

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046139**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.02.09**

(21) Номер заявки  
**202091203**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.11.14**

(51) Int. Cl. *A61K 47/65* (2017.01)  
*A61K 47/68* (2017.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

---

(54) **КОНЬЮГАТЫ ЛИГАНДА-ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТОВ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКЗОПЕПТИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ КАТЕПСИНА В**

---

(31) **17201589.3**

(32) **2017.11.14**

(33) **EP**

(43) **2020.08.03**

(86) **PCT/EP2018/081269**

(87) **WO 2019/096867 2019.05.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ДЕБИОФАРМ РИСЁРЧ ЭНД  
МАНЬЮФЭКЧЕРИНГ С.А. (CH)**

(72) Изобретатель:  
**Мутгер Манфред (DE), Беллок  
Натали, Биасс Даниэль, Разанам  
Ален, Маркс Лео, Шардонен Кристоф,  
Гарруст Патрик (CH)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **WO-A1-2009117531  
WO-A2-2008098789**

---

(57) Настоящее изобретение относится к конъюгатам лиганда-лекарственного средства для лечения заболевания. В частности, настоящее изобретение относится к конъюгатам лиганда-лекарственного средства, включающим линкерную систему, которая селективно распознается и расщепляется экзопептидазой (т.е. карбоксидипептидазой) активностью Катепсина В, что обеспечивает улучшенную внутриклеточную доставку лекарственного средства в клетку-мишень. Настоящее изобретение также относится к конъюгатам лиганда-лекарственного средства для внутриклеточной доставки цитотоксических средств в опухолевые клетки.

---

**B1**

**046139**

**046139**

**B1**

Настоящее изобретение относится к "конъюгатам лиганда-лекарственного средства" (LDC) для лечения заболевания. В частности, настоящее изобретение относится к конъюгатам лиганда-лекарственного средства, включающим линкерную систему, которая селективно распознается и расщепляется под действием экзопептидазной (то есть карбоксидипептидазной) активности катепсина В, что приводит к улучшенной доставке лекарственного средства в клетку-мишень. Настоящее изобретение также относится к конъюгатам лиганда-лекарственного средства, включающим линкерную систему, которая обеспечивает высвобождение множества лекарственных средств, что приводит к повышению эффективности. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к конъюгатам лиганда-лекарственного средства, которые позволяют достигать высокой нагрузки лекарственного средства (например, высокого отношения антитела-лекарственного средства), что приводит к значительному повышению эффективности. В некоторых аспектах настоящее изобретение также относится к конъюгатам лиганда-лекарственного средства для внутриклеточной доставки цитотоксических лекарственных средств в опухолевые или раковые клетки.

#### Уровень техники

В последнее время большой интерес вызывает использование систем иницируемого ферментами высвобождения лекарственных средств, таких как конъюгаты антитела-лекарственного средства (ADC), для направленной доставки цитотоксических средств в опухолевые клетки. Конъюгаты антитела-лекарственного средства обычно состоят из трех компонентов: антитела (например, моноклонального антитела), которое направленно взаимодействует с антигеном, экспрессируемым на высоком уровне в опухолевых клетках, цитотоксического средства (иногда называемого "токсином" или "полезной нагрузкой") и линкерной системы, которая может высвобождать цитотоксическое средство (полезную нагрузку) из антитела при интернализации в раковые клетки. В идеальном случае конъюгаты антитела-лекарственного средства должны сохранять благоприятные фармакокинетические и функциональные свойства антител, оставаться интактными и нетоксичными в системном кровотоке (крови) и становиться активными в участке-мишени с высвобождением лекарственного средства в количестве, достаточном для уничтожения клетки-мишени. Таким образом, одна из самых больших проблем при разработке конъюгатов антитела-лекарственного средства представляет собой конструирование линкерных систем для конъюгирования антитела и лекарственного средства, которые являются нетоксичными и стабильными в системном кровотоке, но которые, тем не менее, способны высвобождать лекарственное средство внутри клетки-мишени в достаточном количестве и с нужной скоростью.

Большое количество линкерных систем было разработано для специфического внутриклеточного высвобождения цитотоксических лекарственных средств. Существует два основных семейства линкеров: расщепляемые и нерасщепляемые. Расщепляемые линкеры обычно используют характерное свойство клетки-мишени, например, опухолевой клетки, для селективного высвобождения лекарственного средства (например, цитотоксического средства) из конъюгата, а именно: (1) чувствительность к протеазе (системы с иницируемым ферментами высвобождением), (2) чувствительность к pH или (3) чувствительность к глутатиону. Нерасщепляемые линкеры обычно основаны на полном расщеплении антитела после интернализации конъюгата в клетку-мишень. Примером конъюгата антитела-лекарственного средства с использованием нерасщепляемого линкера является конъюгат гуманизированный антитела против HER2 (против ErbB2) с майтанзином, трастузумаб-эмантанзин (T-DM1 или Кадсила®, LoRusso et al., Clin. Cancer Res. 2011, 17, 6437-6447).

Также были предложены пептидные линкеры, поскольку они сочетают в себе хорошую стабильность в системном кровотоке с быстрым внутриклеточным высвобождением лекарственного средства при воздействии определенных ферментов. В частности, были описаны пептидные линкеры, включающие дипептид валин-цитруллин (Val-Cit), в качестве субстрата для внутриклеточного расщепления катепсином В (Cat B) (Lu et al., Int. J. Mol. Sci. 2016, 17, 561-582; Jain et al., Pharm. Res. 2015, 32(11), 3526-3540; Dubowchik et al., Bioconj. Chem. 2002, 13, 855-859). Cat B представляет собой лизосомальную цистеиновую протеазу, участвующую в различных физиологических процессах, которая отличается от других цистеиновых протеаз тем, что она обладает эндопептидазной активностью, а также экзопептидазной активностью, что означает то, что она может удалять дипептидные звенья с С-концов белков и пептидов (Turk et al., Biochim. Biophys. Acta 2012, 1824(1), 68-88). Таким образом, экзопептидазная активность Cat B является карбоксидипептидазной активностью.

Как правило, ферментное расщепление конъюгата (например, при воздействии Cat B) высвобождает антитело и конъюгат линкера-лекарственного средства в участке-мишени. Линкер, в свою очередь, должен обеспечивать быстрое высвобождение лекарственного средства из конъюгата линкера-лекарственного средства. Таким образом, были предложены "саморасщепляющиеся" спейсеры между линкером и лекарственным средством для улучшения скорости высвобождения лекарственного средства после ферментного расщепления. Саморасщепляющиеся спейсеры обычно могут высвобождать лекарственное средство, например, цитотоксическое средство, посредством механизмов, основанных на элиминировании или циклизации.

Примером линкерной системы, включающей саморасщепляющийся спейсер, является парааминобензилоксикарбонильный (РАВС) линкер, какой используется, например, в конъюгате бремтуксимаб

ведотин, Адцетрис® (Younes et al. N. Engl. J. Med. 2010, 363, 1812-1821; Jain et al., Pharm. Res. 2015, 32(11), 3526-3540). В системе PABC линкера, используемой в "конъюгатах антитела-лекарственного средства", используется протеаза-чувствительный дипептидный линкер Val-Cit-PABC, который может распознаваться и расщепляться катепсином В. малеимидокапроильная группа, как правило, используется для присоединения линкерной единицы к антителу и служит в качестве спейсера между лекарственным средством и антителом для предотвращения стерических конфликтов при распознавании субстрата катепсином В. После ферментного расщепления амидной связи цитруллина-PABC, образующееся PABC-замещенное лекарственное средство, например, монометил ауристатин Е (ММАЕ), спонтанно подвергается 1,6-элиминированию с высвобождением свободного лекарственного средства (например, ММАЕ) в качестве продукта.

Однако эффективность системы PABC линкера для доставки лекарственного средства в клетку-мишень может быть ограничена из-за медленного внутриклеточного высвобождения лекарственного средства и ограниченной стабильности фрагмента Val-Cit-PABC в плазме (Dorywalska et al., Mol. Cancer Ther. 2016, 15(5), 958-970).

Кроме того, исследования *in vivo* показывают, что фармакокинетические (ФК) свойства (например, распределение, печеночный клиренс) конъюгатов на основе Val-Cit-PABC зависят от количества молекул лекарственного средства, присоединенных к фрагменту антитела (Strop et al., Chem. & Biol. 2013, 20, 161-167). Таким образом, важным параметром конъюгатов антитело-лекарственное средство является отношение антитела-лекарственного средства (DAR) (или нагрузка лекарственного средства), относящееся к среднему количеству молекулы (молекул) лекарственного средства, присоединенной к одному фрагменту антитела. Значение DAR влияет не только на эффективность, но также на ФК свойства и токсичность конъюгатов. В частности, высокое значение DAR (то есть высокую нагрузку лекарственного средства) связывали со сниженными ФК свойствами и/или более высокой токсичностью вследствие агрегации молекул конъюгата и/или преждевременного расщепления.

Чтобы преодолеть эти проблемы, предложили использовать гидрофильные линкерные системы, содержащие отрицательно заряженные сульфатные группы, полиэтиленгликолевые группы или пирофосфатдиэфирные группы для уменьшения агрегации конъюгата. Аналогичным образом, в WO 2015/123679 A1 раскрыты гидрофильные конъюгаты антитела-лекарственного средства на основе комбинации гидрофильного линкера с гидрофильным лекарственным средством, таким как ауристатин, химически модифицированным гидрофильной аминокислотой, например, Thr. Гидрофильные конъюгаты, как указано в WO 2015/123679 A1, демонстрируют хорошие ФК свойства в модели *in vivo*. Однако эффективность гидрофильных линкерных систем, например, раскрытых в WO 2015/123679 A1, может быть ограничена вследствие неспецифического ферментного расщепления, медленного внутриклеточного высвобождения лекарственного средства и/или увеличенного захвата лизосомами.

Кроме того, достижение высоких значений DAR (высокой нагрузки лекарственного средства) часто ограничено повышенной тенденцией к агрегации ADC, стерическими факторами (например, обусловленными множественными сайтами присоединения) или отсутствием системной стабильности.

Таким образом, существует потребность в новых соединениях, включающих линкерную систему, которая является стабильной в системном кровотоке и может быстро высвобождать и доставлять лекарственное средство в клетку-мишень.

Следовательно, целью настоящего изобретения является получение соединений, включающих линкерную систему, которая является стабильной в системном кровотоке и обеспечивает быстрое высвобождение и доставку лекарственного средства в клетку-мишень бесследным способом. Еще одной целью настоящего изобретения является получение фармацевтических композиций, содержащих такие соединения.

Еще одной целью настоящего изобретения является получение соединений, включающих линкерную систему, которая является стабильной в системном кровотоке, и в то же время способна высвобождать множество молекул лекарственного средства (например, множество полезных нагрузок), где отдельные молекулы лекарственного средства могут быть одинаковыми или разными.

Другая цель настоящего изобретения состоит в предоставлении соединений или композиций, которые могут применяться в способах лечения или предупреждения рака, аутоиммунного заболевания и/или инфекционного заболевания.

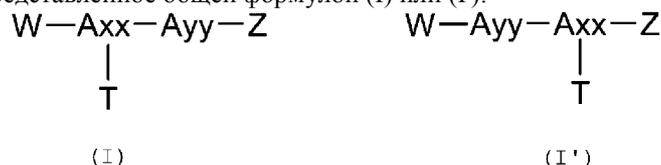
### **Сущность изобретения**

В настоящем изобретении предложена новая расщепляемая линкерная система, которая может применяться в конъюгатах лиганда-лекарственного средства. Линкерная система отличается С-концевой дипептидной единицей, несущей лекарственное средство или векторную группу на своей боковой цепи. С-концевая дипептидная единица действует в качестве высокоспецифичного субстрата для экзопептидазной (т.е. карбоксидипептидазной) активности катепсина В, что приводит к улучшенному внутриклеточному расщеплению и высвобождению лекарственного средства. Линкерная система является стабильной и обеспечивает высвобождение множества молекул лекарственного средства (например, множества полезных нагрузок), где отдельные молекулы лекарственного средства могут быть одинаковыми или различными, что приводит к повышенной эффективности. Линкерная система также позволяет достигнуть высокой нагрузки лекарственного средства (например, высокого DAR), что приводит к значи-

тельному повышению эффективности.

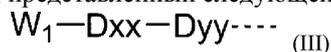
Настоящее изобретение, в частности, включает следующие варианты осуществления ("Пункты"):

1. Соединение, представленное общей формулой (I) или (I'):



где в формулах (I) и (I')

W представляет собой фрагмент, представленный следующей формулой (III):



где

$W_1$  представляет собой фрагмент, полученный из лекарственного средства, отличающегося от нативного лекарственного средства только ковалентным присоединением к  $D_{xx}$ , как показано в формуле (III), если лекарственное средство является аналогом ауристатина, ауристатин является ауристатином Phe (AF), ауристатином Cit (ACit), ауристатином Arg (AArg), ауристатином Lys (ALys), ауристатином Orn (AOrn), ауристатином Dab (ADab) или ауристатином Dap (ADap), предпочтительно AF;

$D_{xx}$  представляет собой одинарную ковалентную связь или аминокислоту, имеющую гидрофобную боковую цепь, предпочтительно аминокислоту, выбранную из Phe, Val, Tyr, гомо-Phe и Ala, предпочтительно Phe или Val, где одинарная ковалентная связь или аминокислота, имеющая гидрофобную боковую цепь, необязательно присоединены к фрагменту  $W_1$  через двухвалентный фрагмент, выбранный из малеимидов, триазолов, гидразинов, карбонилсодержащих групп и их производных;

$D_{yy}$  представляет собой одинарную ковалентную связь, Phe или аминокислоту, выбранную из Arg, Lys, Цитруллин (Cit), Орнитин (Orn), 2,3-диамино-пропионовой кислоты (Dap), 2,4-диамино-масляной кислоты (Dab);

при условии, что, если  $D_{xx}$  является аминокислотой, выбранной из Phe, Leu, Ile, Val, Tyr, гомо-Phe, Trp и Ala,  $D_{yy}$  является Phe или аминокислотой, выбранной из Arg, Lys, Cit, Orn, Dap и Dab, и если  $D_{xx}$  является одинарной ковалентной связью,  $D_{yy}$  является одинарной ковалентной связью, Phe или аминокислотой, выбранной из Arg, Lys, Cit, Orn, Dap и Dab;

и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к N-концу  $A_{xx}$  в формуле (I) или N-концу  $A_{yy}$  в формуле (I');

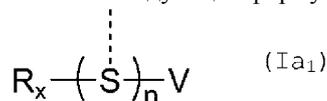
$A_{xx}$  представляет собой аминокислоту, выбранную из Glu, Aaa, Dap, Dab, Lys, Orn, Ser, Ama и гомо-лизина (гомо-Lys); при условии, что  $A_{xx}$  в формуле (I) не является аминокислотой в (D) конфигурации;

$A_{yy}$  в формуле (I) представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, гомо-Phe, Ala, Trp, Phg, Leu, Val, Tyr, гомо-Tyr, Tyr( $OR_1$ ) и гомо-Tyr( $OR_1$ ), где  $R_1$  является  $-(CH_2CH_2O)_{n1}-R_2$ , где  $R_2$  является атомом водорода или метильной группой, и  $n1$  является целым числом от 2 до 24;

$A_{yy}$  в (I') представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, гомо-Phe, Ala, Trp, Phg, Leu, Val, Tyr и Ser;

при условии, что  $A_{yy}$  в формуле (I') не является аминокислотой в (D) конфигурации;

T является фрагментом, представленным следующей формулой (Ia<sub>1</sub>):



где в формуле (Ia<sub>1</sub>)

S представляет собой группу, содержащую один или более атомов, выбранных из углерода, азота, кислорода и серы;

V представляет собой фрагмент, полученный из векторной группы, способной к взаимодействию с клеткой-мишенью;

n является целым числом от 1 до 10;

$R_x$  является атомом или группой, которые необязательно присутствуют для насыщения свободной валентности S, если таковая присутствует;

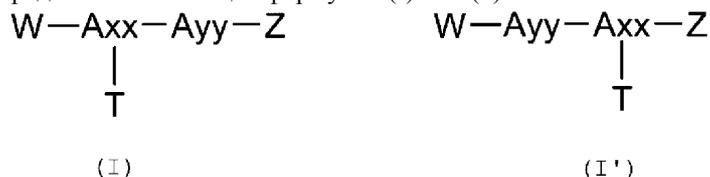
и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к боковой цепи  $A_{xx}$ ; если n больше 1, каждая пунктирная линия представляет собой ковалентную связь с индивидуальной, отдельной группой формулы (I) или формулы (I'), где множество групп формулы (I) или формулы (I') могут быть одинаковыми или различными; если n больше 1, S могут быть одинаковыми или различными;

Z представляет собой группу, ковалентно связанную с C-концом  $A_{yy}$  или  $A_{xx}$ , выбранными из -OH; -N(H)(R), где R представляет собой атом водорода, алкильную группу, содержащую от 1 до 20 атомов углерода, циклоалкильную группу, содержащую от 3 до 20 атомов углерода, или ароматическую группу, содержащую от 6 до 20 атомов углерода; или метящее средство, такое как производное кумарина.



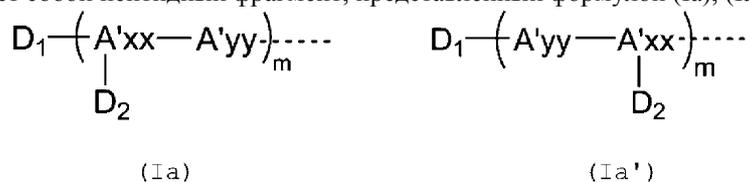
рода, циклоалкильную группу, имеющую от 3 до 20 атомов углерода, или ароматическую группу, имеющую от 6 до 20 атомов углерода; или метящее средство, такое как производное кумарина.

3. Соединение, представленное общей формулой (I) или (I'):



где в формулах (I) и (I')

W представляет собой пептидный фрагмент, представленный формулой (Ia), (Ia') или (Ib):



где в формулах (Ia) и (Ia')

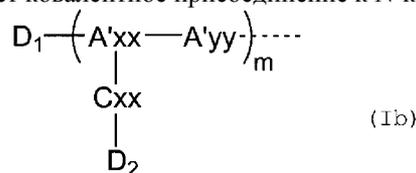
A'yy представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, Ala, Trp, Tyr, Phe, Met, Val, His, Lys, Arg, Cit, Abu, Orn, при условии, что A'yy в формуле (Ia') не является аминокислотой в (D) конфигурации;

D<sub>1</sub> представляет собой фрагмент, полученный из противоопухолевого лекарственного средства; m является целым числом от 1 до 10;

если m=1, то A'xx представляет собой аминокислоту, выбранную из Glu, Ara, Aaa, Dap, Dab, Lys, Orn, Ser, Ama и гомо-Lys, при условии, что A'xx в формуле (Ia) не является аминокислотой в (D) конфигурации, D<sub>2</sub> представляет собой фрагмент, полученный из противоопухолевого лекарственного средства, необязательно фрагмент, полученный из того же лекарственного средства, что и D<sub>1</sub>;

если m больше 1, то каждый D<sub>2</sub> независимо выбран из атома водорода и фрагментов, полученных из противоопухолевого лекарственного средства, где множество фрагментов D<sub>2</sub> могут быть одинаковыми или различными, при условии, что по меньшей мере один D<sub>2</sub> не является атомом водорода, если D<sub>2</sub> является атомом водорода, то тогда A'xx представляет собой аминокислоту, при условии, что A'xx в формуле (Ia) не является аминокислотой в (D) конфигурации, если D<sub>2</sub> является фрагментом, полученным из противоопухолевого лекарственного средства, то A'xx представляет собой аминокислоту, выбранную из Glu, Ara, Aaa, Dap, Dab, Lys, Orn, Ser, Ama и гомо-Lys, при условии, что A'xx в формуле (Ia) не является аминокислотой в (D) конфигурации;

и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к N-концу Axx или Ayy;



где в формуле (Ib)

A'yy представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, Ala, Trp, Tyr, Phe, Met, Val, His, Lys, Arg, Cit, Abu, Orn;

D<sub>1</sub> представляет собой фрагмент, полученный из лекарственного средства;

m является целым числом от 1 до 10;

если m=1, то A'xx представляет собой трифункциональную аминокислоту, выбранную из Glu, α-аминоадипиновой кислоты (Aaa), Dap, Dab, Ser, Thr, гомо-серина (гомо-Ser), гомо-треонина (гомо-Thr) и аминмалоновой кислоты (Ama), при условии, что A'xx не является аминокислотой в (D) конфигурации; D<sub>2</sub> представляет собой фрагмент, полученный из противоопухолевого лекарственного средства, необязательно фрагмент, полученный из того же лекарственного средства, что и D<sub>1</sub>, Cxx представляет собой одинарную ковалентную связь, если A'xx не является Ama, если A'xx является Ama, Cxx представляет собой (L)- или (D)-Pro, или N-метиламинокислоту, такую как саркозин (Sar), N-конец Cxx связан с C-концом Ama, и C-конец Cxx связан с фрагментом D<sub>2</sub>;

если m больше 1, то каждый D<sub>2</sub> независимо выбран из атома водорода и фрагментов, полученных из противоопухолевого лекарственного средства, где множество фрагментов D<sub>2</sub> могут быть одинаковыми или различными, при условии, что по меньшей мере один D<sub>2</sub> не является атомом водорода, если D<sub>2</sub> является атомом водорода, то тогда A'xx представляет собой аминокислоту, при условии, что A'xx не находится в (D) конфигурации, и Cxx представляет собой одинарную ковалентную связь, если D<sub>2</sub> является фрагментом, полученным из противоопухолевого лекарственного средства, то тогда A'xx представляет собой аминокислоту, выбранную из Glu, Aaa, Dap, Dab, Ser, Thr, гомо-Ser, гомо-Thr и Ama, при условии, что A'xx не является аминокислотой в (D) конфигурации, Cxx представляет собой одинарную ковалент-

ную связь, если A'xx не является Ama, если A'xx является Ama, Cxx представляет собой (L)- или (D)-Pro, или N-метиламинокислоту, такая как Sar, где N-конец Cxx связан с C-концом Ama, и C-конец Cxx связан с фрагментом D<sub>2</sub>;

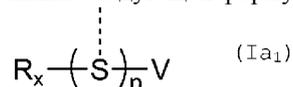
и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к N-концу Axx или Ауу;

Axx представляет собой аминокислоту, выбранную из Glu, Aaa, Dap, Dab, Lys, Orn и гомо-Lys; при условии, что Axx в формуле (I) не является аминокислотой в (D) конфигурации;

Ауу в формуле (I) представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, гомо-Phe, Ala, Trp, Phg, Leu, Val, Tug, гомо-Tug, Tug(OR<sub>1</sub>) и гомо-Tug(OR<sub>1</sub>), где R<sub>1</sub> является -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n1</sub>-R<sub>2</sub>, где R<sub>2</sub> является атомом водорода или метильной группой, и n1 является целым числом от 2 до 24;

Ауу в (I') представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, гомо-Phe, Ala, Trp, Phg, Leu, Val, Tug и Ser; при условии, что Ауу в формуле (I') не является аминокислотой в (D) конфигурации;

T является фрагментом, представленным следующей формулой (Ia<sub>1</sub>):



где в формуле (Ia<sub>1</sub>)

S представляет собой группу, содержащую один или более атомов, выбранных из углерода, азота, кислорода и серы;

V представляет собой фрагмент, полученный из векторной группы, способной к взаимодействию с опухолевой клеткой, где векторную группу выбирают из антител и их фрагментов;

n является целым числом от 1 до 10;

R<sub>x</sub> является атомом или группой, которые необязательно присутствуют для насыщения свободной валентности S, если таковая присутствует;

и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к боковой цепи Axx; если n больше 1, каждая пунктирная линия представляет собой ковалентную связь с индивидуальной, отдельной группой формулы (I) или формулы (I'), где множество групп формулы (I) или формулы (I') могут быть одинаковыми или различными; если n больше 1, S могут быть одинаковыми или различными;

Z представляет собой группу, ковалентно связанную с C-концом Ауу или Axx, выбранных из -OH; -N(H)(R), где R представляет собой атом водорода, алкильную группу, имеющую от 1 до 20 атомов углерода, циклоалкильную группу, имеющую от 3 до 20 атомов углерода, или ароматическую группу, имеющую от 6 до 20 атомов углерода; или метящее средство, такое как производное кумарина.

4. Соединение согласно п.3, где по меньшей мере один из A'xx, A'уу и m определен следующим образом:

A'xx в формулах (Ia) и (Ia') представляет собой аминокислоту, выбранную из Dap, Dap, Lys, Orn и гомо-Lys;

A'уу в формулах (Ia), (Ia') и (Ib) представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, Ala, Trp, Phg и Tug;

m является целым числом от 1 до 4.

5. Соединение согласно любому из пп.1-4, где в формуле (Ia<sub>1</sub>)

S представляет собой двухвалентную группу, выбранную из двухвалентной алкиленовой группы, двухвалентной алкениленовой группы, двухвалентной алкиниленовой группы и двухвалентного полиалкиленоксида.

6. Соединение по пункту 5, где в формуле (Ia<sub>1</sub>)

S представляет собой двухвалентную группу, имеющую формулу -(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-Azz<sub>5</sub>- или -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-Azz<sub>5</sub>-; где q является целым числом от 1 до 50; и Azz<sub>5</sub> отсутствует или представляет собой солибилизирующую группу, выбранную из аминокислоты, такой как Arg или (D)-Arg, и двухвалентную группу, содержащую аммониевую группу, сульфатную группу, сульфонатную группу или пиррофосфатдизэфирную группу.

7. Соединение согласно любому из пп.1-6, где в формуле (Ia<sub>1</sub>)

S представляет собой двухвалентную группу, имеющую формулу -(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-Azz<sub>5</sub>-Y-, или двухвалентную группу, имеющую формулу (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-Azz<sub>5</sub>-Y-;

где Y представляет собой двухвалентный фрагмент, ковалентно связанный с C-концом Azz<sub>5</sub> и с фрагментом V; если Azz<sub>5</sub> отсутствует, Y ковалентно связан с алкильной группой или полиэтиленоксидной группой и с фрагментом V; Y получен из соединения, выбранного из малеимидов, триазолов, в особенности 1,2,3-триазола, гидразинов, карбонилсодержащих групп и их производных; q является целым числом от 1 до 50; и Azz<sub>5</sub> имеет значение, определенное в п.6.

8. Соединение по пп.1,2 или 3, где соединение формулы (I) и формулы (Ia) выбрано из:

W1-Arg-Lys(T)-Phe-Z, W1-Arg-Lys(T)-гомоPhe-Z, W1-Cit-Lys(T)-Phe-Z, W1-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, W1-Cit-Lys(T)-гомоTyr-Z, W1-Lys(T)-Phe-Z, W1-Lys(T)-Tyr-Z, W1-Lys(T)-гомоTyr-Z, W1-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Phe-Z, W1-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, W1-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-гомоTyr-Z, W1-Mal-Phe-Lys-Lys(T)-Phe-Z, W1-Mal-гомоPhe-Arg-Lys(T)-Phe-Z, W1-Mal-гомоPhe-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, W1-Mal-гомоPhe-Cit-Lys(T)-Tyr(OR1)-Z,

где R<sub>1</sub> -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n1</sub>-R<sub>2</sub>, где R<sub>2</sub> является атомом водорода или метильной группой, и n1 является целым числом от 2 до 24, например 12,

W1-Mal-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, W1-Mal-Cit-Lys(T)-гомоTyr-Z, W1-Mal-Arg-Lys(T)-гомоTyr-Z, W1-Cit-(Lys(D2)-Phe)m-Lys(T)-Phe-Z, W1-Cit-(Lys(D2)-Phe)m-Lys(T)-гомоTyr-Z, W1-Cit-(Lys(D2)-Phe)m-Lys(T)-Tyr(OR1)-Z,

где R<sub>1</sub> -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n1</sub>-R<sub>2</sub>, где R<sub>2</sub> является атомом водорода или метильной группой, и n1 является целым числом от 2 до 24, например 12,

W1-(Lys(D2)-Phe)m-Lys(T)-Phe-Z, W1-Phe-(Phe-Lys(D2))m-Lys(T)-Tyr-Z, W1-(Phe-Lys(D2))m-Lys(T)-Tyr-Z, W1-Phe-(Phe-Lys(D2))m-Lys(T)-гомоTyr-Z и W1-Arg-(Phe-Lys(D2))m-Lys(T)-Tyr(OR1)-Z;

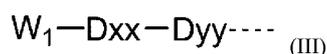
и соединение формулы (I') выбрано из

W1-Arg-Phe-Lys(T)-Z, W1-Arg-Ser-Lys(T)-Z, W1-Cit-Phe-Lys(T)-Z, W1-Cit-Ser-Lys(T)-Z, W1-Cit-гомоPhe-Lys(T)-Z, W1-Phe-Lys(T)-Z, W1-Ser-Lys(T)-Z, W1-Mal-Phe-Cit-Phe-Lys(T)-Z, W1-Mal-гомоPhe-Cit-Phe-Lys(T)-Z, W1-Mal-Phe-Arg-Phe-Lys(T)-Z, W1-Mal-Cit-Phe-Lys(T)-Z, W1-Mal-Phe-Ser-Lys(T)-Z, W1-Mal-Ala-Phe-Lys(T)-Z, W1-Mal-Cit-Ser-Lys(T)-Z и W1-Mal-Arg-гомоPhe-Lys(T)-Z.

где W<sub>1</sub>, T, Z, D<sub>2</sub> и m имеют значения, определенные в пп.1, 2 или 3. 9. Соединение согласно любому из пп.2-8, где каждый фрагмент, полученный из противоопухолевого лекарственного средства, независимо выбран из алкилирующих средств, алкалоидов, таких как таксаны и майтанзиноиды, антиметаболиты, гормональные терапии, ингибиторы киназ, радиоизотопов и/или их фармацевтически приемлемых солей.

10. Соединение согласно любому из пп.2-9, где каждый фрагмент, полученный из лекарственного средства, независимо получен из аманитина, дуокармицина, майтанзина, тубулизина, калихеамицина, камптотецина, SN-38, таксола, дауномицина, винбластина, доксорубицина, метотрексата, пирролбензодиазепина или радиоизотопов и/или их фармацевтически приемлемых солей.

11. Соединение согласно любому из пп.3, 5, 7, 8, 9 и 10, где каждый фрагмент D<sub>1</sub> независимо представлен следующей формулой (III):



где

W<sub>1</sub> представляет собой фрагмент, полученный из аманитина, дуокармицина, ауристатина, майтанзина, тубулизина, калихеамицина, камптотецина, SN-38, таксола, дауномицина, винбластина, доксорубицина, метотрексата, пирролбензодиазепина или радиоизотопов и/или их фармацевтически приемлемых солей;

D<sub>xx</sub> представляет собой одинарную ковалентную связь или аминокислоту, выбранную из Phe, Leu, Ile, гомо-Phe, Trp, Val и Ala, где одинарная ковалентная связь или аминокислота, необязательно присоединены к фрагменту W<sub>1</sub> через двухвалентный фрагмент, выбранный из малеимидов, триазолов, гидразидов, карбонилсодержащих групп и их производных;

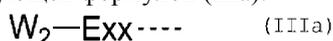
D<sub>yy</sub> представляет собой одинарную ковалентную связь, Phe или аминокислоту, выбранную из Arg, Lys, Cit, Orn, Dap и Dab;

при условии, что, если D<sub>xx</sub> является аминокислотой, D<sub>yy</sub> является Phe или аминокислотой, выбранной из Arg, Lys, Cit, Orn, Dap, и Dab, и если D<sub>xx</sub> является одинарной ковалентной связью, D<sub>yy</sub> является одинарной ковалентной связью, Phe или аминокислотой, выбранной из Arg, Lys, Cit, Orn, Dap и Dab;

и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к N-концу A<sub>xx</sub> в формуле (I), N-концу Ауу в формуле (I'), N-концу A<sub>xx</sub> в формулах (Ia) и (Ib) или N-концу A'уу в формуле (Ia').

12. Соединение согласно любому из пп.3-11, где каждый фрагмент

D<sub>2</sub> независимо представлен следующей формулой (IIIa):



где

W<sub>2</sub> представляет собой фрагмент, полученный из аманитина, дуокармицина, ауристатина, майтан-

зина, тубулизина, калихеамицина, камптотецина, SN-38, таксола, дауномицина, винбластина, доксорубицина, метотрексата, пирролбензодиазепина или радиоизотопов и/или их фармацевтически приемлемых солей;

Ехх представляет собой одинарную ковалентную связь или двухвалентный фрагмент, выбранный из маленимидов, триазолов, гидразинов, карбонилсодержащих групп, аминокислот, дипептидных фрагментов и их производных;

и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к боковой цепи А'хх в формулах (Ia) и (Ia'), боковой цепи А'хх или С-концу Схх, если таковой присутствует, в формуле (Ib).

13. Соединение согласно любому из пп.1-3, где V представляет собой антитело или фрагмент антитела, выбранные из одноцепочечного антитела, моноклонального антитела, одноцепочечного моноклонального антитела, фрагмента моноклонального антитела, химерного антитела, фрагмента химерного антитела, доменного антитела или его фрагмента.

14. Соединение согласно любому из пп.1-3, где опухолевая клетка выбрана из клеток лимфомы, клеток миеломы, клеток рака почки, клеток рака молочной железы, клеток рака предстательной железы, клеток рака яичника, клеток рака толстой и прямой кишки, клеток рака желудка, клеток плоскоклеточного рака, клеток мелкоклеточного рака легкого, клеток рака яичка и любых клеток, которые растут и делятся с нерегулируемой и повышенной скоростью, вызывая онкологические заболевания.

15. Фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество соединения согласно любому из пп.1-13 или его фармацевтически приемлемой соли и один или более компонентов, выбранных из носителя, разбавителя и других вспомогательных веществ.

16. Применение соединения или композиции согласно любому из пп.1-15 для лечения или предотвращения рака.

17. Применение согласно п.16, где в способе лечения или предотвращения рака соединение или композиции вводят одновременно, до или после одного или более других терапевтических средств или терапий, таких как химиотерапевтические средства, лучевая терапия, иммунотерапевтические средства, средства для лечения аутоиммунных нарушений, противоионфекционные средства или другие соединения формулы (I)/(I').

18. Способ лечения или предотвращения рака, где терапевтически эффективное количество соединения или композиции согласно любому из пп.1-15 вводят нуждающемуся в этом пациенту.

#### Фигуры

Фиг. 1. (а) Механизм экзо-Cat В-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения формулы (I), где W представляет собой фрагмент, представленный формулой (III), или пептидный фрагмент, представленный формулой (Ia), (Ia') или (Ib), и T является фрагментом формулы (Ia<sub>1</sub>) при n=1. Внутриклеточное экзо-Cat В расщепление на N-конце дипептида Ахх-Ауу высвобождает свободное лекарственное средство в клетке-мишени. Согласно данному варианту осуществления расщепление ферментом и высвобождение лекарственного средства происходят одновременно. (b) Механизм экзо-Cat В-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения формулы (I), где W представляет собой фрагмент, представленный формулой (III), и T является фрагментом формулы (Ia<sub>1</sub>) при n=1. Внутриклеточное экзо-Cat В расщепление на N-конце дипептида Ахх-Ауу высвобождает модифицированное лекарственное средство W<sub>1</sub>-Dхх-Дуу, где W<sub>1</sub> является лекарственным средством, полученным из нативного лекарственного средства только путем ковалентного присоединения к Dхх, в клетке-мишени.

Фиг. 2. Механизм экзо-Cat В-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения формулы (I'), где W представляет собой фрагмент, представленный формулой (III), или пептидный фрагмент, представленный формулой (Ia), (Ia') или (Ib), и T является фрагментом формулы (Ia<sub>1</sub>) при n=1. Внутриклеточное экзо-Cat В расщепление на N-конце дипептида Ауу-Ахх высвобождает свободное лекарственное средство в клетке-мишени. Согласно данному варианту осуществления расщепление ферментом и высвобождение лекарственного средства происходят одновременно.

Фиг. 3. Механизм экзо-Cat В-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения формулы (I) или формулы (I'), где W представляет собой фрагмент, представленный формулой (III), или пептидный фрагмент, представленный формулой (Ia), (Ia') или (Ib), и T является фрагментом формулы (Ia<sub>1</sub>) при n=4. Внутриклеточное экзо-Cat В расщепление на N-конце каждого С-концевого дипептида Ахх-Ауу формулы (I) или каждого С-концевого дипептида Ауу-Ахх формулы (I') высвобождает свободное лекарственное средство(а) в клетке-мишени. Согласно данному варианту осуществления множественное расщепление ферментом и высвобождение лекарственного средства (средств) происходит одновременно.

Фиг. 4. Механизм экзо-Cat В-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения формулы (I), где W представляет собой пептидный фрагмент, имеющий формулу (Ia) при m=1, и T является фрагментом формулы (Ia<sub>1</sub>) при n=1. Внутриклеточное экзо-Cat В расщепление на N-конце Ахх-Ауу и А'хх-А'уу высвобождает фрагмент D<sub>1</sub> и А'хх(D<sub>2</sub>)-А'уу. Согласно данному варианту осуществления расщепление ферментом и высвобождение D<sub>1</sub> и А'хх(D<sub>2</sub>)-А'уу происходят одновременно. Согласно одному другому варианту осуществления настоящего изобретения, А'хх(D<sub>2</sub>)-А'уу может подвергаться внутримолекулярному аминолизу (т.е. с образованием 5- или 6-членного цикла), катализируемому фер-

ментом или кислотой гидролизу или образованию дикетопиперазина (ДКР) с высвобождением  $D_2$ .

Фиг. 5. Механизм экзо-Cat В-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения формулы (I), где W представляет собой пептидный фрагмент, имеющий формулу (Ia) при  $m \geq 1$ , и T представляет собой фрагмент формулы (Ia<sub>1</sub>) при  $n=1$ . Внутриклеточное экзо-Cat В расщепление на N-конце Axx-Ayy и последовательное экзо-Cat В расщепление каждой единицы A'xx-A'yy высвобождает фрагмент  $D_1$  и m фрагментов A'xx(D<sub>2</sub>)-A'yy. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения один или более фрагментов A'xx(D<sub>2</sub>)-A'yy могут подвергаться внутримолекулярному аминолитису или гидролизу с высвобождением  $D_2$ .

