезинового белка веретена (KSP); винорелбин; ингибиторы циклинзависимой киназы (CDK); средства, разрушающие молекулярный клей, блеомицин; дактиномицин или радионуклиды и их комплексообразователь (такой как DOTA/<sup>177</sup>Lu). Среди противовоспалительных препаратов можно назвать кортикостероиды, такие как дексаметазон или флутиказон. Среди противоинфекционных препаратов можно назвать такие антибиотики, как рифампицин или ванкомицин. Препарат может быть противоопухолевым препаратом или иммуномодулятором. Примерами противоопухолевых лекарственных средств являются цитотоксические и цитостатические соединения, предпочтительно цитотоксические соединения.

Компонент, маскирующий гидрофобность, относится к группе, которая может снижать кажущуюся гидрофобность соединения. Маскирующее гидрофобность вещество может быть выбрано из полисаркозина, полиэтиленгликоля и хитоолигосахарида. Количество этиленгликолевых или саркозиновых фрагментов может варьировать в широких пределах. Например, количество этиленгликолевых или саркозиновых фрагментов в компоненте, маскирующем гидрофобность, может составлять от 2 до 500, предпочтительно от 5 до 100, в частности от 5 до 25. В одном варианте осуществления маскирующий гидрофобность компонент представляет собой полисаркозин, содержащий от 6 до 24 саркозиновых фрагментов, предпочтительно содержащий от 10 до 12 саркозиновых фрагментов. Количество хитозана в хитоолигосахариде может составлять от 2 до 20, например, от 2 до 8.

Электроноакцепторная группа относится к атому или группе, которые притягивают электронную плотность от соседних атомов к себе, обычно за счет резонанса или индуктивного эффекта. Электроноакцепторные группы включают галогены, галогеналкильные (подобные -CF<sub>3</sub>), -CN, -SO<sub>3</sub>H, -NO<sub>2</sub> и -C(O)R группы, где R= H, OH или алкокси. Предпочтительно, электроноакцепторной группой является -NO<sub>2</sub>. В одном варианте осуществления электроноакцепторная группа находится в орто-положении по отношению к Y-T заместителю фенильного кольца.

Используемые в настоящей заявке термины «защитная группа» относятся к химическому заместителю, который может быть избирательно удален с помощью

легкодоступных реагентов, которые не воздействуют на регенерированную функциональную группу или другие функциональные группы в молекуле. Подходящие защитные группы известны в данной области техники и продолжают разрабатываться. Подходящие защитные группы могут быть найдены, например, у Wutz et al. («Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Fourth Edition,» Wiley-Interscience, 2007). Защитная группа для защиты аминогруппы, как описано Wutz et al. (стр. 696-927), используется в определенных вариантах осуществления. Типичные примеры аминозащитных групп включают, без ограничения указанными, *t*-бутилоксикарбонил (Boc), 9-флуоренилметоксикарбонил (Fmoc), ацетил (Ac), карбоксибензильную группу (Cbz), бензильную группу (Bn), аллил, трифторацетил, аллилоксикарбонильную (Alloc) группу и 2,2,2-трихлорэтоксикарбонил (Troc).

Группа, которая может вступать в реакцию с лигандом с образованием соединительной единицы, относится к любому химическому фрагменту, который вступает в реакцию для ковалентного связывания лиганда. В частности, он может вступать в реакцию с тиоловой группой, присутствующей в лиганде.

Неполный перечень химических соединений, которые являются реакционноспособными для ковалентного связывания лиганда, включает карбоновую кислоту; первичный амин; вторичный амин; третичный амин; гидроксил; галоген; активированный эфир, такой как *N*-гидроксисукцинимидный эфир, перфторированные эфиры, нитрофениловые эфиры, аза-бензотриазол и активированный бензотриазолом эфир, ацилмочевины; алкинил; алкенил; азид; изоцианат; изотиоцианат; альдегид; реагирующие с тиолом фрагменты, такие как малеимид, галомалеимиды, галоацетилы, пиридилдисульфиды; тиол; акрилат; мезилат; тозилат; трифлат, гидроксиламин; хлорсульфонил; производные бороновой кислоты -  $B(OR')_2$ , где  $R'$  представляет собой водородную или алкильную группу.

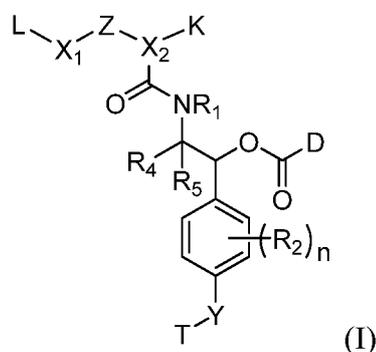
«Расщепляемая единица» относится к химической группе, которая может быть расщеплена под действием внутреннего или внешнего, предпочтительно внешнего, стимула. В настоящем описании расщепляемая единица представляет собой либо расщепляемую полипептидную единицу, либо расщепляемую сахарную единицу. Стимулом, запускающим расщепление расщепляемой единицы, могут быть, например, pH или температурные условия, или присутствие фермента. Расщепление расщепляемой единицы предпочтительно вызывает саморасщепление содержащего фенил линкера из соединений по изобретению и высвобождение активного агента D. В настоящем описании «расщепляемая сахарная единица» может относиться к сахарной фракции, предпочтительно глюкурониду или галактозиду. В настоящем описании «расщепляемая

полипептидная единица» может относиться к полипептиду, предпочтительно дипептиду или трипептиду.

Используемые в настоящей заявке термины «один или несколько» могут пониматься как относящиеся к числу от 1 до 20, или от 1 до 10, или от 1 до 5.

Соединение формулы (I)

Настоящее изобретение относится к соединению формулы (I):



где

L представляет собой лиганд;

X1 представляет собой соединительную единицу;

Z представляет собой необязательный спейсер;

X2 представляет собой соединительную единицу;

K представляет собой необязательный компонент, маскирующий гидрофобность, предпочтительно выбранный из полисаркозина и полиэтиленгликоля;

R1 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации;

указанный алкила и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR'', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

D представляет собой активный агент, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из лекарственных средств, средств визуализации и флуорофоров;

каждый R2 независимо выбран из группы, состоящей из электроноакцепторных групп и C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкила;

n составляет 0, 1 или 2;

R4 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими

гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)- и -NR''-;

R5 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)- и -NR''-;

T представляет собой сахарную расщепляемую единицу или полипептидную расщепляемую единицу;

Y представляет собой O, когда T является сахарной расщепляемой единицей, или NR<sub>3</sub>, когда T является полипептидной расщепляемой единицей;

R3 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанный алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

R'' и R''' независимо выбраны из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

и его фармацевтически приемлемым солям.

Согласно одному варианту осуществления, L представляет собой лиганд, выбранный из группы, состоящей из полипептидов, белков, антител и их антигенсвязывающих фрагментов, предпочтительно L представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, более предпочтительно L представляет собой антитело. Согласно одному варианту осуществления, антителом является трастузумаб.

Согласно одному варианту осуществления, D выбран из группы, состоящей из лекарственных средств, предпочтительно D является противоопухолевым лекарственным средством или иммуномодулятором. Согласно одному варианту осуществления, D представляет собой экзатекан или монометилуристатин E (ММАЕ).

Согласно одному варианту осуществления, X1 и X2 независимо выбраны из группы, состоящей из одной или нескольких аминокислот, одной или нескольких N-замещенных аминокислот, необязательно замещенного полиэфира, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкилена, арилена, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкилена, гетероциклоалкилена имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, гетероарилена, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкенилена, и любой их комбинации,

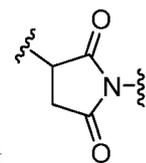
указанные алкилен и алкенилен при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из --O-, -S-, -C(O)-,

$-NR''$ -,  $-C(O)NR''$ -,  $-NR''-C(O)-$ ,  $-NR''-C(O)-NR'''$ -,  $-NR''-C(O)-O-$ ,  $-O-C(O)NR''$ - и триазола,

и указанные алкилен, арилен, циклоалкилен, гетероциклоалкилен, гетероарилен и алкенилен необязательно замещены одним или несколькими заместителями, выбранными из галогена, оксо,  $-OH$ ,  $-NO_2$ ,  $-CN$ ,  $C_1-C_6$  алкила,  $C_3-C_6$  циклоалкила, гетероциклила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов,  $C_1-C_6$  алкокси,  $C_1-C_6$  галоалкила,  $C_1-C_6$  галоалкокси,  $-(CO)-R'$ ,  $-O-(CO)-R'$ ,  $-(CO)-O-R'$ ,  $-(CO)-NR''R'''$ ,  $-NR''-(CO)-R'$ , и  $-NR''R'''$ ;

$R'$ ,  $R''$  и  $R'''$  независимо выбраны из H и  $C_1-C_6$  алкила.

Согласно одному варианту осуществления, X1 выбран из группы, состоящей из одной или нескольких аминокислот, одной или нескольких N-замещенных аминокислот, при необходимости замещенного полиэфира,  $C_1-C_{12}$  алкилена, арилена, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации.



Согласно одному варианту осуществления, X1 представляет собой

Согласно варианту осуществления, X2 выбран из группы, состоящей из одной или нескольких аминокислот, одной или нескольких N-замещенных аминокислот,  $C_1-C_{12}$  алкилена, при необходимости замещенного полиэфира и любой их комбинации.

Согласно одному варианту осуществления, Z выбран из группы, состоящей из одной или нескольких аминокислот, одной или нескольких N-замещенных аминокислот, при необходимости замещенного полиэфира,  $C_1-C_{12}$  алкилена, арилена, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов,  $C_3-C_8$  циклоалкилена, гетероциклоалкилена, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, гетероарилена, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов,  $C_2-C_{10}$  алкенилена, и любой их комбинации,

указанные алкилен и алкенилен при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-NR''$ -,  $-C(O)NR''$ -,  $-NR''-C(O)-$ ,  $-NR''-C(O)-NR'''$ -,  $-NR''-C(O)-O-$ ,  $-O-C(O)NR''$ - и триазола,

и указанные алкилен, арилен, циклоалкилен, гетероциклоалкилен, гетероарилен и алкенилен при необходимости замещены одним или несколькими заместителями, выбранными из галогена, оксо,  $-OH$ ,  $-NO_2$ ,  $-CN$ ,  $C_1-C_6$  алкила,  $C_3-C_6$  циклоалкила, гетероциклила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов,  $C_1-C_6$  алкокси,

C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> галоалкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> галоалкокси, -(CO)-R', -O-(CO)-R', -(CO)-O-R', -(CO)-NR''R''', -NR''-(CO)-R' и -NR''R''';

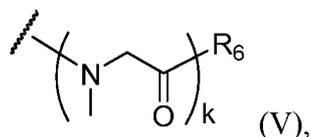
R', R'' и R''' независимо выбраны из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила.

Согласно одному варианту осуществления, Z выбран из группы, состоящей из одной или нескольких аминокислот, одной или нескольких N-замещенных аминокислот и полиэтиленгликоля.

Согласно одному варианту осуществления, Z отсутствует, а X1 и X2 непосредственно связаны друг с другом одинарной связью.

Согласно одному варианту осуществления, K представляет собой полисаркозин, предпочтительно монодисперсный полисаркозин. Полисаркозин может содержать от 1 до 50 повторяемых единиц.

В конкретных вариантах осуществления K представляет собой полисаркозин, предпочтительно следующей формулы (V)



где k представляет собой целое число от 2 до 50, предпочтительно от 4 до 30, а R<sub>6</sub> соответствует OH или NH<sub>2</sub>.

Согласно одному варианту осуществления, T представляет собой расщепляемую сахарную единицу, которая представляет собой глюкуронид или галактозид. Гликозидная связь, связывающая T с арильной группой, может быть такой, которая может быть расщеплена для инициирования последовательности реакций саморасщепления, приводящей к высвобождению лекарственного средства.

Согласно одному варианту осуществления, T представляет собой дипептид, предпочтительно выбранный из Val-Cit, Val-Ala и Phe-Lys.

Согласно одному варианту осуществления, R1 выбран из группы, состоящей из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, предпочтительно H.

Согласно одному варианту осуществления, R3 выбран из группы, состоящей из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, предпочтительно H.

Согласно одному варианту осуществления, R4 выбран из группы, состоящей из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила.

Согласно одному варианту осуществления, R5 выбран из группы, состоящей из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила.

Согласно одному варианту осуществления, как R4, так и R5 представляет собой H.

Согласно одному варианту осуществления n равно 0, Y представляет собой NR<sub>3</sub>, а

T представляет собой расщепляемую полипептидную единицу. Согласно другому варианту осуществления, n равно 1, R2 представляет собой  $-\text{NO}_2$ , Y представляет собой O, а T представляет собой расщепляемую сахарную единицу.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, L представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

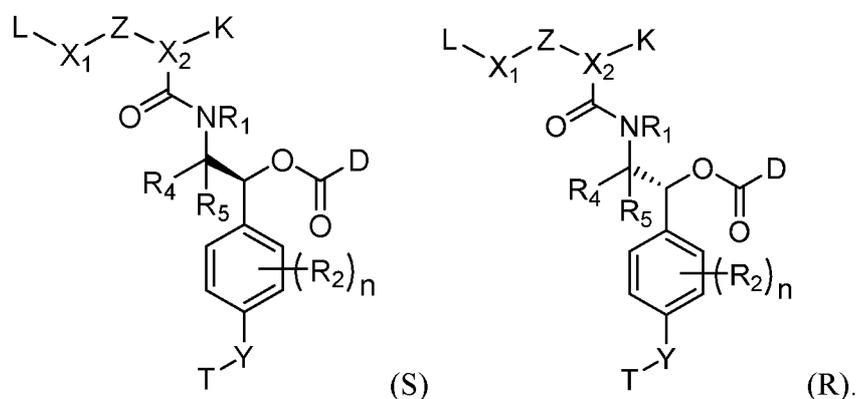
Согласно одному варианту осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает антиген, выбранный из группы, включающей или состоящей из CD19, CD20, CD22, CD30, CD37, CD79b, HER2 и PSMA.

Согласно одному варианту осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с HER2/neu.

Некоторые примеры антител, подходящих в качестве лиганда L в соединении формулы (I), описанном в настоящей заявке, включают, без ограничения указанными, трастузумаб, брентуксимаб, лонкастуксимаб, розопатамаб, ритуксимаб, пинатузумаб, полатузумаб и наратуксимаб.

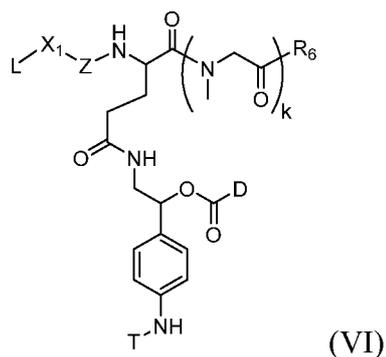
Согласно одному варианту осуществления, антителом является трастузумаб.

Соединение формулы (I) содержит по меньшей мере один асимметричный углерод, поэтому могут существовать различные стереоизомеры. Например, соединение формулы (I) может существовать в форме (R) или форме (S), как показано ниже:



Согласно одному варианту осуществления, соединением формулы (I) является (S).

В конкретном варианте осуществления соединение формулы (I) является соединением формулы (VI):





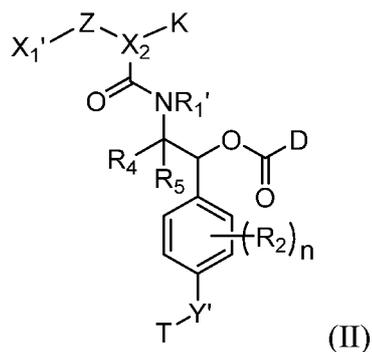
где  $k$  представляет собой целое число от 2 до 50, предпочтительно от 4 до 30.

Соединения формулы (I) по изобретению могут быть синтезированы любым подходящим способом, известным в данной области техники, таким как способы, раскрытые в разделе примеров.

Варианты осуществления, описанные для соединения формулы (I), также применимы для соединений формулы (II), (III) и (IV).

Соединение формулы (II)

Настоящее изобретение также относится к соединению формулы (II):



где

$X1'$  представляет собой группу, которая может вступать в реакцию с лигандом с образованием соединительной единицы;

$Z$  представляет собой необязательный спейсер;

$X2$  представляет собой соединительную единицу;

$K$  представляет собой необязательный компонент, маскирующий гидрофобность, предпочтительно выбранный из полисаркозина и полиэтиленгликоля;

$R1'$  выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H,  $C_1$ - $C_{24}$  алкила,  $C_2$ - $C_6$  алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов,  $C_3$ - $C_8$  циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

$D$  представляет собой активный агент, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из лекарственных средств, средств визуализации и флуорофоров;

каждый  $R2$  независимо выбран из группы, состоящей из электроноакцепторных групп и  $C_1$ - $C_4$  алкила;

n составляет 0, 1 или 2;

R<sub>4</sub> выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)- и -NR''-;

R<sub>5</sub> выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)- и -NR''-;

T представляет собой сахарную расщепляемую единицу или полипептидную расщепляемую единицу;

Y' представляет собой O, когда T является сахарной расщепляемой единицей, или NR<sub>3</sub>', когда T является полипептидной расщепляемой единицей;

R<sub>3</sub>' выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''-, -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

R'' и R''' независимо выбраны из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

и его фармацевтически приемлемым солям.

Согласно одному варианту осуществления, X<sub>1</sub>' представляет собой малеимид.

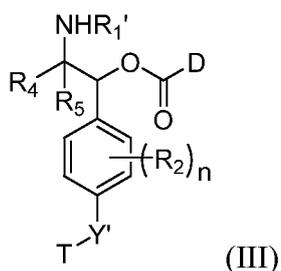
Согласно одному варианту осуществления, R<sub>1</sub>' представляет собой H.

Согласно одному варианту осуществления, R<sub>3</sub>' представляет собой H.

Соединение формулы (II) может быть использовано для синтеза соединения формулы (I), следовательно, оно является промежуточным продуктом в синтезе соединения формулы (I).

Соединение формулы (III)

Настоящее изобретение также относится к соединению формулы (III)



где

R1' выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

D представляет собой активный агент, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из лекарственных средств, средств визуализации и флуорофоров;

каждый R2 независимо выбран из группы, состоящей из электроноакцепторных групп;

n составляет 0, 1 или 2;

R4 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)- и -NR''-;

R5 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, и -NR''-;

T представляет собой сахарную расщепляемую единицу или полипептидную расщепляемую единицу;

Y' представляет собой O, когда T является сахарной расщепляемой единицей, или NR3', когда T является полипептидной расщепляемой единицей;

R3' выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

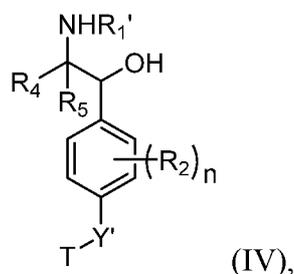
R'' и R''' независимо выбраны из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

и его фармацевтически приемлемым солям.

Соединение формулы (III) может быть использовано для синтеза соединения формулы (II), следовательно, оно является промежуточным продуктом в синтезе соединения формулы (I).

Соединение формулы (IV)

Настоящее изобретение также относится к соединению формулы (IV)



где

R1' выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

каждый R2 независимо выбран из группы, состоящей из электроноакцепторных групп и C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкила;

n составляет 0, 1 или 2;

R4 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)- и -NR''-;

R5 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)- и -NR''-;

T представляет собой сахарную расщепляемую единицу или полипептидную расщепляемую единицу;

Y' представляет собой O, когда T является сахарной расщепляемой единицей, или NR3', когда T является полипептидной расщепляемой единицей;

R3' выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-

C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

R'' и R''' независимо выбраны из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

и его фармацевтически приемлемым солям.

Согласно одному варианту осуществления, R<sub>4</sub> и R<sub>5</sub> представляют собой H, Y' представляет собой O, а T является сахарной расщепляемой единицей.

Согласно другому варианту осуществления, Y' представляет собой NR<sub>3</sub>', а T представляет собой полипептидную расщепляемую единицу.

Соединение формулы (IV) может быть использовано для синтеза соединения формулы (III), следовательно, оно является промежуточным продуктом в синтезе соединения формулы (I).

#### Фармацевтическая композиция

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение по изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. В частности, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

Используемый в настоящей заявке термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические средства и средства, замедляющие абсорбцию, и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Носитель может быть пригоден для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинномозгового или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В одном варианте осуществления носитель должен быть пригоден для подкожного введения или внутриопухолевой инъекции. В зависимости от способа введения активное соединение может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение. Композиции могут дополнительно включать одно или несколько вспомогательных веществ, консервантов, солюбилизаторов, буферных агентов

и т.д.

Форма фармацевтических композиций, способ введения, дозировка и режим, естественно, зависят от состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания, возраста, массы тела и пола пациента, и т.д.

Фармацевтические композиции по изобретению могут быть приготовлены для местного, перорального, интраназального, внутриглазного, внутривенного, внутримышечного или подкожного введения, и тому подобного.

Предпочтительно, фармацевтические композиции содержат носители, которые являются фармацевтически приемлемыми для состава, пригодного для инъекций. Это могут быть, в частности, изотонические стерильные солевые растворы (моонатрий фосфат или динатрий фосфат, хлорид натрия, калия, кальция или магния и т.п., или смеси таких солей) или сухие, особенно лиофилизированные композиции, которые при добавлении, в зависимости от случая, стерилизованной воды или физиологического раствора позволяют восстанавливать растворы для инъекций.

Дозы, используемые для введения, могут быть адаптированы в зависимости от различных параметров и, в частности, в зависимости от используемого способа введения, соответствующей патологии или, альтернативно, от необходимой продолжительности лечения.

Для приготовления фармацевтических композиций эффективное количество соединения по изобретению может быть растворено или диспергировано в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.

Фармацевтические формы, пригодные для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии; составы, включающие кунжутное масло, арахисовое масло или водный раствор пропиленгликоля; и стерильные порошки или лиофилизаты для импровизированного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть текучей до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить шприцем. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки.

Растворы активных соединений в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей могут быть приготовлены в воде, соответствующим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также могут быть приготовлены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. При обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант, предотвращающий рост

микроорганизмов.

Соединения по изобретению могут быть введены в композицию в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают соли добавления кислот (образованные свободными аминогруппами) и соли, которые образуются с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и тому подобное. Соли, образованные свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или трехвалентного железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и тому подобное.

Носителем также может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и растительные масла. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае диспергирования и за счет использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, мертиолятом и тому подобным. Во многих случаях предпочтительнее будет включать изотонические средства, например, сахар или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция композиций для инъекций может быть достигнута за счет использования в композициях агентов, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные растворы для инъекций готовят путем добавления активных соединений в необходимом количестве в соответствующий растворитель с несколькими другими ингредиентами, перечисленными выше, по мере необходимости, с последующей стерилизующей фильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем введения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами приготовления являются методы вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые дают порошок активного ингредиента плюс любого дополнительного необходимого ингредиента из его раствора, предварительно подвергнутого стерилизующей фильтрации.

Также рассматривается приготовление большего количества или

высококонтентрированных растворов для прямых инъекций, где предполагается, что использование ДМСО в качестве растворителя приведет к чрезвычайно быстрому проникновению, доставляя высокие концентрации активных веществ в небольшую область опухоли.

После приготовления растворы будут введены способом, совместимым с лекарственным составом, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы легко вводятся в различных лекарственных формах, таких как растворы для инъекций, описанные выше, но также могут быть использованы капсулы для высвобождения лекарственного средства и тому подобное.

Например, для парентерального введения в водном растворе в раствор следует при необходимости соответствующим образом добавить буфер, а жидкий разбавитель сначала сделать изотоническим с достаточным количеством физиологического раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и интраперитонеального введения. В связи с этим стерильные водные среды, которые могут быть использованы, будут известны специалистам в данной области техники в свете настоящего раскрытия. Например, одну дозу можно растворить в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавить к 1000 мл жидкости для подкожных инъекций, либо ввести в предполагаемое место инфузии (см., например, «Remington's Pharmaceutical Sciences», 15-е издание, страницы 1035-1038 и 1570-1580). Некоторые изменения в дозировке обязательно будут иметь место в зависимости от состояния пациента, которого лечат. Лицо, ответственное за введение препарата, в любом случае определит подходящую дозу для конкретного пациента.

В дополнение к соединениям, разработанным для парентерального введения, таким как внутривенная или внутримышечная инъекция, другие фармацевтически приемлемые формы включают, например, таблетки или другие твердые вещества для перорального применения; капсулы с замедленным высвобождением; и любую другую форму, используемую в настоящее время.

В определенных вариантах осуществления предполагается использование липосом и/или наночастиц для введения антител в клетки-хозяева. Образование и применение липосом и/или наночастиц известно специалистам в данной области техники.

Нанокапсулы, как правило, могут захватывать соединения стабильным и воспроизводимым образом. Чтобы избежать побочных эффектов, вызванных внутриклеточной полимерной перегрузкой, такие ультрадисперсные частицы (размером примерно 0,1 мкм) обычно разрабатывают с использованием полимеров, способных разлагаться *in vivo*. Биоразлагаемые наночастицы полиалкил-цианоакрилата, которые

отвечают этим требованиям, предусмотрены для использования в настоящем описании, и такие частицы могут быть легко изготовлены.

Липосомы образуются из фосфолипидов, которые диспергируются в водной среде и самопроизвольно образуют многослойные концентрические двухслойные везикулы (также называемые многослойными везикулами (MLV)). MLV обычно имеют диаметр от 25 нм до 4 мкм. Обработка ультразвуком MLV приводит к образованию небольших однослойных везикул (SUV) диаметром от 200 до 500 Å, содержащих водный раствор в сердцевине. Физические характеристики липосом зависят от рН, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов.

Дозы, используемые для введения, могут быть адаптированы в зависимости от различных параметров и, в частности, в зависимости от используемого способа введения, соответствующей патологии или, альтернативно, от необходимой продолжительности лечения. Следует понимать, что соответствующие дозировки соединений и композиции, содержащие соединения, могут варьировать от пациента к пациенту. Определение оптимальной дозировки, как правило, включает уравнивание терапевтической пользы с каким-либо риском или вредными побочными эффектами описанных здесь методов лечения. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая, без ограничения указанными, активность конкретного соединения, способ введения, время введения, скорость выведения соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации, а также возраст, пол, массу тела, состояние, общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни пациента. Количество соединения и способ введения в конечном счете определяются по усмотрению врача, хотя, как правило, дозировка должна быть такой, чтобы достичь локальных концентраций в месте воздействия, которые обеспечивают необходимый эффект, не вызывая существенных вредных побочных эффектов. Например, доза, используемая для введения, может составлять примерно 0,1-1000 мг соединения по изобретению для субъекта с массой тела примерно 50-70 кг.

