

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046016**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2024.01.31

(21) Номер заявки

202192554

(22) Дата подачи заявки

2020.03.23

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)*A61P 35/00* (2006.01)*C07D 491/22* (2006.01)*C07K 5/06* (2006.01)*C07K 5/08* (2006.01)*C07K 5/10* (2006.01)(54) **СОЕДИНЕНИЯ И КОНЬЮГАТЫ НА ИХ ОСНОВЕ**

(31) 62/826393; 62/964177

(32) 2019.03.29; 2020.01.22

(33) US

(43) 2021.12.22

(86) PCT/EP2020/057984

(87) WO 2020/200880 2020.10.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:

Говард Филип Уилсон, Дикинсон  
Найэлл, Кайо Таис, Мастерсон Люк,  
Гаундри Уилльям (GB)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,  
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(56) SUGIMORI M. ET AL.: "Synthesis and Antitumor Activity of Ring A- and F-Modified Hexacyclic Camptothecin Analogues", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 41, no. 13, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 2308-2318, XP002239569, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/JM970765Q, cited in the application, compound 34, abstract, table 1

(57) Изобретение относится к соединению, которое представляет собой 1-(3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-N-(((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-3,6,9,12,15,18,21,24-октаксагептакозан-27-амид, к содержащему это соединение конъюгату формулы IV



или его фармацевтически приемлемой соли, где L представляет собой антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела, а DL представляет собой звено лекарственное средство-линкер, как оно определено в формуле изобретения. Также изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей указанный конъюгат, и к их применению для лечения рака у субъекта.

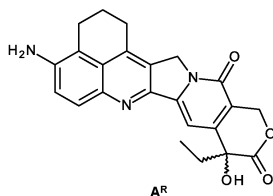
**B1****046016****046016 B1**

Настоящее изобретение относится к нацеливающимся конъюгатам, содержащим специфический ингибитор топоизомеразы, и соединениям, применимым в их синтезе, а также к высвобождаемому поражающему элементу.

### Предпосылки изобретения Ингибиторы топоизомеразы

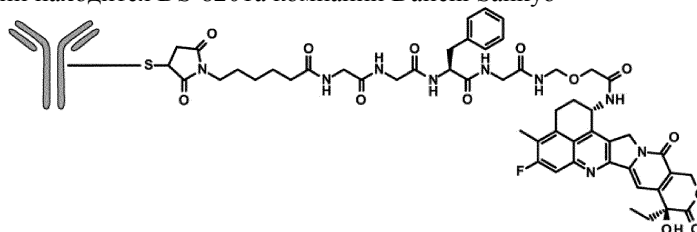
Ингибиторы топоизомеразы представляют собой химические соединения, которые блокируют действие топоизомеразы (топоизомеразы I и II), которая представляет собой тип фермента, который контролирует изменения в структуре ДНК посредством катализа разрыва и восстановления фосфодиэфирного остова нитей ДНК в ходе нормального клеточного цикла.

Следующее соединение:

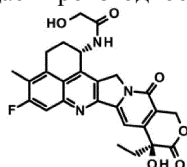


в рацемической форме было раскрыто в EP 0296597 (пример 63). Оно также раскрыто (как соединение 34 в рацемической форме) в Sugimori, M., et al., J Med Chem, 1998, 41, 2308-2318 (DOI: 10.1021/jm970765q), где его биологическая активность рассматривается наряду с биологической активностью ряда родственных соединений.

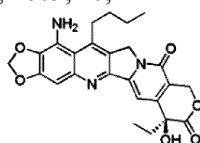
Различные ингибиторы топоизомеразы, такие как производные иринотекана и эксатекана и доксорубин, были включены в состав конъюгатов антитело-лекарственное средство. Например, на стадии клинических испытаний находится DS-8201a компании Daiichi Sankyo



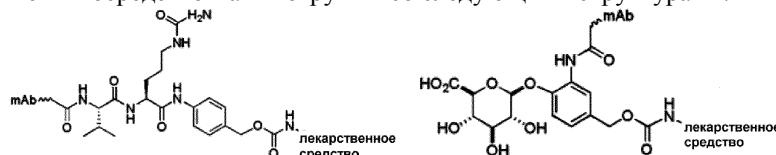
где антитело представляет собой Her2 (Takegawa, N., et al., Int J Cancer, 2017, 141, 1682-1689 (DOI: 10.1002/ijc.30870)). Данный ADC высвобождает производное эксатекана:



В Burke, P.J., et al., Bioconjugate Chem., 2009, 20, 1242-1250 раскрыты конъюгаты:

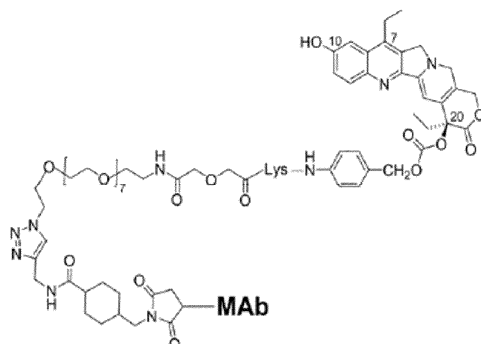


которые соединены посредством аминогруппы со следующими структурами:



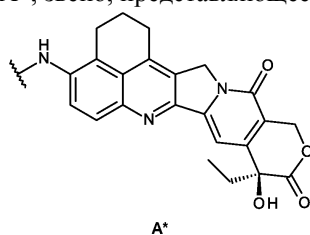
которые содержат группу ПАВС (пара-аминобензилоксикарбонил).

На стадии клинических испытаний находится сацитумаб говитекан (IMMU-132) компании Immunomedics (Cardillo, T.M., et al., Bioconjugate Chem, 2015, 26(5), 919-931, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00223)



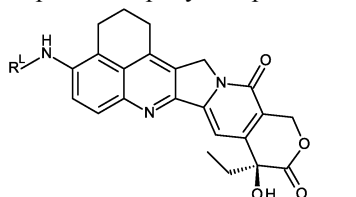
### Краткое описание изобретения

В общем аспекте настоящее изобретение предусматривает конъюгат, содержащий следующее производное ингибитора топоизомеразы (A\*, звено, представляющее собой лекарственное средство):

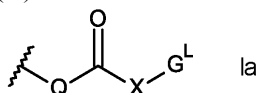


с линкером для присоединения звена, представляющего собой лиганд, где линкер присоединен посредством расщепляемой связи к аминокислотному остатку. Звено, представляющее собой лиганд, предпочтительно представляет собой антитело. Настоящее изобретение также предусматривает A\* с присоединенным связывающим звеном и промежуточные соединения для их синтеза, а также высвобождаемый поражающий элемент.

В первом аспекте настоящего изобретения предусмотрено соединение формулы I

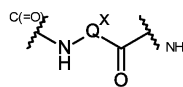


и его соли и сольваты, где R<sup>L</sup> представляет собой линкер для присоединения к звену, представляющему собой лиганд, которое выбрано из (ia):

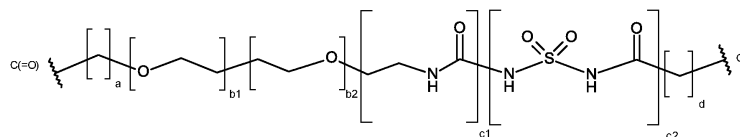


где

Q представляет собой



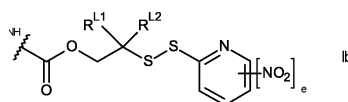
где Q<sup>X</sup> является таким, что Q представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток, трипептидный остаток или тетрапептидный остаток; X представляет собой



где a равняется 0-5, b<sub>1</sub> равняется 0-16, b<sub>2</sub> равняется 0-16, c<sub>1</sub> равняется 0 или 1, c<sub>2</sub> равняется 0 или 1, d равняется 0-5, где по меньшей мере b<sub>1</sub> или b<sub>2</sub> равняется 0 (т.е. только один из b<sub>1</sub> и b<sub>2</sub> может не равняться 0), и по меньшей мере c<sub>1</sub> или c<sub>2</sub> равняется 0 (т.е. только один из c<sub>1</sub> и c<sub>2</sub> может не равняться 0);

G<sup>L</sup> представляет собой линкер для присоединения к звену, представляющему собой лиганд;

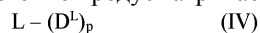
(ib):



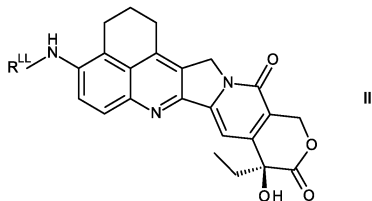
где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и  $e$  равняется 0 или 1.

Во втором аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ получения соединения по первому аспекту настоящего изобретения, включающий по меньшей мере одну из стадий способа, изложенных ниже.

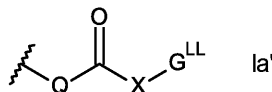
В третьем аспекте настоящее изобретение предусматривает конъюгаты формулы IV:



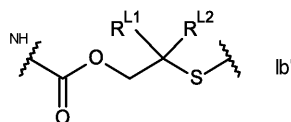
или их фармацевтически приемлемую соль или сольват, где L представляет собой звено, представляющее собой лиганд (т.е. нацеливающееся средство),  $D^L$  представляет собой звено лекарственное средство-линкер, представленное формулой III:



$R^{LL}$  представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд, выбранному из (ia'):



где Q и X являются такими, как определено в первом аспекте, и  $G^{LL}$  представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд; и (ib'):



где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  являются такими, как определено в первом аспекте; и p представляет собой целое число от 1 до 20.

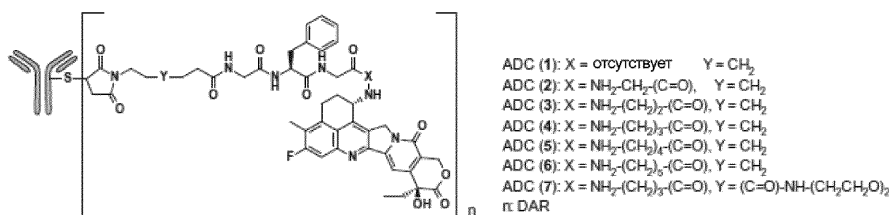
Соответственно, конъюгаты содержат звено, представляющее собой лиганд, ковалентно связанное с по меньшей мере одним звеном, представляющим собой лекарственное средство ( $A^*$ ), посредством звена, представляющего собой линкер (т.е. звено, представляющее собой лиганд, с присоединенными одним или несколькими звеньями лекарственное средство-линкер). Звено, представляющее собой лиганд, более полно описанное ниже, представляет собой нацеливающееся средство, которое связывается с целевым фрагментом. Звено, представляющее собой лиганд, может, например, специфически связываться с клеточным компонентом (средство, связывающееся с клеткой) или с другими целевыми молекулами, представляющими интерес. Соответственно, настоящее изобретение также предусматривает способы лечения, например, различных видов рака и аутоиммунного заболевания. Данные способы охватывают применение конъюгатов, где звено, представляющее собой лиганд, представляет собой нацеливающееся средство, которое специфически связывается с целевой молекулой. Звено, представляющее собой лиганд, может представлять собой, например, белок, полипептид или пептид, такой как антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, или другое связывающее средство, такое как белок, слитый с Fc.

Нагрузка лекарственным средством представлена p, числом звеньев, представляющих собой лекарственное средство, приходящимся на звено, представляющее собой лиганд (например антитело). Нагрузка лекарственным средством может находиться в диапазоне от 1 до 20 звеньев, представляющих собой лекарственное средство (D), на звено, представляющее собой лиганд (например Ab или mAb). В случае композиций p представляет собой среднее значение нагрузки лекарственным средством для конъюгатов в композиции, и p находится в диапазоне от 1 до 20.

В четвертом аспекте настоящего изобретения предусмотрено применение конъюгата по третьему аспекту настоящего изобретения в изготовлении лекарственного препарата для лечения пролиферативного заболевания. В четвертом аспекте также предусмотрен конъюгат по третьему аспекту настоящего изобретения для применения в лечении пролиферативного заболевания.

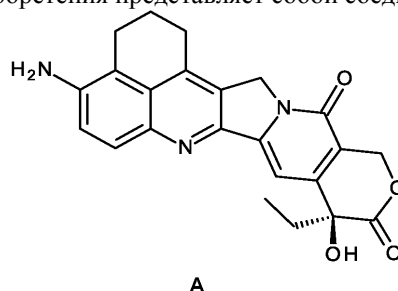
Специалист в данной области техники сможет легко определить способно или не способно кандидатное соединение лечить пролиферативное состояние в отношении любого определенного типа клеток. Например, анализы, которые могут успешно использоваться для оценки активности, обеспечиваемой определенным соединением, описаны в примерах ниже.

В Nakada, et al., Bioorg Med Chem Lett, 26(2016), 1542-1545 (DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.02.020) рассматриваются серии ADC:



и сделан вывод о том, что снижение цитотоксичности ADC (1) и (2) может быть обусловлено стерическим затруднением высвобождаемого фрагмента, представляющего собой лекарственное средство, в сайте, подвергающемся действию ферментов, осуществляющих деградацию, в опухолевых клетках. Данный документ объясняет важность расположения пептидной группы на расстоянии от крупного высвобождаемого фрагмента, представляющего собой лекарственное средство. Напротив, в настоящем изобретении пептидная группа присоединена непосредственно к крупному высвобождаемому фрагменту, представляющему собой лекарственное средство.

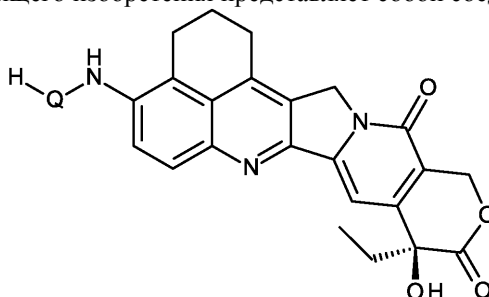
Пятый аспект настоящего изобретения представляет собой соединение А:



А

в виде отдельного энантиомера или в энантиомерно обогащенной форме.

Шестой аспект настоящего изобретения представляет собой соединение формулы VI:



VI

где Q является таким, как определено в первом аспекте.

#### Определения

C<sub>5-6</sub>арилен: используемый в данном документе термин "C<sub>5-6</sub>арилен" относится к двухвалентному фрагменту, полученному посредством удаления двух атомов водорода от атома ароматического кольца ароматического соединения.

В данном контексте префиксы (например C<sub>5-6</sub>) обозначают количество атомов кольца или диапазон значений количества атомов кольца, будь то атомы углерода или гетероатомы.

Все атомы кольца могут представлять собой атомы углерода, как в "карбоариленовых группах", в таком случае группа представляет собой фенилен (C<sub>6</sub>).

В качестве альтернативы, атомы кольца могут включать один или несколько гетероатомов, как в "гетероариленовых группах". Примеры гетероариленовых групп включают без ограничения группы, полученные из:

N<sub>1</sub>: пиррола (азола) (C<sub>5</sub>), пиридина (азина) (C<sub>6</sub>);

O<sub>1</sub>: фурана (оксола) (C<sub>5</sub>);

S<sub>1</sub>: тиюфена (тиола) (C<sub>5</sub>);

N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>: оксазола (C<sub>5</sub>), изоксазола (C<sub>5</sub>), изоксазина (C<sub>6</sub>);

N<sub>2</sub>O<sub>1</sub>: оксадиазола (фуразана) (C<sub>5</sub>);

N<sub>3</sub>O<sub>1</sub>: оксатриазола (C<sub>5</sub>);

N<sub>1</sub>S<sub>1</sub>: тиазола (C<sub>5</sub>), изотиазола (C<sub>5</sub>);

N<sub>2</sub>: имидазола (1,3-диазола) (C<sub>5</sub>), пиразола (1,2-диазола) (C<sub>5</sub>), пиридазина (1,2-диазина) (C<sub>6</sub>), пиридина (1,3-диазина) (C<sub>6</sub>) (например, цитозина, тимина, урацила), пиразина (1,4-диазина) (C<sub>6</sub>); и

N<sub>3</sub>: триазола (C<sub>5</sub>), триазина (C<sub>6</sub>).

C<sub>1-4</sub>алкил: Используемый в данном документе термин "C<sub>1-4</sub>алкил" относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством удаления атома водорода от атома углерода углеводородного соединения, содержащего от 1 до 4 атомов углерода, который может быть алифатическим или алициклическим.

ским, и который может быть насыщенным или ненасыщенным (например, частично ненасыщенным, полностью ненасыщенным). Используемый в данном документе термин "C<sub>1-n</sub>-алкил" относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством удаления атома водорода от атома углерода углеводородного соединения, содержащего от 1 до n атомов углерода, который может быть алифатическим или алициклическим, и который может быть насыщенным или ненасыщенным (например, частично ненасыщенным, полностью ненасыщенным). Таким образом, термин "алкил" включает подклассы алкенил, алкинил, циклоалкил и т.д., рассмотренные ниже.

Примеры насыщенных алкильных групп включают без ограничения метил (C<sub>1</sub>), этил (C<sub>2</sub>), пропил (C<sub>3</sub>) и бутил (C<sub>4</sub>).

Примеры насыщенных линейных алкильных групп включают без ограничения метил (C<sub>1</sub>), этил (C<sub>2</sub>), n-пропил (C<sub>3</sub>) и n-бутил (C<sub>4</sub>).

Примеры насыщенных разветвленных алкильных групп включают изопропил (C<sub>3</sub>), изобутил (C<sub>4</sub>), втор-бутил (C<sub>4</sub>) и трет-бутил (C<sub>4</sub>).

C<sub>2-4</sub>алкенил: используемый в данном документе термин "C<sub>2-4</sub>алкенил" относится к алкильной группе, содержащей одну или несколько углерод-углеродных двойных связей.

Примеры ненасыщенных алкенильных групп включают без ограничения этенил (винил, -CH=CH<sub>2</sub>), 1-пропенил (-CH=CH-CH<sub>3</sub>), 2-пропенил (аллил, -CH=CH-CH<sub>2</sub>), изопропенил (1-метилвинил, -C(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>) и бутенил (C<sub>4</sub>).

C<sub>2-4</sub>алкинил: используемый в данном документе термин "C<sub>2-4</sub>алкинил" относится к алкильной группе, содержащей одну или несколько углерод-углеродных тройных связей.

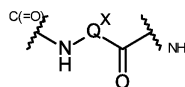
Примеры ненасыщенных алкинильных групп включают без ограничения этинил (-C≡CH) и 2-пропинил (пропаргил, -CH<sub>2</sub>-C≡CH).

C<sub>3-4</sub>циклоалкил: используемый в данном документе термин "C<sub>3-4</sub>циклоалкил" относится к алкильной группе, которая также является циклильной группой, то есть к одновалентному фрагменту, полученному посредством удаления атома водорода от атома алициклического кольца циклического углеводородного (карбоциклического) соединения, где фрагмент содержит от 3 до 7 атомов углерода, в том числе от 3 до 7 атомов кольца.

Примеры циклоалкильных групп включают без ограничения группы, полученные из насыщенных моноциклических углеводородных соединений: циклопропана (C<sub>3</sub>) и циклобутана (C<sub>4</sub>)

и ненасыщенных моноциклических углеводородных соединений: циклопропена (C<sub>3</sub>) и циклобутена (C<sub>4</sub>).

Маркировка связей: в формуле



маркировка с помощью надстрочных индексов C(=O) и NH обозначает группу, с которой связаны атомы. Например, группа NH показана связанной с карбонилем (который не является частью проиллюстрированного фрагмента), и карбонил показан связанным с группой NH (которая не является частью проиллюстрированного фрагмента).

### Соли

Удобными или желательными могут быть получение, очистка и/или обработка соответствующей соли активного соединения, например фармацевтически приемлемой соли. Примеры фармацевтически приемлемых солей рассмотрены в Berge, et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

Например, если соединение является анионным или содержит функциональную группу, которая может быть анионной (например, -COOH может представлять собой -COO<sup>-</sup>), то может быть образована соль с подходящим катионом. Примеры подходящих неорганических катионов включают без ограничения ионы щелочных металлов, такие как Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>, катионы щелочно-земельных металлов, такие как Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, и другие катионы, такие как Al<sup>+3</sup>. Примеры подходящих органических катионов включают без ограничения ион аммония (т.е. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) и замещенные ионы аммония (например, NH<sub>3</sub>R<sup>+</sup>, NH<sub>2</sub>R<sub>2</sub><sup>+</sup>, NHR<sub>3</sub><sup>+</sup>, NR<sub>4</sub><sup>+</sup>). Примерами некоторых подходящих замещенных ионов аммония являются ионы, полученные из этиламина, диэтиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглюмина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером часто встречающегося иона четвертичного аммония является N(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>+</sup>.

Если соединение является катионным или содержит функциональную группу, которая может быть катионной (например, -NH<sub>2</sub> может представлять собой -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), то может быть образована соль с подходящим анионом. Примеры подходящих неорганических анионов включают без ограничения анионы, полученные из следующих неорганических кислот: хлористоводородной, бромистоводородной, йодистоводородной, серной, сернистой, азотной, азотистой, фосфорной и фосфористой.

Примеры подходящих органических анионов включают без ограничения анионы, полученные из следующих органических кислот: 2-ацетоксибензойной, уксусной, аскорбиновой, аспарагиновой, бен-

зойной, камфорсульфоновой, коричной, лимонной, эдетовой, этандисульфоновой, этансульфоновой, фу-маровой, глюкогептоновой, глюконовой, глутаминовой, гликолевой, гидроксималеиновой, гидроксинаф-талинкарбоновой, изетионовой, молочной, лактобионовой, лауриновой, малеиновой, яблочной, метан-сульфоновой, муциновой, олеиновой, щавелевой, пальмитиновой, памоевой, пантотеновой, фенилуксу-ной, фенилсульфоновой, пропионовой, пировиноградной, салициловой, стеариновой, янтарной, сульфа-ниловой, винной, толуолсульфоновой, трифторуксусной и валериановой кислоты. Примеры подходящих полимерных органических анионов включают без ограничения анионы, полученные из следующих по-лимерных кислот: дубильной кислоты, карбоксиметилцеллюлозы.

#### Сольваты

Удобными или желательными могут быть получение, очистка и/или обработка соответствующего сольвата активного соединения. Термин "сольват" используется в данном документе в общепринятом смысле и относится к комплексу растворенного вещества (например, активного соединения, соли актив-ного соединения) и растворителя. Если растворитель представляет собой воду, то сольват может для удобства упоминаться как гидрат, например, моногидрат, дигидрат, тригидрат и т.п.

#### Изомеры

Определенные соединения по настоящему изобретению могут существовать в одной или несколь-ких конкретных геометрических, оптических, энантиомерных, диастереомерных, эписмерных, атропо-мерных, стереоизомерных, таутомерных, конформационных или аномерных формах, включая без огра-ничения цис- и транс-формы; E- и Z-формы; c-, t- и g- формы; эндо- и экзоформы; R-, S- и мезо-формы; D- и L-формы; d- и l-формы; (+) и (-)-формы; кето-, енольные и енолятные формы; син- и анти-формы; синклинальные и антиклинальные формы;  $\alpha$ - и  $\beta$ -формы; аксиальные и экваториальные формы; формы "ванна", "кресло", "твист", "конверт" и "полукресло", и их комбинации, далее в данном документе обо-бщенно называемые "изомеры" (или "изомерные формы").

Термин "хиральный" относится к молекулам, которые обладают свойством не совпадать со своим зеркальным отражением при наложении, в то время как термин "ахиральный" относится к молекулам, которые совпадают со своим зеркальным отражением при наложении.

Термин "стереоизомеры" относится к соединениям, которые имеют идентичный химический со-став, однако различаются расположением атомов или групп в пространстве.

Термин "диастереомер" относится к стереоизомеру с двумя или более хиральными центрами, и мо-лекулы которого не представляют собой зеркальные отражения друг друга. Диастереомеры обладают разными физическими свойствами, например, точками плавления, точками кипения, спектральными свойствами и реакционной способностью. Смеси диастереомеров можно разделять с применением высо-кочувствительных аналитических процедур, таких как электрофорез и хроматография.

Термин "энантиомеры" относится к двум стереоизомерам соединения, которые являются несовпа-дающими зеркальными отражениями друг друга.

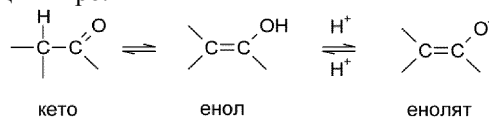
Стереохимические определения и условные обозначения, применяемые в данном документе, в це-лом следуют информации, указанной в P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Нью-Йорк, и Eliel, E. и Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., Нью-Йорк, 1994. Соединения по настоящему изобретению могут содержать асимметричные или хиральные центры и, следовательно, существуют в разных стереоизомерных фор-мах. Предполагается, что все стереоизомерные формы соединений по настоящему изобретению, включая без ограничения диастереомеры, энантиомеры и атропоизомеры, а также их смеси, такие как рацемиче-ские смеси, образуют часть настоящего изобретения. Множество органических соединений существуют в оптически активных формах, т.е. они обладают способностью вращать плоскость плоскополяризован-ного света. При описании оптически активного соединения префиксы D и L или R и S используются для обозначения абсолютной конфигурации молекулы относительно ее хирального центра(ов). Префиксы d и l или (+) и (-) используются для обозначения знака вращения соединением плоскополяризованного све-та, где (-) или l означают, что соединение является левовращающим. Соединение с префиксом (+) или d является правовращающим. Для заданной химической структуры данные стереоизомеры являются иден-тичными, за исключением того, что они являются зеркальными отражениями друг друга. Определенный стереоизомер может также называться энантиомером, и смесь таких изомеров часто называется смесью энантиомеров. Смесью энантиомеров с соотношением 50:50 называется рацемической смесью или рацематом, она может возникать при отсутствии стереоселекции или стереоспецифичности в ходе химической реакции или процесса. Термины "рацемическая смесь" и "рацемат" относятся к эквимольярной смеси двух разновидностей энантиомеров, лишенных оптической активности.

Термин "энантиомерно обогащенная форма" относится к образцу хирального вещества, где соот-ношение энантиомеров составляет более чем 50:50, но менее чем 100:0.

Следует отметить, что за исключением рассмотренных ниже таутомерных форм, из используемого в данном документе термина "изомеры" специально исключены структурные (или конституционные) изомеры (т.е. изомеры, которые отличаются по связям между атомами, а не только по положению атомов в пространстве). Например, ссылку на метоксигруппу,  $-OCH_3$ , не следует истолковывать как ссылку на ее структурный изомер, гидроксиметильную группу,  $-CH_2OH$ . Аналогичным образом, ссылку на орто-

хлорфенил не следует истолковывать как ссылку на его структурный изомер, мета-хлорфенил. Однако ссылка на класс структур вполне может включать структурные изомерные формы, находящиеся в пределах данного класса (например, C<sub>1-7</sub>-алкил включает n-пропил и изопропил; бутил включает n-, изо-, втор- и трет-бутил; метоксифенил включает орто-, мета- и пара-метоксифенил).

Вышеуказанное исключение не относится к таутомерным формам, например, кето-, енольным и енолятным формам, как, например, в случае следующих таутомерных пар: кето/енол (проиллюстрированы ниже), имин/енамин, амид/иминоспирт, амидин/ендиамин, нитрозо/оксим, тиокетон/ентиол, N-нитрозо/гидроксиазо и нитро/аци-нитро.



Термин "таутомер" или "таутомерная форма" относится к структурным изомерам, обладающим разной энергией, которые являются взаимопревращаемыми за счет низкого энергетического барьера. Например, протонные таутомеры (также известные как прототропные таутомеры) включают виды взаимопревращения за счет миграции протона, такие как кето-енольная и имин-енаминовая изомеризация. Валентные таутомеры включают виды взаимопревращения посредством реорганизации некоторых из связывающих электронов.

Следует отметить, что в термин "изомер" специально включены соединения с одним или несколькими изотопными замещениями. Например, H может находиться в любой изотопной форме, в том числе <sup>1</sup>H, <sup>2</sup>H (D) и <sup>3</sup>H (T); C может находиться в любой изотопной форме, в том числе <sup>12</sup>C, <sup>13</sup>C и <sup>14</sup>C; O может находиться в любой изотопной форме, в том числе <sup>16</sup>O и <sup>18</sup>O, и т.п.

Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединения по настоящему изобретению, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора, хлора и йода, такие как без ограничения <sup>2</sup>H (дейтерий, D), <sup>3</sup>H (тритий), <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>F, <sup>31</sup>P, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>36</sup>Cl и <sup>125</sup>I. Различные изотопно меченые соединения по настоящему изобретению, например соединения, в которые включены радиоактивные изотопы, такие как <sup>3</sup>H, <sup>13</sup>C и <sup>14</sup>C. Такие изотопно меченые соединения могут быть применимы в метаболических исследованиях, исследованиях кинетики реакции, методиках выявления или визуализации, таких как позитронно-эмиссионная томография (PET) или однофотонная эмиссионная компьютерная томография (SPECT), включая анализы распределения лекарственного средства или субстрата в ткани, или в лечении пациентов с применением радиоактивных веществ. Меченные или замещенные дейтерием терапевтические соединения по настоящему изобретению могут обладать улучшенными свойствами DMPK (метаболизм и фармакокинетика лекарственного средства) в отношении распределения, метаболизма и выведения (ADME). Замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, может обеспечить определенные терапевтические преимущества, появляющиеся вследствие большей метаболической стабильности, например увеличение периода полужизни *in vivo* или снижение требуемых дозировок. Меченное <sup>18</sup>F соединение может быть применимо для исследований с применением PET или SPECT. Изотопно меченые соединения по настоящему изобретению и их пролекарства, могут, как правило, быть получены посредством осуществления процедур, раскрытых на схемах или в примерах и способах получения, описанных ниже, посредством замещения реагента, не являющегося изотопно меченым, легко доступным изотопно меченым реагентом. Кроме того, замещение более тяжелыми изотопами, в частности дейтерием (т.е. <sup>2</sup>H или D), может обеспечить определенные терапевтические преимущества, появляющиеся вследствие большей метаболической стабильности, например, увеличение периода полужизни *in vivo*, или снижение требуемых дозировок, или увеличение терапевтического индекса. Понятно, что дейтерий в данном контексте считается заместителем. Концентрация такого более тяжелого изотопа, в частности дейтерия, может быть определена с помощью коэффициента изотопного обогащения. Считается, что в соединениях по настоящему изобретению любой атом, конкретно не обозначенный как определенный изотоп, представляет собой любой стабильный изотоп данного атома.

Если не указано иное, ссылка на определенное соединение включает все такие изомерные формы, в том числе их (полностью или частично) рацемические и другие смеси. Способы получения (например асимметрический синтез) и разделения (например фракционная кристаллизация и хроматографические способы) таких изомерных форм либо известны из уровня техники, либо их легко разрабатывать посредством адаптации способов, изложенных в данном документе, или известных способов известным образом.

#### **Звено, представляющее собой лиганд**

Звено, представляющее собой лиганд, может быть любым и включает белок, полипептид, пептид и непептидное средство, которые специфически связываются с целевой молекулой. В некоторых вариантах осуществления звено, представляющее собой лиганд, может представлять собой белок, полипептид или пептид. В некоторых вариантах осуществления звено, представляющее собой лиганд, может представлять собой циклический полипептид. Такие звенья, представляющие собой лиганд, могут включать антигена или фрагмент антигена, которые содержат по меньшей мере один сайт связывания с целевой молекулой, лимфокины, гормоны, факторы роста или любую другую молекулу или вещество, связывающиеся



с клеткой, которые способны специфически связываться с мишенью.

Термины "специфически связывается" и "специфическое связывание" относятся к связыванию антитела или другого белка, полипептида или пептида с заданной молекулой (например антигеном). Как правило, антитело или другая молекула связываются с аффинностью, составляющей по меньшей мере приблизительно  $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , и связываются с заданной молекулой с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше, чем их аффинность при связывании с неспецифической молекулой (например, BSA, казеином), отличной от заданной молекулы, или близкородственной молекулой.

Примеры звеньев, представляющих собой лиганд, включают средства, описанные для применения в WO 2007/085930, которая включена в данный документ.

В некоторых вариантах осуществления звено, представляющее собой лиганд, представляет собой средство, связывающееся с клеткой, которое связывается с внеклеточной мишенью на клетке. Такое средство, связывающееся с клеткой, может представлять собой белок, полипептид, пептид или непептидное средство. В некоторых вариантах осуществления средство, связывающееся с клеткой, может представлять собой белок, полипептид или пептид. В некоторых вариантах осуществления средство, связывающееся с клеткой, может представлять собой циклический полипептид. Средство, связывающееся с клеткой, также может представлять собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC).

#### **Средство, связывающееся с клеткой**

Средство, связывающееся с клеткой, может быть любым и включает пептиды и средства, отличные от пептидов. Они могут включать антитела или фрагмент антитела, которые содержат по меньшей мере один сайт связывания, лимфокины, гормоны, миметики гормонов, витамины, факторы роста, молекулы, осуществляющие транспорт питательных веществ, или любую другую молекулу или вещество, связывающиеся с клеткой.

#### **Пептиды**

В одном варианте осуществления средство, связывающееся с клеткой, представляет собой линейный или циклический пептид, содержащий 4-30, предпочтительно 6-20 смежных аминокислотных остатков.

В одном варианте осуществления средство, связывающееся с клеткой, включает пептид, который связывает интегрин  $\alpha_v\beta_6$ . Пептид может быть селективным в отношении  $\alpha_v\beta_6$  по сравнению с XY5.

В одном варианте осуществления средство, связывающееся с клеткой, включает полипептид A20FMDV-Cys. A20FMDV-Cys характеризуется последовательностью NAVPNLRGDLQVLAQKVARTC. В качестве альтернативы, можно применять вариант последовательности A20FMDV-Cys, где один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных остатков замещены другим аминокислотным остатком. Кроме того, полипептид может характеризоваться последовательностью NAVXXXXXXXXXXXXXXXXXRTC.

#### **Антитела**

Термин "антитело" в данном документе используется в наиболее широком смысле и специально охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, димеры, мультимеры, полиспецифические антитела (например биспецифические антитела), поливалентные антитела и фрагменты антител при условии, что они демонстрируют требуемую биологическую активность (Miller et al. (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). Антитела могут быть мышинными, человеческими, гуманизированными, химерными или полученными от других видов. Антитело представляет собой белок, вырабатываемый иммунной системой, который обладает способностью к распознаванию определенного антигена и связыванию с ним. (Janeway C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, Нью-Йорк). Целевой антиген, как правило, имеет множество сайтов связывания, также называемых эпитопами, распознаваемых CDR на многочисленных антителах. Каждое антитело, которое специфически связывается с другим эпитопом, имеет отличную структуру. Таким образом, один антиген может иметь более чем одно соответствующее антитело. Антитело включает полноразмерную молекулу иммуноглобулина или иммунологически активную часть полноразмерной молекулы иммуноглобулина, т.е. молекулу, которая содержит антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывает антиген мишени, представляющей интерес, или ее часть, при этом такие мишени включают без ограничения раковую клетку или клетки, которые продуцируют аутоиммунные антитела, ассоциированные с аутоиммунным заболеванием. Иммуноглобулин может представлять собой молекулу иммуноглобулина любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса. Иммуноглобулины могут быть получены от любых видов, в том числе они могут происходить от человека, мыши или кролика.

"Фрагменты антитела" содержат часть полноразмерного антитела, как правило, его антигенсвязывающую или вариабельную область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и scFv; диатела; линейные антитела; фрагменты, получаемые в экспрессионной библиотеке Fab, антиидиотипические (анти-Id) антитела, CDR (область, определяющую комплементарность) и эпитоп-

связывающие фрагменты любого из вышеуказанных, которые иммуноспецифически связываются с антигенами раковых клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами, молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции практически однородных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, будучи направленными на один антигенный сайт. Более того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые содержат разные антитела, направленные на разные детерминанты (эпитопы), каждое моноклональное антитело направлено на одну детерминанту на антигене. В дополнение к их специфичности, моноклональные антитела имеют преимущество в том, что они могут быть синтезированы как незагрязненные другими антителами. Модификатор "моноклональный" характеризует антитело как полученное из практически однородной популяции антител, и его не следует истолковывать как требование получения антитела посредством какого-либо определенного способа. Например, моноклональные антитела, подлежащие применению по настоящему изобретению, могут быть получены посредством гибридного способа, впервые описанного в Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495, или могут быть получены посредством способов с применением рекомбинантной ДНК (см. US 4816567). Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с применением методик, описанных в Clackson et al. (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, или от трансгенных мышей, несущих полностью человеческую систему иммуноглобулинов (Lonberg (2008) *Curr. Opin.* 20(4):450-459).

Моноклональные антитела, описанные в данном документе, в частности, включают химерные антитела, гуманизированные антитела и человеческие антитела.

Примеры средств, связывающихся с клеткой, включают средства, описанные для применения в WO 2007/085930, которая включена в данный документ.

Опухоль-ассоциированные антигены и когнатные антитела для применения в вариантах осуществления настоящего изобретения перечислены ниже и описаны более подробно на стр. 14-86 в WO 2017/186894, которая включена в данный документ.

- (1) BMPR1B (рецептор костного морфогенетического белка типа IB).
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5).
- (3) STEAP1 (эпителиальный антиген предстательной железы с шестью трансмембранными сегментами).
- (4) 0772P (CA125, MUC16).
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, мегакариоцит-потенцирующий фактор, мезотелин).
- (6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIb, SLC34A2, семейство переносчиков растворенных веществ 34 (фосфат натрия), представитель 2, натрий-зависимый транспортер фосфата 3b типа II).
- (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, семафорин 5b Hlog, домен sema, семь тромбоспондиновых повторов (1 типа и подобные 1 типу), трансмембранный домен (TM) и короткий цитоплазматический домен, (семафорин) 5B).
- (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, cDNA RIKEN 2700050C12, cDNA гена RIKEN 2700050C12).
- (9) ETBR (рецептор эндотелина типа B).
- (10) MSG783 (RNF124, гипотетический белок FLJ20315).
- (11) STEAP2 (HGNC8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP I, STEAP2, STMP, ген 1, ассоциированный с раком предстательной железы, белок 1, ассоциированный с раком предстательной железы, эпителиальный антиген предстательной железы 2 с шестью трансмембранными сегментами, белок предстательной железы с шестью трансмембранными сегментами).
- (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, катионный канал 5, действующий по механизму транзитного рецепторного потенциала, подсемейство M, представитель 4).
- (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, фактор роста, полученный из тератокарциномы)
- (14) CD21 (CR2 (рецептор комплемента 2), или C3DR (C3d/рецептор вируса Эпштейна-Барр), или Hs.73792).
- (15) CD79b (CD79B, CD79β, Igb (ассоциированный с иммуноглобулином бета), B29).
- (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (якорный белок-фосфатаза 1a, содержащий домен SH2), la) SPAP1B, SPAP1C).
- (17) HER2 (ErbB2).
- (18) NCA (CEACAM6).
- (19) MDP (DPEP1).
- (20) IL20R-альфа (IL20Ra, ZCYTOR7).
- (21) Бревикан (BCAN, VEHAB).
- (22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5).
- (23) ASLG659 (B7h).

- (24) PSCA (предшественник антигена стволовых клеток предстательной железы).
- (25) GEDA.
- (26) BAFF-R (рецептор фактора, активирующего В-клетки, рецептор BLyS 3, BR3).
- (27) CD22 (изоформа В-клеточного рецептора CD22-B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814).
- (27a) CD22 (молекула CD22).
- (28) CD79a (CD79A, CD79альфа), ассоциированный с иммуноглобулином альфа, белок, специфический в отношении В-клеток, который ковалентно взаимодействует с Ig бета (CD79B) и образует комплекс с молекулами Ig M на поверхности, передает сигнал, участвующий в дифференцировке В-клеток), pI: 4,84, MW: 25028, TM: 2 [P], ген, хромосома: 19q13.2).
- (29) CXCR5 (рецептор 1 лимфомы Беркитта, рецептор, сопряженный с G-белком, который активируется хемокином CXCL13, функционирует при миграции лимфоцитов и гуморальной защите, играет роль при инфекции HIV-2 и, возможно, в развитии СПИД, лимфомы, миеломы и лейкоза); 372 aa, pI: 8,54, MW: 41959, TM: 7 [P], ген, хромосома: 11q23.3).
- (30) HLA-DOB (бета-субъединица молекулы MHC класса II (антиген Ia), которая связывает пептиды и представляет их CD4+ Т-лимфоцитам); 273 aa, pI: 6,56, MW: 30820. TM. 1 [P], ген, хромосома: 6p21.3).
- (31) P2X5 (лиганд-зависимый ионный канал 5 пуриnergического рецептора P2X, ионный канал, управляемый внеклеточным АТФ, может участвовать в передаче импульса по синапсам и нейрогенезе, дефицит может вносить вклад в патофизиологию идиопатической нестабильности детрузора); 422 aa, pI: 7,63, MW: 47206, TM: 1 [P], ген, хромосома: 17p13.3).
- (32) CD72 (антиген CD72 дифференцировки В-клеток, Lyb-2); 359 aa, pI: 8,66, MW: 40225, TM: 1 5 [P], ген, хромосома: 9p13.3).
- (33) LY64 (лимфоцитарный антиген 64 (RP105), мембранный белок семейства белков с богатыми лейцином повторами (LRR) I типа, регулирует активацию и апоптоз В-клеток, потеря функции ассоциирована с повышением активности заболевания у пациентов с системной красной волчанкой); 661 aa, pI: 6,20, MW: 74147, TM: 1 [P], ген, хромосома: 5q12).
- (34) FcRH1 (подобный Fc-рецептору белок 1, предполагаемый рецептор Fc-домена иммуноглобулина, который содержит Ig-подобные и ITAM-домены типа C2, может играть роль в дифференцировке В-лимфоцитов); 429 aa, pI: 5,28, MW: 46925, TM: 1 [P], ген, хромосома: 1q21-1q22).
- (35) IRTA2 (ассоциированный с транслокацией рецептор 2 суперсемейства иммуноглобулинов, предполагаемый иммунорецептор с возможной ролью в развитии В-клеток и лимфомагенезе; нарушение регуляции гена посредством транслокации происходит в некоторых В-клеточных злокачественных новообразованиях); 977 aa, pI: 6,88, MW: 106468, TM: 1 [P], ген, хромосома: 1q21).
- (36) TENB2 (TMEFF2, томорегулин, TPEF, HPP1, TR, предполагаемый трансмембранный протеогликан, родственный семейству факторов роста EGF/херегулин и фоллистатину); 374 aa).
- (37) PSMA - FOLH1 (фолатгидролаза (специфический мембранный антиген предстательной железы) 1).
- (38) SST (рецептор соматостатина; примечание: существует 5 подтипов).
- (38.1) SSTR2 (рецептор соматостатина 2).
- (38.2) SSTR5 (рецептор соматостатина 5).
- (38.3) SSTR1.
- (38.4) SSTR3.
- (38.5) SSTR4.
- AvB6 - обе субъединицы (39+40).
- (39) ITGAV (интегрин, альфа V).
- (40) ITGB6 (интегрин, бета 6).
- (41) CEACAM5 (молекула клеточной адгезии 5, родственная карциноэмбриональному антигену).
- (42) MET (протоонкоген met; рецептор фактора роста гепатоцитов).
- (43) MUC1 (муцин 1, ассоциированный с клеточной поверхностью).
- (44) CA9 (карбоангидраза IX).
- (45) EGFRvIII (рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), вариант транскрипта 3).
- (46) CD33 (молекула CD33).
- (47) CD19 (молекула CD19).
- (48) IL2RA (рецептор интерлейкина 2, альфа); эталонная последовательность NCBI: NM\_000417.2).
- (49) AXL (рецепторная тирозинкиназа AXL).
- (50) CD30 - TNFRSF8 (суперсемейство рецепторов фактора некроза опухоли, представитель 8).
- (51) BCMA (антиген созревания В-клеток) - TNFRSF17 (суперсемейство рецепторов фактора некроза опухоли, представитель 17).
- (52) CT Ag - CTA (раково-тестикулярные антигены).
- (53) CD174 (Y по Льюису) - FUT3 (фукозилтрансфераза 3 (галактозид-3(4)-L-фукозилтрансфераза, группа крови Льюиса).

(54) CLEC14A (семейство 14 с лектиновым доменом типа С, представитель А; номер доступа в Genbank NM175060).

(55) GRP78 - HSPA5 (белок теплового шока 5 с молекулярной массой 70 кДа (регулируемый глюкозой белок, 78 кДа).

(56) CD70 (молекула CD70) L08096.

(57) специфические антигены стволовых клеток.

Например:

5T4 (см. элемент списка (63) ниже);

CD25 (см. элемент списка (48) выше);

CD32;

LGR5/GPR49;

промиелин/СВ133.

(58) ASG-5.

(59) ENPP3 (эктонуклеотидпирофосфатаза/фосфодиэстераза 3).

(60) PRR4 (богатый пролином белок 4 (слезная железа)).

(61) GCC - GUCY2C (гуанилатциклаза 2С (рецептор термостабильного энтеротоксина).

(62) Liv-1- SLC39A6 (семейство переносчиков растворенных веществ 39 (транспортёр цинка), представитель 6).

(63) 5T4, гликопротеин трофобластов, TPBG - TPBG (гликопротеин трофобластов).

(64) CD56 - NCMA1 (молекула адгезии нервных клеток 1).

(65) CanAg (опухоль-ассоциированный антиген CA242).

(66) FOLR1 (рецептор фолата 1).

(67) GPNMB (гликопротеин (трансмембранный) nmb).

(68) TIM-1- HAVCR1 (клеточный рецептор 1 вируса гепатита А).

(69) RG-1/миндин, мишень при опухоли предстательной железы - миндин/RG-1.

(70) B7-H4 - VTCN1 (содержащий V-образный домен ингибитор активации Т-клеток 1).

(71) PTK7 (PTK7 протеинтирозинкиназа 7).

(72) CD37 (молекула CD37).

(73) CD138 - SDC1 (синдекан 1).

(74) CD74 (молекула CD74, главный комплекс гистосовместимости, инвариантная цепь класса II).

(75) клаудины - CL (клаудины).

(76) EGFR (рецептор эпидермального фактора роста).

(77) Her3 (ErbB3) - ERBB3 (гомолог 3 вирусного онкогена при эритробластном лейкозе v-erb-b2 (птичий)).

(78) RON - MST1R (стимулирующий макрофаги рецептор 1 (тирозинкиназа, родственная c-met)).

(79) ERHA2 (рецептор EPH A2).

(80) CD20 - MS4A1 (трансмембранные домены 4, подсемейство А, представитель 1).

(81) Тенасцин С - TNC (тенасцин С).

(82) FAP (белок активации фибробластов, альфа).

(83) DKK-1 (гомолог Dickkopf 1 (Xenopus laevis)).

(84) CD52 (молекула CD52).

(85) CS1 - SLAMF7 (представитель 7 семейства SLAM).

(86) Эндоглин - ENG (эндоглин).

(87) Аннексин А1 - ANXA1 (аннексии А1).

(88) V-CAM (CD106) - VCAM1 (молекула адгезии сосудистого эндотелия 1).

Дополнительными опухоль-ассоциированным антигеном и когнатными антителами, представляющими интерес, являются:

(89) ASCT2 (транспортёр ASC 2, также известный как SLC1A5).

Антитела ASCT2 описаны в WO 2018/089393, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Средство, связывающееся с клеткой, может быть меченым, например, для облегчения выявления или очистки средства либо до встраивания в виде конъюгата, либо в виде части конъюгата. Метка может представлять собой биотиновую метку. В другом варианте осуществления средство, связывающееся с клеткой, может быть меченным радиоактивным изотопом.

#### Способы лечения

Конъюгаты по настоящему изобретению можно использовать в способе терапии. Также предусмотрен способ лечения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества конъюгата формулы IV. Термин "терапевтически эффективное количество" обозначает количество, достаточное для того, чтобы продемонстрировать пользу для пациента. Такая польза может представлять собой по меньшей мере снижение интенсивности по меньшей мере одного симптома. Реально вводимое количество, а также скорость и динамика введения будут зависеть от природы и тяжести состояния, подлежащего лечению. Назначение лечения, например принятие решений о дозах,

находится в пределах компетенции врачей общей практики и других врачей.

Конъюгат можно вводить отдельно или в комбинации с другими средствами для лечения либо одновременно, либо последовательно в зависимости от состояния, подлежащего лечению. Примеры видов лечения и терапии включают без ограничения химиотерапию (введение активных средств, включая, например, лекарственные средства), хирургическое лечение и лучевую терапию.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению и для применения по настоящему изобретению могут содержать, в дополнение к активному ингредиенту, т.е. конъюгату формулы IV, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, широко известные специалистам в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны противодействовать эффективности активного ингредиента. Конкретная природа носителя или другого материала будет зависеть от пути введения, который может быть пероральным или может осуществляться посредством инъекции, например, внутривенной, подкожной или внутримышечной.

Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме таблетки, капсулы, порошка или жидкости. Таблетка может содержать твердый носитель или адьювант. Жидкие фармацевтические композиции обычно содержат жидкий носитель, такой как вода, продукты переработки нефти, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Капсула может содержать твердый носитель, такой как желатин.

Для внутривенной, внутримышечной или подкожной инъекции или инъекции в очаг поражения активный ингредиент будет находиться в форме водного раствора, приемлемого для парентерального введения, который не содержит пирогенов и характеризуется подходящим значением pH, изотоничностью и стабильностью. Специалисты в данной области техники могут получить пригодные растворы с применением, например, изотонических сред, таких как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор лактата Рингера для инъекций. Консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки могут быть включены при необходимости.

Конъюгаты можно использовать для лечения пролиферативного заболевания и аутоиммунного заболевания. Термин "пролиферативное заболевание" относится к нежелательной или неконтролируемой клеточной пролиферации избыточных или аномальных клеток, которая является нежелательной, как, например, неопластический или гиперпластический рост, будь то *in vitro* или *in vivo*.

Примеры пролиферативных состояний включают без ограничения клеточную пролиферацию доброкачественного, предракового и злокачественного характера, в том числе без ограничения новообразования и опухоли (например, гистиоцитому, глиому, астроцитому, остеому), виды рака (например, рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак желудочно-кишечного тракта, рак кишечника, рак толстой кишки, карциному молочной железы, карциному яичника, рак предстательной железы, рак яичка, рак печени, рак почки, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак головного мозга, саркому, остеосаркому, саркому Капоши, меланому), виды лейкоза, псориаз, заболевания костей, фибропролиферативные нарушения (например соединительных тканей) и атеросклероз. Другие виды рака, представляющие интерес, включают без ограничения злокачественные состояния системы крови, такие как виды лейкоза и лимфомы, например, неходжкинскую лимфому и ее подтипы, такие как DLBCL, лимфома из клеток маргинальной зоны, лимфома из клеток мантийной зоны и фолликулярная лимфома, лимфому Ходжкина, AML и другие виды рака B- или T-клеточного происхождения. Любой тип клеток может подвергаться лечению, в том числе без ограничения клетки легкого, желудочно-кишечного тракта (в том числе, например, кишечника, толстой кишки), молочной железы (маммарные), яичника, предстательной железы, печени (печеночные), почки (почечные), мочевого пузыря, поджелудочной железы, головного мозга и кожи.

Примеры аутоиммунного заболевания включают следующие: ревматоидный артрит, аутоиммунные демиелинизирующие заболевания (например, рассеянный склероз, аллергический энцефаломиелит), псориазический артрит, эндокринную офтальмопатию, увеоретинит, системную красную волчанку, миастению гравис, болезнь Грейвса, гломерулонефрит, аутоиммунное нарушение печени, воспалительное заболевание кишечника (например болезнь Крона), анафилаксию, аллергическую реакцию, синдром Шегрена, сахарный диабет I типа, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, фибромиалгию, полимиозит, дерматомиозит, множественную эндокринную недостаточность, синдром Шмидта, аутоиммунный увеит, болезнь Аддисона, адреналит, тиреоидит, тиреоидит Хашимото, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, пернициозную анемию, атрофию желудка, хронический гепатит, волчаночный гепатит, атеросклероз, подострую кожную красную волчанку, гипопаратиреоз, синдром Дресслера, аутоиммунную тромбоцитопению, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, гемолитическую анемию, вульгарную пузырчатку, пузырчатку, герпетический дерматит, гнездную алопецию, пемфигоид, склеродермию, прогрессирующий системный склероз, CREST-синдром (кальциноз, феномен Рейно, нарушение моторики пищевода, склеродактилия и телеангиэктазия), мужское и женское аутоиммунное бесплодие, анкилозирующий спондилит, язвенный колит, смешанное заболевание соединительной ткани, узелковый полиартерит, системный некротизирующий васкулит, атопический дерматит, атопический

ринит, синдром Гудпасчера, болезнь Шагаса, саркоидоз, ревматическую лихорадку, астму, привычный выкидыш, антифосфолипидный синдром, "легкое фермера", многоформную эритему, посткардиотомный синдром, синдром Кушинга, аутоиммунный хронический активный гепатит, "легкое птицевода", токсический эпидермальный некролиз, синдром Альпорта, альвеолит, аллергический альвеолит, фиброзирующий альвеолит, интерстициальное заболевание легких, узловатую эритему, гангренозную пиодермию, трансфузионную реакцию, артериит Такаясу, ревматоидную полимиалгию, темпоральный артериит, шistosомоз, гигантоклеточный артериит, аскаридоз, аспергиллез, синдром Самптера, экзему, лимфоматозный гранулематоз, болезнь Бехчета, синдром Каплана, болезнь Кавасаки, лихорадку денге, энцефаломиелит, эндокардит, эндомиокардиальный фиброз, эндофтальмит, стойкую возвышающуюся эритему, псориаз, эритроblastоз плода, эозинофильный фасциит, синдром Шульмана, синдром Фелти, филяриоз, циклит, хронический циклит, гетерохромный циклит, циклит Фукса, IgA-нефропатию, пурпуру Шенлейна-Геноха, заболевание "трансплантат против хозяина", отторжение трансплантата, кардиомиопатию, синдром Итона-Ламберта, рецидивирующий полихондрит, криоглобулинемию, макроглобулинемию Вальденстрема, синдром Эванса и аутоиммунную гонадную недостаточность.

В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой нарушение, связанное с В-лимфоцитами (например, системную красную волчанку, синдром Гудпасчера, ревматоидный артрит и диабет I типа), Th1-лимфоцитами (например, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, псориаз, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, туберкулез или заболевание "трансплантат против хозяина") или Th2-лимфоцитами (например, atopический дерматит, системную красную волчанку, atopическую астму, риноконъюнктивит, аллергический ринит, синдром Оменна, системный склероз или хроническое заболевание "трансплантат против хозяина"). В целом нарушения, связанные с дендритными клетками, включают нарушения, связанные с Th1-лимфоцитами и Th2-лимфоцитами. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное нарушение представляет собой иммунологическое нарушение, опосредованное Т-клетками.

"Химиотерапевтическое средство" представляет собой химическое соединение, применимое в лечении рака, независимо от механизма действия. Классы химиотерапевтических средств включают без ограничения алкилирующие средства, антимагболиты, растительные алкалоиды на основе яда, воздействующего на веретено деления, цитотоксические/противоопухолевые антибиотики, ингибиторы топоизомеразы, антитела, фотосенсибилизирующие средства и ингибиторы киназ. Химиотерапевтические средства включают соединения, применяемые в "направленной терапии" и традиционной химиотерапии.

Примеры химиотерапевтических средств включают эрлотиниб (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), доцетаксел (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (фторурацил, 5-фторурацил, CAS № 51-21-8), гемцитабин (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS № 391210-10-9, Pfizer), цисплатин (цис-диамин, ди-хлорплатина (II), CAS № 15663-27-1), карбоплатин (CAS № 41575-94-4), паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), темозоломид (4-метил-5-оксо-2,3,4,6,8-пентазабицикло[4.3.0]нона-2,7,9-триен-9-карбоксамид, CAS № 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), тамоксифен ((Z)-2-[4-(1,2-дифенилбут-1-енил)фенокси-1-N,N-диметилэтанамин, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®), и доксорубин (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD и рапамицин. Дополнительные примеры химиотерапевтических средств включают оксалиплатин (ELOXATIN®, Sanofi), бортезомиб (VELCADE®, Millennium Pharm.), сутент (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), летрозол (FEMARA®, Novartis), мезилат иматиниба (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (ингибитор Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (ингибитор Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (ингибитор PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (ингибитор PI3K, Novartis), XL-147 (ингибитор PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), фулвестрант (FASLODEX®, Astra-Zeneca), лейковорин (фолиновая кислота), рапамицин (сиролимус, RAPAMUNE®, Wyeth), лапатиниб (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), лонафарниб (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), сорафениб (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), гефитиниб (IRESSA®, AstraZeneca), иринотекан (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), типифарниб (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (без кремофора), составы на основе паклитаксела, связанного со сконструированными с альбумином наночастицами (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, IL), вандетаниб (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), хлорамбуцил, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), темсиролимус (TORISEL®, Wyeth), пазопаниб (GlaxoSmithKline), канфосфамид (TELCYTA®, Telik), тиотепу и циклофосфамид (CYTOXAN®, NEOSAR®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, в том числе алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилмеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); камптотецин (в том числе синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (в том числе его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (в частности криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (в том числе синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин,

ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид мехлоретаминоксида, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (например, калихеамицин, калихеамицин гамма II, калихеамицин омега II (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); динемидин, динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также неокарциностатиновый хромофор и родственные хромопротеиновые хромофоры энединовых антибиотиков, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, неморубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомидин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомоцины, пепломицин, порфирамицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, пропionate дромостанолон, эпитиостанол, мепитиостан, тестостерон; вещества, подавляющие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; средство для восполнения фолиевой кислоты, такое как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидгликозид; аминоклевулиновая кислота; этилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митокстантрон; мопиданмол; нитраэрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарабазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; теназоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); циклофосфамид; тиотепу; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоклутетин; капецитабин (XELODA®, Roche); ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из вышеуказанных.