Фиг. 6. Механизм экзо-Cat В-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения формулы (I'), где W представляет собой пептидный фрагмент, имеющий формулу (Ia) при  $m=1$ , и T является фрагментом формулы (Ia<sub>1</sub>) при  $n=1$ . Внутриклеточное экзо-Cat В расщепление на N-конце Ayy-Axx и A'xx-A'yy высвобождает  $D_1$  и A'xx(D<sub>2</sub>)-A'yy. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения фрагмент A'xx(D<sub>2</sub>)-A'yy может подвергаться внутримолекулярному аминолитису или гидролизу с высвобождением  $D_2$ .

Фиг. 7. Механизм экзо-Cat В-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения формулы (I'), где W представляет собой пептидный фрагмент, имеющий формулу (Ia) при  $m \geq 1$ , и T представляет собой фрагмент формулы (Ia<sub>1</sub>) при  $n=1$ . Внутриклеточное экзо-Cat В расщепление на N-конце Ayy-Axx и последовательное экзо-Cat В расщепление каждого A'xx-A'yy высвобождает фрагменты  $D_1$  и m A'xx(D<sub>2</sub>)-A'yy. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения один или более фрагментов A'xx(D<sub>2</sub>)-A'yy могут подвергаться внутримолекулярному аминолитису или гидролизу с высвобождением  $D_2$ .

Фиг. 8. Механизм экзо-Cat В-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения формулы (II). Внутриклеточное экзо-Cat В расщепление на N-конце каждого пептида Vxx-Vyy высвобождает V-S-Vxx<sub>1</sub>-Vxx<sub>2</sub> и o фрагментов Vxx(D)-Vyy-OH, которые могут подвергаться внутримолекулярному аминолитису или гидролизу с высвобождением o фрагментов D.

Фиг. 9. Механизм экзо-Cat В-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения формулы (I'), где D представляет собой фрагмент, полученный из майтанзина (DMR), и T представляет собой фрагмент формулы (Ia<sub>1</sub>) при  $n=1$ , в котором S представляет собой  $-(OCH_2CH_2)_q$  при  $q=4$  (ПЭГ<sub>4</sub>). Дуу на фиг. 9 представляет собой аминокислоту, выбранную из Arg, Lys, Cit и Phe. Согласно данному варианту осуществления, Cat В-индуцированное ферментное расщепление на N-конце Axx высвобождает лекарственное средство в клетке-мишени.

Фиг. 10. Схематическое изображение, иллюстрирующее применение LDC в диагностике. Cat В-индуцированное расщепление на C-конце флуоресцентного зонда 7-амино-4-метилкумарина (АМС) позволяет контролировать высвобождение лекарственного средства в клетке-мишени.

Фиг. 11-17. Схематические изображения, на которых показано синтетическое получение соединений 1-7 (соединений формулы (I) или (I')). Фиг. 11: получение соединения 1, т.е. AF-Arg-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac)-Phe-OH (соединения формулы (I), в котором  $n=1$ , W=AF-Arg, W<sub>1</sub>=AF, Dxx=одинарная связь, Дуу=Arg, T=ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac, Axx=Lys, Ayy=Phe и Z=OH). Фиг. 12: получение соединения 2, т.е. AF-Arg-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal)-Phe-OH (соединения формулы (I), в котором  $n=1$ , W=AF-Arg, W<sub>1</sub>=AF, Dxx=одинарная связь, Дуу=Arg, Axx=Lys, Ayy=Phe и Z=OH; "Mal" представляет собой производное малеимида для присоединения вектора). Фиг. 13: получение соединения 3, т.е. AF-Arg-Phe-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac)-OH (соединения формулы (I'), в котором  $n=1$ , W=AF-Arg, W<sub>1</sub>=AF, Dxx=одинарная связь, Дуу=Arg, T=ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac, Axx=Lys, Ayy=Phe и Z=OH). Фиг. 14: получение соединения 4, т.е. AF-Arg-Phe-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal)-OH (соединения формулы (I'), в котором  $n=1$ , W=AF-Arg, W<sub>1</sub>=AF, Dxx=одинарная связь, Дуу=Arg, Axx=Lys, Ayy=Phe и Z=OH; "Mal" представляет собой производное малеимида для присоединения вектора). Фиг. 15: получение соединения 5, т.е. DM1-Mal-Phe-Lys-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac)-Phe-OH (соединения формулы (I), в котором  $n=1$ , W<sub>1</sub>=DM1, Dxx=Mal-Phe, Дуу=Lys, T=ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac, Axx=Lys, Ayy=Phe и Z=OH). Фиг. 16: получение соединения 6, т.е. DM1-Mal-Phe-Cit-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac)-Phe-OH (соединения формулы (I), в котором  $n=1$ , W<sub>1</sub>=DM1, Dxx=Mal-Phe, Дуу=Cit, T=ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac, Axx=Lys, Ayy=Phe и Z=OH). Фиг. 17: получение соединения 7, т.е. DM1-Mal-Phe-Cit-Phe-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac)-OH (соединения формулы (I'), в котором  $n=1$ , W<sub>1</sub>=DM1, Dxx=Mal-Phe, Дуу=Cit, T=ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac, Axx=Lys, Ayy=Phe и Z=OH).

Фиг. 18-28. Схематические изображения, на которых показано синтетическое получение соединений 8-18 (соединений формулы (II)). Фиг. 18: получение соединения 8, т.е. Arg-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg-Glu(Sar-OCPT)-Phe-OH (соединения формулы (IIa), в котором  $o=1$  и  $p=1$ , D=CPT, V=Arg, S=ПЭГ<sub>4</sub>, Vxx=Glu, Vyy=Phe, Vxx<sub>1</sub>=Phe, Vxx<sub>2</sub>=Arg, Cxx=Sar и Z=OH). Фиг. 19: получение соединения 9, т.е. Arg-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg-Dap(CO-CPT)-Phe-OH (соединения формулы (II), в котором  $o=1$  и  $p=1$ , D=CPT, V=Arg, S=ПЭГ<sub>4</sub>, Vxx=Dap, Vyy=Phe, Vxx<sub>1</sub>=Phe, Vxx<sub>2</sub>=Arg и Z=OH). Фиг. 20: получение соединения 10, т.е. Arg-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg-Dab(CO-CPT)-Phe-OH (соединения формулы (II), в котором  $o=1$  и  $p=1$ , D=CPT, V=Arg, S=ПЭГ<sub>4</sub>, Vxx=Dab, Vyy=Phe, Vxx<sub>1</sub>=Phe, Vxx<sub>2</sub>=Arg и Z=OH). Фиг. 21: получение соединения 11, т.е. Arg-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg-Ser(CO-CPT)-Phe-OH (соединения формулы (II), в котором  $o=1$  и  $p=1$ , D=CPT, V=Arg, S=ПЭГ<sub>4</sub>,

Vxx=Ser, Vyy=Phe, Vxx<sub>1</sub>=Phe, Vxx<sub>2</sub>=Arg и Z=OH). Фиг. 22: получение соединения 12, т.е. Ac-Cys-Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Lys-Lys(Mal-DM1)-Phe-OH (соединения формулы (II), в котором o=1 и p=1, D=DM1-Mal, V=Ac-Cys-Mal, S=ПЭГ<sub>4</sub>, Vxx=Lys, Vyy=Phe, Vxx<sub>1</sub>Phe, Vxx<sub>2</sub>=Lys и Z=OH). Фиг. 23: получение соединения 13, т.е. Ac-Cys-Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Lys-Lys(AF)-Phe-OH (соединения формулы (II), в котором o=1 и p=1, D=AF, V=Ac-Cys-Mal, S=ПЭГ<sub>4</sub>, Vxx=Lys, Vyy=Phe, Vxx<sub>1</sub>Phe, Vxx<sub>2</sub>=Lys и Z=OH). Фиг. 24: получение соединения 14, т.е. Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Lys-Lys(AF)-Phe-OH (соединения формулы (II), в котором o=1 и p=1, D=AF, S=Mal-ПЭГ<sub>4</sub>, Vxx=Lys, Vyy=Phe, Vxx<sub>1</sub>=Phe, Vxx<sub>2</sub>=Lys и Z=OH; "Mal" представляет собой производное малеимида для присоединения вектора). Фиг. 25: получение соединения 15, т.е. Arg-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg-Glu(Sar-OCPT)-Arg-OH (соединения формулы (IIa), в котором o=1 и p=1, D=CPT, V=Arg, S=ПЭГ<sub>4</sub>, Vxx=Glu, Vyy=Arg, Vxx<sub>1</sub>Phe, Vxx<sub>2</sub>=Arg, Cxx=Sar и Z=OH). Фиг. 26: получение референсного соединения 16, т.е. Arg-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg-Glu(Sar-OCPT)-Arg-Phe-Arg-OH. Фиг. 27: получение соединения 17, т.е. Arg-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg-[Glu(Sar-OCPT)-Arg]<sub>2</sub>-OH (соединения формулы (IIa), в котором o=2 и p=1, D=CPT, V=Arg, S=ПЭГ<sub>4</sub>, Vxx=Glu, Vyy=Arg, Vxx<sub>1</sub>=Phe, Vxx<sub>2</sub>=Arg, Cxx=Sar и Z=OH). Фиг. 28: получение соединения 18, т.е. Arg-ПЭГ<sub>4</sub>-[Phe-Arg-Glu(Sar-OCPT)-Arg]<sub>2</sub>-OH (соединения формулы (IIa), в котором o=1 и p=2, D=CPT, V=Arg, S=ПЭГ<sub>4</sub>, Vxx=Glu, Vyy=Arg, Vxx<sub>1</sub>=Phe, Vxx<sub>2</sub>=Arg, Cxx=Sar и Z=OH).

Фиг. 29. Исследование экзо-Cat В-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения 1, т.е. AF-Arg-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac)-Phe-OH (формула (I)). Расщепление соединения 1 приводило к количественному высвобождению фармакологически активного фрагмента AF-Arg ( $t_{1/2}$ =1,5 мин).

Фиг. 30. Исследование экзо-Cat В-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения 3, т.е. AF-Arg-Phe-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac)-OH (формула (I')). Расщепление соединения 3 приводило к количественному высвобождению фармакологически активного фрагмента AF-Arg ( $t_{1/2}$ =1,4 мин).

Фиг. 31. Исследование экзо-Cat В-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения 5, т.е. DM1-Mal-Phe-Lys-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac)-Phe-OH (формула (I)). Расщепление соединения 5 приводило к количественному высвобождению фармакологически активного фрагмента DM1-Mal-Phe-Lys ( $t_{1/2}$ =0,59 мин).

Фиг. 32. Исследование экзо-Cat В-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения 12, т.е. Ac-Cys-Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Lys-Lys(Mal-DM1)-Phe-OH (формула (II)). Расщепление соединения 12 приводило к высвобождению фармакологически активного фрагмента Lys(Mal-DM1)-Phe ( $t_{1/2}$ =1,53 мин).

Фиг. 33. Исследование экзо-Cat В-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения 17, т.е. Arg-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg-[Glu(Sar-CPT)-Phe]<sub>2</sub>-OH (формула (II)). Отщепление С-концевого дипептида от соединения 17 приводит к временному образованию промежуточного соединения Arg-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg-(Glu(Sar-CPT)-Phe)-OH (соединения 8), которое, в свою очередь, расщепляется Cat В с высвобождением второго Glu(Sar-CPT)-Phe-OH, который в результате гидролиза сложного эфира высвобождает кампотетин (CPT).

Фиг. 34. Исследование экзо-Cat В-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения 18, т.е. Arg-ПЭГ<sub>4</sub>-[Phe-Arg-Glu(Sar-CPT)-Arg]<sub>2</sub>-OH (формула (II)). Последовательное расщепление соединения 18 приводит к временному образованию промежуточных соединений, Arg-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg-(Glu(Sar-CPT)-Arg)-Phe-Arg-OH (соединения 16) и Arg-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg-(Glu(Sar-CPT)-Arg)-OH (соединения 15), которые в свою очередь расщепляются Cat В с высвобождением второго Glu(Sar-CPT)-Arg-OH. Затем нативный CPT высвобождается при гидролизе сложного эфира.

Фиг. 35. Исследование цитотоксической активности соединений AF и AF-Arg в ErbB2-экспрессирующих линиях клеток SK-BR-3 и SK-OV-3 при инкубировании в течение 120 ч (пример 9). Верхний график: отношение выживания SK-OV-3 (%) после 120 ч инкубирования со снижаемыми концентрациями AF или AF-Arg (логарифмическое разведение) (два опыта; IC<sub>50</sub> (AF<sub>опыт1</sub>)=100,2 нМ, IC<sub>50</sub> (AF<sub>опыт2</sub>)=145,2 нМ; IC<sub>50</sub> (AF-Arg<sub>опыт1</sub>)=146,7 нМ, IC<sub>50</sub> (AF-Arg<sub>опыт2</sub>)=204,7 нМ). Нижний график: отношение выживания SK-BR-3 (%) после 120 ч инкубирования со снижаемыми концентрациями AF или AF-Arg (логарифмическое разведение) (два опыта; IC<sub>50</sub> (AF<sub>опыт1</sub>)=18,82 нМ, IC<sub>50</sub> (AF<sub>опыт2</sub>)=21,75 нМ; IC<sub>50</sub> (AF-Arg<sub>опыт1</sub>)=20,9 нМ, IC<sub>50</sub> (AF-Arg<sub>опыт2</sub>)=24,92 нМ).

Фиг. 36-41. Схематические изображения, на которых показано синтетическое получение соединений 19-24 (соединения формулы (I)/(I')). Фиг. 36: получение соединения 19, т.е. AF-Cit-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac)-Phe-OH (соединения формулы (I)/(III), в котором W<sub>1</sub>=AF, Dxx=одинарная связь, Дуу=Cit, T=ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac, Axx=Lys, Ауу=Phe и Z=OH). Фиг. 37: получение соединения 20, т.е. ACit-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac)-Phe-OH (соединения формулы (I)/(III), в котором W<sub>1</sub>=ACit, Dxx=Оуу=одинарная связь, T=ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac, Axx=Lys, Ауу=Phe и Z=OH). Фиг. 38: получение соединения 21, т.е. ACit-Phe-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac)-OH (соединения формулы (I)/(III), в котором W<sub>1</sub>=ACit, Dxx=одинарная связь, Дуу=Phe, T=ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac, Axx=Lys, Ауу=Phe и Z=OH). Фиг. 39: получение соединения 22, т.е. DM1-Mcc-Phe-Cit-Lys(ПЭГ<sub>5</sub>-Ma-Cys-Ac)-Tyr-OH (соединения формулы (I)/(III), в котором W<sub>1</sub>=DM1, Dxx=Mcc-Phe, Дуу=Cit, T=ПЭГ<sub>5</sub>-Ma-Cys-Ac, Axx=Lys, Ауу=Tyr и Z=OH). Фиг. 40: получение соединения 23, т.е. DM1-Mcc-Cit-Lys(ПЭГ<sub>5</sub>-Ma-Cys-Ac)-Tyr-OH (соединения формулы (I)/(III), в котором W<sub>1</sub>=DM1, Dxx=одинарная связь, Дуу=Cit, T=ПЭГ<sub>5</sub>-Ma-Cys-Ac, Axx=Lys, Ауу=Tyr и Z=OH). Фиг. 41: получение соединения 24, т.е. DM1-Mcc-Phe-Lys(ПЭГ<sub>5</sub>-Ma-Cys-Ac)-Tyr-OH (соединения формулы (I)/(III),

в котором  $W_1=DM1$ ,  $D_{xx}=Mcc$ -одинарная связь,  $D_{yy}=Phe$ ,  $T=ПЭГ_5$ -Ma-Cys-Ac,  $A_{xx}=Lys$ ,  $A_{yy}=Tyr$  и  $Z=OH$ ).

Фиг. 42-45. Схематические изображения, на которых показано синтетическое получение соединений 25-28 (соединений формулы (II)/(II')). Фиг. 42: получение соединения 25, т.е. Ac-Cys-Ma-ПЭГ<sub>5</sub>-Phe-Cit-Lys(Mcc-DM1)-Cit-OH (соединения формулы (II), в котором  $o=1$  и  $p=1$ ,  $D=DM1-Mcc$ ,  $V=Ac-Cys-Ma$ ,  $S=ПЭГ_5$ ,  $V_{xx}=Lys$ ,  $V_{yy}=Cit$ ,  $V_{xx_1}=Phe$ ,  $V_{xx_2}=Cit$  и  $Z=OH$ ). Фиг. 43: получение соединения 26, т.е. Ma-ПЭГ<sub>5</sub>-Phe-Cit-Lys(Mcc-DM1)-Cit-OH (соединения формулы (II), в котором  $o=1$  и  $p=1$ ,  $D=DM1-Mcc$ ,  $S=ПЭГ_5$ ,  $V_{xx}=Lys$ ,  $V_{yy}=Cit$ ,  $V_{xx_1}=Phe$ ,  $V_{xx_2}=Cit$  и  $Z=OH$ ). Фиг. 44: получение соединения 27, т.е. Ac-Cys-Ma-ПЭГ<sub>5</sub>-Phe-Cit-Lys(Mcc-DM1)-Tyr-OH (соединения формулы (II), в котором  $o=1$  и  $p=1$ ,  $D=DM1-Mcc$ ,  $V=Ac-Cys-Ma$ ,  $S=ПЭГ_5$ ,  $V_{xx}=Lys$ ,  $V_{yy}=Tyr$ ,  $V_{xx_1}=Phe$ ,  $V_{xx_2}=Cit$  и  $Z=OH$ ). Фиг. 45: получение соединения 28, т.е. Ac-Cys-Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Lys-Lys(Mal-DM1)-Phe-Phe-Lys-OH (промежуточного соединения для синтеза соединения 29).

Фиг. 46, 47. Схематические изображения, на которых показано синтетическое получение соединений 29-30 (соединений формулы (II) для высвобождения множества лекарственных средств). Фиг. 46: получение соединения 29, т.е. Ac-Cys-Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-[Phe-Lys-Lys(Mal-DM1)-Phe]<sub>2</sub>-OH (соединения формулы (II), в котором  $o=1$  и  $p=2$ ,  $D=Mal-DM1$ ,  $V=Ac-Cys$ ,  $S=ПЭГ_4$ ,  $V_{xx}=Lys$ ,  $V_{yy}=Phe$ ,  $V_{xx_1}=Phe$ ,  $V_{xx_2}=Lys$  и  $Z=OH$ ). Фиг. 47: получение соединения 30, т.е. Ac-Cys-Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg-Lys(Mal-DM1)-Arg-Lys(AF)-Phe-OH (соединения формулы (II), в котором  $o=2$  и  $p=1$ ,  $D=Mal-DM1/AF$ ,  $V=Ac-Cys$ ,  $S=ПЭГ_4$ ,  $V_{xx}=Lys/Lys$ ,  $V_{yy}=Arg/Phe$ ,  $V_{xx_1}=Phe$ ,  $V_{xx_2}=Arg$  и  $Z=OH$ ).

Фиг. 48, 49. Схематические изображения, на которых показано синтетическое получение соединений 31-32 (соединений формулы (I) для высвобождения множества лекарственных средств). Фиг. 48: получение соединения 31, т.е. AF-Cit-Lys(Mal-DM1)-Phe-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac)-Phe-OH (соединения формулы (I), где  $W$  является пептидным фрагментом формулы (Ia), в которой  $m=1$ ,  $D_1=AF-Cit$ ,  $D_2=Mal-DM1$ ,  $A_{xx}/A'_{xx}=Lys$ ,  $A_{yy}/A'_{yy}=Phe$ ,  $T=ПЭГ_4$ -Mal-Cys-Ac и  $Z=OH$ ). Фиг. 49: получение соединения 32, т.е. Ac-Cys-Mal-[ПЭГ<sub>5</sub>-Lys(AF-Cit-Lys(Y)-Phe-OH)]<sub>2</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (соединения формулы (I), где  $W$  является фрагментом формулы (III), в которой  $W_1=AF$ ,  $O_{xx}$ -одинарная связь и  $D_{yy}=Cit$ ,  $A_{xx}=Lys$ ,  $A_{yy}=Phe$  и  $Z=OH$ ;  $T$  является фрагментом формулы (Ia<sub>1</sub>), в которой  $V=Ac-Cys-Mal$ ,  $S=ПЭГ_5$ -Lys(Y),  $Y$ -триазол,  $R_x=Gly-NH_2$  и  $n=2$ ).

Фиг. 50. Исследование экзо-Cat B-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения 13, т.е. Ac-Cys-Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Lys-Lys(AF)-Phe-OH (формула (II)). Расщепление соединения 13 приводит к высвобождению фармакологически активного фрагмента Lys(AF)-Phe ( $t^{1/2}=1,62$  мин).

Фиг. 51. Исследование экзо-Cat B-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения 29, т.е. Ac-Cys-Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-[Phe-Lys-Lys(Mal-DM1)-Phe]<sub>2</sub>-OH (формула (II)). Множественные расщепления соединения 29 приводят к высвобождению двух фармакологически активных фрагментов Lys(Mal-DM1)-Phe.

Фиг. 52. Исследование экзо-Cat B-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения 30, т.е. Ac-Cys-Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg-Lys(Mal-DM1)-Arg-Lys(AF)-Phe-OH (формула (II)). Множественные расщепления соединения 30 приводят к высвобождению фармакологически активных фрагментов Lys(Mal-DM1)-Arg и Lys(AF)-Phe.

Фиг. 53. Исследование экзо-Cat B-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения 31, т.е. AF-Cit-Lys(Mal-DM1)-Phe-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac)-Phe-OH (формула (I)). Множественные расщепления соединения 31 приводят к высвобождению фармакологически активных фрагментов AF-Cit и Lys(Mal-DM1)-Phe.

Фиг. 54. Исследование экзо-Cat B-индуцированного высвобождения лекарственного средства из соединения 32, т.е. Ac-Cys-Mal-[ПЭГ<sub>5</sub>-Lys(AF-Cit-Lys(Y)-Phe-OH)]<sub>2</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (формула (I),  $Y$ -триазол). Множественные расщепления соединения 32 приводят к высвобождению двух фармакологически активных фрагментов AF-Cit.

Фиг. 55. Исследование экзо-Cat B-индуцированного высвобождения лекарственного средства из конъюгата антитела-лекарственного средства ADC1, т.е. AF-Arg-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-трастузумаб)-Phe-OH (формула (I)). Расщепление ADC1 приводит к высвобождению фармакологически активного фрагмента AF-Arg ( $t^{1/2}=4,22$  мин).

Фиг. 56. Исследование стабильности в плазме конъюгата антитела-лекарственного средства ADC1 в течение 24 ч. Результаты демонстрируют, что ADC1 демонстрирует превосходную стабильность в плазме (человека и мыши).

Фиг. 57. Анализ связывания конъюгата антитела-лекарственного средства ADC1 и трастузумаба в ErbB2-экспрессирующих и ErbB2-отрицательных линиях клеток (SK-BR-3 и MDA-MB-231, соответственно). Результаты показывают, что ADC1 обладает такой же аффинностью и специфичностью в отношении ErbB2-экспрессирующих клеток, что и трастузумаб.

Фиг. 58. Анализ связывания конъюгата антитела-лекарственного средства ADC3 и трастузумаба в ErbB2-экспрессирующих и ErbB2-отрицательных линиях клеток (BT-474 и MDA-MB-231, соответственно). Результаты показывают, что ADC3 обладает такой же аффинностью и специфичностью в отношении ErbB2-экспрессирующих клеток, что и трастузумаб.

Фиг. 59. Исследование цитотоксической активности ADC1 в ErbB2-экспрессирующих и ErbB2-

отрицательных линиях клеток. Фиг. 59a: отношение выживания ErbB2-экспрессирующих SK-OV-3 (% жизнеспособных клеток) после 96 ч инкубирования с повышаемыми концентрациями ADC1 (квадраты), трастузумаб (звезды), AF-Arg (треугольники) и соединения 2 (точки) (два опыта;  $IC_{50}(ADC1_{опыт1})=34,4$  пМ,  $IC_{50}(ADC1_{опыт2})=93,9$  пМ). Фиг. 59b: отношение выживания ErbB2-экспрессирующих SK-BR-3 (% жизнеспособных клеток) после 96 ч инкубирования с повышаемыми концентрациями ADC1 (квадраты), трастузумаб (звезды), AF-Arg (треугольники) и соединения 2 (точки) (два опыта;  $IC_{50}(ADC1_{опыт1})=14,8$  пМ,  $IC_{50}(ADC1_{опыт2})=43,3$  пМ). Фиг. 59c: отношение выживания ErbB2-отрицательных MDA-Mb-231 (% жизнеспособных клеток) после 96 ч инкубирования с повышаемыми концентрациями ADC1 (квадраты), трастузумаб (звезды), AF-Arg (треугольники) и соединения 2 (точки) (два опыта;  $IC_{50}(ADC1_{опыт1})=0,128$  нМ,  $IC_{50}(ADC1_{опыт2})=23,5$  нМ).

Фиг. 60. Исследование цитотоксической активности ADC3 в ErbB2-экспрессирующих и ErbB2-отрицательных линиях клеток. Фиг. 60a: отношение выживания ErbB2-экспрессирующих BT-474 (% жизнеспособных клеток) после 96 ч инкубирования с повышаемыми концентрациями ADC3 (треугольники), DM1 (точки) и трастузумаба (простые точки), (два опыта;  $IC_{50}(ADC3_{опыт1})=0,68$  нМ,  $IC_{50}(ADC3_{опыт2})=0,35$  нМ). Фиг. 60b: отношение выживания ErbB2-отрицательных MDA-MB-231 (% жизнеспособных клеток) после 96 ч инкубирования с повышаемыми концентрациями ADC3 (треугольники), DM1 (точки) и трастузумаба (простые точки), (два опыта;  $IC_{50}(ADC3_{опыт1})=8,69$  нМ,  $IC_{50}(ADC3_{опыт2})=91,8$  нМ).

### Подробное описание настоящего изобретения

#### 1. Определения.

Термин "С-концевой" при использовании в настоящем документе относится к С-концу аминокислотной цепи, например, к аминокислоте Ауу в дипептиде Ахх-Ауу (формула (I)) или аминокислоте Ахх в дипептиде Ауу-Ахх (формула (I')). Связывание с "С-концом" означает, что между кислотной группой аминокислотного остатка и партнером по связыванию образуется ковалентная связь. Например, связывание группы Z с С-концом аминокислотного остатка Ауу дает сложный эфир или структурный элемент амидного типа -C(O)-X-, где X является партнером по связыванию Z и карбонильной группы, образующейся из остатка аминокислоты Ауу.

Термин "трифункциональный" при использовании в настоящем документе относится к соединению или фрагменту, имеющему три функциональных группы, которые могут образовывать или образовали три ковалентных связи с соседними фрагментами.

Термин "функциональная группа" относится к группе, которая способна к связыванию с другой функциональной группой при образовании по меньшей мере одной ковалентной связи без необходимости в разрыве каких-либо С-С или С-Н ковалентных связей.

Термин "аминокислота" при использовании в настоящем документе относится к соединению, которое содержит или получено по меньшей мере из одной аминокислотной группы и по меньшей мере одной кислотной группы, предпочтительно карбоксильной группы. Расстояние между аминокислотной группой и кислотной группой конкретно не ограничено,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -аминокислоты являются подходящими, но  $\alpha$ -аминокислоты, и в особенности  $\alpha$ -аминокарбоновые кислоты, являются наиболее предпочтительными. Данный термин охватывает как природные аминокислоты, так и синтетические аминокислоты, которые не существуют в природе.

Выражение "аминокислота в (D) конфигурации" при использовании в настоящем документе относится к (D)-изомеру любой природной или синтетической аминокислоты. Это относится к  $\alpha$ -аминокислотам, а также  $\beta$ - и  $\gamma$ -аминокислотам. Выражение "аминокислота в (D) конфигурации" при использовании в настоящем документе не подразумевает включение ахиральных аминокислот, таких как глицин или другие ахиральные аминокислоты, такие как аминокислота изомасляная кислота.

Если не определено иное, хиральные соединения и фрагменты могут присутствовать в форме чистого стереоизомера или в форме смеси стереоизомеров, включающей рацемат 50:50. В рамках настоящего изобретения ссылки на определенные стереоизомеры следует понимать как ссылки на соединения или фрагменты, где обозначенный стереоизомер присутствует по меньшей мере в 90% энантиомерном избытке (ЭИ), более предпочтительно по меньшей мере ЭИ 95% и наиболее предпочтительно ЭИ 100%.

Термин "гидрофобный" используется в настоящем документе для описания соединений, групп или фрагментов, которые не имеют сродства к воде. Например, термин "аминокислота с гидрофобной боковой цепью" используется для описания аминокислот с гидрофобной или частично гидрофобной алифатической боковой цепью или аминокислот с ароматической боковой цепью, таких как Phe, Leu, Ile, Val, Tyr, Trp, Ala. Конечно, любая другая аминокислота, демонстрирующая такую же или более высокую степень гидрофобности, также должна рассматриваться как гидрофобная в рамках настоящего изобретения. Сравнение степени гидрофобности может быть выполнено путем определения коэффициента распределения в смеси n-октанола/воды (при 25°C и pH 7): если отношение концентраций в n-октаноле/воде для другой аминокислоты равно или выше, чем у одной или более из аминокислот Phe, Leu, Ile, Val, Tyr, Trp, Ala, такую другую аминокислоту следует считать гидрофобной аминокислотой.

Термин "аминокислота с основной боковой цепью" используется в настоящем документе для описания природных или неприродных аминокислот, боковая цепь которых содержит одну или более иони-

зируемых групп, имеющих значение  $pK_a$  больше или равное 6. Примеры природных аминокислот с основной боковой цепью включают Arg (гуанидиногруппа,  $pK_a=12,5$ ), Lys (аминогруппа,  $pK_a=10,5$ ), His (имидазольная группа,  $pK_a=6$ ). Примеры неприродных аминокислот включают цитруллин (Cit), орнитин (Orn), 2,3-диаминопропионовую кислоту (Dap), 2,4-диаминомасляную кислоту (Dab).

Термин "солубилизирующая группа" при использовании в настоящем документе относится к гидрофильной группе, улучшающей растворимость в воде соединения, с которым она связана. Примеры солубилизирующих групп включают аммониевые группы, сульфатные группы, фосфатные группы, сульфатные группы и полиэтиленгликолевые (ПЭГ) группы, в частности группы формулы  $-(CH_2CH_2O)_n-H$ , где  $n$  равно 2-60, например, 2-24.

Термин "алкильная группа" при использовании в настоящем документе относится к группе, содержащей от 1 до 20 атомов углерода, предпочтительно метильной или этильной группе, циклоалкильной группе, содержащей от 3 до 20 атомов углерода, предпочтительно 5-8 атомов углерода, или ароматической группе, содержащей от 6 до 20 атомов углерода, предпочтительно 6 или 10 атомов углерода. Циклоалкильная группа или ароматическая группа может состоять из одного кольца, но может быть также сформирована двумя или более конденсированными кольцами, например, нафтильная группа.

В случаях, когда настоящее описание относится к "предпочтительным" вариантам осуществления/признакам, комбинации таких "предпочтительных" вариантов осуществления/признаков также следует считать раскрытыми, если эта комбинация "предпочтительных" вариантов осуществления/признаков является технически значимой.

Далее, в настоящем описании и формуле изобретения, использование терминов "содержащий" и "включающий" следует понимать таким образом, что в дополнение к указанным элементам могут присутствовать дополнительные неуказанные элементы. Однако эти термины также следует понимать как раскрывающие, в качестве более ограниченного варианта осуществления, также термин "состоящий из", при этом никакие дополнительные неуказанные элементы не могут присутствовать, пока это является технически значимым. Например, выражение "двухвалентная карбонилсодержащая группа" в качестве предпочтительного варианта осуществления включает двухвалентную группу, состоящую из карбонила ( $-CO-$ ). Кроме того, выражение "по меньшей мере один из X и Y" следует понимать в широком смысле как раскрывающее один или оба из X и Y, т.е. как эквивалентное выражению "по меньшей мере один, выбранный из группы X и Y".

Термин "лекарственное средство" при использовании в настоящем документе следует понимать как фармакологически активную субстанцию, которая может ингибировать или препятствовать функции клеток и/или вызывать гибель клеток. В некоторых вариантах осуществления термин "лекарственное средство" следует понимать как синоним других терминов, обычно используемых в данной области, таких как "токсин" или "полезная нагрузка", используемые в области терапии рака.

Выражение "фрагмент, полученный из лекарственного средства" при использовании в настоящем документе характеризует фрагмент, который содержит группу, которая идентична нативному лекарственному средству за исключением структурных модификаций, необходимых для связывания лекарственного средства с остальной структурой соединения настоящего изобретения. В зависимости от функциональных групп, доступных в нативном лекарственном средстве, связывание может быть выполнено с использованием одной из функциональных групп, уже присутствующих в нативном лекарственном средстве, или оно может быть выполнено путем включения новой функциональной или связывающей группы. Как следствие, (нативное) лекарственное средство может использоваться для связывания в немодифицированной или в модифицированной форме. Таким образом, лекарственное средство может быть немодифицированным (в своей исходной форме) за исключением замены атома водорода ковалентной связью, или оно может быть химически модифицировано для включения одной функциональной группы (например, группы, выбранной из гидроксильной, карбоксильной, amino и тиольной групп), дающей возможность ковалентного присоединения (присоединений) к аминокислоте, например, аминокислоте Axx в формуле (I) и Ауу в формуле (I'), Vxx в формулах (II) и (II'), Sxx в формулах (Ib) и (IIa). Лекарственное средство может быть также модифицировано путем ковалентного присоединения к двухвалентной группе, например, аминокислоте, (ди)пептиду или другому линкеру или спейсеру, таким как описанные в настоящем документе в отношении S, S<sub>a</sub>, S<sub>b</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> или их комбинации, в результате чего связывание с остальной частью соединения настоящего изобретения осуществляется через указанную двухвалентную группу. Указанная двухвалентная группа, тем не менее, останется присоединенной к лекарственному средству после расщепления Катепсином В. Подразумевается, что выражение "фрагмент, полученный из лекарственного средства" при использовании в настоящем документе охватывает оба значения и, таким образом, может относиться к фрагменту, который отличается от немодифицированного (нативного) лекарственного средства только присутствием ковалентной связи, требуемой для связывания с остальной частью молекулы или модифицированного лекарственного средства, как указано выше, дополнительного содержащего, например, линкер или спейсер.

Выражение "производное малеимида" (или например, "производное триазола" и т.д.) при использовании в настоящем документе относится к малеимидной группе, модифицированной посредством ковалентных связей, требуемых для связывания с другими группами, например, для связывания с лекарст-

венным средством и с остальной частью соединения. Например, производное малеимида ковалентно присоединено через карбоксильную группу (например, 3-малеимидопропионовой кислоты) к N-концевому остатку соединения формулы (I)/(I') или к боковой цепи Vxx соединения формулы (II)/(II')/(IIa). Затем нуклеофильная группа (например, нуклеофильная группа, которая может присутствовать в нативном лекарственном средстве, такая как тиольная группа мертанзина) подвергают реакции с малеимидной функциональной группой в присоединении Михаэля.

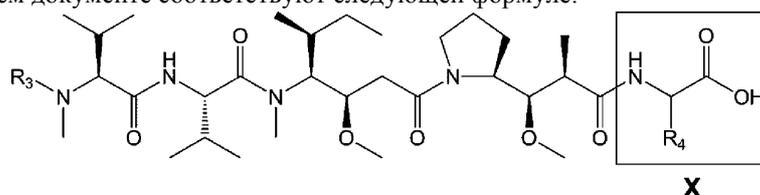
Аналогичным образом, термин "производное" используется в отношении других групп для описания присутствия ковалентных связей, требуемых для связывания с соседними группами.

Термин "нативное лекарственное средство" относится к соединению, терапевтическая эффективность которого была установлена в тестах *in vitro* и/или *in vivo*. В предпочтительном варианте осуществления нативное лекарственное средство является соединением, терапевтическая эффективность которого была установлена в клинических исследованиях. Наиболее предпочтительно нативное лекарственное средство является лекарственным средством, которое уже доступно в продаже. Тип терапевтической эффективности, которую надлежит установить, и подходящие анализы, которые нужно применить, зависят, конечно, от типа медицинского показания, подлежащего лечению.

Таким образом, лекарственное средство для применения в "конъюгате лиганда-лекарственного средства" согласно настоящему изобретению может быть нативным лекарственным средством (например, лекарственным средством, изначально содержащим одну или более функциональных групп, дающих возможность ковалентного присоединения к конъюгату) или может быть химически модифицированным лекарственным средством (например, лекарственным средством согласно формуле (III)), фрагментом A'xx(D<sub>2</sub>)-A'yy согласно формуле (Ia) или фрагментом A'yy-A'xx(D<sub>2</sub>) согласно формуле (Ia'), фрагментом Vxx(D)-Vyy согласно формуле (II) или фрагментом Vyy-Vxx(D) согласно формуле (II') при условии, что лекарственное средство является фармакологически активным после высвобождения из конъюгата. Фармакологическая активность в этом отношении означает по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 80% фармакологической активности нативного лекарственного средства.

В тех случаях, когда лекарственное средство является цитотоксическим средством (например, DM1), которое химически модифицировано путем ковалентного присоединения к аминокислоте или (ди)пептиду, химически модифицированное лекарственное средство (например, фрагмент согласно формуле (III), фрагмент A'xx(D<sub>2</sub>)-A'yy согласно формуле (Ia), фрагмент A'yy-A'xx(D<sub>2</sub>) согласно формуле (Ia'), фрагмент Vxx(D)-Vyy согласно формуле (II) или фрагмент Vyy-Vxx(D) согласно формуле (II')) может быть указано как "внутренняя полезная нагрузка", при условии, что химически модифицированное лекарственное средство является фармакологически активным после своего высвобождения из конъюгата.

Выражение "аналог ауристатина" (или просто "ауристатин") относится к классу соединений, структурно близких природному пентапептиду доластину 10. Аналоги ауристатина (ауристатины) при использовании в настоящем документе соответствуют следующей формуле:



в которой R<sub>3</sub> представляет собой атом водорода или алкильную группу, содержащую 1-10 атомов углерода, предпочтительно атом водорода или металльную группу; и R<sub>4</sub> представляет собой боковую цепь любой природной или не природной аминокислоты.