#### Способ применения

Соединения по изобретению проявляют ценные фармацевтические свойства, как указано в тестах *in vitro* и *in vivo*, представленных в примерах, и, следовательно, показаны для терапии. Изобретение также относится к соединению по изобретению для применения в качестве лекарственного средства. В частности, изобретение относится к соединению-конъюгату лиганд-лекарственное средство формулы (I), более конкретно к соединению-конъюгату антитело-лекарственное средство формулы (1), где L представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, для использования в качестве

лекарственного средства.

В частности, соединения по изобретению и, более конкретно, конъюгаты антитело-лекарственное средство формулы (I) настоящего изобретения полезны для профилактики или лечения рака, воспалительных заболеваний и/или инфекционных заболеваний. В предпочтительном варианте осуществления соединение формулы (I) для применения в профилактике или лечении рака представляет собой конъюгат лиганд-лекарственное средство (LDC) формулы (I), где L представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть, и более предпочтительно, где D представляет собой цитотоксическое соединение.

Изобретение также относится к соединению по изобретению для использования в способе лечения рака. Используемый здесь термин «рак» имеет свое общее значение в данной области техники и включает аномальное состояние, характеризующееся быстрым пролиферирующим ростом клеток. Подразумевается, что этот термин включает все типы раковых образований или онкогенных процессов, метастатические ткани или злокачественно трансформированные клетки, ткани или органы, независимо от гистопатологического типа или стадии инвазивности. Термин «рак» включает злокачественные новообразования различных систем органов, такие как поражение кожи, легких, молочной железы, щитовидной железы, лимфоидной системы, желудочно-кишечного тракта и мочеполовых путей, а также аденокарциномы, которые включают злокачественные новообразования, такие как большинство видов рака толстой кишки, почечно-клеточный рак, рак предстательной железы и/или опухоли яичек, немелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки и рак пищевода.

Изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, предпочтительно человеку, терапевтически эффективного количества

- (i) соединения по изобретению или
- (ii) фармацевтической композиции, как описано в настоящей заявке.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения или профилактики рака у субъекта, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества конъюгата лиганд-лекарственное средство (LDC) формулы (I), где L представляет собой его антитело или антигенсвязывающую часть, и более предпочтительно где D является цитотоксическим соединением.

Изобретение также относится к соединению по изобретению для применения в способе лечения воспалительных заболеваний.

Используемый здесь термин «воспалительное заболевание» применяется для определения любого заболевания, вызванного воспалением у субъекта или ведущего к нему. Термин может включать, без ограничения указанными, (1) воспалительные и/или аллергические заболевания, (2) аутоиммунные заболевания, (3) отторжение трансплантата и (4) другие заболевания, при которых необходимо подавлять нежелательные воспалительные реакции.

Изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания, где указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, предпочтительно человеку, терапевтически эффективного количества

- (i) соединения по изобретению, или
- (ii) фармацевтическая композиции, описанной в настоящей заявке.

Изобретение также относится к соединению по изобретению для применения в способе лечения инфекционных заболеваний.

Используемый здесь термин «инфекционное заболевание» применяется для определения любого заболевания, вызванного инвазией субъекта инфекционными агентами (или патогенами), их размножением и реакцией тканей субъекта на эти инфекционные агенты и токсины, которые они вырабатывают. Этот термин может включать, без ограничения указанными, (1) бактериальные инфекции, (2) вирусные инфекции, (3) грибковые инфекции и (4) паразитарные инфекции.

Изобретение относится к способу лечения инфекционного заболевания, где указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, предпочтительно человеку, терапевтически эффективного количества

- (i) соединения по изобретению или
- (ii) фармацевтической композиции, как описано в настоящей заявке.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения или профилактики инфекционного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества конъюгата лиганд-лекарственное средство (LDC) формулы (I), где L представляет собой его антитело или антигенсвязывающую часть, и более предпочтительно, где D является противоинфекционным средством, например, антибиотиком или противовирусным средством.

Используемый в настоящей заявке термин «лечение» включает индукцию регресса, облегчение, ингибирование прогрессирования, предотвращение или уменьшение вероятности заболевания, расстройства или состояния, к которому применяется такой термин, или одного или нескольких симптомов или проявлений такого заболевания,

расстройства или состояния. Предотвращение относится к предотвращению возникновения заболевания, расстройства, состояния или симптома, или их проявления, или ухудшения их тяжести. Соответственно, раскрытые в настоящее время соединения могут быть введены профилактически для предотвращения или уменьшения частоты возникновения или рецидива заболевания, расстройства или состояния.

Используемые здесь термины «терапевтически эффективное количество» соединения относятся к количеству соединения, которое будет вызывать биологическую или медицинскую реакцию субъекта, например, улучшать симптомы, облегчать состояния, замедлять или задерживать прогрессирование заболевания или предотвращать заболевание.

Изобретение также относится к применению соединения по изобретению, предпочтительно соединения формулы (I), с целью приготовления лекарственного средства для лечения рака, воспалительных заболеваний и/или инфекционных заболеваний, предпочтительно для лечения рака.

Соединение формулы (II) может быть использовано как таковое без лиганда. Например, когда  $X1'$  является малеимидной частью, соединение формулы (II) может вступать в реакцию *in vivo* с белком, таким как сывороточный альбумин, который затем становится лигандом. Таким образом, настоящее изобретение также относится к соединению формулы (II), как описано выше, для применения в качестве лекарственного средства.

#### Примеры

#### Материалы и общие методы

Все растворители и реагенты были получены из авторитетных коммерческих источников (Sigma-Aldrich, Fluorochem, TCI Chemicals, Acros Organics, Alfa Aesar, Enamine, Thermo Fisher, Carbosynth, WuXi AppTec, Iris Biotech) и использовались без дополнительной очистки, если не указано иное. Безводные растворители были приобретены у Sigma-Aldrich. Fmoc-аминокислоты, 2-хлортритил, полистирол с амидами Ванга и Ринка, 1% смолы DVB 100-200 меш (предварительно загруженные первой Fmoc-саркозиновой аминокислотой) были приобретены в Christof Senn Laboratories и Sigma-Aldrich. Монометил ауристатин E (ММАЕ), экзатекан мезилат и 7-этил-10-гидроксикамптотецин (SN38) были приобретены у DCChemicals, MedChemExpress или Abzena. Человеческий альбумин (кат.№ А3782) был приобретен у Sigma-Aldrich. Трастузумаб (Герцептин® для внутривенного введения) был приобретен у компании Roche. Некоммерческие моноклональные антитела были получены на заказ путем транзитной трансфекции на клеточной линии CHO и очистки на протеин-A/SEC, с

помощью GTP Technologies (Тулуза, Франция).

Синтез на основе смолы проводили в пустых пластиковых пробирках SPE, снабженных полиэтиленовой фриттой толщиной 20 мкм (Sigma-Aldrich). Для перемешивания использовали платформенный шейкер Titramax 101 (Heidolph). Если не указано иное, все химические реакции проводили при комнатной температуре в атмосфере инертного аргона.

Спектры жидкостного ядерного магнитного резонанса регистрировали на спектрометре Bruker Fourier 300HD или Bruker AVANCE III HD400 с использованием остаточного пика растворителя для калибровки. Масс-спектроскопический анализ был проведен Центром масс-спектрометрии (CCSM) института CNRS UMR5246 Университета Клода Бернара Лиона 1.

Флэш-хроматографию с нормальной фазой проводили на приборах Teledyne Isco CombiFlash® Rf200 с использованием флэш-картриджей Macherey-Nagel Chromabond® (40-63 мкм). Обратной-фазную хроматографию проводили с использованием картриджей Biotage® Sfär C18 Duo 100 × 30 мкм или картриджей Interchim PuriFlash RP-AQ (30 мкм) на приборах Teledyne Isco Combiflash® Rf200; или с использованием препаративной бинарной ВЭЖХ-системы Agilent 1100.

Химические реакции и характеристики соединений отслеживали и анализировали, соответственно, с помощью тонкослойной хроматографии с использованием предварительно нанесенного силикагеля толщиной 40-63 мкм (Macherey-Nagel), ВЭЖХ-УФ (Agilent 1100 systems) или УВЭЖХ-УФ/МС (система Thermo UltiMate 3000 УВЭЖХ, оснащенная масс-спектрометром Bruker Impact ПТМ Q-ToF или система ВЭЖХ Agilent 1260, оснащенная масс-спектрометром Bruker MicrOTOF-QII).

Метод ВЭЖХ 1: Система ВЭЖХ Agilent 1100, оснащенная функцией определения DAD. Подвижной фазой А была вода + 0,1% ТФУ, а подвижной фазой В был ацетонитрил. Колонка представляла собой Agilent Zorbax SB-Aq 4,6×150 мм 5 мкм (комнатной температуры). Линейный градиент составлял от 0% В до 50% В за 30 минут с последующей 5-минутной выдержкой при 50% В. Скорость потока составляла 1,0 мл/мин.

Метод ВЭЖХ 2: Система ВЭЖХ Agilent 1100, оснащенная функцией определения DAD. Подвижной фазой А была вода + 0,1% ТФУ, а подвижной фазой В был ацетонитрил. Колонка представляла собой Agilent Poroshell 120 EC-C18 3,0×50 мм 2,7 мкм (комнатная температура). Линейный градиент составлял от 5% В до 80% В за 9 минут с последующей выдержкой в течение 1 минуты при 80%В. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин.

Метод ВЭЖХ 3: Система ВЭЖХ Agilent 1100, оснащенная функцией определения

DAD. Подвижной фазой А была вода + 0,1% ТФУ, а подвижной фазой В был ацетонитрил. Колонка представляла собой Agilent Poroshell 120 EC-C18 3,0×50 мм 2,7 мкм (комнатная температура). Линейный градиент составлял от 5% В до 80% В за 20 минут с последующей выдержкой в течение 2 минут при 80% В. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин.

Метод ВЭЖХ 4: Система УВЭЖХ Thermo UltiMate 3000 + масс-спектрометр Bruker Impact ПТМ Q-ToF. Подвижной фазой А была вода + 0,1% муравьиной кислоты, а подвижной фазой В был ацетонитрил + 0,1% муравьиной кислоты. Колонка представляла собой Agilent PLRP-S 1000Å 2,1×150 мм 8 мкм (80°C). Линейный градиент составлял от 10%В до 50%В за 25 минут. Скорость потока составляла 0,4 мл/мин. УФ-детекцию осуществляли при длине волны 280 нм. Масс-спектрометр Q-ToF использовали в диапазоне m/z 500-3500 (ESI+). Данные подвергали деконволюции с использованием алгоритма MaxEnt, входящего в состав программного обеспечения Bruker Compass®.

Метод ВЭЖХ 5 (препаративный метод): Бинарная система ВЭЖХ Teledyne Isco CombiFlash® Rf200, оснащенная функцией определения DAD. Подвижной фазой А была вода + 0,1% ТФУ, а подвижной фазой В был ацетонитрил. Многоцветными картриджами были Biotage® Sfar C18 Duo 100 × 30 мкм (30 г). Линейный градиент составлял от 10% В до 50% В за 35 минут с последующей 5-минутной выдержкой при 50% В. Скорость потока составляла 25 мл/мин.

Метод ВЭЖХ 6 (препаративный метод): Препаративная бинарная система ВЭЖХ Agilent 1100, оснащенная двухконтурным автоинжектором, детектором DAD и коллектором фракций. Подвижной фазой А была вода + 0,1% ТФУ, а подвижной фазой В был ацетонитрил. Колонка представляла собой колонку Waters SunFire C18 OBD Prep Column, 100Å, 5 мкм, 19 мм × 250 мм (комнатная температура). Линейный градиент составлял от 10% В до 60% В за 40 минут с последующей 5-минутной выдержкой при 60% В. Скорость потока составляла 25 мл/мин.

#### 1) Получение химических соединений по изобретению

##### 1.1) Монодисперсные промежуточные продукты полисаркозинов

###### 1.1.1) Общие методы

Синтез монодисперсных полисаркозинов на смоле осуществляли с использованием итерационных процедур синтеза субномеров (уже описанных в патенте WO2019081455) для амида Ринка и 2-хлортритиловой смолы или следуя классическим методологиям Fmoc/SPPS с коммерческим дипептоидным строительным блоком Fmoc-Sar-Sar-OH (CAS#2313534-20-0) для смолы Ванга. Пожалуйста, обратите внимание, что синтез пептоидного субномера на смоле Ванга не увенчался успехом. Во всех случаях

димерной стадии на смоле ( $n=2$ ) удалось избежать из-за образования дикетопиперазина. Все выходы синтеза указаны на основе начальной загрузки Fmoc-саркозина, указанной производителем. Если не указано иное, все реакции проводили при комнатной температуре. Использовали смолы с амидом Ринка, 2-хлортритилом или полистиролом Ванга 1% DVB 100-200 меш, предварительно загруженные первым остатком Fmoc-саркозина (Christof Senn Laboratories) (типичная начальная загрузка 0,6-1 ммоль/г).

#### 1.1.2) Элонгация полисаркозинов

Предварительно загруженный Fmoc-саркозином амид Ринка, 2-хлортритил или смолу Ванга обрабатывали 20% пиперидином в ДМФ (1 мл на 100 мг смолы) 2 раза по 15 минут при комнатной температуре. Затем смолу промывали ДМФ (4 раза) и ДХМ (4 раза). К смоле добавляли раствор Fmoc-Sar-Sar-OH (3 экв.), HATU (2,9 экв.) и DIPEA (6 экв.) в ДМФ (1 мл на 100 мг смолы). Реакционный сосуд перемешивали в течение 2 часов, и смолу промывали ДМФ (4 раза) и ДХМ (4 раза). Смолу обрабатывали 20% раствором пиперидина в ДМФ (1 мл на 100 мг смолы) в течение 2 раз по 15 минут при комнатной температуре. Затем смолу промывали ДМФ (4 раза) и ДХМ (4 раза).

Для синтеза на основе амида Ринка или 2-хлортритиловой смолы затем использовали классические процедуры синтеза субмономеров, как описано в WO2019081455. Элонгацию олигомера полисаркозина  $n=3$  осуществляли до получения необходимой длины путем чередования стадий бромацетилирования и замещения амином. Стадию бромацетилирования проводили путем добавления 10 экв. бромуксусной кислоты и 13 экв. диизопропилкарбодиимида в ДМФ (2 мл на 100 мг смолы). Смесь перемешивали в течение 30 минут, сливали и промывали ДМФ (4 раза). Для стадии вытеснения амина добавляли 40 масс.% раствор метиламина в воде (1,5 мл на 100 мг смолы) и сосуд встряхивали в течение 30 минут, сливали и промывали ДМФ (4 раза) и ДХМ (4 раза).

Для синтеза на смоле Ванга использовали классические процедуры Fmoc/SPPS. Элонгацию олигомера полисаркозина  $n=3$  осуществляли путем итеративного соединения дипептоидного структурного блока Fmoc-Sar-Sar-OH (CAS#2313534-20-0). К смоле добавляли раствор Fmoc-Sar-Sar-OH (3 экв.), HATU (2,9 экв.) и DIPEA (6 экв.) в ДМФ (1 мл на 100 мг смолы). Реакционный сосуд перемешивали в течение 90 минут, и смолу тщательно промывали ДМФ (4 раза) и ДХМ (4 раза). Затем смолу обрабатывали 20% раствором пиперидина в ДМФ (1 мл на 100 мг смолы) в течение 2 раз по 15 минут при комнатной температуре. Смолу промывали ДМФ (4 раза) и ДХМ (4 раза). Этот цикл связывания/снятия защиты с Fmoc повторяли до тех пор, пока не была получена необходимая длина полисаркозина. При необходимости последнее соединение

производили с использованием коммерческой аминокислоты Fmoc-Sar-OH вместо дипептоидной единицы Fmoc-Sar-Sar-OH, чтобы получить конечный полисаркозин одинаковой длины.

1.1.3) Окончательная функционализация полисаркозинов на смоле, необязательное присоединение блокирующей группы, отделение от смолы и очистка

При достижении необходимой длины монодисперсного олигомера полисаркозина на смоле выполняли ортогональную химическую функционализацию. За этим при необходимости проводили окончательное присоединение блокирующей группы Fmoc-аминокислоты (например, Fmoc-Gly-OH, Fmoc- $\beta$ -Ala-OH, Fmoc-Амино-3,6-диоксаоктановой кислоты, Fmoc-9-амино-4,7-диоксанонановой кислоты). Защитная группа Fmoc, покрывающая N-конец конечного соединения, могла быть удалена до или после отделения от смолы, в зависимости от используемого химического состава ортогональной функционализации (см. далее).

1.1.3.1) Полисаркозины с 2-азидоэтан-1-аминовой боковой функционализацией

К смоле Ринка или 2-хлортритиловой смоле добавляли 10 экв. бромуксусной кислоты и 13 экв. диизопропилкарбодиимида в ДМФ (2 мл на 100 мг смолы). Смесь перемешивали в течение 30 минут, осушали и промывали ДМФ (4 раза). Добавляли 3 молярный раствор 2-азидоэтан-1-амина в ДМФ (1 мл на 100 мг смолы), и сосуд встряхивали в течение 45 минут, сливали и промывали ДМФ (4 раза) и ДХМ (4 раза). Затем проводили 1-часовое связывание с Fmoc-Gly-OH (5 экв Fmoc-Gly-OH, 4,9 экв НАТУ, 10 экв DIPEA в ДМФ (1 мл на 100 мг смолы) и снятие защиты Fmoc 20% пиперидином в ДМФ (1 мл на 100 мг смолы) 2 раза в течение 15 минут при комнатной температуре. Смолу промывали ДМФ (4 раза) и ДХМ (4 раза).

Конечные соединения полисаркозина отщепляли от смолы (100% ТФУ 2 раза по 30 минут для смол Ринка и Ванга, 20% ТФУ в ДХМ 2 раза по 15 минут для 2-хлортритиловой смолы). Смолу отделяли фильтрацией, а летучие вещества удаляли при пониженном давлении, чтобы получить неочищенный продукт, который очищали с помощью картриджей Interchim® RP-AQ (30 мкм). Подвижной фазой А была вода + 0,1% ТФУ, а подвижной фазой В был ацетонитрил.

1.1.3.2) Полисаркозины с  $\beta$ -аланиновой боковой функционализацией

К смоле Ринка или 2-хлортритиловой смоле добавляли 10 экв. бромуксусной кислоты и 13 экв. диизопропилкарбодиимида в ДМФ (2 мл на 100 мг смолы). Смесь перемешивали в течение 30 минут, сливали и промывали ДМФ (4 раза). Добавляли 3-молярный раствор аллил-3-аминопропаноата (синтезированный, как описано в Schröer et al., J. Org. Chem. 1997, 62, 10, 3220-3229 и очищенный до свободного основания 20 минут

при 50°C с 3 экв.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в ТГФ) в ДМФ (1 мл на 100 мг смолы), и сосуд встряхивали в течение 45 минут, сливали и промывали ДМФ (4 раза) и ДХМ (4 раза). Затем проводили 1-часовое связывание Fmoc-Gly-OH (5 экв. Fmoc-Gly-OH, 4,9 экв. HATU, 10 экв. DIPEA в ДМФ (1 мл на 100 мг смолы). Смолу промывали ДМФ (4 раза), ДХМ (4 раза). Аллос-защитную группу удаляли путем 2-кратной 30-минутной обработки раствором ДХМ, содержащим 0,25 экв.  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  и 20 экв. фенилсилана (осторожно перемешивали под струей аргона). Затем смолу промывали ДМФ (5 раз) и ДХМ (5 раз). При необходимости сложный эфир N-гидроксисукцинимида (NHS) вводили в боковую цепь карбоновой кислоты конечного соединения полисаркозина путем 90-минутной обработки раствором ДМФ, содержащим 50 экв. DIC и 60 экв. N-гидроксисукцинимида (1,5 мл на 100 мг смолы). Затем смолу промывали ДМФ (4 раза) и ДХМ (4 раза).

Конечные соединения полисаркозина отщепляли от смолы (100% ТФУ 2 раза по 30 минут для смол Ринка и Ванга, 20% ТФУ в ДХМ 2 раза по 15 минут для 2-хлортритиловой смолы). Смолу отделяли фильтрацией, а летучие вещества удаляли при пониженном давлении, чтобы получить неочищенный продукт, которое очищали с помощью картриджей Interchim® RP-AQ (30 мкм). Подвижной фазой А была вода + 0,1% ТФУ, а подвижной фазой В был ацетонитрил.

#### 1.1.3.3) Полисаркозины с боковой функционализацией глутаминовой кислотой

К смоле Ринка, смоле Ванга или 2-хлортритиловой смоле добавляли раствор Fmoc-Glu(OAll)-OH (3 экв.), HATU (2,9 экв.) и DIPEA (6 экв.) в ДМФ (1 мл на 100 мг смолы). Реакционную смесь перемешивали в течение 90 минут, и смолу тщательно промывали ДМФ (4 раза) и ДХМ (4 раза). Затем смолу обрабатывали 20% раствором пиперидина в ДМФ (1 мл на 100 мг смолы) в течение 2 раз по 15 минут при комнатной температуре. Смолу промывали ДМФ (4 раза) и ДХМ (4 раза). За этим последовало 1-часовое смешивание с Fmoc-амино-3,6 диоксооктановой кислотой (3 экв.), HATU (2,9 экв.), DIPEA (6 экв.) в ДМФ (1 мл на 100 мг смолы). Смолу промывали ДМФ (4 раза), ДХМ (4 раза). Аллос-защитную группу удаляли путем 2-кратной обработки по 30 минут раствором ДХМ, содержащим 0,25 экв.  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  и 20 экв. фенилсилана (осторожно перемешивали под струей аргона). Затем смолу промывали ДМФ (5 раз) и ДХМ (5 раз). При необходимости сложный эфир N-гидроксисукцинимида (NHS) вводили в боковую цепь карбоновой кислоты конечного соединения полисаркозина путем 90-минутной обработки раствором ДМФ, содержащим 50 экв. DIC и 60 экв. N-гидроксисукцинимида (1,5 мл на 100 мг смолы). Затем смолу промывали ДМФ (4 раза) и ДХМ (4 раза).

Конечные соединения полисаркозина отщепляли от смолы (100% ТФУ 2 раза по 30 минут для смол Ринка и Ванга, 20% ТФУ в ДХМ 2 раза по 15 минут для 2-хлортритиловой

смолы). Смолу отделяли фильтрацией, а летучие вещества удаляли при пониженном давлении, чтобы получить неочищенный продукт, которые очищали с помощью картриджей Interchim® RP-AQ (30 мкм). Подвижной фазой А была вода + 0,1% ТФУ, а подвижной фазой В был ацетонитрил.

#### 1.1.3.4) $\gamma$ -азидогомоаланин-функционализованные полисаркозины

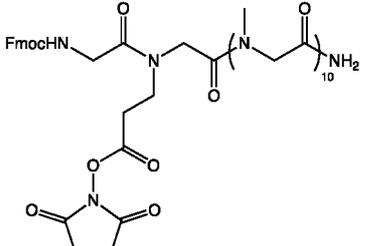
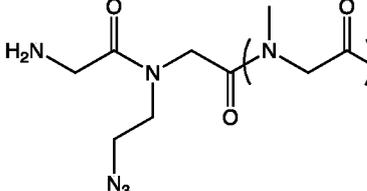
К смоле Ринка, Ванга или 2-хлортритиловой смоле добавляли раствор Fmoc- $\gamma$ -азидогомоаланина (3 экв.), NATU (2,9 экв.) и DIPEA (6 экв.) в ДМФ (1 мл на 100 мг смолы). Реакционный сосуд перемешивали в течение 90 минут, и смолу тщательно промывали ДМФ (4 раза) и ДХМ (4 раза). Затем смолу обрабатывали 20% раствором пиперидина в ДМФ (1 мл на 100 мг смолы) в течение 2 раз по 15 минут при комнатной температуре. Смолу промывали ДМФ (4 раза) и ДХМ (4 раза). За этим последовало 1-часовое смешивание с Fmoc-амино-3,6 диоксооктановой кислотой (3 экв.), NATU (2,9 экв.), DIPEA (6 экв.) в ДМФ (1 мл на 100 мг смолы). Смолу промывали ДМФ (4 раза), ДХМ (4 раза).

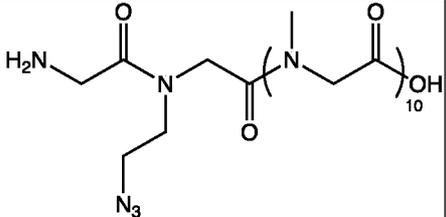
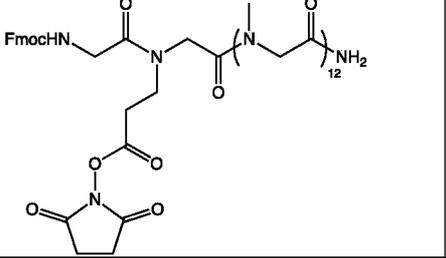
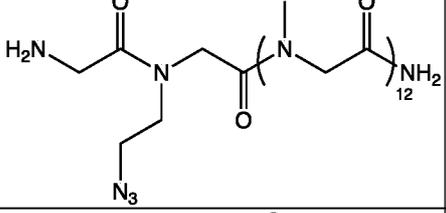
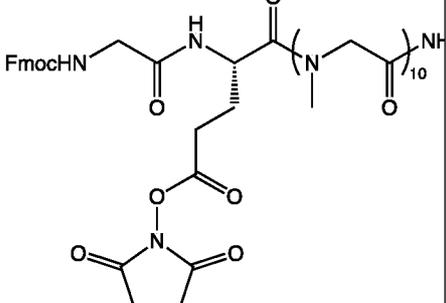
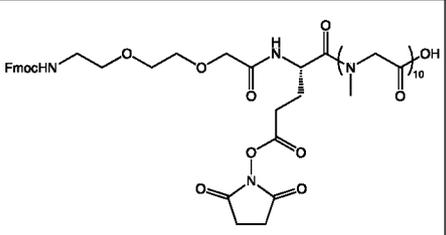
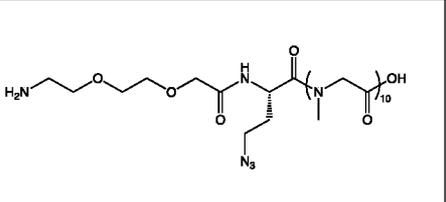
Конечные соединения полисаркозина отщепляли от смолы (100% ТФУ 2 раза по 30 минут для смол Ринка и Ванга, 20% ТФУ в ДХМ 2 раза по 15 минут для 2-хлортритиловой смолы). Смолу отделяли фильтрацией, а летучие вещества удаляли при пониженном давлении, чтобы получить неочищенный продукт, который очищали с помощью картриджей Interchim® RP-AQ (30 мкм). Подвижной фазой А была вода + 0,1% ТФУ, а подвижной фазой В был ацетонитрил.