Также в определение "химиотерапевтическое средство" включены (I) антигормональные средства, которые действуют посредством регуляции или подавления действия гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогенов (SERM), в том числе, например, тамоксифен (в том числе NOLVADEX®; цитрат тамоксифена), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и FARESTON® (цитрат торемифина); (ii) ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, которая регулирует выработку эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, MEGASE® (ацетат мегестрола), AROMASIN® (эксеместан; Pfizer), форместан, фадрозол, RTVISOR® (ворозол), FEMARA® (летрозол; Novartis) и ARIMIDEX® (анастрозол; AstraZeneca); (iii) антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; а также троксацитабин (1,3-диоксолановый нуклеозидный аналог цитозина); (iv) ингибиторы протеинкиназ, такие как ингибиторы MEK (WO 2007/044515); (v) ингибиторы липидкиназ; (vi) антисмысловые олигонуклеотиды, в частности олигонуклеотиды, которые подавляют экспрессию генов в сигнальных путях, задействованных в нарушении пролиферации клеток, например, PKC-альфа, Raf и H-Ras, такие как облимержен (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) рибозимы, такие как ингибиторы экспрессии VEGF (например ANGIOZYME®) и ингибиторы экспрессии HER2; (viii) вакцины, такие как вакцины для генной терапии, например ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® и VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; ингибиторы топоизомеразы 1, такие как LURTOTECAN®; ABARELIX® gmRH; (ix) антиангиогенные средства, такие как бевацизумаб (AVASTIN®, Genentech); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из вышеуказанных.

Также в определение "химиотерапевтическое средство" включены терапевтические антитела, такие как алемтузумаб (Campath), бевацизумаб (AVASTIN®, Genentech); цетуксимаб (ERBITUX®, Imclone); панитумумаб (VECTIBIX®, Amgen), ритуксимаб (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), пертузумаб (OMNITARG™, 2C4, Genentech), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), тозитумомаб (Bexxar, Corixa) и конъюгат антитело-лекарственное средство гемтузумаб озогамидин (MYLOTARG®, Wyeth).

Гуманизированные моноклональные антитела с терапевтическим потенциалом в качестве химиотерапевтических средств в комбинации с конъюгатами по настоящему изобретению включают алемтузумаб, аполизумаб, азелизумаб, атлизумаб, бапинеузумаб, бевацизумаб, биватузумаб мертансин, кантузумаб мертансин, целелизумаб, цертолизумаб пегол, цидфузитузумаб, цидтузумаб, даклизумаб, экулизу-

маб, эфализумаб, эспратузумаб, эрлизумаб, фелвизумаб, фонтолизумаб, гемтузумаб озогамицин, инотузумаб озогамицин, ипилимумаб, лабетузумаб, линтузумаб, матузумаб, меполизумаб, мотавизумаб, мотовизумаб, натализумаб, нимотузумаб, ноловизумаб, нумавизумаб, окрелизумаб, омализумаб, паливизумаб, пасколизумаб, пекфузитузумаб, пектузумаб, пертузумаб, пекселизумаб, раливизумаб, ранибизумаб, ресливизумаб, реслизумаб, ресивизумаб, ровелизумаб, руплизумаб, сибротузумаб, силлизумаб, сонтузумаб, такатузумаб тетракетан, тадоцизумаб, тализумаб, тефибазумаб, тоцилизумаб, торализумаб, трастузумаб, тукотузумаб целмолейкин, тукузитузумаб, умавизумаб, уртоксазумаб и визилизумаб.

#### Составы

В то время как является возможным отдельное применение (например введение) конъюгата, часто предпочтительным является представление его в виде композиции или состава.

В одном варианте осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию (например, состав, препарат, лекарственный препарат), содержащую конъюгат, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В одном варианте осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере один конъюгат, описанный в данном документе, вместе с одним или несколькими другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, широко известными специалистам в данной области техники, в том числе без ограничения фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями, вспомогательными веществами, адъювантами, наполнителями, буферами, консервантами, антиоксидантами, смазывающими средствами, стабилизирующими средствами, солюбилизирующими средствами, поверхностно-активными веществами (например смачивающими средствами), маскирующими средствами, красителями, ароматизаторами и подсластителями.

В одном варианте осуществления композиция дополнительно содержит другие активные средства, например другие терапевтические или профилактические средства.

Информацию о подходящих носителях, разбавителях, вспомогательных веществах и т.п. можно найти в стандартных фармацевтических источниках литературы. См., например, Handbook of Pharmaceutical Additives. 2-е издание (под ред. M. Ash и I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Нью-Йорк, США), Remington's Pharmaceutical Sciences. 20-е издание, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; и Handbook of Pharmaceutical Excipients. 2-е издание, 1994.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам получения фармацевтической композиции, включающим смешивание по меньшей мере одного меченого радиоактивным изотопом [<sup>11</sup>C] конъюгата или подобного конъюгату соединения, определенного в данном документе, с одним или несколькими другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, широко известными специалистам в данной области техники, например, носителями, разбавителями, вспомогательными веществами и т.д. В случае составления в виде дискретных единиц (например таблеток и т.п.), каждая единица содержит заданное количество (дозу) активного соединения.

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" относится к соединениям, ингредиентам, материалам, композициям, дозированным лекарственным формам и т.п., которые по результатам тщательной медицинской оценки являются подходящими для применения в контакте с тканями указанного субъекта (например человека), при этом не вызывая чрезмерную токсичность, раздражение, аллергическую реакцию или другую проблему или осложнение, соизмеримые с обоснованным соотношением польза/риск. Каждый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество и т.п. также должны быть "приемлемыми" с точки зрения совместимости с другими ингредиентами состава.

Составы могут быть получены посредством любых способов, широко известных в области фармацевтики. Такие способы включают стадию приведения активного соединения в контакт с носителем, который состоит из одного или нескольких вспомогательных ингредиентов. В целом составы получают посредством однородного и непосредственного приведения активного соединения в контакт с носителями (например, жидкими носителями, тонкоизмельченным твердым носителем и т.п.) и последующего придания продукту формы при необходимости.

Может быть получен состав, предусматривающий быстрое или медленное высвобождение; немедленное, замедленное, отсроченное или пролонгированное высвобождение или их комбинацию.

Составы, подходящие для парентерального введения (например посредством инъекции), включают водные или неводные изотонические апиогенные стерильные жидкости (например, растворы, суспензии), в которых растворен, суспендирован или иным образом представлен активный ингредиент (например в липосоме или другой микрочастице). Такие жидкости могут дополнительно содержать другие фармацевтически приемлемые ингредиенты, такие как антиоксиданты, буферы, консерванты, стабилизирующие средства, бактериостатические средства, суспендирующие средства, загустители и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим по отношению к крови (или другой соответствующей биологической жидкости) предполагаемого реципиента. Примеры вспомогательных веществ включают, например, воду, спирты, многоатомные спирты, глицерин, растительные масла и т.п. Примеры подходящих изотонических носителей для применения в таких составах включают хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера или раствор лактата Рингера для инъекций. Как правило, концентрация активного ингредиента в жидкости составляет от приблизительно 1 нг/мл до приблизительно 10 мкг/мл, например от



приблизительно 10 нг/мл до приблизительно 1 мкг/мл. Составы могут быть представлены в однодозовых или многодозовых герметично закрытых контейнерах, например ампулах и флаконах, и могут храниться в высушенном посредством сублимации (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например воды для инъекций, непосредственно перед применением. Экстемпоральные растворы и суспензии для инъекций могут быть получены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

#### Доза

Специалисту в данной области техники будет понятно, что подходящие дозы конъюгатов и композиций, содержащих конъюгаты, могут варьироваться от пациента к пациенту. Определение оптимальной дозы, как правило, включает уравнивание терапевтической пользы по отношению к любому риску или пагубным побочным эффектам. Выбранный уровень дозы будет зависеть от разнообразных факторов, в том числе без ограничения активности определенного соединения, пути введения, времени введения, скорости выведения соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в комбинации, степени тяжести состояния и вида, пола, возраста, веса, состояния, общего состояния здоровья и анамнеза пациента. Количество соединения и путь введения в конечном счете будут оставлены на усмотрение врача, ветеринара или клинициста, однако, как правило, доза будет подбираться с целью достижения значений локальной концентрации в месте действия, которые обеспечивают достижение требуемого эффекта, не вызывая существенных вредных или пагубных побочных эффектов.

Введение может осуществляться в виде одной дозы, непрерывно или с перерывами (например в виде разделенных доз через подходящие интервалы времени) на протяжении курса лечения. Способы определения наиболее эффективных способов и дозы введения хорошо известны специалистам в данной области техники и будут варьироваться в зависимости от состава, применяемого для терапии, цели терапии, клетки-мишени (клеток-мишеней), подлежащей лечению, и субъекта, подлежащего лечению. Однократное или многократное введение может осуществляться с применением уровня дозы и схемы, выбранных лечащим врачом, ветеринаром или клиницистом.

В целом подходящая доза активного соединения находится в диапазоне от приблизительно 100 нг до приблизительно 25 мг (более типично от приблизительно 1 мкг до приблизительно 10 мг) в день в расчете на килограмм веса тела субъекта. В случае, если активное соединение представляет собой соль, сложный эфир, амид, пролекарство или т.п., вводимое количество рассчитывается по исходному соединению и, таким образом, фактический применяемый вес увеличивается пропорционально.

Величины доз, описанные выше, могут применяться в отношении конъюгата или эффективного количества соединения, которое высвобождается после расщепления линкера.

Для предупреждения или лечения заболевания подходящая доза ADC по настоящему изобретению будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, как определено выше, степени тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли молекулу в превентивных или терапевтических целях, предшествующей терапии, анамнеза пациента и реакции на антитело, а также от усмотрения лечащего врача. Молекула подходящим образом вводится пациенту однократно или в ходе ряда курсов лечения. В зависимости от типа и степени тяжести заболевания, количество молекул, составляющее от приблизительно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или больше, представляет собой исходную кандидатную дозу для введения пациенту, будь то, например, посредством одного или нескольких отдельных введений или посредством непрерывной инфузии. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продлевается до тех пор, пока не произойдет требуемое подавление симптомов заболевания. Другие схемы дозирования могут быть применимыми. Ход данной терапии легко поддается мониторингу посредством традиционных методик и анализов.

#### Нагрузка лекарственным средством

Нагрузка лекарственным средством (p) представляет собой среднее количество лекарственного средства, приходящееся на звено, представляющее собой лиганд, которое может представлять собой средство, связывающееся с клеткой, например антитело.

Среднее количество лекарственного средства, приходящееся на антитело, в препаратах ADC, полученных посредством реакций конъюгации, может быть охарактеризовано посредством традиционных способов, таких как UV, HPLC с обращенной фазой, HIC, масс-спектрометрия, анализ ELISA и электрофорез. Количественное распределение ADC с точки зрения p также может быть определено. Посредством ELISA может быть определено усредненное значение p в определенном препарате ADC (Hamblett et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). Однако распределение значений p (лекарственного средства) не различимо посредством связывания антитела с антигеном и предела выявления ELISA. Кроме того, применение анализа ELISA для выявления конъюгатов антитело-лекарственное средство не обеспечивает определения места присоединения фрагментов лекарственного средства к антителу, например фрагментов легкой цепи или тяжелой цепи или определенных аминокислотных остатков. В некоторых случаях разделение, очистка и определение характеристик однодого ADC, где p представляет собой определенное значение, полученное для ADC с нагрузками другим лекарственным средством, могут осуществляться посредством таких способов, как HPLC с обра-

щенной фазой или электрофорез. Такие методики также применимы в отношении других типов конъюгатов.

В случае некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство значение  $p$  может ограничиваться количеством сайтов присоединения на антителе. Например, антитело может содержать только одну или несколько тиольных групп цистеина или может содержать только одну или несколько достаточно реакционноспособных тиольных групп, посредством которых линкер может быть присоединен. Более высокая нагрузка лекарственным средством может вызывать агрегацию, нерастворимость, токсичность или потерю способности к проникновению в клетку для определенных конъюгатов антитело-лекарственное средство.

Как правило, в ходе реакции конъюгации с антителом конъюгируется менее чем теоретически максимальное количество фрагментов, представляющих собой лекарственное средство. Антитело может содержать, например, множество остатков лизина, которые не реагируют с линкером лекарственного средства. Только наиболее реакционноспособные группы лизина способны реагировать с реакционноспособным в отношении амина линкерным реагентом. Кроме того, только наиболее реакционноспособные тиольные группы цистеина способны реагировать с реакционноспособным в отношении тиола линкерным реагентом. В целом антитела не содержат множество или вообще не содержат свободных и реакционноспособных тиольных групп цистеина, которые могут быть присоединены к фрагменту, представляющему собой лекарственное средство. Большинство тиольных остатков цистеина в антителах соединений существуют в виде дисульфидных мостиков и их количество должно быть сокращено с помощью восстановителя, такого как дитиотреитол (DTT) или TCEP, в частично или полностью восстанавливающих условиях. Нагрузку (соотношение лекарственное средство/антитело) ADC можно регулировать несколькими разными способами, включающими (i) ограничение молярного избытка линкера лекарственного средства по отношению к антителу, (ii) ограничение времени или температуры протекания реакции конъюгации и (iii) частичные или ограничивающие восстанавливающие условия для модификации тиольной группы цистеина.

Некоторые антитела содержат восстанавливаемые межпечочные дисульфидные связи, т.е. цистеиновые мостики. Антитела можно сделать реакционноспособными в отношении конъюгации с линкерными реагентами посредством обработки восстановителем, таким как DTT (дитиотреитол). Каждый цистеиновый мостик, таким образом, будет теоретически образовывать два реакционноспособных тиольных нуклеофила. Дополнительные нуклеофильные группы можно вводить в антитела посредством осуществления реакции остатков лизина с 2-иминотиолоном (реагентом Трота), приводящей к превращению амина в тиол. Реакционноспособные тиольные группы можно вводить в антитело (или его фрагмент) посредством конструирования одного, двух, трех, четырех или более остатков цистеина (например посредством получения мутантных антител, содержащих один или несколько ненативных аминокислотных остатков цистеина). В US 7521541 описано конструирование антител посредством введения реакционноспособных аминокислот, представляющих собой цистеин.

Аминокислоты, представляющие собой цистеин, могут быть сконструированы в реакционноспособных сайтах антитела, а также таким образом, чтобы они не образовывали внутрипечочных или межмолекулярных дисульфидных связей (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Doman et al. (2009) Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO 2009/052249). Тиольные группы сконструированных остатков цистеина способны реагировать с линкерами лекарственного средства по настоящему изобретению (т.е. формулы I), которые содержат реакционноспособные в отношении тиола электрофильные группы, такие как малеимид или альфа-галогенамиды, с образованием ADC с антителами со сконструированными остатками цистеина. Местоположение звена, представляющего собой лекарственное средство, таким образом, может быть разработанным, контролируемым и известным. Нагрузку лекарственным средством можно контролировать, так как тиольные группы сконструированного цистеина, как правило, реагируют с реагентами лекарственное средство-линкер с высоким выходом. Конструирование антитела IgG с введением аминокислоты, представляющей собой цистеин, посредством замены в одном сайте на тяжелой или легкой цепи обеспечивает получение двух новых остатков цистеина на симметричном антителе. Нагрузка лекарственным средством, близкая к 2, может быть достигнута с почти однородностью продукта конъюгации ADC.

В случае, если более чем одна нуклеофильная или электрофильная группа антитела реагирует с линкерами лекарственного средства, полученный продукт может представлять собой смесь соединений ADC с распределением звеньев, представляющих собой лекарственное средство, присоединенных к антителу, например, 1, 2, 3 и т.д. Посредством способов жидкостной хроматографии, таких как хроматография с полимерной обращенной фазой (PLRP) и хроматография гидрофобных взаимодействий (HIC), можно разделять соединения в смеси по значению нагрузки лекарственным средством. Препараты ADC с одним значением ( $p$ ) нагрузки лекарственным средством могут быть выделены, однако такие ADC с одним значением нагрузки все еще могут представлять собой неоднородные смеси, поскольку звенья, представляющие собой лекарственное средство, могут быть присоединены посредством линкера к разным сайтам антитела.

Таким образом, композиции на основе конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему

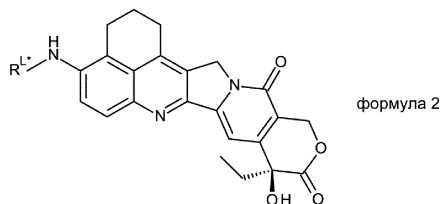
изобретению могут содержать смеси конъюгатов антитело-лекарственное средство, где антитело содержит один или несколько фрагментов, представляющих собой лекарственное средство, и где фрагменты, представляющие собой лекарственное средство, могут быть присоединены к антителу по разным аминокислотным остаткам.

В одном варианте осуществления среднее количество лекарственных средств, приходящееся на средство, связывающееся с клеткой, находится в диапазоне от 1 до 20. В некоторых вариантах осуществления диапазон выбран из диапазона от 1 до 10, от 2 до 10, от 2 до 8, от 2 до 6 и от 4 до 10.

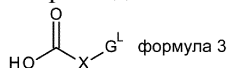
В некоторых вариантах осуществления на средство, связывающееся с клеткой, приходится одно лекарственное средство.

#### Общие пути синтеза

Соединения формулы I, где  $R^L$  представлен формулой Ia, могут быть синтезированы из соединения формулы 2



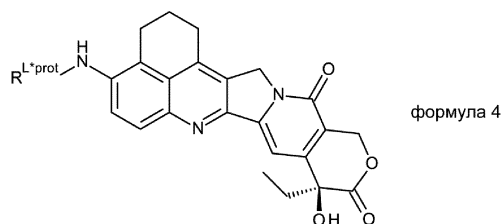
где  $R^{L*}$  представляет собой -QH за счет присоединения к соединению формулы 3



или его активированную версию.

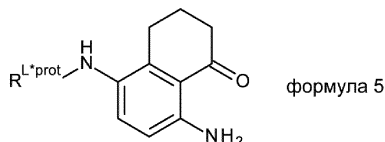
Такую реакцию можно осуществлять в условиях, способствующих образованию амидной связи.

Соединения формулы 2 можно синтезировать посредством удаления защитной группы из соединения формулы 4



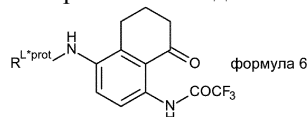
где  $R^{L*prot}$  представляет собой -Q-Prot<sup>N</sup>, где Prot<sup>N</sup> представляет собой защитную группу для аминогруппы.

Соединения формулы 4 могут быть синтезированы посредством реакции сочетания соединения формулы 5



с соединением A3 с применением реакции Фридлендера.

Соединения формулы 5 можно синтезировать из соединений формулы 6



посредством удаления трифторацетамидной защитной группы.

Соединения формулы 6 можно синтезировать посредством реакции сочетания  $R^{L*prot}$ -OH с соединением 17.

Соединения формулы I, где  $R^L$  представлен формулой Ia или Ib, можно синтезировать из соединения III посредством реакции сочетания с соединением  $R^L$ -OH или его активированной формой.

#### Защитные группы для аминогруппы

Защитные группы для аминогруппы широко известны специалистам в данной области техники. Особое внимание обращается на раскрытие подходящих защитных групп в Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis, четвертое издание, John Wiley & Sons, 2007 (ISBN 978-0-471-69754-1), стр. 696-871.

#### Дополнительные предпочтения

Следующие предпочтения можно применять ко всем аспектам настоящего изобретения, как описано выше, или они могут относиться к отдельному аспекту. Предпочтения могут быть объединены вместе в любой комбинации.

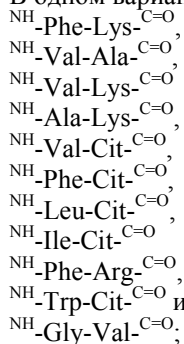
$Q^x$

В одном варианте осуществления Q представляет собой аминокислотный остаток. Аминокислота может представлять собой природную аминокислоту или неприродную аминокислоту.

В одном варианте осуществления Q выбран из Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp, где Cit представляет собой цитруллин.

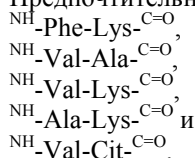
В одном варианте осуществления Q включает дипептидный остаток. Аминокислоты в дипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления дипептид содержит природные аминокислоты. Если линкер представляет собой линкер, лабильный в отношении расщепления катепсином, то дипептид является сайтом действия катепсин-опосредованного расщепления. Таким образом, дипептид представляет собой сайт распознавания для катепсина.

В одном варианте осуществления Q выбран из

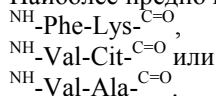


где Cit представляет собой цитруллин.

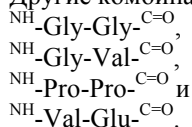
Предпочтительно Q выбран из



Наиболее предпочтительно, Q выбран из

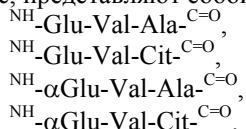


Другие комбинации дипептидов, представляющие интерес, включают

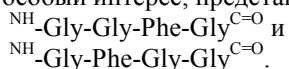


Могут применяться другие комбинации дипептидов, в том числе комбинации, описанные в Dubowchik et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855-869, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления Q представляет собой трипептидный остаток. Аминокислоты в трипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления трипептид содержит природные аминокислоты. Если линкер представляет собой линкер, лабильный в отношении расщепления катепсином, то трипептид является сайтом действия катепсин-опосредованного расщепления. Таким образом, трипептид представляет собой сайт распознавания для катепсина. Трипептидные линкеры, представляющие особый интерес, представляют собой



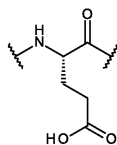
В некоторых вариантах осуществления Q представляет собой тетрапептидный остаток. Аминокислоты в тетрапептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления тетрапептид содержит природные аминокислоты. Если линкер представляет собой линкер, лабильный в отношении расщепления катепсином, то тетрапептид является сайтом действия катепсин-опосредованного расщепления. Таким образом, тетрапептид представляет собой сайт распознавания для катепсина. Тетрапептидные линкеры, представляющие особый интерес, представляют собой:



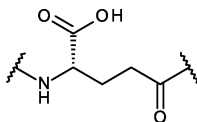
В некоторых вариантах осуществления тетрапептид представляет собой  $\text{NH-Gly-Gly-Phe-Gly}^{\text{C=O}}$ .

На представленных выше изображениях пептидных остатков  $\text{NH}^{\text{H}}$  - представляет собой N-конец, и  $\text{-C=O}$  представляет собой C-конец остатка. C-конец связан с NH из A\*.

Glu представляет собой остаток глутаминовой кислоты, т.е.



$\alpha\text{Glu}$  представляет собой остаток глутаминовой кислоты при связывании посредством  $\alpha$ -цепи, т.е.:



В одном варианте осуществления при необходимости боковая цепь аминокислоты является химически защищенной. Защитная группа для боковой цепи может представлять собой группу, рассмотренную выше. Защищенные аминокислотные последовательности являются расщепляемыми с помощью ферментов. Например, дипептидная последовательность, содержащая остаток Lys с защитой боковой цепи с помощью Boc, является расщепляемой с помощью катепсина.

Защитные группы для боковых цепей аминокислот широко известны из уровня техники, описаны в каталоге Novabiochem и являются такими, как описано выше.

$\text{G}^{\text{L}}$

$\text{G}^{\text{L}}$  может быть выбран из

$(\text{G}^{\text{L}1-1})$		$(\text{G}^{\text{L}6})$	
$(\text{G}^{\text{L}1-2})$		$(\text{G}^{\text{L}7})$	

(G <sup>L2</sup> )		(G <sup>L8</sup> )	
(G <sup>L3-1</sup> )		(G <sup>L9</sup> )	
(G <sup>L3-2</sup> )		(G <sup>L10</sup> )	
(G <sup>L3-3</sup> )		(G <sup>L11</sup> )	
(G <sup>L3-4</sup> )		(G <sup>L12</sup> )	
(G <sup>L4</sup> )		(G <sup>L13</sup> )	
(G <sup>L5</sup> )		(G <sup>L14</sup> )	

где Ag представляет собой C<sub>5-6</sub>ариленовую группу, например фенилен, и X представляет собой C<sub>1-4</sub>алкил.

В некоторых вариантах осуществления G<sup>L</sup> выбран из G<sup>L1-1</sup> и G<sup>L1-2</sup>. В некоторых из данных вариантов осуществления G<sup>L</sup> представляет собой G<sup>L1-1</sup>.

G<sup>LL</sup>

G<sup>LL</sup> может быть выбран из

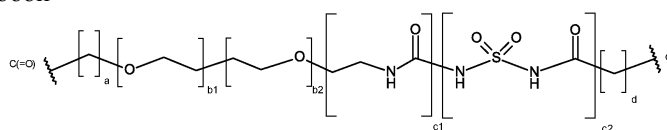
(G <sup>LL1-1</sup> )		(G <sup>LL3-1</sup> )	
(G <sup>LL1-2</sup> )		(G <sup>LL3-2</sup> )	
(G <sup>LL2</sup> )		(G <sup>LL9-1</sup> )	
(G <sup>LL3-1</sup> )		(G <sup>LL9-2</sup> )	
(G <sup>LL3-2</sup> )		(G <sup>LL10</sup> )	
(G <sup>LL-4</sup> )		(G <sup>LL11</sup> )	
(G <sup>LL-5</sup> )		(G <sup>LL12</sup> )	
(G <sup>LL6</sup> )		(G <sup>LL13</sup> )	
(G <sup>LL7</sup> )		(G <sup>LL14</sup> )	

где Ar представляет собой C<sub>5-6</sub>-ариленовую группу, например фенолен, и X представляет собой C<sub>1-4</sub>-алкил.

В некоторых вариантах осуществления G<sup>LL</sup> выбран из G<sup>LL1-1</sup> и G<sup>LL1-2</sup>. В некоторых из данных вариантов осуществления G<sup>LL</sup> представляет собой G<sup>LL1-1</sup>.

### X

X представляет собой



где a равняется 0-5, b1 равняется 0-16, b2 равняется 0-16, c равняется 0 или 1, d равняется 0-5, где по меньшей мере b1 или b2 равняется 0, и по меньшей мере c1 или c2 равняется 0.

a может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления a равняется 0-3. В некоторых из данных вариантов осуществления a равняется 0 или 1. В дополнительных вариантах осуществления a равняется 0.

b1 может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления b1 равняется 0-12. В некоторых из данных вариантов осуществления b1 равняется 0-8 и может равняться 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

b2 может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления b2 равняется 0-12. В некоторых из данных вариантов осуществления b2 равняется 0-8 и может равняться 0, 2, 3, 4, 5 или 8. Только один из b1 и b2 может не равняться 0.

c1 может равняться 0 или 1.

c2 может равняться 0 или 1.

Только один из c1 и c2 может не равняться 0.

d может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления d равняется 0-3. В некоторых из данных вариантов осуществления d равняется 1 или 2. В дополнительных вариантах осуществления d равняется 2. В дополнительных вариантах осуществления d равняется 5.

В некоторых вариантах осуществления X a равняется 0, b1 равняется 0, c1 равняется 1, c2 равняется 0, и d равняется 2, и b2 может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

В некоторых вариантах осуществления X a равняется 1, b2 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 0 и d равняется 0, и b1 может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления b1 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

В некоторых вариантах осуществления X a равняется 0, b1 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 0 и d равняется 1, и b2 может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

В некоторых вариантах осуществления X b1 равняется 0, b2 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 0, и один из a и d равняется 0. Другой из a и d равняется 1-5. В некоторых из данных вариантов осуществления другой из a и d равняется 1. В других из данных вариантов осуществления другой из a и d равняется 5.