В определенных вариантах осуществления изобретения используются некоторые аналоги ауристатина. Типичные примеры аналогов ауристатина (соединений, структурно близких доластину 10), включают монометилауристатин E (MMAE) и монометилауристатин F (MMAF). Далее выражение "аналог ауристатина" относится, в частности, к ауристатину X, где C-концевая аминокислота X (как показано выше) выбрана из Phe (в данном случае аналогом ауристатина является ауристатин Phe/F (AF)), Cit (в данном случае аналогом ауристатина является ауристатин Cit (ACit)), Arg (в данном случае аналогом ауристатина является ауристатин Arg (AArg)), Lys (в данном случае аналогом ауристатина является ауристатин Lys (ALys)), Orn (в данном случае аналогом ауристатина является ауристатин Orn (AOrn)), Dab (в данном случае аналогом ауристатина является ауристатин Dab (ADab)) и Dar (в данном случае аналогом ауристатина является ауристатин Dar (ADar)). Аналоги ауристатина при использовании в настоящем документе (AF, ACit, AArg, ALys, AOrn, ADab, ADar) нужно рассматривать как нативные лекарственные средства, в дополнение к нативным лекарственным средствам, как определено выше.

В других вариантах осуществления аналог ауристатина является аналогом, не используемым в рамках настоящего изобретения. Обычно это аналог представленной выше формулы, в которой R<sub>3</sub> представляет собой метильную группу, а X представляет собой Asp, Glu, Thr, фосфо Thr.

Выражение "фрагмент, полученный из векторной группы" при использовании в настоящем доку-

менте указывает, что векторная группа может быть в немодифицированной или модифицированной форме. Таким образом, векторная группа может быть немодифицированной (в своей исходной форме) за исключением замены атома водорода ковалентной связью, или химически модифицированной для введения одной или более функциональных групп (например, группы, выбранной из гидроксильной, карбоксильной, тиольной и/или аминогрупп), дающих возможность ковалентного присоединения (присоединений) векторной группы к S (формулы (I) (I'), (II) и (II')), S<sub>1</sub> (формулы (Ia<sub>2</sub>) или Azz<sub>3</sub> (формулы (Ia<sub>3</sub>)), при условии, что такие модификации не препятствуют в существенной степени взаимодействию между векторной группой и клеткой-мишенью.

Выражение "способный к взаимодействию с клеткой-мишенью" при использовании в настоящем документе указывает, что векторная группа может связываться, образовывать комплекс или реагировать с фрагментом, например, белком или рецептором, который экспонирован на поверхности клетки-мишени. Указанное взаимодействие может приводить к эффекту направленной доставки (т.е. к локальному увеличению концентрации несущего вектор соединения вблизи клетки-мишени) и/или может вызывать интернализацию несущего вектор соединения согласно настоящему изобретению в клетке-мишени.

Выражение "фармацевтически приемлемые соли" при использовании в настоящем документе относится к производным раскрытых соединений, где исходное соединение модифицировано путем получения соответствующих солей кислоты или основания. Фармацевтически приемлемые соли включают обычные нетоксичные соли или четвертичные аммониевые соли исходного соединения, например, образованные с нетоксичными неорганическими или органическими кислотами. Списки подходящих солей можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, page 1418, S.M. Berge, L.M. Bighley, and D.C. Monkhouse, "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66 (1), 1-19 (1977); P. H. Stahl and C G. Wermuth, editors, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, Weinheim/Zurich, Wiley-VCH, 2008, а также в A.K. Bansal et al., Pharmaceutical Technology, 3(32), 2008. Фармацевтические соли могут быть синтезированы из исходного соединения, содержащего основную или кислотную группу, с применением стандартных химических методов. Это может быть выполнено до или после включения фрагмента лекарственного средства в соединение согласно настоящему изобретению.

Термин "антитело" при использовании в настоящем документе охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, димеры, мультимеры, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела), винированные антитела, фрагменты антител и небольшие иммунные белки. Антитело представляет собой белок, генерируемый иммунной системой, который способен распознавать и связываться с определенным антигеном. Антиген-мишень, как правило, имеет множество сайтов связывания, также называемых эпитопами, распознаваемых определяющими комплементарность областями различных антител. Каждое антитело, которое специфично связывается с определенным эпитопом, имеет определенную структуру. Таким образом, один антиген может иметь больше одного соответствующего антитела. Антитело включает полноразмерную молекулу иммуноглобулина или иммунологически активный фрагмент полноразмерной молекулы иммуноглобулина, то есть молекулу, которая содержит антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифично связывает антиген представляющей интерес мишени или его часть. Антитела могут быть любого типа, например IgG, IgE, IgM, IgD и IgA, любого класса, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2 или соответствующего субкласса. Антитело может быть человеческим или полученным из других видов.

Термин "фрагмент антитела" при использовании в настоящем документе относится к части полноразмерного антитела, обычно его антигенсвязывающей или вариабельной области. Примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv фрагменты; диатела; линейные антитела; однодоменные антитела. Антитела и их фрагменты могут быть заменены связывающими молекулами на основе альтернативных неиммуноглобулиновых каркасов, пептидных аптамеров, аптамеров нуклеиновых кислот и структурированных полипептидов, включающих полипептидные петли, сформированные на непептидном скелете, природных рецепторов или их доменов.

Термин "рак" при использовании в настоящем документе означает физиологическое состояние у млекопитающих, которое характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Опухоль включает одну или больше раковых клеток. Примеры рака включают карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Дополнительные примеры рака включают плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легкого, в том числе мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка, в том числе рак желудочно-кишечного тракта, желудочно-кишечную стромальную опухоль, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак толстой и прямой кишки, карциному эндометрия или матки, карциному слюнных желез, рак почки, рак предстательной железы, рак щитовидной железы и рак печени.

Если не указано иное, термин "алкил" относится к насыщенным углеводородным группам, которые могут быть нормальными, разветвленными, циклическими, или любой их комбинации. Нормальная ал-

кильная группа предпочтительно содержит 1-20 атомов углерода, более предпочтительно 1-6 атомов углерода. Разветвленная алкильная группа предпочтительно содержит 3-20 атомов углерода, более предпочтительно 4-8 атомов углерода. Циклическая алкильная группа предпочтительно содержит 3-20 атомов углерода, более предпочтительно 5-8 атомов углерода.

Термин "ароматическая группа" характеризует группу, которая содержит одну или более циклических структур, имеющих делокализованную  $\pi$ -электронную систему, которая соответствует правилу Хюккеля  $4n+2$ . Указанная одна или более циклических структур могут быть моноциклом, таким как 6-членное кольцо (например, бензол), или бициклической структурой, такой как группа с двумя конденсированными 6-членными кольцами (например, нафтен), или группа, в которой два 6-членных кольца связаны друг с другом через одну ковалентную связь (например, бифенил). Другие ароматические группы могут содержать три или более конденсированных циклов, такие как антрацен, фенантрен, пирен и хризен. Ароматические группы также могут содержать гетероциклические структуры, включающие, например, 5-членные кольца, содержащие от одного до четырех атомов азота (остальные члены кольца представляют собой углерод или углерод и кислород), 5-членные кольца, содержащие один атом кислорода или серы, 6-членные кольца с один или двумя атомами азота, кислорода или серы или бициклические группы с двумя конденсированными кольцами, одно из которых является 5-членным гетероциклом, а другое является 6-членным карбоциклом или гетероциклом.

Если не указано иное, все валентности отдельных атомов соединений или фрагментов, описанных в настоящем документе, являются насыщенными. В частности, они насыщены указанными партнерами по связыванию. Если не указан ни один партнер по связыванию или указано слишком малое количество партнеров по связыванию, оставшиеся валентности соответствующего атома насыщены соответствующим количеством атомов водорода.

Если иное не указано или не следует из контекста, все связи между соседними аминокислотными группами сформированы пептидными (амидными) связями.

Если из контекста не следует иное, и/или альтернативные значения в явной форме представлены в настоящем документе, все термины должны иметь значения, общепринятые в данной области, что отражено в IUPAC Gold Book (по состоянию на 1 ноября 2017 года) или в Dictionary of Chemistry, Oxford, 6th Ed.

## 2. Краткое описание.

Настоящее изобретение основано на открытии С-концевого дипептидного линкера, который может действовать в качестве высокоспецифичного субстрата для экзопептидазной активности Катепсина В (Cat B). С-концевой дипептидный линкер согласно настоящему изобретению может применяться в конъюгатах лиганда-лекарственного средства (LDC), что приводит к улучшенному расщеплению и высвобождению лекарственного средства из LDC.

Cat B представляет собой лизосомальную цистеиновую протеазу суперсемейства папаина, участвующую во внутриклеточном белковом обмене, а также в различных физиологических и патологических процессах. В настоящее время доступны обширные структурные и функциональные данные, что делает эту протеазу универсальным инструментом в рамках внутриклеточной доставки лекарственных средств.

Укладка папаина состоит из двух доменов, состоит из двух доменов, называемых левым (L-) и правым (R-) доменами. L-домен содержит три  $\alpha$ -спирали, тогда как R-домен образует своего рода P-бочонок, как описано в Turk et al. (Biochim. Biophys. Acta 2012, 1824(1), 68-88). Двухдоменный интерфейс открывается на поверхности, образуя расщелину с активным центром фермента. В центре расщелины с активным центром находятся остатки Cys25 (на N-конце центральной спирали, L-домен) и His163 (в остатках  $\beta$ -бочонка, R-домен). Эти два каталитических остатка образуют ионную пару тиолат-имидазолия, необходимую для протеолитической активности фермента. Субстрат связывается в расщелине с активным центром в развернутой конформации, как описано в Turk et al. (Biochem. Soc. Symp. 2003, 70, 15-30), устанавливая поочередные контакты с L- и R-доменами. Большинство цистеиновых катепсинов демонстрируют преимущественно эндопептидазную активность (F, L, K, S, V), тогда как Cat X и C демонстрируют только экзопептидазную активность. Напротив, Cat B демонстрирует как эндопептидазную, так и экзопептидазную (то есть карбоксидипептидазную) активность. Рентгеноструктурный анализ показывает, что экзопептидазы/карбоксидипептидазы, такие как Cat B, содержат дополнительные структурные особенности, то есть дополнительную ("закрывающую") петлю, которая модифицирует расщелину с активным центром и служит обоснованием для связывания субстрата как при эндопептидазной, так и экзопептидазной активности. В частности, закрывающая петля обеспечивает структурную основу для доминирующей экзо-или эндо-Cat B активности, как показано в Renko et al. (FEBS Journal 2010, 277, 4338-4345).

Расщепляемые Cat B линкерные системы, описанные в предшествующем уровне техники (например, линкерная система Val-Cit-PABC), главным образом основаны на эндопептидазной активности Cat B. С другой стороны, линкерная система согласно настоящему изобретению специально разработана в соответствии со структурными требованиями для применения в качестве специфического субстрата для экзопептидазной (карбоксидипептидазной) активности Cat B.

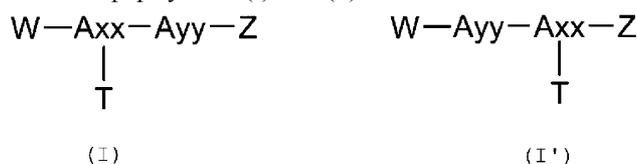
Таким образом, линкерная система может применяться в LDC в качестве высокоспецифичного субстрата для экзопептидазной (карбоксидипептидазной) активности Cat B, т.е. в соединении формулы (I)

или (I') и соединении формулы (II) или (II'), описанных ниже, что приводит к улучшению профилей расщепления (например, быстрому внутриклеточному высвобождению лекарственного средства). Кроме того, линкерная система обеспечивает внутриклеточное высвобождение множества молекул лекарственного средства, при этом отдельные молекулы лекарственного средства могут быть одинаковыми или разными. Если лекарственное средство представляет собой полезную нагрузку (т.е. цитотоксическое средство), линкерная система обеспечивает внутриклеточное высвобождение множества полезных нагрузок, которые могут представлять собой множество молекул лекарственного средства одного и того же лекарственного средства или множество молекул разных лекарственных средств (например, 2 или более разных лекарственных средств/полезных нагрузок). В качестве отличительного признака LDC, демонстрирующих высокие значения DAR (например, формулы (Ia<sub>1</sub>) или (II)), линкерная система может быть соединена/конъюгирована с одним сайтом векторной группы, способной взаимодействовать с клеткой-мишенью (например, антитела), что позволяет преодолеть проблемы перегрузки и преждевременного внеклеточного расщепления. Таким образом, линкерная система согласно настоящему изобретению обеспечивает регулируемую технологическую платформу, которая позволяет достичь высокой нагрузки лекарственного средства (например, высокого DAR), в то же время являясь стабильной и нетоксичной в системном кровотоке.

Кроме того, было неожиданно обнаружено, что присутствие стерически затрудняющего фрагмента (Т в формуле (I)/(I') или D в формуле (II)/(II')) на боковой цепи остатка Ахх в формуле (I)/(I') или Вхх в формуле (II)/(II') не оказывает неблагоприятного влияния ни на аффинность связывания соединения настоящего изобретения с Cat B, ни на скорость расщепления соединения под действием экзопептидазной активности Cat B. Без ограничения какой-либо теорией, считается, что стерическим затрудняющий фрагмент Т или D направлен за пределы связывающей полости Cat B (известной как "гидрофобный карман" Cat B), что приводит к превосходной селективности и скорости расщепления под действием экзопептидазной активности Cat B.

### 3. Соединение формул (I) и (I').

Настоящее изобретение относится к соединениям (т.е. конъюгату лиганда-лекарственного средства (LDC)), представленным общими формулами (I) или (I'):



Соединение формул (I) или (I') содержит C-концевую дипептидную единицу Ахх-Ауу или Ауу-Ахх, которая служит в качестве субстрата для специфичного распознавания и расщепления под действием экзопептидазной активности Cat B.

Ахх представляет собой трифункциональную аминокислоту. Ахх может быть любой природной или неприродной трифункциональной аминокислотой, при условии, что Ахх в формуле (I) не является аминокислотой в (D) конфигурации. Примеры трифункциональных аминокислот включают аминокислоты и диаминокарбоновые кислоты, такие как α-аминоадипиновую кислоту (Ааа), диаминопропионовую кислоту (Dар), диаминасаяную кислоту (Dаб) и аминмалоновую кислоту (Ама). Другие подходящие трифункциональные аминокислоты включают Glu, 2-аминопимелиновую кислоту (Ара), Lys, Orn, Ser и гомо-лизин (гомо-Lys).

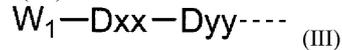
Согласно одному варианту осуществления, Ахх представляет собой аминокислоту, выбранную из Glu, Ара, Ааа, Dар, Dаб, Lys, Orn, Ser, Ама и гемолизина (гомо-Lys). Согласно одному предпочтительному варианту осуществления, Ахх представляет собой аминокислоту, выбранную из Dар, Dаб, Lys, Orn и гомо-Lys.

Ауу представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, Ala, Trp, Tyr, Фенилглицина (Phg), Met, Val, His, Lys, Arg, Цитруллина (Cit), 2-аминоасаяной кислоты (Абу), Orn, Ser, Thr, Leu и Ile; или Ауу в формуле (I) представляет собой аминокислоту, выбранную из гомо-тирозина (гомо-Tyr), гомо-фенилаланина (гомо-Phe), бета-фенилаланина (бета-Phe), бета-гомо-фенилаланина (бета-гомо-Phe), Tyr(OR<sub>1</sub>) и гомо-Tyr(OR<sub>1</sub>), где R<sub>1</sub> является солибилизирующей группой, предпочтительно -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n1</sub>-R<sub>2</sub>, где R<sub>2</sub> является атомом водорода или метильной группой, и n1 является целым числом от 2 до 24, например, целым числом от 5 до 20 или от 8 до 16; при условии, что Ауу в формуле (I) не является аминокислотой в (D) конфигурации. Без ограничения теорией, считается, что Ауу предоставляет соединению настоящего изобретения структурные особенности для специфичного распознавания и расщепления экзопептидазной активностью Cat B. В результате соединение может высвобождать лекарственное средство со значительно более высокой скоростью по сравнению с соединением, расщепляемым эндопептидазной активностью Cat B (например, в системе Val-Cit-PABC).

Согласно одному варианту осуществления, Ауу в формуле (I) представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, гомо-Phe, Ala, Trp, Leu, Tyr, Phg, Met, Abu, Val, Lys, Cit, Tyr(OR<sub>1</sub>) и гомо-Tyr(OR<sub>1</sub>), предпочтительно аминокислоту, выбранную из Phe, гомо-Phe, Ala, Trp, Leu, Val, Tyr, гомо-Tyr, Tyr(OR<sub>1</sub>)

и гомо-Туг(OR<sub>1</sub>), более предпочтительно Phe, гомо-Phe, Туг, гомо-Туг, Туг(OR<sub>1</sub>) или гомо-Туг(OR<sub>1</sub>), где R<sub>1</sub> имеет значение, определенное выше, в частности, Phe или Туг; и Ауу в формуле (I') представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, гомо-Phe, Ala, Ser, Thr, Leu, Val, Tyr, Phg, Trp, Ile и Arg, предпочтительно аминокислоту, выбранную из Phe, гомо-Phe, Ala, Trp, Phg, Leu, Val, Туг и Ser, более предпочтительно Phe, гомо-Phe или Ser, в частности, Phe или Ser.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения W представляет собой фрагмент, представленный следующей формулой (III):



В отношении формулы (III), изображенной выше, D<sub>xx</sub> представляет собой одинарную ковалентную связь или аминокислоту, имеющую гидрофобную боковую цепь, предпочтительно аминокислоту, выбранную из Phe, Val и Ala. В некоторых вариантах осуществления D<sub>xx</sub> может содержать дополнительный элемент, при этом одинарная ковалентная связь или аминокислота, имеющая гидрофобную боковую цепь, необязательно присоединяются к фрагменту W<sub>1</sub> через двухвалентный фрагмент, выбранный из малеимидов, триазолов, гидразинов, карбонилсодержащих групп и их производных, предпочтительно через производное двухвалентного малеимида.

В отношении формулы (III), изображенной выше, D<sub>yy</sub> представляет собой одинарную ковалентную связь, Phe или аминокислоту, имеющую основную боковую цепь, предпочтительно аминокислоту, выбранную из Arg, Lys, Cit, Orn, Dap и Dab, более предпочтительно Arg или Cit; при условии, что, если D<sub>xx</sub> является аминокислотой, имеющей гидрофобную боковую цепь, D<sub>yy</sub> является Phe или аминокислотой, имеющей основную боковую цепь, и если D<sub>xx</sub> является одинарной ковалентной связью, D<sub>yy</sub> является одинарной ковалентной связью, Phe или аминокислотой, имеющей основную боковую цепь.

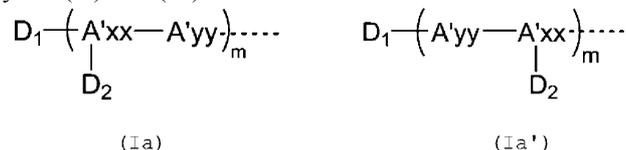
Пунктирная линия в формуле (III) указывает ковалентное присоединение к N-концу A<sub>xx</sub> в формуле (I) или N-концу Ауу в формуле (I').

W<sub>1</sub> представляет собой фрагмент, полученный из лекарственного средства. В некоторых случаях W представляет собой фрагмент, полученный из лекарственного средства, имеющего одну или более групп, выбранных из гидроксильной, карбоксильной, amino или тиольной групп, где указанная одна или более групп необязательно могут служить для ковалентного присоединения к C-концевой дипептидной единице A<sub>xx</sub>-Ауу (формулы (I)) или Ауу-A<sub>xx</sub> (формулы (I')). Лекарственное средство (средства), подходящее для применения в настоящем изобретении, более подробно описано ниже. Примеры лекарственных средств, имеющих одну или более групп, выбранных из гидроксильной, карбоксильной, amino или тиольной групп, включают ауристатины, майтанзины, камптотецины и доксорубицины.

В одном варианте осуществления W<sub>1</sub> представляет собой фрагмент, полученный из лекарственного средства, отличающегося от нативного лекарственного средства (например, DM1) только ковалентным присоединением к D<sub>xx</sub>, как показано в формуле (III). Если нативное лекарственное средство является аналогом ауристатина, аналог ауристатина выбран из ауристатина F (AF), ауристатина Cit (ACit), ауристатина Arg (AArg), ауристатина Lys (ALys), ауристатина Orn (AOrn), ауристатина Dab (ADab) и ауристатина Dap (ADap). Предпочтительно аналогом ауристатина является AF. В одном аспекте ауристатин не является ауристатином Asp (AAsp), ауристатином Glu (AGlu), ауристатином фосфо-Thr (AphThr) или ауристатином Thr (AThr).

В одном другом варианте осуществления W<sub>1</sub> представляет собой фрагмент, полученный из лекарственного средства, предпочтительно фрагмент, полученный из лекарственного средства, отличающегося от нативного лекарственного средства только ковалентным присоединением к D<sub>xx</sub>; при условии, что W<sub>1</sub> не является аналогом ауристатина.

Согласно одному варианту осуществления, W представляет собой пептидный фрагмент, представленный следующей формулой (Ia) или (Ia'):



A'уу представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, Ala, Trp, Туг, Phg, Met, Val, His, Lys, Arg, Cit, Orn и Abu; при условии, что A'уу в формуле (Ia') не является аминокислотой в (D) конфигурации. Согласно одному варианту осуществления, A'уу представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, Ala, Trp, Phg и Туг, предпочтительно Phe или Туг.

D<sub>1</sub> представляет собой фрагмент, полученный из лекарственного средства. Каждый D<sub>2</sub> независимо представляет собой атом водорода или фрагмент, полученный из лекарственного средства, при условии, что по меньшей мере один D<sub>2</sub> не является атомом водорода. Когда D<sub>2</sub> представляет собой фрагмент, полученный из лекарственного средства, D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub> могут быть фрагментами, полученными из одного лекарственного средства, или фрагментами, полученными из разных лекарственных средств. Лекарственное средство (средства), подходящее для применения в настоящем изобретении, более подробно описано ниже. Согласно одному варианту осуществления, каждый D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub> независимо представляет собой фраг-

мент, полученный из лекарственного средства, имеющего одну или более групп, выбранных из гидроксильной, карбоксильной, amino или тиольной групп.

$m$  является целым числом от 1 до 10; и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к N-концу  $A'xx$  или  $A'yy$ . Таким образом, когда  $m \geq 1$ , соединение включает один фрагмент  $D_1$  и  $m$  фрагментов  $D_2$ , где множество фрагментов  $D_2$  могут быть одинаковыми или различными. Согласно одному предпочтительному варианту осуществления,  $m$  является целым числом от 1 до 4.

Если  $m=1$ ,  $A'xx$  представляет собой трифункциональную аминокислоту, такую как аминокислота или диаминокарбоновая кислота.  $A'xx$  может быть любой трифункциональной природной или неприродной аминокислотой, при условии, что  $A'xx$  в формуле (Ia) не является аминокислотой в (D) конфигурации. Примеры трифункциональных аминокислот включают Glu, Aра, Aaa, Dар, Dаб, Lys, Orn, Ser, Ama и гомо-Lys. Согласно одному предпочтительному варианту осуществления,  $A'xx$  представляет собой аминокислоту, выбранную из Dар, Dаб, Lys, Orn и гомо-Lys.

Если  $m$  больше 1, то каждый  $D_2$  независимо выбран из атома водорода и фрагментов, полученных из лекарственного средства, где множество фрагментов  $D_2$  могут быть одинаковыми или различными. Если  $D_2$  является атомом водорода,  $A'xx$  представляет собой аминокислоту.  $A'xx$  может быть любой природной или неприродной аминокислотой, например, бифункциональной или трифункциональной аминокислотой, которая совместно обеспечивает необходимые функциональные группы для присоединения к аминокислоте  $A'yy$  и фрагменту  $D_1$  или другой аминокислоте  $A'xx$ , при условии, что  $A'xx$  в формуле (Ia) не является аминокислотой в (D) конфигурации. Примеры бифункциональных аминокислот включают Gly, Ala, Abu, Циклогексилаланин (Cha), Ile, Leu, Phe, Phg, Val. Если  $D_2$  является фрагментом, полученным из лекарственного средства,  $A'xx$  представляет собой трифункциональную аминокислоту, как описано выше, предпочтительно аминокислоту, выбранную из Dар, Dаб, Lys, Orn и гомо-Lys.

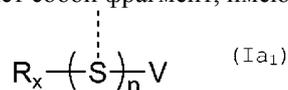
Пептид формулы (I)/(Ia), (I)/(Ia'), (I')/(Ia) или (I')/(Ia') действует в качестве специфичного субстрата для экзопептидазной активности Cat B. Таким образом, соединение формулы (I) или (I'), описанное в настоящем документе, может расщепляться на N-конце под действием Cat B с высвобождением W, который является либо фрагментом  $D_1$ , полученным из лекарственного средства, либо дипептидным фрагментом, имеющим формулу (Ia) или (Ia'). Когда W является дипептидным фрагментом формулы (Ia) или (Ia'), он может в свою очередь расщепляться Cat B с высвобождением фрагмента  $D_1$  и пептида ( $A'xx(D_2)-A'yy$ )/( $A'yy-A'xx(D_2)$ ). В некоторых аспектах настоящего изобретения фрагменты  $D_1$  и пептиды ( $A'xx(D_2)-A'yy$ )/( $A'yy-A'xx(D_2)$ ) демонстрируют фармакологическую (например, цитотоксическую) активность.

В некоторых аспектах настоящего изобретения пептид ( $A'xx(D_2)-A'yy$ )/( $A'yy-A'xx(D_2)$ ) может быть "саморасщепляющимся" фрагментом, который может подвергаться внутримолекулярному аминолизу (т.е. с образованием пяти- или шестичленного цикла или с образованием дикетопиперазина (DKP)) с высвобождением фрагмента  $D_2$  в качестве продукта. Когда  $m \geq 1$ , пептид ( $A'xx(D_2)-A'yy$ )<sub>m</sub>/( $A'yy-A'xx(D_2)$ )<sub>m</sub> является субстратом Cat B, который может расщеплять (m-1) амидных связей между аминокислотами  $A'yy-A'xx/A'yy-A'xx$  с высвобождением m дипептидов ( $A'xx(D_2)-A'yy$ )/( $A'yy-A'xx(D_2)$ ). В некоторых аспектах каждый дипептид может в свою очередь подвергаться внутримолекулярному аминолизу ( $A'xx(D_2)-A'yy$ ) или образованию DKP ( $A'yy-A'xx(D_2)$ ) с высвобождением m фрагментов  $D_2$  в качестве продукта.

Таким образом, когда W представляет собой пептид, имеющий формулу (Ia)/(Ia'), линкер может высвобождать две или более молекул одного и того же или разных лекарственных средств (и, таким образом, позволяет достигать высокого DAR), при этом общая фармакологическая активность может быть улучшена. Высвобождение лекарственного средства может проходить в соответствии с многостадийным механизмом. Например, сначала W может высвобождаться из соединения формулы (I), а затем действовать в качестве субстрата для Cat B, с высвобождением фрагмента  $D_1$  и, в конечном счете, m пептидов ( $A'xx(D_2)-A'yy$ )/( $A'yy-A'xx(D_2)$ ), которые могут быть фармакологически активными в таком качестве (например, внутренние полезные нагрузки) и/или могут подвергаться внутримолекулярному аминолизу, образованию DKP или гидролизу с высвобождением m фрагментов  $D_2$ .

Соединение настоящего изобретения, как правило, является стабильным во внеклеточной среде (например, в плазме) в отсутствие Cat B (т.е. фермента, способного расщеплять линкер). Однако при воздействии Cat B линкер распознается и расщепляется, иницируя, в конечном счете, спонтанный саморасщепляющийся аминолиз, приводящий к расщеплению связи, ковалентно связывающей саморасщепляющийся фрагмент, например,  $A'xx-A'yy$ , с лекарственным средством, вызывая, таким образом, высвобождение лекарственного средства  $D_2$  в своей фармакологически активной форме. Саморасщепляющийся аминолиз может проходить, если  $A'xx$  представляет собой аминокислоту, такую как Glu, Aaa, Dар, Dаб, Ser, Thr, гомо-Ser, гомо-Thr.

T в формуле (I) или (I') представляет собой фрагмент, имеющий следующую формулу (Ia<sub>1</sub>):



S представляет собой ди- или многовалентную группу, включающую 1 или более атомов, выбранных из углерода, азота, кислорода и серы. S связывает (соединяет) аминокислоту(ы)  $A'xx$  (путем кова-

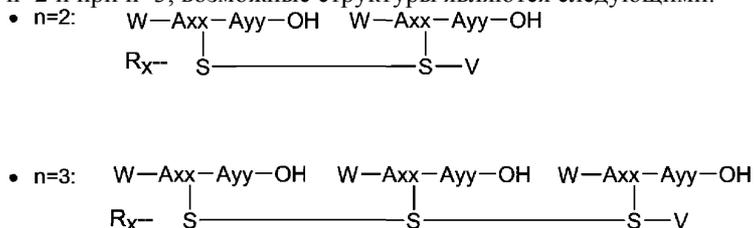
лентного присоединения к боковой цепи Axx) с фрагментом V (описанным ниже). S может быть связана с Axx и V, например, с помощью процедур хемоселективного присоединения для формирования амидной связи или с помощью "клик-химии" (например, азид-алкинового циклоприсоединения). R<sub>x</sub> представляет собой атом или группу, которая необязательно присутствует для насыщения свободной валентности S, если таковая присутствует.

В некоторых вариантах осуществления S может действовать как фрагмент для множественного присоединения лекарственного средства (фиг. 3). Она может быть небольшой органической группой с двумя или более валентностями, имеющей, например, молекулярную массу 200 дальтонов или меньше, или всего 100 дальтонов или меньше, но она также может быть более сложным и/или крупным фрагментом, полученным из функциональных полимеров, сополимеров, дендримеров или синтетических конструкций, включающих множество реакционноспособных групп для присоединения линкера-лекарственного средства.

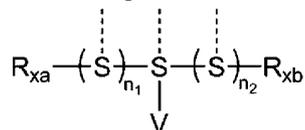
В представленной выше формуле (Ia<sub>1</sub>), n является целым числом от 1 до 10, например, от 1 до 5. Когда n=1, S представляет собой двух- или трехвалентную группу, и пунктирная линия представляет собой ковалентное присоединение S к боковой цепи Axx.

Когда n>1, каждая S независимо представляет собой двух- или трехвалентную группу, и каждая пунктирная линия представляет собой ковалентное присоединение к отдельной группе формулы (I) (к боковой цепи индивидуальной аминокислоты Axx), где группы формулы (I) могут быть одинаковыми или различными. Когда n>1, линкер может высвобождать две или больше молекул одного и того же или разных лекарственных средств (и, таким образом, позволяет достигать высокого DAR), при этом общая фармакологическая активность может быть улучшена.

Например, при n=2 и при n=3, возможные структуры являются следующими:



Конечно, если переменные группы, такие как W, Axx, Ayy и S, присутствуют много раз, отдельные переменные группы одного типа могут быть одинаковыми или могут отличаться друг от друга. Более того, положение связывания V в вышеуказанных структурах конкретно не ограничено. Например, в приведенной выше формуле при n=3, V также может быть связан с центральной группой S вместо концевой группы S, где центральная группа S является четырехвалентной, как показано ниже:



где каждый n<sub>1</sub> и n<sub>2</sub> независимо является целым числом от 0 до n и n<sub>1</sub>+n<sub>2</sub>+1=n; каждый R<sub>xa</sub> и R<sub>xb</sub> независимо представляет собой атом или группу, необязательно присутствующую для насыщения свободной валентности S, если таковая присутствует.

В некоторых аспектах настоящего изобретения двухвалентная или многовалентная группа S выбрана таким образом, что она устойчива к гидролизу, что означает то, что, как правило, меньше 20% и предпочтительно меньше 10% тестируемого соединения подвергается гидролизу в растворе фосфатно-солевого буфера (PBS) при pH 7,4 и 37°C в течение 24 ч при определении с помощью ВЭЖХ, где указанное тестируемое соединение является соединением на основе многовалентной группы S, где все валентности S насыщены атомами водорода.

В идеальном варианте соединение формулы (I) или формулы (II) (т.е. НРС), содержащее указанную двух- или многовалентную группу S, взятое в целом, также показывает такую устойчивость к гидролизу, то есть предпочтительно, чтобы меньше 20% и более предпочтительно меньше 10% соединения формулы (I) подвергалось гидролизу в фосфатно-солевом буфере (PBS) при pH 7,4 и 37°C в течение 24 ч при определении с помощью ВЭЖХ.

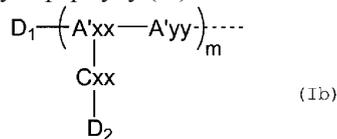
S может быть полярной или заряженной двухвалентной или многовалентной группой, при этом растворимость соединения формулы (I) в воде улучшается. Также S может включать аминокислотный или пептидный фрагмент, предпочтительно полярный или заряженный аминокислотный или пептидный фрагмент, пептид, включающий от 2 до 10 аминокислот, которые могут быть природными или неприродными аминокислотами.

Также S может быть основана на комбинации двух или более вышеуказанных многовалентных групп, связанных друг с другом ковалентными связями.

Предпочтительными группами S являются (-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, где n выбрано из 1-10, Dab или комбина-

ции этих двух групп.

Согласно одному другому варианту осуществления, W в формулах (I) и (I') представляет собой пептидный фрагмент, имеющий следующую формулу (Ib):



A'yy, D<sub>1</sub> и m в формуле (Ib) имеют значение, определенное в формуле (Ia), и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение KN-концу Axx или Ayy.

Если m=1, A'xx представляет собой аминокислоту, выбранную из Glu, Aaa, Dap, Dab, Ser, Thr, гомосерина (гомо-Ser), гомотреонина (гомо-Thr) и Ama, при условии, что A'xx не является аминокислотой в (D) конфигурации. D<sub>2</sub> представляет собой фрагмент, полученный из лекарственного средства, необязательно из того же лекарственного средства, что и D<sub>1</sub>. Cxx представляет собой одинарную ковалентную связь, если A'xx не является Ama. Когда A'xx представляет собой Ama, присутствует дополнительная аминокислота Cxx. Cxx связана с боковой цепью A'xx, т.е. одним из двух C-концов Ama, а также она связана с фрагментом лекарственного средства D<sub>2</sub>. Cxx представляет собой (L)- или (D)-Pro или N-метиламинокислоту, такую как саркозин (Sar). Предпочтительно, Cxx представляет собой аминокислоту, выбранную из (L)- или (D)-Pro, Sar, N-метил Val и N-метил Leu, более предпочтительно Sar.

Если m больше 1, то каждый D<sub>2</sub> независимо выбран из атома водорода и фрагментов, полученных из лекарственного средства, где множество фрагментов D<sub>2</sub> могут быть одинаковыми или различными. Если D<sub>2</sub> является атомом водорода, A'xx представляет собой аминокислоту, а Cxx представляет собой одинарную ковалентную связь (даже если A'xx является Ama). A'xx может быть любой природной или неприродной аминокислотой, например, бифункциональной или трифункциональной аминокислотой, которая совместно обеспечивает необходимые функциональные группы для присоединения к аминокислоте A'yy и фрагменту D<sub>1</sub> или другой аминокислоте A'xx, при условии, что A'xx не является аминокислотой в (D) конфигурации. Если D<sub>2</sub> является фрагментом, полученным из лекарственного средства, A'xx представляет собой аминокислоту, выбранную из Glu, Aaa, Dap, Dab, Ser, Thr, гомосерина (гомо-Ser), гомотреонина (гомо-Thr) и Ama, и Cxx представляет собой одинарную ковалентную связь, если A'xx не является Ama. Когда A'xx является Ama, Cxx представляет собой аминокислоту, выбранную из (L)- или (D)-Pro, Sar, N-метил Val и N-метил Leu, более предпочтительно Sar.

Хорошо известно, что пептиды и белки, которые содержат остаток Pro в предпоследнем N-концевом положении, подвергаются неферментативному аминолизу, который приводит к образованию ДКР. Механизм образования ДКР включает нуклеофильную атаку N-концевого азота на карбонил второй аминокислоты. Этот внутримолекулярный аминолиз протекает легко и играет важную роль в пути биосинтеза биологически активных циклических дипептидов, таких как с(His-Pro), которые присутствуют в центральной нервной системе, периферических тканях и физиологических жидкостях. В дипептиде (Ama(Cxx-D<sub>2</sub>)-A'yy) механизм образования ДКР включает нуклеофильную атаку N-концевого азота на боковую цепь A'xx с высвобождением в результате фрагмента D<sub>2</sub>.

Пептид формулы (I)/(Ib) или (I')/(Ib) действует как субстрат для экзопептидазной активности Cat B с высвобождением дипептидного фрагмента, имеющего формулу (Ib), который в свою очередь может расщепляться Cat B с высвобождением фрагмента D<sub>1</sub> и пептида (A'xx(Cxx-D<sub>2</sub>)-A'yy). Пептид (A'xx(Cxx-D<sub>2</sub>)-A'yy) является "саморасщепляющимся" фрагментом, который может подвергаться внутримолекулярному аминолизу (т.е. с образованием пяти- или шестичленного цикла или с образованием дикетопиперазина (ДКР)) с высвобождением фрагмента D<sub>2</sub> в качестве продукта. Когда m ≥ 1, пептид (A'xx(Cxx-D<sub>2</sub>)-A'yy)<sub>m</sub> действует в качестве субстрата для Cat B, которая может расщеплять (m-1) амидных связей между аминокислотами A'yy и A'xx с высвобождением m пептидов (A'xx(Cxx-D<sub>2</sub>)-A'yy). Каждый пептид (A'xx(Cxx-D<sub>2</sub>)-A'yy) может, в свою очередь, подвергаться внутримолекулярному аминолизу с высвобождением m фрагментов D<sub>2</sub> в качестве продукта.

Таким образом, когда W представляет собой пептид, имеющий формулу (Ib), высвобождение лекарственного средства происходит согласно многостадийному механизму, например, W может сначала высвободиться из соединения формулы (I), а затем действовать в качестве субстрата для Cat B с высвобождением фрагмента D<sub>1</sub> и m пептидов (A'xx(Cxx-D<sub>2</sub>)-A'yy), которые, в конечном счете, подвергаются внутримолекулярному аминолизу с высвобождением m фрагментов D<sub>2</sub>. В пептиде (Ama(Cxx-D<sub>2</sub>)-A'yy) механизм образования ДКР (внутримолекулярный аминолиз) включает нуклеофильную атаку N-концевого азота Ama по карбонилу сложного эфира в Cxx с высвобождением фрагмента D<sub>2</sub>.