#### 1.1.4) Конечные промежуточные продукты полисаркозина

В следующей таблице 1 перечислены полученные соединения.

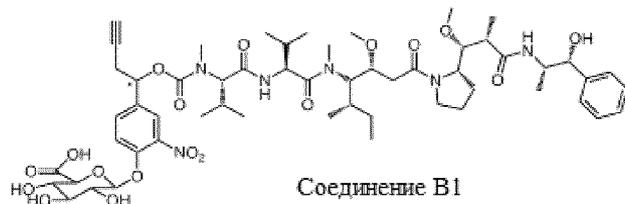
Таблица 1

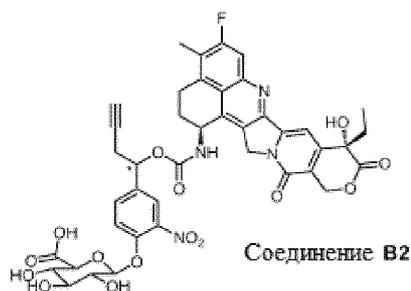
Название соединения	Структура	Смола	Выход	МС (ЭРИ <sup>+</sup> )	Время удерживания ВЭЖХ
Соединение A1 NH <sub>2</sub> Fmoc-Gly-( $\beta$ Аланин-NHS)-PSAR10-CONH <sub>2</sub> (белое твердое вещество)		Амид Ринка	56%	Расч. [M+H] <sup>+</sup> = 1233,5 Набл. [M+H] <sup>+</sup> = 1233,5	9,1 минут (Метод ВЭЖХ 3)
Соединение A2 NH <sub>2</sub> -Gly-(N <sub>3</sub> )-PSAR10-CONH <sub>2</sub> (прозрачное масло)		Амид Ринка	48%	Расч. [M+H] <sup>+</sup> = 911,5 Набл. [M+H] <sup>+</sup> = 911,5	12,5 минут (Метод ВЭЖХ 1)

Соединение A3 NH <sub>2</sub> -Gly-(N <sub>3</sub> )- PSAR10- COOH (прозрачное масло)		2- хлоро- трил	14%	Расч. [M+H] <sup>+</sup> = 912,5 Набл. [M+H] <sup>+</sup> = 912,5	14,5 минут (Метод ВЭЖХ 1)
Соединение A4 NH <sub>2</sub> Fmoc-Gly- (β-Аланин- NHS)-PSAR12- CONH <sub>2</sub> (белое твердое вещество)		Амид Ринка	50%	Расч. [M+Na] <sup>+</sup> = 1375,6 Набл. [M+Na] <sup>+</sup> = 1375,6	5,5 минут (Метод ВЭЖХ 2)
Соединение A5 NH <sub>2</sub> -Gly-(N <sub>3</sub> )- PSAR12- CONH <sub>2</sub> (прозрачное масло)		Амид Ринка	37%	Расч. [M+H] <sup>+</sup> = 1053,5 Набл. [M+H] <sup>+</sup> = 1053,5	11,6 минут (Метод ВЭЖХ 1)
Соединение A6 NH <sub>2</sub> Fmoc-Gly- (Glu-NHS)- PSAR10- CONH <sub>2</sub> (белое твердое вещество)		Амид Ринка	56%	Расч. [M+2Na] <sup>2+</sup> = 639,3 Набл. [M+2Na] <sup>2+</sup> = 639,3	5,4 минут (Метод ВЭЖХ 2)
Соединение A7 NH <sub>2</sub> Fmoc- PEG2-(Glu- NHS)-PSAR10- COOH (белое твердое вещество)		Ванг	60%	Расч. [M+2H] <sup>2+</sup> = 661,8 Набл. [M+2H] <sup>2+</sup> = 661,8	5,7 минут (Метод ВЭЖХ 2)
Соединение A8 NH <sub>2</sub> -PEG2- (N <sub>3</sub> )-PSAR10- COOH (прозрачное масло)		Ванг	65%	Расч. [M+H] <sup>+</sup> = 1000,5 Набл. [M+H] <sup>+</sup> = 1000,5	14,0 минут (Метод ВЭЖХ 1)

## 1.2) Синтез промежуточных соединений

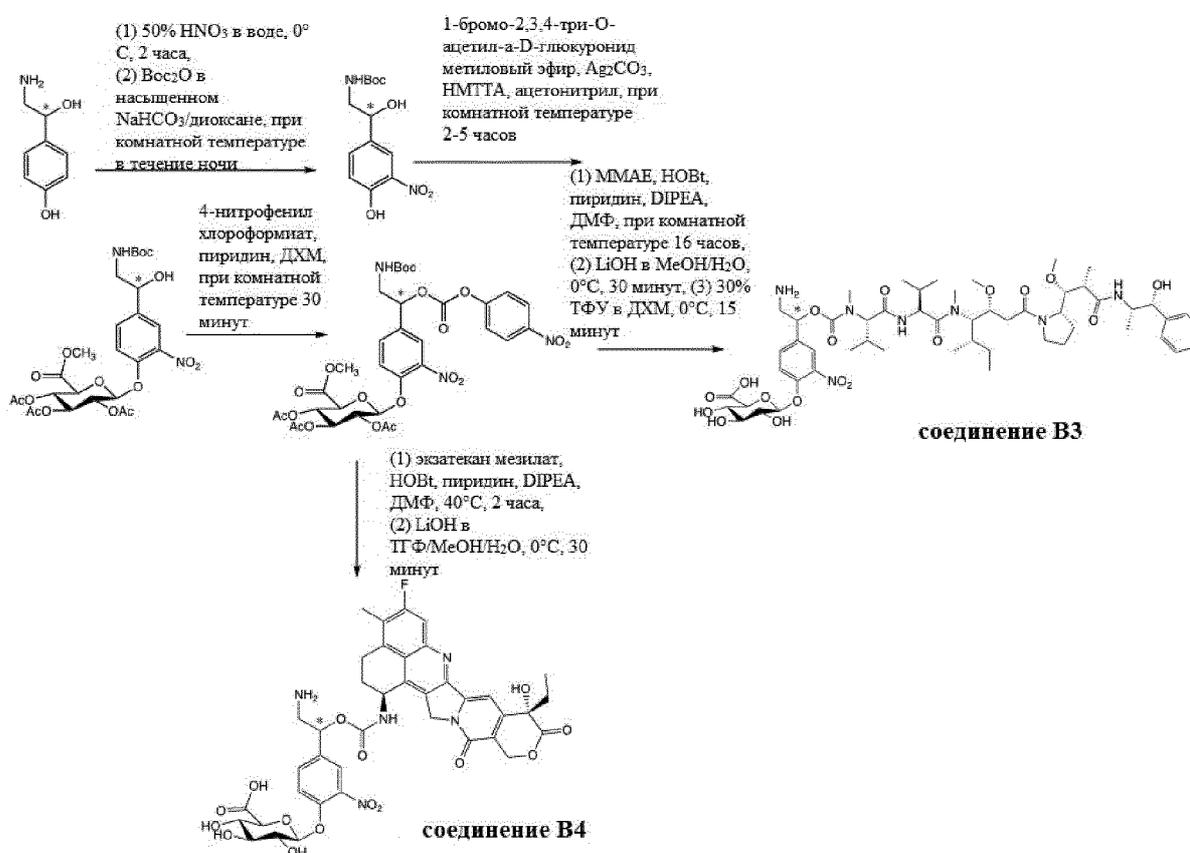
## 1.2.1) Синтез соединения B1 и соединения B2





Эти соединения были синтезированы в соответствии с процедурами, описанными в патенте WO2019081455. Эти соединения представляют собой эквимольные диастереоизомерные смеси (стереогенный центр обозначен звездочкой).

### 1.2.2) Синтез соединения В3 и соединения В4



#### 1.2.2.1) Синтез трет-бутил (2-гидрокси-2-(4-гидрокси-3-нитрофенил)этил)карбамата

Добавляли навеску ( $\pm$ )-октопамина гидрохлорида (1690 мг/11 ммоль) в круглодонную колбу, и суспендировали в 4 мл дистиллированной воды. Колбу охлаждали при  $0^\circ\text{C}$  и медленно добавляли 4 мл предварительно охлажденного 65% раствора азотной кислоты. Реакционную смесь выдерживали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 20 минут, демонстрируя полное мононитрование исходного материала по результатам ВЭЖХ. Содержимое колбы переносили в предварительно охлажденную колбу Эрленмейера вместимостью 250 мл и медленно нейтрализовали при  $0^\circ\text{C}$  насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (примерно 50 мл) до

достижения значения рН 8-9. Затем добавляли 30 мл диоксана, затем  $\text{Woc}_2\text{O}$  (7202 мг/13,2 ммоль). Затем реакционной смеси давали достичь комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Затем реакционную смесь разбавляли EtOAc и промывали 3 раза насыщенным раствором лимонной кислоты и один раз насыщенным раствором NaCl. Органическую фазу сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и выпаривали под вакуумом для получения неочищенного продукта, который очищали хроматографией на силикагеле (петролейный эфир/EtOAc, градиент от 70:30 до 20:80) для получения титульного соединения (1320 мг/40%) в виде густого желто-коричневого масла.  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц; ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  10,79 (s; 1H); 7,79 (d;  $J = 2,1$  Гц; 1H); 7,47 (dd;  $J = 8,6; 2,1$  Гц; 1H); 7,08 (d;  $J = 8,6$  Гц; 1H); 6,74 (t;  $J = 5,9$  Гц; 1H); 4,56 (t;  $J = 6,3$  Гц; 1H); 3,07 (td;  $J = 6,1; 1,6$  Гц; 2H); 1,31 (s; 9H), МС  $m/z$  (ЭРИ $^+$ ): Расч.  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 299,1$ ; Экс.  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 299,1$ . Время удерживания методом ВЭЖХ 2 = 5,5 минут.

1.2.2.2) Синтез (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1-гидроксиэтил)-2-нитрофенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триил триацетата

В круглодонную колбу добавляли навеску  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  (1500 мг/5,4 ммоль) и 1,1,4,7,10,10-гексаметилтриэтилентетрамина (251 мг/1,1 ммоль) в 4 мл безводного ацетонитрила и перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. Добавляли предыдущее соединение трет-бутил (2-гидрокси-2-(4-гидрокси-3-нитрофенил)этил)карбамат (292 мг/0,98 ммоль) и 1-бром-2,3,4-три-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкуронида метиловый эфир (583 мг/1,46 ммоль) при 0°C, и смесь растворов перемешивали в течение 4 часов при комнатной температуре. Затем реакционную смесь фильтровали на целите, разбавляли EtOAc и промывали 3 раза насыщенным раствором лимонной кислоты и один раз насыщенным раствором NaCl. Органическую фазу сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и выпаривали под вакуумом для получения неочищенного продукта, который очищали хроматографией на силикагеле (петролейный эфир/EtOAc, градиент от 70:30 до 30:70) для получения титульного соединения (244 мг/48%) в виде желтой пены.  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц; ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  7,76 (dd;  $J = 3,3; 2,1$  Гц; 1H); 7,60 (t;  $J = 7,6$  Гц; 1H); 7,36 (dd;  $J = 8,7; 2,6$  Гц; 1H); 6,77 (s; 1H); 5,71 (d;  $J = 7,8$  Гц; 1H); 5,61 (s; 1H); 5,46 (td;  $J = 9,5; 1,1$  Гц; 1H); 5,21 – 5,02 (m; 3H); 4,75 (dd;  $J = 9,9; 1,4$  Гц; 1H); 4,62 (s; 1H); 3,65 (s; 3H); 3,17 (s; 2H); 3,10 (t;  $J = 6,1$  Гц; 2H); 2,81 – 2,59 (m; 6H); 2,05 – 1,96 (m; 9H); 1,30 (d;  $J = 1,7$  Гц; 9H), МС  $m/z$  (ЭРИ $^+$ ): Расч.  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 637,2$ ; Эксп.  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 637,2$ . Время удерживания методом ВЭЖХ 2 = 6,75 минут.

1.2.2.3) Синтез (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)этил)-2-нитрофенокси)-6-(метоксикарбонил) тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триилтриацетата

Предыдущее соединение (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1-гидроксиэтил)-2-нитрофенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триил триацетат (334 мг/0,54 ммоль) и 4-нитрофенилхлорформиат (219 мг/1,09 ммоль) растворяли в 6 мл безводного ДХМ при 0°C. Добавляли безводный пиридин (112 мг/1,41 ммоль), и смесь перемешивали 30 минут при комнатной температуре. Реакционную смесь фильтровали через фильтр из ПТФЭ с размером пор 0,45 мкм и очищали хроматографией на силикагеле (петролейный эфир/EtOAc, градиент от 85:15 до 30:70) для получения титульного соединения (380 мг/90%) в виде желтой пены. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц; ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 8,39 – 8,26 (m; 2H); 7,93 (d; *J* = 2,2 Гц; 1H); 7,75 (d; *J* = 8,8 Гц; 1H); 7,55 (dd; *J* = 9,2; 1,2 Гц; 2H); 7,46 (d; *J* = 8,8 Гц; 1H); 7,20 (d; *J* = 4,8 Гц; 1H); 5,77 (dd; *J* = 7,7; 3,7 Гц; 1H); 5,47 (t; *J* = 9,5 Гц; 1H); 5,11 (q; *J* = 9,6 Гц; 2H); 4,77 (d; *J* = 9,9 Гц; 1H); 3,73 – 3,59 (m; 3H); 3,59 – 3,37 (m; 2H); 2,05 – 1,96 (m; 9H); 1,48 – 1,35 (m; 1H); 1,32 (s; 9H), МС *m/z* (ЭРИ<sup>+</sup>): Расч. [M+Na]<sup>+</sup> = 802,15; Эксп. [M+Na]<sup>+</sup> = 802,15. Время удерживания методом ВЭЖХ 2 = 8,5 минут.

#### 1.2.2.4) Синтез соединения В3

101 мг (0,13 ммоль) предыдущего соединения (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)этил)-2-нитрофенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триил триацетата, 98 мг (0,14 ммоль) ММАЕ и 18 мг (0,13 ммоль) НОВt растворяли в 1 мл смеси безводного ДМФ/пиридина в соотношении 85:15 (об./об.). Добавляли 16,7 мг (0,13 ммоль) DIPEA. Реакционную смесь перемешивали 16 часов при комнатной температуре и выпаривали летучие вещества при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали хроматографией на силикагеле (градиент ДХМ/MeOH от 99:1 до 95:5) до получения 147 мг (84%) промежуточного соединения (белого твердого вещества), которое непосредственно вводили на стадии снятия защиты. ЭРИ<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> = 1358,7. Время удерживания методом ВЭЖХ 2 = 8,8 минут.

144 мг (0,106 ммоль) этого промежуточного соединения растворяли в 3 мл MeOH при 0°C. LiOH моногидрат (44,5 мг/1,06 ммоль) растворяли в воде (0,4 мл) и добавляли в реакционный сосуд. После перемешивания при 0°C в течение 30 минут (реакция под контролем ВЭЖХ) смесь нейтрализовали уксусной кислотой (83 мг/1,4 ммоль) и концентрировали при пониженном давлении. Полученный неочищенный продукт повторно растворяли при 0°C раствором ТФУ/ДХМ (30:70 об./об.) и перемешивали 15

минут при комнатной температуре. Летучие вещества выпаривали при пониженном давлении, неочищенный остаток собирали в растворе вода/ACN (1:1 по объему) и очищали с помощью ВЭЖХ метода 5 для получения 85 мг (72%) соединения В3 в виде белого твердого вещества. МСВР  $m/z$  (ЭРИ+): Расч.  $[M+H]^+ = 1118,5867$ ; Эксп.  $[M+H]^+ = 1118,5842$ ; Погрешность = 2,2 ppm. Метод ВЭЖХ 3. время удерживания = 9,36 минут.

#### 1.2.2.5) Синтез соединения В4

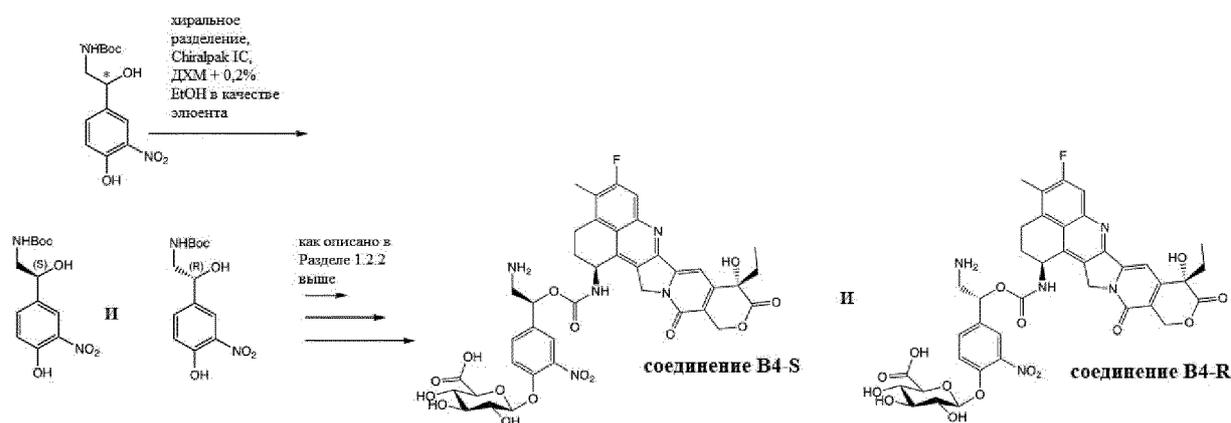
Соединение В4 синтезировали с помощью тех же процедур, которые использовали для синтеза соединения В3, с небольшими корректировками. Реакцию связывания (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)этил)-2-нитрофенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триил триацетата с экзатекана мезилатом проводили при 40°C в течение 2 часов вместо ночи при комнатной температуре.

125 мг (87%) промежуточного соединения (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(4-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1-(((1R,9R)-9-этил-5-фторо-9-гидрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-1-ил)карбамоил)окси)этил)-2-нитрофенокси)-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триил триацетата было получено в виде зеленовато-желтого твердого вещества. ЭРИ+  $[M+Na]^+ = 1098,3$ . Время удерживания методом ВЭЖХ 3 = 14,7 и 14,9 минут (диастереоизомерная смесь).

Снятие защиты с глюкуронидной части проводили с использованием MeOH/ТГФ (75:25 об./об.) вместо чистого MeOH. Снятие Вос-защиты проводили, как описано для соединения В3.

Очистка с использованием препаративного метода ВЭЖХ 5 позволила получить 65 мг (67%) соединения В4 в виде желтого твердого вещества. ЭРИ+  $[M+H]^+ = 836,2$ . Время удерживания при определении ВЭЖХ методом 3 = 7,3 и 7,8 минут (диастереоизомерная смесь).

#### 1.2.2.6) Синтез стереочистых соединений В4-S и В4-R



1.2.2.6.1) Хиральное разделение рацемической смеси трет-бутил (2-гидрокси-2-(4-гидрокси-3-нитрофенил)этил)карбамата

Хиральное разделение рацемического трет-бутил (2-гидрокси-2-(4-гидрокси-3-нитрофенил)этил)карбамата (синтезированного, как описано ранее) проводили с использованием колонки Chiralflash® IC MPLC 30×100 мм, 20 мкм (Daicel, cat#83M73) на системе Teledyne Isco CombiFlash® Rf200. Подвижная фаза представляла собой ДХМ + 0,2 об.% EtOH (изократический градиент). Скорость потока составляла 12 мл/мин. Растворителем для образца был ДХМ + 0,2% (об./об.) EtOH. Массовое извлечение двух энантиомеров после разделения составило более 80%.

Время удерживания трет-бутил (S)-(2-гидрокси-2-(4-гидрокси-3-нитрофенил)этил)карбамата составляло 15 минут, а для трет-бутил (R)-(2-гидрокси-2-(4-гидрокси-3-нитрофенил)этил)карбамата - 25 минут.

Для определения абсолютной конфигурации фенольное положение обоих энантиомеров этерифицировали 1,2 молярными эквивалентами 4-нитробензоилхлорида и 2 молярными эквивалентами триэтиламина в безводном ТГФ. Соединения очищали хроматографией на силикагеле (петролейный эфир/EtOAc, градиент от 90:10 до 10:90) с получением 4-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1-гидроксиэтил)-2-нитрофенил-4-нитробензоата.  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц; ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  8,51 (d; J = 9,1 Гц; 2H); 8,44 (d; J = 9,1 Гц; 2H); 8,19 (d; J = 1,9 Гц; 1H); 7,88 (d; J = 10,2 Гц; 1H); 7,72 (d; J = 8,4 Гц; 1H); 6,93 (t; J = 5,9 Гц; 1H); 5,84 (d; J = 4,7 Гц; 1H); 4,86 – 4,76 (m; 1H); 3,24 (t; J = 6,1 Гц; 2H); 1,38 (s; 9H), ЭРИ<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> = 470,1. Абсолютная конфигурация энантиомеров (предварительно растворенных в смеси гептан/дихлорметан в соотношении 1:1 и выдержанных для медленного испарения в течение 3 недель, чтобы вызвать образование кристаллов) была подтверждена рентгеновской кристаллографией. Кристалл в форме блока был закреплен на нейлоновой петле в перфтороэфирном масле. Данные были собраны с помощью ультрадифрактометров Xcalibur, Atlas, Gemini, оснащенных низкотемпературным прибором Oxford Cryosystems, работающим при T = 150,00 (5) К. Данные были измерены с помощью  $\omega$ -сканирования с использованием излучения Cu K $\alpha$ . Структура была определена с помощью программы ShelXT solution с использованием двойных методов и с помощью Olex2 (O.V. Dolomanov et al., Olex2: A complete structure solution, refinement and analysis program, J. Appl. Cryst., 2009, 42, 339-341) в качестве графического интерфейса. Модель была уточнена с помощью ShelXL 2018/3 (Sheldrick, G.M., Crystal structure refinement with ShelXL, Acta Cryst., 2015, C71, 3-8) с использованием методики наименьших квадратов в полноматричном приближении по F<sup>2</sup>.

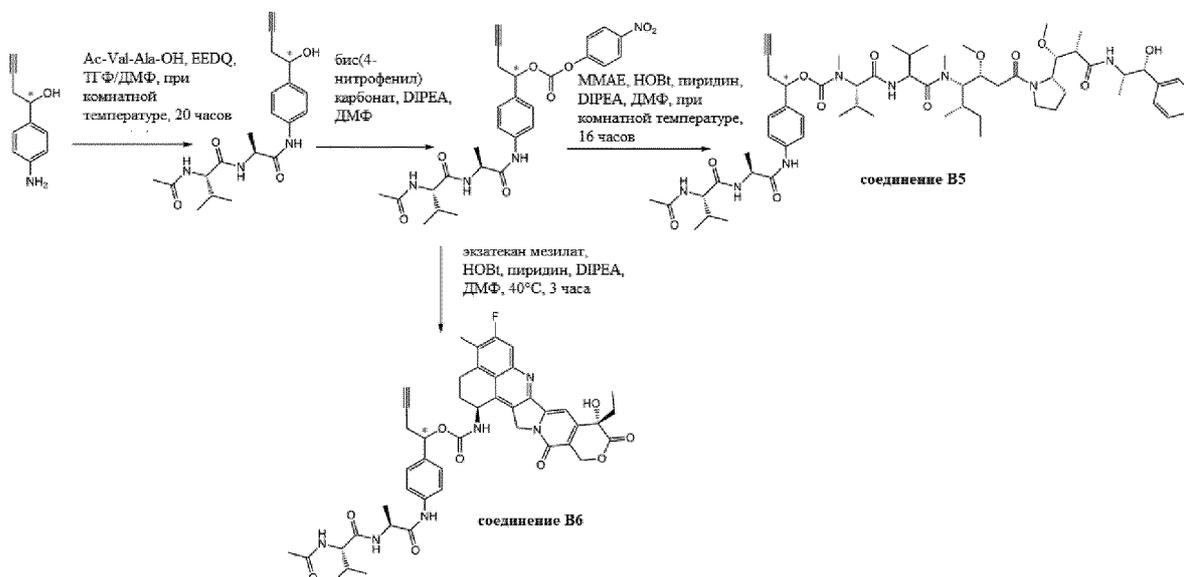
### 1.2.2.6.2) Синтез стереочистых соединений В4-S и В4-R

Стереочистые соединения В4-S и В4-R были синтезированы, как описано в предыдущем разделе 1.2.2, без каких-либо заметных изменений условий реакции, реакционной способности или общих выходов.

Окончательная очистка с использованием препаративного метода ВЭЖХ 5 позволила получить 33 мг соединения В4-S в виде желтого твердого вещества. ЭРИ+ [M+H]<sup>+</sup> = 836,2. Время удерживания ВЭЖХ метод 3 = 7,3 минут.

Окончательная очистка с использованием препаративного метода ВЭЖХ 5 позволила получить 21 мг соединения В4-R в виде желтого твердого вещества. ЭРИ+ [M+H]<sup>+</sup> = 836,2. Время удерживания ВЭЖХ метод 3 = 7,8 минут.

### 1.2.3) Синтез соединения В5 и соединения В6



#### 1.2.3.1) Синтез Ac-Val-Ala-OH (ацетил-L-валил-L-аланина)

К раствору L-аланина бензилового эфира гидрохлорида (542 мг/2,5 ммоль) в 30 мл ДХМ последовательно добавляли триэтиламин (254 мг/2,5 ммоль), дистиллированную воду (30 мл), N-α-ацетил-L-валин (400 мг/2,5 ммоль) и HOBT (339 мг/2,5 ммоль). Затем смесь охлаждали до 0°C и добавляли EDC-HCl (530 мг/2,75 ммоль). Полученную смесь перемешивали при температуре 0°C в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли 20 мл 2М HCl, и разделяли слои. Органическую фазу промывали 2 раза 2М HCl, 2 раза насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> и один раз насыщенным раствором NaCl. Органическую фазу сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и выпаривали под вакуумом с получением 714 мг (89%) бензилацетил-L-валил-L-аланината в качестве белого твердого промежуточного продукта.