В некоторых вариантах осуществления X a равняется 1, b2 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 1, d равняется 2, и b1 может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

В некоторых вариантах осуществления  $R^L$  представлен формулой Ib. В некоторых вариантах осуществления  $R^{L1}$  представлен формулой Ib'.

$R^{L1}$  и  $R^{L2}$  независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу.

В некоторых вариантах осуществления  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  одновременно представляют собой H.

В некоторых вариантах осуществления  $R^{L1}$  представляет собой H, и  $R^{L2}$  представляет собой метил.

В некоторых вариантах осуществления  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  одновременно представляют собой метил.

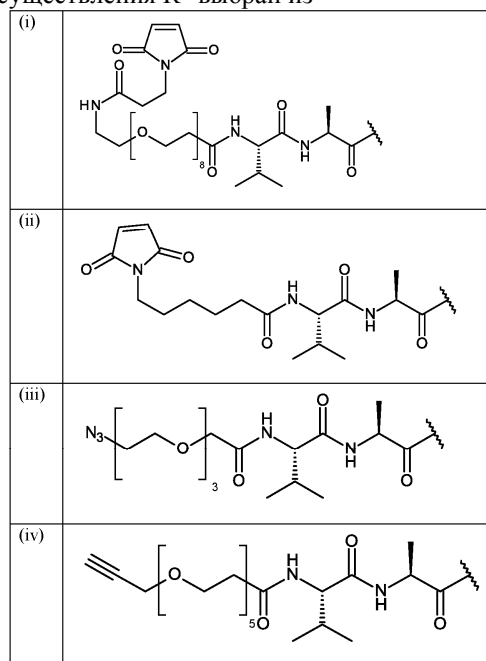
В некоторых вариантах осуществления  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу.

В некоторых вариантах осуществления  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.

В группе Ib в некоторых вариантах осуществления e равняется 0. В других вариантах осуществления e равняется 1, и нитрогруппа может находиться в любом доступном положении кольца. В некоторых из данных вариантов осуществления она находится в орто-положении. В других из данных вариантов осуществления она находится в пара-положении.

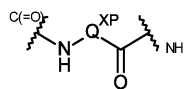
В некоторых вариантах осуществления пятого аспекта настоящего изобретения энантимерно обогащенная форма характеризуется соотношением энантимеров, составляющим более чем 60:40, 70:30, 80:20 или 90:10. В дополнительных вариантах осуществления соотношение энантимеров составляет более чем 95:5, 97:3 или 99:1.

В некоторых вариантах осуществления  $R^L$  выбран из

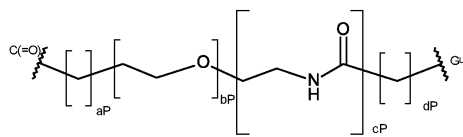






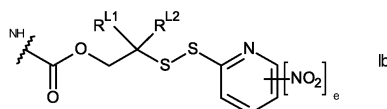


где  $Q^{XP}$  является таким, что  $Q^P$  представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток или трипептидный остаток;  
 $X^P$  представляет собой



где  $aP$  равняется 0-5,  $bP$  равняется 0-16,  $cP$  равняется 0 или 1,  $dP$  равняется 0-5;  $G^L$  представляет собой линкер для присоединения к звену, представляющему собой лиганд;

(ib):



где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу и  $e$  равняется 0 или 1.

$aP$  может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления  $aP$  равняется 0-3. В некоторых из данных вариантов осуществления  $aP$  равняется 0 или 1. В дополнительных вариантах осуществления  $aP$  равняется 0.

$bP$  может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления  $bP$  равняется 0-12. В некоторых из данных вариантов осуществления  $bP$  равняется 0-8 и может равняться 0, 2, 4 или 8.

$cP$  может равняться 0 или 1.

$dP$  может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления  $dP$  равняется 0-3. В некоторых из данных вариантов осуществления  $dP$  равняется 1 или 2. В дополнительных вариантах осуществления  $dP$  равняется 2.

В некоторых вариантах осуществления  $X^P$   $aP$  равняется 0,  $cP$  равняется 1, и  $dP$  равняется 2, и  $bP$  может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления  $bP$  равняется 0, 4 или 8.

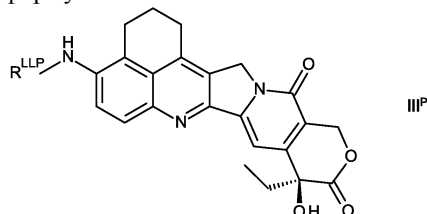
Предпочтения, касающиеся  $Q^X$ , указанного выше для соединений формулы I, при необходимости могут применяться в отношении  $Q^{XP}$ .

Предпочтения, касающиеся  $G^L$ ,  $R^{L1}$ ,  $R^{L2}$  и  $e$ , указанных выше для соединений формулы I, могут применяться в отношении соединений формулы I<sup>P</sup>.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат формулы IV представлен формулой IV<sup>P</sup>

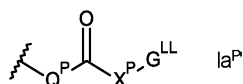


или его фармацевтически приемлемой солью или сольватом, где L представляет собой звено, представляющее собой лиганд (т.е. нацеливающееся средство),  $D^{LP}$  представляет собой звено лекарственное средство-линкер, представленное формулой III<sup>P</sup>



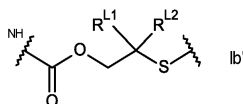
$R^{LLP}$  представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд, выбранному из

(ia'):



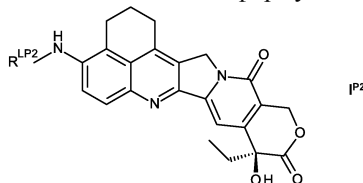
где  $Q^P$  и  $X^P$  являются такими, как определено выше, и  $G^{LL}$  представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд; и

(ib'):

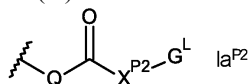


где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  являются такими, как определено выше; и  $p$  представляет собой целое число от 1 до 20.

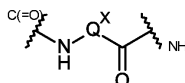
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы I представлено формулой I<sup>P2</sup>



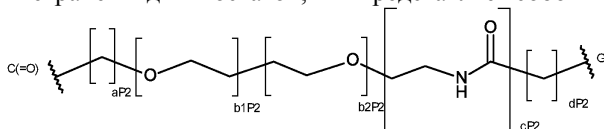
и его солями и сольватами, где R<sup>LP2</sup> представляет собой линкер для присоединения к средству, связывающемуся с клеткой, который выбран из (ia)



где Q представляет собой



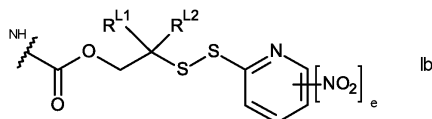
где Q<sup>X</sup> является таким, что Q представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток, трипептидный остаток или тетрапептидный остаток; X<sup>P2</sup> представляет собой



где aP2 равняется 0-5, b1P2 равняется 0-16, b2P2 равняется 0-16, cP2 равняется 0 или 1, dP2 равняется 0-5, где по меньшей мере b1P2 или b2P2 равняется 0 (т.е. только один из b1 и b2 может не равняться 0);

G<sup>L</sup> представляет собой линкер для присоединения к звену, представляющему собой лиганд;

(ib):



где R<sup>L1</sup> и R<sup>L2</sup> независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и e равняется 0 или 1.

aP2 может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления aP2 равняется 0-3. В некоторых из данных вариантов осуществления aP2 равняется 0 или 1. В дополнительных вариантах осуществления aP2 равняется 0.

b1P2 может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления b1P2 равняется 0-12. В некоторых из данных вариантов осуществления b1P2 равняется 0-8 и может равняться 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

b2P2 может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах осуществления b2P2 равняется 0-12. В некоторых из данных вариантов осуществления b2P2 равняется 0-8 и может равняться 0, 2, 3, 4, 5 или 8. Только один из b1P2 и b2P2 может не равняться 0.

cP2 может равняться 0 или 1.

dP2 может равняться 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления dP2 равняется 0-3. В некоторых из данных вариантов осуществления dP2 равняется 1 или 2. В дополнительных вариантах осуществления dP2 равняется 2. В дополнительных вариантах осуществления dP2 равняется 5.

В некоторых вариантах осуществления X<sup>P2</sup> aP2 равняется 0, b1P2 равняется 0, cP2 равняется 1, и dP2 равняется 2, и b2P2 может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления b2P2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

В некоторых вариантах осуществления X<sup>P2</sup> aP2 равняется 1, b2P2 равняется 0, cP2 равняется 0, и dP2 равняется 0, и b1P2 может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления b1P2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

В некоторых вариантах осуществления X<sup>P2</sup> aP2 равняется 0, b1P2 равняется 0, cP2 равняется 0, и dP2 равняется 1, и b2P2 может равняться 0-8. В некоторых из данных вариантов осуществления b2P2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.

В некоторых вариантах осуществления X<sup>P2</sup> b1P2 равняется 0, b2P2 равняется 0, cP2 равняется 0, и один из aP2 и dP2 равняется 0. Другой из aP2 и d равняется 1-5. В некоторых из данных вариантов осуществления другой из aP2 и d равняется 1. В других из данных вариантов осуществления другой из aP2 и dP2 равняется 5.

Предпочтения, касающиеся Q<sup>X</sup>, указанного выше для соединений формулы I, при необходимости

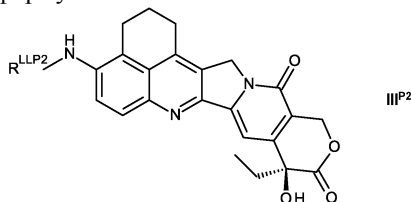
могут применяться в отношении  $Q^X$  в формуле Ia<sup>P2</sup>.

Предпочтения, касающиеся  $G^L$ ,  $R^{L1}$ ,  $R^{L2}$  и  $e$ , указанных выше для соединений формулы I, могут применяться в отношении соединений формулы I<sup>P2</sup>.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат формулы IV представлен формулой IV<sup>P2</sup>:

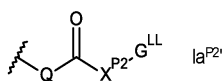


или его фармацевтически приемлемой солью или сольватом, где L представляет собой звено, представляющее собой лиганд (т.е. нацеливающееся средство),  $D^{LP2}$  представляет собой звено лекарственное средство-линкер, представленное формулой III<sup>P2</sup>



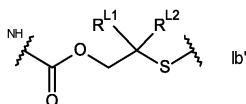
$R^{LLP2}$  представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд, выбранному из

(ia<sup>'</sup>):



где Q и  $X^{P2}$  являются такими, как определено выше, и  $G^{LL}$  представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд; и

(ib<sup>'</sup>):



где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  являются такими, как определено выше; и p представляет собой целое число от 1 до 20.

## Примеры

### Общая информация

Флэш-хроматографию проводили с применением Biotage® Isolera™ и фракций, проверенных на чистоту с помощью тонкослойной хроматографии (TLC). TLC проводили с применением силикагеля Merck Kieselgel 60 F254 с флуоресцентным индикатором на алюминиевых пластинах. Визуализацию TLC осуществляли с помощью УФ-излучения.

Растворители для экстрагирования и хроматографии приобретали в VWR U.K. и применяли без дополнительной очистки.

Все чистые химические вещества приобретали в Sigma-Aldrich, если не указано иное. Пегилированные реагенты получали от Quanta biodesign (США) через Stratech (Великобритания).

Условия LC/MS.

Способ А.

Масс-спектрометрию с электрораспылением в режиме детекции положительно заряженных ионов проводили с применением Waters Acquity H-класс SQD2.

Применяемыми подвижными фазами были растворитель А (вода с 0,1% муравьиной кислоты) и растворитель В (ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты). Исходный состав с 5% В удерживали в течение 25 с, затем увеличивали концентрацию с 5% В до 100% В в течение периода времени, составлявшего 1 мин 35 с. Состав удерживали в течение 50 с при 100% В, затем возвращали до 5% В за 5 с и удерживали при данном значении в течение 5 с. Общая продолжительность прогона градиента составляла 3,0 мин. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин. Детекцию осуществляли при 254 нм. Колонки: Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18, 1,7 мкм, 2,1×50 мм при 50°C, оснащенная предколонкой Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard, 130А, 1,7 мкм, 2,1×5 мм.

Способ В.

HPLC (Waters Alliance 2695) проводили с применением подвижной фазы из воды (А) (0,1% муравьиной кислоты) и ацетонитрила (В) (0,1% муравьиной кислоты).

Исходный состав с 5% В удерживали в течение 25 с, затем увеличивали концентрацию с 5% В до 100% В в течение периода времени, составлявшего 1 мин 35 с. Состав удерживали в течение 50 с при 100% В, затем возвращали до 5% В за 5 с и удерживали при данном значении в течение 5 с. Общая продолжительность прогона градиента составляла 3,0 минуты. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин. Диапазон значений длины волны при детекции: 190-800 нм. Колонки: Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18, 1,7 мкм, 2,1×50 мм при 50°C, оснащенная предколонкой Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard, 130А, 1,7 мкм, 2,1×5 мм.

Способ С.

HPLC (Waters Alliance 2695) проводили с применением подвижной фазы из воды (А) (0,1% муравьиной кислоты) и ацетонитрила (В) (0,1% муравьиной кислоты).

Исходный состав с 5% В удерживали в течение 1 мин, затем увеличивали концентрацию с 5% В до 100% В в течение периода времени, составлявшего 9 мин. Состав удерживали в течение 2 мин при 100% В, затем возвращали до 5% В за 0,10 мин и удерживали при данном значении в течение 3 мин. Общая продолжительность прогона градиента равнялась 15 мин. Скорость потока составляла 0,6 мл/мин. Диапазон значений длины волны при детекции: 190-800 нм. Температурный режим термостата: 50°C. Колонка: ACE Excel 2 C18-AR, 2 мкм, 3,0×100 мм.

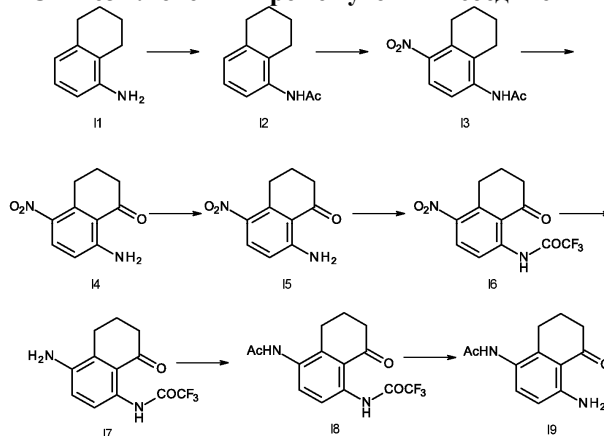
Условия HPLC.

Сверхбыструю высокоэффективную жидкостную хроматографию с обращенной фазой (UFLC) проводили на аппарате Shimadzu Prominence™ с применением колонки Phenomenex™ Gemini NX, 5 мкм C18 (при 50°C) с размерами: 150×21,2 мм. Применяемыми элюентами были растворитель А (H<sub>2</sub>O с 0,1% муравьиной кислоты) и растворитель В (CH<sub>3</sub>CN с 0,1% муравьиной кислоты). Все эксперименты с применением UFLC проводили при следующих условиях градиентного элюирования. Концентрацию исходного состава с 13% В увеличивали до 30% В в течение периода времени, составлявшего 3 мин, затем увеличивали до 45% В в течение 8 мин и снова увеличивали до 100% в течение 6 мин, а затем возвращали до 13% в течение 2 мин и удерживали в течение 1 мин. Общая продолжительность прогона градиента составляла 20,0 мин. Скорость потока составляла 20,0 мл/мин, а детекцию осуществляли при 254 нм и 223 нм.

Способ ЯМР.

Значения химического сдвига при проведении протонного ЯМР измеряли по дельта-шкале при 400 МГц с применением Bruker AV400. Применялись следующие сокращения: s, синглет; d, дублет; t, триплет; q, квартет; quin, квинтет; m, мультиплет; br, широкий. Константы взаимодействия приведены в Гц.

#### Синтез ключевых промежуточных соединений



а) N-(5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамид (12).

5,6,7,8-Тетрагидронафталин-1-амин 11 (8,54 г, 58,0 ммоль) растворяли в дихлорметане (80 мл). Добавляли триэтиламин (18 мл, 129 ммоль) и смесь охлаждали до 0°C. Добавляли по каплям уксусный ангидрид (11,5 мл, 122 ммоль), после завершения добавления реакционную смесь нагревали до к.т. и перемешивали в течение 45 мин, сразу после чего LCMS указывала на завершение реакции. Смесь разбавляли с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, промывали с помощью H<sub>2</sub>O, насыщ. NaHCO<sub>3</sub>, 10% лимонной кислоты, органическую фазу сушили над MgSO<sub>4</sub> и концентрировали in vacuo. Грязно-белое твердое вещество растирали со 1:3 смесью Et<sub>2</sub>O/изогексана с получением 12 (10,8 г, 57,1 ммоль, выход 98%) в виде белого твердого вещества, которое применяли без дополнительной очистки. LC/MS (способ А): время удерживания 1,44 минуты (ES<sup>+</sup>) масса/заряд 190 [M+H]<sup>+</sup>.

б) N-(4-нитро-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамид (13).

N-(5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамид 12 (1,00 г, 5,2840 ммоль) порциями добавляли к серной кислоте (15 мл, 281 ммоль) при -5°C. К реакционной смеси порциями добавляли нитрат натрия (450 мг, 5,2945 ммоль) и перемешивали в течение 30 мин при -5°C, сразу после чего LCMS указывала на отсутствие дальнейшего протекания реакции. Реакционную смесь выливали на лед с наружным охлаждением, водную смесь экстрагировали с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, органическую фазу сушили над MgSO<sub>4</sub> и очищали с помощью Isolera (10-80% EtOAc в изогексане) с получением смеси N-(4-нитро-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамида 13 и N-(2-нитро-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамида (956 мг, 4,0811 ммоль, выход 77%) в виде белого/желтого твердого вещества. LC/MS (способ А): время удерживания 1,53 мин (ES<sup>+</sup>) масса/заряд 235 [M+H]<sup>+</sup>.

в) N-(4-нитро-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамид (14).

N-(4-нитро-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамид 13 (1,01 г, 4,31 ммоль) растворяли в ацетоне

(30 мл). Добавляли сульфат магния в воде (3,9 мл, 5,9 ммоль, 1,5 моль/л) и смесь охлаждали до 0°C. К реакционной смеси порциями добавляли перманганат калия (2,07 г, 13,0 ммоль) и смесь нагревали до к.т. и перемешивали в течение 50 мин, сразу после чего TLC указывала на завершение реакции. Реакционную смесь фильтровали через целит, твердые вещества промывали с помощью  $\text{CHCl}_3$  и полученную органическую смесь промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$ , солевого раствора, сушили над  $\text{MgSO}_4$  и очищали с помощью Isolera (20-50% EtOAc в изо-гексане) с получением смеси N-(4-нитро-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамида I4 и N-(2-нитро-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамида (709 мг, 2,86 ммоль, 66%) в виде белого/желтого твердого вещества. LC/MS (способ А): время удерживания 1,44 мин ( $\text{ES}^+$ ) масса/заряд 190  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

d) 8-Амино-5-нитро-3,4-дигидронафталин-1 (2H)-он (I5).

Смесь N-(4-нитро-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамида I4 и N-(2-нитро-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамида (709 мг, 2,8561 ммоль) и 6 н. хлористоводородную кислоту (7 мл) перемешивали при 80°C в течение 2,5 ч, срезу после чего LCMS указывала на завершение реакции. Реакционную смесь охлаждали на ледяной бане и 6 н. раствор NaOH добавляли до тех пор, пока значение pH не стало основным. Водную смесь экстрагировали с помощью  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , органическую фазу сушили над  $\text{MgSO}_4$  и концентрировали *in vacuo*. Очистка с помощью Isolera (0-50% EtOAc *in* изо-гексане) привела к получению 8-амино-5-нитро-3,4-дигидронафталин-1(2H)-она I5 (320 мг, 1,552 ммоль, выход 54%) в виде желтого/оранжевого твердого вещества. LC/MS (способ А): время удерживания 1,54 мин ( $\text{ES}^+$ ) масса/заряд 207  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

e) 2,2,2-Трифтор-N-(4-нитро-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамид (I6).

8-Амино-5-нитро-3,4-дигидронафталин-1(2H)-он I5 (430 мг, 2,0854 ммоль) растворяли в дихлорметане (20 мл). Добавляли пиридин (340 мкл, 4,20 ммоль) и смесь охлаждали до 0°C. Добавляли ангидрид трифторуксусной кислоты (590 мкл, 4,197 ммоль) и перемешивали в течение 30 мин, сразу после чего LCMS указывала на завершение реакции. Смесь разбавляли с помощью  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$ , органическую фазу сушили над  $\text{MgSO}_4$  и концентрировали *in vacuo* с получением 2,2,2-трифтор-N-(4-нитро-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамида I6 (630 мг, 2,0846 ммоль, выход >99%) в виде желтого твердого вещества, которое применяли без дополнительной очистки. LC/MS (способ А): время удерживания 1,86 мин ( $\text{ES}^+$ ) масса/заряд 301X  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

f) N-(4-Амино-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)-2,2,2-трифторацетамид (I7).

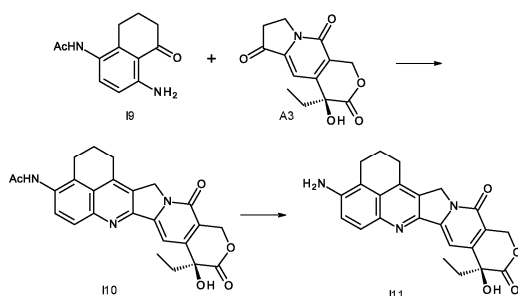
Цинк (2,73 г, 41,7 ммоль) суспендировали в метаноле (80 мл), муравьиной кислоте (4 мл) и воде (4 мл) и смесь охлаждали до 0°C. Порциями добавляли 2,2,2-трифтор-N-(4-нитро-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамид I6 (568 мг, 2,0865 ммоль) и смесь перемешивали при 0°C в течение 30 мин, сразу после чего LCMS указывала на завершение реакции. Реакционную смесь фильтровали, фильтрат разбавляли с помощью EtOAc и промывали с помощью насыщ.  $\text{NaHCO}_3$ . Органическую фазу сушили над  $\text{MgSO}_4$  и концентрировали *in vacuo* с получением N-(4-амино-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)-2,2,2-трифторацетамида I7 (568 мг, 2,0865 ммоль, выход >99%) в виде желтого твердого вещества, которое применяли без дополнительной очистки. LC/MS (способ А): время удерживания 1,65 мин ( $\text{ES}^+$ ) масса/заряд 273  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

g) N-(4-Ацетамидо-8-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)-2,2,2-трифторацетамид (I8).

N-(8-амино-4-оксотетралин-5-ил)-2,2,2-трифторацетамид I7 (568 мг, 2,0865 ммоль) растворяли в дихлорметане (20 мл). Добавляли триэтиламин (580 мкл, 4,16 ммоль), а затем ацетилхлорид (297 мл, 4,173 ммоль) и смесь перемешивали в течение 30 мин, сразу после чего LCMS указывала на завершение реакции. Реакционную смесь разбавляли с помощью  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$ , органическую фазу сушили над  $\text{MgSO}_4$  и концентрировали *in vacuo* с получением N-(8-ацетамидо-4-оксотетралин-5-ил)-2,2,2-трифторацетамида I8 (655 мг, 2,084 ммоль, выход >99%) в виде желтого твердого вещества, которое применяли без дополнительной очистки. LC/MS (способ А): время удерживания 1,55 мин ( $\text{ES}^+$ ) масса/заряд 315  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

h) N-(4-Амино-5-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)ацетамид (I9).

N-(8-ацетамидо-4-оксотетралин-5-ил)-2,2,2-трифторацетамид I8 (2,77 г, 8,81 ммоль) растворяли в метаноле (240 мл) и воде (17 мл). Добавляли карбонат калия (4,88 г, 35,3 ммоль) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч при 50°C, сразу после чего LCMS указывала на завершение реакции. Реакционную смесь охлаждали, концентрировали *in vacuo*, растворяли в 10% MeOH в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$ . Органическую фазу сушили над  $\text{MgSO}_4$  и очищали посредством хроматографии с применением Isolera (2-15% MeOH в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) с получением 7V-(8-амино-1-оксотетралин-5-ил)ацетамида I9 (1,20 г, 5,50 ммоль, выход 62,3%) в виде желтого твердого вещества. LC/MS (способ А): время удерживания 0,98 мин ( $\text{ES}^+$ ) масса/заряд 219  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



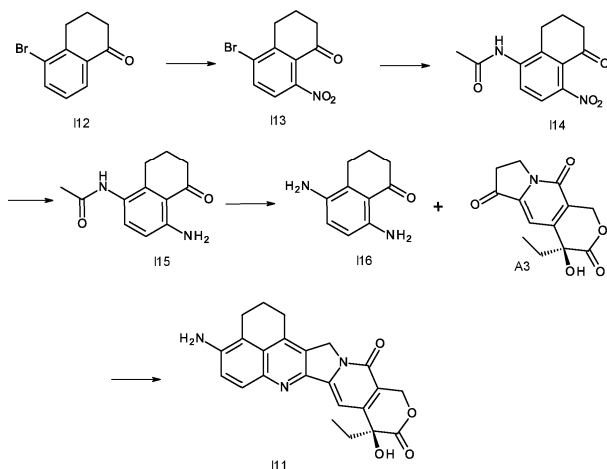
i) (S)-N-(9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1Н,12Н-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-б]хинолин-4-ил)ацетамид (I10).

N-(8-амино-1-оксотетралин-5-ил)ацетамид I9 (641 мг, 2,94 ммоль, 1,0 экв.), (S)-4-этил-4-гидрокси-7,8-дигидро-1Н-пирано[3,4-*f*]индолизин-3,6,10(4Н)-трион A3 (840 мг, 3,19 ммоль, 1,1 экв.) и PPTS (740 мг, 2,95 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в толуоле (60 мл) и перемешивали с обратным холодильником в течение 3 ч, сразу после чего LCMS указывала на то, что I9 израсходовался. Реакционную смесь охлаждали и концентрировали *in vacuo*. Полученные твердые вещества растирали с ацетонитрилом, а затем с ацетоном с получением I10 в виде коричневого твердого вещества с незначительной примесью TsOH (1,26 г, 96%). LC/MS (способ А): время удерживания 1,32 мин. ( $ES^+$ ) масса/заряд 447  $[M+H]^+$ .

j) (S)-4-амино-9-этил-9-гидрокси-1,2,3,9,12,15-гексагидро-10Н,13Н-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-б]хинолин-10,13-дион (I11).

(S)-N-(9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1Н,12Н-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-б]хинолин-4-ил)ацетамид (I10) (1,26 г, 2,83 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в хлористоводородной кислоте (6 моль/л) в  $H_2O$  (12 мл) и смесь перемешивали в течение 5 ч при  $80^\circ C$ , сразу после чего LCMS указывала на то, что I10 израсходовался. Реакционную смесь разбавляли с помощью  $H_2O$  и концентрировали *in vacuo* с получением (S)-4-амино-9-этил-9-гидрокси-1,2,3,9,12,15-гексагидро-10Н,13Н-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-б]хинолин-10,13-диона I11 (1,51 г, 2,85 ммоль, 90 мас.%, выход 101%) в виде красного кристаллического твердого вещества. LC/MS (способ А): время удерживания 1,36 мин. ( $ES^+$ ) масса/заряд 405  $[M+H]^+$ .