В настоящем изобретении было неожиданно обнаружено, что присутствие стерически затрудняющего фрагмента (фрагмента T в формуле (I)/(I')) на боковой цепи остатка Axx в формуле (I)/(I') не оказывает никакого неблагоприятного эффекта ни в отношении аффинности связывания соединения настоящего изобретения с Cat B, ни в отношении скорости расщепления соединения Cat B по экзопептидазному механизму. Без ограничения какой-либо теорией, считается, что стерически затрудняющий фрагмент T направляется за пределы связывающей полости Cat B (гидрофобного кармана), что приводит



бой двухвалентную алкиленовую группу, двухвалентную алкениленовую группу, двухвалентную алкиниленовую группу или двухвалентную полиалкиленоксидную группу. Эти двухвалентные группы предпочтительно имеют длину основной цепи 1-100 атомов, более предпочтительно 2-50 атомов, более предпочтительно 3-25.

Согласно одному варианту осуществления каждый  $S$ ,  $S_a$ ,  $S_b$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  и  $S_3$  независимо представляет собой двухвалентную группу, имеющую формулу  $-(CH_2)_q-Azz_5-$ , или двухвалентную группу, имеющую формулу  $-(OCH_2CH_2)_q-Azz_5-$ , где  $q$  является целым числом от 1 до 50, предпочтительно целым числом от 2 до 10; и  $Azz_5$  либо отсутствует, либо представляет собой солубилизирующую группу, такую как двухвалентную группу, содержащую в качестве заместителя аммониевую группу, сульфатную группу или аминокислоту. Например,  $Azz_5$  может быть аминокислотой с полярной боковой цепью, например, Arg.

Согласно одному варианту осуществления, каждый  $S$ ,  $S_a$ ,  $S_b$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  и  $S_3$  независимо представляет собой двухвалентную группу, имеющую формулу  $(CH_2)_q-Azz_5-Y-$ , или двухвалентную группу, имеющую формулу  $(OCH_2CH_2)_q-Azz_5-Y-$ ; где  $Y$  представляет собой двухвалентный фрагмент, ковалентно связанный с С-концом или боковой цепи  $Azz_5$  и с фрагментом  $V$ ; если  $Azz_5$  отсутствует,  $Y$  представляет собой двухвалентный фрагмент, ковалентно связанный с алкиленовой или полиэтиленоксидной группой и с фрагментом  $V$ ;  $Y$  является двухвалентным фрагментом, выбранным из малеимидов, триазолов, гидразинов, карбонилсодержащих групп и их производных, предпочтительно производным двухвалентного малеимида или триазола;  $Azz_5$  и  $q$  имеют определенные выше значения.

Например, когда  $Y$  представляет собой двухвалентную малеимидную группу (производное),  $Y$  может быть получен путем реакции малеимидогруппы с нуклеофильной группой, такой как гидроксильная, amino или тиольная группа. Малеймидогруппа, которая будет реагировать с нуклеофильной группой, может быть введена, например, на С-конец или в боковую цепь  $Azz_5$  (и, таким образом, нуклеофильная группа может быть введена во фрагмент  $V$  или уже присутствует во фрагменте  $V$ ). Таким образом, каждый  $S$ ,  $S_a$ ,  $S_b$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  и  $S_3$  может быть независимо получен из фрагмента, имеющего формулу  $-(CH_2)_q-Azz_5-Y'$ , или фрагмента, имеющего формулу  $-(OCH_2CH_2)_q-Azz_5-Y'$ , где  $Y'$  представляет собой малеймидогруппу, где  $q$  представляет собой целое число, выбранное в диапазоне от 1 до 50.

Когда  $Y$  представляет собой двухвалентную триазольную группу,  $Y$  может быть получен путем реакции азидной группы с алкиновой группой (т.е. "клик-химии"), азидную группу или алкиновую группу вводят, например, на С-конец или в боковую цепь  $Azz_5$ . Таким образом, каждый  $S$ ,  $S_a$ ,  $S_b$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  и  $S_3$  может быть независимо получен из фрагмента, имеющего формулу  $-(CH_2)_q-Azz_5-Y'$ , или фрагмента, имеющего формулу  $-(OCH_2CH_2)_q-Azz_5-Y'$ , где  $Y'$  представляет собой алкиновую группу или азидную группу.

Когда  $Y$  представляет собой двухвалентную гидразиновую группу,  $Y$  может быть получен путем реакции гидразиновой группы с альдегидной группой, гидразиновую группу или альдегидную группу вводят, например, на С-конец или в боковую цепь  $Azz_5$ . Кроме того, когда  $Y$  представляет собой двухвалентную карбонилсодержащую группу,  $Y$  может быть получен путем реакции карбоксильной группы или ее производного, например, ацилхлоридной группы, с нуклеофильной группой, такой как гидроксильная группа или аминогруппа.

$V$  в формулах (Ia<sub>1</sub>), (Ia<sub>2</sub>) и (Ia<sub>3</sub>) представляет собой фрагмент, полученный из векторной группы, способной к взаимодействию с клеткой-мишенью.  $V$  более подробно описан ниже.

$Z$  представляет собой группу, ковалентно присоединенную к С-концу Ауу, выбранную из -ОН; -N(H)(R), где R представляет собой атом водорода, алкильную группу, циклоалкильную группу или ароматическую группу; и метящее средство, такое как производное кумарина.

Согласно одному варианту осуществления соединение формулы (I) выбрано из следующих соединений, где  $Z$  предпочтительно является -ОН: W-Glu(T)-Phe-Z, W-Glu(T)-Ala-Z, W-Glu(T)-Trp-Z, W-Glu(T)-Tyr-Z, W-Apa(T)-Phe-Z, W-Apa(T)-Ala-Z, W-Apa(T)-Trp-Z, W-Apa(T)-Tyr-Z, W-Aaa(T)-Phe-Z, W-Aaa(T)-Ala-Z, W-Aaa(T)-Trp-Z, W-Aaa(T)-Tyr-Z, W-Dap(T)-Phe-Z, W-Dap(T)-Ala-Z, W-Dap(T)-Trp-Z, W-Dap(T)-Tyr-Z, W-Dab(T)-Phe-Z, W-Dab(T)-Ala-Z, W-Dab(T)-Trp-Z, W-Dab(T)-Tyr-Z, W-Lys(T)-Phe-Z, W-Lys(T)-гомо-Phe-Z, W-Lys(T)-Ala-Z, W-Lys(T)-Trp-Z, W-Lys(T)-Tyr-Z, W-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, W-Lys(T)-гомо-Tyr(OR<sub>1</sub>)-Z, где R<sub>1</sub>  $-(CH_2CH_2O)_{n1}-H$ , и  $n1$  является целым числом от 2 до 24, W-Orn(T)-Phe-Z, W-Orn(T)-Ala-Z, W-Orn(T)-Trp-Z, W-Orn(T)-Tyr-Z, W-Ser(T)-Phe-Z, W-Ser(T)-Ala-Z, W-Ser(T)-Trp-Z, W-Ser(T)-Tyr-Z, W-гомо-Lys(T)-Phe-Z, W-гомо-Lys(T)-Ala-Z, W-гомо-Lys(T)-Trp-Z, W-гомо-Lys(T)-Tyr-Z.

Согласно одному варианту осуществления соединение формулы (I) (где W является фрагментом формулы (III)) выбрано из следующих соединений, где  $Z$  предпочтительно является -ОН: W<sub>1</sub>Arg-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>Arg-Lys(T)-гомо-Phe-Z, W<sub>1</sub>Cit-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub> Cit-Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>Cit-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, W<sub>1</sub>Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>Lys(T)-гомо-Tyr-Z, W<sub>1</sub>Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>Mal-Phe-Cit-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, W<sub>1</sub>Mal-Phe-Lys-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>Mal-гомо-Phe-Arg-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub> Mal-гомо-Phe-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>Mal-гомо-Phe-Cit-Lys(T)-Tyr(OR<sub>1</sub>)-Z, где R<sub>1</sub>  $(CH_2CH_2O)_{n1}-H$ , и  $n1$  является целым числом от 2 до 24, например 12, W<sub>1</sub>Mal-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>Mal-Cit-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, W<sub>1</sub>Mal-Arg-Lys(T)-гомо-Tyr-Z; предпочтительно W<sub>1</sub> Arg-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>Cit-Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>Mal-Cit-Lys(T)-Tyr-Z или W<sub>1</sub>Arg-Lys(T)-Phe-Z; более предпочтительно W<sub>1</sub>-Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Phe-Z или W<sub>1</sub>Mal-Cit-Lys(T)-Tyr-Z.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления, соединение формулы (I) (где W является фрагментом формулы (III)) выбрано из следующих соединений, где Z предпочтительно является -OH: APhe-Arg-Lys(T)-Phe-Z, APhe-Arg-Lys(T)-гомо-Phe-Z, APhe-Cit-Lys(T)-Phe-Z, APhe-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, APhe-Cit-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, ACit-Lys(T)-Phe-Z, ACit-Lys(T)-Tyr-Z, ACit-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, DM1-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Phe-Z, DM1-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, DM1-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, DM1-Mal-Phe-Lys-Lys(T)-Phe-Z, DM1-Mal-гомо-Phe-Arg-Lys(T)-Phe-Z, DM1-Mal-гомо-Phe-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, DM1-Mal-гомо-Phe-Cit-Lys(T)-Tyr(OR<sub>1</sub>)-Z, где R<sub>1</sub> -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n1</sub>-H, и n1 является целым числом от 2 до 24, например 12, DM1-Mal-Cit-Lys(T)-Tyr-Z; DM1-Mal-Cit-Lys(T)-гомо-Tyr-Z; DM1-Mal-Arg-Lys(T)-гомо-Tyr-Z; предпочтительно APhe-Arg-Lys(T)-Phe-Z, APhe-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, DM1-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Phe-Z, DM1-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, DM1-Mal-Cit-Lys(T)-Tyr-Z или APhe-Arg-Lys(T)-Phe-Z; более предпочтительно DM1-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Phe-Z или DM1-Mal-Cit-Lys(T)-Tyr-Z.

В одном варианте осуществления соединение формулы (I) содержит фрагмент W, представленный формулой (III), в которой W<sub>1</sub> представляет собой фрагмент, полученный из лекарственного средства, которое не является аналогом ауристатина (например, AF). Это соединение предпочтительно выбрано из следующих соединений, где Z предпочтительно является -OH: DM1-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Phe-Z, DM1-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, DM1-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, DM1-Mal-Phe-Lys-Lys(T)-Phe-Z, DM1-Mal-гомо-Phe-Arg-Lys(T)-Phe-Z, DM1-Mal-гомо-Phe-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, DM1-Mal-гомо-Phe-Cit-Lys(T)-Tyr(OR<sub>1</sub>)-Z, где R<sub>1</sub> -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n1</sub>-H, и n1 является целым числом от 2 до 24, например 12; DM1-Mal-Cit-Lys(T)-Tyr-Z; DM1-Mal-Cit-Lys(T)-гомо-Tyr-Z и DM1-Mal-Arg-Lys(T)-гомо-Tyr-Z; более предпочтительно DM1-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Phe-Z, DM1-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Tyr-Z или DM1-Mal-Cit-Lys(T)-Tyr-Z.

Согласно одному варианту осуществления соединение формулы (I) (где W является фрагментом формулы (III)) выбрано из следующих соединений, где Z предпочтительно является -OH: W<sub>1</sub>Cit-(Lys(D<sub>2</sub>)-Phe)<sub>m</sub>-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>Cit-(Lys(D<sub>2</sub>)-Phe)<sub>m</sub>-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, W<sub>1</sub>Cit-(Lys(D<sub>2</sub>)-Phe)<sub>m</sub>-Lys(T)-Tyr(OR<sub>1</sub>)-Z, где R<sub>1</sub> -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n1</sub>-H, и n1 являются целым числом от 2 до 24, например 12, W<sub>1</sub>(Lys(D<sub>2</sub>)-Phe)<sub>m</sub>-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>Phe-(Phe-Lys(D<sub>2</sub>))<sub>m</sub>-Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>-(Phe-Lys(D<sub>2</sub>))<sub>m</sub>-Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>-Phe-(Phe-Lys(D<sub>2</sub>))<sub>m</sub>-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, W<sub>1</sub>Arg-(Phe-Lys(D<sub>2</sub>))<sub>m</sub>-Lys(T)-Tyr(OR<sub>1</sub>)-Z; предпочтительно из AF-Cit-(Lys(Mal-DM1)-Phe)<sub>m</sub>-Lys(T)-Phe-Z, AF-Cit-(Lys(Mal-DM1)-Phe)<sub>m</sub>-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, AF-Cit-(Lys(Mal-DM1)-Phe)<sub>m</sub>-Lys(T)-Tyr(OR<sub>1</sub>)-Z, где R<sub>1</sub> -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n1</sub>-H, и n1 является целым числом от 2 до 24, например 12, AF-Phe-(Phe-Lys(Mal-DM1))<sub>m</sub>-Lys(T)-Tyr-Z, AF-Arg-(Phe-Lys(Mal-DM1))<sub>m</sub>-Lys(T)-Tyr(OR<sub>1</sub>)-Z; где m является предпочтительно целым числом от 1 до 8, например от 1 до 4.

Согласно одному варианту осуществления, соединение формулы (I') выбрано из следующих соединений, где Z предпочтительно является -OH: W-Phe-Glu(T)-Z, W-Ala-Glu(T)-Z, W-Trp-Glu(T)-Z, W-Tyr-Glu(T)-Z, W-Phe-Apa(T)-Z, W-Ala-Apa(T)-Z, W-Trp-Apa(T)-Z, W-Tyr-Apa(T)-Z, W-Phe-Aaa(T)-Z, W-Ala-Aaa(T)-Z, W-Tф-Aaa(T)-Z, W-Tyr-Aaa(T)-Z, W-Phe-Dap(T)-Z, W-Ala-Dap(T)-Z, W-Trp-Dap(T)-Z, W-Tyr-Dap(T)-Z, W-Phe-Dab(T)-Z, W-Ala-Dab(T)-Z, W-Trp-Dab(T)-Z, W-Tyr-Dab(T)-Z, W-Phe-Lys(T)-Z, W-Ala-Lys(T)-Z, W-Trp-Lys(T)-Z, W-Tyr-Lys(T)-Z, W-Phe-Orn(T)-Z, W-Ala-Orn(T)-Z, W-Trp-Orn(T)-Z, W-Tyr-Orn(T)-Z, W-Phe-Ser(T)-Z, W-Ala-Ser(T)-Z, W-Trp-Ser(T)-Z, W-Tyr-Ser(T)-Z, W-Phe-Ama(T)-Z, W-Ala-Ama(T)-Z, W-Tф-Ama(T)-Z, W-Tyr-Ama(T)-Z, W-Phe-гомо-Lys(T)-Z, W-Ala-гомо-Lys(T)-Z, W-Tф-гомо-Lys(T)-Z, W-Tyr-гомо-Lys(T)-Z.

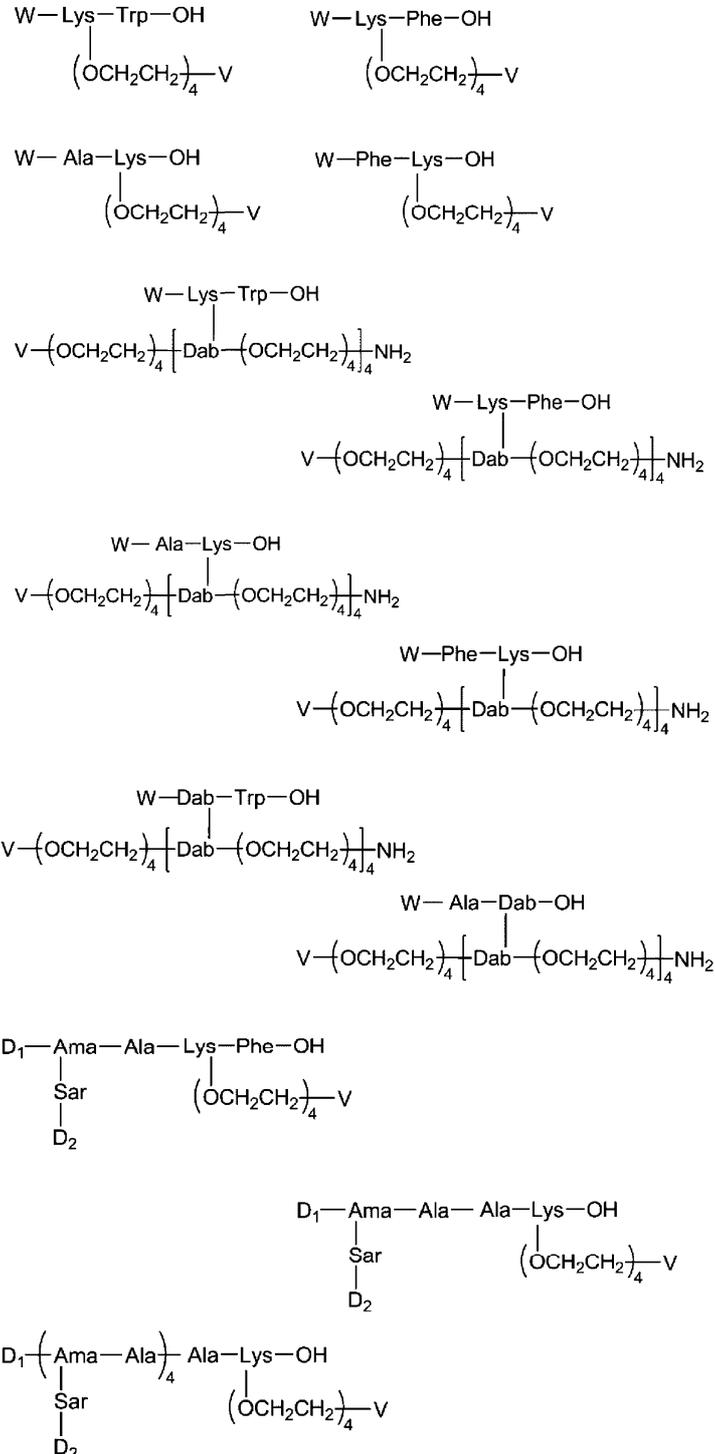
Согласно одному варианту осуществления соединение формулы (I') (где W является фрагментом формулы (III)) выбрано из: W<sub>1</sub>Arg-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Arg-Ser-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Cit-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Cit-Ser-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Cit-гомо-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Ser-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Mal-Phe-Cit-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Mal-гомо-Phe-Cit-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Mal-Phe-Arg-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Mal-Cit-Phe Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Mal-Phe-Ser-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Mal-Ala-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>-Mal-Cit-Ser-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>-Mal-Arg-гомо-Phe-Lys(T)-Z; предпочтительно W<sub>1</sub> Arg-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Cit-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Mal-Phe-Cit-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Mal-Phe-Arg-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Mal-Cit-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Mal-Phe-Ser-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub> Mal-Ala-Phe-Lys(T)-Z; более предпочтительно W<sub>1</sub>Cit-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub> Mal-Phe-Cit-Phe-Lys(T)-Z или W<sub>1</sub>Mal-Phe-Ser-Lys(T)-Z.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления соединение формулы (I') (где W является фрагментом формулы (III)) выбрано из следующих соединений, где Z предпочтительно является -OH: APhe-Arg-Phe-Lys(T)-Z, APhe-Arg-Ser-Lys(T)-Z, APhe-Cit-Phe-Lys(T)-Z, APhe-Cit-Ser-Lys(T)-Z APhe-Cit-гомо-Phe-Lys(T)-Z, ACit-Phe-Lys(T)-Z, ACit-Ser-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Phe-Cit-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-гомо-Phe-Cit-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Phe-Arg-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Cit-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Phe-Ser-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Ala-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Cit-Ser-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Arg-гомо-Phe-Lys(T)-Z; более предпочтительно APhe-Arg-Phe-Lys(T)-Z, APhe-Cit-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Phe-Cit-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Phe-Arg-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Cit-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Phe-Ser-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Ala-Phe-Lys(T)-Z; еще более предпочтительно APhe-Cit-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Phe-Cit-Phe-Lys(T)-Z или DM1-Mal-Phe-Ser-Lys(T)-Z.

В одном варианте осуществления соединение формулы (I') содержит фрагмент W, представленный формулой (III), в которой W<sub>1</sub> представляет собой фрагмент, полученный из лекарственного средства, которое не является аналогом ауристатина (например, AF). Это соединение предпочтительно выбрано из следующих соединений, где Z предпочтительно является -OH: DM1-Mal-Phe-Cit-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-

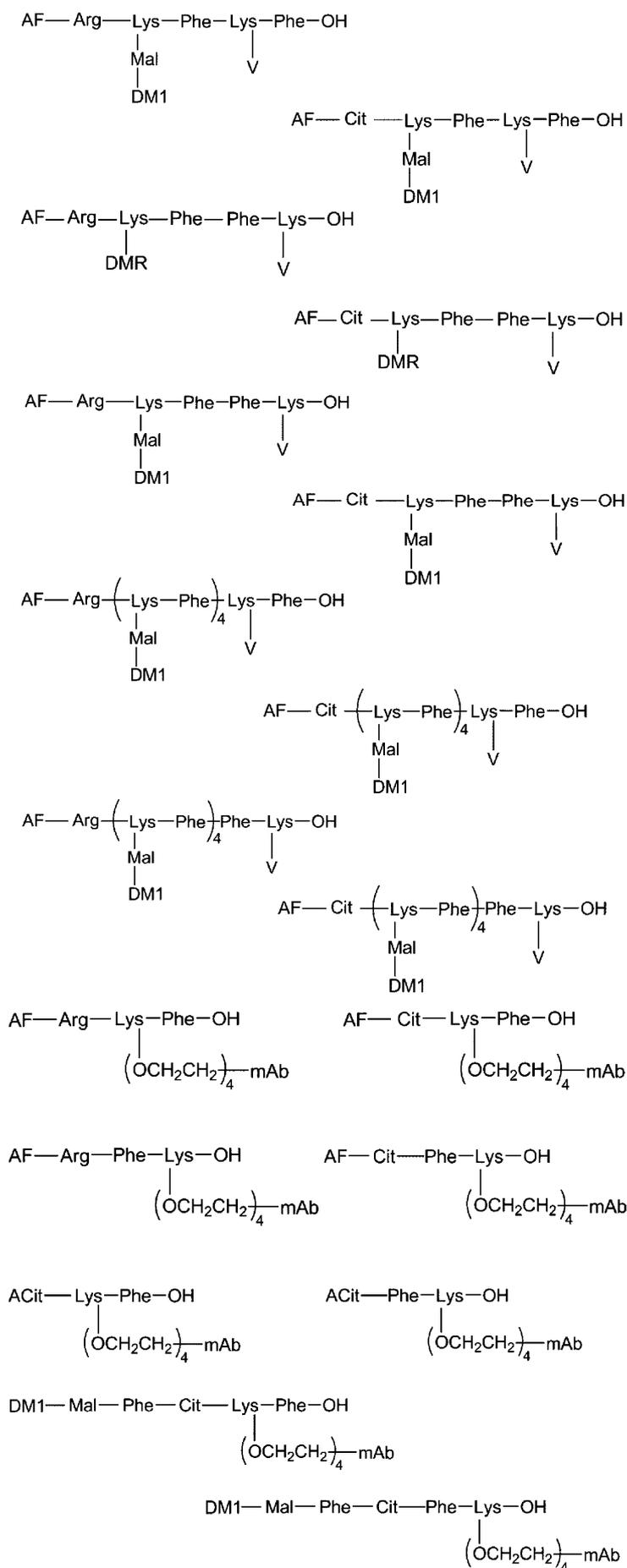
гомо-Phe-Cit-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Phe-Arg-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Cit-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Phe-Ser-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Ala-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Cit-Ser-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Arg-гомо-Phe-Lys(T)-Z; более предпочтительно DM1-Mal-Phe-Cit-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Phe-Arg-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Cit-Phe-Lys(T)-Z, DM1-Mal-Phe-Ser-Lys(T)-Z или DM1-Mal-Ala-Phe-Lys(T)-Z; еще более предпочтительно DM1-Mal-Phe-Cit-Phe-Lys(T)-Z или DM1-Mal-Phe-Ser-Lys(T)-Z.

Соединение формулы (I) или (I') может быть выбрано из:



В представленных выше соединениях переменные группы W, W<sub>1</sub>, V, D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub> имеют такие же значения, как описано выше и ниже. Предпочтительно в соединениях формул (I) и (I'), представленных выше, каждый W<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub> независимо представляет собой фрагмент, полученный из лекарственного средства, и в особенности фрагменты, полученные из Ауристатина F (AF), Ауристатина X (AX; "AX" относится к аналогу Ауристатина, где X представляет собой C-концевую аминокислоту пептидной цепи ауристатина), Камптотецина (CPT). Кроме того, в соединениях, показанных выше, если этиленоксидная группа (т.е. группа формулы (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)) связывает N-конец аминокислоты, может присутствовать дополнительная карбоксильная группа (CO) (не показанная в представленных выше соединениях), при этом меж-



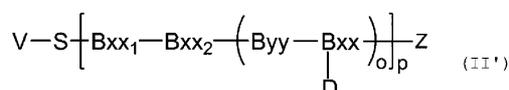
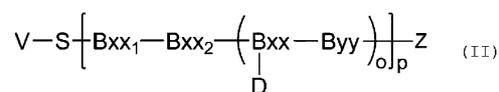


где в представленных выше соединениях DMR и DM1 представляют собой майтанзиноидные сред-

ства (например, мертанзин), а mAb представляет собой вектор моноклонального антитела, способный к взаимодействию с клеткой-мишенью (описанной ниже).

#### 4. Соединение формулы (II) и (II').

Настоящее изобретение также относится к соединению (т.е. LDC), представленному общей формулой (II) или (II'):



Соединение формулы (II) или (II') содержит С-концевую дипептидную единицу Vxx-Vуу или Vуу-Vxx, которая служит в качестве субстрата для распознавания и расщепления Cat B (посредством экзопептидазной активности Cat B).

Термин "С-концевой" при использовании в настоящем документе относится к С-концу аминокислотной цепи, например, аминокислоте Vуу в дипептиде Vxx-Vуу, и означает, что никакая группа лекарственного средства или вектора не присоединена к С-концу Vуу. Тем не менее, если  $o > 1$  и/или  $p > 1$ , С-конец Vуу может связываться с N-концом другой дипептидной единицы Vxx-Vуу или дипептидной единицы Vxx<sub>1</sub>Vxx<sub>2</sub>, как более подробно описано ниже.

D представляет собой фрагмент, полученный из лекарственного средства. Если  $p > 1$  и/или  $o > 1$ , возможно, что до ( $o \cdot p$ )-1 групп D отсутствует, т.е. что соответствующие группы D представляют собой атом водорода или солибилизирующую группу, такую как  $-(CH_2CH_2O)_{n1}-H$ , где  $n1$  является целым числом от 2 до 24. Согласно одному варианту осуществления, D представляет собой фрагмент, полученный из лекарственного средства, имеющий одну или более групп, выбранных из гидроксильной, карбоксильной, amino или тиольной групп. Лекарственное средство(а), подходящее для применения в настоящем изобретении, более подробно описано ниже. Примеры подходящих лекарственных средств включают ауристатины, майтанзины, камптотецины и доксорубицины.

Vxx представляет собой трифункциональную аминокислоту, такую как аминокдикарбоновая кислота или диаминокарбоновая кислота. Vxx может быть любой природной или неприродной аминокислотой, которая обеспечивает необходимые три функциональные группы для присоединения к смежным группам, таким как аминокислоты Vxx<sub>2</sub> и/или Vуу и фрагмент D в формуле (II); при условии, что Vxx в формуле (II) не является аминокислотой в (D) конфигурации. Примеры трифункциональных аминокислот включают аминокдикарбоновые кислоты и диаминокарбоновые кислоты, такие как Aaa, Dap, Dab и Ama. Другие подходящие трифункциональные аминокислоты включают Glu, Aра, Lys, Orn, Ser и гомо-Lys. В тех случаях, когда Vxx несет водород в качестве группы D, Vxx может быть также любой другой аминокислотой, при условии, что Vxx в формуле (II) не является аминокислотой в (D) конфигурации.

Согласно одному варианту осуществления, Vxx представляет собой аминокислоту, выбранную из Glu, Aра, Aaa, Dap, Dab, Lys, Orn, Ser, Thr, Ama, гомо-Ser, гомо-Thr и гомо-Lys. Согласно одному предпочтительному варианту осуществления, Vxx представляет собой аминокислоту, выбранную из Dap, Dab, Lys, Orn и гомо-Lys, предпочтительно Lys или Dab, более предпочтительно Lys.

Vуу представляет собой аминокислоту, выбранную от Phe, Ala, Trp, Tyr, Phg, Val, His, Lys, Abu, Met, Cit, Orn, Ser, Thr, Leu, Ile, Arg и Tyr(OR<sub>1</sub>), где R<sub>1</sub>  $-(CH_2CH_2O)_{n1}-R_2$ , где R<sub>2</sub> является атомом водорода или метильной группой, и  $n1$  является целым числом от 2 до 24; или Vуу в формуле (II) представляет собой аминокислоту, выбранную из гомо-Tyr, гомо-Phe, бета-Phe и бета-гомо-Phe; при условии, что Vуу в формуле (II') не является аминокислотой в (D) конфигурации, и при условии, что, если  $o \cdot p > 1$ , то только С-концевой Vуу в формуле (II) может представлять собой аминокислоту, выбранную из гомо-Phe, бета-Phe и бета-гомо-Phe. Предпочтительно, Vуу в формулах (II) и (II') представляет собой Cit, Phe, Phg, Ser, Trp, Tyr или Tyr(OR<sub>1</sub>), где R<sub>1</sub>  $-(CH_2CH_2O)_{n1}-R_2$ , где R<sub>2</sub> является атомом водорода или метильной группой, и  $n1$  является целым числом от 2 до 24, более предпочтительно Phe, Tyr или Tyr(OR<sub>1</sub>); если  $o \cdot p > 1$ , Vуу предпочтительно представляет собой Tyr или Tyr(OR<sub>1</sub>). Без ограничения теорией, считается, что Vуу дает соединение формулы (II) или (II'), соответствующее структурным требованиям для распознавания и расщепления Cat B.

Vxx<sub>1</sub> либо отсутствует (представляет собой одинарную ковалентную связь), либо представляет собой аминокислоту (т.е. природную или неприродную аминокислоту), имеющую гидрофобную или основную боковую цепь; при условии, что, если  $p$  больше 1, Vxx<sub>1</sub> не является аминокислотой в (D) конфигурации. Примеры природных аминокислот, имеющих гидрофобную или основную боковую цепь, включают Phe, Tyr, Val, Ala, Ile, Leu, Ser, His, Met. Примеры неприродных аминокислот, имеющих гидрофобную боковую цепь, включают фенилглицин (Phg), циклогексил-Ala (Cha), 2-аминоизомасляную кислоту (Aib), бутил-Gly (Tle), альфа-аминокапроновую кислоту (Nle), норвалин (Nva).

Согласно одному варианту осуществления, Vxx<sub>1</sub> представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, гомо-Phe, Phg, Val, Ser, Leu, Tyr, Ala, Ile; предпочтительно аминокислоту, выбранную из Phe, гомо-

Phe, Tyr и Val, более предпочтительно Phe, гомо-Phe или Tyr.

$V_{xx_2}$  представляет собой аминокислоту (т.е. природную или неприродную аминокислоту), имеющую гидрофобную или основную боковую цепь. Согласно одному варианту осуществления,  $V_{xx_2}$  представляет собой аминокислоту, выбранную из Arg, Lys, Cit, Val, Leu, Ser, Ala, Gly, His, Gin, Phg и Phe. Согласно одному предпочтительному варианту осуществления,  $V_{xx_2}$  представляет собой аминокислоту, выбранную из Arg, Lys, Cit и Phe, предпочтительно Arg или Cit.

S в формулах (II) и (IV) представляет собой двухвалентную группу, содержащую 1 или более атомов, выбранных из углерода, азота, кислорода и серы. S связывает аминокислоту  $V_{xx_1}$  или, если  $V_{xx_1}$  отсутствует,  $V_{uu}$  (путем ковалентного присоединения к N-концу  $V_{xx_1}$  или  $V_{xx_2}$ ) с фрагментом V (описанным ниже).

Согласно одному варианту осуществления, S представляет собой двухвалентную алкиленовую группу, двухвалентную алкениленовую группу или двухвалентную полиалкиленоксидную группу. Предпочтительно, S представляет собой двухвалентную группу, имеющую формулу  $-(CH_2)_q-Azz_5-$ , или двухвалентную группу, имеющую формулу  $(OCH_2CH_2)_q-Azz_5$ ; где q является целым числом от 1 до 50, предпочтительно целым числом от 2 до 10; и  $Azz_5$  либо отсутствует, либо представляет собой солубилизирующую группу, такую как двухвалентная группа, содержащая аммониевую группу, сульфатную группу или аминокислоту в качестве заместителя. Например,  $Azz_5$  может быть аминокислотой с полярной боковой цепью.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления, S представляет собой двухвалентную группу, имеющую формулу  $-Y-Azz_5-(CH_2)_q-$ , или двухвалентную группу, имеющую формулу  $-Y-Azz_5-(OCH_2CH_2)_q-$ ; где Y представляет собой двухвалентный фрагмент, ковалентно присоединенный к N-концу  $Azz_5$  и к фрагменту V; если  $Azz_5$  отсутствует, Y представляет собой двухвалентный фрагмент, ковалентно присоединенный к алкильной или полиэтиленоксидной группе и к фрагменту V; Y является двухвалентным фрагментом, выбранным из малеимидов, триазолов, гидразинов, карбонилсодержащих групп и их производных, предпочтительно производного двухвалентного малеимида или триазольной группы. Двухвалентная группа формулы  $-Y-Azz_5-(CH_2)_q-$  может быть получена, как описано ниже.

Каждое o и p в формулах (II) и (IV) независимо является целым числом от 1 до 10, предпочтительно целым числом от 1 до 4.

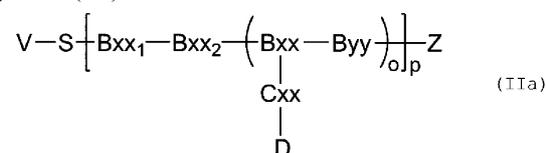
V представляет собой фрагмент, полученный из векторной группы, способной к взаимодействию с клеткой-мишенью. Выражение "способный к взаимодействию с клеткой-мишенью" при использовании в настоящем документе указывает, что векторная группа может связываться, образовывать комплекс или реагировать с фрагментом, например, белком или рецептором, клетки-мишени, вызывая интернализацию соединения формулы (II) в клетку-мишень. V будет более подробно описан ниже.

Z представляет собой группу, ковалентно присоединенную к C-концу  $V_{uu}$  (и в случае  $p > 1$ , группа  $V_{uu}$ , которая расположена на C-конце), выбранную из -OH; -N(H)(R), где R представляет гидроксильную группу, атом водорода, алкильную группу, циклоалкильную группу или ароматическую группу, предпочтительно гидроксильную группу; и метящее средство, такое как производное кумарина.

Согласно одному варианту осуществления, R представляет собой алкильную группу, содержащую от 1 до 20 атомов углерода, предпочтительно металльную или этильную группу, циклоалкильную группу, содержащую от 3 до 20 атомов углерода, предпочтительно от 5 до 8 атомов углерода, или ароматическую группу, содержащую от 6 до 20 атомов углерода, предпочтительно 6 или 10 атомов углерода.

Пептиды  $V_{xx}(D)-V_{uu}$  и  $V_{uu}-V_{xx}(D)$  в соответствующих формулах (II) и (IV) селективно действуют в качестве субстрата для экзопептидазной активности Cat B. Таким образом, Cat B расщепляет соединение формулы (II) или (II') на N-конце (каждого) остатка  $V_{xx}$  (формулы (II)) или  $V_{uu}$  (формулы (II')), с высвобождением пептидного фрагмента  $V-S-V_{xx_1}V_{xx_2}$ , одного пептидного фрагмента  $V_{xx}(D)-V_{uu}-Z$  и (p-1) пептидных фрагментов  $V_{xx_1}-V_{xx_2}$ , а также ((o\*p)-1) пептидных фрагментов  $V_{xx}(D)-V_{uu}-OH$ . Согласно некоторому варианту осуществления,  $V_{xx}(D)-V_{uu}-OH$  и  $V_{xx}(D)-V_{uu}-Z$  могут быть саморасщепляющимися фрагментами, которые могут подвергаться внутримолекулярному аминолизу или гидролизу, приводящему к высвобождению фрагмента D в качестве продукта. В некоторых аспектах дипептид  $V_{xx}(D)-V_{uu}-OH/V_{uu}-V_{xx}(D)-OH$  может демонстрировать фармакологическую (например, цитотоксическую) активность.

Согласно еще одному варианту осуществления соединение настоящего изобретения представлено следующими общими формулами (IIa):



В формуле (IIa),  $V_{xx}$  представляет собой карбоксиаминокислоту (т.е. содержащую группу COOH в своей боковой цепи), такую как Ama, Glu, Aaa, Aра, или трифункциональную аминокислоту, выбранную из Dар, Dаб, Ser, Thr, Lys, Orn, гомо-Lys, гомо-Ser и гомо-Thr; при условии, что  $V_{xx}$  не является амино-

кислотой в (D) конфигурации. Предпочтительно, Vxx представляет собой трифункциональную аминокислоту, выбранную из Ama, Glu, Aaa, Dap, Dab, Ser, Thr, Ara, Lys, Orn, гомо-Lys, гомо-Ser и гомо-Thr.

Sxx представляет собой одинарную ковалентную связь, если Vxx не является Ama. Если Vxx является Ama, Sxx представляет собой (L)- или (D)-Pro, или N-алкиламинокислоту, такую как Sar, N-конец Sxx связан с C-концом Ama, и C-конец Sxx связан, например, через сложноэфирную связь с фрагментом лекарственного средства D (например, СРТ).

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления, Sxx представляет собой аминокислоту, выбранную из (L)- или (D)-Pro, Саркозина (SAR), N-метил-Val и N-метил- Leu.

Wuu представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, Ala, Trp, Tyr, Phg, Val, His, Lys, Abu, Met, Cit, Orn, Ser, Thr, Leu, Ile, Arg, гомо-Phe, бета-Phe и бета-гомо-Phe, при условии, что, если  $\sigma^*p > 1$ , то только C-концевой Wuu может представлять собой аминокислоту, выбранную из гомо-Phe, бета-Phe и бета-гомо-Phe. Предпочтительно, Wuu представляет собой Cit, Phe, гомо-Phe, Ser, Trp, Tyr или Tyr(OR<sub>1</sub>), где R<sub>1</sub> является -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n1</sub>-R<sub>2</sub>, где R<sub>2</sub> является атомом водорода или метильной группой, и n1 является целым числом от 2 до 24; более предпочтительно Phe, Tyr или Tyr(OR<sub>1</sub>); если  $\sigma^*p > 1$ , Wuu предпочтительно представляет собой Tyr или Tyr(OR<sub>1</sub>). Без ограничения теорией, считается, что Wuu дает соединение формулы (IIa), соответствующее структурным требованиям для распознавания и расщепления Cat B.