Этот промежуточный продукт растворяли в 10 мл EtOAc/MeOH 1:1 (об./об.) и

переносили в реактор гидрирования из нержавеющей стали. После первой продувки аргоном добавляли каталитическое количество, составляющее 5 масс.% Pd/C. Затем реактор дважды продували H<sub>2</sub> и выдерживали при давлении H<sub>2</sub> 10 бар в течение ночи при комнатной температуре. После фильтрации реакционной смеси через фильтр из ПТФЭ с размером пор 0,45 мкм и удаления растворителя под вакуумом было получено количественное количество чистого ацетил-L-валил-L-аланина в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц; ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 12,45 (s; 1H); 8,23 (d; *J* = 6,9 Гц; 1H); 7,85 (d; *J* = 9,0 Гц; 1H); 4,25 – 4,11 (m; 2H); 1,94 (dt; *J* = 13,6; 6,8 Гц; 1H); 1,85 (s; 3H); 1,26 (d; *J* = 7,3 Гц; 3H); 0,85 (dd; *J* = 12,1; 6,8 Гц; 6H).

1.2.3.2) Синтез (2S)-2-ацетамидо-N-((2S)-1-((4-(1-гидроксибут-3-ин-1-ил)фенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)-3-метилбутанамида

В круглодонной колбе 420 мг (2,60 ммоль) 1-(4-аминофенил)бут-3-ин-1-ола (синтезированного в соответствии с процедурами, описанными в Sharma A. et al., Chem 2018, 4 (10), 2370-2383) и 600 мг (2,60 ммоль) предыдущего соединения Ac-Val-Ala-OH суспендировали в 20 мл безводного ТГФ. Затем в колбу помещали 676 мг (2,74 ммоль) 2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохинолина (EEDQ), предварительно растворенного в 5 мл безводного ДМФ, и мутную реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Затем летучие вещества выпаривали при пониженном давлении, а неочищенный остаток вводили в сухом виде и очищали хроматографией на силикагеле (градиент ДХМ/MeOH от 99:1 до 85:15), получая 809 мг (83%) титульного соединения в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц; ДМСО-*d*<sub>6</sub>) δ 9,84 (s; 1H); 8,18 (d; *J* = 7,0 Гц; 1H); 7,90 (d; *J* = 8,6 Гц; 1H); 7,53 (d; *J* = 8,6 Гц; 2H); 7,28 (d; *J* = 8,6 Гц; 2H); 5,44 (d; *J* = 4,4 Гц; 1H); 4,62 (q; *J* = 6,2 Гц; 1H); 4,39 (p; *J* = 7,6; 7,2 Гц; 1H); 4,17 (dd; *J* = 8,5; 6,8 Гц; 1H); 2,70 (t; *J* = 2,6 Гц; 1H); 1,96 (dt; *J* = 13,2; 6,6 Гц; 1H); 1,88 (s; 3H); 1,30 (d; *J* = 7,1 Гц; 3H); 0,86 (dd; *J* = 10,9; 6,8 Гц; 6H), ЭРИ<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> = 374,2. Время удерживания ВЭЖХ метод 2 = 3,95 минут.

1.2.3.3) Синтез 1-(4-((S)-2-((S)-2-ацетамидо-3-метилбутанамидо)пропанамидо)фенил)бут-3-ин-1-ил (4-нитрофенил) карбоната

94 мг (0,25 ммоль) (2S)-2-ацетамидо-N-((2S)-1-((4-(1-гидроксибут-3-ин-1-ил)фенил)амино)-1-оксопропан-2-ил)-3-метилбутанамида и 153 мг (0,50 ммоль) бис(4-нитрофенил) карбоната растворяли в 2 мл безводного ДМФ. Добавляли 98 мг (0,76 ммоль) DIPEA, и реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении, а неочищенный остаток очищали хроматографией на силикагеле (градиент ДХМ/MeOH от 99:1 до 90:10), получая 118 мг (87%) титульного соединения в виде желтого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц;

DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9,99 (s; 1H); 8,35 – 8,26 (m; 2H); 8,22 (d;  $J = 7,0$  Гц; 1H); 7,89 (d;  $J = 8,6$  Гц; 1H); 7,63 (d;  $J = 8,7$  Гц; 2H); 7,58 – 7,48 (m; 2H); 7,43 (d;  $J = 8,7$  Гц; 2H); 5,74 (d;  $J = 7,5$  Гц; 1H); 4,39 (p;  $J = 7,2$  Гц; 1H); 4,17 (dd;  $J = 8,5; 6,9$  Гц; 1H); 3,01 – 2,84 (m; 3H); 1,99 – 1,91 (m; 1H); 1,88 (s; 3H); 1,31 (d;  $J = 7,1$  Гц; 3H); 0,86 (dd;  $J = 11,2; 6,8$  Гц; 6H), ЭРИ<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> = 539,1. Время удерживания ВЭЖХ метод 2 = 6,48 минут.

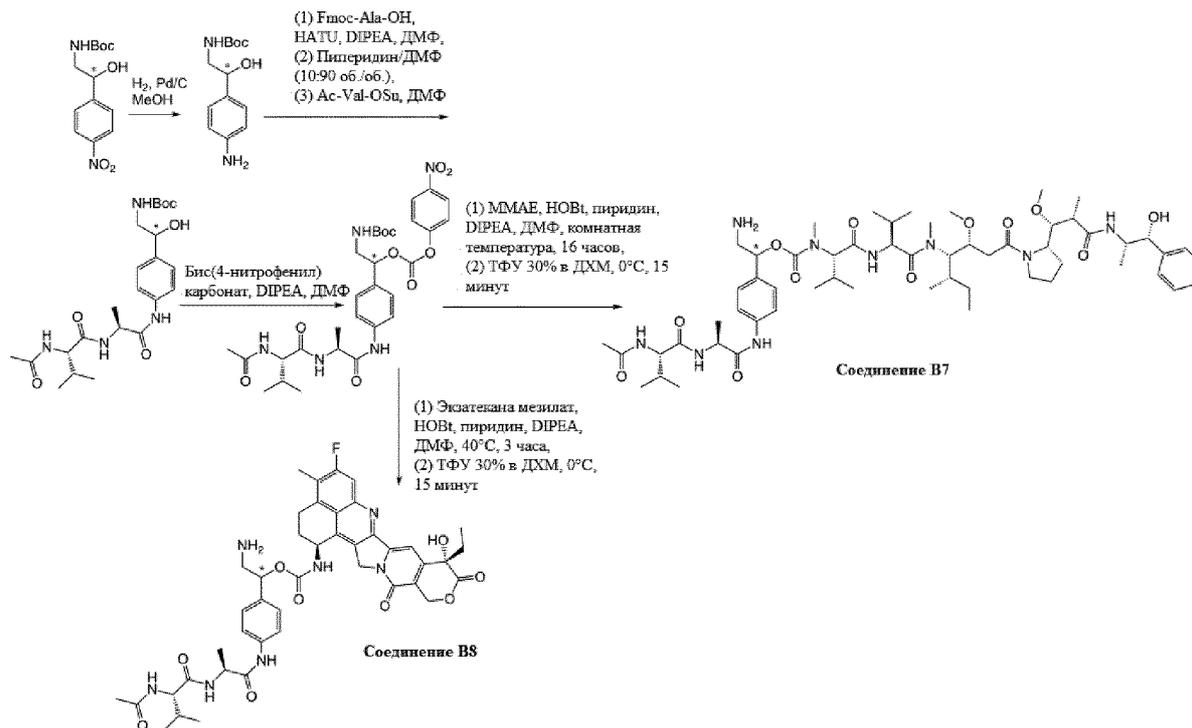
#### 1.2.3.4) Синтез соединения В5

44 мг (0,082 ммоль) предыдущего соединения 1-(4-((S)-2-((S)-2-ацетиамидо-3-метилбутанамидо)пропанамидо)фенил)бут-3-ин-1-ил (4-нитрофенил) карбоната, 53 мг (0,074) ММАЕ и 11,1 мг (0,082 ммоль) НОВt растворяли в 1 мл смеси безводного ДМФ/пиридина в соотношении 85:15 (об./об.). Добавляли 10,6 мг (0,082 ммоль) DIPEA. Реакцию перемешивали 16 часов при комнатной температуре и непосредственно очищали с помощью ВЭЖХ-препаративного метода 5 для получения 41 мг (50%) соединения В5 в виде белого твердого вещества. ЭРИ<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> = 1139,7. Время удерживания методом 2 ВЭЖХ = 7,40 минут.

#### 1.2.3.5) Синтез соединения В6

Соединение В6 синтезировали по тем же методикам, которые использовали для синтеза соединения В5, с небольшими изменениями. Реакцию связывания 1-(4-((S)-2-((S)-2-ацетиамидо-3-метилбутанамидо)пропанамидо)фенил)но-3-ин-1-ил(4-нитрофенил) карбоната с экзатекана мезилатом проводили при 40°C в течение 3 часов вместо ночи при комнатной температуре. После удаления летучих веществ при пониженном давлении реакционную смесь очищали хроматографией на силикагеле (градиент ДХМ/MeOH от 99:1 до 95:5) до получения 53,3 мг (78%) соединения В6 в виде твердого вещества зеленовато-желтого цвета. ЭРИ<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> = 835,3. Время удерживания методом 2 ВЭЖХ = 6,50 и 6,60 минут (диастереоизомерная смесь).

## 1.2.4) Синтез соединения В7 и соединения В8



## 1.2.4.1) Синтез трет-бутил (2-(4-аминофенил)-2-гидроксиэтил)карбамата

Раствор MeOH, содержащий 911 мг (3,23 ммоль) коммерческого трет-бутил (2-гидрокси-2-(4-нитрофенил)этил)карбамата (CAS# 939757-25-2), переносили в реактор гидрирования из нержавеющей стали. После первой продувки аргоном добавляли каталитическое количество, составляющее 5 масс.%. Затем реактор дважды продували H<sub>2</sub> и выдерживали при давлении H<sub>2</sub> 10 бар в течение 5 часов при комнатной температуре, продолжая перемешивать реакцию смесь. После фильтрации реакционной смеси через фильтр из ПТФЭ с размером пор 0,45 мкм и удаления MeOH под вакуумом было получено 749 мг (92%) титульного соединения в виде белого твердого вещества. ЭРИ+ [M+N]<sup>+</sup> = 253,2. Время удерживания методом 2 ВЭЖХ = 2,73 минут.

## 1.2.4.2) Синтез трет-бутил (2-(4-((S)-2-((S)-2-ацетамидо-3-метилбутанамидо)пропанамидо)фенил)-2-гидроксиэтил)карбамата

150 мг (0,60 ммоль) предыдущего соединения трет-бутил (2-(4-аминофенил)-2-гидроксиэтил)карбамата, 222 мг (0,71 ммоль) Fmoc-Ala-OH и 81 мг (0,62 ммоль) DIPEA растворяли в 5 мл безводного ДМФ. Добавляли 181 мг (0,71 ммоль) HATU и перемешивали реакцию смесь при комнатной температуре в течение ночи. Затем летучие вещества удаляли при пониженном давлении, а неочищенный остаток очищали хроматографией на силикагеле (градиент ДХМ/MeOH от 100:0 до 90:10), чтобы количественно получить первый промежуточный продукт трет-бутил (2-(4-((S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)пропанамидо)фенил)-2-гидроксиэтил)карбамат,

который непосредственно участвовал в снятии Fмос-защиты. Время удерживания методом 2 ВЭЖХ = 7,7 минут.

Растворяли трет-бутил(2-(4-((S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)пропанамидо)фенил)-2-гидроксиэтил)карбамат в 5 мл ДМФ/пиперидина 9:1 (об./об.) и перемешивали 15 минут при комнатной температуре. Затем летучие вещества удаляли при пониженном давлении, а неочищенный остаток очищали хроматографией на силикагеле (градиент ДХМ/MeOH от 99:1 до 80:20) до получения 130 мг (68% за две стадии) второго промежуточного продукта трет-бутил (2-(4-((S)-2-аминопропанамидо)фенил)-2-гидроксиэтил)карбамата в виде белой пены твердого вещества. Время удерживания методом 2 ВЭЖХ = 3,75 минут.

130 мг (0,40 ммоль) трет-бутил (2-(4-((S)-2-аминопропанамидо)фенил)-2-гидроксиэтил)карбамата и 124 мг (0,48 ммоль) коммерческого Ac-Val-OSu (CAS# 56186-37-9) растворяли в 3 мл безводного ДМФ, и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем летучие вещества удаляли при пониженном давлении, а неочищенный остаток растирали с 3 мл ДХМ до получения 95 мг (51%) титульного соединения в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц; ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  9,82 (s; 1H); 8,16 (d;  $J = 7,1$  Гц; 1H); 7,88 (d;  $J = 8,6$  Гц; 1H); 7,53 (d;  $J = 8,4$  Гц; 2H); 7,22 (d;  $J = 8,5$  Гц; 2H); 6,73 – 6,58 (m; 1H); 5,27 (d;  $J = 4,4$  Гц; 1H); 4,58 – 4,47 (m; 1H); 4,40 (q;  $J = 7,1$  Гц; 1H); 4,17 (dd;  $J = 8,4$ ; 6,8 Гц; 1H); 3,15 – 2,90 (m; 2H); 1,88 (s; 4H); 1,35 (s; 9H); 1,30 (d;  $J = 7,1$  Гц; 3H); 0,92 – 0,73 (m; 6H), ЭРИ $^+$  [M+H] $^+$  = 487,3. Время удерживания методом 2 ВЭЖХ = 4,50 минут.

1.2.4.3) Синтез трет-бутил (2-(4-((S)-2-((S)-2-ацетамидо-3-метилбутанамидо)пропанамидо)фенил)-2-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)этил)карбамата

286 мг (0,62 ммоль) трет-бутил (2-(4-((S)-2-((S)-2-ацетамидо-3-метилбутанамидо)пропанамидо)фенил)-2-гидроксиэтил)карбамата и 375 мг (1,23 ммоль) бис(4-нитрофенил) карбоната растворяли в 3 мл безводного ДМФ. Добавляли 318 мг (2,46 ммоль) DIPEA, и реакционную смесь перемешивали 3 часа при комнатной температуре. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении, а неочищенный остаток очищали хроматографией на силикагеле (градиент ДХМ/MeOH от 99:1 до 90:10), получая 336 мг (87%) титульного соединения в виде желтого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (300 МГц; ДМСО- $d_6$ )  $\delta$  9,99 (s; 1H); 8,36 – 8,26 (m; 2H); 8,22 (d;  $J = 6,9$  Гц; 1H); 7,89 (d;  $J = 8,6$  Гц; 1H); 7,63 (d;  $J = 8,6$  Гц; 2H); 7,56 – 7,46 (m; 2H); 7,34 (d;  $J = 8,6$  Гц; 2H); 7,22 (t;  $J = 5,6$  Гц; 1H); 5,68 (t;  $J = 6,0$  Гц; 1H); 4,38 (p;  $J = 7,1$  Гц; 1H); 4,17 (dd;  $J = 8,5$ ; 6,9 Гц; 1H); 3,49 – 3,34 (m; 2H); 2,01 – 1,90 (m; 1H); 1,87 (s; 3H); 1,37 (s; 9H); 1,30 (d;  $J = 7,1$  Гц; 3H); 0,86 (dd;  $J = 11,1$ ; 6,8 Гц; 6H), ЭРИ $^+$  [M+Na] $^+$  = 652,2. Время удерживания методом 2 ВЭЖХ = 7,13

минут.

#### 1.2.4.4) Синтез соединения В7

43,2 мг (0,069 ммоль) предыдущего соединения трет-бутил (2-(4-((S)-2-((S)-2-ацетамидо-3-метилбутанамидо)пропанамидо)фенил)-2-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)этил)карбамата, 41 мг (0,057) ММАЕ и 6,7 мг (0,057 ммоль) НОВт растворяли в 1 мл смеси безводного ДМФ/пиридина в соотношении 85:15 (об./об.). Добавляли 11,0 мг (0,086 ммоль) DIPEA. Реакционную смесь перемешивали 16 часов при комнатной температуре и испаряли летучие вещества при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали хроматографией на силикагеле (градиент ДХМ/MeOH от 99:1 до 90:10) с получением 47 мг (55%) промежуточного соединения (слегка желтоватого твердого вещества), которое непосредственно вводили на стадии снятия Вос-защиты. ЭРИ+  $[M+Na]^+$  = 1230,7. Время удерживания методом 2 ВЭЖХ = 7,55 минут.

Полученное твердое вещество повторно растворяли при 0°C раствором ТФУ/ДХМ (30:70 об./об.) и перемешивали 15 минут при комнатной температуре. Летучие вещества выпаривали при пониженном давлении, неочищенный остаток собирали в растворе вода/ACN (1:1 об./об.) и очищали с помощью Метода 5 ВЭЖХ с получением 15 мг (30%) соединения В7 в виде белого твердого вещества. ЭРИ+  $[M+H]^+$  = 1108,7. Время удерживания методом 2 ВЭЖХ = 5,8 и 5,9 минут (диастереоизомерная смесь).

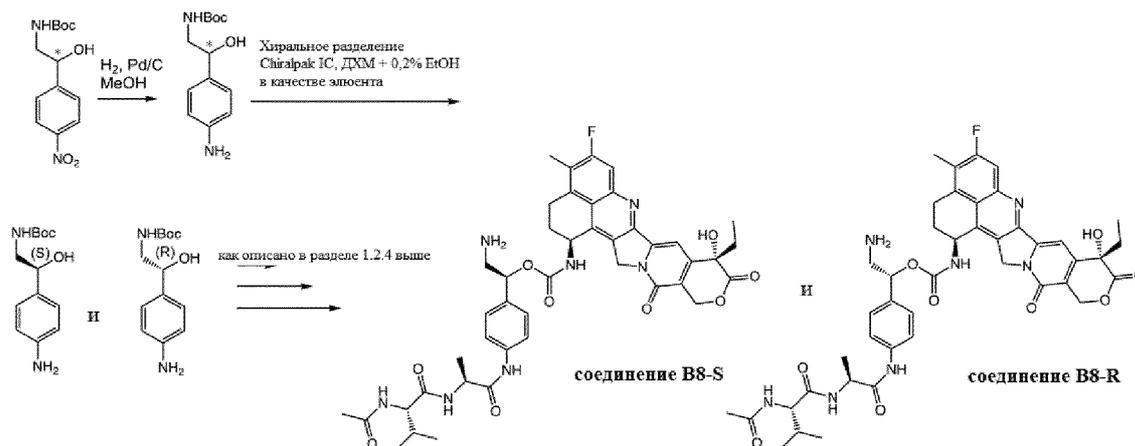
#### 1.2.4.5) Синтез соединения В8

Соединение В8 синтезировали с соблюдением тех же процедур, которые использовали для синтеза соединения В7, с небольшими корректировками. Реакцию связывания трет-бутил (2-(4-((S)-2-((S)-2-ацетамидо-3-метилбутанамидо)пропанамидо)фенил)-2-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)этил)карбамата с экзатекана мезилатом проводили при температуре 40°C в течение 3 часов вместо ночи при комнатной температуре.

69 мг (95%) промежуточного соединения 1-(4-((S)-2-((S)-2-ацетамидо-3-метилбутанамидо)пропанамидо)фенил)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)этил ((1R,9R)-9-этил-5-фторо-9-гидрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо [де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-1-ил)карбамата получали в виде желто-коричневого твердого вещества. ЭРИ+  $[M+H]^+$  = 926,4. Время удерживания методом 2 ВЭЖХ = 6,7 и 6,8 минут (диастереоизомерная смесь).

Снятие Вос-защиты проводили, как описано для соединения В7. Очистка с использованием препаративного метода 5 ВЭЖХ позволила получить 47 мг (70%) соединения В8 в виде желтого твердого вещества. ЭРИ+  $[M+H]^+$  = 826,4. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 8,30 и 8,75 минут (диастереоизомерная смесь).

## 1.2.4.6) Синтез стереочистых соединений В8-S и В8-R



## 1.2.4.6.1) Хиральное разделение рацемической смеси трет-бутил (2-(4-аминофенил)-2-гидроксиэтил)карбамата

Хиральное разделение рацемического трет-бутил (2-(4-аминофенил)-2-гидроксиэтил)карбамата проводили с использованием колонки Chiralflash® IC MPLC 30×100 мм, 20 мкм (Daicel cat#83M73) на системе Teledyne Isco CombiFlash® Rf200. Подвижная фаза представляла собой ДХМ + 0,2% (об./об.) EtOH (изократический градиент). Скорость потока составляла 12 мл/мин. Растворителем для пробы был ДХМ + 0,2% (об./об.) EtOH. Массовое извлечение двух энантиомеров после разделения составило более 75%.

Время удерживания трет-бутил (S)-(2-(4-аминофенил)-2-гидроксиэтил)карбамата составило 21 минуту, а время удерживания трет-бутил (R)-(2-(4-аминофенил)-2-гидроксиэтил)карбамата - 29 минут. Абсолютная конфигурация энантиомеров (предварительно растворенных в смеси гептан/этанол в соотношении 1:1 и выдержанных для медленного испарения в течение 1 недели, чтобы вызвать образование кристаллов) была подтверждена рентгеновской кристаллографией. Кристалл в форме блока был закреплен на нейлоновой петле в перфторозфирном масле. Данные были собраны с помощью ультрадифрактометров Xcalibur, Atlas, Gemini, оснащенных низкотемпературным прибором Oxford Cryosystems, работающим при T = 150,00 (10) К. Данные были измерены с помощью  $\omega$ -сканирования с использованием излучения Cu K $\alpha$ . Структура была решена с помощью программы ShelXT solution с использованием двойных методов и с помощью Olex2 (O.V. Dolomanov et al., Olex2: A complete structure solution, refinement and analysis program, J. Appl. Cryst., 2009, 42, 339-341) в качестве графического интерфейса. Модель была уточнена с помощью ShelXL 2018/3 (Sheldrick, G.M., Crystal structure refinement with ShelXL, Acta Cryst., 2015, C71, 3-8) с использованием методики наименьших квадратов в полноматричном приближении по F<sup>2</sup>.

## 1.2.4.6.2) Синтез стереочистых соединений В8-S и В8-R

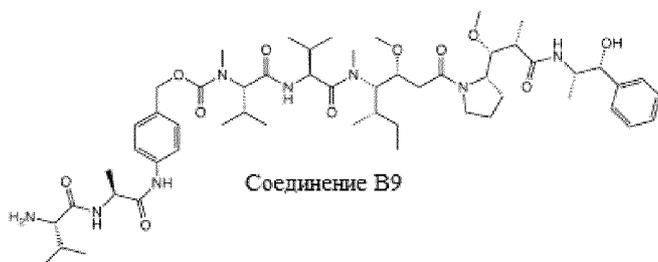
Стереочистые соединения В8-S и В8-R были синтезированы, как описано в предыдущем разделе 1.2.4, без каких-либо заметных изменений условий реакции, реакционной способности или общих выходов.

Окончательная очистка с использованием препаративного метода 5 ВЭЖХ позволила получить 54 мг соединения В8-S в виде желтого твердого вещества. ЭРИ+  $[M+H]^+ = 826,4$ . Время удерживания методом 3 ВЭЖХ 3 = 8,45 минут.

Окончательная очистка с использованием препаративного метода 5 ВЭЖХ позволила получить 46 мг соединения В8-R в виде желтого твердого вещества. ЭРИ+  $[M+H]^+ = 826,4$ . Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 8,90 минут.

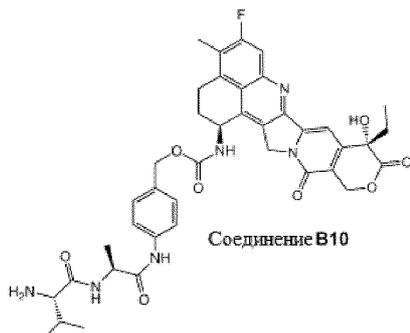
## 1.2.5) Синтез соединения В9, соединения В10 и соединения В11

## 1.2.5.1) Синтез соединения В9



20,0 мг (0,036 ммоль) Вос-Val-Ala-РАВ-РNP (CAS#1884578-00-0, Iris Biotech), 23,1 мг (0,032) ММАЕ и 5 мг (0,036 ммоль) НОВt растворяли в 1 мл смеси 85:15 (об./об.) безводного ДМФ/пиридина. Добавляли 4,6 мг (0,036 ммоль) DIPEA. Реакционную смесь перемешивали 16 часов при комнатной температуре и испаряли летучие вещества при пониженном давлении. Неочищенный остаток растворяли в 2 мл раствора ТФУ/ДХМ (30:70 об./об.) и перемешивали 1 час при комнатной температуре. Летучие вещества выпаривали при пониженном давлении, неочищенный остаток собирали в растворе вода/АСN (1:1 об./об.) и очищали с использованием метода 5 ВЭЖХ с получением 11 мг (26%) соединения В9 в виде белого твердого вещества. ЭРИ+  $[M+H]^+ = 1037,7$ . Время удерживания методом 2 ВЭЖХ = 7,9 минут.

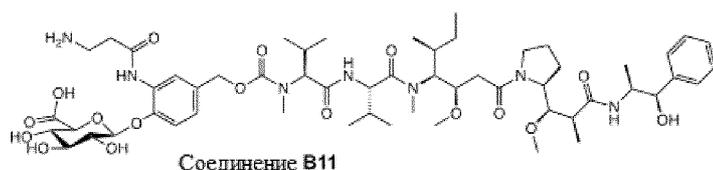
## 1.2.5.2) Синтез соединения В10



Соединение В10 синтезировали с использованием тех же процедур, которые использовали для синтеза соединения В9, с небольшими корректировками. Реакцию связывания Вос-Val-Ala-PAB-PNP (CAS#1884578-00-0) с экзатекана мезилатом проводили при 40°C в течение 3 часов вместо ночи при комнатной температуре.

Снятие Вос-защиты проводили, как описано для вышеуказанного соединения В9. Очистка с использованием препаративного метода 5 ВЭЖХ позволила получить 52 мг (90% за две стадии) соединения В10 в виде желтого твердого вещества. ЭРИ+ [M+H]<sup>+</sup> = 755,3. Время удерживания методом 2 ВЭЖХ = 5,70 минут.