Альтернативный способ синтеза I11



Способ ИРС, контроля чистоты и анализа для данного синтеза

Устройство	Thermo U-3000		
Колонка	ACE Excel 3 C18- PFP (3,0 мм × 150 мм)		
Термостат	40°C		
Подвижная фаза	А: 10 мМ формиата аммония в воде, pH=3,5		
	В: CAN		
Программа градиента	Время (мин)	A%	B%
	0,0	90	10
	20,0	10	90
	23,0	10	90
	24,0	90	10
	30,0	90	10
	Время повторного уравнивания: 6 мин		
Скорость потока	1,0 мл/мин		
Детектор	УФ 220 нм		
Разбавитель	ACN		

## а) 5-Бром-8-нитротетралин-1-он (I13).

Раствор нитрата калия (1,15 экв., 13,83 г), растворенного в серной кислоте (конц., 5,0 отн. об., 160 мл), добавляли (время добавления 4-12 ч., поддержание температуры ниже 10°C) к раствору 5-бромтетралин-1-она (I12) (1,0 экв., 26,77 г) в серной кислоте (конц., 5,0 отн. об., 160 мл) в атмосфере азота. После завершения реакции реакцию смесь переносили в колбу, содержащую воду (36 отн. об., 1,15 л), регулируя скорость переноса таким образом, чтобы поддерживать температуру ниже 10°C. Полученное твердое вещество фильтровали, трижды промывали водой (4,0 отн. об., 128 мл) и затем сушили при ~40°C в течение 24 ч. Сухой осадок растворяли в смеси ацетона (2,5 отн. об., 80 мл) и воды (0,38 отн. об., 12,2 мл), нагретой до ~75°C, и затем охлаждали до ~20°C. Полученное твердое вещество удаляли посредством фильтрации. Растворитель заменяли на этанол посредством перегонки и объем раствора сокращали до 2,0 отн. об. (64 мл). Раствор охлаждали до ~25°C и полученное твердое вещество собирали посредством фильтрации. Твердое вещество промывали этанолом (1,0 отн. об., 32 мл), затем сушили под вакуумом при 40°C с получением 5-бром-8-нитротетралин-1-она I13 (15,36 г, 40%) в виде коричневого твердого вещества; RT 14,0 мин.

## Способ 1. Способ ИРС, контроля чистоты и анализа для бром-8-нитротетралин-1-она

Устройство	Thermo U-3000		
Колонка	ACE Excel 3 C18- PFP (3,0 мм × 150 мм)		
Термостат	40°C		
Подвижная фаза	А: 10 mM формиата аммония в воде, pH=3,5		
	В: ACN		
Программа градиента	Время (мин)	A%	B%
	0,0	90	10
	20,0	10	90
	23,0	10	90
	24,0	90	10
	30,0	90	10
	Время повторного уравнивания: 6 мин		
Скорость потока	1,0 мл/мин		
Детектор	УФ 220 нм		
Разбавитель	ACN		

## b) N-(8-нитро-1-оксотетралин-5-ил)ацетамид (I14)

Раствор бром-8-нитротетралин-1-она (I13) (1,0 экв., 18,0 г, 90,6% вес./вес.), ацетамида (1,2 экв., 4,72 г), трис(дибензилиденацетон)дипалладия(0) (0,01 экв., 0,61 г) и фосфата калия (1,4 экв., 19,8 г) в диоксане (15 отн. об., 270 мл) в атмосфере азота нагревали до ~70°C. После завершения реакции раствор охлаждали до ~20°C, а также разбавляли диоксаном (5 отн. об., 90,0 мл) и фильтровали. Растворитель заменяли на этанол и объем сокращали до общего реакционного объема, составляющего 3 отн. об. (54,0 мл). Раствор охлаждали до ~20°C и полученное твердое вещество собирали посредством фильтрации и промывали с помощью МТВЕ (метил-трет-бутиловый эфир) (1,0 отн. об., 18,0 мл). Твердое вещество сушили под вакуумом при 40°C с получением N-(8-нитро-1-оксотетралин-5-ил)ацетамида I14 (10,0 г, 60,6%) в виде темно-желтого твердого вещества; RT 8,86 мин.

## c) N-(8-амино-1-оксотетралин-5-ил)ацетамид (I15)

Гидроксид палладия на угле (20% вес./вес., 0,15 экв., 5,25 г) добавляли к раствору N-(8-нитро-1-оксотетралин-5-ил)ацетамида (I14) (1,0 экв., 32,6 г) в метаноле (40 отн. об., 1250 мл). Реакционную смесь помещали в атмосферу водорода при давлении ~40 фунт/кв. дюйм и температуре ~40°C на 8 ч. Водород удаляли и заменяли азотом, и катализатор удаляли посредством фильтрации через целлюлозу, промывая целлюлозу метанолом (4,0 отн. об., 130 мл). Объем раствора сокращали до 4,0 отн. об. посредством перегонки и затем разбавляли с помощью МТВЕ (4 отн. об. 130 мл). Полученное твердое вещество собирали посредством фильтрации, промывали с помощью МТВЕ (2 отн. об., 65 мл) и сушили под вакуумом при 40°C с получением N-(8-амино-1-оксотетралин-5-ил)ацетамида I15 (21,1 г, 77,8%) в виде серо-зеленого твердого вещества; RT 5,44 мин.

## d) 5,8-Диаминотетралин-1-он (I16)

Раствор N-(8-амино-1-оксотетралин-5-ил)ацетамида (I15) (1,0 экв., 10,0 г) в хлористоводородной кислоте (5 M, 6,0 отн. об., 60 мл) выдерживали при ~90°C в течение 3 ч. Температуру понижали до 25°C и добавляли гидроксид натрия (2 M, 4,0 отн. об., 40 мл) до тех пор, пока не достигалось значение pH, составляющее 10,0, при этом поддерживая температуру 25°C. Полученное твердое вещество собирали посредством фильтрации и промывали водой (2,0 отн. об., 20 мл). Влажный осадок растворяли в тетрагидрофуране (60 отн. об., 600 мл) и фильтровали. Раствор концентрировали до 5,0 отн. об. и добавляли гептан (20 отн. об., 200 мл). Раствор концентрировали до 10,0 отн. об. и дополнительно добавляли гептан (20 отн. об., 200 мл), а затем объем снова сокращали до 10,0 отн. об. Полученное твердое вещество собирали посредством фильтрации и промывали гептаном (5,0 отн. об., 50 мл). Твердое вещество сушили под

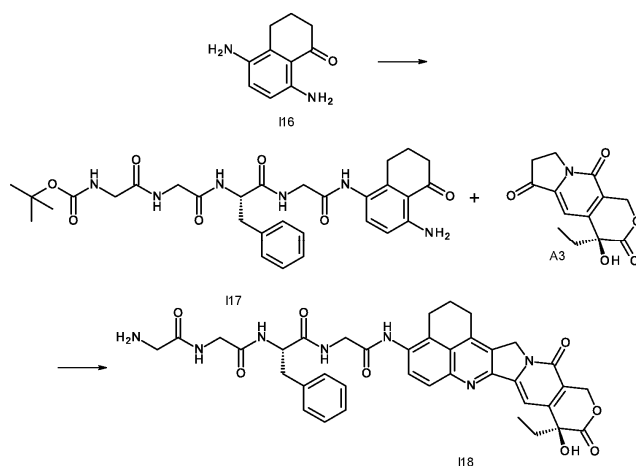


вакуумом при 40°C в течение 17 ч с получением 5,8-диаминотетралин-1-она (I16) (6,90 г, 82,7%) в виде желтого твердого вещества; <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 1,82 (m, 2H), 2,38 (t, J=2,0 Гц, 2H), 2,47 (t, J=2,0 Гц, 2H), 6,34 (d, J=2,0 Гц, 1H), 6,68 (d, J=2,0 Гц, 1H); RT 3,90.

е) (S)-4-амино-9-этил-9-гидрокси-1,2,3,9,12,15-гексагидро-10H,13H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-10,13-дион (I11).

Раствор 5,8-диаминотетралин-1-она (I16) (1,0 экв., 5,0 г), (4S)-4-этил-4-гидрокси-7,8-дигидро-1H-пирано[3,4-f]индолизин-3,6,10-триона (A3) (1,06 экв., 7,9 г) и пара-толуолсульфоната пиридиния (1,0 экв., 7,2 г) в толуоле (50,0 отн. об., 250 мл) выдерживали при 120°C в течение 15 ч. Объем раствора сокращали до 2,0 отн. об. и затем разбавляли ацетонитрилом (20 отн. об., 100 мл) и водой (20 отн. об., 100 мл). Полученную взвесь фильтровали и твердое вещество промывали водным ацетонитрилом (1:1, 20 отн. об., 100 мл). Твердое вещество суспендировали в водном метаноле (вода:MeOH 3:1, 40 отн. об., 200 мл), фильтровали и промывали водным метанолом (1:1, 20 отн. об., 100 мл). Твердое вещество суспендировали в воде (60 отн. об., 300 мл) при 50°C, фильтровали и промывали водой (10 отн. об., 50 мл). Твердое вещество суспендировали в водном ацетонитриле (вода: ацетонитрил, 1:3, 40 отн. об., 200 мл) при 30°C, фильтровали и промывали водным ацетонитрилом (вода: ацетонитрил, 1:3, 5 отн. об., 50 мл) и затем сушили под вакуумом при 40°C с получением (S)-4-амино-9-этил-9-гидрокси-1,2,3,9,12,15-гексагидро-10H,13H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-10,13-диона (I11) в виде белого твердого вещества (5,0 г, 43,7%); RT 5,13.

Синтез I18.



а) трет-Бутил-(S)-2-((2-((1-((2-((4-амино-5-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)карбамат (I17)

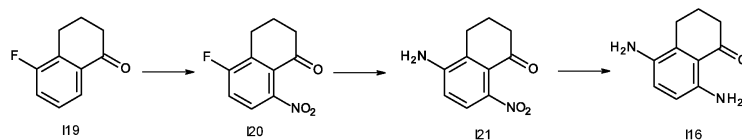
Вос-GGFG-OH (227 мг, 0,52 ммоль) и EEDQ (157 мг, 0,634 ммоль) солибилизировали в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл) и смесь перемешивали в течение 15 мин, пока пептид не переходил в раствор. Затем добавляли соединение I16 (100 мг, 0,56747 ммоль) и смесь оставляли перемешиваться до завершения реакции. По результатам LVMS через 1 ч реакция выглядела завершенной на 90%. Смесь становилась более густой по мере осаждения продукта. Смесь оставляли на еще один час перед проведением вакуумной сушки. Неочищенное вещество поглощали в Et<sub>2</sub>O (50 мл). Твердое вещество фильтровали и затем поглощали в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 мл) для дополнительной очистки. Твердое вещество фильтровали и сушили с получением продукта I17 (273 мг, 0,459 ммоль, выход 80,9%) в виде серого твердого вещества. Данные анализа: LCMS 3 мин: ES<sup>+</sup>=1,46 мин, масса/заряд 595,7 [M+H]<sup>+</sup>.

б) (S)-2-(2-(2-Аминоацетида)ацетида)-N-(2-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-2-оксоэтил)-3-фенилпропанамид (I18)

Анилин I17 (450 мг, 1,045 ммоль), лактон A5 (280 мг, 1,064 ммоль) и н-толуолсульфонат пиридиния (273 мг, 1,086 ммоль) солибилизировали в толуоле (20 мл) и смесь нагревали до 150°C (при высоком коэффициенте дефлегмации). Для содействия солибилизации смеси добавляли MeOH (4 мл). Через 7 ч неочищенную реакционную смесь доводили до сухости в вакууме.

Неочищенный продукт очищали посредством хроматографии на силикагеле (CHCl<sub>3</sub>/MeOH, от 100% до 65:35) с получением продукта I18 (259 мг, 0,359 ммоль, выход 78,1). Данные анализа: LCMS 3 мин: ES<sup>+</sup>=1,17 мин, масса/заряд 722,8 [M+H]<sup>+</sup>.

Альтернативный способ синтеза I16.



а) 5-Фтор-8-нитротетралин-1-он (I20)

5-Фтортетралин-1-он I19 (4,7 г, 29 ммоль) солибилизировали в 1/2 количества серной кислоты (120 мл) в 3-горлой круглодонной колбе. Смесь перемешивали до полного растворения твердого вещества и затем охлаждали до 0-5°C. В капельной воронке растворяли нитрат калия (3 г, 29,6730 ммоль) в оставшейся половине серной кислоты (120 мл) при 0-5°C. Медленно добавляли к смеси SM, следя, чтобы раствор оставался прохладным (45 мин). Перемешивали при 0-5°C до завершения реакции. Затем реакционную смесь гасили с помощью воды (250 мл) и оставляли перемешиваться при 0-5°C. Твердое вещество фильтровали и промывали водой (50 мл). Твердое вещество сушили в вакуумной печи в течение 2 ч при 50°C. Неочищенное твердое вещество суспендировали в Et<sub>2</sub>O на протяжении ночи, а затем охлаждали до 0°C и фильтровали. Влажный осадок промывали дополнительным количеством холодного Et<sub>2</sub>O (50 мл) и оставляли сушиться в вакуумной печи при 50°C с получением чистого продукта I20 (5,5 г, 26 ммоль, выход 92%) в виде светло-розового тонкодисперсного порошка. LCMS (Способ В): ES<sup>+</sup>=1,55 мин, масса/заряд 210,1 [M+H]<sup>+</sup>.

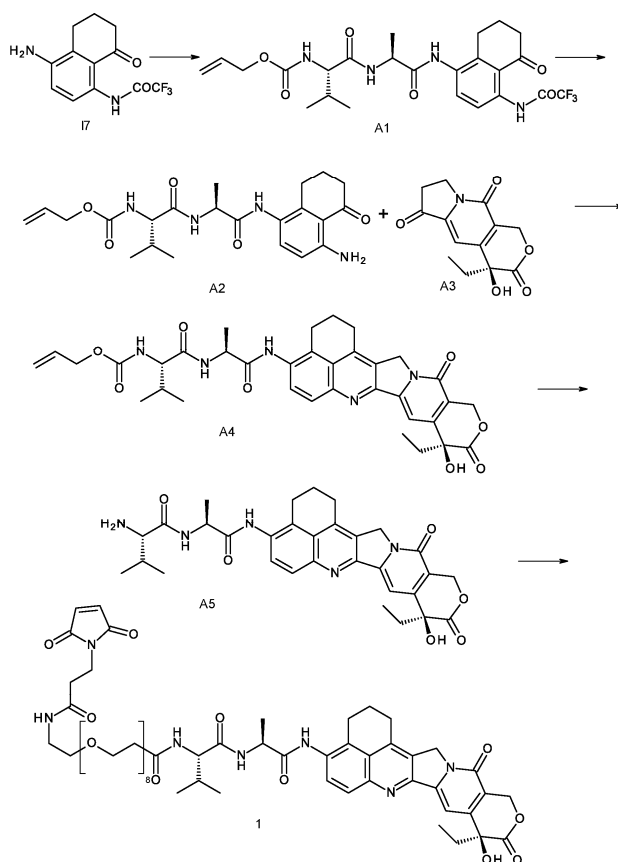
b) 5-Амино-8-нитротетралин-1-он (I21)

Соединение I20 (2,7 г, 13 ммоль) солибилизировали в CH<sub>3</sub>CN (2,5 мл) и NH<sub>4</sub>OH (21 мас.%) в H<sub>2</sub>O (8 мл, 40 ммоль) вносили в герметично закрываемую устойчивую к давлению пробирку и нагревали до 185°C. После завершения смесь переносили в круглодонную колбу и обрабатывали вакуумом. Неочищенное вещество очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (CHCl<sub>3</sub>/MeOH; от 100 до 99:1) с получением чистого продукта I21 (1,1 г, 5,3 ммоль, выход 41%) в виде черного твердого вещества. LCMS (Способ В): ES<sup>+</sup>=1,34 мин, масса/заряд 207,1 [M+H]<sup>+</sup>.

c) 5,8-Диаминотетралин-1-он (I16)

Соединение I21 (1,35 г, 6,55 ммоль) растворяли в смеси метанола (20 мл), H<sub>2</sub>O (1 мл) и муравьиной кислоты (1 мл) при 0°C. Медленно добавляли цинк (8,5 г, 130 ммоль), следя за поддержанием температуры ниже 40°C. Для ускорения завершения реакции добавляли дополнительное небольшое количество муравьиной кислоты/H<sub>2</sub>O (0,5 мл). Реакционную смесь фильтровали и фильтрат разбавляли с помощью EtOAc и CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> с последующей обработкой вакуумом. Неочищенное вещество вводили сухим способом в систему для проведения колоночной хроматографии на силикагеле (CHCl<sub>3</sub>/EtOAc; от 100 до 7:3, затем CHCl<sub>3</sub>/MeOH; от 99:1 до 98:2) с получением чистого продукта I16 (1,015 г, 5,760 ммоль, выход 88,0%). LCMS (Способ В): ES<sup>+</sup>=0,2 мин, масса/заряд не наблюдали.

Пример 1.



a) Аллил-((S)-3-метил-1-оксо-1-(((S)-1-оксо-1-((5-оксо-4-(2,2,2-трифторацетамидо)-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)амино)пропан-2-ил)амино)бутан-2-ил)карбамат (A1)

DCC (6,54 г, 31,7 ммоль) и HOPO (3,36 г, 30,2 ммоль) добавляли к раствору alloc-Val-Ala-OH (9,09 г, 31,7 ммоль) и I7 (7,85 г, 28,8 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 мл) при 25°C. Полученную смесь оставляли перемешиваться в течение ночи. Белое твердое вещество, которое образовалось во время протекания реакции,

отфильтровывали и промывали с помощью холодного  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Фильтрат промывали водой (150 мл) и соевым раствором (150 мл). Органический слой сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и выпаривали. Неочищенный продукт очищали посредством хроматографии на силикагеле (Hex/EtOAc, 60:40). Выделенный продукт A1 содержал примесь в виде совместно элюированного DCU (21,1 г, выход 140%). LC/MS (Способ В):  $\text{ES}^+=1,81$  мин, масса/заряд 527,6  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

б) Аллил-((S)-1-(((S)-1-((4-амино-5-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат (A2)

Защищенный анилин A1 (18 г, 34,19 ммоль) солюбилизировали в смеси MeOH и  $\text{H}_2\text{O}$  10:1 (165 мл) и добавляли  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (10 г, 72,36 ммоль). Смесь перемешивали при  $50^\circ\text{C}$  до завершения реакции. Смесь обрабатывали вакуумом до почти полной сухости и остаток поглощали с помощью  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  и солевого раствора, затем сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и выпаривали. Неочищенный продукт очищали посредством хроматографии на силикагеле ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , от 100% до 7:3). Выделенный продукт A2 содержал совместно элюированную примесь (10,71 г, выход 73%). LC/MS (Способ В):  $\text{ES}^+=1,46$  мин, масса/заряд 431,7  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

с) Аллил-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-бутан-2-ил)карбамат (A4)

Анилин A2 (450 мг, 1,045 ммоль), лактон A3 (280 мг, 1,064 ммоль) и *n*-толуолсульфонат пиридиния (273 мг, 1,086 ммоль) солюбилизировали в толуоле (20 мл) и смесь нагревали до  $130^\circ\text{C}$  (при высоком коэффициенте дефлегмации). Для содействия солюбилизации смеси периодически добавляли несколько капель MeOH. Через 7 ч неочищенную реакционную смесь доводили до сухости в вакууме. Неочищенный продукт очищали посредством хроматографии на силикагеле ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , от 100% до 95:5) с получением продукта A4 (360 мг, выход 52,3%). LC/MS (Способ В):  $\text{ES}^+=1,51$  мин, масса/заряд 658,8  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

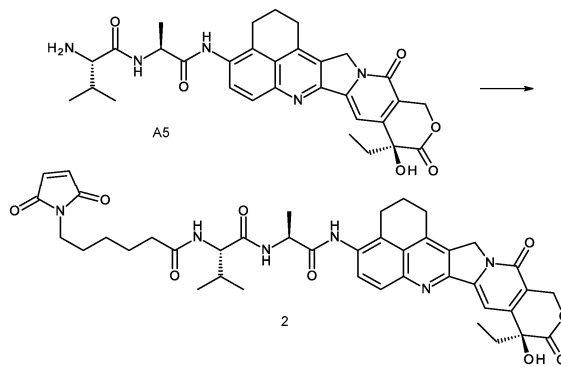
д) Аллил-(S)-2-амино-N-((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)-3-метил-бутанамид (A5)

Избыток пиперидина (642 мкл) добавляли к раствору A4 (543 мг, 0,82 ммоль) и  $\text{PdP}(\text{Ph}_3)_4$  (89 мг, 0,08 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 мл). Смесь оставляли перемешиваться при комнатной температуре в течение 20 мин, по окончании которых реакция была завершена (при контроле посредством LC/MS). Реакционную смесь разбавляли с помощью  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 мл) и органическую фазу промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  (25 мл) и солевого раствора (25 мл). Органическую фазу сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и избыток растворителя удаляли посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении с получением неочищенного продукта A5, который применяли без дополнительной очистки на следующей стадии. LC/MS (Способ В):  $\text{ES}^+=1,15$  мин, масса/заряд 574,6  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

е) 1-(3-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагептакозан-27-амид (1).

Пиридин (83 мкл, 1,03 ммоль) и Mal-dPEG<sub>8</sub>-OTFP (767 мг, 1,03 ммоль) добавляли к раствору неочищенного A5 (расчетное количество 1,03 ммоль) в сухом  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 мл) в атмосфере аргона. Реакционную смесь перемешивали на протяжении ночи и, поскольку реакция не завершилась, добавляли 0,5 экв. Mal-dPEG<sub>8</sub>-OTFP в качестве попытки ускорить реакцию. Реакционную смесь разбавляли с помощью  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 мл) и органическую фазу промывали с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  (2×50 мл) и солевого раствора, затем сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и избыток растворителя удаляли посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали посредством HPLC с обращенной фазой (градиент  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  +0,05% FA) и подвергали сублимационной сушке с получением 1 (1,189 г, выход 31% после 2 стадий). LC/MS (Способ В):  $\text{ES}^+=1,43$  мин, масса/заряд 1149,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . LC/MS (Способ С):  $\text{ES}^+=5,37$  мин, масса/заряд 1149,4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

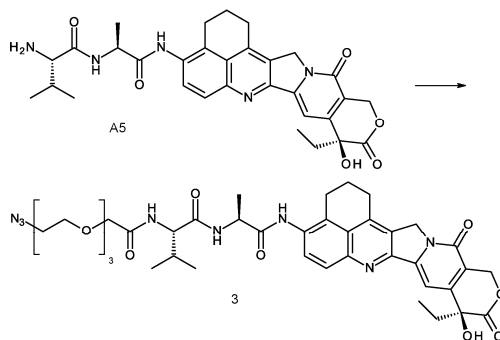
## Пример 2.



6-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)гексанамида (2)

Mal-капроновую кислоту (56 мг, 0,26 ммоль) и EDCI.HCl (51 мг, 0,26 ммоль) добавляли к раствору неочищенного A5 (расчетное количество 0,26 ммоль) в сухом CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 мл) в атмосфере аргона. Реакционную смесь перемешивали на протяжении ночи и, поскольку реакция не завершилась, добавляли дополнительные 0,5 экв. Mal-капроновой кислоты и EDCI.HCl. Реакционную смесь разбавляли с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл) и органическую фазу промывали с помощью H<sub>2</sub>O (2×50 мл) и солевого раствора, затем сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и избыток растворителя удаляли посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 95:5) с получением 2 (31,6 мг, выход 20% после 2 стадий). LC/MS (Способ В): ES<sup>+</sup>=1,56 минуты, масса/заряд 767,8 [M+H]<sup>+</sup>. LC/MS (Способ С) 15мин: ES<sup>+</sup>=6,05 мин, масса/заряд 767,8 [M+H]<sup>+</sup>.

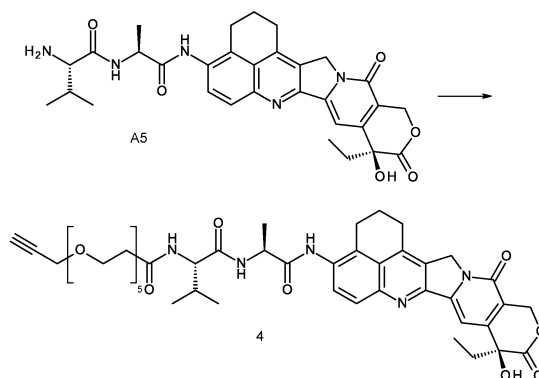
## Пример 3.



(S)-2-(2-(2-(2-(2-Азидоэтокси)этокси)этокси)ацетиламино)-N-((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)-3-метилбутанамида (3).

Азидо-dPEG<sub>3</sub>-кислоту (77,5 мг, 0,31 ммоль) и EDCI.HCl (60 мг, 0,31 ммоль) добавляли к раствору неочищенного A5 (расчетное количество 0,31 ммоль) в сухом CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 мл) в атмосфере аргона. Реакционную смесь перемешивали на протяжении ночи и, поскольку реакция не завершилась, добавляли дополнительные 0,5 экв. азидо-dPEG<sub>3</sub>-OH и EDCI.HCl. Реакционную смесь разбавляли с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл) и органическую фазу промывали с помощью H<sub>2</sub>O (2×50 мл) и солевого раствора, затем сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и избыток растворителя удаляли посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали посредством препаративной HPLC и фракции подвергали сублимационной сушке с получением чистого 3 (92,2 мг, выход 24,7% после 2 стадий). LC/MS (Способ В): ES<sup>+</sup>=1,69 мин, масса/заряд 789,9 [M+H]<sup>+</sup>. LC/MS (Способ С): ES<sup>+</sup>=6,68 мин, масса/заряд 790,0 [M+H]<sup>+</sup>.

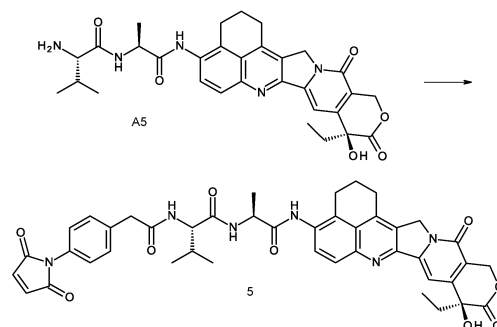
## Пример 4.



N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-4,7,10,13,16-пентаоксанадек-18-инамид (4).

Пропаргил-dPEG<sub>5</sub>-кислоту (56 мг, 0,19 ммоль) и EDCI.HCl (37 мг, 0,19 ммоль) добавляли к раствору неочищенного A5 (расчетное количество 0,19 ммоль) в сухом CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл) в атмосфере аргона. Реакционную смесь перемешивали на протяжении ночи и, поскольку реакция не завершилась, добавляли дополнительные 0,5 экв. пропаргил-dPEG<sub>5</sub>-OH и EDCI.HCl. Реакционную смесь разбавляли с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл) и органическую фазу промывали с помощью H<sub>2</sub>O (2×50 мл) и солевого раствора, затем сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и избыток растворителя удаляли посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали посредством препаративной HPLC и фракции подвергали сублимационной сушке с получением чистого 4 (22 мг, выход 16,7% после 2 стадий). LC/MS (Способ В): ES<sup>+</sup>=1,54 минуты, масса/заряд 860,9 [M+H]<sup>+</sup>. LCMS (Способ С): ES<sup>+</sup>=5,57 мин, масса/заряд 860,9 [M+H]<sup>+</sup>.

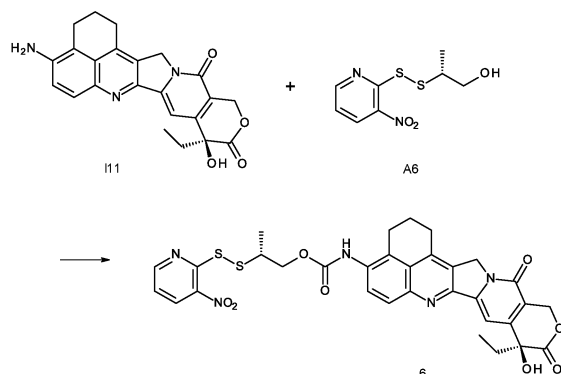
## Пример 5.



(S)-2-(2-(4-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)фенил)ацетиламино)-N-((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)-3-метилбутанамид (5).

PM-уксусная кислота-OSu (64 мг, 0,19 ммоль) добавляли к раствору неочищенного A5 (расчетное количество 0,19 ммоль) в сухом CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл) в атмосфере аргона. Реакция не протекала, поэтому добавляли DIPEA (51 мкл, 0,28 ммоль). Реакционную смесь перемешивали вплоть до завершения реакции. Смесь разбавляли с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл) и органическую фазу промывали с помощью H<sub>2</sub>O (2×50 мл) и солевого раствора, затем сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и избыток растворителя удаляли посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении посредством ротационного выпаривания при пониженном давлении. Неочищенное вещество очищали посредством препаративной HPLC и фракции подвергали сублимационной сушке с получением чистого 5 (2,5 мг, выход 1,6% после 2 стадий). LC/MS (Способ В): ES<sup>+</sup>=1,54 мин, масса/заряд 787,7 [M+H]<sup>+</sup>. LC/MS (Способ С): ES<sup>+</sup>= 5,61 мин, масса/заряд 787,8 [M+H]<sup>+</sup>.