Пептид Vxx(Sxx-D)-Wuu в формулах (IIa) селективно действует в качестве субстрата для экзопептидазной активности Cat B, т.е. Cat B расщепляет соединение формулы (IIa) на N-конец (каждого) остатка Vxx с высвобождением пептидного фрагмента V-S-Vxx<sub>1</sub>Vxx<sub>2</sub>, одного пептидного фрагмента Vxx(Sxx-D)-Wuu-Z и (p-1) пептидных фрагментов Vxx<sub>1</sub>-Vxx<sub>2</sub>, а также (( $\sigma^*p$ )-1) пептидных фрагментов Vxx(Sxx-D)-Wuu-OH, фрагменты пептида. Vxx(Sxx-D)-Wuu-OH и Vxx(Sxx-D)-Wuu-Z являются саморасщепляющимися фрагментами, которые могут подвергаться внутримолекулярному аминолизу (с образованием DKP), приводящему к высвобождению фрагмента D в качестве продукта. В пептидах Ama(Sxx-D<sub>2</sub>)-Wuu-OH и Ama(Sxx-D<sub>2</sub>)-Wuu-Z механизм образования DKP включает нуклеофильную атаку N-концевого азота Ama по сложноэфирному карбонилу в Sxx с высвобождением фрагмента D<sub>2</sub> (например, СРТ).

D, Vxx<sub>1</sub>, Vxx<sub>2</sub>, S и V в формулах (IIa) имеют значения, определенные выше в отношении формул (II) и (IV). В тех случаях, когда Vxx в формуле (IIa) несет водород в качестве группы D, Vxx также может быть любой другой аминокислотой, при условии, что Vxx не является аминокислотой в (D) конфигурации.

В настоящем изобретении было неожиданно обнаружено, что присутствие стерически затрудняющего фрагмента D в боковой цепи остатка Vxx (или Sxx, если таковой присутствует) не оказывает никакого неблагоприятного влияния ни на аффинность связывания соединения настоящего изобретения с Cat B, ни на скорость расщепления соединения экзопептидазным механизмом Cat B. Без ограничения какой-либо теорией, считается, что стерическим затрудняющий фрагмент D направлен за пределы связывающей полости Cat B (известной как "гидрофобный карман" Cat B), что приводит к превосходной селективности и скорости расщепления посредством экзопептидазного механизма.

В соединении формулы (II)/(II') фрагмент V (векторная группа) ковалентно присоединен к одной группе S, как показано выше, т.е. линкерная система присоединена к векторной группе через одну точку присоединения (например, путем цистеина-малеимидного связывания). Присоединение больше одной линкерной системы на множестве сайтов фрагмента V не предусмотрено для включения в настоящее изобретение. В результате может быть достигнута высокая нагрузка лекарственного средства (высокое DAR), и, в то же время, могут быть преодолены проблемы перегрузки векторной группы и/или преждевременного внеклеточного расщепления конъюгата (например, неспецифического цитотоксического действия).

В некоторых аспектах линкерная система обеспечивает новую и регулируемую технологическую платформу, приводящую к по меньшей мере одному из следующих пунктов: (1) высвобождение одной молекулы лекарственного средства (полезной нагрузки) в клетке-мишени, (2) высвобождение множества молекул (например, 2-20 или 4-10) одного и того же лекарственного средства в клетке-мишени (высокое DAR), (3) высвобождение множества молекул (например, 2-20 или 4-10) разных лекарственных средств (двойной полезной нагрузки или множественной полезной нагрузки) в клетке-мишени (высокое DAR).

Согласно одному варианту осуществления соединение формулы (II) выбрано из следующих соединений, где Z предпочтительно является -OH: V-S-Phe-Lys-Lys(D)-Phe-Z, V-S-Phe-Cit-Lys(D)-Cit-Z, V-S-Phe-Cit-Lys(D)-Tyr-Z, V-S-Phe-Cit-Lys(D)-гомо-Tyr-Z, V-S-Phe-Arg-Lys(D)-Arg-Lys(D)-Phe-Z, V-S-Phe-Arg-(Lys(D)-Cit)<sub>o</sub>-Z, V-S-Phe-Arg-(Lys(D)-Tyr(OR<sub>1</sub>))<sub>o</sub>-Z, где R<sub>1</sub> является -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n1</sub>-R<sub>2</sub>, где R<sub>2</sub> является атомом водорода или метильной группой, и n1 является целым числом от 2 до 24, например 12, V-S-Phe-Arg-(Lys(D)-Cit)<sub>o</sub>-Tyr(OR<sub>1</sub>)-Tyr-Z; предпочтительно из V-S-Phe-Lys-Lys(D)-Phe-Z, V-S-Phe-Cit-Lys(D)-Cit-Z, V-S-Phe-Cit-Lys(D)-гомо-Tyr-Z или V-S-Phe-Arg-Lys(D)-Arg-Lys(D)-Phe-Z.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления, соединение формулы (II) выбрано из следующих соединений, где Z предпочтительно является -OH: V-S-Phe-Lys-Lys(Mal-DM1)-Phe-Z, V-S-Phe-Lys-Lys(AF)-Phe-Z, V-S-Phe-Cit-Lys(Mal-DM1)-Cit-Z, V-S-Phe-Cit-Lys(Mal-DM1)-Tyr-Z, V-S-Phe-Cit-Lys(Mal-DM1)-гомо-Tyr-Z, V-S-Phe-Arg-Lys(Mal-DM1)-Arg-Lys(AF)-Phe-Z, V-S-Phe-Arg-(Lys(Mal-DM1)-Cit)<sub>o</sub>-Z, V-S-Phe-Arg-(Lys(Mal-DM1)-Tyr(OR<sub>1</sub>))<sub>o</sub>-Z, где R<sub>1</sub> является -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n1</sub>-R<sub>2</sub>, где R<sub>2</sub> является атомом водорода или метильной группой, и n1 является целым числом от 2 до 24, например 12, V-S-Phe-



средство (т.е. мертанзин), а mAb представляет собой вектор моноклонального антитела, способный к взаимодействию с клеткой-мишенью (описанной ниже).

#### 5. Лекарственные средства.

В соединении настоящего изобретения каждый фрагмент, полученный из лекарственного средства, независимо выбран из:

- (i) противоопухолевых средств;
  - (ii) иммуномодулирующих средств;
  - (iii) лекарственных средств для лечения инфекционных заболеваний;
- и радиоизотопов и/или их фармацевтически приемлемых солей, кислот или производных.

Согласно одному варианту осуществления каждый фрагмент, полученный из лекарственного средства, независимо получен из лекарственного средства, имеющего одну или более групп, выбранных из гидроксильной, карбоксильной, тиольной или аминогруппы.

Лекарственное средство может быть немодифицированным (в его исходной форме за исключением замены атома водорода ковалентной связью) или химически модифицированным для включения одной или более функциональных групп (например, одной или более групп, выбранных из гидроксильной, карбоксильной, амино и тиольной групп), дающих возможность ковалентного присоединения (присоединений) к аминокислоте, например, аминокислоте Axx в формулах (I) и (I'), аминокислоте A'xx в формулах (Ia) и (Ib), аминокислоте Vxx в формулах (II), (II') и (IIa), и/или Cxx в формулах (Ib) и (IIa). Лекарственное средство также может быть модифицировано путем ковалентного присоединения к двухвалентной группе, например, аминокислоте, пептиду, линкеру или спейсеру, как описано выше, и т.д.

Согласно одному варианту осуществления лекарственное средство может быть модифицировано путем введения двухвалентной группы, например, аминокислоты или пептида, что может повысить аффинность конъюгата для Cat B, в частности, для экзопептидазной (карбоксипептидазной) активности Cat B. Например, лекарственное средство может быть модифицировано путем введения аминокислоты, такой как Phe, Lys, Cit или Arg, между (нативным) лекарственным средством и аминокислотой Axx формулы (I) или Ауу формулы (I'). Пример такого модифицированного лекарственного средства представлен на фиг. 12, на которой показано майтанзиноидное лекарственное средство, содержащее аминокислоту Дуу, такую как Arg, Phe, Cit или Lys, между лекарственным средством и пептидом согласно формуле (I') (т.е. лекарственное средство и аминокислота вместе формируют фрагмент W согласно формуле (I')). Как показано на фиг. 12, индуцированное Cat B ферментное расщепление на N-конце Axx высвобождает фрагмент W (т.е. лекарственное средство, производное майтанзина) в клетке-мишени.

В некоторых аспектах настоящего изобретения каждый фрагмент, полученный из лекарственного средства, независимо представляет собой группу пролекарства, которое фармакологически не активно в конъюгированной форме (например, в случае присутствия в соединении формулы (I), (I'), (II), (II') или (IIa)), но становится фармакологически активным при высвобождении из конъюгата или активируется после внутриклеточно.

Таким образом, лекарственное средство, применяемое в конъюгате лиганда-лекарственного средства согласно настоящему изобретению, может быть нативным лекарственным средством (например, лекарственным средством, изначально содержащим одну или более функциональных групп, позволяющих осуществлять ковалентное присоединение к конъюгату) или может быть химически модифицированным лекарственным средством, при условии, что лекарственное средство является фармакологически активным либо при высвобождении из конъюгата, либо активируется после внутриклеточно. В предпочтительном варианте осуществления лекарственное средство является модифицированным лекарственным средством, которое фармакологически активно в таком смысле, что оно сохраняет по меньшей мере 20%, более предпочтительно по меньшей мере 50% фармакологической активности немодифицированного (нативного) лекарственного средства.

Ниже представлены примеры лекарственных средств, которые могут применяться в конъюгате лиганда-лекарственного средства согласно настоящему изобретению.

#### (i) Противоопухолевые средства включают:

(a) алкилирующие средства, такие как аналоги азотистого иприта (например, циклофосфамид, хлорамбуцил, мелфалан, хлорметин, ифосфамид, трофосфамид, преднимустин, бендамустин, хлорнафазин, эстрамустин, мехлоретамин, мехлоретамин оксида гидрохлорид, манномустин, митолактол, новэмбин, фенестерин, урамустин); алкилсульфонаты (например, бусульфат, треосульфат, манносульфат, импросульфат и пипосульфат); этиленимины (например, тиотепа, триазиквон, карбоквон); нитрозомочевины (например, кармустин, ломустин, семустин, стрептозицин, хлорозоцин, фотемустин, нимустин, ранимустин); эпоксиды (например, этоглоцид); другие алкилирующие средства (например, митобронитол, пипоброман, темозоломид, дакарбазин);

(b) алкалоиды, такие как алкалоиды барвинка (например, винкристин, винбластин, виндезин, винорелбин, навелбин, винфлунид, винтафолид); таксаны (например, паклитаксел, доцетаксел, паклитаксел полиглукмекс, кабазитаксел) и их аналоги, майтанзиноиды (например, DM1, DM2, DM3, DM4, майтанзин и ансамитоцины) и их аналоги, криптофицины (например, криптофицин 1 и криптофицин 8); эпитилоны, элеутеробин, дискодермолид, бриостатин, долостатины, ауристатины (например, монометилауристатин

Е, монометилауристатин F), тубулизины, цефалостатины; панкратистатин; саркодиктин; спонгистатин; демеколцин; эпиподофиллины (например, 9-аминокамптотецин, камптотецин, криснатол, дауномицин, этопозид, этопозид фосфат, иринотекан и их метаболиты, такие как SN-38, митоксантрон, новантрон, ретиноевые кислоты (ретинолы), тенипозид, топотекан, 9-нитрокамптотецин (RFS 2000)); митомицины (например, митомицин С);

(с) антиметаболиты, такие как ингибиторы ДГФР (например, метотрексат, триметрексат, деноптерин, птероптерин, аминоптерин (4-аминоптероиновая кислота) или другие аналоги фолиевой кислоты, такие как ралтитрексед, пеметрексед, пралатрексат); ингибиторы ИМФ-дегидрогеназы (например, микофеноловая кислота, тиазофуридин, рибавирин, EICAR); ингибиторы рибонуклеотидредуктазы (например, гидроксимочевина, дефероксамин); аналоги пиримидинов (например, цитарабин, фторурацил, 5-фторурацил и их метаболиты, тегафур, кармофур, гемцитабин, капецитабин, азациитидин, децитабин, комбинации фторурацила, комбинации тегафура, комбинации трифлуридина, цитозин-арабинозид, анци-табин, флоксуридин, доксифлуридин), аналоги урацила (например, 6-азауридин, дезоксиуридин); аналоги цитозина (например, эноцитабин); аналоги пуринов (например, имуран, флударабин, меркаптопуридин, тиамиприн, тиогуанин, кладрибин, клофарабин, неларабин); средство, восполняющее дефицит фолиевой кислоты, такое как фолиевая кислота;

(d) гормональные терапии, применяемые, в частности, при лечении неопластических заболеваний, такие как эстрогены, прогестогены, аналоги гонадотропин-рилизинг-гормона, антиэстрогены, антиандрогены, ингибиторы ароматазы;

(е) ингибиторы киназы, такие как BIBW 2992 (антитело против EGFR/Erb2), иматиниб, гефитиниб, пегаптаниб, сорафениб, дазатиниб, сунитиниб, эрлотиниб, нилотиниб, лапатиниб, акситиниб, пазопаниб, вандетаниб, афатиниб, вемурафениб, кризотиниб, регорафениб, маситиниб, дабрафениб, траметиниб, ибрутиниб, церитиниб, ленватиниб, нинтедониб, цедираниб, палбоциклиб, осимертиниб, алектиниб, роллетиниб, кобиметиниб, мидостаурин, олмутиниб, E7080 (антитело против VEGFR2), мубритиниб, понатиниб (AP24534), бафетиниб (INNO-406), босутиниб (SKI-606), кабозантиниб, висмодегид, инипариб, руксолитиниб, СУТ387, тивозаниб, испинесиб, темсиролимус, эверолимус, ридафоролимус;

(f) другие средства, такие как дуокармицин (в том числе синтетические аналоги: адозелезин, карзелезин, бизелезин, KW-2189 и CBI-TMI); димеры бензодиазепина (димеры пирролбензодиазепина или томаймицин, индолинобензодиазепины, имидазобензотиадизепины или оксазолинобензодиазепины); платиносодержащие соединения (например, карбоплатин, цисплатин, оксалиплатин, сатраплатин, полиплатиллен); азиридины, такие как бензодопа, метуредопа и уредопа; метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилтиофосфорамид и триметилломеламин; динемидин, эсперамицин, кедарцидин, мадуропептин, аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азазерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин; хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, нитомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромидин, пуромидин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностагин, зорубицин; поликетиды (например, ацетогенины); гемцитабин, эпоксомидины (например, карфилзомиб).

(ii) Иммуномодулирующие средства включают иммуностимуляторы, иммунодепрессанты, циклопорин, циклоспорин А, аминокaproновую кислоту, имуран, бромкриптин, хлорамбуцил, хлорохин, циклофосфамид, кортикостероиды (например, амцинонид, бетаметазон, будесонид, гидрокортизон, флунизолид, флутиказона пропионат, флуокортолон, даназол, дексаметазон, преднизон, триамцинолона ацетонид, беклометазона дипропионат), ДГЭА, гидроксихлорохин, мелоксикам, метотрексат, мофетил, микофенолат, сироллимус, такролимус, эверолимус, финголимод, ибрутиниб.

(iii) Средства для лечения инфекционных заболеваний включают антибактериальные средства, антимитотические средства, антимикобактериальные средства и противовирусные средства. Неограничивающим примером антибиотика, применяемого в конъюгате антитела-антибиотика, является рифалог, производное рафамицина.

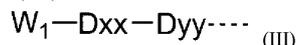
Лекарственные средства, применяемые в настоящем изобретении, также включают соответствующие радиоизотопы. Примерами радиоизотопов (радионуклидов) являются, например,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  или  $^{225}\text{Ac}$ . Меченные радиоизотопами лекарственные средства могут применяться в экспериментах направленной визуализации или в адресной терапии (Wu et al., Nat. Biotech. 2005, 23, 1137-1146).

Лекарственные средства, применяемые в настоящем изобретении, также включают соответствующие фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления каждый фрагмент, полученный из лекарственного средства, независимо получен из лекарственного средства, выбранного из дуокармицина, ауристатина (аналога ауристатина), майтанзина, тубулизина, калихеамицина, камптотецина, SN-38, таксола, дауномицина, винбластина, доксорубицина, метотрексата, пирролобензодиазепина или радиоизотопов и/или их фармацевтически приемлемых солей; предпочтительно получен из лекарственного сред-

ства, выбранного из ауристатина, майтанзина, камптотецина, доксорубицина, пирролобензодиазепина или радиоизотопов и/или их фармацевтически приемлемых солей. В одном варианте осуществления лекарственное средство не является аналогом ауристатина.

Согласно одному варианту осуществления каждый фрагмент  $D_1$  в формулах (Ia), (Ia') и (Ib) независимо представлен следующей формулой (III):



$W_1$  представляет собой фрагмент, полученный из лекарственного средства, отличающегося от нативного лекарственного средства только ковалентным присоединением к  $D_{xx}$  (как показано выше). В одном варианте осуществления  $W_1$  представляет собой фрагмент, полученный из дуокармицина, ауристатина, майтанзина, тубулизина, калихеамицина, камптотецина, SN-38, таксола, дауномицина, винбластина, доксорубицина, метотрексата, пирролбензодиазепина, или радиоизотопов и/или их фармацевтически приемлемых солей; предпочтительно фрагмент, полученный из ауристатина, майтанзина, камптотецина, доксорубицина, пирролбензодиазепина или радиоизотопов и/или их фармацевтически приемлемых солей.

Согласно одному варианту осуществления,  $W_1$  представляет собой фрагмент, полученный из ауристатина, предпочтительно фрагмент, полученный из ауристатина F (AF), ауристатина E (AE), ауристатина Cit (ACit), метиллауристатина F (MMAF), метиллауристатина Cit (MMACit) или метиллауристатина E (MMAE), более предпочтительно фрагмент, полученный из AF или MMAF, или представляет собой фрагмент, полученный из майтанзина, такого как мертанзин (также известный как DM1) или раванзин (также известный как DM4). В некоторых случаях  $W_1$  не является аналогом ауристатина. В других вариантах осуществления  $W_1$  не является ауристатином Asp (AAsp), ауристатином Glu (AGlu), ауристатином фосфо-Thr (AphThr) или ауристатином Thr (AThr).

$D_{xx}$  представляет собой одинарную ковалентную связь или аминокислоту, имеющую гидрофобную боковую цепь, предпочтительно аминокислоту, выбранную из Phe, Val, Tyr и Ala. Согласно одному варианту осуществления,  $D_{xx}$  представляет собой комбинацию аминокислоты, имеющей гидрофобную боковую цепь, как определено выше, и двухвалентного фрагмента, выбранного из малеимидов, триазолов, гидразинов, карбонилсодержащих групп и их производных, который присоединен (N-концом аминокислоты с гидрофобной боковой цепью) к фрагменту  $W_1$  через двухвалентный фрагмент, выбранный из малеимидов, триазолов, гидразинов, карбонилсодержащих групп и их производных. Предпочтительно  $D_{xx}$  является фрагментом, состоящим из аминокислоты, имеющей гидрофобную боковую цепь, как определено выше, и производного двухвалентного малеимида или триазола, где присоединение к фрагменту  $W_1$  осуществляется через производное двухвалентного малеимида или триазола.

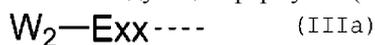
$D_{yy}$  представляет собой одинарную ковалентную связь или аминокислоту, имеющую основную боковую цепь, предпочтительно аминокислоту, выбранную из Arg, Lys, Phe, Cit, Orn, Dap и Dab, более предпочтительно Arg или Cit.

Пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к N-концу  $A_{xx}$  в формуле (I), N-концу  $A_{yy}$  в формуле (I'), N-концу  $A'_{xx}$  в формулах (Ia) и (Ib) или N-концу  $A'_{yy}$  в формуле (Ia').

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления,  $W_1$  представляет собой фрагмент, полученный из ауристатина, предпочтительно AF,  $D_{xx}$  представляет собой одинарную ковалентную связь, и  $D_{yy}$  представляет собой аминокислоту, выбранную из Arg, Lys, Phe, Cit, Orn, Dap и Dab, предпочтительно Arg или Cit.

Согласно одному другому предпочтительному варианту осуществления,  $W_1$  представляет собой фрагмент, полученный из майтанзина, предпочтительно DM1;  $D_{yy}$  является Arg, Lys или Cit, предпочтительно Cit или Lys;  $D_{xx}$  является аминокислотой, имеющей гидрофобную боковую цепь, например, Phe, который присоединен к майтанзину через производное двухвалентного малеимида.

Согласно одному другому варианту осуществления, каждый фрагмент  $D_2$  и  $D$  в формулах (Ia), (Ia'), (Ib), (II), (II') и (IIa) независимо представлен следующей формулой (IIIa):



$W_2$  представляет собой фрагмент, полученный из дуокармицина, ауристатина, майтанзина, тубулизина, калихеамицина, камптотецина, SN-38, таксола, дауномицина, винбластина, доксорубицина, метотрексата, пирролбензодиазепина или радиоизотопов и/или их фармацевтически приемлемых солей.

$E_{xx}$  представляет собой одинарную ковалентную связь или двухвалентный фрагмент, выбранный из малеимидов, триазолов, гидразинов, карбонилсодержащих групп, аминокислот, дипептидных фрагментов и их производных, предпочтительно производного двухвалентного малеимида или триазола, более предпочтительно производного малеимида.

Пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к боковой цепи  $A'_{xx}$  в формулах (Ia) и (Ia'), боковой цепи  $A'_{xx}$  или C-концу  $C_{xx}$ , если таковой присутствует, в формуле (Ib), боковой цепи  $V_{xx}$  в формулах (II) и (II'), боковой цепи  $V_{xx}$  или C-концу  $C_{xx}$ , если таковой присутствует, в формуле (IIa).

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления,  $W_2$  представляет собой фрагмент, полученный из ауристатина (например, AF) или майтанзина (например, DM1). Если  $W_2$  является фраг-

ментом, полученным из ауристатиона (например, AF), присоединение может осуществляться через C-концевую карбоксильную группу лекарственного средства и  $\omega$ -аминогруппу в Vxx (формулы (II) и (II')) или A'xx (формулы (Ia), (Ia') и (Ib)). Если W<sub>2</sub> является фрагментом, полученным из майтанзина (например, DM1), присоединение к  $\omega$ -аминогруппе в Vxx или A'xx предпочтительно осуществляется через производное двухвалентного малеимида.

#### 6. Векторная группа.

V в формулах (I), (I'), (Ia<sub>1</sub>), (Ia<sub>2</sub>), (Ia<sub>3</sub>), (II), (II') и (IIa) представляет собой фрагмент, полученный из векторной группы, способной к взаимодействию с клеткой-мишенью. Выражение "способный к взаимодействию с клеткой-мишенью" при использовании в настоящем документе указывает, что векторная группа может связываться, образовывать комплекс или реагировать с фрагментом, например, антигеном или рецептором, на поверхности клетки-мишени. Такое взаимодействие с клеткой-мишенью может быть экспериментально проверено способами, известными в уровне техники, например, путем получения соединения формулы (I), несущего метку (такую как флуоресцентный маркер), контакта указанного соединения с тканью, содержащей клетки-мишени, и обнаружения распределения флуоресцентного маркера в ткани (например, с помощью флуоресцентной микроскопии). Увеличение интенсивности флуоресценции в клетках-мишенях указывает на взаимодействие с клеткой-мишенью в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления векторная группа также способна вызывать или способствовать интернализации направленного конъюгата лекарственного средства (т.е. соединения формулы (I) или формулы (II)) в клетку-мишень.

Согласно одному варианту осуществления, V представляет собой фрагмент, полученный из векторной группы, выбранной из антител, фрагментов антитела, белков, пептидов и непептидных молекул.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления, V представляет собой фрагмент, полученный из антитела или фрагмента антитела, такого как одноцепочечное антитело, моноклональное антитело, одноцепочечное моноклональное антитело, фрагмент моноклонального антитела, химерное антитело, фрагмент химерного антитела, доменное антитело или его фрагмент, цитокин, гормон, фактор роста, колониестимулирующий фактор, нейромедиатор или молекула-переносчик питательных веществ.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления, V представляет собой фрагмент, полученный из пептида, способного к взаимодействию с представляющей интерес мишенью. Неограничивающие примеры пептидов включают соматостатин или его аналоги, такие как октреотид, Angioper-2, гастрин-рилизинг пептид, полученный из трансферрина пептид, производное Нейропептида Y, пептиды RGD, пептидные аналоги альфа-меланоцит-стимулирующего гормона, вазоактивный интестинальный пептид, нейротензин и аналоги гонадолиберина (ГнРГ).

Согласно еще одному предпочтительному варианту осуществления, V представляет собой фрагмент, полученный из непептидной молекулы, такой как фолиевая кислота, гиалуроновая кислота, антагонист рецептора Нейротензина 1 (NRT1), такой как производные SR 142948A и лиганд простатического специфического мембранного антигена (PSMA), такой как PSMA-617 и PSMA-11.

Согласно одному варианту осуществления клетка-мишень выбрана из опухолевых клеток, инфицированных вирусом клеток, инфицированных микроорганизмом клеток, инфицированных паразитом клеток, клеток, вовлеченных в аутоиммунные заболевания, активированных клеток, миелоидных клеток, лимфоидных клеток, меланоцитов и инфекционных агентов, в том числе бактерий, вирусов, микобактерий, грибов.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления, клетка-мишень является любой опухолевой клеткой из солидной или гемобластной опухоли, включающей, без ограничения, клетки лимфомы, клетки миеломы, клетки рака почки, клетки рака молочной железы, клетки рака предстательной железы, клетки рака яичника, клетки рака толстой и прямой кишки, клетки рака желудка, клетки плоскоклеточного рака, клетки мелкоклеточного рака легкого, клетки рака яичка или любые клетки, которые растут и делятся с нерегулируемой и повышенной скоростью, вызывая развитие злокачественных опухолей.

#### 7. Фармацевтические композиции.

Соединения настоящего изобретения могут быть предоставлены в форме фармацевтических композиций для применения у человека или животного в медицине или ветеринарии. Такие композиции, как правило, включают терапевтически эффективное количество LDC согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли и один или более компонентов, выбранных из носителя, разбавителя и других вспомогательных веществ.

Подходящие носители, разбавители и другие вспомогательные вещества для применения в фармацевтических композициях известны в уровне техники и, например, описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (Gennaro AR, 1985). Носитель, разбавитель и/или другое вспомогательное вещество могут быть выбраны в соответствии с предполагаемым путем введения и фармацевтической практикой. Фармацевтические композиции могут включать в качестве носителя, разбавителей и/или других вспомогательных веществ, или в дополнение к ним, любое подходящее связующее вещество(а), смазывающее вещество(а), суспендирующее вещество(а), вещество(а) для получения покрытия, солибили-

зирующее вещество(а).

Терапевтически эффективное количество может определять врач на стандартной основе. Конкретная величина дозы и частота введения для любого конкретного субъекта/пациента может изменяться и зависит от множества факторов, включающих активность конкретного применяемого лекарственного соединения, метаболическую стабильность и длительность действия этого соединения, возраст пациента, массу тела, общее состояние здоровья, пол, диету, способ и время введения, скорость выведения, комбинацию лекарственных средств, тяжесть конкретного состояния и пациента, проходящего терапию. Эти факторы учитываются врачом при определении терапевтически эффективной дозы.

8. Применение LDC или их композиций в способах предотвращения или лечения заболеваний.

Соединения настоящего изобретения, включающие соединение формулы (I)/(I') или соединение формулы (II)/(II'), могут применяться для лечения заболевания. Лечение может быть терапевтическим и/или профилактическим лечением, с целью предупреждения, уменьшения или остановки нежелательного физиологического изменения или нарушения. В некоторых аспектах лечение может продлевать выживаемость субъекта по сравнению с ожидаемой выживаемостью без получения лечения.

Заболевание, подвергаемое лечению LDC, может быть любым заболеванием, при котором такое лечение эффективно, включая хронические и острые нарушения или заболевания, а также патологические состояния, которые предрасполагают к нарушению. В некоторых аспектах заболевание является неопластическим заболеванием, таким как рак, которое можно лечить путем адресного уничтожения опухолевых клеток. Неограничивающие примеры онкологических заболеваний, которые можно лечить, включают доброкачественные и злокачественные опухоли, солидные или гемобластные; лейкоз и лимфоидные злокачественные опухоли, а также рак молочной железы, яичников, желудка, эндометрия, слюнной железы, легкого, почек, толстой кишки, щитовидной железы, поджелудочной железы, предстательной железы или мочевого пузыря. Заболевание может быть нейрональным, глиальным, астроцитальным, гипоталамическим или другим glandулярным, макрофагальным, эпителиальным, стромальным и бластоцельным заболеванием; или воспалительным, ангиогенным или иммунологическим заболеванием. Примером заболевания является солидная злокачественная опухоль.

Согласно одному варианту осуществления соединение настоящего изобретения или его композиция применяется в способе лечения или предотвращения рака, аутоиммунного заболевания и/или инфекционного заболевания, например, путем введения терапевтически эффективного количества соединения согласно настоящему изобретению или его композиции нуждающемуся в этом пациенту.

Молекулу могут вводить субъекту (например, пациенту) однократно или на протяжении курса лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания, приблизительно от 0,1 мкг/кг до 1 мг/кг лекарственного средства может использоваться в качестве начальной кандидатной дозы для первого введения в первом исследовании с участием человека, например, путем одного или более отдельных введений или путем непрерывной инфузии. Типичная суточная доза может изменяться в пределах от приблизительно 0,1 мг/кг до 50 мг/кг или больше или от приблизительно 0,5 до приблизительно 25 мг/кг веса пациента.

При лечении рака наблюдаемый терапевтический эффект может быть уменьшением количества раковых клеток; уменьшением размера опухоли; ингибированием или замедлением инфильтрации раковых клеток в периферические органы; задержкой роста опухоли; и/или облегчением одного или более симптомов, связанных с раком.

Пути введения (доставки) включают один или более из перорального (например, таблетка, капсула, раствор для приема внутрь), наружного, мукозального (например, назальный спрей, аэрозоль для ингаляции), назального, парентерального (например, форма для инъекций), желудочно-кишечного, интраспинального, внутривентриального, внутримышечного, внутривенного, внутриматочного, внутриглазного, кожного, внутричерепного, эндотрахеального, интравагинального, интрацеребровентрикулярного, внутричерепного, подкожного, глазного (включая интравитреальное или интракамеральное), трансдермального, ректального, трансбуккального, вагинального, эпидурального, подъязычного пути. Согласно предпочтительному варианту осуществления соединения настоящего изобретения вводят путем инъекции, например, парентерально, внутривенно, подкожно, внутримышечно, трансдермально.

Согласно еще одному варианту осуществления соединения настоящего изобретения применяют в способе лечения или предотвращения рака, аутоиммунного заболевания и/или инфекционного заболевания и вводят одновременно с одним или более другими терапевтическими средствами, такими как химиотерапевтические средства, лучевая терапия, иммунотерапевтические средства, средства для лечения аутоиммунных нарушений, средства для лечения инфекционных заболеваний или одно или более других соединений формулы (I)/(I') и/или (II)/(II'), и/или (IIIa). Также другое терапевтическое средство можно вводить до или после соединения настоящего изобретения.

9. Применение меченых LDC в диагностических и/или терапевтических целях.

В соединении (LDC) согласно настоящему изобретению, Z может быть метящим средством, таким как производное кумарина и т.п. Метящие средства включают фрагменты, полученные из флуоресцентных или люминесцентных соединений, электрон-транспортных соединений или других метящих средств, известных в уровне техники. Соединение согласно настоящему изобретению может расщепляться экзопептидазной активностью Cat B на своем C-конце с высвобождением метящего средства, например, флу-

оресцентного производного аминкумарина (АМС), в клетке-мишени (фиг. 10).

Меченые LDC согласно настоящему изобретению могут применяться в диагностических целях *in vitro*, например, для контроля высвобождения лекарственного средства в клетке-мишени, для иммунологических исследований или для иммуногистологии, а также для диагностических и/или терапевтических применений *in vivo*. Например, меченые LDC могут применяться в качестве вспомогательных средств в терапевтических применениях, таких как (онкологическая) хирургия, например, в качестве флуоресцентных зондов, функционирующих в режиме реального времени, для хирургии с визуализационным контролем.

Введение меченого соединения согласно настоящему изобретению для диагностических и/или терапевтических применений *in vivo* (например, хирургии) будет осуществляться методами, аналогичными для немеченых соединений. Такие режимы введения уже были описаны выше, а также могут быть найдены в литературе, поэтому они будут известны специалисту.

10. Получение соединений согласно изобретению.

Далее предложены способы получения линкеров, лекарственных средств-линкеров и конъюгатов лиганда-лекарственного средства. Соединения согласно настоящему изобретению могут быть синтезированы при использовании стандартного твердофазного пептидного синтеза (SPPS) на основе Fmoc-метода, включающего синтез пептида на смоле и конвергентные стратегии. Введение различных малеимидо-производных и последующее хемоселективное связывание с фрагментами, полученными из векторной группы, также представлено ниже. Общие стратегии и методики, которые могут использоваться при получении соединений согласно настоящему изобретению, хорошо известны специалисту и проиллюстрированы на фиг. 11-28 и 36-49.

11. Примеры.

11.1 Список сокращений, использованных в примерах:

Ac: ацетил;

AF: Ауристатин Phe или Ауристатин F;

ACit: Ауристатин Cit;

Cit: цитруллин;

CPT: Камптотецин;

Dab: Диминомасляная кислота;

Dap: Диаминопропионовая кислота;

DXM: Дихлорметан;

DIEA: Диизопропилэтиламин;

DM1: N<sub>2</sub>'-Деацетил-N<sub>2</sub>'-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанзин (Мертанзин);

DM1-smcc: N<sub>2</sub>'-Деацетил-N<sub>2</sub>'-[3-[[1-[[4-[[2,5-диоксо-1-пирролидинил]окси]карбонил]циклогексил]метил]-2,5-диоксо-3-пирролидинил]тио]-1-оксопропил]-майтанзин (CAS: 1228105-51-8);

DMAP: Диметиламинопиридин;

DMFA: Диметилформамид;

DMCO: Диметилсульфоксид;

DPBS=Фосфатно-солевой буфер Дульбекко (D8537, Sigma);

DTT: Дитиотреитол;

экв.: эквивалент;

NATU: Гексафторфосфат 1-[бис(диметиламино)метил]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиний-3-оксида;

NBTU: Гексафторфосфат 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиния;

FA: Муравьиная кислота;

Mai: 3-Малеимидопропионил;

Ma: 2-Малеимидоацетил;

Mal-NHS: Малеимидо-N-гидроксиянтарная кислота;

MC: Малеимидокапроил;

Msc: 4-(N-Малеимидометил)циклогексан-1-карбоксил;

MES: 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота;

MS: Масс-спектрометрия;

MMAF: Монометилауристатин F;

Mtt: Метилтритил;

MM: Молекулярная масса;

NHS: Сложный эфир N-гидроксисукцинимиды;

PABC: Пара-аминобензилоксикарбонил;

Pbf: 2,2,4,6,7-Пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил;

ПЭГ<sub>4</sub>: Тетраэтиленгликоль;

PNP: п-Нитрофенил;

SAR: Саркозин;

SPPS: Твердофазный синтез пептидов;

SQD: Одиночный квадрупольный детектор;

ТФУ: Трифторуксусная кислота;  
 TIS: Триизопропилсилан;  
 Trt: Тритил;  
 TQ: Тройной квадрупольный;  
 СВЭЖХ: Сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография;  
 об./об.: объем/объем.

#### 11.2 Исходные материалы и химические соединения.

Основные исходные материалы и химические соединения, используемые в следующих примерах, перечислены ниже:

смолы и защищенные аминокислоты для твердофазного пептидного синтеза производства Bachem или Novabiochem (Switzerland), если не указано иное;

малеимидопропионовая кислота, 4-нитрофенилхлорформат, ТФУ, TIS и DIEA производства Sigma-Aldrich (Switzerland); HBTU производства Merck (Switzerland) и HATU производства Combi-Blocks (Switzerland);

производные ПЭГ (Fmoc-NH-ПЭГ<sub>4</sub>-COOH, Fmoc-NH-ПЭГ<sub>3</sub>COOH и Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-NHS) производства Iris Biotech GmbH (Germany);

AF (Ауристин F) производства Levena Biopharma (USA);

ACit (Ауристин Cit) производства Bachem (Switzerland);

DM1 (Мертанзин) производства Active Biochem (Germany);

DM1-smcc производства eNovation Chemicals

CPT (камптотецин) и Mal-NHS производства Fluorochem (United Kingdom);

Ma-NHS (AMAS) производства AstaTech (USA);

H-Sar-OCPT производства Almac (United Kingdom);

герцептин (Трастузумаб) производства Roche Pharma (Schweiz) AG;

Колонка Sephadex® PD 10 производства GE-Healthcare (17-0851-01);

Центрифужное фильтрующее устройство Amicon Ultra-4 с мембраной Ultracel-30;

Буфер PBS по Дульбекко производства Sigma (D8537);

Рекомбинантный человеческий катепсин В в форме предшественника производства R & D Systems (Bio-Techne AG, product cat#. 953-CY-010);

Cys-MC-Val-Cit-PABC-MMAF производства IBIOsource (USA, номер по кат. S10001);

Монометилауристин F (MMAF) производства MedKoo (USA, номер по кат. 407222);

Смешанная плазма К2 ЭДТА человека и CD-1 мыши, смешанного пола, производства Seralab (в настоящее время BioIVT) (United Kingdom);

Прокаина гидрохлорид производства Sigma-Aldrich (Switzerland, номер по кат. 46608).

Сэндвич-ИФА (Набор для ИФА EDI™ интактный MMAF ADC, номер KTR-783) производства Epi-tope Diagnostics Inc.

#### 11.3 Методы.

Следующие методы могут использоваться для оценки соединений согласно настоящему изобретению.