### 1.2.5.3) Синтез соединения В11

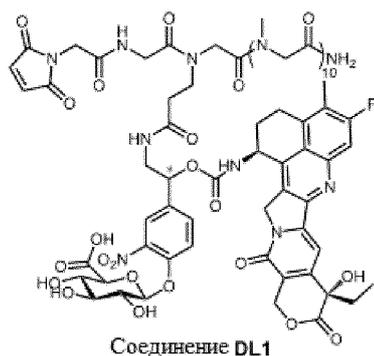


Соединение (2S, 3S, 4S, 5R, 6S)-6-(2-(3-аминопропанамидо)-4-((5R,8R,11R,12S)-11-((R)-сек-бутил)-12-(2-(2-((1R,2S)-3-(((1R,2S)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксипропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновую кислоту (соединение В11) синтезировали, как описано в Jeffrey SC et al., Bioconjug. Chem., 2006, 17(3), 831–840).

### 1.3) Синтез лекарств-линкеров

#### 1.3.1) Синтез лекарств-линкеров на основе глюкозидов

##### 1.3.1.1) Синтез соединения DL1

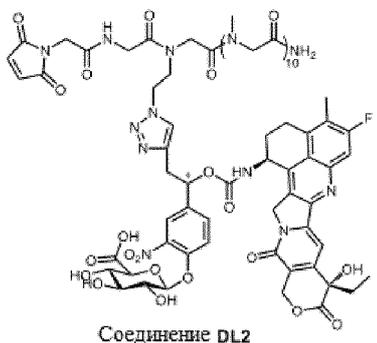


100 мг (0,081 ммоль) соединения А1 (NHS-активированного промежуточного продукта полисаркозина) и 51 мг (0,061 ммоль) соединения В4 (NH<sub>2</sub>-нагрузки) растворяли в безводном ДМФ в небольшом флаконе (концентрация соединения В4 0,080 М). Добавляли 41 мг (0,405 ммоль) триэтиламина, и реакционную смесь перемешивали 30 минут при комнатной температуре. После полного завершения реакции по результатам ВЭЖХ пиперидин непосредственно добавляли в реакционный сосуд, до получения 8%

раствора пиперидина в ДМФ. Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 5-10 минут, пока ВЭЖХ не показывала полное снятие Fmoc-защиты. Реакцию медленно нейтрализовали 10% раствором ТФУ в смеси вода/ACN 1:1 (об./об.) и очищали с помощью ВЭЖХ, препаративного метода 5 до получения 74 мг (выход 70% в пересчете на исходное соединение В4) промежуточного соединения (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(41-амино-1-(((1R,9R)-9-этил-5-фторо-9-гидрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хиолин-1-ил)амино)-9-глицил-12,15,18,21,24,27,30,33,36,39-декаметил-1,6,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41-тридекаоксо-2-окса-5,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39-додкекаазагентетраоктан-3-ил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновой кислоты в виде желтого твердого вещества. ЭРИ+  $[M+H]^+ = 1731,7$ . Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 7,40 минут и 7,70 минут (эквимолярная диастереоизомерная смесь).

17,8 мг (0,010 ммоль) этого соединения и 2,85 мг (0,011 ммоль) N-гидроксисукцинимидного эфира малеимидоуксусной кислоты растворяли в безводном ДМФ (концентрация малеимидного соединения 0,1 М). Добавляли 1,56 мг (0,015) триэтиламина, и реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов до полного завершения реакции по результатам ВЭЖХ. Затем реакционную смесь разбавляли 1% раствором ТФУ в смеси вода/ACN 1:1 (об./об.) и очищали с помощью препаративного метода 6 ВЭЖХ с получением 13,7 мг (72%) соединения DL1 в виде желтого твердого вещества. МСВР m/z (ЭРИ+): Расч.  $[M+2H]^{2+} = 934,8559$ ; Эксп.  $[M+2H]^{2+} = 934,8544$ ; Погрешность = 1,7 ppm. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 7,73 минут и 8,08 минут (эквимолярная диастереоизомерная смесь).

### 1.3.1.2) Синтез соединения DL2

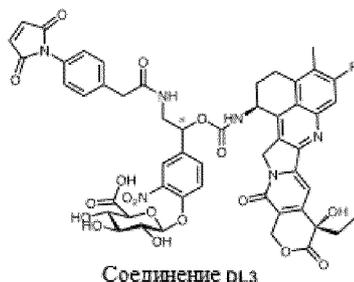


44,5 мг (0,049 ммоль) соединения А2 (промежуточного соединения азид-полисаркозина) и 27,5 (0,033 ммоль) соединения В2 (алкин-нагрузки) растворяли в смеси 1:1 (об./об.) 100 мм ФБР (рН = 7,5) и ДМСО с получением 0,060М концентрации соединения В2. Свежеприготовленные растворы  $CuSO_4$  пентагидрата и аскорбата натрия (приблизительно 250 мг/мл) затем последовательно добавляли в реакционный сосуд,

чтобы получить 0,08 молярного эквивалента Cu и 1 молярный эквивалент аскорбата натрия (в пересчете на молярный эквивалент соединения В2 в реакционной смеси). Реакционную смесь продували аргоном и перемешивали при температуре 40°C. Реакцию контролировали методом ВЭЖХ, и она была завершена менее чем за 2 часа. Затем реакционную смесь разбавляли 0,1% раствором ТФУ в смеси вода/АСN 1:1 (об./об.) и очищали с помощью препаративного метода 5 ВЭЖХ до получения 44 мг (77% в пересчете на исходное соединение В2) промежуточного соединения (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(2-(1-(35-амино-3-глицил-6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-декаметил-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-ундекаоксо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-ундекаазапентатриаконтитил)-1Н-1,2,3-триазол-4-ил)-1-(((1R,9R)-9-этил-5-фторо-9-гидрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1Н,12Н-бензо[де]пирано [3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-1-ил)карбамоил)окси)этил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2Н-пиран-2-карбоновой кислоты в виде желтого твердого вещества. ЭРИ+ [M+H]<sup>+</sup> = 1755,7. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 7,51 минут и 7,82 минут (диастереоизомерная смесь).

26,0 мг (0,015 ммоль) этого соединения и 4,11 мг (0,016 ммоль) N-гидроксисукцинимидного эфира малеимидоуксусной кислоты растворяли в безводном ДМФ (концентрация малеимидного соединения 0,1 М). Добавляли 2,25 мг (0,022 ммоль) триэтиламина, и реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов до полного превращения малеимидного соединения по результатам ВЭЖХ. Затем реакционную смесь разбавляли 1% раствором ТФУ в смеси вода/АСN 1:1 (об./об.) и очищали с помощью препаративного метода 6 ВЭЖХ с получением 16,0 мг (57%) соединения DL2 в виде желтого твердого вещества. ЭРИ+ [M+H]<sup>+</sup> = 1892,7. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ= 7,95 минут и 8,20 минут (эквимольная диастереоизомерная смесь).

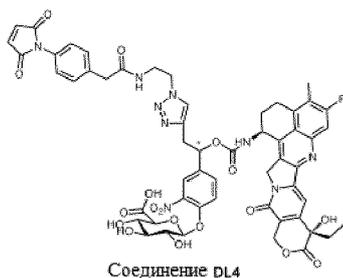
### 1.3.1.3) Синтез соединения DL3



5,4 мг (0,023 ммоль) коммерческой 2-(4-(2,5-диоксо-2Н-пиррол-1(5Н)-ил)фенил)уксусной кислоты (CAS#91574-45-7) и 9,04 мг (0,021 ммоль) COMU растворяли в безводном ДМФ (концентрация малеимидного соединения 0,1М). Добавляли 4,75 мг (0,067 ммоль) триэтиламина. Реакцию предварительно инкубировали 2 минуты при

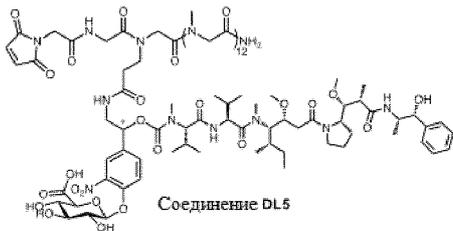
комнатной температуре и переносили к 9,8 мг (0,012 ммоль) соединения В4 (предварительно взвешенного в реакционном флаконе). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут до полного завершения реакции по результатам ВЭЖХ. Затем реакционную смесь разбавляли 1% раствором ТФУ в смеси вода/АСN 1:1 (об./об.) и очищали с помощью препаративного метода 5 ВЭЖХ для получения 4,7 мг (40%) соединения DL3 в виде желтого твердого вещества. МСВР m/z (ЭРИ+): Расч.  $[M+H]^+ = 1049,284$ ; Эксп.  $[M+H]^+ = 1049,2873$ ; Погрешность = -2,5 ppm. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 9,80 минут (эквимольная диастереоизомерная смесь).

#### 1.3.1.4) Синтез соединения DL4



16,0 мг (0,054 ммоль) N-(2-азидоэтил)-2-(4-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)фенил)ацетамида (синтезированного по методикам, уже описанным в патенте WO2019081455 — довольно нестабильного соединения, которое может храниться всего несколько дней при  $-20^{\circ}\text{C}$ ) и 22,6 мг (0,027 ммоль) соединения В2 растворяли в смеси 1:1 (об./об.) в 100 мМ ФБР (pH = 7,5) и ДМСО, чтобы достичь концентрации соединения В2 0,060М. Свежеприготовленные растворы  $\text{CuSO}_4$  пентагидрата и аскорбата натрия (приблизительно 250 мг/мл) затем последовательно добавляли в реакционный сосуд, чтобы получить 0,08 молярного эквивалента Cu и 1 молярный эквивалент аскорбата натрия (в пересчете на молярный эквивалент соединения В2 в реакционной смеси). Реакционную смесь продували аргоном и перемешивали при комнатной температуре. Реакцию контролировали с помощью ВЭЖХ, и она была завершена менее чем за 1 час. Затем реакционную смесь разбавляли 0,1% раствором ТФУ в смеси вода/АСN 1:1 (об./об.) и очищали с помощью препаративного метода 6 ВЭЖХ с получением 16 мг (53%) соединения DL4 в виде желтого твердого вещества. МСВР m/z (ЭРИ+): Расч.  $[M+H]^+ = 1144,3331$ ; Эксп.  $[M+H]^+ = 1144,3351$ ; Погрешность = -1,8 ppm. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 9,61 минут (эквимольная диастереоизомерная смесь).

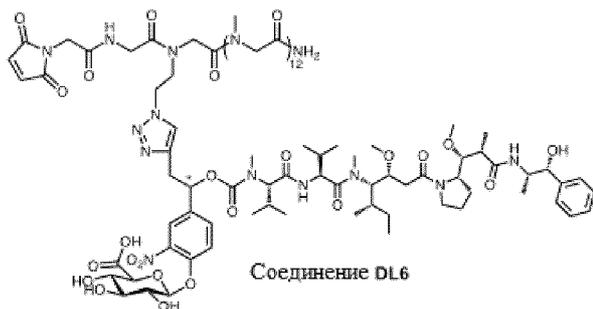
## 1.3.1.5) Синтез соединения DL5



Соединение DL5 синтезировали, как описано выше, с использованием той же процедуры, которую использовали для соединения DL1. Исходными материалами были соединение A4 (NHS-активированный промежуточный продукт полисаркозина) и соединение B3 (NH<sub>2</sub>-нагрузка).

Было получено 10,8 мг (48% от двух стадий) соединения DL5 в виде желтоватого твердого вещества. МСВР m/z (ЭРИ+): Расч. [M+3H]<sup>3+</sup> = 765,0460; Эксп. [M+3H]<sup>3+</sup> = 765,0443; Погрешность = 2,2 ppm. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 9,14 минут (эквимольная диастереоизомерная смесь).

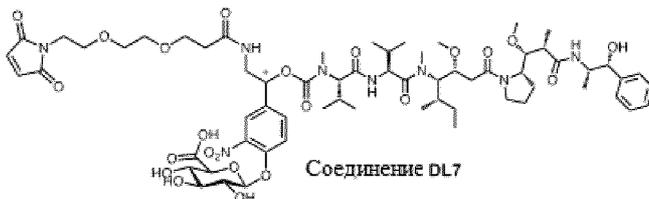
## 1.3.1.6) Синтез соединения DL6



Соединение DL6 синтезировали, как описано выше, с использованием той же процедуры, которую использовали для соединения DL2. Исходными материалами были соединение A5 (промежуточный продукт азид-полисаркозин) и соединение B1 (алкин-нагрузка).

Было получено 16,3 мг (41% от двух стадий) соединения DL6 в виде желтоватого твердого вещества. ЭРИ+ [M+2H]<sup>2+</sup> = 1159,1. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 9,32 минут и 9,45 минут (эквимольная диастереоизомерная смесь).

## 1.3.1.7) Синтез соединения DL7

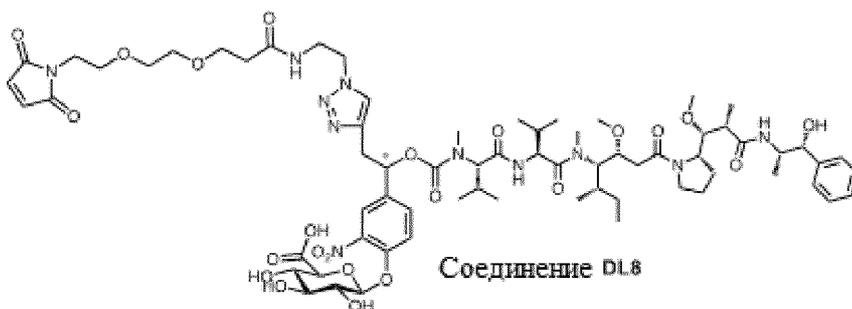


Соединение DL7 синтезировали, как описано выше, с использованием той же

процедуры, которую использовали для соединения DL3. Исходными материалами были коммерческое соединение малеимид-ПЭГ<sub>2</sub>-кислота (CAS№1374666-32-6) и соединение В3 (NH<sub>2</sub>-нагрузка).

Было получено 15,6 мг (69%) соединения DL7 в виде белого твердого вещества. ЭРИ+ [M+2Na]<sup>2+</sup> = 701,3. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 10,94 минут (эквимольная диастереоизомерная смесь).

#### 1.3.1.8) Синтез соединения DL8

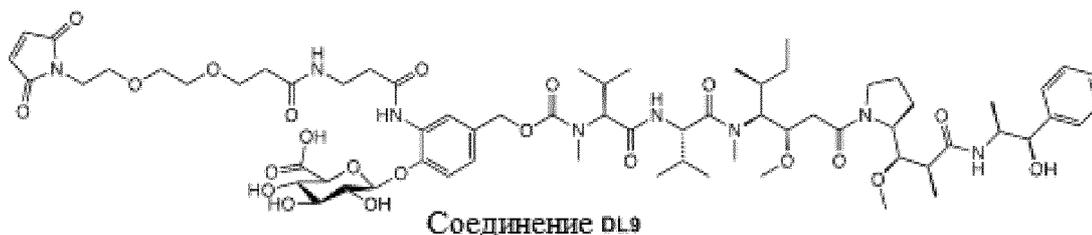


15,0 мг (0,013 ммоль) соединения В1 (алкин-нагрузки) и 3,44 мг (0,040 ммоль) 2-азидоэтиламина растворяли в смеси 1:1 (об./об.) 100 мМ ФБР (рН = 7,5) и ДМСО, чтобы достичь концентрации соединения В1 0,060М. Свежеприготовленные растворы CuSO<sub>4</sub> пентагидрата и аскорбата натрия (приблизительно 250 мг/мл) затем последовательно добавляли в реакционный сосуд, чтобы получить 0,08 молярного эквивалента Cu и 1 молярный эквивалент аскорбата натрия (на основе молярного эквивалента соединения В1 в реакционной смеси). Реакционную смесь продували аргоном и перемешивали при комнатной температуре. Реакцию контролировали методом ВЭЖХ, и она была завершена менее чем за 1 час. Затем реакционную смесь разбавляли 0,1% раствором ТФУ в смеси вода/АСН 1:1 (об./об.) и очищали с помощью препаративного метода 5 ВЭЖХ до получения 18,2 мг (110% в пересчете на исходное соединение В1) промежуточного соединения (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((3S, 4R,7R,10R)-15-(1-(2-аминоэтил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)-4-((R)-сек-бутил)-3-(2-(2-(((1C,2S)-3-(((1R,2S)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-7,10-диизопропил-5,11-диметил-6,9,12-триоксо-2,13-диокса-5,8,11-триазапентадекан-14-ил)-2-нитрофенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновой кислоты в виде белого твердого вещества. ЭРИ+ [M+H]<sup>+</sup> = 1213,6. Время удерживания методом 2 ВЭЖХ = 5,55 минут и 5,65 минут (диастереоизомерная смесь).

5,79 мг (0,022 ммоль) коммерческой малеимид-ПЭГ<sub>2</sub>-кислоты (CAS№1374666-32-6) и 9,00 мг (0,021 ммоль) СОМУ растворяли в безводном ДМФ (концентрация малеимидного соединения 0,1 М). Добавляли 6,1 мг (0,060 ммоль) триэтиламина. Реакционную смесь предварительно инкубировали 2 минуты при комнатной температуре

и переносили на 18,2 мг (0,012 ммоль) предыдущего соединения (предварительно взвешенного в реакционном флаконе). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 минут до полного завершения реакции по результатам ВЭЖХ. Затем реакционную смесь разбавляли 1% раствором ТФУ в смеси вода/АСН 1:1 (об./об.) и очищали с помощью препаративного метода 5 ВЭЖХ до получения 16,0 мг (73%) соединения DL8 в виде белого твердого вещества. МСВР m/z (ЭРИ+): Расч.  $[M+2H]^{2+} = 726,8609$ ; Эксп.  $[M+2H]^{2+} = 726,8631$ ; Погрешность = -3,1 ppm. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 10,40 минут и 10,56 минут (эквимольная диастереоизомерная смесь).

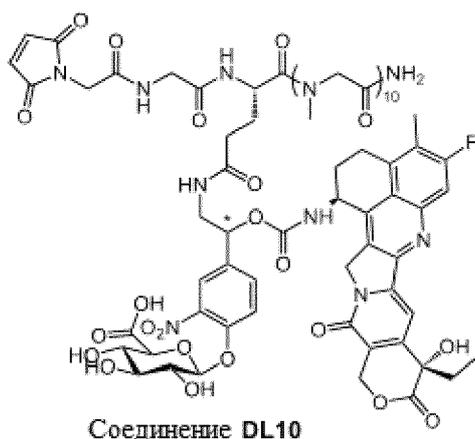
#### 1.3.1.9) Синтез соединения DL9



Соединение DL9 синтезировали, как описано выше, с использованием той же процедуры, которую использовали для соединения DL3. Исходными материалами были коммерческое соединение малеимид-ПЭГ2-кислота (CAS№1374666-32-6) и соединение B11 (NH<sub>2</sub>-нагрузка).

Было получено 10,0 мг (41%) соединения DL9 в виде белого твердого вещества. МСВР m/z (ЭРИ+): Расч.  $[M+2H]^{2+} = 685,3549$ ; Эксп.  $[M+2H]^{2+} = 685,3554$ ; Погрешность = -0,8 ppm. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 11,38 минут.

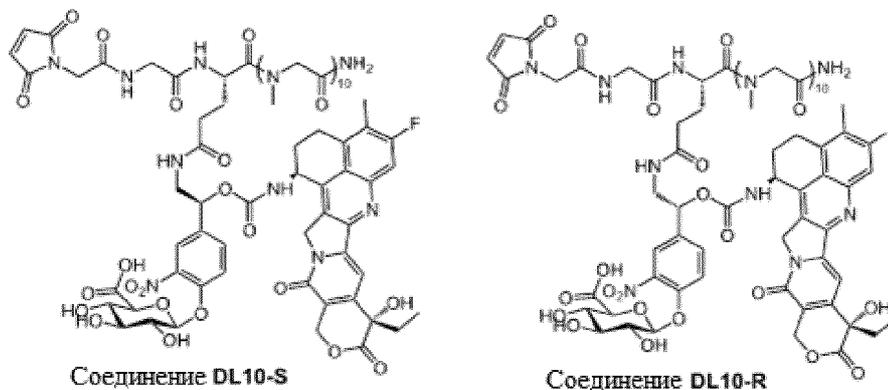
#### 1.3.1.10) Синтез соединения DL10



Соединение DL10 синтезировали, как описано выше, с помощью той же процедуры, которую использовали для соединения DL1. Исходными материалами были соединение A6 (NHS-активированный промежуточный продукт полисаркозина) и соединение B4 (NH<sub>2</sub>-нагрузка).

Было получено 54,1 мг (44% за две стадии) соединения DL10 в виде желтого твердого вещества. МСВР  $m/z$  (ЭРИ+): Расч.  $[M+2H]^{2+} = 934,8559$ ; Эксп.  $[M+2H]^{2+} = 934,8545$ ; Погрешность = 1,5 ppm. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 7,68 минут и 8,01 минут (эквимольная диастереоизомерная смесь).

#### 1.2.1.11) Синтез соединений DL10-S и DL10-R

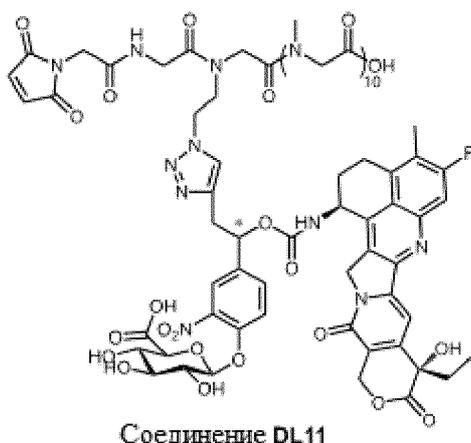


Соединения DL10-S и DL10-R синтезировали, как описано выше, с помощью той же процедуры, которую использовали для соединения DL1. Исходными материалами были, соответственно, соединения В4-S и В4-R ( $NH_2$ - нагрузка) и соединение А6 (NHS-активированный промежуточный продукт полисаркозина).

Было получено 4,7 мг соединения DL10-S в виде желтого твердого вещества. ЭРИ+  $[M+Na]^+ = 1890,7$ . Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 7,62 минут.

Было получено 4,0 мг соединения DL10-R в виде желтого твердого вещества. ЭРИ+  $[M+Na]^+ = 1890,7$ . Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 8,06 минут.

#### 1.2.1.12) Синтез соединения DL11

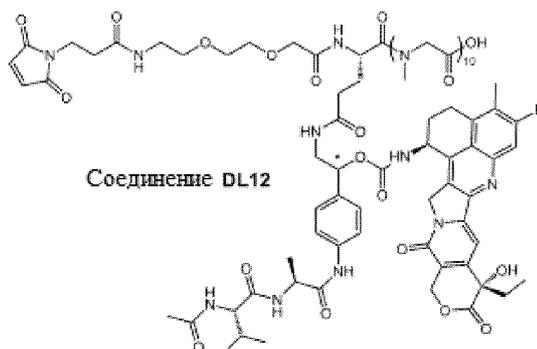


Соединение DL11 синтезировали, как описано выше, с помощью той же процедуры, которую использовали для соединения DL2. Исходными материалами были соединение А3 (промежуточный продукт азид-полисаркозин) и соединение В2 (алкин-нагрузка).

Было получено 14,3 мг (43% за две стадии) соединения DL11 в виде желтого твердого вещества. МСВР m/z (ЭРИ+): Расч.  $[M+2H]^{2+} = 947,3536$ ; Эксп.  $[M+2H]^{2+} = 947,3540$ ; Погрешность = -0,5 ppm. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 8,13 минут и 8,36 минут (эквимольная диастереоизомерная смесь).

### 1.3.2) Синтез лекарств-линкеров на основе дипептидов

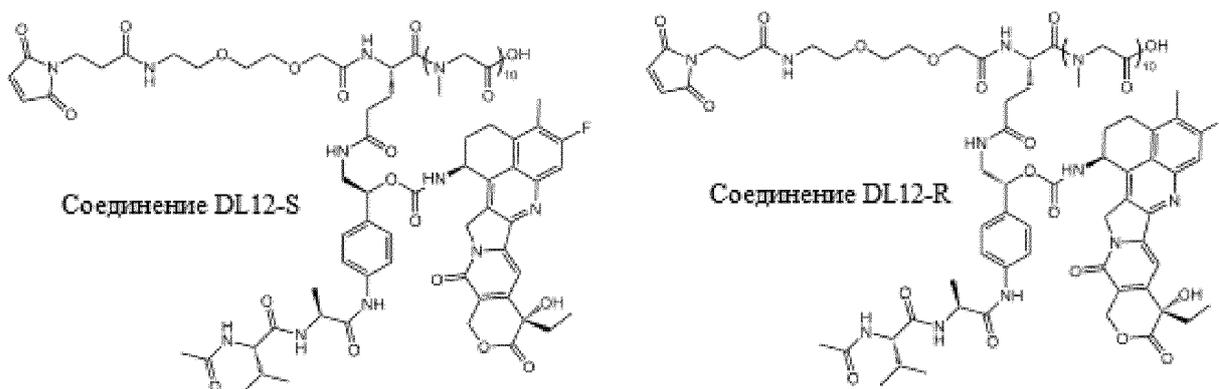
#### 1.3.2.1) Синтез соединения DL12



Соединение DL12 синтезировали, как описано выше, с помощью той же процедуры, которую использовали для соединения DL1. Исходными материалами были соединение A7 (NHS-активированный промежуточный продукт полисаркозина) и соединение B8 (NH<sub>2</sub>-нагрузка).

Было получено 34,9 мг (46% за две стадии) соединения DL12 в виде желтого твердого вещества. МСВР m/z (ЭРИ+): Расч.  $[M+2H]^{2+} = 981,4394$ ; Эксп.  $[M+2H]^{2+} = 981,4398$ ; Погрешность = -0,4 ppm. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 8,81 минут и 8,94 минут (эквимольная диастереоизомерная смесь).

#### 1.3.2.2) Синтез соединений DL12-S и DL12-R



Соединения DL12-S и DL12-R синтезировали, как описано выше, с помощью той же процедуры, которую использовали для соединения DL1. Исходными материалами были, соответственно, соединения B8-S и B8-R (NH<sub>2</sub>-нагрузка) и соединение A7 (NHS-активированный промежуточный продукт полисаркозина).

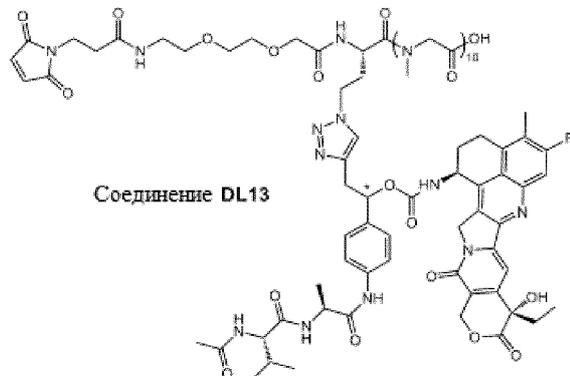
Было получено 18,1 мг соединения DL12-S в виде желтого твердого вещества.