## Пример 6.

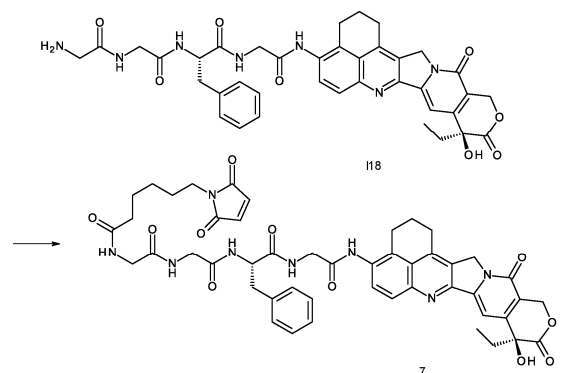


(R)-2-((3-нитропиридин-2-ил)дисульфанил)пропил-((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)карбамат (6).

(i) (2R)-2-[(3-нитро-2-пиридил)дисульфанил]пропан-1-ол A6 (25 мг, 0,1015 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в дихлорметане (1 мл). Добавляли пиридин (8,5 мкл, 0,11 ммоль, 1,0 экв.), затем добавляли трифосген (11 мг, 0,0370685 ммоль, 0,33 экв.) и смесь перемешивали в атмосфере Ag в течение 45 мин, сразу после чего LCMS (гашение с помощью Et<sub>2</sub>NH) указывала на образование соответствующего карбамата.

(ii) (S)-4-амино-9-этил-9-гидрокси-1,2,3,9,12,15-гексагидро-10H,13H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-10,13-дион (I11) (43 мг, 0,09026 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в дихлорметане (2 мл), N,N-диизопропилэтиламине (42 мкл, 0,241 ммоль, 2,7 экв.) и пиридине (25 мкл, 0,309 ммоль, 3,4 экв.). Добавляли реакционную смесь из стадии (i) и смесь перемешивали в течение 30 мин, сразу после чего LCMS указывала на завершение реакции. Реакционную смесь концентрировали *in vacuo* и очищали посредством хроматографии с применением Isolera (0-4% MeOH в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) с получением 6 (22 мг, 0,03256 ммоль, выход 36%, QC=96,8%) в виде желтого твердого вещества. LC/MS (Способ B): RT=1,86 мин, 676,6 [M+H]<sup>+</sup>.

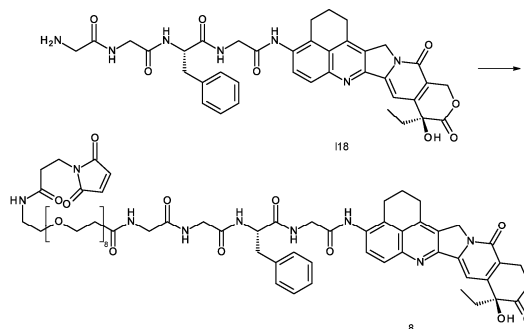
## Пример 7.



6-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-N-(2-(((S)-1-((2-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-2-оксоэтил)гексанамид (7).

Соединение I18 (259 мг, 0,3588 ммоль) солибилизировали в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 мл). Исходный материал был полностью нерастворим, поэтому добавляли DMA (1 мл). Так как улучшения не наблюдали, добавляли DIPEA (68 мкл, 0,390 ммоль) и все твердое вещество перешло в раствор. Добавляли малеимидкапроновую кислоту (69 мг, 0,358 ммоль) и смесь оставляли перемешиваться при к.т. на протяжении ночи, и после этого анализ LCMS показал завершение реакции. Реакционную смесь гасили с помощью MeOH (2 мл) и обрабатывали вакуумом до сухости. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC и затем подвергали сублимационной сушке с получением соединения 7 в виде коричневатожелтого твердого вещества (38,2 мг, выход 11%). Данные анализа: LCMS 3 мин: ES<sup>+</sup>=1,47 мин, масса/заряд 916,2 [M+H]<sup>+</sup>. LCMS 15 мин: ES<sup>+</sup>=5,46 мин, масса/заряд 916,1 [M+H]<sup>+</sup>.

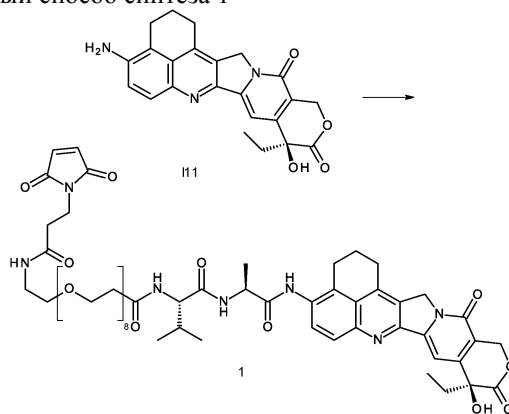
## Пример 8.



1-(3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-N-(2-((2-(((S)-1-((2-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-1-оксо-3-фенилпропан-2-ил)амино)-2-оксоэтил)амино)-2-оксоэтил)-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагептакозан-27-амид (8).

Соединение 118 (70 мг, 0,096 ммоль) сольбилизировали в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 мл). Исходный материал был полностью нерастворим, поэтому добавляли DMA (0,5 мл). Так как улучшения не наблюдали, добавляли DIPEA (19 мкл, 0,106 ммоль) и все твердое вещество перешло в раствор. Добавляли Mal-dPEG<sub>8</sub>-OH (63 мг, 0,106 ммоль) и EDCI.HCl (19 мг, 0,099 ммоль) и смесь оставляли перемешиваться при к.т. на протяжении ночи, после чего анализ LCMS показал завершение реакции. Реакционную смесь гасили с помощью MeOH (2 мл) и обрабатывали вакуумом до сухости. Неочищенный продукт очищали посредством препаративной HPLC и затем подвергали сублимационной сушке с получением 8 в виде коричневатого-желтого твердого вещества (30 мг, выход 24%). LCMS 3 мин:  $\text{ES}^+ = 1,44$  мин, масса/заряд 1297,6  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

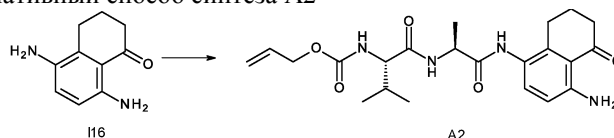
## Пример 9. Альтернативный способ синтеза 1



(S)-4-Амино-9-этил-9-гидрокси-1,2,3,9,12,15-гексагидро-10H,13H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-10,13-дион 111 (371 мг, 0,779 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в дихлорметане (30 мл). Добавляли N,N-диизопропилэтиламин (69 мкл, 0,396 ммоль, 0,51 экв.) и (2S)-2-[[[(2S)-2-[3-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[3-(2,5-диоксопиррол-1-ил)пропаноиламино]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]этокси]пропаноиламино]-3-метилбутаноил]амино]пропановую кислоту (664 мг, 0,871 ммоль, 1,1 экв.) в N,N-диметилацетамиде (10 мл), затем добавляли EDCI.HCl (226 мг, 1,18 ммоль, 1,5 экв.) и смесь перемешивали в течение 2 ч, сразу после чего LCMS указывала на достаточный уровень превращения, однако отмечалось, что реакция прервалась. Реакционную смесь нагревали до 30°C и перемешивали в течение 30 мин, при этом LCMS указывала на отсутствие изменений, поэтому  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  удаляли *in vacuo* и к полученному раствору в DMA добавляли  $\text{Et}_2\text{O}$ . Собирали осажденное масло,  $\text{Et}_2\text{O}$  удаляли *in vacuo* и процесс осаждения повторяли. Объединенные осадки очищали посредством HPLC (10-60% В в А в течение 13 мин) с получением 1 (200 мг, 0,174 ммоль, чистота 98%, выход 22%) в виде желтого остатка после сублимационной сушки. LC/MS (способ А): время удерживания 1,44 мин ( $\text{ES}^+$ ) масса/заряд 1149  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

<sup>1</sup>H ЯМР (600 МГц, хлороформ-d)  $\delta$  8,81 (s, 1H), 7,83 (s, 2H), 7,48 (s, 1H), 7,18 (dd, J=18,7, 7,5 Гц, 2H), 6,69 (s, 2H), 6,43 (s, 1H), 5,68 (d, J=16,1 Гц, 1H), 5,27 (d, J=16,1 Гц, 1H), 5,03 (d, J=18,4 Гц, 1H), 4,90 (d, J=18,4 Гц, 1H), 4,75 (p, J=7,2 Гц, 1H), 4,32 (dd, J=7,4, 5,8 Гц, 1H), 4,05 (s, 1H), 3,83 (t, J=7,2 Гц, 3H), 3,78-3,68 (m, 3H), 3,68-3,57 (m, 31H), 3,53 (t, J=5,1 Гц, 3H), 3,40 (q, J=5,3 Гц, 2H), 3,06-2,91 (m, 3H), 2,84 (dt, J=16,3, 6,2 Гц, 1H), 2,63 (ddd, J=14,8, 8,5, 4,2 Гц, 1H), 2,57-2,44 (m, 4H), 2,30 (dq, J=13,4, 6,7 Гц, 1H), 2,10 (p, J=6,4 Гц, 3H), 1,91 (ddt, J=16,8, 14,3, 7,2 Гц, 3H), 1,54 (d, J=7,1 Гц, 3H), 1,02 (dd, J=15,5, 6,9 Гц, 10H).

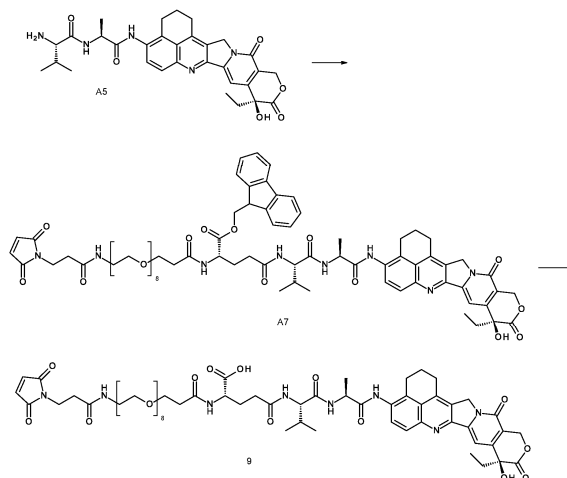
## Пример 10. Альтернативный способ синтеза A2



Аллил-((S)-1-(((S)-1-((4-амино-5-оксо-5,6,7,8-тетрагидронафталин-1-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат (A2)

EDCI.HCl (7,71 г, 31,2 ммоль) добавляли к раствору alloc-Val-Ala-OH (8,49 г, 31,2 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 мл) и перемешивали в течение 15 мин или до достижения солюбилизации. Затем добавляли I16 (5 г, 28,3 ммоль) и полученную смесь оставляли перемешиваться вплоть до завершения реакции. Летучие вещества удаляли при пониженном давлении. Неочищенный продукт поглощали в Et<sub>2</sub>O (50 мл) и смесь подвергали воздействию ультразвука в течение 3 мин. Твердое вещество фильтровали и снова поглощали в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 мл), подвергали воздействию ультразвука в течение 3 мин и снова фильтровали с получением чистого продукта A2 в виде серого твердого вещества (12,21 г, выход 79%). LC/MS (Способ В): ES<sup>+</sup>=1,47 мин, масса/заряд 431,5 [M+H]<sup>+</sup>.

## Пример 11.



а) (9Н-Флуорен-9-ил)метил-N2-(1-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-3-оксо-7,10,13,16,19,22,25,28-октаокса-4-азагептриаконтан-31-оил)-N5-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1Н,12Н-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-б]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-L-глутаминат (A7) EDCI.HCl (0,10 ммоль, 1,2 экв.) добавляли к раствору A5 (0,087 ммоль, 1,0 экв.) и Mal-PEG<sub>8</sub>-Glu-OH (0,10 ммоль, 1,2 экв.) в DCM (5 мл) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре на протяжении ночи. Реакционную смесь выпаривали до сухости и очищали с помощью колонки (8-12% MeOH/DCM) с получением продукта в виде белого твердого вещества. Выход=80 мг (63%). LC/MS (Способ В) rt 1,66 мин масса/заряд (1456,2) M+H.

б) N2-(1-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-3-оксо-7,10,13,16,19,22,25,28-октаокса-4-азагептриаконтан-31-оил)-N5-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1Н,12Н-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-б]хинолин-4-ил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-L-глутамин (9).

1-Метилпирролидин (200 мкл) добавляли к раствору A7 (0,06 ммоль) в DMF (0,8 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Растворитель удаляли под вакуумом и остаток очищали посредством препаративной HPLC (30% MeCN/вода + 0,05% муравьиной кислоты в течение 8,5 мин). Фракции, содержащие продукт, подвергали сублимационной сушке с получением продукта в виде грязно-белого твердого вещества. Выход=23 мг (30%). LC/MS (Способ В) rt 1,43 мин масса/заряд (1278,4) M+H.

## Пример 12. Конъюгация

**Антитело, представляющее собой герцептин-C239i**

Антитела, представляющие собой герцептин, сконструированные таким образом, чтобы они содержали цистеин, вставленный между положениями 239 и 240, получали согласно способам, описанным в Dimasi, N., et al., Molecular Pharmaceutics, 2017, 14, 1501-1516 (DOI: 5 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00995).

**ConjA**

50 мМ раствор DL-дителиотреитола (DTT) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (150 молярных эквивалентов/антитело, 40 микромоль, 800 мкл) к 10 мл раствора антитела, представляющего собой герцептин-C239i (40 мг, 267 наномоль), в буфере для восстановления, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), при конечной концентрации антитела, со-



ставляющей 4,0 мг/мл. Смесь для восстановления оставляли для протекания реакции при комнатной температуре на 4 ч 45 мин (или до полного восстановления, определяемого посредством UHPLC) в орбитальном встряхивателе при слабом (60 об/мин) встряхивании. Чтобы удалить весь избыток восстановительного средства и помощью центрифугирования с применением спинного фильтра у восстановленного антитела проводили замену буфера на буфер для повторного окисления, содержащий PBS и 1 мМ EDTA. Добавляли 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (DHAA, 20 молярных эквивалентов/антитело, 5,33 мкмоль, 106,7 мкл) в DMSO, и смесь для повторного окисления оставляли для протекания реакции в течение 16 ч при комнатной температуре при слабом (60 об/мин) встряхивании при концентрации антитела, составляющей 4 мг/мл (или добавляли дополнительное количество DHAA и реакционную смесь оставляли на более длительное время до полного повторного окисления цистеиновых тиольных групп с повторным образованием межцепочечных цистеиновых дисульфидных связей, что определяли посредством UHPLC). Затем смесь для повторного окисления подвергали стерилизующей фильтрации и разбавляли в буфере для конъюгации, содержащем PBS и 1 мМ EDTA, с получением конечной концентрации антитела, составляющей 3,6 мг/мл. Соединение 1 добавляли в виде раствора в DMSO (10 молярных эквивалентов/антитело, 1,33 мкмоль, в 0,55 мл DMSO) к 5,0 мл данного раствора повторно окисленного антитела (20 мг, 133 наномоль) с получением конечной концентрации DMSO, составляющей 10% (об./об.). Раствор перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре, затем реакцию конъюгации гасили посредством добавления N-ацетилцистеина (6,67 мкмоль, 67 мкл при 100 мМ), затем очищали посредством спинной фильтрации в PBS с применением спинного фильтра Amicon Ultracell 30 кДа MWCO объемом 15 мл, подвергали стерилизующей фильтрации и анализировали.

Анализ UHPLC восстановленного образца ConjA с применением системы Shimadzu Prominence, оснащенной колонкой Thermo Scientific MAbPac 50×2,1 мм, при элюировании в градиенте воды и ацетонитрила, с детекцией при 214 и 330 нм (специфических для соединения 1), продемонстрировал наличие неконъюгированных легких цепей и смеси неконъюгированных тяжелых цепей и тяжелых цепей, присоединенных к одной молекуле соединения 1, что соответствовало соотношению лекарственное средство/антитело (DAR), составляющему 1,89 молекулы соединения 1 на антитело.

Анализ UHPLC образца ConjA с применением системы Shimadzu Prominence, оснащенной колонкой Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP, 4 мкм, 4,6×150 мм (с предколонкой 4 мкм, 3,0×20 мм), при элюировании со скоростью потока 0,3 мл/мин с помощью простерилизованного фильтрацией буфера для SEC, содержащего 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.) с детекцией при 280 нм, продемонстрировал мономерную чистоту, составляющую 98%. Анализ UHPLC SEC показал, что концентрация конечного ConjA составляет 2,14 мг/мл в 6,5 мл, а масса полученного ConjA составила 13,9 мг (выход 70%).

#### ConjA\*

10 мМ раствор трис(2-карбоксиил)фосфина (ТСЕР) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (10 молярных эквивалентов/антитело, 400 наномоль, 40 мкл) к 2,4 мл раствора антитела, представляющего собой трастузумаб (6 мг, 40 наномоль), в буфере для восстановления, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), при конечной концентрации антитела, составляющей 2,5 мг/мл. Смесь для восстановления оставляли для протекания реакции при комнатной температуре на 16 ч (или до полного восстановления, определяемого посредством UHPLC) в орбитальном встряхивателе при слабом (60 об/мин) встряхивании. С помощью центрифугирования с применением спинного фильтра у раствора восстановленного антитела проводили замену буфера (для удаления всего избытка восстанавливающего средства) на буфер для конъюгации, содержащий PBS и 1 мМ EDTA, с получением конечной концентрации антитела, составляющей 2,0 мг/мл. Соединение 1 добавляли в виде раствора в DMSO (20 молярных эквивалентов/антитело, 400 наномоль, в 0,15 мл DMSO) к 1,35 мл данного раствора восстановленного антитела (3 мг, 20 наномоль) с получением конечной концентрации DMSO, составляющей 10% (об./об.). Раствор смешивали в течение 2 ч при комнатной температуре, затем реакцию конъюгации гасили посредством добавления N-ацетилцистеина (2 микромоль, 20 мкл при 100 мМ), затем очищали посредством центрифугирования с применением спинного фильтра Amicon Ultracell 30 кДа MWCO объемом 15 мл, подвергали стерилизующей фильтрации и анализировали.

Анализ UHPLC восстановленного образца ConjA\* с применением системы Shimadzu Prominence, оснащенной колонкой Thermo Scientific MAbPac 50×2,1 мм, при элюировании с градиентом воды и ацетонитрила, с детекцией при 214 и 330 нм (специфических для соединения 1), продемонстрировал наличие смеси неконъюгированных легких цепей, легких цепей, присоединенных к одной молекуле соединения 1, неконъюгированных тяжелых цепей и тяжелых цепей, присоединенных к не более трем молекулам соединения 1, что соответствовало соотношению лекарственное средство/антитело (DAR), составляющему 7,89 молекулы соединения 1 на антитело.

Анализ UHPLC образца ConjA\* с применением системы Shimadzu Prominence, оснащенной колонкой Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP, 4 мкм, 4,6×150 мм (с предколонкой 4 мкм, 3,0×20 мм), при элюировании со скоростью потока 0,3 мл/мин с помощью простерилизованного фильтрацией буфера для SEC, содержащего 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола

(об./об.), с детекцией при 280 нм, продемонстрировал мономерную чистоту, составляющую 98,5%. Анализ УНПЛС SEC показал, что концентрация конечного ConjA\* составляет 2,02 мг/мл в 1,25 мл, а масса полученного ConjA\* составила 2,5 мг (выход 84%).

#### ConjB

10 мМ раствор трис(2-карбоксиил)фосфина (ТСЕР) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (10 молярных эквивалентов/антитело, 3,56 микромоляр, 356 мкл) к 11,1 мл раствора антитела, представляющего собой трастузумаб (53,4 мг, 356 наномоль), в буфере для восстановления, содержащем PBS с pH 7,4 и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), при конечной концентрации антитела, составляющей 4,84 мг/мл. Смесь для восстановления оставляли для протекания реакции при 37°C на 1 ч 30 мин (или до полного восстановления, определяемого посредством УНПЛС) в орбитальном встряхивателе при слабом (60 об/мин) встряхивании. Соединение 2 добавляли в виде раствора в DMSO (15 молярных эквивалентов/антитело, 5,1 микромоляр, в 1,2 мл DMSO) к 10,5 мл данного раствора восстановленного антитела (50,8 мг, 339 наномоль) с получением конечной концентрации DMSO, составляющей 10% (об./об.). Раствор смешивали в течение 1 ч 30 мин при комнатной температуре, затем реакцию конъюгации гасили посредством добавления N-ацетилцистеина (25,4 микромоляр, 254 мкл при 100 мМ), затем очищали посредством АКТА™ Start FPLC с применением колонки GE Healthcare HiLoad™ 26/600, заполненной Superdex 200 PG, при элюировании со скоростью потока 2,6 мл/мин с помощью PBS. Фракции, соответствующие пику мономера ConjB, объединяли, концентрировали и проводили замену буфера на буфер с pH 6,0, содержащий 25 мМ гистидина и 205 мМ сахарозы, с применением спинного фильтра Amicon Ultracell 50 кДа MWCO объемом 15 мл, подвергали стерилизующей фильтрации и анализировали.

Анализ УНПЛС восстановленного образца ConjB с применением системы Shimadzu Prominence, оснащенной колонкой Thermo Scientific MAbPac 50×2,1 мм, при элюировании с градиентом воды и ацетонитрила, с детекцией при 214 и 330 нм (специфических для соединения 2), продемонстрировал наличие смеси неконъюгированных легких цепей, легких цепей, присоединенных к одной молекуле соединения 2, неконъюгированных тяжелых цепей и тяжелых цепей, присоединенных к не более трем молекулам соединения 2, что соответствовало соотношению лекарственное средство/антитело (DAR), составляющему 7,93 молекулы соединения 2 на антитело.

Анализ УНПЛС образца ConjA\* с применением системы Shimadzu Prominence, оснащенной колонкой Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР, 4 мкм, 4,6×150 мм (с предколонкой 4 мкм, 3,0×20 мм), при элюировании со скоростью потока 0,3 мл/мин с помощью простерилизованного фильтрацией буфера для SEC, содержащего 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), с детекцией при 280 нм, продемонстрировал мономерную чистоту, составляющую 98,9%. Анализ УНПЛС SEC показал, что концентрация конечного ConjB составляет 2,4 мг/мл в 16 мл, а масса полученного ConjB составила 38,4 мг (выход 84%).

#### ConjC

10 мМ раствор трис(2-карбоксиил)фосфина (ТСЕР) в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,4 (PBS) добавляли (40 молярных эквивалентов/антитело, 11,2 микромоляр, 1,12 мл) к 20 мл раствора антитела, представляющего собой герцептин-C239i (42 мг, 280 наномоль), в буфере для восстановления, содержащем PBS и 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), при конечной концентрации антитела, составляющей 2,1 мг/мл. Смесь для восстановления оставляли для протекания реакции при комнатной температуре в течение 16 ч (или до полного восстановления, определяемого посредством УНПЛС) в орбитальном встряхивателе при слабом (60 об/мин) встряхивании. Чтобы удалить весь избыток восстановительного средства с помощью центрифугирования с применением спинного фильтра у восстановленного антитела проводили замену буфера на буфер для повторного окисления, содержащий PBS и 1 мМ EDTA. 50 мМ раствор дегидроаскорбиновой кислоты (DHAA, 30 молярных эквивалентов/антитело, 7,0 микромоляр, 141 мкл) в DMSO добавляли к 22 мл данного восстановленного антитела, подвергнутого замене буфера (35,2 мг, 235 наномоль), и смесь для повторного окисления оставляли для протекания реакции в течение 2 ч и 30 мин при комнатной температуре и слабом (60 об/мин) встряхивании при концентрации антитела, составляющей 1,6 мг/мл (или добавляли дополнительное количество DHAA и реакционную смесь оставляли на более длительное время до полного повторного окисления цистеиновых тиольных групп с повторным образованием межцепочечных цистеиновых дисульфидных связей, определяемого посредством УНПЛС). Затем смесь для повторного окисления подвергали стерилизующей фильтрации. Соединение 6 добавляли в виде раствора в DMSO (20 молярных эквивалентов/антитело, 2,3 микромоляр, в 1,36 мл DMSO) к 11,0 мл данного раствора повторно окисленного антитела (17,6 мг, 117 наномоль), pH регулировали с помощью 1,22 мл 1 М бикарбоната натрия с получением конечной концентрации DMSO, составляющей 10% (об./об.), и 10% (об./об.) 1 М бикарбоната натрия. Раствор оставляли для протекания реакции при комнатной температуре в течение 2 ч при слабом встряхивании. Затем реакцию конъюгации гасили посредством добавления N-ацетилцистеина (12 микромоляр, 117 мкл при 100 мМ), затем очищали и проводили замену буфера на буфер с pH 6,0, содержащий 25 мМ гистидина и 205 мМ сахарозы, с применением спинного фильтра Amicon Ultracell 50 кДа MWCO объемом 15 мл, под-

вергали стерилизующей фильтрации и анализировали.

Анализ УНПЛС интактного образца ConJc с применением системы Shimadzu Prominence, оснащенной колонкой Sepax Proteomix HIC бутил-NP5 4,6×35 мм, 5 мкм, при элюировании градиентом буфера с pH 7,4, содержащего 25 мМ фосфата натрия, 1,5 М сульфата аммония, и 20% ацетонитрила (об./об.) в 25 мМ натрий-фосфатном буфере с pH 7,4, с детекцией при 214 и 330 нм (специфических для соединения 6), продемонстрировал наличие неконъюгированного и конъюгированного антитела, присоединенного к одной или двум молекулам соединения 6, что соответствовало соотношению лекарственное средство/антитело (DAR), составляющему 1,42 молекулы соединения 6 на антитело.

Анализ УНПЛС образца ConJc с применением системы Shimadzu Prominence, оснащенной колонкой Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР, 4 мкм, 4,6×150 мм (с предколонкой 4 мкм, 3,0×20 мм), при элюировании со скоростью потока 0,3 мл/минута с помощью простерилизованного фильтрацией буфера для SEC, содержащего 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.), с детекцией при 280 нм, продемонстрировал чистоту мономера, составляющую 98%. Анализ УНПЛС SEC показал, что концентрация конечного ConJc составляет 1,06 мг/мл в 10,1 мл, а масса полученного ConJc составила 10,7 мг (выход 61%).

Пример 13. Анализ in vitro.

Твердый тестируемый материал растворяли в DMSO с получением исходного раствора с концентрацией 2 мМ, на основе которого получали восемь серийных разведений в DMSO при соотношении 1:10 и хранили при -20°C до применения.

Адгезивные клетки NCI-N87 промывали с помощью D-PBS и отделяли с помощью трипсин-EDTA, затем в двух повторностях определяли плотность и жизнеспособность клеток посредством анализа, основанного на исключении трипанового синего, с применением автоматического счетчика клеток (LUNA-II™). Суспензию клеток разбавляли до  $1 \times 10^5$  клеток/мл в среде для роста (RPMI 1640 с Glutamax + 10% (об./об.) фетальной бычьей сыворотки NuClone™) и перемешивали на вортексе перед распределением из расчета 2 мл на лунку в стерильные полипропиленовые планшеты с объемом лунки 3 мл. Затем разбавления поражающего элемента вносили в соответствующие лунки из расчета 10 мкл/лунка и смешивали путем повторяющегося пипетирования. В случае контрольных лунок к суспензии клеток объемом 2 мл вносили 10 мкл DMSO и тщательно перемешивали. Затем по 100 мкл каждого образца вносили аликвотами в 2 повторные лунки стерильного 96-луночного микропланшета с плоским дном и инкубировали при 37°C в инкубаторе, насыщаемом CO<sub>2</sub> (5%). В конце периода инкубации (7 дней) измеряли жизнеспособность клеток с применением анализа CellTiter 96™ aqueous One (MTS), который вносили из расчета 20 мкл/лунка и инкубировали в течение 4 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Затем планшеты считывали с применением многоканального планшет-ридера EnVision™ (Perkin Elmer) с использованием показателя поглощения при 490 нм.

Процентную долю выживших клеток рассчитывали на основании среднего поглощения у 2 повторных лунок для каждого образца по сравнению со средним поглощением у двух контрольных лунок, обработанных только DMSO (100%). IC<sub>50</sub> определяли путем аппроксимации каждого набора данных к сигмоидальным кривым доза-ответ с переменным наклоном с помощью нелинейного алгоритма аппроксимации в программном обеспечении GraphPad Prism (Сан-Диего, Калифорния).

Все эксперименты, описанные в данном отчете, проводили и тестировали в ходе трех независимых экспериментов. Данные приведены как среднее для трех независимых повторностей.