11.3.1 Расщепление, индуцированное рекомбинантным человеческим катепсином В CatB-индуцированное расщепление соединений настоящего изобретения оценивали с помощью анализа ферментного расщепления *in vitro* при использовании рекомбинантного человеческого катепсина В и анализа СВЭЖХ-МС/МС, как описано ниже.

Референсные соединения Cys-MC-Val-Cit-PABC-MMAF и MMAF использовали в качестве положительного контроля. Фермент восстанавливали в 25 мМ буфере MES, доведенном до pH 5,0 1М раствором NaOH, и затем активировали 20 нМ раствором DDT при комнатной температуре в течение по меньшей мере 15 мин.

Ферментный анализ *in vitro* проводили при 37°C с тестируемыми соединениями в концентрации 10 мкМ (2,5 мкМ, если тестируемое соединение является конъюгатом антитела-лекарственного средства) в присутствии активированного рекомбинантного человеческого фермента Катепсина В в количестве 2 мкг/мл в 25 мМ буфере MES, pH 5,0. Ферментную реакцию расщепления останавливали в каждом определенном моменте времени путем смешивания равного объема ацетонитрила+0,1% FA, содержащей внутренний стандарт (8 мкМ варфарина).

Анализ проводили с помощью системы СВЭЖХ Waters Acquity, сопряженной с тройным квадрупольным масс-спектрометром Waters Xevo TQ. СВЭЖХ проводили в зависимости от тестируемых соединений при использовании колонок VEN C8 1,7 мкм 100×2,1 мм или VEN C18 1,7 мкм 50×2,1 мм или HSS T3 1,7 мкм 50×2,1 мм, нагретых до 45°C или 50°C, оборудованных 2 мкм фильтрующими предколонками (поставляемых Waters), и системы растворителей A1 (H<sub>2</sub>O+0,1% FA) и B1 (ацетонитрил+0,1% FA) при скорости потока 0,6 мл/мин и градиента 10-95% B1 за 1,9 мин.

МС/МС проводили при использовании интерфейса электрораспылительной ионизации (ЭРИ) в режиме положительно заряженных ионов и регистрации специфических MRM-переходов для каждого тестируемого соединения.

### 11.3.2 Стабильность в плазме человека и мыши.

Стабильность конъюгатов лиганда-лекарственного средства согласно настоящему изобретению в плазме человека и мыши оценивали согласно тесту стабильности в плазме с помощью анализа СВЭЖХ-МС/МС, как описано ниже. Если тестируемое соединение являлось конъюгатом антитела-лекарственного средства, проводили дополнительные иммуноанализы.

Прокаин использовали в качестве положительного контроля стабильности в человеческой и мышинной плазме. Анализ стабильности в плазмы *in vitro* проводили при 37°C с концентрацией 1 мкМ тестируемого соединения (LDC) в плазме в течение 24 ч. Ферментную реакцию останавливали в каждой определенной точке времени путем смешивания 1 объема плазмы с 3 объемами ацетонитрила+0,1% FA, содержащего внутренний стандарт (0,65 мкМ варфарина). Затем каждый образец центрифугировали при 16000×g в течение 5 мин при 4°C. Супернатанты переносили во флаконы для инъекций.

Анализы выполняли при использовании системы СВЭЖХ Waters Acquity, сопряженной с тройным квадрупольным масс-спектрометром Waters Xevo TQ. СВЭЖХ в зависимости от тестируемых соединений проводили с колонками VEN C8 1,7 мкм 100×2,1 мм или VEN C18 1,7 мкм 50×2,1 мм или HSS T3 1,7 мкм 50×2,1 мм, нагретыми до 45°C или 50°C и снабженными 2 мкм фильтрующими предколонками (поставляемыми Waters), и системами растворителей A1 (H<sub>2</sub>O+0,1% FA) и B1 (ацетонитрил+0,1% FA) при скорости потока 0,6 мл/мин и в градиенте 10-95% B1 за 1,9 мин.

МС/МС проводили при использовании интерфейса электрораспылительной ионизации (ЭРИ) в режиме положительно заряженных ионов и регистрации специфических MRM-переходов для каждого тестируемого соединения.

Целостность конъюгата антитела-лекарственного средства контролировали с помощью иммуноанализа. Например, в случае ADC1 (более подробно описанного ниже) концентрацию интактного ADC определяли количественно с помощью сэндвич-ИФА (набора для ИФА EDI™ интактного MMAF ADC, KTR-783) в соответствии с инструкцией производителя. Кратко, аликвоты собирали в разные точки времени в ходе эксперимента по определению стабильности в плазме, описанного выше. Все образцы разводили 1:800 до иммунодетектирования. Трастузумаб и AF-Arg включали в качестве отрицательных контролей (данные не показаны). Стандартные образцы и образцы для контроля качества (низкая, средняя, высокая) с добавкой известных концентраций ADC1 использовали для количественного определения неизвестных образцов и валидации опыта, соответственно.

### 11.3.3 Анализ аффинности связывания.

Аффинность связывания конъюгатов антитела-лекарственного средства согласно настоящему изобретению оценивали следующим образом.

В случае ADC1 (более подробно описанного ниже), клетки SK-BR-3 (ErbB2-экспрессирующие) и MD-MB-231 (ErbB2-отрицательные) инкубировали либо с трастузумабом, либо с ADC1. Для клеток SK-BR-3 концентрация обоих соединений изменялась в пределах от 3 мкг/мл до  $3 \times 10^{-4}$  мкг/мл (разведения 1/10). Для клеток MDA-MB-231 использовали только концентрацию 3 мкг/мл для обоих соединений. Затем клетки инкубировали с вторичным антителом козы против иммуноглобулина человека, конъюгированным с Alexa 488 (BioLegend) и окрашивали живые/мертвые клетки, после чего проводили анализ на приборе BD LSRII. Планки погрешности: SD (n=2). Необработанные данные анализировали в FlowJo (FlowJo).

В случае ADC3 (более подробно описанного ниже) клетки BT-474 (ErbB2-экспрессирующие) и MDA-MB-231 (ErbB2-отрицательные) инкубировали либо с ADC3, либо с трастузумабом. Для клеток BT-474 концентрация всех соединений изменялась в пределах от 3 мкг/мл до  $3 \times 10^{-6}$  мкг/мл (разведения 1/10). Для клеток MDA-MB-231 использовали только концентрацию 3 мкг/мл для всех соединений. Затем клетки инкубировали с вторичным крысиным антителом против IgG человека, конъюгированным с Alexa 488 (BioLegend), и окрашивали живые/мертвые клетки, после чего проводили анализ на проточном цитометре Attune Nxt. Планки погрешности: SD (n=2).

Необработанные данные анализировали в FlowJo (FlowJo).

### 11.3.4 Цитотоксическая активность.

Культуры в лог-фазе роста линий клеток SK-OV-3 (ErbB2-экспрессирующих), SK-BR-3 (ErbB2-экспрессирующих), BT-474 (ErbB2-экспрессирующих) и MDA-MB-231 (ErbB2-отрицательных) собирали и сеяли клетки при плотности от 1500 до 12000 клеток/лунка в 96-луночные микротитровальные планшеты в соответствии с предварительно определенными условиями. После инкубирования в течение ночи (при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> или 0% CO<sub>2</sub> для клеток MDA-MB-231), чтобы обеспечить клеточную адгезию и восстановление поверхностного белка, добавляли серийные разведения тестируемых соединений (конечная концентрация DMCO 0,1% для AF, AF-Arg и DM1; 5% воды для инъекций для трастузумаба; 5% PBS для ADC1 и ADC3) и инкубировали культуры еще в течение 72, 96 или 120 ч.

Оценку роста клеток проводили с помощью анализа восстановления красителя Alamar Blue (поставляемого Thermo Fisher Scientific). Alamar Blue добавляли к клеткам до 10% объема культуры. Клетки инкубировали в течение 4-6 ч и измеряли восстановление красителя по флуоресценции на анализаторе планшетов EnSpire (Perkin Elmer). Измерения флуоресценции с вычитанием фона преобразовали по %

шкале с учетом значения растворителя как 100% активность (относительные измерения). Затем относительные измерения анализировали с использованием программы GraphPad Prism с получением относительных значений IC<sub>50</sub>. Все эксперименты проводили дважды с 3 повторностями на каждую концентрацию. Планки погрешности: SEM (n=3).

Цитотоксичность AF и AF-Arg в отношении ErbB2-экспрессирующих клеток SK-OV-3 и SK-BR-3 после 72 и 120 ч обработки. Клетки SK-OV-3 и SK-BR-3 сеяли за день до обработки в полную культуральную среду. После периода покоя в течение ночи, клетки обрабатывали снижаемыми концентрациями тестируемых соединений в полной культуральной среде (AF: 10 мкМ-1 пМ; AF-Arg: 10 мкМ-1 пМ, логарифмическое разведение).

Цитотоксичность ADC1 и производных (трастузумаб, AF-Arg и Соединения 2) в отношении ErbB2-экспрессирующих клеток SK-OV-3 и SK-BR-3 и ErbB2-отрицательных клеток MDA-MB-231 после 96 ч обработки. Клетки SK-OV-3, SK-BR-3 и MDA-MB-231 сеяли за день до обработки в полную культуральную среду. После периода покоя в течение ночи, клетки обрабатывали снижаемыми концентрациями тестируемых соединений в полной культуральной среде (Соединение 2: 10 мкМ-1 пМ; AF-Arg: 10 мкМ-1 пМ; трастузумаб: 7,22 мкМ-0,72 пМ; ADC1: 0,4 мкМ-0,04 пМ, логарифмическое разведение).

Цитотоксичность ADC3 и производных (трастузумаб и DM1) в отношении ErbB2-экспрессирующих клеток BT-474 и ErbB2-отрицательных клеток MDA-MB-231 после 96 ч обработки. Клетки BT-474 и MDA-MB-231 сеяли за день до обработки в полную культуральную среду. После периода покоя в течение ночи, клетки обрабатывали снижаемыми концентрациями тестируемых соединений в полной культуральной среде (DM1: 10 мкМ-1 пМ; ADC3: 1 мкМ-0,1 пМ; трастузумаб: 7,215 мкМ-1 пМ, логарифмическое разведение).

#### 11.3.5 Отношение антитела-лекарственного средства.

Отношение антитела-лекарственного средства (DAR) измеряли с помощью ОФ-ЖХ с помощью системы СВЭЖХ Waters Acquity, оборудованной бинарным насосом, автодозатором, работающим при 25°C, термостатом колонки и диодно-матричным детектором (ДМД), работающим в диапазоне 190-500 нм. Для разделения разных цепей ADC (тяжелых и легких цепей), использовали колонку Thermo mAb pack RP (4 мкм 2,1×100 мм) (Thermo Fisher Scientific AG, Sunnyvale, CA, USA).

Образцы подготавливали путем добавления 5 мкл раствора 100 мМ дитиотреитола (DDT) к 45 мкл раствора ADC в концентрации 2,5 мг/мл в воде для разделения легких и тяжелых цепей, связанных дисульфидными мостиками. Затем смесь инкубировали в течение 1 ч при 30°C.

Градиентный режим применяли, как описано в следующей таблице (подвижная фаза А состояла из 0,1% трифторацетата (по объему) в воде и подвижная фаза В - из 0,1% трифторацетата (по объему) в ацетонитриле).

t (мин)	Поток (мл/мин)	% А	% В
0,0	0,6	73	27
13,0	0,6	60	40
13,1	0,6	73	27
16,0	0,6	73	27

Температура колонки составляла 90°C, вводимый объем составлял 5 мкл, и хроматограммы регистрировали при 280 нм. Затем вычисляли DAR с использованием AUC каждого пика.

Количественный анализ проводили с помощью УФ-спектрометрии с использованием анализатора микропланшетов BioTeck Synergy HT (BioTeck Instrument, Sursee, Switzerland) и микропланшетов Greiner Bio-one (Huberlab, Aesch, Switzerland).

Перед количественным анализом раствора проводили сравнение между спектром поглощения при 280 нм ADC до и после очистки (с и без свободного лекарственного средства/полезной нагрузки соответственно) для оценки, присутствует ли интерференция УФ-поглощения между мАт (например, трастузумабом) и лекарственным средством.

Поскольку УФ-поглощение лекарственного средства (например, DM1) в ADC влияет на мАт (например, трастузумаб), количественный анализ нужно проводить в соответствии со следующим уравнением, учитывая УФ-сигнал как мАт, так и лекарственного средства:

$$C^{mAt} = \left( \frac{A_{280} \times \varepsilon_{252}^{DM1} - A_{252} \times \varepsilon_{280}^{DM1}}{\varepsilon_{280}^{mAt} \times \varepsilon_{252}^{DM1} - \varepsilon_{252}^{mAt} \times \varepsilon_{280}^{DM1}} \right) / l$$

где

A<sub>x</sub> соответствует общему оптическому поглощению при длине волны x;

A<sub>x</sub><sup>Y</sup> соответствует УФ-поглощению при длине волны x для соединения y (мАт или лекарственного средства);

ε<sub>x</sub><sup>y</sup> соответствует коэффициенту молярной рефракции при длине волны x для соединения y;

l соответствует оптическому пути;

C<sup>mAt</sup> соответствует концентрации ADC/мАт в растворе.

Определение  $\varepsilon^{\text{MAt}}$  и  $\varepsilon^{\text{LC}}$ : две калибровочные кривые строили при 280 нм и 252 нм по 5 растворам тратузамаба (соответственно ЛС) с известными концентрациями. Затем  $s^{\text{MAt}}$  (соответственно  $\varepsilon^{\text{LC}}$ ) вычисляли по уравнению Ламберта-Бэра:  $\text{Abs}=\varepsilon \times l \times C$ .

Подготовка образца: раствор ADC (в воде) сначала центрифугировали в течение 5 мин при 21500 g. Затем раствор разбавляли соответствующим объемом воды, чтобы он соответствовал диапазону концентраций калибровочной кривой. Разбавленный раствор затем центрифугировали в течение 5 мин при 21500 g. Затем 200 мкл супернатанта наносили на UV-микропланшет для УФ-анализа.

Пример 1. Получение соединений формулы (I) или (I').

Соединения, описанные в настоящем документе, получали при использовании стандартного SPPS на основе Fmoc-метода, включающего связывание пептида на смоле и конвергентные стратегии, как показано на фиг. 11-17 и на фиг. 36-41. Соединения, полученные в примере 1, показаны в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Соединения формулы (I)/(I')

Соединение	Структура
1	AF-Arg-Lys(ПЭГ <sub>4</sub> -Mal-Cys-Ac)-Phe-OH
2	AF-Arg-Lys(ПЭГ <sub>4</sub> -Mal)-Phe-OH
3	AF-Arg-Phe-Lys(ПЭГ <sub>4</sub> -Mal-Cys-Ac)-OH
4	AF-Arg-Phe-Lys(ПЭГ <sub>4</sub> -Mal)-OH
5	DM1-Mal-Phe-Lys-Lys(ПЭГ <sub>4</sub> -Mal-Cys-Ac)-Phe-OH
6	DM1-Mal-Phe-Cit-Lys(ПЭГ <sub>4</sub> -Mal-Cys-Ac)-Phe-OH
7	DM1-Mal-Phe-Cit-Phe-Lys(ПЭГ <sub>4</sub> -Mal-Cys-Ac)-OH
19	AF-Cit-Lys(ПЭГ <sub>4</sub> -Mal-Cys-Ac)-Phe-OH
20	ACit-Lys(ПЭГ <sub>4</sub> -Mal-Cys-Ac)-Phe-OH
21	ACit-Phe-Lys(ПЭГ <sub>4</sub> -Mal-Cys-Ac)-OH
22	DM1-Mcc-Phe-Cit-Lys(ПЭГ <sub>5</sub> -Ma-Cys-Ac)-Tyr-OH
23	DM1-Mcc-Cit-Lys(ПЭГ <sub>5</sub> -Ma-Cys-Ac)-Tyr-OH
24	DM1-Mcc-Phe-Lys(ПЭГ <sub>5</sub> -Ma-Cys-Ac)-Tyr-OH

Пептиды получали с помощью стандартного SPPS на основе Fmoc при использовании автоматического синтезатора пептидов Activo P-11 (производства Activotec) и смолы Fmoc-Xxx-Wang (Xxx: C-концевая аминокислота; нанесение: 0,60 ммоль/г; Bachem), как показано на фиг. 11-17 и на фиг. 36-41.

Реакции сочетания для образования амидной связи проводили в течение 30 мин при комнатной температуре при использовании 3 экв. Fmoc-аминокислот, Fmoc-NH-ПЭГ<sub>4</sub>-COOH или Fmoc-NH-ПЭГ<sub>5</sub>-COOH, активированного FIBTU (2,9 экв.) в присутствии DIEA (7 экв.). Снятие Fmoc проводили раствором 20% пиперидина в ДМФА. Селективное удаление защитной группы Mtt боковой цепи (Lys) проводили с использованием ДХМ/ТФУ/TIS (94/1/5, об./об./об.).

Для синтеза соединений 1-4 и 19, Ауристатин F (AF) присоединяли после удаления Fmoc с конденсацией фрагмента (3 экв. AF, 2,9 экв. HBTU, 7 экв. DIEA) в течение 30 мин. Для синтеза соединений 20 и 21, Ауристатин Cit (ACit) присоединяли после удаления Fmoc при идентичных условиях (3 экв. ACit, 2,9 экв. FIBTU, 7 экв. DIEA).

Для синтеза соединений 1-4 и 19-21, производное Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-NHS добавляли на смолу в течение 30 мин (3 экв. Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-NHS, 7 экв. DIEA) после удаления Mtt смесью ДХМ/ТФУ/TIS (94/1/5, об./об./об.). Затем соединения 1, 3, 19, 20 и 21, остаток малеимида на цепи ПЭГ подвергали реакции на смоле с ацетилцистеином (Ac-Cys-OH) путем хемоселективного связывания (3 экв. Ac-Cys-OH, DIEA, 7 экв.) в течение 20 мин. Пептиды снимали со смолы с одновременным снятием защиты с боковой цепи при обработке ТФУ/TIS/водой (95/2,5/2,5, об./об./об.) в течение 60 мин. После концентрирования смеси после снятия со смолы, неочищенные пептиды осаждали холодным диэтиловым эфиром и центрифугировали (фиг. 11-14 и фиг. 36-38).

Для синтеза соединений 5-7, производное Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-NHS добавляли на смолу в течение 30 мин (3 экв. Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-NHS, 7 экв. DIEA) после удаления Mtt смесью ДХМ/ТФУ/TIS (94/1/5, об./об./об.). Затем остаток малеимида на цепи ПЭГ подвергали реакции на смоле с ацетилцистеином (Ac-Cys-OH) путем хемоселективного связывания между малеимид и тиолом (3 экв. Ac-Cys-OH, DIEA, 7 экв.) в течение 20 мин. Mal-производное вводили путем добавления фрагментов Mal-NHS на N-конец Phe после снятия Fmoc защиты. Пептиды снимали со смолы с одновременным снятием защиты с боковой цепи при обработке ТФУ/TIS/водой (95/2,5/2,5, об./об./об.) в течение 60 мин. После концентрирования смеси после снятия со смолы, неочищенные пептиды осаждали холодным диэтиловым эфиром и центрифугировали. Затем Мертанзин (DM1, 1,45 экв.) подвергали реакции с концевой малеимидной группой путем хемоселективного связывания в буфере PBS при pH 7,4 и ацетонитриле (отношение 2:1) (фиг. 15-17).

Для синтеза соединений 22-24, производное Ma-NHS добавляли на смолу в течение 30 мин (3 экв. Mal-NHS, 7 экв. DIEA) после удаления Fmoc. Затем остаток малеимида подвергали реакции на смоле с

ацетилцистеином (Ac-Cys-OH) путем хемоселективного связывания (3 экв. Ac-Cys-OH, DIEA, 7 экв.) в течение 20 мин. Пептиды снимали со смолы с одновременным снятием защиты с боковой цепи при обработке TФУ/TIS/водой (95/2,5/2,5, об./об./об.) в течение 60 мин. После концентрирования смеси после снятия со смолы, неочищенные пептиды осаждали холодным диэтиловым эфиром и центрифугировали. После их очистки производное DM1-smcc (1.1 экв.) подвергали реакции с N-концом линкера в растворе в ДМФА и 4-метилморфолине (6 экв.) в течение 4 ч (фиг. 39-41).

Пептиды очищали на системе ВЭЖХ Waters Autopurification, сопряженной с масс-спектрометром SQD с колонкой XSelect Peptide CSH C18 OBD Prep (130 Å, 5 мкм, 19 мм×150 мм) при использовании системы растворителей А (0,1% ТФУ в воде) и В (0,1% ТФУ в ацетонитриле) при скорости потока 24 мл/мин и в градиенте 20-60% В в течение 30 мин.

Нужные фракции концентрировали и лиофилизировали. Чистоту определяли на системе СВЭЖХ Waters Acquity, сопряженной с масс-спектрометром SQD с колонкой CSH C18 (130 Å, 1,7 мкм, 2,1 мм×50 мм) при использовании системы растворителей А (0,1% FA в воде) и В (0,1% FA в ацетонитриле) при скорости потока 0,6 мл/мин и в градиенте 5-85% В в течение 5 мин или колонки CSH Floro-phenyl (130 Å, 1,7 мкм, 2,1 мм×50 мм) при использовании системы растворителей А (0,1% FA в воде) и В (0,1% FA в ацетонитриле) при скорости потока 0,9 мл/мин и в градиенте В 5-95% в течение 2,9 мин.

МС-анализ проводили при использовании интерфейса электрораспылительной ионизации (ЭРИ) в режиме положительно и отрицательно заряженных ионов. Результаты анализа соединений, полученных в примере 1, показаны в табл. 2 ниже.

Таблица 2

Анализ соединений 1-7 и 19-24

Соединение	Формула	Чистота (%)	ММ	[M+2H <sup>+</sup> ] <sup>+2</sup>	[M+3H <sup>+</sup> ] <sup>+3</sup>
1	C <sub>86</sub> H <sub>139</sub> N <sub>15</sub> O <sub>23</sub> S	94	1783,2	892,8	595,6
2	C <sub>79</sub> H <sub>126</sub> N <sub>14</sub> O <sub>19</sub>	96	1575,9	789,0	526,7
3	C <sub>84</sub> H <sub>135</sub> N <sub>15</sub> O <sub>22</sub> S	90	1739,1	870,8	581,0
4	C <sub>79</sub> H <sub>126</sub> N <sub>14</sub> O <sub>19</sub>	98	1575,9	789,3	526,7
5	C <sub>95</sub> H <sub>132</sub> ClN <sub>13</sub> O <sub>29</sub> S <sub>2</sub>	98	2019,7	1011,5	674,5
6	C <sub>95</sub> H <sub>131</sub> ClN <sub>14</sub> O <sub>30</sub> S <sub>2</sub>	97	2048,7	1025,6	683,8
7	C <sub>95</sub> H <sub>131</sub> ClN <sub>14</sub> O <sub>30</sub> S <sub>2</sub>	94	2048,7	1026,1	685,0
19	C <sub>84</sub> H <sub>135</sub> N <sub>15</sub> O <sub>22</sub> S	90	1739,2	871,9	581,6
20	C <sub>75</sub> H <sub>125</sub> N <sub>13</sub> O <sub>22</sub> S	96	1592,9	798,3	532,2
21	C <sub>75</sub> H <sub>125</sub> N <sub>13</sub> O <sub>22</sub> S	96	1592,9	798,4	532,1
22	C <sub>101</sub> H <sub>141</sub> ClN <sub>14</sub> O <sub>32</sub> S <sub>2</sub>	99	2162,9	1082,2	721,9
23	C <sub>92</sub> H <sub>132</sub> ClN <sub>13</sub> O <sub>31</sub> S <sub>2</sub>	89	2015,7	1008,7	673,0
24	C <sub>95</sub> H <sub>130</sub> ClN <sub>11</sub> O <sub>30</sub> S <sub>2</sub>	89	2005,7	-	669,0

Пример 2. Получение соединений формулы (II) или (II').

Соединения, описанные в настоящем документе, получали с помощью стандартного метода SPPS на основе Fmoc, включающего связывание пептида на смоле и конвергентные стратегии, как показано на фиг. 18-26 и на фиг. 42-45. Соединения, полученные в примере 2, показаны в табл. 3 ниже.

Таблица 3

Соединения формулы (II)/(II')

Соединение	Структура
8	Arg-ПЭГ <sub>4</sub> -Phe-Arg-Glu(Sar-OCPT)-Phe-OH
9	Arg-ПЭГ <sub>4</sub> -Phe-Arg-Dap(CO-CPT)-Phe-OH
10	Arg-ПЭГ <sub>4</sub> -Phe-Arg-Dab(CO-CPT)-Phe-OH
11	Arg-ПЭГ <sub>4</sub> -Phe-Arg-Ser(CO-CPT)-Phe-OH
12	Ac-Cys-Mal-ПЭГ <sub>4</sub> -Phe-Lys-Lys(Mal-DM1)-Phe-OH
13	Ac-Cys-Mal-ПЭГ <sub>4</sub> -Phe-Lys-Lys(AF)-Phe-OH

14	Mal-ПЭГ <sub>4</sub> -Phe-Lys-Lys(AF)-Phe-OH
15	Arg-ПЭГ <sub>4</sub> -Phe-Arg-Glu(Sar-OCPT)-Arg-OH
16	Arg-ПЭГ <sub>4</sub> -Phe-Arg-Glu(Sar-OCPT)-Arg-Phe-Arg-OH
25	Ac-Cys-Ma-ПЭГ <sub>5</sub> -Phe-Cit-Lys(Mcc-DM1)-Cit-OH
26	Ma-ПЭГ <sub>5</sub> -Phe-Cit-Lys(Mcc-DM1)-Cit-OH
27	Ac-Cys-Ma-ПЭГ <sub>5</sub> -Phe-Cit-Lys(Mcc-DM1)-Tyr-OH
28	Ac-Cys-Mal-ПЭГ <sub>4</sub> -Phe-Lys-Lys(Mal-DM1)-Phe-Phe-Lys-OH

Пептиды получали с помощью стандартного метода SPPS на основе Fmoc при использовании автоматического синтезатора пептидов Activo P-11 (производства Activotec) и смолы Fmoc-Xxx-Wang (Xxx: C-концевая аминокислота; нанесение: 0,60 ммоль/г; Bachem), как показано на фиг. 18-26 и на фиг. 42-45.

Реакции сочетания для образования амидной связи проводили в течение 30 мин при комнатной температуре с использованием 3 экв. Fmoc-аминокислот, Fmoc-NH-ПЭГ<sub>4</sub>-COOH или Fmoc-NH-ПЭГ<sub>5</sub>-COOH, активированного FIBTU (2,9 экв.) в присутствии DIEA (7 экв.). Снятие Fmoc защиты проводили раствором 20% пиперидина в ДМФА. Селективное удаление защитной группы Mtt боковой цепи (Lys) проводили при использовании ДХМ/ТФУ/TIS (94/1/5, об./об./об.).

Для синтеза соединения 8, 15 и 16, глутаминовую кислоту присоединяли в виде Fmoc-Glu(PhiPr)-OH и вводили N-концевой остаток Arg в виде Boc Arg(Pbf)-OH. Защитную группу боковой цепи PhiPr селективно удаляли в присутствии защитных групп боковой цепи Boc/Pbf при обработке 1% (об) ТФУ в ДХМ. Связывание H-Sar-OCPT на смоле проводили при использовании 1,5 экв. Sar-OCPT/1,4 экв. HATU/4 экв. DIEA в ДМФА в течение 90 мин (фиг. 18 и 25-26).

Для синтеза соединений 9 и 10, остатки Dap и Dab вводили в виде Fmoc-Dap(Mtt)-OH и Fmoc-Dab(Mtt)-OH, соответственно. Защитную группу боковой цепи Mtt селективно удаляли с использованием 1% (об) ТФУ в ДХМ. Образование карбаматной связи с CPT проводили при использовании 1,5 экв. CPT-PNP, полученного, как описано (Pessah et al., Bioorg & Med Chem, 2004, 12, 1-8) и 4 экв. DIEA в ДХМ в течение 30 мин (фиг. 19-20).

Для синтеза соединения 11, Ser вводили в виде Fmoc-Ser(Trt)-OH и селективно удаляли защитную группу Trt при использовании ДХМ/ТФУ/TIS (94/1/5, об./об./об.). Образование карбаматной связи с CPT проводили при использовании 1,5 экв. CPT-PNP и DMAP/DIEA (1 экв.) в ДХМ в течение 12 ч (фиг. 21).

Для синтеза соединения 12 и 28, производное Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-NHS добавляли на смолу в течение 30 мин (3 экв. Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-NHS, 7 экв. DIEA), после чего проводили снятие Fmoc защиты раствором 20% пиперидина в ДМФА. Затем остаток малеимида на цепи ПЭГ подвергали реакции на смоле с ацетилцистеином (Ac-Cys-OH) путем хемоселективного связывания между малеимидом и тиолом (3 экв. Ac-Cys-OH, DIEA, 7 экв.) в течение 20 мин. Затем Mal-производное вводили путем присоединения фрагмента Mal-NHS к ε-аминогруппе Lys после удаления Mtt смесью ДХМ/ТФУ/TIS (94/1/5, об./об./об.). Пептиды снимали со смолы с одновременным снятием защиты с боковой цепи при обработке ТФУ/TIS/водой (95/2,5/2,5, об./об./об.) в течение 60 мин. После концентрирования смеси после снятия со смолы, неочищенные пептиды осаждали холодным диэтиловым эфиром и центрифугировали. Затем Мертанзин (DM1, 1,45 экв.) подвергали реакции с концевой малеимидной группой путем хемоселективного связывания в PBS буфере при pH 7,4 и ацетонитриле (отношение 2:1) (фиг. 22 и 45).

Для синтеза соединений 13 и 14, AF присоединяли путем сочетания фрагмента (3 экв. AF, 2,9 экв. HBTU, 7 экв. DIEA) на смоле с N-концом остатка Lys после удаления Mtt смесью ДХМ/ТФУ/TIS (94/1/5, об./об./об.). Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-NHS добавляли на смолу в течение 30 мин (3 экв. Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-NHS, 7 экв. DIEA) после удаления Fmoc. Для соединения 13 остаток малеимида на цепи ПЭГ подвергали реакции на смоле с ацетилцистеином (Ac-Cys-OH) путем хемоселективного связывания между малеимидом и тиолом (3 экв. Ac-Cys-OH, DIEA, 7 экв.) в течение 20 мин (фиг. 23-24).

Для синтеза соединений 25-27, производное Ma-NHS добавляли на смолу в течение 30 мин (3 экв. MAL-NHS, 7 экв. DIEA), после чего проводили снятие Fmoc защиты раствором 20% пиперидина в ДМФА. Затем пептиды снимали со смолы с одновременным снятием защиты с боковой цепи при обработке ТФУ/TIS/водой (95/2,5/2,5, об./об./об.) в течение 60 мин. После концентрирования смеси после снятия со смолы, неочищенные пептиды осаждали холодным диэтиловым эфиром и центрифугировали. После их очистки производное DM1-стсс (1.1 экв.) подвергали реакции с N-концом линкера в растворе в ДМФА и 4-метилморфолине (6 экв.) в течение 4 ч. Для соединений 25 и 27 остаток малеимида подвергали реакции с ацетилцистеином (Ac-Cys-OH) (20 экв.) в ацетонитриле и DPBS (отношение 1:1) в течение 6 ч (фиг. 42-44).

Пептиды очищали и анализировали так же и с использованием того же оборудования, как описано в примере 1 выше. Результаты анализа соединений, полученных в примере 2, показаны в табл. 4 ниже.

Анализ соединений 8-16 и 25-28

Соединение	Формула	Чистота (%)	ММ	[M+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>	[M+2H <sup>+</sup> ] <sup>+2</sup>	[M+3H <sup>+</sup> ] <sup>+3</sup>
8	C <sub>71</sub> H <sub>95</sub> N <sub>15</sub> O <sub>18</sub>	94	1446,6	1447,9	724,2	483,7
9	C <sub>67</sub> H <sub>89</sub> N <sub>15</sub> O <sub>17</sub>	96	1376,6	-	689,2	459,8
10	C <sub>68</sub> H <sub>91</sub> N <sub>15</sub> O <sub>17</sub>	83	1390,5	1391,0	696,4	464,6
11	C <sub>67</sub> H <sub>88</sub> N <sub>14</sub> O <sub>18</sub>	90	1377,5	1378,2	689,8	460,3
12	C <sub>95</sub> H <sub>132</sub> ClN <sub>13</sub> O <sub>29</sub> S <sub>2</sub>	94	2019,7	-	1010,4	674,3
13	C <sub>93</sub> H <sub>144</sub> N <sub>14</sub> O <sub>23</sub> S	98	1858,3	1859,0	931,0	620,7
14	C <sub>88</sub> H <sub>135</sub> N <sub>13</sub> O <sub>20</sub>	95	1695,1	-	848,8	566,4
15	C <sub>68</sub> H <sub>98</sub> N <sub>18</sub> O <sub>18</sub>	95	1455,6	-	729,0	486,5
16	C <sub>83</sub> H <sub>118</sub> N <sub>23</sub> O <sub>20</sub>	96	1759,0	-	880,9	587,7
25	C <sub>98</sub> H <sub>143</sub> ClN <sub>16</sub> O <sub>32</sub> S <sub>2</sub>	94	2156,9	-	1080,5	720,1
26	C <sub>96</sub> H <sub>134</sub> ClN <sub>15</sub> O <sub>29</sub> S	97	1993,7	1994,6	988,4	665,7
27	C <sub>101</sub> H <sub>141</sub> ClN <sub>14</sub> O <sub>32</sub> S <sub>2</sub>	80	2162,9	-	1083,0	721,9
28	C <sub>110</sub> H <sub>153</sub> ClN <sub>16</sub> O <sub>31</sub> S <sub>2</sub>	94	2295,1	-	1148,6	765,9

Пример 3. Получение соединений формулы (II) для высвобождения множества лекарственных средств.

Соединения, описанные в настоящем документе, получали с помощью стандартного метода SPPS на основе Fmoc, включающего связывание пептида на смоле и конвергентные стратегии, как показано на фиг. 27 и 28 и на фиг. 46 и 47. Соединения, полученные в примере 3, показаны в табл. 5 ниже.

Таблица 5

Соединения формулы (II), подходящие для высвобождения множества лекарственных средств

Соединение	Структура
17	Arg-ПЭГ <sub>4</sub> -Phe-Arg-[Glu(Sar-OCPT)-Phe] <sub>2</sub> -OH
18	Arg-ПЭГ <sub>4</sub> -[Phe-Arg-Glu(Sar-OCPT)-Arg] <sub>2</sub> -OH
29	Ac-Cys-Mal-ПЭГ <sub>4</sub> -[Phe-Lys-Lys(Mal-DM1)-Phe] <sub>2</sub> -OH
30	Ac-Cys-Mal-ПЭГ <sub>4</sub> -Phe-Arg-Lys(Mal-DM1)-Arg-Lys(AF)-Phe-OH

Для синтеза соединений 17 и 18 глутаминовую кислоту присоединяли в виде Fmoc-Glu(PhiPr)-OH и N-концевой остаток Arg вводили в виде Boc-Arg(Pbf)-OH. Защитную группу боковой цепи PhiPr селективно удаляли в присутствии защитных групп боковой цепи Boc/Pbf при обработке 1% (об) ТФУ в ДХМ. Связывание на смоле H-Sar-OCPT проводили с использованием 1,5 экв. Sar-OCPT (1,4 экв.) HATU (4 экв.) DIEA в ДМФА в течение 90 мин.

Пептиды снимали со смолы с одновременным снятием защиты с боковой цепи при обработке ТФУ/TIS/водой (95/2,5/2,5, об./об./об.) в течение 60 мин. После концентрирования смеси после снятия со смолы, неочищенные пептиды осаждали холодным диэтиловым эфиром и центрифугировали (фиг. 27-28).

Для синтеза соединения 29 производное Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-NHS добавляли на смолу в течение 30 мин (3 экв. Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-NHS, 7 экв. DIEA), после чего проводили снятие Fmoc защиты раствором 20% пиперидина в ДМФА. Затем остаток малеимида на цепи ПЭГ подвергали реакции на смоле с ацетилцистеином (Ac-Cys-OH) путем хемоселективного связывания между малеимидом и тиолом (3 экв. Ac-Cys-OH, DIEA, 7 экв.) в течение 20 мин. Затем Mal-производное вводили путем присоединения фрагмента Mal-NHS к ε-аминогруппе Lys после удаления Mtt ДХМ/ТФУ/TIS (94/1/5, об./об./об.). Пептид снимали со смолы с одновременным снятием защиты с боковой цепи при обработке ТФУ/TIS/водой (95/2,5/2,5, об./об./об.) в течение 60 мин. После концентрирования смеси, полученной после снятия со смолы, неочищенный пептид осаждали холодным диэтиловым эфиром и центрифугировали. Затем мертанзин (DM1, 2,9 экв.) подвергали реакции с концевой малеимидной группой путем хемоселективного связывания в PBS буфере при pH 7,4 и ацетонитриле (отношение 2:1) (фиг. 46).

Для синтеза соединения 30 производное Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-NHS добавляли на смолу в течение 30 мин (3 экв. Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-NHS, 7 экв. DIEA), после чего проводили снятие Fmoc защиты раствором 20% пиперидина в ДМФА. Затем остаток малеимида на цепи ПЭГ подвергали реакции на смоле с ацетилцистеином (Ac-Cys-OH) путем хемоселективного связывания между малеимидом и тиолом (3 экв. Ac-Cys-OH, DIEA, 7 экв.) в течение 20 мин. Затем AF присоединяли путем сочетания фрагмента (3 экв. AF, 2,9 экв. HBTU, 7 экв. DIEA) на смоле с остатком Lys после удаления Mtt смесью ДХМ/ТФУ/TIS

(94/1/5, об./об./об.). Mal-производное вводили путем добавления фрагмента Mal-NHS к боковой цепи Lys после удаления Boc ДХМ/TMSOTf/T3A (97/1/2, об./об./об.). Пептид снимали со смолы при обработке TФУ/TIS/водой (95/2,5/2,5, об./об./об.) в течение 60 мин. После концентрирования смеси, полученной после снятия со смолы, неочищенный пептид осаждали холодным диэтиловым эфиром и центрифугировали. Затем мертанзин (DM1, 1,45 экв.) подвергали реакции с N-концевой малеимидной группой путем хемоселективного связывания в PBS буфере при pH 7,4 и ацетонитриле (отношение 2:1) (фиг. 47).

Пептиды очищали и анализировали так же и с использованием того же оборудования, как описано в примере 1 выше. Результаты анализа соединений, полученных в примере 3, показаны в табл. 6 ниже.