ЭРИ+  $[M+2H]^{2+} = 981,4$ . Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 8,78 минут.

Было получено 16,3 мг соединения DL12-R в виде желтого твердого вещества.

ЭРИ+  $[M+2H]^{2+} = 981,4$ . Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 8,96 минут.

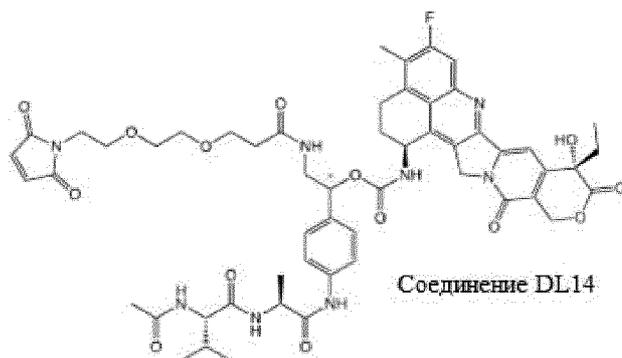
### 1.3.2.3) Синтез соединения DL13



Соединение DL13 синтезировали, как описано выше, с помощью той же процедуры, которую использовали для соединения DL2. Исходными материалами были соединение A8 (промежуточный продукт азид-полисаркозин) и соединение B6 (алкин-нагрузка).

Было получено 4,5 мг (24% за две стадии) соединения DL13 в виде желтого твердого вещества. МСВР  $m/z$  (ЭРИ+): Расч.  $[M+2H]^{2+} = 993,4451$ ; Эксп.  $[M+2H]^{2+} = 993,4416$ ; Погрешность = 3,5 ppm. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 8,88 минут и 9,11 минут (эквимольная диастереоизомерная смесь).

### 1.3.2.4) Синтез соединения DL14

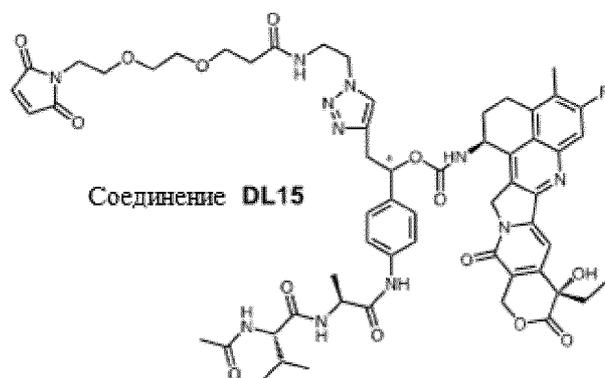


Соединение DL14 синтезировали, как описано выше, с помощью той же процедуры, которую использовали для соединения DL3. Исходными материалами были коммерческое соединение малеимид-ПЭГ<sub>2</sub>-кислота (CAS№1374666-32-6) и соединение B8 (NH<sub>2</sub>-нагрузка).

Было получено 7,0 мг (59%) соединения DL14 в виде желтого твердого вещества. МСВР  $m/z$  (ЭРИ+): Расч.  $[M+H]^+ = 1065,4364$ ; Эксп.  $[M+H]^+ = 1065,4370$ ; Погрешность = -0,5 ppm. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 10,20 минут и 10,44 минут

(эквимольная диастереоизомерная смесь).

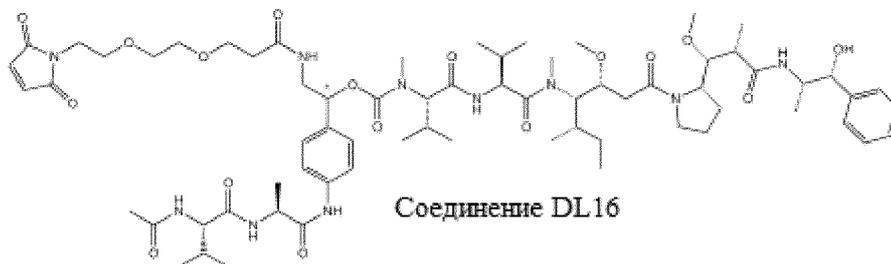
### 1.3.2.5) Синтез соединения DL15



Соединение DL15 синтезировали, как описано выше, с помощью той же процедуры, которую использовали для соединения DL8.

Было получено 3,1 мг (20% за две стадии) соединения DL15 в виде желтого твердого вещества. МСВР  $m/z$  (ЭРИ+): Расч.  $[M+H]^+$  = 1160,4848; Эксп.  $[M+H]^+$  = 1160,4854; Погрешность = -0,6 ppm. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 9,96 минут и 10,12 минут (эквимольная диастереоизомерная смесь).

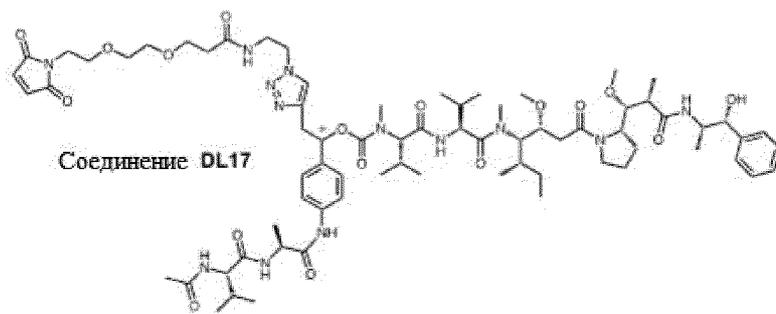
### 1.3.2.6) Синтез соединения DL16



Соединение DL16 синтезировали, как описано выше, с помощью той же процедуры, которую использовали для соединения DL3. Исходными материалами были коммерческое соединение малеимид-ПЭГ<sub>2</sub>-кислота (CAS№1374666-32-6) и соединение В7 (NH<sub>2</sub>-нагрузка).

Было получено 5,3 мг (41%) соединения DL16 в виде белого твердого вещества. МСВР  $m/z$  (ЭРИ+): Расч.  $[M+Na]^+$  = 1369,7618; Экс.  $[M+Na]^+$  = 1369,7621; Погрешность = -0,3 ppm. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 11,38 минут (эквимольная диастереоизомерная смесь).

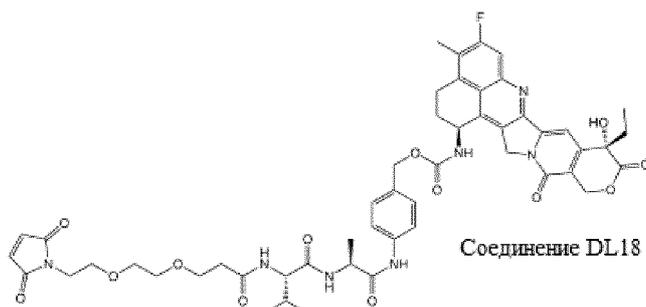
## 1.3.2.7) Синтез соединения DL17



Соединение DL17 синтезировали, как описано выше, с помощью той же процедуры, которую использовали для соединения DL8.

Было получено 8,9 мг (24% за две стадии) соединения DL17 в виде белого твердого вещества. МСВР  $m/z$  (ЭРИ+): Расч.  $[M+H]^+ = 1442,8294$ ; Эксп.  $[M+H]^+ = 1442,8284$ ; Погрешность = 0,7 ppm. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 11,81 минут (эквимольная диастереоизомерная смесь).

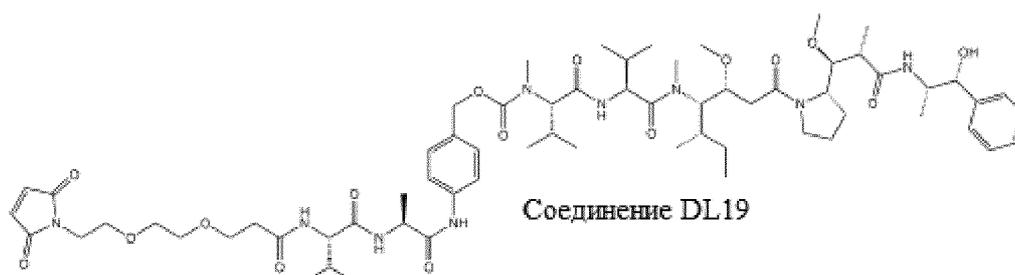
## 1.3.2.8) Синтез соединения DL18



Соединение DL18 синтезировали, как описано выше, с помощью той же процедуры, которую использовали для соединения DL3. Исходными материалами были коммерческое соединение малеимид-ПЭГ<sub>2</sub>-кислота (CAS№1374666-32-6) и соединение В10 (NH<sub>2</sub>-нагрузка).

Было получено 14,5 мг (62%) соединения DL18 в виде желтого твердого вещества. ЭРИ+  $[M+H]^+ = 994,4$ . Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 11,62 минут.

## 1.3.2.9) Синтез соединения DL19

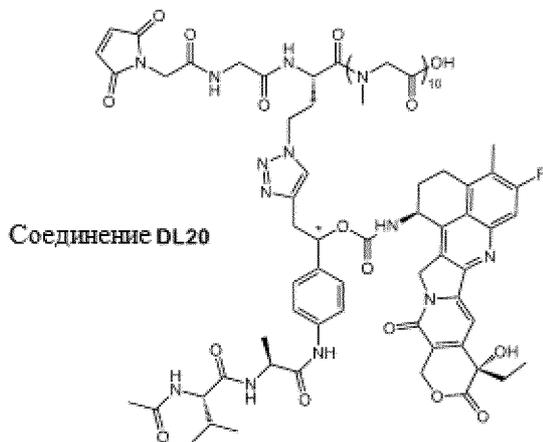


Соединение DL19 синтезировали, как описано выше, с помощью той же процедуры, которую использовали для соединения DL3. Исходными материалами были

коммерческое соединение малеимид-ПЭГ<sub>2</sub>-кислота (CAS№1374666-32-6) и соединение В9 (NH<sub>2</sub>-нагрузка).

Было получено 4,7 мг (35%) соединения DL19 в виде белого твердого вещества. МСВР m/z (ЭРИ+): Расч. [M+H]<sup>+</sup> = 1276,7439; Эксп. [M+H]<sup>+</sup> = 1276,7441; Погрешность = -0,1 ppm. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 13,28 минут.

#### 1.3.2.10) Синтез соединения DL20



Соединение DL20 синтезировали, как описано выше, с помощью той же процедуры, которую использовали для соединения DL2. Исходными материалами были соединение А3 (промежуточный продукт азид-полисаркозин) и соединение В6 (алкин-нагрузка).

Было получено 14,0 мг (36% за две стадии) соединения DL20 в виде желтого твердого вещества. ЭРИ+ [M+H]<sup>+</sup> = 1883,8. Время удерживания методом 3 ВЭЖХ = 8,82 минут и 9,07 минут (эквимольная диастереоизомерная смесь).

#### 2) Получение и характеристика конъюгатов

##### 2.1) Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство

Раствор антитела (10 мг/мл в ФБР 7,4 + 1 мм ЭДТА) обрабатывали 14 молярным эквивалентом трис(2-карбоксиил)фосфина (ТСЕР) в течение 2 часов при 37°C. В полностью восстановленном антителе производили замену буфера на 100 мМ калий-фосфатный, рН 7,4 + 1 мМ ЭДТА, путем трех циклов разбавления/центрифугирования с использованием центрифужного фильтрующего устройства Amicon 30K (Millipore). К антителу добавляли 10-12 молярных эквивалентов лекарственного линкера (из 12 мМ исходного раствора ДМСО) (остаточный ДМСО <10% об./об.) для достижения соотношения лекарственное средство-антитело (DAR), равного 8. Раствор инкубировали 30 минут при комнатной температуре. В конъюгате производили замену буфера/очищали с ФБР рН 7,4 путем четырех циклов разбавления/центрифугирования с использованием центрифужного фильтрующего устройства Amicon 30K и подвергали стерилизующей

филтрации (PES-фильтр с размером пор 0,20 мкм).

Конъюгаты, содержащие самогидролизующиеся малеимиды (малеимид-фенил и малеимид-глицин), инкубировали при 5 мг/мл в ФБР 8,0 при 37°C в течение 24 часов для обеспечения полного гидролиза сукцинимидильной части, где буфер заменяли на ФБР pH 7,4 с использованием центрифужного фильтрующего устройства Amicon 30K и подвергали стерилизующей филтрации (PES-фильтр 0,20 мкм).

Конечную концентрацию белка оценивали спектрофотометрически при 280 нм с использованием микрообъемного спектрометра Colibri (Titertek Berthold).

## 2.2) Характеристика конъюгатов

Полученные конъюгаты были охарактеризованы следующим образом:

Обращенно-фазовая жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ОФЖХ-МС):

Денатурирующий анализ RPLC-QToF проводили с использованием метода УВЭЖХ 4, описанного выше. Вкратце, конъюгаты элюировали на Agilent PLRP-S 1000Å 2,1×150 мм 8 мкм (80°C) с использованием градиента подвижной фазы вода/ацетонитрил + 0,1% муравьиной кислоты (0,4 мл/мин) и определяли с помощью масс-спектрометра Bruker Impact ПТМ Q-ToF, сканирующего диапазон 500-3500 м/z (ЭРИ+). Данные подвергали деконволюции с использованием алгоритма MaxEnt, входящего в состав программного обеспечения Bruker Compass®.

Эксклюзионная хроматография (SEC):

SEC проводили на системе ВЭЖХ Agilent 1100, имеющей объем дополнительной колонки менее 15 мкл (оснащенной короткими секциями с трубками из полиэфирэфиркетона с внутренним диаметром 0,12 мм и микрообъемной УФ-проточной ячейкой). Колонка представляла собой Agilent AdvanceBioSEC 300Å 4,6×150 мм 2,7 мкм (выдерживали при 30°C). Подвижная фаза представляла собой 100 мМ фосфата натрия и 200 мМ хлорида натрия (pH 6,8). К подвижной фазе добавляли 10% ацетонитрила (об./об.), чтобы свести к минимуму вторичные гидрофобные взаимодействия со стационарной фазой и предотвратить рост бактерий. Скорость потока составляла 0,35 мл/мин. Детекцию УФ-излучения осуществляли при длине волны 280 нм.

Хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC):

Хроматографию гидрофобного взаимодействия (HIC) проводили на системе ВЭЖХ Agilent 1100. Колонка представляла собой Tosoh TSK-GEL BUTYL-NPR 4,6×35 мм 2,5 мкм (25°C). Подвижная фаза А представляла собой 1,5М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 25 мМ фосфата калия, pH 7,0. Подвижная фаза В представляла собой 25 мМ фосфат калия, pH 7,0 + 15% изопропанола (об./об.). Линейный градиент представлял собой от 0%В до 100%В за 10 минут с последующей 3-минутной выдержкой при 100%В. Скорость потока составляла

0,75 мл/мин. Детекцию УФ-излучения осуществляли при 220 и 280 нм.

## 2.3) Обзор синтезированных конъюгатов

Конъюгаты антитело-лекарственное средство демонстрировали один LC-1d (легкая цепь с присоединенным 1 лекарством-линкером) и один HC-3d (тяжелая цепь с присоединенными 3 лекарствами-линкерами) пики поглощения на их хроматограмме денатурирующей ОФЖХ (конъюгаты DAR8). Для масс-спектрометрического анализа тяжелой цепи была указана основная гликоформа (G0F для трастузумаба).

Название конъюгата	Лекарство-линкер	Расщепляемый компонент	Лиганд	Лекарство	Ортогональный компонент, маскирующий гидрофобность	LC-1d (Да) после деконволюции	HC-3d (Да) после деконволюции	Мономерная чистота (%)
<b>Конъюгаты на основе гликозидазы</b>								
ADC101 (изобретение)	DL1	Амид-связанный глюкуронидный триггер	Собственное mAb1	Экзатекан	Полисаркозин 10	Расч.: 25885; Набл.: 25885	Расч.: 56294; Набл.: 56294	95%+
ADC102 (сравнительный)	DL2	Триазол-связанный глюкуронидный триггер	Собственное mAb1	Экзатекан	Полисаркозин 10	Расч.: 25909; Набл.: 25909	Расч.: 56366; Набл.: 56367	95%+
ADC103 (изобретение)	DL3	Амид-связанный глюкуронидный триггер	Трастузумаб	Экзатекан	Нет	Расч.: 24507; Набл.: 24506	Расч.: 53796; Набл.: 53795	95%+
ADC104 (сравнительный)	DL4	Триазол-связанный глюкуронидный триггер	Трастузумаб	Экзатекан	Нет	Расч.: 24602; Набл.: 24601	Расч.: 54081; Набл.: 54078	95%+
ADC105 (изобретение)	DL5	Амид-связанный глюкуронидный триггер	Трастузумаб	ММАЕ	Полисаркозин 12	Расч.: 25750; Набл.: 25750	Расч.: 57527; Набл.: 57527	95%+
ADC106 (сравнительный)	DL6	Триазол-связанный глюкуронидный триггер	Трастузумаб	ММАЕ	Полисаркозин 12	Расч.: 25774; Набл.: 25775	Расч.: 57599; Набл.: 57601	95%+
ADC107 (изобретение)	DL7	Амид-связанный глюкуронидный триггер	Трастузумаб	ММАЕ	Нет	Расч.: 24797; Набл.: 24796	Расч.: 54667; Набл.: 54666	95%+
ADC108 (сравнительный)	DL8	Триазол-связанный глюкуронидный триггер	Трастузумаб	ММАЕ	Нет	Расч.: 24892; Набл.: 24891	Расч.: 54952; Набл.: 54952	95%+
ADC109 (сравнительный)	DL9	Амид-связанный глюкуронидный триггер (амид,	Трастузумаб	ММАЕ	Нет	Расч.: 24809; Набл.: 24808	Расч.: 54703; Набл.: 54702	95%+

		напрямую связанный (фенилом) с						
ADC110 (изобретение)	DL10	Амид-связанный глюкуронидный триггер	Трастузумаб	Экзатекан	Полисаркозин 10	Расч.: 25326; Набл.: 25326	Расч.: 56255; Набл.: 56253	95%+
ADC110-S (изобретение)	DL10- S	Амид-связанный глюкуронидный триггер	Трастузумаб	Экзатекан	Полисаркозин 10	Расч.: 25326; Набл.: 25326	Расч.: 56255; Набл.: 56255	95%+
ADC110-R (изобретение)	DL10- R	Амид-связанный глюкуронидный триггер	Трастузумаб	Экзатекан	Полисаркозин 10	Расч.: 25326; Набл.: 25326	Расч.: 56255; Набл.: 56254	95%+
ADC111 (изобретение)	DL10	Амид-связанный глюкуронидный триггер	Собственное mAb1	Экзатекан	Полисаркозин 10	Расч.: 25885; Набл.: 25885	Расч.: 56294; Набл.: 56294	95%+
ADC111-S (изобретение)	DL10- S	Амид-связанный глюкуронидный триггер	Собственное mAb1	Экзатекан	Полисаркозин 10	Расч.: 25885; Набл.: 25885	Расч.: 56294; Набл.: 56293	95%+
ADC111-R (изобретение)	DL10- R	Амид-связанный глюкуронидный триггер	Собственное mAb1	Экзатекан	Полисаркозин 10	Расч.: 25885; Набл.: 25885	Расч.: 56294; Набл.: 56292	95%+
ADC112 (изобретение)	DL11	Триазол-связанный глюкуронидный триггер	Трастузумаб	Экзатекан	Полисаркозин 10	Расч.: 25351; Набл.: 25350	Расч.: 56330; Набл.: 56328	95%+
<b>Конъюгаты на основе дипептидазы</b>								
ADC201 (изобретение)	DL12	Амид-связанный дипептидный триггер	Трастузумаб	Экзатекан	Полисаркозин 10	Расч.: 25401; Набл.: 25401	Расч.: 56479; Набл.: 56480	95%+
ADC202 (сравнительный)	DL13	Триазол-связанный дипептидный триггер	Трастузумаб	Экзатекан	Полисаркозин 10	Расч.: 25425; Набл.: 25425	Расч.: 56552; Набл.: 56552	95%+
ADC203 (изобретение)	DL14	Амид-связанный дипептидный триггер	Собственное mAb2	Экзатекан	Нет	Расч.: 25333; Набл.: 25333	Расч.: 53629; Набл.: 53629	95%+
ADC204 (сравнительный)	DL15	Триазол-связанный дипептидный триггер	Собственное mAb2	Экзатекан	Нет	Расч.: 25428; Набл.: 25427	Расч.: 53914; Набл.: 53914	95%+
ADC205 (изобретение)	DL16	Амид-связанный дипептидный триггер	Трастузумаб	ММАЕ	Нет	Расч.: 24787; Набл.: 24786	Расч.: 54637; Набл.: 54636	95%+

ADC206 (сравнительный)	DL17	Триазол-связанный дипептидный триггер	Трастузумаб	ММАЕ	Нет	Расч.: 24882; Набл.: 24882	Расч.: 54922; Набл.: 54922	95%+
ADC207 (изобретение)	DL14	Амид-связанный дипептидный триггер	Трастузумаб	Экзатекан	Нет	Расч.: 24505; Набл.: 24504	Расч.: 53790; Набл.: 53788	95%+
ADC208 (сравнительный)	DL18	Обычный линейный дипептидный пара- аминобензиловый спейсер	Трастузумаб	Экзатекан	Нет	Расч.: 24434; Набл.: 24433	Расч.: 53577; Набл.: 53576	71,2% (агрегированный)
ADC209 (сравнительный)	DL19	Обычный линейный дипептидный пара- аминобензиловый спейсер	Трастузумаб	ММАЕ	Нет	Расч.: 24716; Набл.: 24716	Расч.: 54424; Набл.: 54423	95%+ но асимметричный хвостовой пик = высокая гидрофобность ADC
ADC210 (сравнительный)	DL20	Триазол-связанный дипептидный триггер	Трастузумаб	Экзатекан	Полисаркозин 10	Расч.: 25341; Набл.: 25341	Расч.: 56300; Набл.: 56299	95%+

3) Профили хроматографии гидрофобного взаимодействия (НІС) конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC)

Кажущуюся гидрофобность конъюгатов оценивали методом хроматографии гидрофобного взаимодействия (НІС) на колонке TSK-GEL BUTYL-NPR, следуя методу, описанному в разделе 2.

Результаты показаны на фиг. 1 для лекарств-линкеров на основе гликозидазы по настоящему изобретению (структура октопамина) и на фиг. 2 для лекарств-линкеров на основе дипептидазы по настоящему изобретению (структура 2-амино-1-(4-аминофенил)этан-1-ола). Конъюгаты по настоящему изобретению систематически были более гидрофильными (более короткое время удерживания на хроматограмме НІС) по сравнению с известными соответствующими структурами. Этот эффект наблюдается при использовании лекарств-линкеров на основе гликозидазы и лекарств-линкеров на основе дипептидазы. Этот эффект наблюдается в присутствии или при отсутствии маскирующего гидрофобность компонента полисаркозина в структуре лекарств-линкеров. Этот эффект наблюдается при использовании лекарственных нагрузок различной природы и с различными уровнями внутренней гидрофобности.

4) Анализы цитотоксичности *in vitro* конъюгатов на основе лекарств-линкеров из настоящего изобретения и конъюгатов на основе лекарств-линкеров известных структур

Цитотоксичность конъюгатов *in vitro* оценивали на нескольких антиген-позитивных линиях раковых клеток. Клетки высевали в 96-луночные планшеты с соответствующей плотностью в зависимости от клеточной линии (от 1000 до 10 000 клеток на лунку в 100 мкл соответствующей питательной среды) и инкубировали при 37°C в течение 24 часов. Добавляли серийные разведения тестируемого соединения, предварительно растворенного в питательной среде (50 мкл), и проводили инкубацию при 37°C в течение 72 часов для конъюгатов на основе ММАЕ и 144 часов для конъюгатов на основе экзатекана. В лунки добавляли МТТ (5 мг/мл, 20 мкл, Sigma-Aldrich), и инкубацию продолжали в течение 1-2 часов при 37°C. Затем питательную среду осторожно удаляли, а содержимое лунки гомогенно растворяли подкисленным изопропанолом. Значения поглощения измеряли на ридере для микропланшетов Multiskan™ Sky (Thermo Scientific) с использованием длины волны 570 нм (при эталонной длине волны 690 нм). Значения концентрации IC<sub>50</sub> по сравнению с необработанными контрольными клетками определяли с помощью построения кривой зависимости доза-ингибирование (GraphPad Prism 9).

Результаты показаны на фиг. 3 для конъюгатов на основе чувствительных к гликозидазе лекарств-линкеров и на фиг. 4 для конъюгатов на основе чувствительных к дипептидазе лекарств-линкеров. Конъюгаты по настоящему изобретению (структуры

октопамина и 2-амино-1-(4-аминофенил)этан-1-ола) систематически проявляли сходные эффективности при сравнении с известными соответствующими структурами.

5) Анализы цитотоксичности *in vitro* конъюгатов на основе лекарства-линкера DL10 (эквимольярной диастереоизомерной смеси) по настоящему изобретению, стереоопределенного лекарства-линкера DL10-S по настоящему изобретению и стереоопределенного лекарства-линкера DL10-R по настоящему изобретению

Цитотоксичность конъюгатов *in vitro* оценивали на нескольких антиген-позитивных линиях раковых клеток в соответствии с протоколом эксперимента, описанным выше в разделе 4).

Результаты показаны на фиг. 5. Не наблюдалось различий в активности *in vitro* между стереочистыми лекарствами-линкерами и эквимольярной диастереоизомерной смесью одного и того же лекарства-линкера.

6) Фармакокинетический профиль (общая концентрация конъюгата антитело-лекарственное средство в зависимости от времени) у крыс после однократного внутривенного введения конъюгата в дозе 3 мг/кг

ADC вводили в дозе 3 мг/кг самкам крыс Спрег-Дули (возраст 4-6 недель — Charles River) через хвостовую вену (три животных в группе, распределенные случайным образом). Кровь отбирали в цитратные пробирки с помощью ретроорбитального кровопускания в различные моменты времени, перерабатывали в плазму и хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения анализа. Концентрацию ADC оценивали с помощью набора для ИФА IgG человека (Stemcell™ Technologies) в соответствии с протоколом производителя. Для количественной оценки использовали стандартные кривые соответствующего моноклонального антитела. Параметры фармакокинетики (клиренс, период полувыведения и AUC) рассчитывали методом двухкомпонентного анализа с использованием программного обеспечения Microsoft® Excel®, включающего функции ФК (надстройка, разработанная Usansky et al., Департамент фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств, Allergan, Ирвин, США).