	IC <sub>50</sub> (нМ)
III	0,3854

Пример 14. Анализ ADC in vitro.

Концентрацию и жизнеспособность клеток из субконфлюэнтной культуры (конфлюэнтность 80-90%) в матрице T75 измеряли посредством окрашивания трипановым синим, а подсчет осуществляли с применением автоматического счетчика клеток LUNA-II™. Клетки разбавляли до  $2 \times 10^5$ /мл, распределяли (50 мкл на лунку) в 96-луночные планшеты с плоским дном.

Исходный раствор (1 мл) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) (20 мкг/мл) получали путем разбавления простерилизованного фильтрацией ADC в среде для культивирования клеток. Набор из 8х 10-кратных разведений исходного раствора ADC получали в 24-луночном планшете путем последовательного переноса 100 мкл в 900 мкл среды для культивирования клеток. Разведения ADC вносили (из расчета 50 мкл на лунку) в 4 повторные лунки в 96-луночном планшете, содержащие 50 мкл суспензии клеток, высеванных туда ранее. В контрольные лунки вносили по 50 мкл среды для культивирования клеток. 96-луночный планшет, содержащий клетки и ADC, инкубировали при 37°C в инкубаторе, насыщаемом CO<sub>2</sub>, в течение периода воздействия.

В конце инкубационного периода жизнеспособность клеток измеряли посредством анализа с MTS. MTS (Promega) вносили (из расчета 20 мкл на лунку) в каждую лунку и инкубировали в течение 4 ч при 37°C в инкубаторе, насыщаемом CO<sub>2</sub>. Поглощение в лунках измеряли при 490 нм. Процентную долю выживших клеток рассчитывали на основании среднего поглощения у 4 лунок, обработанных ADC, по

сравнению со средним поглощением у 4 контрольных лунок без обработки (100%). IC<sub>50</sub> определяли на основании данных доза-ответ с применением GraphPad Prism с помощью нелинейного алгоритма аппроксимации: сигмоидальные кривые доза-ответ с переменным наклоном.

Периоды инкубации с ADC составляли 4 дня в случае MDA-MB-468 и 7 дней в случае NCI-N87. MDA-MB-468 и NCI-N87 культивировали в RPMI 1640 с Glutamax + 10% (об./об.) фетальной бычьей сыворотки HyClone™. NCI-N87 представляет собой линию клеток, экспрессирующих Her2, а MDA-MB-468 представляет собой Her2-негативную линию клеток.

EC <sub>50</sub> (мкг/мл)	NCI-N87	MDA-MB-468
ConjA	0,1176	>10
ConjA*	0,01634	>10
ConjB	0,01857	>10
ConjC	0,1452	>10

Пример 15. Анализ ADC *in vivo*

### Способы и материалы

#### Мыши.

В день 1 исследования возраст самок мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (Fox Chase SCID™, CB17/Icr- Prkdcscid/IcoIcrCtrl, Charles River) составлял восемь недель, а масса тела (BW) находилась в диапазоне 14,5-20,0 г. Животным предоставляли *ad libitum* доступ к воде (обработана с помощью обратного осмоса, 1 ppm Cl) и модифицированному и подвергнутому облучению лабораторному рациону NIH 31™, содержащему 18,0% общего белка, 5,0% общего жира и 5,0% общей клетчатки. Мышей размещали на подвергнутой облучению подстилке для лабораторных животных Enrich-o-cobs™ в фиксированных микроизоляторах в условиях 12-часового светового цикла при 20-22°C и 40-60% влажности. Служба исследований CR четко выполняет рекомендации Руководства по уходу за лабораторными животными и их использованию относительно содержания, разведения, проведения хирургических процедур, контроля кормления и выпаивания, а также оказания ветеринарной помощи. Программа по уходу и использованию животных в службе исследований CR аккредитована Международной ассоциацией по оценке и аккредитации лабораторных исследований на животных (AAALAC), что обеспечивает соблюдение принятых стандартов по уходу и использованию лабораторных животных.

#### Культура опухолевых клеток

Клетки NCI-N87 карциномы желудка человека культивировали в среде RPMI-1640, дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 mM глутамина, 100 единиц/мл пенициллина, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина и 25 мкг/мл гентамицина. Клетки выращивали в матрасах для культур тканей в инкубаторе с увлажнением при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха.

#### Имплантация *in vivo* и рост опухоли

Клетки NCI-N87, используемые для имплантации, собирали в фазе логарифмического роста и ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), содержащем 50% Matrigel™ (BD Biosciences). В день имплантации опухоли каждой подопытной мыши вводили посредством подкожной инъекции в правый бок  $1 \times 10^7$  клеток (0,1 мл суспензии клеток), и рост опухоли отслеживали, когда средний размер приближался к целевому диапазону 100-150 мм<sup>3</sup>. Через двенадцать дней, в день, обозначенный как день 1 исследования, мышей разделяли на четырнадцать групп в зависимости от рассчитанного размера опухоли, причем семь групп предназначались для оценки эффективности (n=10) и семь групп предназначались для сбора образцов (n=3), при этом каждая группа состояла из животных с индивидуальными значениями объема опухоли, находящимися в диапазоне 108-172 мм<sup>3</sup>, и групповыми средними значениями объема опухоли, составляющими 120-124 мм<sup>3</sup>. Опухоли измеряли в двух направлениях с применением штангенциркуля, и объем рассчитывали по формуле:

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = (w^2 \times l) / 2,$$

где w = ширина и l = длина опухоли в мм. Массу опухоли можно рассчитывать, исходя из предположения, что 1 мг эквивалентен 1 мм<sup>3</sup> объема опухоли.

#### Терапевтические средства

ConjA\* хранили в защищенном от света месте при 4°C. Стерильный PBS применяли для введения дозы группе контроля со средой-носителем.

#### Обработка

В день 1 исследования самок мышей SCID, несущих сформированные ксенотрансплантаты NCI-N87, разделяли на группы. Аликвоту исходного раствора разбавляли с помощью PBS до подходящей концентрации. Средство вводили внутривенно посредством инъекции в хвостовую вену однократно в день 1. Объем дозы составлял 0,2 мл на 20 г массы тела (10 мл/кг) и его пересчитывали относительно

массы тела для каждого отдельного животного.

Мыши из группы 1 получали среду-носитель, представляющую собой PBS, и служили в качестве контрольной группы. Группа 2 получала ConjA\* в дозе 4 мг/кг.

Опухоли измеряли с применением штангенциркуля два раза в неделю, и каждое животное подвергали эвтаназии, когда его опухоль достигала объема конечной точки, составлявшего 800 мм<sup>3</sup>, или в конце исследования (день 68), в зависимости от того, что наступало раньше. Животных, которые покидали исследование по причине достижения конечной точки объема опухоли, регистрировали как подвергнутых эвтаназии по причине прогрессирования опухоли (TP) с указанием даты проведения эвтаназии.

#### Критерии ответов в виде регрессии

Эффективность обработки можно определять, исходя из частоты возникновения и величины ответов в виде регрессии, наблюдаемых в ходе исследования. Обработка может вызывать частичную регрессию (PR) или полную регрессию (CR) опухоли у животного. При ответе в виде PR объем опухоли составлял 50% или менее от ее объема в день 1 в ходе трех последовательных измерений на протяжении исследования, и был равен или превышал 13,5 мм<sup>3</sup> в ходе одного или нескольких из этих трех измерений. При ответе в виде CR объем опухоли составлял менее 13,5 мм<sup>3</sup> в ходе трех последовательных измерений на протяжении исследования. Животных оценивали в отношении события PR или CR только один раз в ходе исследования, и оценивали только как CR, если удовлетворялись критерии как PR, так и CR. Животное с ответом в виде CR на момент завершения исследования дополнительно классифицировали как выжившее без опухоли (TFS). Животных контролировали в отношении возникновения ответа в виде регрессии.

#### Токсичность

Животных взвешивали ежедневно в дни 1-5, затем два раза в неделю вплоть до завершения исследования. Мышей часто осматривали для выявления выраженных признаков любых нежелательных побочных эффектов, связанных с лечением (TR), и клинические симптомы регистрировали при их обнаружении. Массу тела каждого отдельного животного отслеживали в соответствии с протоколом, и любое животное с потерей массы тела, превышавшей 30% в ходе одного измерения или превышавшей 25% в ходе трех последовательных измерений, подвергали эвтаназии и регистрировали как гибель по причине TR. Групповые средние потери массы тела также отслеживали в соответствии с протоколом службы исследований CR. Допустимый уровень токсичности определяли как групповое среднее потери массы тела (BW), составляющее менее 20% в ходе исследования, и наличие не более 10% случаев гибели по причине TR.

#### Результаты

На фиг. 1 представлены графики среднего роста опухоли, где

Среду-носитель	●
ConjA*	◆

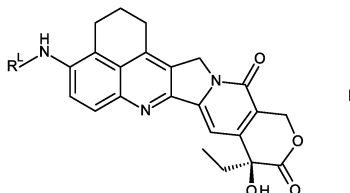
Мыши из группы 1 получали среду-носитель, представляющую собой PBS, внутривенно qd×1 и служили в качестве контрольной группы. Медианное значение TTE для группы 1 составило 24,8 дня. У всех контрольных животных опухоли достигали конечной точки, составляющей 800 мм<sup>3</sup>.

Группа 2 получала ConjA\* в дозе 4 мг/кг внутривенно qd×1. CR наблюдали у всех 10 мышей, которых дополнительно классифицировали как TFS на момент завершения исследования.

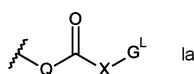
В группе обработки максимальное снижение массы тела составляло -9,5% в день 50 исследования. Не наблюдали случаев гибели по причине TR.

#### Изложение сущности изобретения

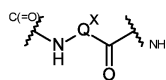
##### 1. Соединение формулы I



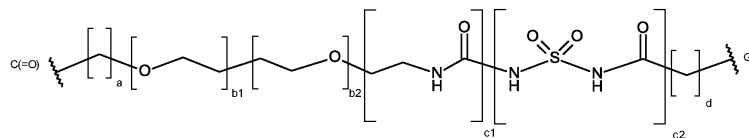
и его соли и сольваты, где R<sup>L</sup> представляет собой линкер для присоединения к звену, представляющему собой лиганд, которое выбрано из (ia)



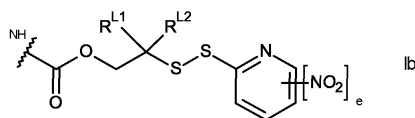
где Q представляет собой



где Q<sup>x</sup> является таким, что Q представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток, трипептидный остаток или тетрапептидный остаток;  
X представляет собой



где a равняется 0-5, b1 равняется 0-16, b2 равняется 0-16, c1 равняется 0 или 1, c2 равняется 0 или 1, d равняется 0-5, где по меньшей мере b1 или b2 равняется 0 и по меньшей мере c1 или c2 равняется 0;  
G<sup>L</sup> представляет собой линкер для присоединения к звену, представляющему собой лиганд; (ib)



где R<sup>L1</sup> и R<sup>L2</sup> независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и e равняется 0 или 1.

2. Соединение по п.1, где R<sup>L</sup> представлен формулой Ia.

3. Соединение по п.2, где Q представляет собой аминокислотный остаток.

4. Соединение по п.3, где Q выбран из: Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp.

5. Соединение по п.2, где Q представляет собой дипептидный остаток.

6. Соединение по п.5, где Q выбран из

NH-Phe-Lys-C=O,

NH-Val-Ala-C=O,

NH-Val-Lys-C=O,

NH-Ala-Lys-C=O,

NH-Val-Cit-C=O,

NH-Phe-Cit-C=O,

NH-Leu-Cit-C=O,

NH-Ile-Cit-C=O,

NH-Phe-Arg-C=O,

NH-Trp-Cit-C=O и NH-Gly-Val-C=O.

7. Соединение по п.6, где Q выбран из NH-Phe-Lys-C=O, NH-Val-Cit-C=O и NH-Val-Ala-C=O.

8. Соединение по п.2, где Q представляет собой трипептидный остаток.

9. Соединение по п.8, где Q выбран из

NH-Glu-Val-Ala-C=O, NH-Glu-Val-Cit-C=O, NH-αGlu-Val-Ala-C=O и NH-αGlu-Val-Cit-C=O.

10. Соединение по п.2, где Q представляет собой тетрапептидный остаток.

11. Соединение по п.10, где Q выбран из NH-Gly-Gly-Phe-Gly-C=O и NH-Gly-Phe-Gly-Gly-C=O.

12. Соединение по п.11, где Q представляет собой NH-Gly-Gly-Phe-Gly-C=O.

13. Соединение по любому из пп.2-12, где a равняется 0-3.

14. Соединение по п.13, где a равняется 0 или 1.

15. Соединение по п.13, где a равняется 0.

16. Соединение по любому из пп.2-15, где b1 равняется 0-8.

17. Соединение по п.16, где b1 равняется 0.

18. Соединение по п.16, где b1 равняется 2.

19. Соединение по п.16, где b1 равняется 3.

20. Соединение по п.16, где b1 равняется 4.

21. Соединение по п.16, где b1 равняется 5.

22. Соединение по п.16, где b1 равняется 8.

23. Соединение по любому из пп.2-15 и 17, где b2 равняется 0-8.

24. Соединение по п.23, где b2 равняется 0.

25. Соединение по п.23, где b2 равняется 2.

26. Соединение по п.23, где b2 равняется 3.

27. Соединение по п.23, где b2 равняется 4.

28. Соединение по п.23, где b2 равняется 5.

29. Соединение по п.23, где b2 равняется 8.

30. Соединение по любому из пп.2-29, где c1 равняется 0.

31. Соединение по любому из пп.2-29, где c1 равняется 1.

32. Соединение по любому из пп.2-31, где c2 равняется 0.

33. Соединение по любому из пп.2-30, где c2 равняется 1.

34. Соединение по любому из пп.2-33, где d равняется 0-3.

35. Соединение по п.34, где d равняется 1 или 2.  
 36. Соединение по п.34, где d равняется 2.  
 37. Соединение по любому из пп.2-33, где d равняется 5.  
 38. Соединение по любому из пп.2-12, где a равняется 0, b1 равняется 0, c1 равняется 1, c2 равняется 0, и d равняется 2, и b2 равняется 0-8.  
 39. Соединение по п.38, где b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.  
 40. Соединение по любому из пп.2-12, где a равняется 1, b2 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 0, и d равняется 0, и b1 равняется 0-8.  
 41. Соединение по п.40, где b1 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.  
 42. Соединение по любому из пп.2-12, где a равняется 0, b1 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 0, и d равняется 1, и b2 равняется 0-8.  
 43. Соединение по п.42, где b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.  
 44. Соединение по любому из пп.2-12, где b1 равняется 0, b2 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 0, один из a и d равняется 0, и другой из a и d равняется 1-5.  
 45. Соединение по п.44, где другой из a и d равняется 1 или 5.  
 46. Соединение по любому из пп.2-12, где a равняется 1, b2 равняется 0, c1 равняется 0, c2 равняется 1, d равняется 2, и b1 равняется 0-8.  
 47. Соединение по п.46, где b1 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.  
 48. Соединение по любому из пп.2-47, где  $G^L$  выбран из

( $G^{L1}$ )		( $G^{L6}$ )	
( $G^{L2}$ )		( $G^{L7}$ )	
( $G^{L2}$ )		( $G^{L8}$ )	
( $G^{L3-1}$ )	 где группа NO <sub>2</sub> является необязательной	( $G^{L9}$ )	
( $G^{L3-2}$ )	 где группа NO <sub>2</sub> является необязательной	( $G^{L10}$ )	
( $G^{L3-3}$ )	 где группа NO <sub>2</sub> является необязательной	( $G^{L11}$ )	
( $G^{L3-4}$ )	 где группа NO <sub>2</sub> является необязательной	( $G^{L12}$ )	
( $G^{L4}$ )	 где Hal представляет собой I, Br, Cl	( $G^{L15}$ )	
( $G^{L5}$ )		( $G^{L14}$ )	

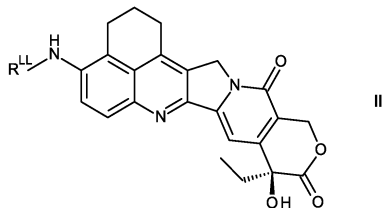
где Ar представляет собой  $C_{5-6}$ ариленовую группу, и X представляет собой  $C_{1-4}$ алкил.

49. Соединение по п.48, где  $G^L$  выбран из  $G^{L1-1}$  и  $G^{L1-2}$ .  
 50. Соединение по п.48, где  $G^L$  представляет собой  $G^{L1-1}$ .  
 51. Соединение по п.1, где  $R^L$  представлен формулой Ib.  
 52. Соединение по п.51, где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  одновременно представляют собой H.

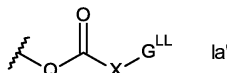
53. Соединение по п.51, где  $R^{L1}$  представляет собой H и  $R^{L2}$  представляет собой метил.  
 54. Соединение по п.51, где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  одновременно представляют собой метил.  
 55. Соединение по п.51, где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу.  
 56. Соединение по п.51, где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.  
 57. Соединение по любому из пп.51-56, где  $e$  равняется 0.  
 58. Соединение по любому из пп.51-56, где  $e$  равняется 1.  
 59. Конъюгат формулы IV



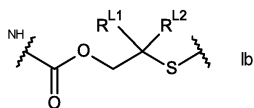
или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где L представляет собой звено, представляющее собой лиганд (т.е. нацеливающее средство),  $D^L$  представляет собой звено лекарственного средство-линкер, представленное формулой III



$R^{LL}$  представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд, выбранному из (ia'):



где Q и X являются такими, как определено в любом из пп.1-47, и  $G^{LL}$  представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд; и (ib'):



где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  являются такими, как определено в любом из пп.1 и 52-56; и r представляет собой целое число от 1 до 20.

60. Конъюгат по п.59, где  $G^{LL}$  выбран из



(G <sup>LL1-1</sup> )		(G <sup>LL8-1</sup> )	
(G <sup>LL1-2</sup> )		(G <sup>LL8-2</sup> )	
(G <sup>LL2</sup> )		(G <sup>LL9-1</sup> )	
(G <sup>LL3-1</sup> )		(G <sup>LL9-2</sup> )	
(G <sup>LL3-2</sup> )		(G <sup>LL10</sup> )	
(G <sup>LL4</sup> )		(G <sup>LL11</sup> )	
(G <sup>LL5</sup> )		(G <sup>LL12</sup> )	
(G <sup>LL6</sup> )		(G <sup>LL13</sup> )	
(G <sup>LL7</sup> )		(G <sup>LL14</sup> )	

где Ar представляет собой C<sub>5-6</sub>ариленовую группу и X представляет собой C<sub>1-4</sub>алкил.

61. Конъюгат по п.60, где G<sup>LL</sup> выбран из G<sup>LL1-1</sup> и G<sup>LL1-2</sup>.

62. Конъюгат по п.61, где G<sup>LL</sup> представляет собой G<sup>LL1-1</sup>.

63. Конъюгат по любому из пп.59-62, где звено, представляющее собой лиганд, представляет собой средство, связывающееся с клеткой.

64. Конъюгат по любому из пп.59-62, где звено, представляющее собой лиганд, представляет собой антитело или его активный фрагмент.

65. Конъюгат по п.64, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело или фрагмент антитела к опухоль-ассоциированному антигену.

66. Конъюгат по п.65, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело, которое связывается с одним или несколькими опухоль-ассоциированными антигенами или рецепторами клеточной поверхности, выбранными из (1)-(89):

- (1) Bmpr1b;
- (2) E16;
- (3) STEAP1;
- (4) 0772P;
- (5) MPF;
- (6) Napi3b;
- (7) Sema 5b;
- (8) PSCA hlg;
- (9) ETBR;
- (10) MSG783;
- (11) STEAP2;
- (12) TrpM4;
- (13) CRIPTO;
- (14) CD21;
- (15) CD79b;

- (16) FcRH2;
- (17) HER2;
- (18) NCA;
- (19) MDP;
- (20) IL20R-альфа;
- (21) бревикан;
- (22) EphB2R;
- (23) ASLG659;
- (24) PSCA;
- (25) GEDA;
- (26) BAFF-R;
- (27) CD22;
- (28) CD79a;
- (29) CXCR5;
- (30) HLA-DOB;
- (31) P2X5;
- (32) CD72;
- (33) LY64;
- (34) FcRH1;
- (35) IRTA2;
- (36) TENB2;
- (37) PSMA - FOLH1;
- (38) SST;
- (38.1) SSTR2;
- (38.2) SSTR5;
- (38.3) SSTR1;
- (38.4) SSTR3;
- (38.5) SSTR4;
- (39) ITGAV;
- (40) ITGB6;
- (41) CEACAM5;
- (42) MET;
- (43) MUC1;
- (44) CA9;
- (45) EGFRvIII;
- (46) CD33;
- (47) CD19;
- (48) IL2RA;
- (49) AXL;
- (50) CD30 - TNFRSF8;
- (51) BCMA - TNFRSF17;
- (52) CT Ag - CTA;
- (53) CD174 (Y по Льюису) - FUT3;
- (54) CLEC14A;
- (55) GRP78-HSPA5;
- (56) CD70;
- (57) специфические антигены стволовых клеток;
- (58) ASG-5;
- (59) ENPP3;
- (60) PRR4;
- (61) GCC - GUCY2C;
- (62) Liv-1- SLC39A6;
- (63) 5T4;
- (64) CD56 - NCMA1;
- (65) CanAg;
- (66) FOLR1;
- (67) GPNMB;
- (68) TIM-1 - HAVCR1;
- (69) RG-1/миндин, мишень при опухоли предстательной железы - миндин/RG-1;
- (70) B7-H4 - VTCN1;
- (71) PTK7;
- (72) CD37;

- (73) CD138 - SDC1;
- (74) CD74;
- (75) клаудины - CL;
- (76) EGFR;
- (77) Her3;
- (78) RON - MST1R;
- (79) EPHA2;
- (80) CD20 - MS4A1;
- (81) тенасцин С - TNC;
- (82) FAP;
- (83) DKK-1;
- (84) CD52;
- (85) CS1 - SLAMF7;
- (86) эндоглин - ENG;
- (87) аннексин А1 - ANXA1;
- (88) V-CAM (CD106) - VCAM1;
- (89) ASCT2(SLC1A5).

67. Конъюгат по любому из пп.64-66, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело, сконструированное с цистеином.

68. Конъюгат по любому из пп.64-67, где нагрузка лекарственным средством (р) для лекарственных средств (D) в отношении антитела (Ab) представляет собой целое число от 1 до приблизительно 10.

69. Конъюгат по п.68, где р равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

70. Смесь конъюгатов по любому из пп.64-69, где среднее значение нагрузки лекарственным средством, приходящееся на антитело в смеси конъюгатов антитело-лекарственное средство, составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10.

71. Конъюгат или смесь по любому из пп.59-70 для применения в терапии.

72. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат или смесь по любому из пп.59-70 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

73. Конъюгат или смесь по любому из пп.59-70 или фармацевтическая композиция по п.72 для применения в лечении пролиферативного заболевания у субъекта.

74. Конъюгат, смесь или фармацевтическая композиция по п.73, где заболевание представляет собой рак.

75. Применение конъюгата или смеси по любому из пп.59-70 или фармацевтической композиции по п.72 в способе консервативного лечения.

76. Способ консервативного лечения, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п.72.

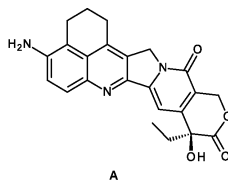
77. Способ по п.76, где способ консервативного лечения предназначен для лечения рака.

78. Способ по п.77, где пациенту вводят химиотерапевтическое средство в комбинации с конъюгатом.

79. Применение конъюгата или смеси по любому из пп.59-70 в способе изготовления лекарственного препарата для лечения пролиферативного заболевания.

80. Способ лечения млекопитающего, страдающего пролиферативным заболеванием, включающий введение эффективного количества конъюгата или смеси по любому из пп.59-70 или фармацевтической композиции по п.72.

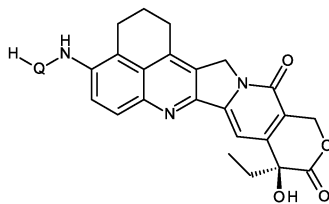
81. Соединение А



А

в виде отдельного энантиомера или в энантиомерно обогащенной форме.

82. Соединение формулы VI

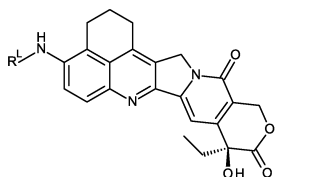


VI

где Q является таким, как описано в любом из пп.1, 3 и 12.

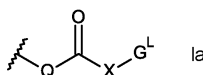
**Изложение сущности изобретения из 1-ой заявки, на основании которой испрашивается приоритет (P1)**

P1 -1. Соединение формулы I

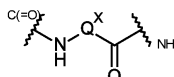


и его соли и сольваты, где  $R^L$  представляет собой линкер для присоединения к средству, связывающемуся с клеткой, который выбран из:

(ia):

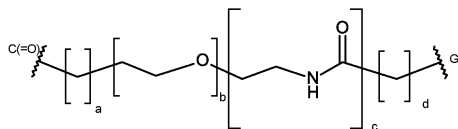


где Q представляет собой



где  $Q^X$  является таким, что Q представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток или трипептидный остаток;

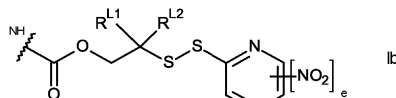
X представляет собой



где a равняется 0-5, b равняется 0-16, c равняется 0 или 1, d равняется 0-5;

$G^L$  представляет собой линкер для присоединения к звену, представляющему собой лиганд;

(ib):



где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и e равняется 0 или 1.

P1-2. Соединение по п. P1-1, где  $R^L$  представлен формулой Ia.

P1-3. Соединение по п. P1-2, где Q представляет собой аминокислотный остаток.

P1-4. Соединение по п. P1-3, где Q выбран из: Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp.

P1-5. Соединение по п. P1-2, где Q представляет собой дипептидный остаток.

P1-6. Соединение по п. P1-5, где Q выбран из:  $\text{NH-Phe-Lys-C=O}$ ,  $\text{NH-Val-Ala-C=O}$ ,  $\text{NH-Val-Lys-C=O}$ ,  $\text{NH-Ala-Lys-C=O}$ ,  $\text{NH-Val-Cit-C=O}$ ,  $\text{NH-Phe-Cit-C=O}$ ,  $\text{NH-Leu-Cit-C=O}$ ,  $\text{NH-Ile-Cit-C=O}$ ,  $\text{NH-Phe-Arg-C=O}$ ,  $\text{NH-Trp-Cit-C=O}$  и  $\text{NH-Gly-Val-C=O}$ .

P1-7. Конъюгат по п. P1-6, где Q выбран из  $\text{NH-Phe-Lys-C=O}$ ,  $\text{NH-Val-Cit-C=O}$  и  $\text{NH-Val-Ala-C=O}$ .

P1-8. Соединение по п. P1-2, где Q представляет собой трипептидный остаток.

P1-9. Соединение по любому из пп. с P1-2 по P1-8, где a равняется 0-3.

P1-10. Соединение по п. P1-9, где a равняется 0 или 1.

P1-11. Соединение по п. P1-9, где a равняется 0.

P1-12. Соединение по любому из пп. с P1-2 по P1-11, где b равняется 0-8.

P1-13. Соединение по п. P1-12, где b равняется 0.

P1-14. Соединение по п. P1-12, где b равняется 4.

P1-15. Соединение по п. P1-12, где b равняется 8.

P1-16. Соединение по любому из пп. с P1-2 по P1-15, где c равняется 0.

P1-17. Соединение по любому из пп. с P1-2 по P1-15, где c равняется 1.

P1-18. Соединение по любому из пп. с P1-2 по P1-17, где d равняется 0-3.

P1-19. Соединение по п. P1-18, где d равняется 1 или 2.

P1-20. Соединение по п. P1-19, где d равняется 2.

P1-21. Соединение по любому из пп. с P1-2 по P1-8, где a равняется 0, c равняется 1 и d равняется 2, и b равняется 0, 4 или 8.