Таблица 6

Анализ соединений 17-18 и 29-30

Соединение	Формула	Чистота (%)	ММ	[M+2H <sup>+</sup> ] <sup>+2</sup>	[M+3H <sup>+</sup> ] <sup>+3</sup>
17	C <sub>117</sub> H <sub>157</sub> N <sub>31</sub> O <sub>28</sub>	91	2445,7	-	816,7
18	C <sub>108</sub> H <sub>130</sub> N <sub>20</sub> O <sub>26</sub>	96	2124,3	1064,0	709,7
29	C <sub>167</sub> H <sub>227</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>23</sub> O <sub>46</sub> S <sub>2</sub>	89	3459,8	1731,6	1154,1
30	C <sub>147</sub> H <sub>222</sub> ClN <sub>27</sub> O <sub>37</sub> S <sub>2</sub>	90	3059,1	1530,6	1021,6

Пример 4. Получение соединений формулы (I) для высвобождения множества лекарственных средств.

Соединения, описанные в настоящем документе, получали с использованием стандартного метода SPPS на основе Fmoc, включающего связывание пептида на смоле и конвергентные стратегии, как показано на фиг. 48 и 49. Соединения, подготовленные в примере 4, показаны в табл. 7 ниже.

Таблица 7

Соединения формулы (Ia)/(Ia<sub>1</sub>), подходящие для высвобождения множества лекарственных средств; Y=ковалентное связывание между фрагментом T и единицей линкера-лекарственного средства, например, с помощью клик-химии (образованием триазольного фрагмента)

Соединение	Структура
31	AF-Cit-Lys(Mal-DM1)-Phe-Lys(ПЭГ <sub>4</sub> -Mal-Cys-Ac)-Phe-OH
32	Ac-Cys-Mal-[ПЭГ <sub>5</sub> -Lys(AF-Cit-Lys(Y)-Phe-OH)] <sub>2</sub> -Gly-NH <sub>2</sub>

Для синтеза соединения 31, Ауристин F (AF) присоединяли после удаления Fmoc путем сочетания фрагмента (3 экв. AF, 2,9 экв. HBTU, 7 экв. DIEA). Затем производное Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-NHS добавляли на смолу в течение 30 мин (3 экв. Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-NHS, 7 экв. DIEA) после удаления Mtt смесью ДХМ/TФУ/TIS (94/1/5, об./об./об.). Затем остаток малеимида на цепи ПЭГ подвергали реакции на смоле с ацетилцистеином (Ac-Cys-OH) путем хемоселективного связывания между малеимидом и тиолом (3 экв. Ac-Cys-OH, DIEA, 7 экв.) в течение 20 мин. Mal-производное вводили путем присоединения фрагмента Mal-NHS к боковой цепи Lys после удаления Boc смесью ДХМ/TMSOTf/T3A (97/1/2, об./об./об.).

Пептид снимали со смолы при обработке TФУ/TIS/водой (95/2,5/2,5, об./об./об.) в течение 60 мин. После концентрирования смеси, полученной после снятия со смолы, неочищенный пептид осаждали холодным диэтиловым эфиром и центрифугировали. Затем Мертанзин (DM1, 1,45 экв.) подвергали реакции с N-концевой малеимидной группой путем хемоселективного связывания в PBS буфере при pH 7,4 и ацетонитриле (отношение 2:1) (фиг. 48)

Для синтеза соединения 32 пептиды Ac-Cys-Mal-[ПЭГ<sub>5</sub>-Lys(Poc)]<sub>2</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (фрагмент T) и AF-Cit-Lys(N<sub>3</sub>)-Phe-OH (лекарственное средство-линкер) получали согласно методикам, описанным в примере 1 и 2. Производные Fmoc-Lys(Poc)-OH и Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH использовали в качестве алкинового и азидного компонентов для клик-химии. С этой целью Ac-Cys-Mal-[ПЭГ<sub>5</sub>-Lys(Poc)]<sub>2</sub>-Gly-NH<sub>2</sub> (1 экв.) присоединяли в растворе к AF-Cit-Lys(N<sub>3</sub>)-Phe-OH (1 экв.) согласно стандартной клик-химии (фиг. 49).

Пептиды очищали и анализировали, как описано в примере 1 выше. Результаты анализа соединений, полученных в примере 4, показаны в табл. 8 ниже.

Таблица 8

Анализ соединений 31-32

Соединение	Формула	Чистота (%)	ММ	[M+2H <sup>+</sup> ] <sup>+2</sup>	[M+3H <sup>+</sup> ] <sup>+3</sup>
31	C <sub>167</sub> H <sub>227</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>23</sub> O <sub>46</sub> S <sub>2</sub>	89	3459,8	1731,6	1154,1
32	C <sub>182</sub> H <sub>292</sub> N <sub>36</sub> O <sub>49</sub> S	85	3800,5	1901,8	1268,2

Пример 5. Исследование Cat В-индуцированного расщепления при использовании соединений 1-7, 19, 22 и 23 (формула I/I').

Способность соединений 1-7 и 19-23 (формулы I/I') к расщеплению Катепсином В оценивали с помощью теста на ферментное расщепление in vitro, описанного выше. Результаты приведены в табл. 9 ниже и показаны на фиг. 29-31.

Таблица 9

Исследование Cat В-индуцированного расщепления соединений формулы (I)/(I')  
(Референсное соединение: Cys-MC-Val-Cit-PAVC-MMAF)

Соединение	T <sub>1/2</sub> Соединения (мин)	T <sub>1/2</sub> Референсное (мин)	Отношение (T <sub>1/2</sub> Соединения/T <sub>1/2</sub> Референсное)
<b>1</b>	1,5	12,9	0,12
<b>3</b>	1,4	12,9	0,11
<b>5</b>	0,6	10,9	0,05
<b>6</b>	0,3	13,1	0,02
<b>7</b>	1,2	13,1	0,09
<b>19</b>	1,1	12,6	0,09
<b>22</b>	0,06	11,4	0,005
<b>23</b>	0,0004	11,4	0,00004

Из этих результатов очевидно, что расщепление экзо-Cat В и высвобождение лекарственного средства (AF-Arg, AF-Cit, ACit, DM1-Mal-Phe-Lys, DM1-Mal-Phe-Cit, DM1-Msc-Phe-Cit) в соединениях формулы (I)/(I') проходили одновременно и очень быстро. Например, вызванное Cat В высвобождение лекарственного средства из соединения 5 проходило в 20 раз быстрее по сравнению с референсным PAVC соединением Cys-MC-Val-Cit-PAVC-MMAR. Кинетика быстрого расщепления, достигаемая соединениями 1-7, 19 и 22-23, демонстрирует, что соединения согласно настоящему изобретению демонстрируют высокую селективность и аффинность связывания в отношении экзопептидазной активности Катепсина В. Кроме того, было неожиданно обнаружено, что присутствие фрагмента Ac-Cys-ПЭГ<sub>4</sub> на боковой цепи остатка Lys (соответствующего остатку Ахх в формуле (I или I')) не оказывало неблагоприятного влияния на аффинность связывания соединений с Cat В. Эти результаты также показывают, что при сравнении расщепление по механизму на основе эндопептидазной активности Cat В, как это реализовано в линкерных системах PAVC (например, референсном соединении), происходит значительно медленнее. В качестве конкретных четких примеров, соединения 22 и 23 спонтанно расщепляются экзо-Cat В (T<sub>1/2</sub><1 мин), демонстрируя крайне благоприятные свойства связывания субстратов на основе формулы (I); предполагается, что благоприятное взаимодействие между С-концевым Туг и закрывающей петлей Cat В способствует существенному повышению скорости расщепления, наблюдаемой в этих соединениях.

Пример 6. Исследование Cat В-индуцированного расщепления с использованием соединений 8-13 и 27-28 (формула II).

Способность соединений 8-13 и 27-28 (формула II) к расщеплению Катепсином В оценивали с помощью теста ферментного расщепления *in vitro*, описанного выше. Результаты приведены в табл. 10 ниже и показаны на фиг. 32 и 50.

Таблица 10

Исследование Cat В-индуцированного расщепления соединений формулы (II)/(II')  
(Референсное соединение: Cys-MC-Val-Cit-PAVC-MMAF)

Соединение	T <sub>1/2</sub> Соединения (мин)	T <sub>1/2</sub> Референсное (мин)	Отношение (T <sub>1/2</sub> Соединения/T <sub>1/2</sub> Референсное)
<b>8</b>	2,2	11,6	0,19
<b>9</b>	4,5	7,2	0,63
<b>10</b>	0,9	10,2	0,1
<b>11</b>	2,2	11,1	0,2
<b>12</b>	1,5	10,9	0,14
<b>13</b>	1,6	10,7	0,15
<b>27</b>	0,06	11,4	0,005
<b>28</b>	0,3	10,7	0,03

Эти результаты демонстрируют, что Cat В-индуцированное расщепление соединений 8-13, несущих сайт присоединения вектора на N-конце линкерной системы, было очень быстрым. Наблюдали скорости расщепления до 10 раз выше по сравнению с референсной линкерной системой PAVC, что указывает на то, что соединения 8-13 расщеплялись экзопептидазным механизмом Cat В. Неожиданно присутствие стерически затрудняющих фрагментов лекарственных средств, таких как СРТ, DM1 или AF, в боковой цепи остатка Vxx в формуле (II) не оказывало никакого неблагоприятного влияния на наблюдаемые скорости расщепления, указывая на то, что стерически затрудняющие фрагменты были направлены за пределы связывающей полости Cat В. В соединении 8 высвобождение лекарственного средства (СРТ) проходит путем катализируемого кислотой или ферментом (эстеразой) гидролиза, тогда как соединения 9 и 11 могут подвергаться внутримолекулярному аминолизу (с образованием циклической мочевины или

карбамата) для высвобождения СРТ. Прежде всего, в соединениях 12 и 13 фармакологически активный фрагмент, т.е. H-Lys(Mal-DM1)-Phe-OH или H-Lys(AF)-Phe-OH, высвобождался одновременно в результате Cat В-индуцированного расщепления.

Соединение 27 демонстрирует важность С-концевого остатка для скорости расщепления. Как наблюдается выше, Туг (в соединении 27) склонен к благоприятным взаимодействиям (предположительно вследствие образования Н-связей), которые приводят к очень быстрому расщеплению под действием экзопептидазной активности Cat В (примерно в 2300 раз быстрее по сравнению с референсным РАВС).

Пример 7. Исследование Cat В-индуцированного расщепления с использованием мультимерных соединений (высвобождающих множество лекарственных средств) согласно формуле (II).

Способность мультимерных соединений 17-18 и 29-30 (формула (II)) к расщеплению Катепсином В оценивали с помощью теста ферментного расщепления *in vitro*, описанного выше. Результаты показаны на фиг. 33-34 и на фиг. 51-52.

Как показано на фиг. 33, Cat В-индуцированное расщепление соединения 17 приводило к быстрому высвобождению С-концевой единицы дипептида-лекарственного средства Glu(Sar-OCPT)-Phe-OH, и соединения 8 в качестве промежуточного соединения, указывая на то, что расщепление проходило по экзопептидазному механизму Cat В. В свою очередь, соединение 8 быстро расщеплялось с высвобождением С-концевой единицы дипептида-лекарственного средства H-Glu(Sar-OCPT)-Phe-OH. Каждая единица дипептида-лекарственного средства H-Glu(Sar-OCPT)-Phe-OH может, в свою очередь, подвергаться катализируемому кислотой или ферментом гидролизу с высвобождением нативного СРТ.

Как показано на фиг. 34, Cat В-индуцированное расщепление соединения 18 приводило к быстрому высвобождению С-концевой единицы дипептида-лекарственного средства H-Glu(Sar-OCPT)-Arg-OH и соединения 16 в качестве первого промежуточного соединения, которое, в свою очередь, быстро расщеплялось посредством экзо-Cat В механизма с высвобождением соединения 15 в качестве второго промежуточного соединения. Cat В-индуцированное расщепление соединения 15 приводит к высвобождению второй С-концевой единицы дипептида-лекарственного средства H-Glu(Sar-OCPT)-Arg-OH. Каждая единица дипептида-лекарственного средства H-Glu(Sar-OCPT)-Phe-OH может, в свою очередь, подвергаться катализируемому кислотой или ферментом гидролизу с высвобождением нативного СРТ. Благодаря идентификации ожидаемых промежуточных соединений (ВЭЖХ и МС/МС) можно установить селективное расщепление согласно экзопептидазному механизму Cat В.

Как показано на фиг. 51, Cat В-индуцированное расщепление соединения 29 приводило к быстрому (приблизительно в 5 раз быстрее по сравнению с референсной РАВС-системой) высвобождению С-концевой единицы дипептида-лекарственного средства H-Lys(Mal-DM1)-Phe-OH и соединения 28 в качестве первого промежуточного соединения, которое, в свою очередь, быстро расщеплялось по экзо-Cat В механизму с высвобождением соединения 12 в качестве второго промежуточного соединения. Cat В-индуцированное расщепление соединения 12 приводит к высвобождению второй единицы дипептида-лекарственного средства H-Lys(Mal-DM)-Phe-OH. Опять же, идентификация ожидаемых промежуточных соединений позволяет устанавливать селективное и быстрое расщепление согласно экзопептидазному механизму Cat В.

Как показано на фиг. 52, Cat В-индуцированное расщепление соединения 30 приводило к быстрому высвобождению С-концевой единицы дипептида-лекарственного средства H-Lys(AF)-Phe-OH. После этой очень быстрой стадии расщепления (больше чем в 10 раз быстрее по сравнению с референсной РАВС-системой), промежуточный линкер-лекарственное средство, содержащий С-концевой Arg (остаток Вуу) расщеплялся умеренно быстро ( $T_{1/2} < 30$  мин) с высвобождением второго (другого) дипептида-лекарственного средства H-Lys(Mal-DM1)-Arg-OH. Последовательное расщепление дипептидов-лекарственных средств четко демонстрирует селективное расщепление под действием экзопептидазной активности Cat В.

Результаты для соединений 29 и 30 приведены в табл. 11.

Таблица 11

Исследование Cat В-индуцированного расщепления соединений 29 и 30 с высвобождением множества лекарственных средств согласно формуле (II)  
(Референсное соединение: Cys-МС-Val-Cit-РАВС-ММАF)

Соединение	$T_{1/2}$ Соединения (мин)	$T_{1/2}$ Референсное (мин)	Отношение ( $T_{1/2}$ Соединения/ $T_{1/2}$ Референсное)
29	2,4	10,7	0,23
30	1,1	15,4	0,07

Пример 8. Исследование Cat В-индуцированного расщепления с использованием мультимерных соединений (формулы (I) и (I')).

Способность мультимерных соединений 31-32 (формулы (Ia и Ia<sub>1</sub>)) к расщеплению Cat В оценивали с помощью теста ферментного расщепления *in vitro*, описанного выше. Результаты приведены в табл. 12 и показаны на фиг. 53-54.

Таблица 12

Исследование Cat В-индуцированного расщепления соединений с высвобождением множества лекарственных средств согласно формуле (Ia) и (Ia<sub>1</sub>) (Референсное соединение: Cys-MC-Val-Cit-PABC-MMAF)

Соединение	T <sub>1/2</sub> Соединения (мин)	T <sub>1/2</sub> Референсное (мин)	Отношение (T <sub>1/2</sub> Соединения/T <sub>1/2</sub> Референсное)
31	1,08	12,7	0,08
32	0,98	15,4	0,06

Как показано на фиг. 53, Cat В-индуцированное расщепление соединения 31 приводило к быстрому высвобождению С-концевой дипептидной единицы, т.е. вектора, содержащего H-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal-Cys-Ac)-Phe-OH. После этой очень быстрой стадии расщепления (больше чем в 10 раз быстрее по сравнению с референсной PABC-системой), промежуточное двойное лекарственное средство-линкер расщеплялось с одновременным высвобождением разных лекарственных средств AF-Cit и H-Lys(Mal-DM1)-Phe-OH, снова подтверждая механизм экзо-Cat В расщепления.

Как показано на фиг. 54, Cat В-индуцированное расщепление соединения 32 приводило к быстрому высвобождению лекарственного средства AF-Cit (скорость расщепления приблизительно в 20 раз выше по сравнению с референсной PABC-системой). Прежде всего, высвобождение 2 фрагментов лекарственного средства AF-Cit происходило почти спонтанно, подтверждая, что линкерная система подходит для увеличения DAR-значений в ADC. Данные подтверждают двойную и синергическую функцию формулы (I) и (Ia<sub>1</sub>), т.е. предоставление возможности быстрого высвобождения лекарственного средства благодаря линкеру формулы (I) и улучшения растворимости в воде благодаря солибилизирующему эффекту фрагмента формулы (Ia<sub>1</sub>).

Пример 9. Цитотоксическая активность AF-Arg и AF.

Цитотоксическое действие *in vitro* нативного AF и AF-Arg, т.е. химически модифицированного лекарственного средства в соответствии с формулой (III), где W<sub>1</sub> представляет собой AF, D<sub>xx</sub> представляет собой одинарную ковалентную связь, и Дуу представляет собой Arg, оценивали в двух ErbB2-экспрессирующих линиях клеток, а именно, клетках SK-BR-3 и SK-OV-3. Тест цитотоксической активности проводили согласно методу, описанному в разделе 11.3.4 выше.

Результаты анализа цитотоксической активности при времени инкубирования 72 ч и 120 ч приведены в соответствующих табл. 13 и 14 ниже.

Таблица 13

Исследование цитотоксичности AF и AF-Arg в ErbB2-экспрессирующих клетках SK-OV-3 и SK-BR-3 через 72 ч

Лекарственное средство	Относительная IC <sub>50</sub> (нМ) через 72 ч (день 3)			
	SK-OV-3		SK-BR-3	
	опыт 1	опыт 2	опыт 1	опыт 2
AF	82,79	153,8	37,43	53,66
AF-Arg	179,6	239,5	~98,02	~110,7

Таблица 14

Исследование цитотоксичности AF и AF-Arg в ErbB2-экспрессирующих клетках SK-OV-3 и SK-BR-3 через 120 ч

Лекарственное средство	Относительная IC <sub>50</sub> (нМ) через 120 ч (день 5)			
	SK-OV-3		SK-BR-3	
	опыт 1	опыт 2	опыт 1	опыт 2
AF	~100,2	145,2	18,82	21,75
AF-Arg	146,7	204,7	20,9	24,92

Эти результаты показывают, что химически модифицированное лекарственное средство (AF-Arg) сохраняет цитотоксическую активность, например, более 85% цитотоксической активности нативного лекарственного средства (AF), в клетках SK-BR-3 и приблизительно 70% в клетках SK-OV-3 через 120 ч (фиг. 35). Более того, эти результаты также указывают, что введение двухвалентной группы, т.е. Arg (аминокислоты Дуу в формуле (III)), между лекарственным средством и линкерной системой согласно настоящему изобретению не оказывает нежелательного влияния на фармакологическую активность фрагмента (модифицированного) лекарственного средства, высвобождаемого в клетке-мишени. В частности, если лекарственное средство интернализуется в клетку-мишень посредством векторизации, цитотоксичность лекарственного средства (AF-Arg) не ослабляется из-за сниженной проницаемости клетки для модифицированного лекарственного средства, благодаря увеличению полярности, то есть заряженной боковой цепи Arg.

Пример 10. Получение конъюгатов антитела-лекарственного средства.

Для получения ADC1, раствор коммерческого трастузумаба (10,0 мг, 0,066 мкмоль) в воде (0,48 мл) и DPBS при pH 7,4 (0,52 мл) при комнатной температуре (КТ) частично восстанавливали путем добавления раствора гидрохлорида трис(2-карбоксиэтил)-фосфина (0,058 мг, 0,24 мкмоль) в буфере PBS pH 7,4 (50 мкл). После перемешивания в течение 60 минут, добавляли раствор соединения 2 (AF-Arg-Lys(ПЭГ<sub>4</sub>-Mal)-Phe-OH) (1,04 мг, 0,66 мкмоль) в ДМСО (50 мкл). Реакцию перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре и разбавляли дополнительным количеством PBS буфера pH 7,4 (1,92 мл). Затем раствор наносили на колонку Sephadex® PD-10 (GE Healthcare), уравновешенной PBS буфером pH 7,4. Первые 2,5 мл элюента, полученного после нанесения, отбрасывали. Затем колонку элюировали PBS буфером pH 7,4 (3,5 мл) и собирали весь элюат. Весь суспендированный материал удаляли с помощью центрифугирования, а супернатант концентрировали в центрифужных фильтрующих устройствах Amicon® до объема 0,3 мл и растворяли в PBS pH 7,4 (7 мл).

Для получения ADC3 к раствору коммерческого трастузумаба (50 мг) в воде (2,38 мл) и DPBS в pH 7,4 (1,87 мл) при КТ добавляли раствор гидрохлорида трис(2-карбоксиэтил)фосфина (0,38 мг, 1,33 мкмоль) в DPBS (450 мкл). Реакцию перемешивали в течение 75 мин. Раствор соединения 26 (Ma-ПЭГ<sub>5</sub>-Phe-Cit-Lys(Мсс-DM1)-Cit-OH) (6,65 мг, 3,33 мкмоль) в ДМСО (300 мкл) добавляли к реакционной смеси, которую перемешивали при КТ в течение 60 мин. 100 мл коммерческого DPBS доводили до pH 8 водным раствором гидроксида натрия (1 моль/л). Затем две колонки PD 10 предварительно промывали раствором DPBS (по 25 мл) при pH 8. Реакционную смесь наносили на 2 колонки (по 2,5 мл на каждую колонку). Элюент, полученный в течение фазы нанесения, отбрасывали. Затем две колонки элюировали DPBS буфером pH 8 (по 3,5 мл каждую). Собранные элюаты (2×3,5 мл) объединяли и перемешивали в течение 15 ч при комнатной температуре для стабилизации тиомалеимида путем дециклизации. Весь суспендированный материал удаляли с помощью центрифугирования при 4000 об/мин (10 мин). Раствор делили (2×3,5 мл) и переносили в 2 центрифужных фильтра Amicon®. Два раствора концентрировали путем центрифугирования при 4000 об/мин в течение 2 ч с получением конечного объема 0,5 мл в каждой ячейке. Затем два раствора объединяли. Мембраны 2 фильтров промывали PBS буфером по Дульбекко (4 мл). Промывочный раствор добавляли к концентрированному ADC с получением конечного раствора ADC (V=5,0 мл).

Соответствующие значения DAR для ADC 1 и 3, представленные в табл. 15, определяли в соответствии с методом, описанным в разделе 11.3.5 выше.

Таблица 15

Значения DAR для ADC1 и ADC3

Соединение	Лекарственное средство-линкер	Формула	DAR	Концентрация
ADC1	Соединение 2	I	4,2	1,17 мг/мл
ADC3	Соединение 26	II	4,4	10,4 мг/мл

Пример 11. Исследование Cat B-индуцированного расщепления с использованием ADC1.

Расщепление ADC1 Cat B проходило быстро, на что указывало быстрое высвобождение AF-Arg ( $T_{1/2} < 5$  мин), подтверждающее механизм экзо-Cat B активности в конструкциях формулы (I) (фиг. 55). Результаты показывают, что присоединение mAt к боковой цепи Lys не приводит к снижению наблюдаемой скорости расщепления по сравнению с модельным фрагментом V (-Cys-Ac).

ADC3 так же расщеплялся экзо-Cat B (данные не показаны).

Пример 12. Стабильность ADC в плазме.

Исследования СВЭЖХ-МС/МС не показали обнаружения свободного лекарственного средства (ни AF, ни AF-Arg в случае ADC1 или производного DM1 в случае ADC3).

На графике (фиг. 56) показаны вычисленные средние концентрации ADC в образцах плазмы человека и мыши. Планки погрешности: SD (n=2). Результаты показывают, что ADC1 был стабильным в плазме мыши и человека в течение 24 ч.

Пример 13. Анализы связывания ADC.

ADC1: Анализ связывания ADC1 и трастузумаба на клетках SK-BR-3 (ErbB2-экспрессирующих) и MDA-MB-231 (ErbB2-отрицательных), показал, что ADC1 обладает такой же аффинностью и специфичностью в отношении экспрессирующих ErbB2 клеток, что и трастузумаб (фиг. 57).

ADC3: Анализ связывания ADC3 и трастузумаба на клетках BT-474 (ErbB2-экспрессирующих) и MDA-MB-231 (ErbB2-отрицательных), показал, что ADC3 обладает такой же аффинностью и специфичностью в отношении экспрессирующих ErbB2 клеток, что и трастузумаб (фиг. 58).

Пример 14. Цитотоксическая активность ADC.

Анализ цитотоксичности ADC1 и производных (трастузумаба, соединения 2 или AF-Arg) в отношении ErbB2-экспрессирующих клеток SK-OV-3 и SK-BR-3 и ErbB2-отрицательных клеток MDA-MB-231 проводили согласно методу, описанному в разделе 11.3.4 выше. Этот анализ продемонстрировал повышенную цитотоксическую активность ADC1 по сравнению с моноклональным антителом (трастузумабом), соединением 2 или AF-Arg. На фиг. 59(a)-(c) показаны кривые доза-эффект двух независимых опы-

тов с относительными значениями  $IC_{50}$ , определенными в тесте с Alamar Blue после 96 ч инкубирования. Соответствующие результаты анализов цитотоксической активности приведены в табл. 16 ниже.

Таблица 16

Исследование цитотоксичности ADC1, трастузумаба, AF-Arg и соединения 2 в ErbB2-экспрессирующих клетках SK-OV-3 и SK-BR-3 и в ErbB2-отрицательных клетках через 96 ч

Лекарственное средство	Относительная $IC_{50}$ (нМ) через 96 ч (день 4)					
	SK-OV-3		SK-BR-3		MDA-MB-231	
	опыт 1	опыт 2	опыт 1	опыт 2	опыт 1	опыт 2
Соединение 2	122,7	~86,74	39,35	~80,51	23,7	1,288
AF-Arg	82,57	243,5	~92,13	128,3	15,23	5,844
трастузумаб	~793,4	~16122	759,9	15481127	2,144	10,89
ADC1	0,03438	0,09391	0,01476	0,04327	0,1279	23,46

Анализ цитотоксичности ADC3 и производных (трастузумаба и DM1) в отношении ErbB2-экспрессирующих клеток BT-474 и ErbB2-отрицательных клеток MDA-MB-231 проводили согласно методу, описанному в разделе 11.3.4 выше. Этот анализ подтвердил повышенную цитотоксическую активность ADC3 по сравнению с трастузумабом и DM1. На фиг. 60(a)-(b) показаны кривые доза-эффект двух независимых опытов с относительными значениями  $IC_{50}$ , определенными в тесте с Alamar Blue после 96 ч инкубирования. Соответствующие результаты анализов цитотоксической активности приведены в табл. 17 ниже.

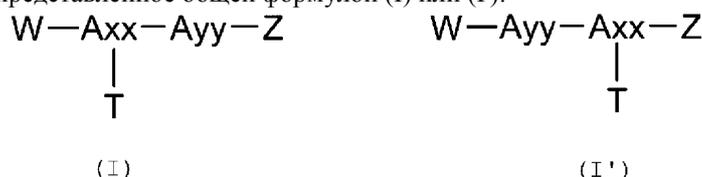
Таблица 17

Исследование цитотоксичности ADC3, трастузумаба и DM1 в ErbB2-экспрессирующих клетках BT-474 и в ErbB2-отрицательных клетках через 96 ч

Лекарственное средство	Относительная $IC_{50}$ (нМ) через 96 ч (день 4)			
	BT-474		MDA-MB-231	
	опыт 1	опыт 2	опыт 1	опыт 2
DM1	2,802	3,002	44,21	57,02
Трастузумаб	0,5711	4,558	1080	686
ADC3	0,683	0,3456	8,689	91,79

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, представленное общей формулой (I) или (I'):



где в формулах (I) и (I')

W представляет собой фрагмент, представленный следующей формулой (III):



где

$W_1$  представляет собой фрагмент, полученный из лекарственного средства, отличающегося от нативного лекарственного средства только ковалентным присоединением к  $D_{xx}$ , как показано в формуле (III), где лекарственное средство является аналогом ауристатиона, выбранным из ауристатиона Phe (AF), ауристатиона Cit (ACit), ауристатиона Arg (AArg), ауристатиона Lys (ALys), ауристатиона Orn (AOrn), ауристатиона Dab (ADab) или ауристатиона Dap (ADap);

$D_{xx}$  представляет собой одинарную ковалентную связь или аминокислоту, выбранную из Phe, Leu, Ile, Val, Tyr, гомо-Phe, Trp и Ala, где одинарная ковалентная связь или аминокислота необязательно присоединены к фрагменту  $W_1$  через двухвалентный фрагмент, выбранный из малеимидов, триазолов, гидразинов, карбонилсодержащих групп и их производных;

$D_{yy}$  представляет собой одинарную ковалентную связь, Phe или аминокислоту, выбранную из Arg, Lys, Цитруллин (Cit), Орнитин (Orn), 2,3-диаминопропионовой кислоты (Dap), 2,4-диамино-масляной кислоты (Dab);

при условии, что если  $D_{xx}$  является аминокислотой, выбранной из Phe, Leu, Ile, Val, Tyr, гомо-Phe, Trp и Ala,  $D_{yy}$  является Phe или аминокислотой, выбранной из Arg, Lys, Cit, Orn, Dap и Dab, и если  $D_{xx}$  является одинарной ковалентной связью,  $D_{yy}$  является одинарной ковалентной связью, Phe или амино-

кислотой, выбранной из Arg, Lys, Cit, Orn, Dap и Dab;

и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к N-концу Axx в формуле (I) или N-концу Ауу в формуле (I');

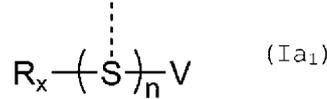
Axx представляет собой аминокислоту, выбранную из Glu, Aaa, Dap, Dab, Lys, Orn, Ser, Ama и гомо-лизина (гомо-Lys); при условии, что Axx в формуле (I) не является аминокислотой в (D) конфигурации;

Ауу в формуле (I) представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, гомо-Phe, Ala, Trp, Phg, Leu, Val, Tug, гомо-Tug, Tug(OR<sub>1</sub>) и гомо-Tug(OR<sub>1</sub>), где R<sub>1</sub> является -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n1</sub>-R<sub>2</sub>, где R<sub>2</sub> является атомом водорода или метильной группой, и n1 является целым числом от 2 до 24;

Ауу в (I') представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, гомо-Phe, Ala, Trp, Phg, Leu, Val, Tug и Ser;

при условии, что Ауу в формуле (I') не является аминокислотой в (D) конфигурации;

T является фрагментом, представленным следующей формулой (Ia<sub>1</sub>):



где в формуле (Ia<sub>1</sub>)

S представляет собой группу, содержащую один или более атомов, выбранных из углерода, азота, кислорода и серы;

V представляет собой фрагмент, полученный из векторной группы, способной к взаимодействию с опухолевой клеткой, где векторную группу выбирают из антител и их фрагментов;

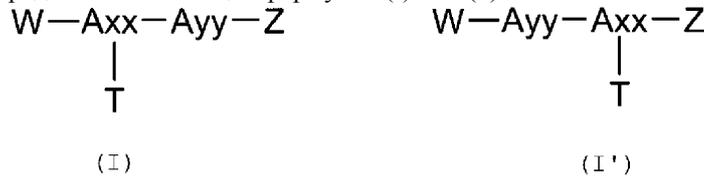
n является целым числом от 1 до 10;

R<sub>x</sub> является атомом или группой, которые необязательно присутствуют для насыщения свободной валентности S, если таковая присутствует;

и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к боковой цепи Axx; если n больше 1, каждая пунктирная линия представляет собой ковалентную связь с индивидуальной, отдельной группой формулы (I) или формулы (I'), где множество групп формулы (I) или формулы (I') могут быть одинаковыми или различными; если n больше 1, S могут быть одинаковыми или различными;

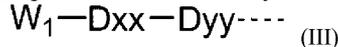
Z представляет собой группу, ковалентно связанную с C-концом Ауу или Axx, выбранную из -OH; -N(H)(R), где R представляет собой атом водорода, алкильную группу, содержащую от 1 до 20 атомов углерода, циклоалкильную группу, содержащую от 3 до 20 атомов углерода, или ароматическую группу, содержащую от 6 до 20 атомов углерода; или метящее средство, такое как производное кумарина.

2. Соединение, представленное общей формулой (I) или (I'):



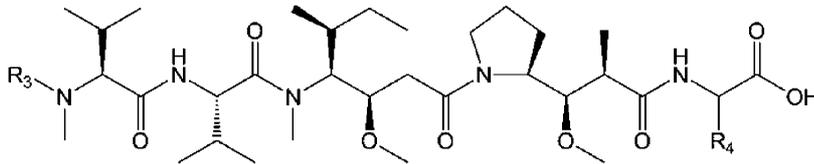
где в формулах (I) и (I')

W представляет собой фрагмент, представленный следующей формулой (III):



где

W<sub>1</sub> представляет собой фрагмент, полученный из противоопухолевого лекарственного средства, при условии, что W<sub>1</sub> не является аналогом ауристинина, при этом аналог ауристинина соответствует следующей формуле:



где R<sub>3</sub> представляет собой метильную группу, и R<sub>4</sub> представляет собой боковую группу аминокислоты, выбранной из Asp, Glu, Thr, фосфо-Thr;

Dxx представляет собой одинарную ковалентную связь или аминокислоту, выбранную из Phe, Leu, Ile, Val, Tug, гомо-Phe, Trp и Ala, где одинарная ковалентная связь или аминокислота необязательно присоединены к фрагменту W<sub>1</sub> через двухвалентный фрагмент, выбранный из малеимидов, триазолов, гидразинов, карбонилсодержащих групп и их производных;

Dyy представляет собой одинарную ковалентную связь, Phe или аминокислоту, выбранную из Arg, Lys, Cit, Orn, Dap и Dab;

при условии, что, если Dxx является аминокислотой, выбранной из Phe, Leu, Ile, Val, Tug, гомо-Phe,

Trp и Ala, Дуу является Phe или аминокислотой, выбранной из Arg, Lys, Cit, Orn, Dap и Dab, и если Dxx является одинарной ковалентной связью, Дуу является одинарной ковалентной связью, Phe или аминокислотой, выбранной из Arg, Lys, Cit, Orn, Dap и Dab, предпочтительно Arg или Cit;

и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к N-концу Axx в формуле (I) или N-концу Ауу в формуле (I');

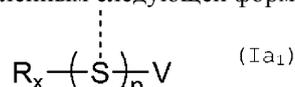
Axx представляет собой аминокислоту, выбранную из Glu, Aaa, Dap, Dab, Lys, Orn и гомо-Lys; при условии, что Axx в формуле (I) не является аминокислотой в (D) конфигурации;

Ауу в формуле (I) представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, гомо-Phe, Ala, Trp, Phg, Leu, Val, Tug, гомо-Tug, Tug(OR<sub>1</sub>) и гомо-Tug(OR<sub>1</sub>), где R<sub>1</sub> является -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n1</sub>-R<sub>2</sub>, где R<sub>2</sub> является атомом водорода или метильной группой, и n1 является целым числом от 2 до 24;

Ауу в (I') представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, гомо-Phe, Ala, Trp, Phg, Leu, Val, Tug и Ser;

при условии, что Ауу в формуле (I') не является аминокислотой в (D) конфигурации;

T является фрагментом, представленным следующей формулой (Ia<sub>1</sub>):



где в формуле (Ia<sub>1</sub>)

S представляет собой группу, содержащую один или более атомов, выбранных из углерода, азота, кислорода и серы;

V представляет собой фрагмент, полученный из векторной группы, способной к взаимодействию с опухолевой клеткой, где векторную группу выбирают из антител и их фрагментов;

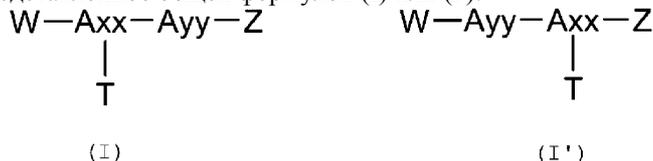
n является целым числом от 1 до 10;

R<sub>x</sub> является атомом или группой, которые необязательно присутствуют для насыщения свободной валентности S, если таковая присутствует;

и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к боковой цепи Axx; если n больше 1, каждая пунктирная линия представляет собой ковалентную связь с индивидуальной, отдельной группой формулы (I) или формулы (I'), где множество групп формулы (I) или формулы (I') могут быть одинаковыми или различными; если n больше 1, S могут быть одинаковыми или различными;

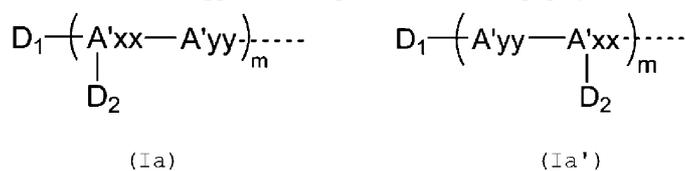
Z представляет собой группу, ковалентно связанную с C-концом Ауу или Axx, выбранную из -OH; -N(H)(R), где R представляет собой атом водорода, алкильную группу, имеющую от 1 до 20 атомов углерода, циклоалкильную группу, имеющую от 3 до 20 атомов углерода, или ароматическую группу, имеющую от 6 до 20 атомов углерода; или метящее средство, такое как производное кумарина.