Результаты показаны на фиг. 6 (профили ФК) и фиг. 7 (параметры ФК) для конъюгатов на основе чувствительных к гликозидазе лекарств-линкеров и на фиг. 8 (профили ФК) и фиг. 9 (параметры ФК) для конъюгатов на основе чувствительных к дипептидазе лекарств-линкеров. Конъюгаты по настоящему изобретению (структуры октопамина и 2-амино-1-(4-аминофенил)этан-1-ола) систематически давали улучшенные фармакокинетические профили и фармакокинетические параметры (улучшенная экспозиция, увеличенный период полувыведения и сниженная скорость клиренса) по сравнению с известными соответствующими структурами.

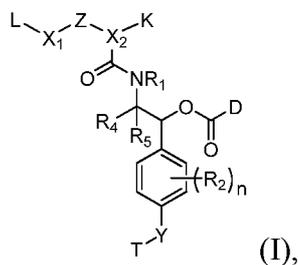
7) Объем опухоли ( $\text{мм}^3$ ) в зависимости от времени на модели ксенотрансплантата рака желудка NCI-N87 HER2+ при однократном внутривенном введении 1 мг/кг конъюгата ADC110 (октопаминовая структура по изобретению с глюкуронидом-экзатекановой нагрузкой) и конъюгата ADC112 (триазольная структура с глюкуронидом-экзатекановой нагрузкой)

Клетки рака желудка NCI-N87 были имплантированы подкожно самкам мышей SCID (возраст 4 недели). ADC вводили однократно внутривенно в подкожной дозе 1 мг/кг, когда опухоли увеличивались приблизительно до  $150 \text{ мм}^3$  (по 6 животных на группу, назначенных для минимизации различий в исходных объемах опухоли между группами). Объем опухоли измеряли каждые 3-5 дней с помощью штангенциркуля и рассчитывали по формуле  $(L \times W^2)/2$ . Мышей умерщвляли, когда объем опухоли превышал  $1000 \text{ мм}^3$ .

Результаты показаны на фиг. 10. Конъюгат ADC110, основанный на октопаминовой структуре по изобретению, продемонстрировал улучшенную активность *in vivo* по сравнению с конъюгатом ADC112, основанным на триазольной структуре. У всех получавших лечение мышей не наблюдалось существенной потери массы тела.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение - конъюгат лиганд-лекарственное средство (LDC), имеющее следующую формулу I)



где

L представляет собой лиганд;

X1 представляет собой соединительную единицу;

Z представляет собой необязательный спейсер;

X2 представляет собой соединительную единицу;

K представляет собой необязательный компонент, маскирующий гидрофобность, предпочтительно выбранный из полисаркозина и полиэтиленгликоля;

R1 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации;

указанный алкила и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR'', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

D представляет собой активный агент, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из лекарственных средств, агентов для визуализации и флуорофоров;

каждый R2 независимо выбран из группы, состоящей из электроноакцепторных групп и C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкила;

n составляет 0, 1 или 2;

R4 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)- и -NR''-;

R5 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)- и -NR''-;

T представляет собой сахарную расщепляемую единицу или полипептидную

расщепляемую единицу;

Y представляет собой O, когда T является сахарной расщепляемой единицей, или NR<sub>3</sub>, когда T является полипептидной расщепляемой единицей;

R<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанный алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

R'' и R''' независимо выбраны из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

и его фармацевтически приемлемые соли.

2. Соединение LDC по п. 1, в котором L представляет собой лиганд, выбранный из группы, состоящей из полипептидов, белков, антител и фрагментов антител, предпочтительно L представляет собой антитело.

3. Соединение LDC по п. 1 или п. 2, в котором D выбран из группы, состоящей из лекарственных средств, предпочтительно D является противоопухолевым лекарственным средством или иммуномодулятором.

4. Соединение LDC по любому из предыдущих пунктов, в котором X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> независимо выбраны из группы, состоящей из одной или нескольких аминокислот, одной или нескольких N-замещенных аминокислот, при необходимости замещенного полиэфира, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкилена, арилена, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкилена, гетероциклоалкилена, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, гетероарилена, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкенилена, и любой их комбинации,

указанные алкилен и алкенилен при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола,

и указанные алкилен, арилен, циклоалкилен, гетероциклоалкилен, гетероарилен и алкенилен при необходимости замещены одним или несколькими заместителями, выбранными из галогена, оксо, -OH, -NO<sub>2</sub>, -CN, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> циклоалкила, гетероциклила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси,

C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> галоалкил, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> галоалкокси, -(CO)-R', -O-(CO)-R', -(CO)-O-R', -(CO)-NR''R''', -NR''-(CO)-R' и -NR''R''';

R', R'' и R''' независимо выбраны из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила.

5. Соединение LDC по любому из предыдущих пунктов, в котором Z независимо выбран из группы, состоящей из одной или нескольких аминокислот, одной или нескольких N-замещенных аминокислот, при необходимости замещенного полиэфира, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкилена, арилена, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкилена, гетероциклоалкилена, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, гетероарилена, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкенилена и любой их комбинации,

указанные алкилен и алкенилен при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола,

и указанные алкилен, арилен, циклоалкилен, гетероциклоалкилен, гетероарилен и алкенилен при необходимости замещены одним или несколькими заместителями, выбранными из галогена, оксо, -OH, -NO<sub>2</sub>, -CN, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> циклоалкила, гетероциклила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> галоалкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> галоалкокси, -(CO)-R', -O-(CO)-R', -(CO)-O-R', -(CO)-NR''R''', -NR''-(CO)-R' и -NR''R''';

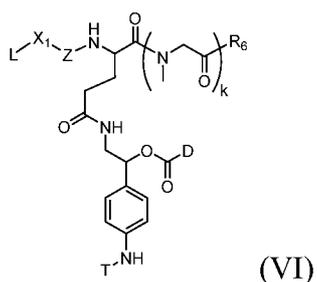
R', R'' и R''' независимо выбраны из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила.

6. Соединение LDC по любому из предыдущих пунктов, где K представляет собой полисаркозин.

7. Соединение LDC по любому из предыдущих пунктов, где T представляет собой сахарную расщепляемую единицу, которая представляет собой глюкуроид.

8. Соединение LDC по любому из пп. 1-6, где T представляет собой дипептид, предпочтительно выбранный из Val-Cit, Val-Ala и Phe-Lys.

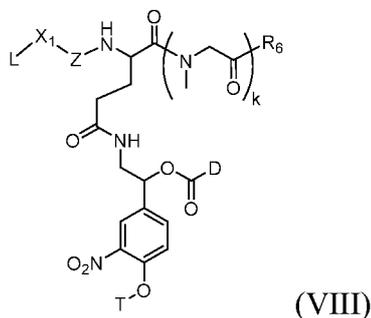
9. Соединение LDC по любому из пп. 1-6, представляющее собой соединение формулы (VI):



где k представляет собой целое число от 2 до 50, предпочтительно от 4 до 30; а T

представляет собой полипептидную расщепляемую единицу, предпочтительно дипептид.

10. Соединение LDC по любому из пп. 1-6, представляющее собой соединение формулы (VIII)

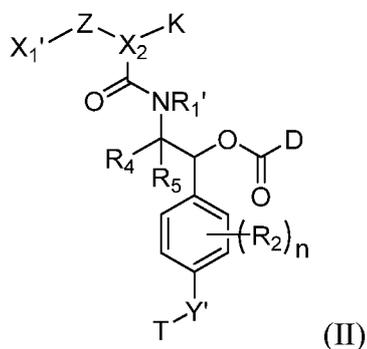


где k представляет собой целое число от 2 до 50, предпочтительно от 4 до 30; а T представляет собой сахарную расщепляемую единицу, предпочтительно глюкуронид или галактозид.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение LDC по любому из предыдущих пунктов, и фармацевтически приемлемый носитель.

12. Соединение LDC по любому из пп. 1-10 для применения в качестве лекарственного средства.

13. Промежуточное соединение формулы (II):



где

X1' представляет собой группу, которая может вступать в реакцию с лигандом с образованием соединительной единицы;

Z представляет собой необязательный спейсер;

X2 представляет собой соединительную единицу;

K представляет собой необязательный компонент, маскирующий гидрофобность, предпочтительно выбранный из полисаркозина и полиэтиленгликоля;

R1' выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их

комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

D представляет собой активный агент, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из лекарственных средств, агентов для визуализации и флуорофоров;

каждый R2 независимо выбран из группы, состоящей из электроноакцепторных групп и C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкила;

n составляет 0, 1 или 2;

R4 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, и -NR''-;

R5 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)- и NR''-;

T представляет собой сахарную расщепляемую единицу или полипептидную расщепляемую единицу;

Y' представляет собой O, когда T является сахарной расщепляемой единицей, или NR3', когда T является полипептидной расщепляемой единицей;

R3' выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

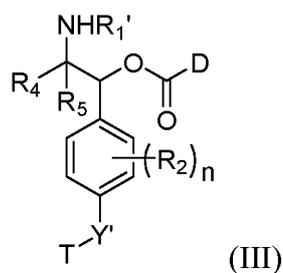
указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

R'' и R''' независимо выбраны из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

и его фармацевтически приемлемые соли.

14. Промежуточное соединение формулы (II) по п. 11, где K представляет собой полисаркозин.

15. Промежуточное соединение формулы (III)



где

R1' выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

D представляет собой активный агент, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из лекарственных средств, агентов для визуализации и флуорофоров;

каждый R2 независимо выбран из группы, состоящей из электроноакцепторных групп и C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкила;

n составляет 0, 1 или 2;

R4 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, и -NR''-;

R5 выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из O-, -S-, -C(O)-, и -NR''-;

T представляет собой сахарную расщепляемую единицу или полипептидную расщепляемую единицу;

Y' представляет собой O, когда T является сахарной расщепляемой единицей, или NR3', когда T является полипептидной расщепляемой единицей;

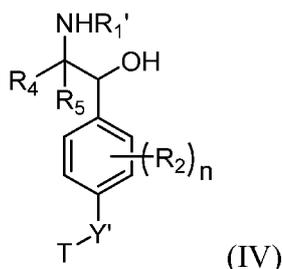
R3' выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

R'' и R''' независимо выбраны из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;

и его фармацевтически приемлемые соли.

16. Промежуточное соединение формулы (IV)



где

R1' выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H, C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub> алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

каждый R2 независимо выбран из группы, состоящей из электроноакцепторных групп и C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкила;

n составляет 0, 1 или 2;

R4 представляет собой H;

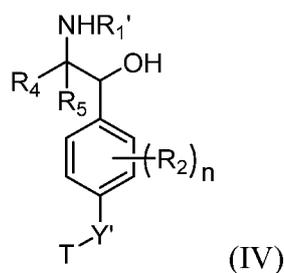
R5 представляет собой H;

T представляет собой сахарную расщепляемую единицу;

Y' представляет собой O;

и его фармацевтически приемлемые соли.

17. Промежуточное соединение формулы (IV)



где

$R_1'$  выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H,  $C_1$ - $C_{24}$  алкила,  $C_2$ - $C_6$  алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов,  $C_3$ - $C_8$  циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

каждый  $R_2$  независимо выбран из группы, состоящей из электроноакцепторных групп;

$n$  составляет 0, 1 или 2;

$R_4$  выбран из группы, состоящей из H,  $C_1$ - $C_6$  алкила и  $C_2$ - $C_6$  алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)- и -NR''-;

$R_5$  выбран из группы, состоящей из H,  $C_1$ - $C_6$  алкила и  $C_2$ - $C_6$  алкенила, причем указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)- и -NR''-;

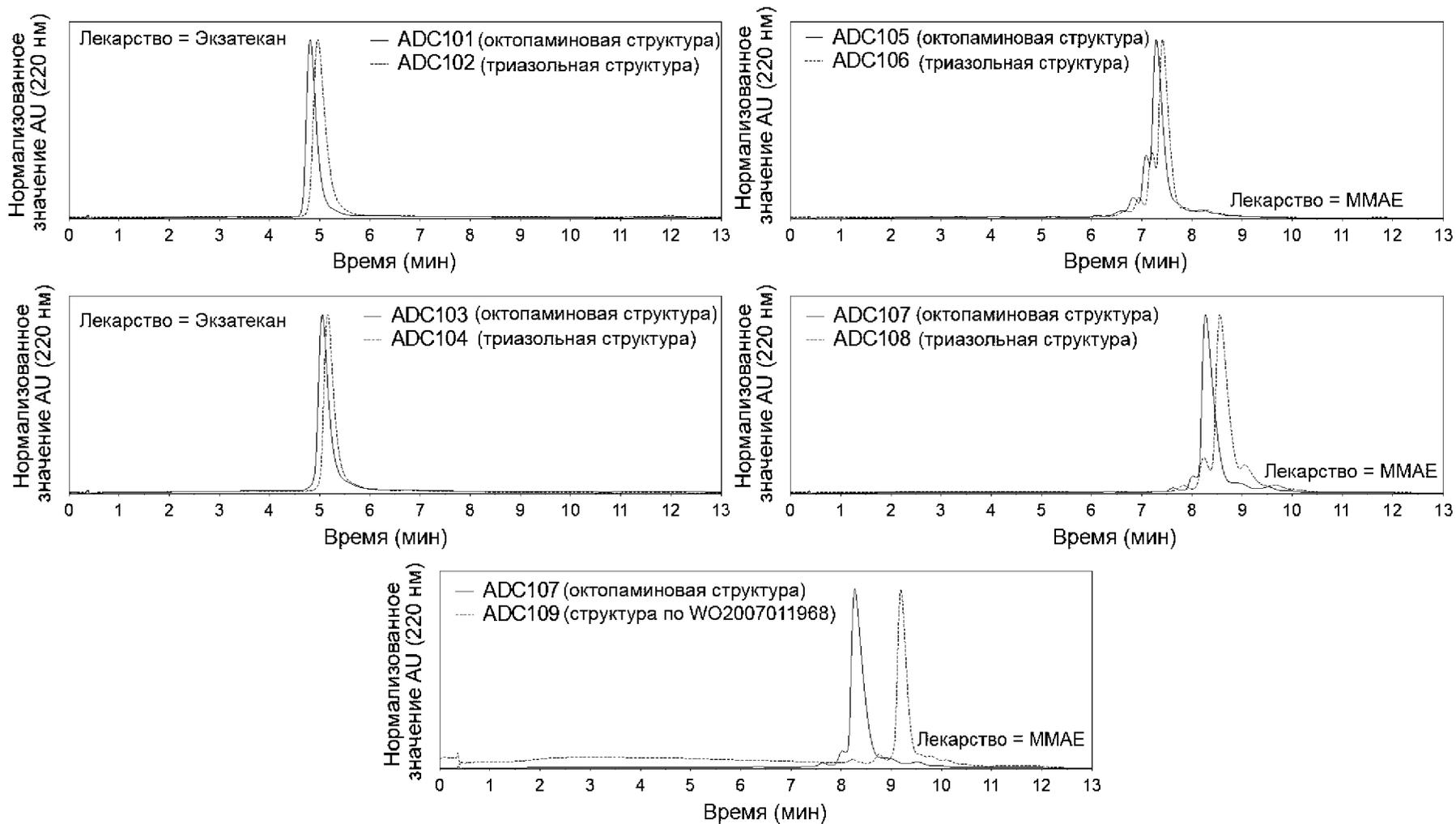
$Y'$  представляет собой NR3';

T представляет собой полипептидную расщепляемую единицу;

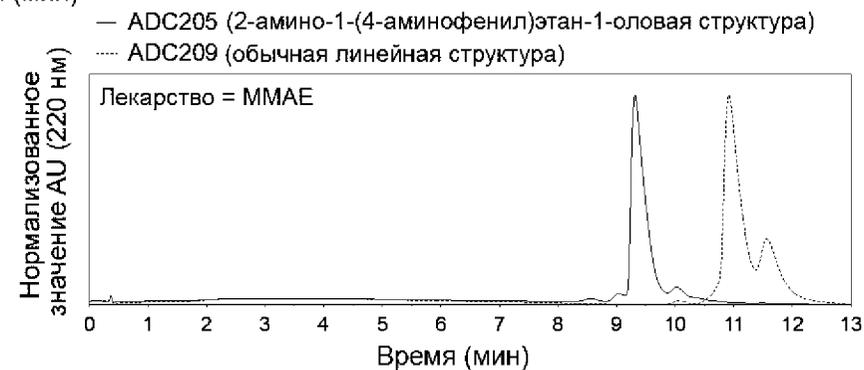
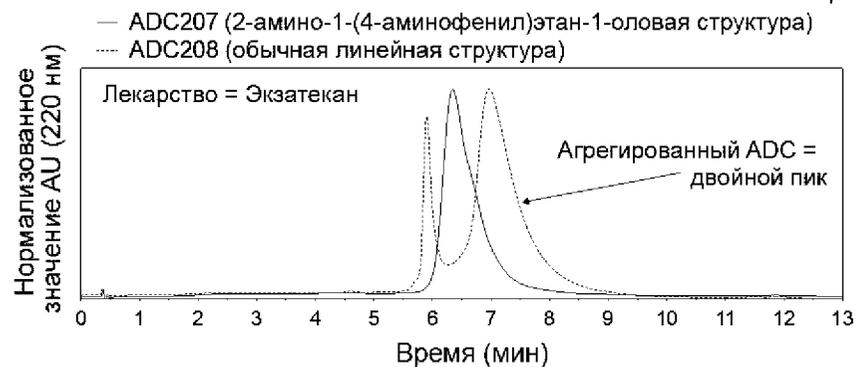
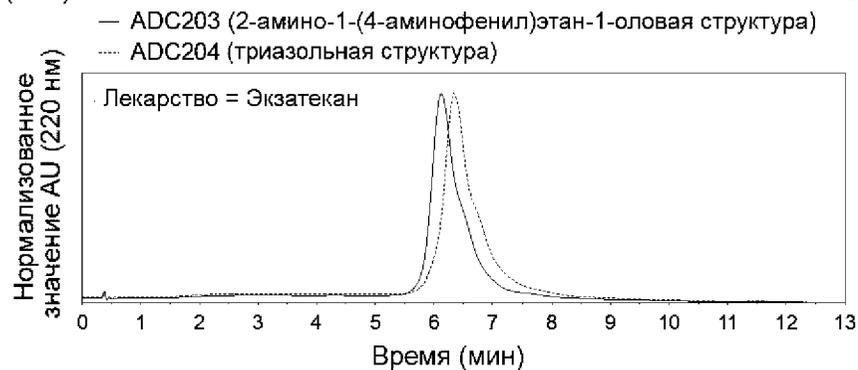
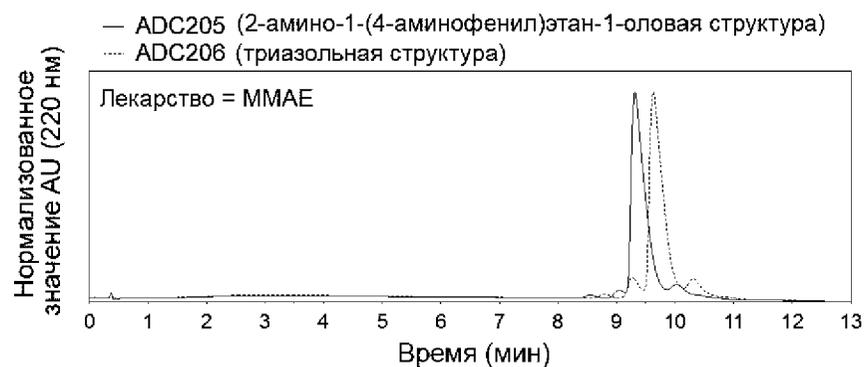
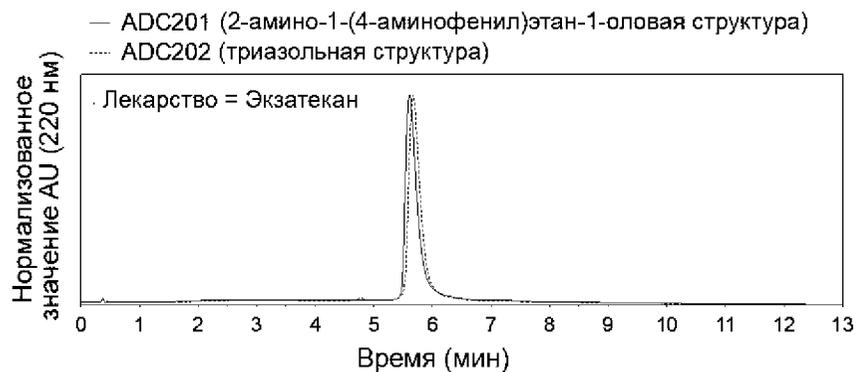
$R_3'$  выбран из группы, состоящей из amino защитных групп, H,  $C_1$ - $C_{24}$  алкила,  $C_2$ - $C_6$  алкенила; при необходимости замещенного полиэфира, арила, имеющего от 6 до 10 кольцевых атомов,  $C_3$ - $C_8$  циклоалкила, гетероциклоалкила, имеющего от 3 до 10 кольцевых атомов, гетероарила, имеющего от 5 до 10 кольцевых атомов, и любой их комбинации,

указанные алкил и алкенил при необходимости разделяются одним или несколькими гетероатомами или химическими группами, выбранными из -O-, -S-, -C(O)-, -NR'', -C(O)NR'', -NR''-C(O)-, -NR''-C(O)-NR''', -NR''-C(O)-O-, -O-C(O)NR''- и триазола;

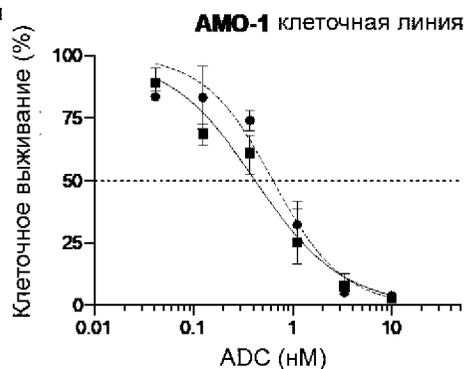
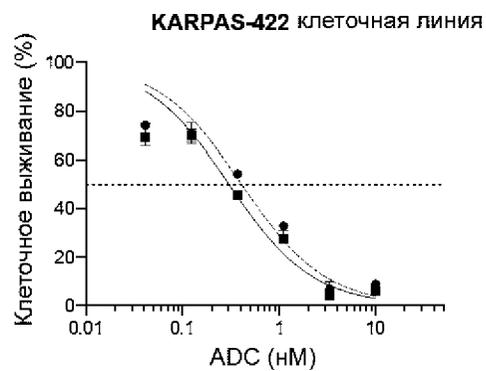
R'' и R''' независимо выбраны из H и C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила;  
и его фармацевтически приемлемые соли.