P1-22. Соединение по любому из пп. с P1-2 по P1-21, где  $G^L$  выбран из

(G <sup>L1-1</sup> )		(G <sup>L6</sup> )	
(G <sup>L1-2</sup> )		(G <sup>L7</sup> )	
(G <sup>L2</sup> )		(G <sup>L8</sup> )	
(G <sup>L3-1</sup> )		(G <sup>L9</sup> )	
где группа NO <sub>2</sub> является необязательной			
(G <sup>L3-2</sup> )		(G <sup>L10</sup> )	
где группа NO <sub>2</sub> является необязательной			
(G <sup>L3-3</sup> )		(G <sup>L11</sup> )	
где группа NO <sub>2</sub> является необязательной			
(G <sup>L3-4</sup> )		(G <sup>L12</sup> )	
где группа NO <sub>2</sub> является необязательной			
(G <sup>L4</sup> )		(G <sup>L13</sup> )	
где Hal представляет собой I, Br, Cl			
(G <sup>L5</sup> )		(G <sup>L14</sup> )	

где Ar представляет собой C<sub>5-6</sub>ариленовую группу и X представляет собой C<sub>1-4</sub>алкил.

P1-23. Соединение по п. P1-22, где G<sup>L</sup> выбран из G<sup>L1-1</sup> и G<sup>L1-2</sup>.

P1-24. Соединение по п. P1-22, где G<sup>L</sup> представляет собой G<sup>L1-1</sup>.

P1-25. Соединение по п. P1-1, где R<sup>L</sup> представлен формулой Ib.

P1-26. Соединение по п. P1-25, где R<sup>L1</sup> и R<sup>L2</sup> одновременно представляют собой H.

P1-27. Соединение по п. P1-25, где R<sup>L1</sup> представляет собой H и R<sup>L2</sup> представляет собой метил.

P1-28. Соединение по п. P1-25, где R<sup>L1</sup> и R<sup>L2</sup> одновременно представляют собой метил.

P1-29. Соединение по п. P1-25, где R<sup>L1</sup> и R<sup>L2</sup> вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу.

P1-30. Соединение по п. P1-25, где R<sup>L1</sup> и R<sup>L2</sup> вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.

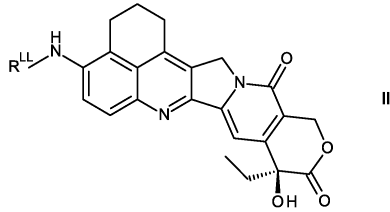
P1-31. Соединение по любому из пп. с P1-25 по P1-30, где e равняется 0.

P1-32. Соединение по любому из пп. с P1-25 по P1-30, где e равняется 1.

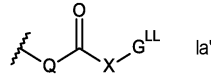
P1-33. Конъюгат формулы IV:



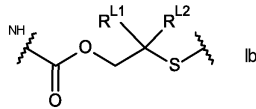
или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где L представляет собой звено, представляющее собой лиганд (т.е. нацеливающееся средство), D<sup>L</sup> представляет собой звено лекарственное средство-линкер, представленное формулой III



$R^{LL}$  представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд, выбранному из (ia'):



где Q и X являются такими, как определено в любом из пп. с P1-1 по P1-21, и  $G^{LL}$  представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд; и (ib'):



где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  являются такими, как определено в любом из пп. P1-1 и с P1-25 по P1-30; и r представляет собой целое число от 1 до 20.  
P1-34. Конъюгат по п. P1-33, где  $G^{LL}$  выбран из

$(G^{LL1-1})$		$(G^{LL8-1})$	
$(G^{LL1-2})$		$(G^{LL8-2})$	
$(G^{LL2})$		$(G^{LL9-1})$	
$(G^{LL3-1})$		$(G^{LL9-2})$	
$(G^{LL3-2})$		$(G^{LL10})$	
$(G^{LL4})$		$(G^{LL11})$	
$(G^{LL5})$		$(G^{LL12})$	
$(G^{LL6})$		$(G^{LL13})$	
$(G^{LL7})$		$(G^{LL14})$	

где Ar представляет собой  $C_{5-6}$ ариленовую группу и X представляет собой  $C_{1-4}$ алкил.

P1-35. Конъюгат по п. P1-34, где  $G^{LL}$  выбран из  $G^{LL1-1}$  и  $G^{LL1-2}$ .

P1-36. Конъюгат по п. P1-35, где  $G^{LL}$  представляет собой  $G^{LL1-1}$ .

P1-37. Конъюгат по любому из пп. с P1-33 по P1-36, где средство, связывающееся с клеткой, пред-

ставляет собой антитело или его активный фрагмент.

P1-38. Конъюгат по п. P1-37, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело или фрагмент антитела к опухоль-ассоциированному антигену.

P1-39. Конъюгат по п. P1-38, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело, которое связывается с одним или несколькими опухоль-ассоциированными антигенами или рецепторами клеточной поверхности, выбранными из (1)-(88):

- (1) BMPR1B;
- (2) E16;
- (3) STEAP1;
- (4) 0772P;
- (5) MPF;
- (6) Napi3b;
- (7) Sema 5b;
- (8) PSCA hlg;
- (9) ETBR;
- (10) MSG783;
- (11) STEAP2;
- (12) TrpM4;
- (13) CRIPTO;
- (14) CD21;
- (15) CD79b;
- (16) FcRH2;
- (17) HER2;
- (18) NCA;
- (19) MDP;
- (20) IL20R-альфа;
- (21) бревикан;
- (22) EphB2R;
- (23) ASLG659;
- (24) PSCA;
- (25) GEDA;
- (26) BAFF-R;
- (27) CD22;
- (28) CD79a;
- (29) CXCR5;
- (30) HLA-DOB;
- (31) P2X5;
- (32) CD72;
- (33) LY64; (34) FcRH1;
- (35) IRTA2;
- (36) TENB2;
- (37) PSMA-FOLH1;
- (38) SST;
- (38.1) SSTR2;
- (38.2) SSTR5;
- (38.3) SSTR1;
- (38.4) SSTR3;
- (38.5) SSTR4;
- (39) ITGAV;
- (40) ITGB6;
- (41) CEACAM5;
- (42) MET;
- (43) MUC1;
- (44) CA9;
- (45) EGFRvIII;
- (46) CD33;
- (47) CD19;
- (48) IL2RA;
- (49) AXL;
- (50) CD30 - TNFRSF8;
- (51) BCMA-TNFRSF17;
- (52) CT Ag - CTA;

- (53) CD174 (Y по Льюису) - FUT3;
- (54) CLEC14A;
- (55) GRP78-HSPA5;
- (56) CD70;
- (57) специфические антигены стволовых клеток;
- (58) ASG-5;
- (59) ENPP3;
- (60) PRR4;
- (61) GCC - GUCY2C;
- (62) Liv-1 - SLC39A6;
- (63) 5T4;
- (64) CD56 - NCMA1;
- (65) CanAg;
- (66) FOLR1;
- (67) GPNMB;
- (68) TIM-1 - HAVCR1;
- (69) RG-1/миндин, мишень при опухоли предстательной железы - миндин/RG-1;
- (70) B7-H4 - VTCN1;
- (71) PTK7;
- (72) CD37;
- (73) CD138-SDC1;
- (74) CD74;
- (75) клаудины - CL;
- (76) EGFR;
- (77) Her3;
- (78) RON - MST1R;
- (79) EPHA2;
- (80) CD20 - MS4A1;
- (81) тенасцин C - TNC;
- (82) FAP;
- (83) DKK-1;
- (84) CD52;
- (85) CS1 - SLAMF7;
- (86) эндоглин - ENG;
- (87) аннексии A1 - ANXA1;
- (88) V-CAM (CD106) - VCAM1;
- (89) ASCT2 (SLC1A5).

P1-40. Конъюгат по любому из пп. с P1-37 по P1-39, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело, сконструированное с цистеином.

P1-41. Конъюгат по любому из пп. с P1-37 по P1-40, где нагрузка лекарственным средством (p) для лекарственных средств (D) в отношении антитела (Ab) представляет собой целое число от 1 до приблизительно 10.

P1-42. Конъюгат по п. P1-41, где p равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

P1-43. Смесь конъюгатов по любому из пп. с P1-33 по P1-42, где среднее значение нагрузки лекарственным средством, приходящееся на антитело, в смеси соединений, представляющих собой конъюгаты антитело-лекарственное средство, составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10.

P1-44. Конъюгат или смесь по любому из пп. с P1-33 по P1-43 для применения в терапии.

P1-45. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат или смесь по любому из пп. с P1-33 по P1-43 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

P1-46. Конъюгат или смесь по любому из пп. с P1-33 по P1-43 или фармацевтическая композиция по п. P1-45 для применения в лечении пролиферативного заболевания у субъекта.

P1-47. Конъюгат или смесь по п. P1-46, где заболевание представляет собой рак.

P1-48. Применение конъюгата или смеси по любому из пп. с P1-33 по P1-43 или фармацевтической композиции по п. P1-45 в способе консервативного лечения.

P1-49. Способ консервативного лечения, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п. P1-45.

P1-50. Способ по п. P1-49, где способ консервативного лечения предназначен для лечения рака.

P1-51. Способ по п. P1-50, где пациенту вводят химиотерапевтическое средство в комбинации с конъюгатом.

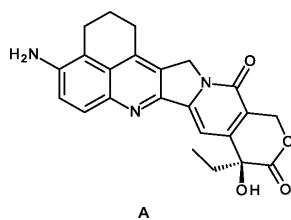
P1-52. Применение конъюгата или смеси по любому из пп. с P1-33 по P1-43 в способе изготовления лекарственного препарата для лечения пролиферативного заболевания.

P1-53. Способ лечения млекопитающего, страдающего пролиферативным заболеванием, включаю-



щий введение эффективного количества конъюгата или смеси по любому из пп. с P1-33 по P1-43 или фармацевтической композиции по п. P1-45.

P1-54. Соединение А:



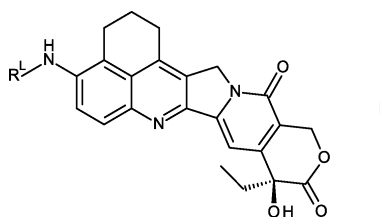
А

в виде отдельного энантиомера или в энантиомерно обогащенной форме.

Изложение сущности изобретения из 2-ой заявки, на основании которой испрашивается приоритет

(P2)

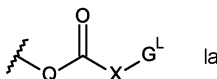
P2-1. Соединение формулы I



I

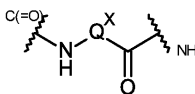
и его соли и сольваты, где  $R^L$  представляет собой линкер для присоединения к средству, связывающемуся с клеткой, который выбран из:

(ia):



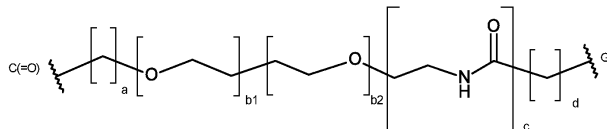
Ia

где Q представляет собой



где  $Q^X$  является таким, что Q представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток, трипептидный остаток или тетрапептидный остаток;

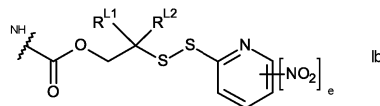
X представляет собой



где a равняется 0-5, b1 равняется 0-16, b2 равняется 0-16, c равняется 0 или 1, d равняется 0-5, где по меньшей мере b1 или b2 равняется 0;

$G^L$  представляет собой линкер для присоединения к звену, представляющему собой лиганд;

(ib):



Ib

где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  независимо выбраны из H и метила или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу; и e равняется 0 или 1.

P2-2. Соединение по п. P2-1, где  $R^L$  представлен формулой Ia.

P2-3. Соединение по п. P2-2, где Q представляет собой аминокислотный остаток.

P2-4. Соединение по п. P2-3, где Q выбран из: Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp.

P2-5. Соединение по п. P2-2, где Q представляет собой дипептидный остаток.

P2-6. Соединение по п. P2-5, где Q выбран из:  $NH-Phe-Lys-C=O$ ,  $NH-Val-Ala-C=O$ ,  $NH-Val-Lys-C=O$ ,  $NH-Ala-Lys-C=O$ ,  $NH-Val-Cit-C=O$ ,  $NH-Phe-Cit-C=O$ ,  $NH-Leu-Cit-C=O$ ,  $NH-Ile-Cit-C=O$ ,  $NH-Phe-Arg-C=O$ ,  $NH-Trp-Cit-C=O$  и  $NH-Gly-Val-C=O$ .

P2-7. Соединение по п. P2-6, где Q выбран из  $NH-Phe-Lys-C=O$ ,  $NH-Val-Cit-C=O$  и  $NH-Val-Ala-C=O$ .

P2-8. Соединение по п. P2-2, где Q представляет собой трипептидный остаток.

P2-9. Соединение по п. P2-8, где Q выбран из  $NH-Glu-Val-Ala-C=O$ ,  $NH-Glu-Val-Cit-C=O$ ,  $NH-\alpha Glu-Val-Ala-C=O$  и  $NH-\alpha Glu-Val-Cit-C=O$ .

P2-10. Соединение по п. P2-2, где Q представляет собой тетрапептидный остаток.

- P2-11. Соединение по п. P2-10, где Q выбран из  $\text{NH-Gly-Gly-Phe-Gly}^{\text{C=O}}$  и  $\text{NH-Gly-Phe-Gly-Gly}^{\text{C=O}}$ .
- P2-12. Соединение по п. P2-11, где Q представляет собой  $\text{NH-Gly-Gly-Phe-Gly}^{\text{C=O}}$ .
- P2-13. Соединение по любому из пп. с P2-2 по P2-12, где a равняется 0-3.
- P2-14. Соединение по п. P2-13, где a равняется 0 или 1.
- P2-15. Соединение по п. P2-13, где a равняется 0.
- P2-16. Соединение по любому из пп. с P2-2 по P2-15, где b1 равняется 0-8.
- P2-17. Соединение по п. P2-16, где b1 равняется 0.
- P2-18. Соединение по п. P2-16, где b1 равняется 2.
- P2-19. Соединение по п. P2-16, где b1 равняется 3.
- P2-20. Соединение по п. P2-16, где b1 равняется 4.
- P2-21. Соединение по п. P2-16, где b1 равняется 5.
- P2-22. Соединение по п. P2-16, где b1 равняется 8.
- P2-23. Соединение по любому из пп. с P2-2 по P2-15 и P2-17, где b2 равняется 0-8.
- P2-24. Соединение по п. P2-23, где b2 равняется 0.
- P2-25. Соединение по п. P2-23, где b2 равняется 2.
- P2-26. Соединение по п. P2-23, где b2 равняется 3.
- P2-27. Соединение по п. P2-23, где b2 равняется 4.
- P2-28. Соединение по п. P2-23, где b2 равняется 5.
- P2-29. Соединение по п. P2-23, где b2 равняется 8.
- P2-30. Соединение по любому из пп. с P2-2 по P2-29, где c равняется 0.
- P2-31. Соединение по любому из пп. с P2-2 по P2-29, где c равняется 1.
- P2-32. Соединение по любому из пп. с P2-2 по P2-31, где d равняется 0-3.
- P2-33. Соединение по п. P2-32, где d равняется 1 или 2.
- P2-34. Соединение по п. P2-32, где d равняется 2.
- P2-35. Соединение по любому из пп. с P2-2 по P2-12, где a равняется 0, b1 равняется 0, c равняется 1, и d равняется 2, и b2 равняется 0-8.
- P2-36. Соединение по п. P2-35, где b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.
- P2-37. Соединение по любому из пп. с P2-2 по P2-12, где a равняется 1, b2 равняется 0, c равняется 0, и d равняется 0, и b1 равняется 0-8.
- P2-38. Соединение по п. P2-37, где b1 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.
- P2-39. Соединение по любому из пп. с P2-2 по P2-12, где a равняется 0, b1 равняется 0, c равняется 0, и d равняется 1, и b2 равняется 0-8.
- P2-40. Соединение по п. P2-39, где b2 равняется 0, 2, 3, 4, 5 или 8.
- P2-41. Соединение по любому из пп. с P2-2 по P2-12, где b1 равняется 0, b2 равняется 0, c равняется 0, один из a и d равняется 0, и другой из a и d равняется 1-5.
- P2-42. Соединение по п. P2-41, где другой из a и d равняется 1 или 5.
- P2-43. Соединение по любому из пп. с P2-2 по P2-42, где  $G^L$  выбран из

(G <sup>L1-1</sup> )		(G <sup>L6</sup> )	
(G <sup>L1-2</sup> )		(G <sup>L7</sup> )	
(G <sup>L2</sup> )		(G <sup>L8</sup> )	
(G <sup>L3-1</sup> )		(G <sup>L9</sup> )	
	где группа NO <sub>2</sub> является необязательной		
(G <sup>L3-2</sup> )		(G <sup>L10</sup> )	
	где группа NO <sub>2</sub> является необязательной		
(G <sup>L3-3</sup> )		(G <sup>L11</sup> )	
	где группа NO <sub>2</sub> является необязательной		
(G <sup>L3-4</sup> )		(G <sup>L12</sup> )	
	где группа NO <sub>2</sub> является необязательной		
(G <sup>L4</sup> )		(G <sup>L13</sup> )	
	где Hal представляет собой I, Br, Cl		
(G <sup>L5</sup> )		(G <sup>L14</sup> )	

где Ar представляет собой C<sub>5-6</sub>ариленовую группу и X представляет собой C<sub>1-4</sub>алкил.

P2-44. Соединение по п. P2-43, где G<sup>L</sup> выбран из G<sup>L1-1</sup> и G<sup>L1-2</sup>.

P2-45. Соединение по п. P2-43, где G<sup>L</sup> представляет собой G<sup>L1-1</sup>.

P2-46. Соединение по п. P2-1, где R<sup>L</sup> представлен формулой Ib.

P2-47. Соединение по п. P2-46, где R<sup>L1</sup> и R<sup>L2</sup> одновременно представляют собой H.

P2-48. Соединение по п. P2-46, где R<sup>L1</sup> представляет собой H, и R<sup>L2</sup> представляет собой метил.

P2-49. Соединение по п. P2-46, где R<sup>L1</sup> и R<sup>L2</sup> одновременно представляют собой метил.

P2-50. Соединение по п. P2-46, где R<sup>L1</sup> и R<sup>L2</sup> вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу.

P2-51. Соединение по п. P2-46, где R<sup>L1</sup> и R<sup>L2</sup> вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.

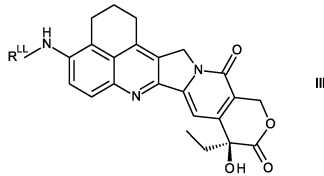
P2-52. Соединение по любому из пп. с P2-46 по P2-51, где e равняется 0.

P2-53. Соединение по любому из пп. с P2-46 по P2-51, где e равняется 1.

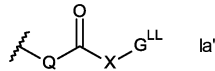
P2-54. Конъюгат формулы IV



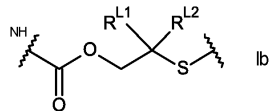
или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где L представляет собой звено, представляющее собой лиганд (т.е. нацеливающееся средство), D<sup>L</sup> представляет собой звено лекарственное средство-линкер, представленное формулой III



$R^{LL}$  представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд, выбранному из (ia'):



где Q и X являются такими, как определено в любом из пп. с P2-1 по P2-42, и  $G^{LL}$  представляет собой линкер, присоединенный к звену, представляющему собой лиганд; и (ib'):



где  $R^{L1}$  и  $R^{L2}$  являются такими, как определено в любом из пп. P2-1 и с P2-47 по P2-51; и r представляет собой целое число от 1 до 20.

P2-55. Конъюгат по п. P2-54, где  $G^{LL}$  выбран из

( $G^{LL1-1}$ )		( $G^{LL8-1}$ )	
( $G^{LL1-2}$ )		( $G^{LL8-2}$ )	
( $G^{LL2}$ )		( $G^{LL9-1}$ )	
( $G^{LL3-1}$ )		( $G^{LL9-2}$ )	
( $G^{LL3-2}$ )		( $G^{LL10}$ )	
( $G^{LL4}$ )		( $G^{LL11}$ )	
( $G^{LL5}$ )		( $G^{LL12}$ )	
( $G^{LL6}$ )		( $G^{LL13}$ )	
( $G^{LL7}$ )		( $G^{LL14}$ )	

где Ar представляет собой  $C_{5-6}$ ариленовую группу, и X представляет собой  $C_{1-4}$ алкил.

P2-56. Конъюгат по п. P2-55, где  $G^{LL}$  выбран из  $G^{LL1-1}$  и  $G^{LL1-2}$ .

P2-57. Конъюгат по п. P2-56, где  $G^{LL}$  представляет собой  $G^{LL1-1}$ .

P2-58. Конъюгат по любому из пп. с P2-54 по P2-57, где звено, представляющее собой лиганд, представляет собой антитело или его активный фрагмент.

P2-59. Конъюгат по п. P2-58, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело или фрагмент антитела к опухоль-ассоциированному антигену.

P2-60. Конъюгат по п. P2-59, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело, которое связывается с одним или несколькими опухоль-ассоциированными антигенами или рецепторами клеточной поверхности, выбранными из (1)-(89):

- (1) BMPR1B;
- (2) E16;
- (3) STEAP1;
- (4) 0772P;
- (5) MPF;
- (6) Napi3b;
- (7) Sema 5b;
- (8) PSCA hlg;
- (9) ETBR;
- (10) MSG783;
- (11) STEAP2;
- (12) TrpM4;
- (13) CRIPTO;
- (14) CD21;
- (15) CD79b;
- (16) FcRH2;
- (17) HER2;
- (18) NCA;
- (19) MDP;
- (20) IL20R-альфа;
- (21) бревикан;
- (22) EphB2R;
- (23) ASLG659;
- (24) PSCA;
- (25) GEDA;
- (26) BAFF-R;
- (27) CD22;
- (28) CD79a;
- (29) CXCR5;
- (30) HLA-DOB;
- (31) P2X5;
- (32) CD72;
- (33) LY64;
- (34) FcRH1;
- (35) IRTA2;
- (36) TENB2;
- (37) PSMA - FOLH1;
- (38) SST;
- (38.1) SSTR2;
- (38.2) SSTR5;
- (38.3) SSTR1;
- (38.4) SSTR3;
- (38.5) SSTR4;
- (39) ITGAV;
- (40) ITGB6;
- (41) CEACAM5;
- (42) MET;
- (43) MUC1;
- (44) CA9;
- (45) EGFRvIII;
- (46) CD33;
- (47) CD19;
- (48) IL2RA;
- (49) AXL;

- (50) CD30 - TNFRSF8;
- (51) BCMA - TNFRSF17;
- (52) CT Ag - CTA;
- (53) CD174 (Y по Льюису) - FUT3;
- (54) CLEC14A;
- (55) GRP78 - HSPA5;
- (56) CD70;
- (57) специфические антигены стволовых клеток;
- (58) ASG-5;
- (59) ENPP3;
- (60) PRR4;
- (61) GCC - GUCY2C;
- (62) Liv-1 - SLC39A6;
- (63) 5T4;
- (64) CD56 - NCMA1;
- (65) CanAg;
- (66) FOLR1;
- (67) GPNMB;
- (68) TIM-1 - HAVCR1;
- (69) RG-1/миндин, мишень при опухоли предстательной железы - миндин/RG-1;
- (70) B7-H4 - VTCN1;
- (71) PTK7;
- (72) CD37; (73) CD138 - SDC1;
- (74) CD74;
- (75) клаудины - CL;
- (76) EGFR;
- (77) Her3;
- (78) RON - MST1R;
- (79) EPHA2;
- (80) CD20 - MS4A1;
- (81) тенасцин C - TNC;
- (82) FAP;
- (83) DKK-1;
- (84) CD52;
- (85) CS1 - SLAMF7;
- (86) эндоглин - ENG;
- (87) аннексии A1 - ANXA1;
- (88) V-CAM (CD106) - VCAM1;
- (89) ASCT2 (SLC1A5).

P2-61. Конъюгат по любому из пп. с P2-58 по P2-60, где антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело, сконструированное с цистеином.

P2-62. Конъюгат по любому из пп. с P2-58 по P2-61, где нагрузка лекарственным средством (p) для лекарственных средств (D) в отношении антитела (Ab) представляет собой целое число от 1 до приблизительно 10.

P2-63. Конъюгат по п. P2-62, где p равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

P2-64. Смесь конъюгатов по любому из пп. с P2-58 по P2-63, где среднее значение нагрузки лекарственным средством, приходящееся на антитело в смеси конъюгатов антитело-лекарственное средство, составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10.

P2-65. Конъюгат или смесь по любому из пп. с P2-54 по P2-64 для применения в терапии.

P2-66. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат или смесь по любому из пп. с P2-54 по P2-64 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

P2-67. Конъюгат или смесь по любому из пп. с P2-54 по P2-64 или фармацевтическая композиция по п. P2-66 для применения в лечении пролиферативного заболевания у субъекта.

P2-68. Конъюгат, смесь или фармацевтическая композиция по п. P2-67, где заболевание представляет собой рак.

P2-69. Применение конъюгата или смеси по любому из пп. с P2-54 по P2-64 или фармацевтической композиции по п. P2-66 в способе консервативного лечения.

P2-70. Способ консервативного лечения, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п. P2-66.

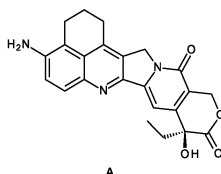
P2-71. Способ по п. P2-70, где способ консервативного лечения предназначен для лечения рака.

P2-72. Способ по п. P2-71, где пациенту вводят химиотерапевтическое средство в комбинации с конъюгатом.

P2-73. Применение конъюгата или смеси по любому из пп. с P2-54 по P2-64 в способе изготовления лекарственного препарата для лечения пролиферативного заболевания.

P2-74. Способ лечения млекопитающего, страдающего пролиферативным заболеванием, включающий введение эффективного количества конъюгата или смеси по любому из пп. с P2-54 по P2-64 или фармацевтической композиции по п. P2-66.

P2-75. Соединение А



в виде отдельного энантиомера или в энантиомерно обогащенной форме.

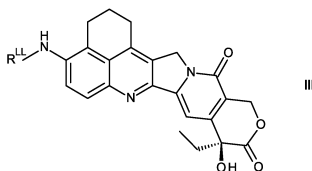
#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, которое представляет собой 1-(3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)пропанамидо)-N-((S)-1-(((S)-1-(((S)-9-этил-9-гидрокси-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1Н,12Н-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-б]хинолин-4-ил)амино)-1-оксoproпан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагептакозан-27-амид.

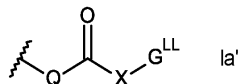
2. Конъюгат формулы IV



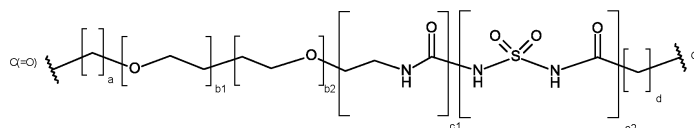
или его фармацевтически приемлемая соль, где L представляет собой антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела,  $D^L$  представляет собой звено лекарственное средство-линкер, представленное формулой III



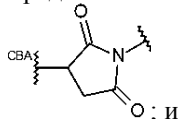
$R^{LL}$  представляет собой линкер, присоединенный к указанным антителу или антиген-связывающему фрагменту антитела, где указанный линкер представлен формулой (Ia')



где Q представляет собой дипептидный остаток, который представляет собой  $NH-Val-Ala-C=O$ , где  $NH$  представляет собой N-конец, а  $-C=O$  представляет собой C-конец указанного остатка, X представляет собой



где a равняется 0, b1 равняется 0, c1 равняется 1, c2 равняется 0, d равняется 2, b2 равняется 8; и  $G^{LL}$  представляет собой линкер, присоединенный к указанным антителу или антиген-связывающему фрагменту антитела, который представляет собой



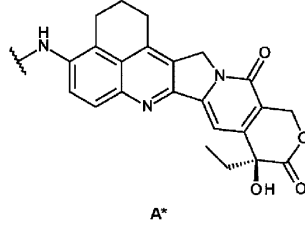
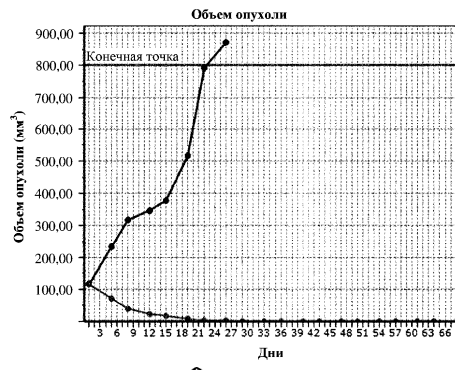
p представляет собой целое число от 1 до 20.

3. Конъюгат по п.2, где нагрузка лекарственным средством (p) для лекарственных средств (D) в отношении антитела (Ab) представляет собой целое число от 1 до 10.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по п.2 или 3 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

5. Применение конъюгата по п.2 или 3 или фармацевтической композиции по п.4 для лечения рака у субъекта.

046016



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2