ФИГ. 1 (заменяющий лист)

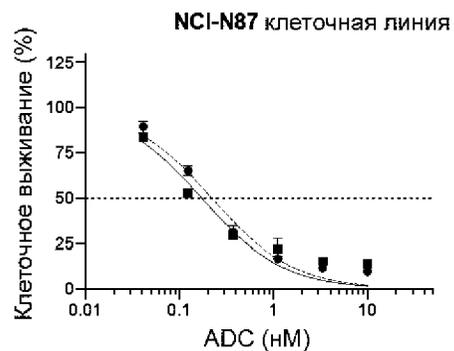
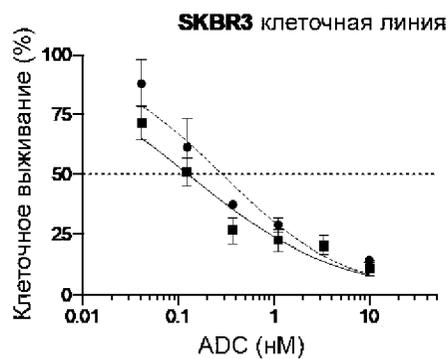


ФИГ. 2 (заменяющий лист)



- ADC101 (октопаминовая структура)
- ADC102 (триазольная структура)

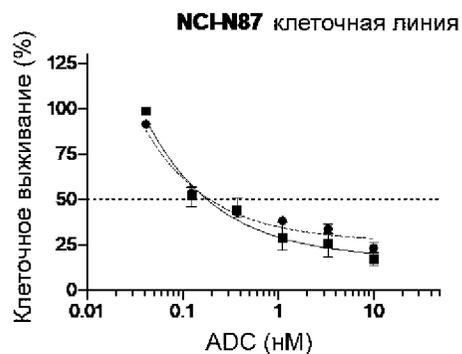
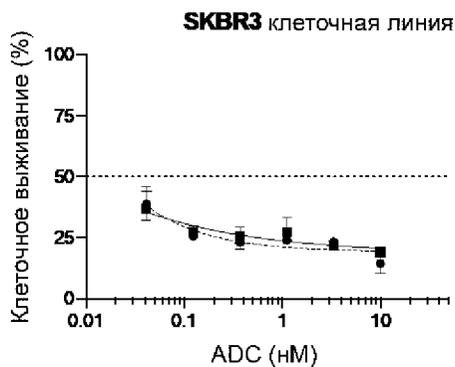
IC <sub>50</sub> (нМ)	KARPAS S-422	AMO-1
ADC101	0.3	0.42
ADC102	0.4	0.62



- ADC103 (октопаминовая структура)
- ADC104 (триазольная структура)

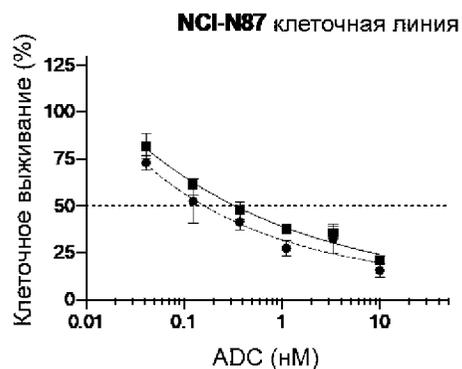
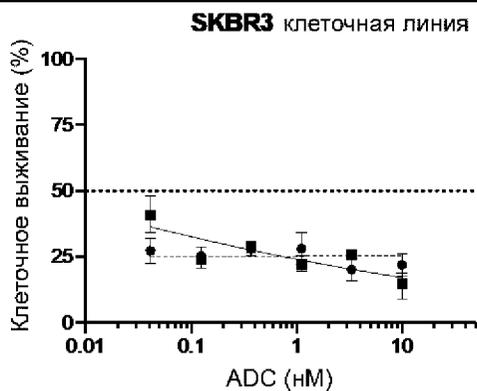
IC <sub>50</sub> (нМ)	SKBR3	NCI-N87
ADC103	0.13	0.17
ADC104	0.29	0.22

Фиг. 3



- ADC105 (октопаминовая структура)
- ADC106 (триазольная структура)

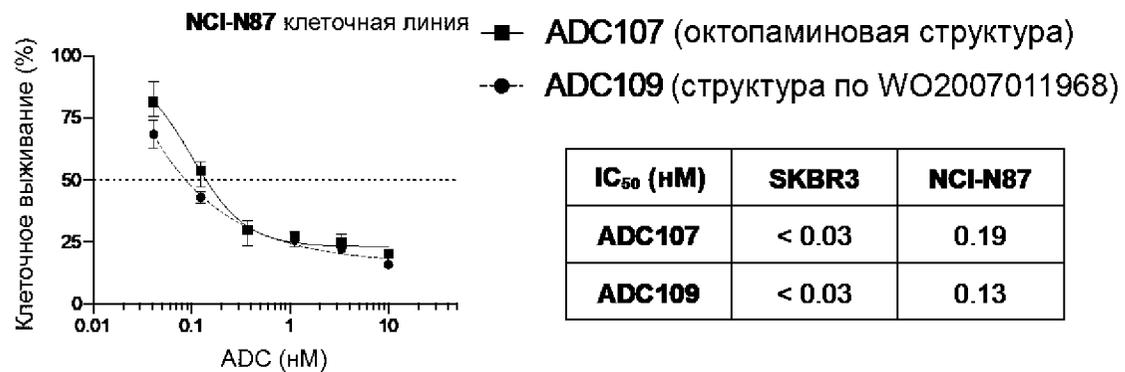
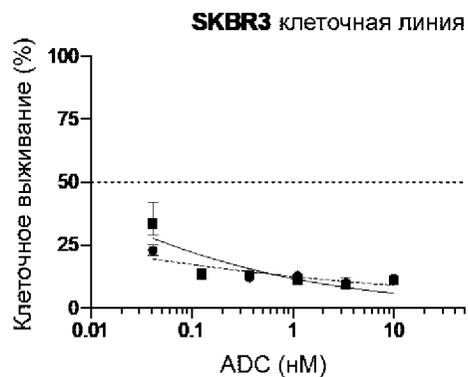
IC <sub>50</sub> (нМ)	SKBR3	NCI-N87
<b>ADC105</b>	< 0.03	0.26
<b>ADC106</b>	< 0.03	0.32



- ADC107 (октопаминовая структура)
- ADC108 (триазольная структура)

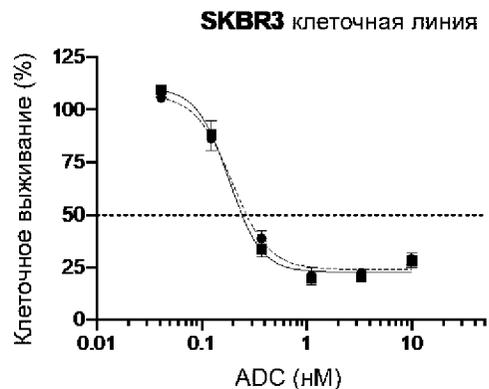
IC <sub>50</sub> (нМ)	SKBR3	NCI-N87
<b>ADC107</b>	< 0.03	0.38
<b>ADC108</b>	< 0.03	0.21

Фиг. 3 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

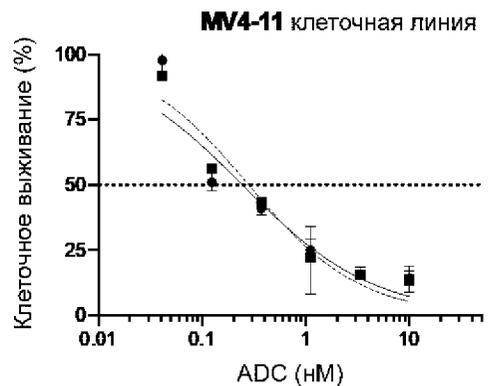


IC <sub>50</sub> (нМ)	SKBR3	NCI-N87
ADC107	< 0.03	0.19
ADC109	< 0.03	0.13

Фиг. 3 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

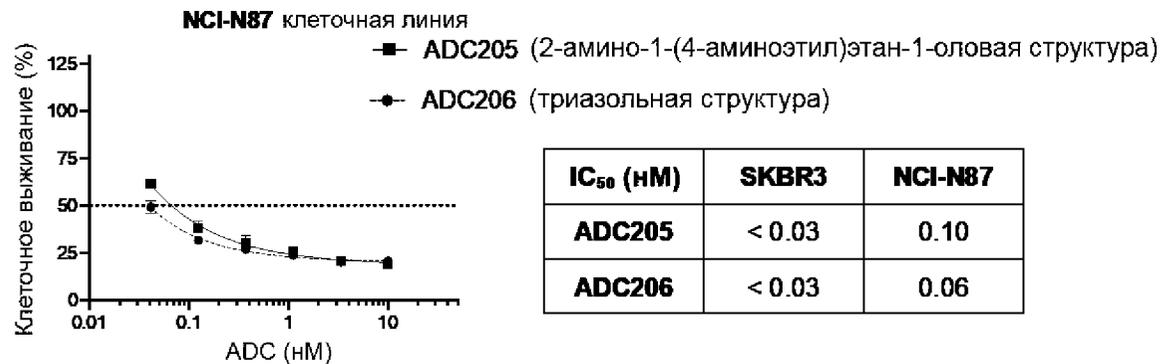
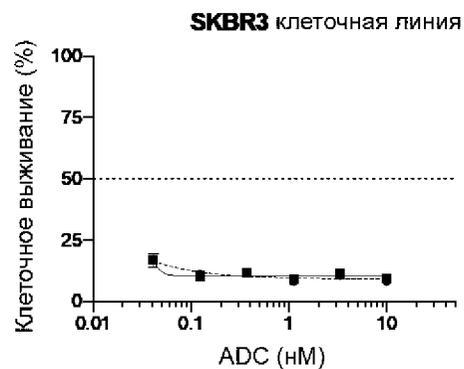


IC <sub>50</sub> (нМ)	SKBR3	NCI-N87
ADC201	0.34	0.22
ADC202	0.41	0.16

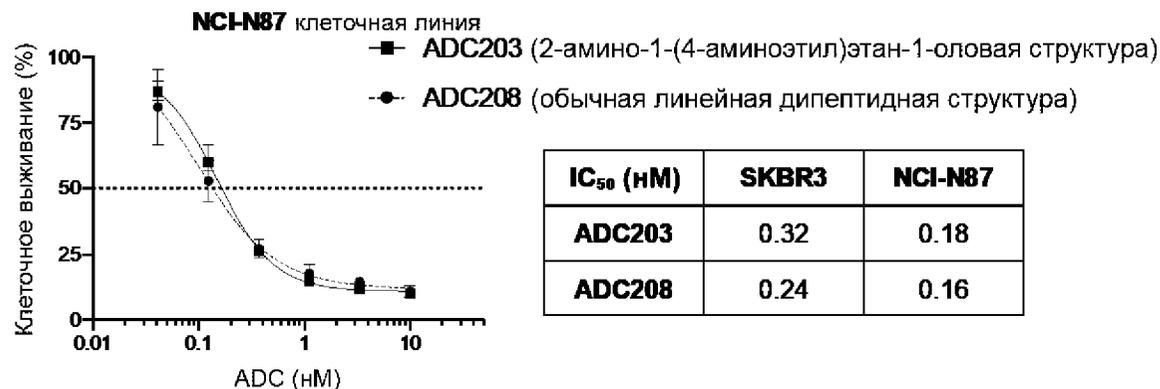
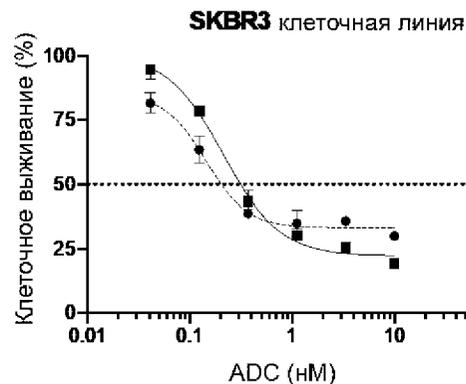


IC <sub>50</sub> (нМ)	MV4-11	MOLM-13
ADC203	0.27	0.05
ADC204	0.27	0.07

Фиг. 4

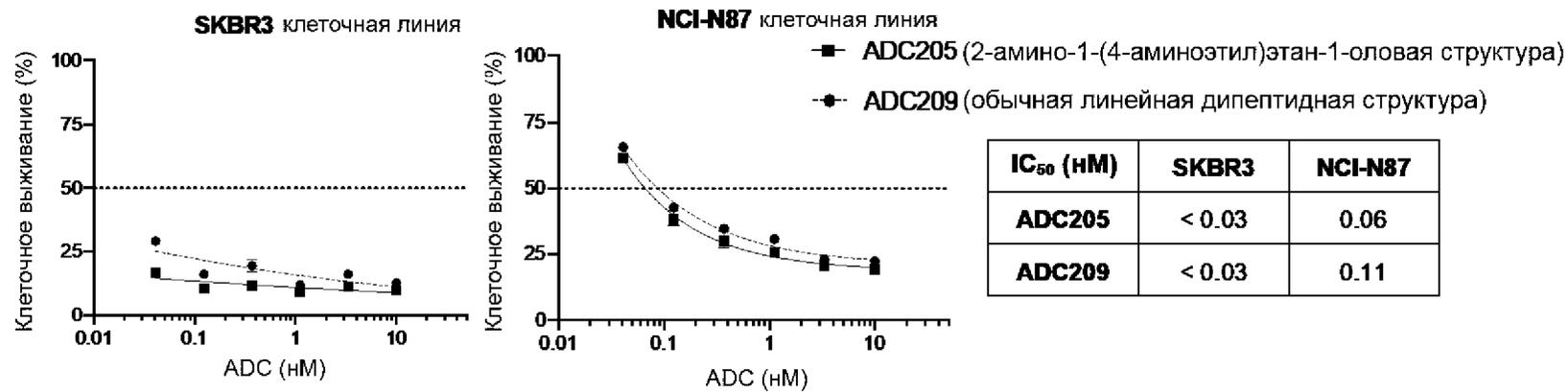


IC <sub>50</sub> (нМ)	SKBR3	NCI-N87
<b>ADC205</b>	< 0.03	0.10
<b>ADC206</b>	< 0.03	0.06

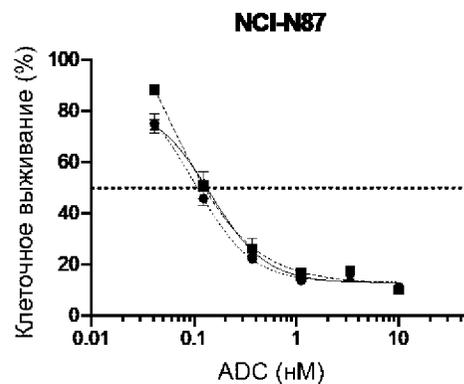
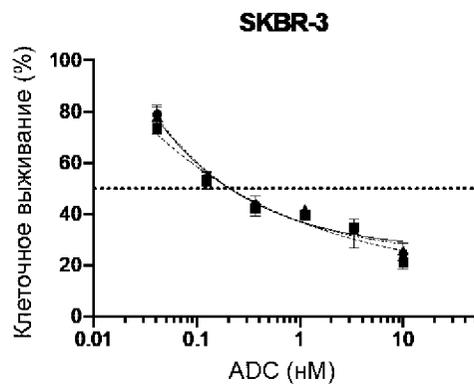


IC <sub>50</sub> (нМ)	SKBR3	NCI-N87
<b>ADC203</b>	0.32	0.18
<b>ADC208</b>	0.24	0.16

ФИГ. 4 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

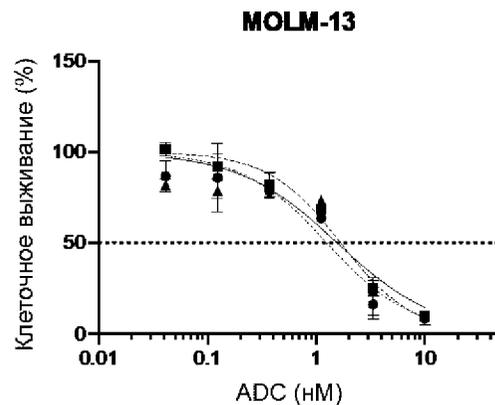
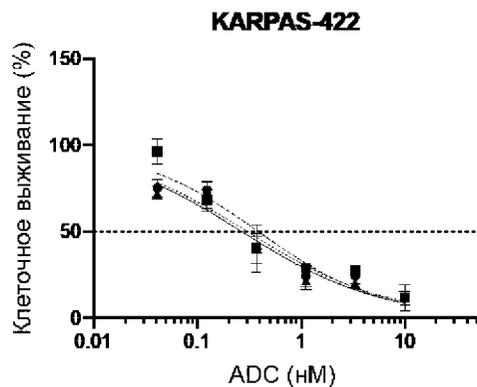


Фиг. 4 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



■ ADC110  
 ▲ ADC110-S  
 ● ADC110-R

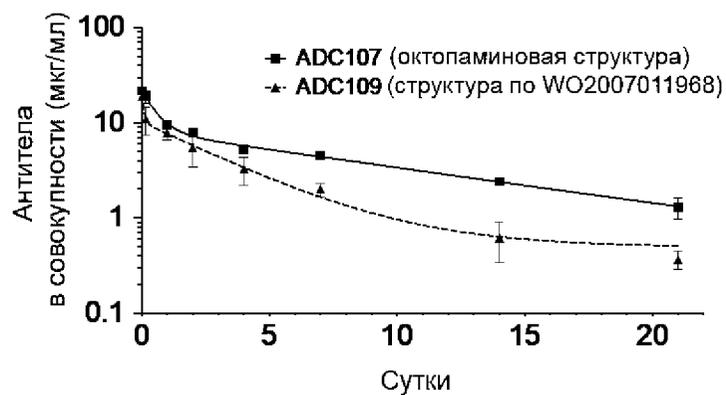
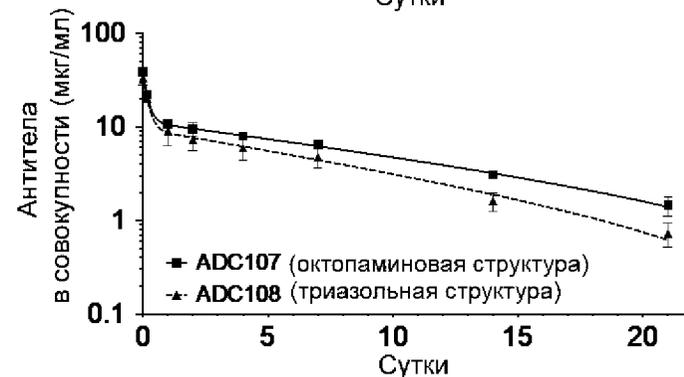
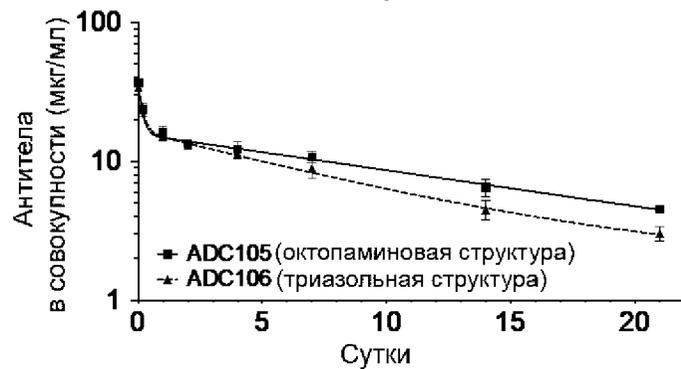
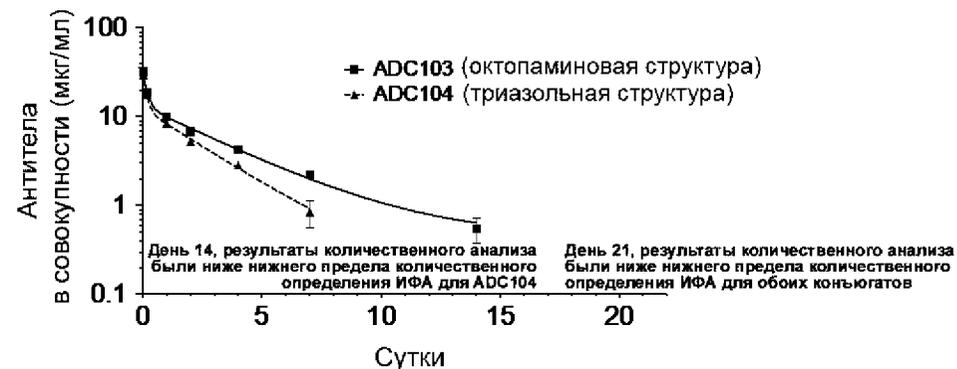
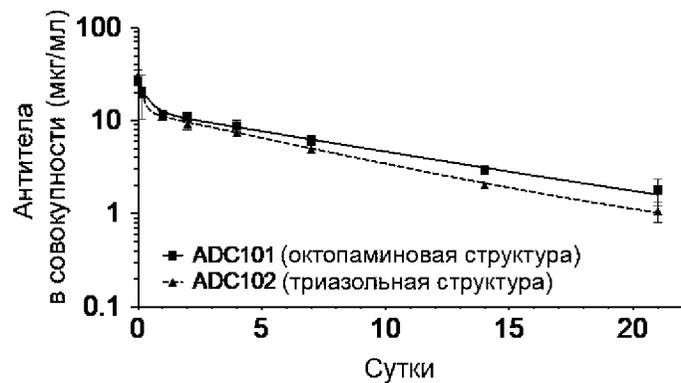
IC <sub>50</sub> (nM)	SKBR-3	NCI-N87
ADC110	0.31	0.16
ADC110-S	0.31	0.13
ADC110-R	0.33	0.12



■ ADC111  
 ▲ ADC111-S  
 ● ADC111-R

IC <sub>50</sub> (nM)	KARPAS-422	MOLM-13
ADC111	0.37	1.66
ADC111-S	0.27	1.55
ADC111-R	0.30	1.26

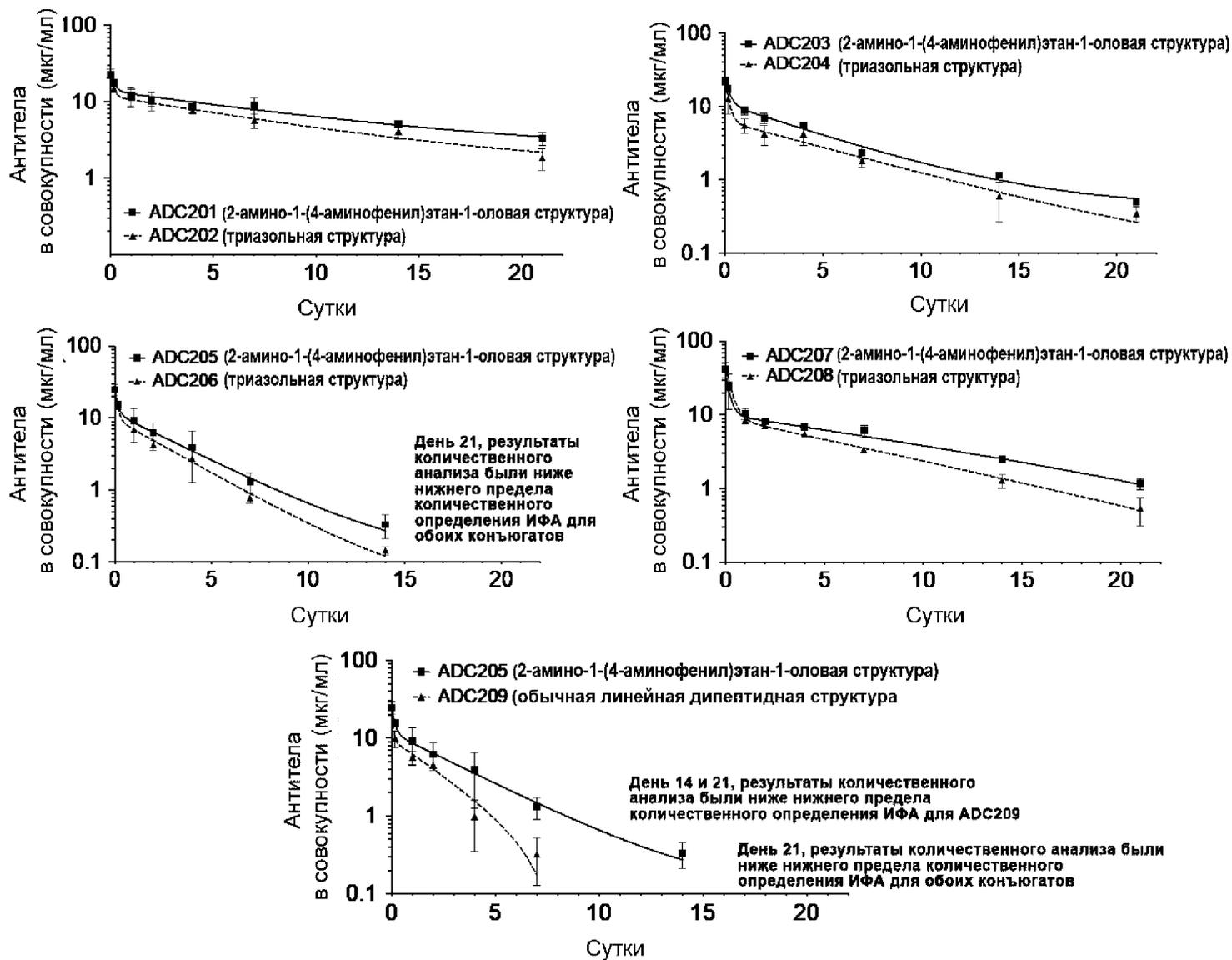
Фиг. 5



Фиг. 6

<b>ADC#</b>	<b>Клиренс (мл/сутки/кг)</b>	<b>AUC<sub>0-inf</sub> (сутки x мкМ)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (сутки)</b>
ADC101	25.0	419	7.2
ADC102	33.2	315	5.8
ADC103	72.1	145	3.2
ADC104	131.7	79	1.9
ADC105	12.1	865	11.3
ADC106	16.8	625	8.5
ADC107	26.5	396	7.0
ADC108	40.5	258	5.5
ADC107	30.1	347	7.2
ADC109	77.8	135	4.6

Фиг. 7

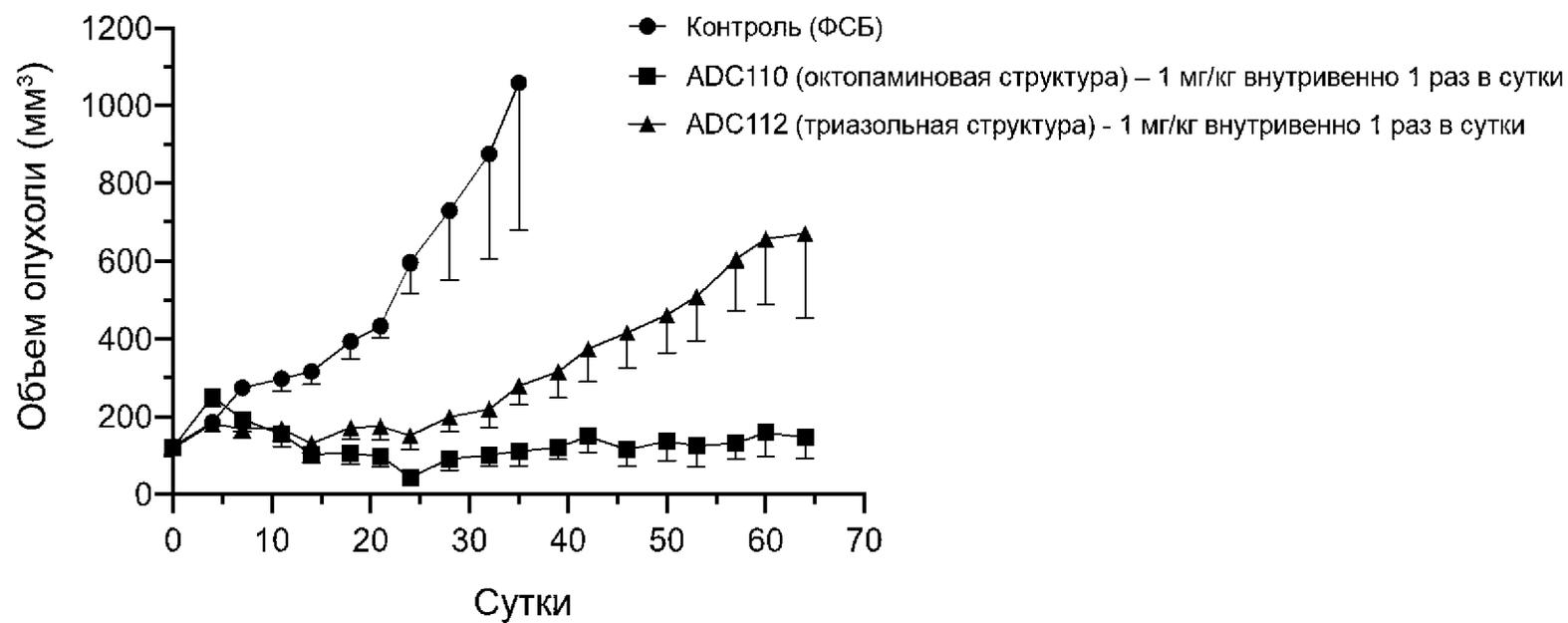


ФИГ. 8

<b>ADC#</b>	<b>Клиренс (мл/сутки/кг)</b>	<b>AUC<sub>0-inf</sub> (сутки x мкМ)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (сутки)</b>
ADC201	15.8	662	11.2
ADC202	24.0	437	8.1
ADC203	55.7	188	4.9
ADC204	81.8	128	4.8
ADC205	91.4	115	2.7
ADC206	137.8	76	2.3
ADC207	30.5	343	6.5
ADC208	49.3	213	5.0
ADC209	226	46.3	1.4

Фиг. 9

### NCI-N87 HER2+ модель опухоли желудка



Фиг. 10