3. Соединение, представленное общей формулой (I) или (I'):



где в формулах (I) и (I')

W представляет собой пептидный фрагмент, представленный формулой (Ia), (Ia') или (Ib):



где в формулах (Ia) и (Ia')

A'yy представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, Ala, Trp, Tug, Phg, Met, Val, His, Lys, Arg, Cit, Abu, Orn, при условии, что A'yy в формуле (Ia') не является аминокислотой в (D) конфигурации;

D<sub>1</sub> представляет собой фрагмент, полученный из противоопухолевого лекарственного средства;

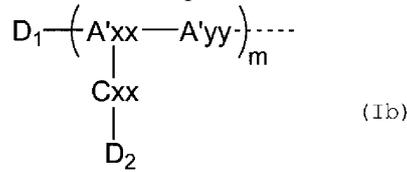
m является целым числом от 1 до 10;

если m=1, то A'xx представляет собой аминокислоту, выбранную из Glu, Aaa, Dap, Dab, Lys, Orn, Ser, Ama и гомо-Lys, при условии, что A'xx в формуле (Ia) не является аминокислотой в (D) конфигурации, D<sub>2</sub> представляет собой фрагмент, полученный из противоопухолевого лекарственного средства, необязательно фрагмент, полученный из того же лекарственного средства, что и D<sub>1</sub>;

если m больше 1, то каждый D<sub>2</sub> независимо выбран из атома водорода и фрагментов, полученных из противоопухолевого лекарственного средства, где множество фрагментов D<sub>2</sub> могут быть одинаковыми или различными, при условии, что по меньшей мере один D<sub>2</sub> не является атомом водорода, если D<sub>2</sub> является атомом водорода, то тогда A'xx представляет собой аминокислоту, при условии, что A'xx в формуле (Ia) не является аминокислотой в (D) конфигурации, если D<sub>2</sub> является фрагментом, полученным из про-

тивоопухолевого лекарственного средства, то A'xx представляет собой аминокислоту, выбранную из Glu, Aра, Aaa, Dар, Dаб, Lys, Orn, Ser, Ama и гомо-Lys, при условии, что A'xx в формуле (Ia) не является аминокислотой в (D) конфигурации;

и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к N-концу Axx или Ауу;



где в формуле (Ib)

A'yy представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, Ala, Trp, Tyr, Phg, Met, Val, His, Lys, Arg, Cit, Abu, Orn;

D<sub>1</sub> представляет собой фрагмент, полученный из противоопухолевого лекарственного средства; m является целым числом от 1 до 10;

если m=1, то A'xx представляет собой трифункциональную аминокислоту, выбранную из Glu, α-аминоадипиновой кислоты (Aaa), Dар, Dаб, Ser, Thr, гомо-серина (гомо-Ser), гомо-треонина (гомо-Thr) и аминмалоновой кислоты (Ama), при условии, что A'xx не является аминокислотой в (D) конфигурации; D<sub>2</sub> представляет собой фрагмент, полученный из противоопухолевого лекарственного средства, необязательно фрагмент, полученный из того же лекарственного средства, что и D<sub>1</sub>, Cxx представляет собой одинарную ковалентную связь, если A'xx не является Ama, если A'xx является Ama, Cxx представляет собой (L)- или (D)-Pro, или N-метиламинокислоту, такую как саркозин (Sar), N-конец Cxx связан с C-концом Ama, и C-конец Cxx связан с фрагментом D<sub>2</sub>;

если m больше 1, то каждый D<sub>2</sub> независимо выбран из атома водорода и фрагментов, полученных из противоопухолевого лекарственного средства, где множество фрагментов D<sub>2</sub> могут быть одинаковыми или различными, при условии, что по меньшей мере один D<sub>2</sub> не является атомом водорода, если D<sub>2</sub> является атомом водорода, то тогда A'xx представляет собой аминокислоту, при условии, что A'xx не находится в (D) конфигурации, и Cxx представляет собой одинарную ковалентную связь, если D<sub>2</sub> является фрагментом, полученным из противоопухолевого лекарственного средства, то тогда A'xx представляет собой аминокислоту, выбранную из Glu, Aaa, Dар, Dаб, Ser, Thr, гомо-Ser, гомо-Thr и Ama, при условии, что A'xx не является аминокислотой в (D) конфигурации, Cxx представляет собой одинарную ковалентную связь, если A'xx не является Ama, если A'xx является Ama, Cxx представляет собой (L)- или (D)-Pro, или N-метиламинокислоту, такую как Sar, где N-конец Cxx связан с C-концом Ama, и C-конец Cxx связан с фрагментом D<sub>2</sub>;

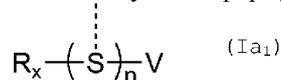
и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к N-концу Axx или Ауу;

Axx представляет собой аминокислоту, выбранную из Glu, Aaa, Dар, Dаб, Lys, Orn и гомо-Lys; при условии, что Axx в формуле (I) не является аминокислотой в (D) конфигурации;

Ауу в формуле (I) представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, гомо-Phe, Ala, Trp, Phg, Leu, Val, Tyr, гомо-Tyr, Tyr(OR<sub>1</sub>) и гомо-Tyr(OR<sub>1</sub>), где R<sub>1</sub> является -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n1</sub>-R<sub>2</sub>, где R<sub>2</sub> является атомом водорода или метильной группой, и n1 является целым числом от 2 до 24;

Ауу в (I') представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, гомо-Phe, Ala, Trp, Phg, Leu, Val, Tyr и Ser; при условии, что Ауу в формуле (I') не является аминокислотой в (D) конфигурации;

T является фрагментом, представленным следующей формулой (Ia<sub>1</sub>):



где в формуле (Ia<sub>1</sub>)

S представляет собой группу, содержащую один или более атомов, выбранных из углерода, азота, кислорода и серы;

V представляет собой фрагмент, полученный из векторной группы, способной к взаимодействию с опухолевой клеткой, где векторную группу выбирают из антител и их фрагментов;

n является целым числом от 1 до 10;

R<sub>x</sub> является атомом или группой, которые необязательно присутствуют для насыщения свободной валентности S, если таковая присутствует;

и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к боковой цепи Axx; если n больше 1, каждая пунктирная линия представляет собой ковалентную связь с индивидуальной, отдельной группой формулы (I) или формулы (I'), где множество групп формулы (I) или формулы (I') могут быть одинаковыми или различными; если n больше 1, S могут быть одинаковыми или различными;

Z представляет собой группу, ковалентно связанную с C-концом Ауу или Axx, выбранную из -OH; -N(H)(R), где R представляет собой атом водорода, алкильную группу, имеющую от 1 до 20 атомов углерода, циклоалкильную группу, имеющую от 3 до 20 атомов углерода, или ароматическую группу, имеющую от 6 до 20 атомов углерода; или метящее средство, такое как производное кумарина.

4. Соединение по п.3, где по меньшей мере один из A'xx, A'yy и m определен следующим образом:  
A'xx в формулах (Ia) и (Ia') представляет собой аминокислоту, выбранную из Asp, Dap, Lys, Orn и гомо-Lys;

A'yy в формулах (Ia), (Ia') и (Ib) представляет собой аминокислоту, выбранную из Phe, Ala, Trp, Phg и Tyr;

m является целым числом от 1 до 4.

5. Соединение по любому из пп.1-4, где в формуле (Ia<sub>1</sub>)

S представляет собой двухвалентную группу, выбранную из двухвалентной алкиленовой группы, двухвалентной алкиниленовой группы, двухвалентной алкиниленовой группы и двухвалентного полиалкиленоксида.

6. Соединение по п.5, где в формуле (Ia<sub>1</sub>)

S представляет собой двухвалентную группу, имеющую формулу  $-(CH_2)_q-Azz_5-$  или  $-(OCH_2CH_2)_q-Azz_5-$ ; где q является целым числом от 1 до 50; и Azz<sub>5</sub> отсутствует или представляет собой солибилизирующую группу, выбранную из аминокислоты, такой как Arg или (D)-Arg, и двухвалентную группу, содержащую аммониевую группу, сульфатную группу, сульфонатную группу или пиррофосфатдизфирную группу.

7. Соединение по любому из пп.1-6, где в формуле (Ia<sub>1</sub>)

S представляет собой двухвалентную группу, имеющую формулу  $-(CH_2)_q-Azz_5-Y-$ , или двухвалентную группу, имеющую формулу  $(OCH_2CH_2)_q-Azz_5-Y-$ ;

где Y представляет собой двухвалентный фрагмент, ковалентно связанный с C-концом Azz<sub>5</sub> и с фрагментом V; если Azz<sub>5</sub> отсутствует, Y ковалентно связан с алкильной группой или полиэтиленоксидной группой и с фрагментом V; Y получен из соединения, выбранного из малеимидов, триазолов, в особенности 1,2,3-триазола, гидразинов, карбонилсодержащих групп и их производных; q является целым числом от 1 до 50; и Azz<sub>5</sub> имеет значение, определенное в п.6.

8. Соединение по пп.1, 2 или 3, где соединение формулы (I) и формулы (Ia) выбрано из: W<sub>1</sub>-Arg-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>-Arg-Lys(T)-гомо-Phe-Z, W<sub>1</sub>-Cit-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>-Cit-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, W<sub>1</sub>-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>-Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, W<sub>1</sub>-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>-Mal-Phe-Cit-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, W<sub>1</sub>-Mal-Phe-Lys-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>-Mal-гомо-Phe-Arg-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>-Mal-гомо-Phe-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>-Mal-гомо-Phe-Cit-Lys(T)-Tyr(OR<sub>1</sub>)-Z, где R<sub>1</sub>  $-(CH_2CH_2O)_n-$ , R<sub>2</sub>, где R<sub>2</sub> является атомом водорода или метильной группой, и n1 является целым числом от 2 до 24, например 12, W<sub>1</sub>-Mal-Cit-Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>-Mal-Cit-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, W<sub>1</sub>-Mal-Arg-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, W<sub>1</sub>-Cit-(Lys(D<sub>2</sub>)-Phe)<sub>m</sub>-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>-Cit-(Lys(D<sub>2</sub>)-Phe)<sub>m</sub>-Lys(T)-гомо-Tyr-Z, W<sub>1</sub>-Cit-(Lys(D<sub>2</sub>)-Phe)<sub>m</sub>-Lys(T)-Tyr(OR<sub>1</sub>)-Z, где R<sub>1</sub>  $-(CH_2CH_2O)_n-$ , R<sub>2</sub>, где R<sub>2</sub> является атомом водорода или метильной группой, и n1 является целым числом от 2 до 24, например 12, W<sub>1</sub>-(Lys(D<sub>2</sub>)-Phe)<sub>m</sub>-Lys(T)-Phe-Z, W<sub>1</sub>-Phe-(Phe-Lys(D<sub>2</sub>))<sub>m</sub>-Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>-(Phe-Lys(D<sub>2</sub>))<sub>m</sub>-Lys(T)-Tyr-Z, W<sub>1</sub>-Phe-(Phe-Lys(D<sub>2</sub>))<sub>m</sub>-Lys(T)-гомо-Tyr-Z и W<sub>1</sub>-Arg-(Phe-Lys(D<sub>2</sub>))<sub>m</sub>-Lys(T)-Tyr(OR<sub>1</sub>)-Z;

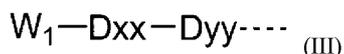
и соединение формулы (I') выбрано из W<sub>1</sub>-Arg-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>-Arg-Ser-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>-Cit-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>-Cit-Ser-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>-Cit-гомо-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>-Ser-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>-Mal-Phe-Cit-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>-Mal-гомо-Phe-Cit-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>-Mal-Phe-Arg-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>-Mal-Cit-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>-Mal-Phe-Ser-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>-Mal-Ala-Phe-Lys(T)-Z, W<sub>1</sub>-Mal-Cit-Ser-Lys(T)-Z и W<sub>1</sub>-Mal-Arg-гомо-Phe-Lys(T)-Z,

где W<sub>1</sub>, T, Z, D<sub>2</sub> и m имеют значения, определенные в пп.1, 2 или 3.

9. Соединение по любому из пп.2-8, где каждый фрагмент, полученный из противоопухолевого лекарственного средства, независимо выбран из алкилирующих средств, алкалоидов, таких как таксаны и майтанзиноиды, антиметаболиты, гормональные терапии, ингибиторы киназ, радиоизотопов и/или их фармацевтически приемлемых солей.

10. Соединение по любому из пп.2-9, где каждый фрагмент, полученный из лекарственного средства, независимо получен из аманитина, дуокармицина, майтанзина, тубулизина, калихеамицина, камптотецина, SN-38, таксола, дауномицина, винбластина, доксорубицина, метотрексата, пирролбензодиазепина или радиоизотопов и/или их фармацевтически приемлемых солей.

11. Соединение по любому из пп.3, 5, 7, 8, 9 и 10, где каждый фрагмент D<sub>1</sub> независимо представлен следующей формулой (III):



где

W<sub>1</sub> представляет собой фрагмент, полученный из аманитина, дуокармицина, ауристатиона, майтанзина, тубулизина, калихеамицина, камптотецина, SN-38, таксола, дауномицина, винбластина, доксорубицина, метотрексата, пирролбензодиазепина или радиоизотопов и/или их фармацевтически приемлемых солей;

D<sub>xx</sub> представляет собой одинарную ковалентную связь или аминокислоту, выбранную из Phe, Leu, Ile, гомо-Phe, Trp, Val и Ala, где одинарная ковалентная связь или аминокислота необязательно присое-

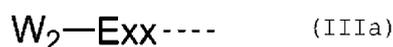
динены к фрагменту  $W_1$  через двухвалентный фрагмент, выбранный из малеимидов, триазолов, гидразинов, карбонилсодержащих групп и их производных;

$D_{yy}$  представляет собой одинарную ковалентную связь, Phe или аминокислоту, выбранную из Arg, Lys, Cit, Orn, Dar и Dab;

при условии, что, если  $D_{xx}$  является аминокислотой,  $D_{yy}$  является Phe или аминокислотой, выбранной из Arg, Lys, Cit, Orn, Dar и Dab, и если  $D_{xx}$  является одинарной ковалентной связью,  $D_{yy}$  является одинарной ковалентной связью, Phe или аминокислотой, выбранной из Arg, Lys, Cit, Orn, Dar и Dab;

и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к N-концу  $A_{xx}$  в формуле (I), N-концу  $A_{yy}$  в формуле (I'), N-концу  $A'_{xx}$  в формулах (Ia) и (Ib) или N-концу  $A'_{yy}$  в формуле (Ia').

12. Соединение по любому из пп.3-11, где каждый фрагмент  $D_2$  независимо представлен следующей формулой (IIIa):



где

$W_2$  представляет собой фрагмент, полученный из аманитина, дуокармицина, ауристатиона, майтанзина, тубулизина, калихеамицина, камптотецина, SN-38, таксола, дауномицина, винбластинина, доксорубицина, метотрексата, пирролбензодиазепина или радиоизотопов и/или их фармацевтически приемлемых солей;

$E_{xx}$  представляет собой одинарную ковалентную связь или двухвалентный фрагмент, выбранный из малеимидов, триазолов, гидразинов, карбонилсодержащих групп, аминокислот, дипептидных фрагментов и их производных;

и пунктирная линия указывает ковалентное присоединение к боковой цепи  $A'_{xx}$  в формулах (Ia) и (Ia'), боковой цепи  $A'_{xx}$  или C-концу  $S_{xx}$ , если таковой присутствует, в формуле (Ib).

13. Соединение по любому из пп.1-3, где  $V$  представляет собой антитело или фрагмент антитела, выбранные из одноцепочечного антитела, моноклонального антитела, одноцепочечного моноклонального антитела, фрагмента моноклонального антитела, химерного антитела, фрагмента химерного антитела, доменного антитела или его фрагмента.

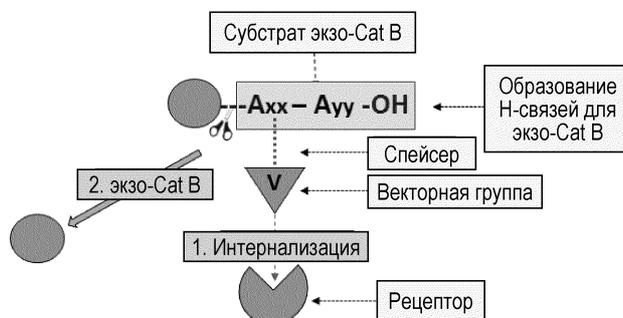
14. Соединение по любому из пп.1-3, где опухолевая клетка выбрана из клеток лимфомы, клеток миеломы, клеток рака почки, клеток рака молочной железы, клеток рака предстательной железы, клеток рака яичника, клеток рака толстой и прямой кишки, клеток рака желудка, клеток плоскоклеточного рака, клеток мелкоклеточного рака легкого, клеток рака яичка и любых клеток, которые растут и делятся с нерегулируемой и повышенной скоростью, вызывая онкологические заболевания.

15. Фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество соединения по любому из пп.1-13 или его фармацевтически приемлемой соли и один или более компонентов, выбранных из носителя, разбавителя и других вспомогательных веществ.

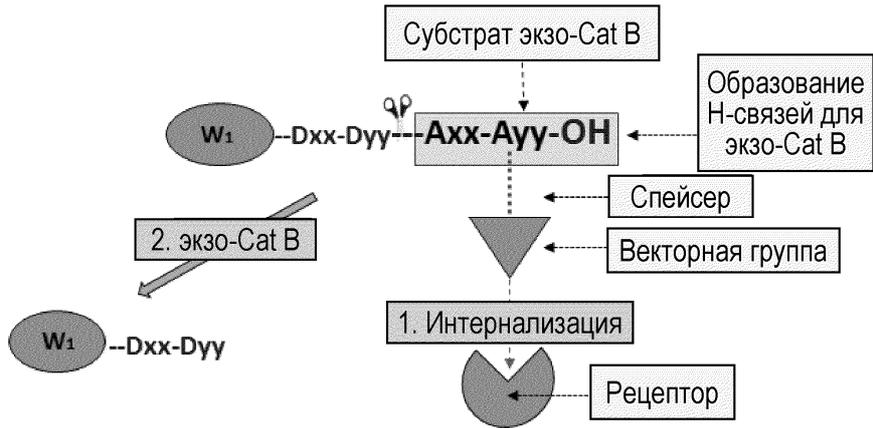
16. Применение соединения или композиции по любому из пп.1-15 для лечения или предотвращения рака.

17. Применение по п.16, где в способе лечения или предотвращения рака соединение или композицию вводят одновременно, до или после одного или более других терапевтических средств или терапий, таких как химиотерапевтические средства, лучевая терапия, иммунотерапевтические средства, средства для лечения аутоиммунных нарушений, средства для лечения инфекционных заболеваний, или других соединений формулы (I)/(I').

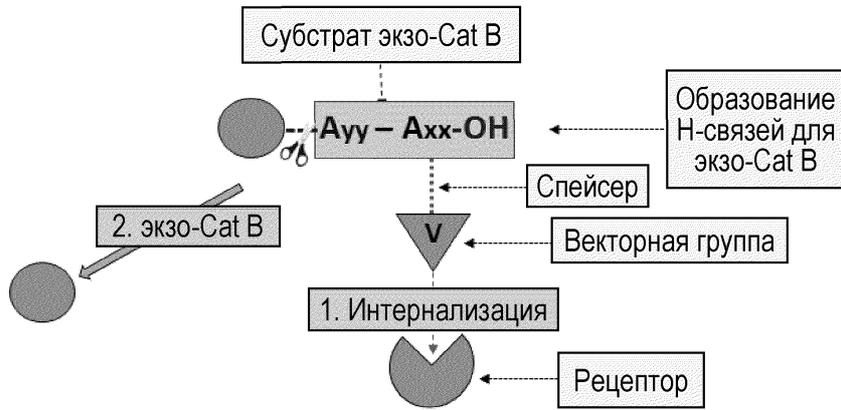
18. Способ лечения или предотвращения рака, где терапевтически эффективное количество соединения или композиции по любому из пп.1-15 вводят нуждающемуся в этом пациенту.



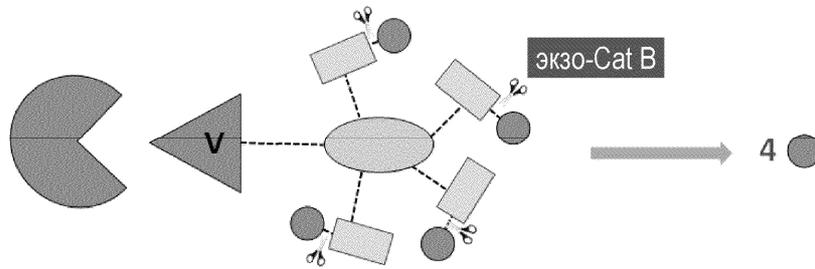
Фиг. 1а



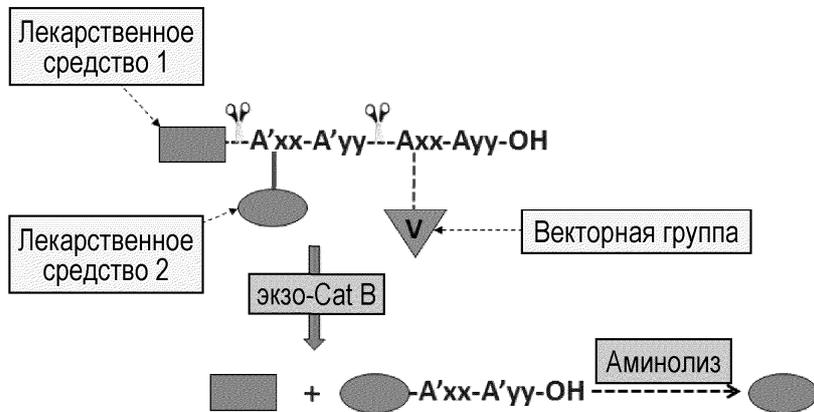
Фиг. 1b



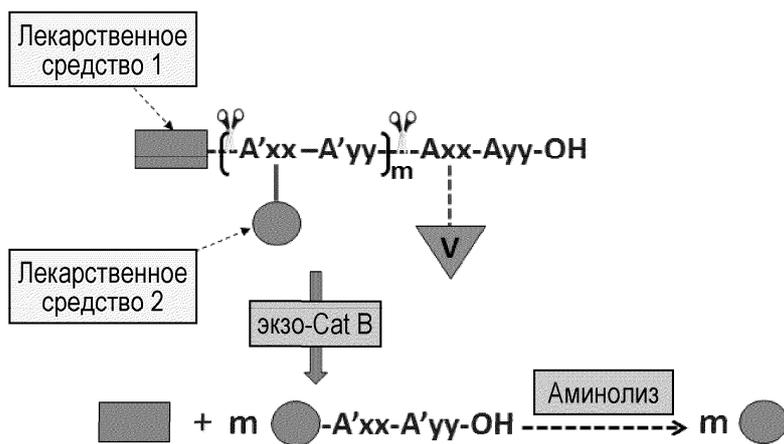
Фиг. 2



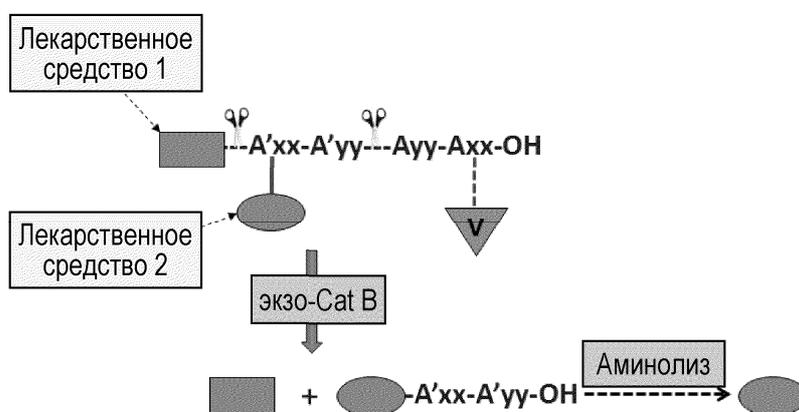
Фиг. 3



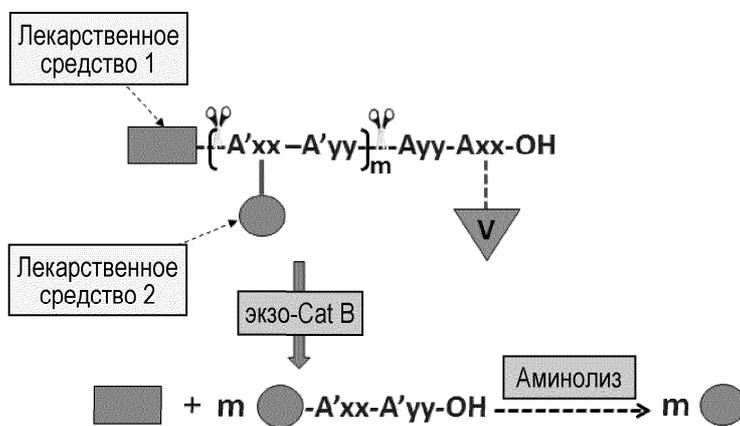
Фиг. 4



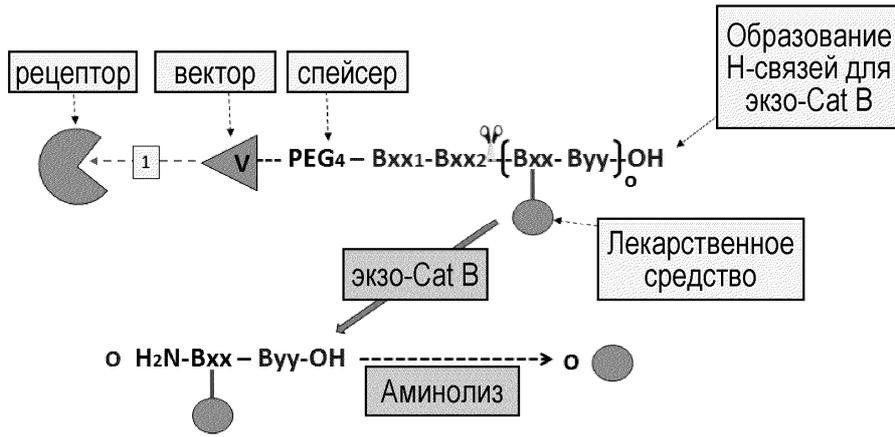
Фиг. 5



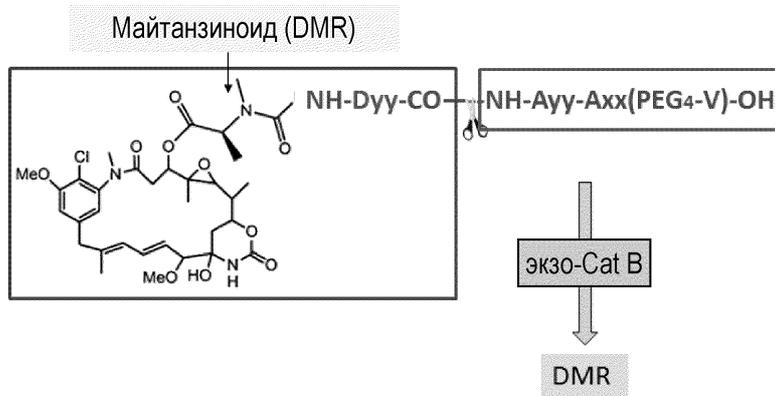
Фиг. 6



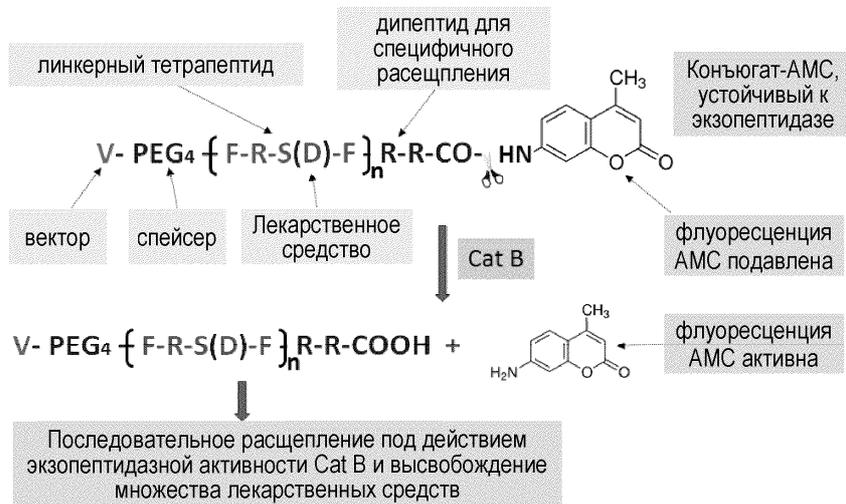
Фиг. 7



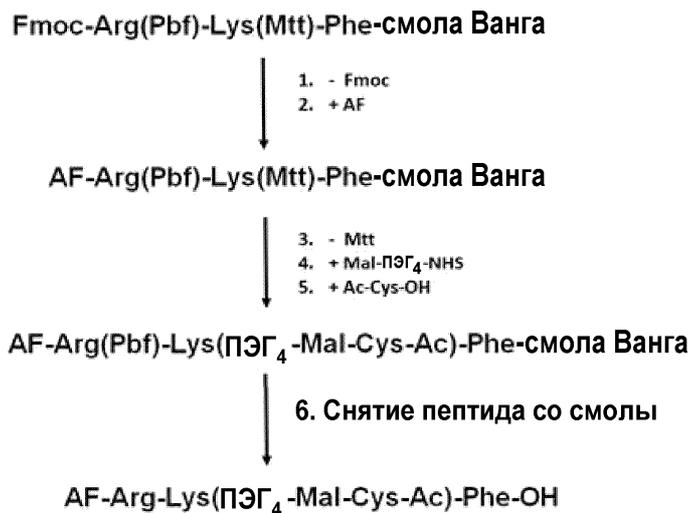
Фиг. 8



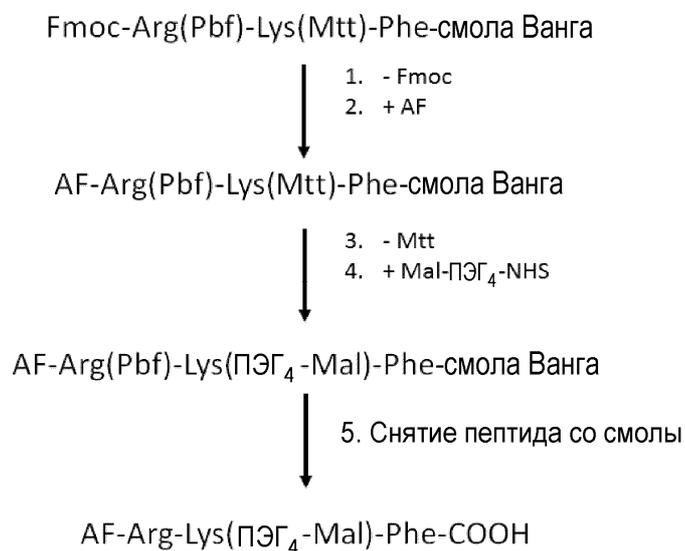
Фиг. 9



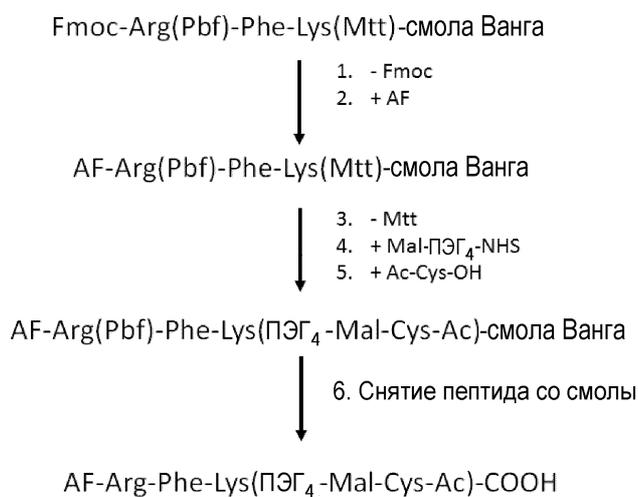
Фиг. 10



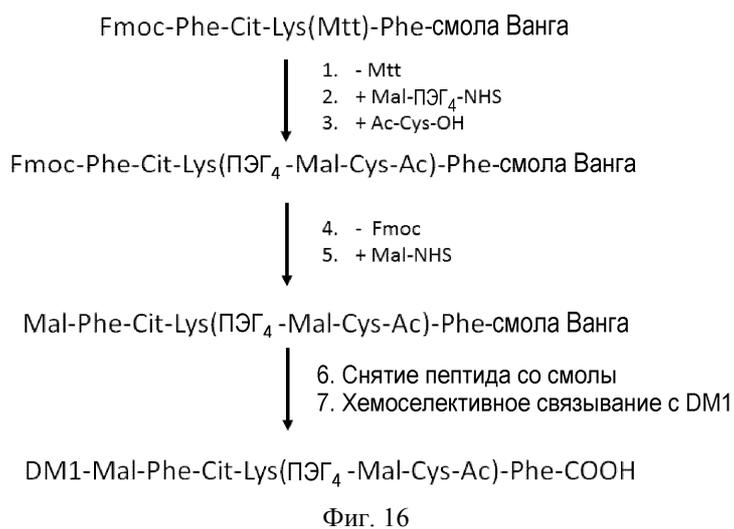
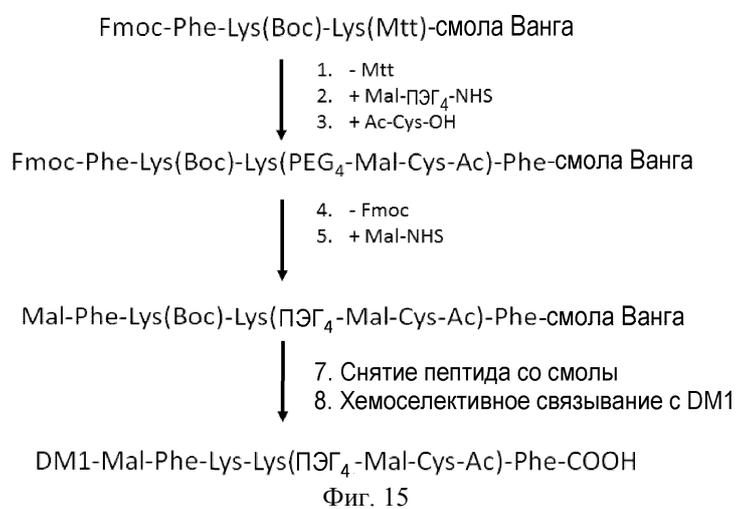
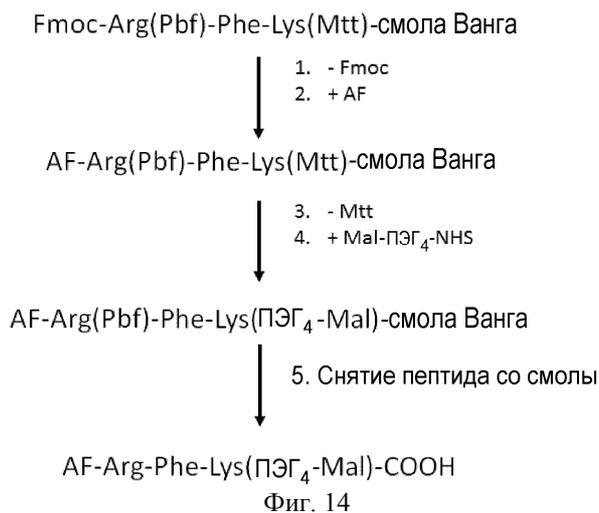
Фиг. 11

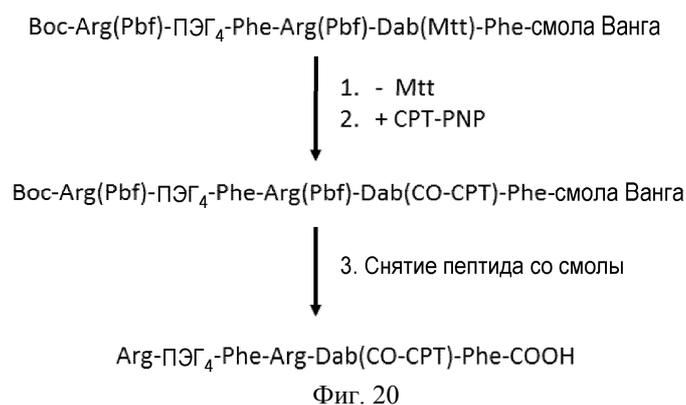
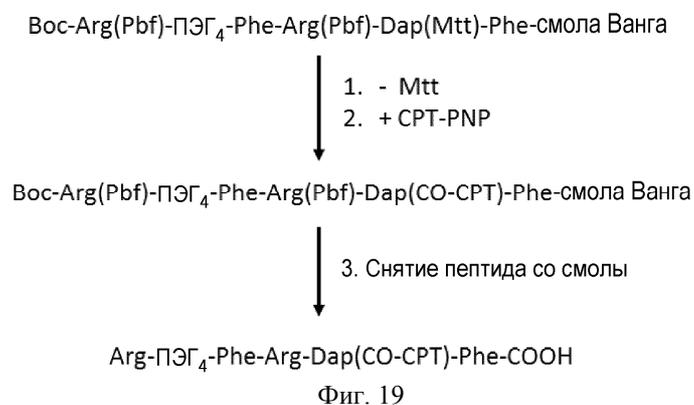
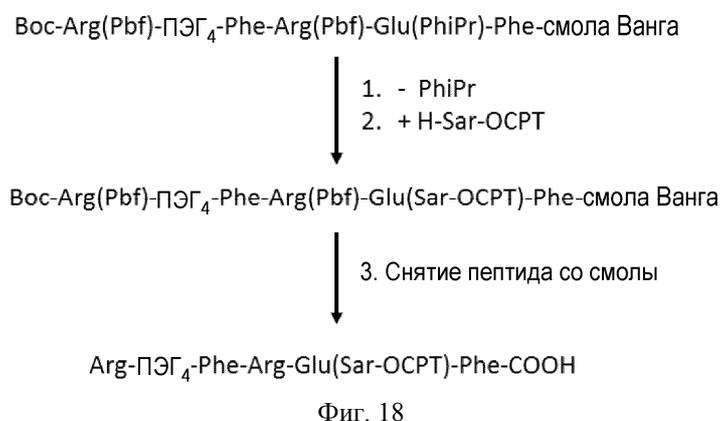
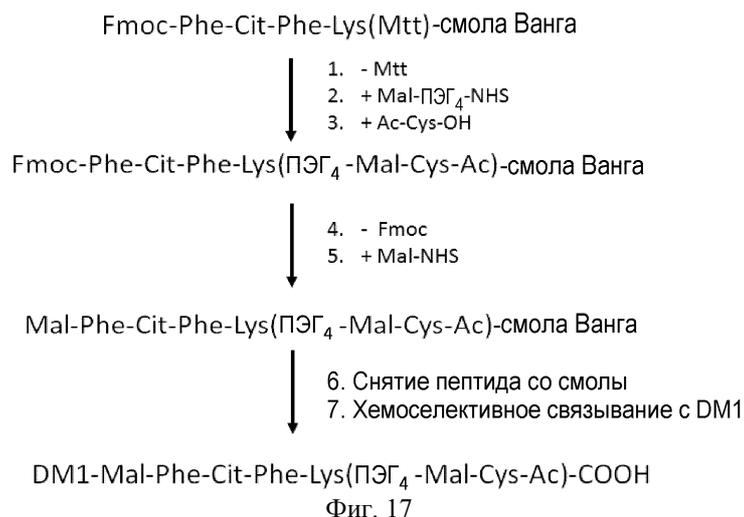


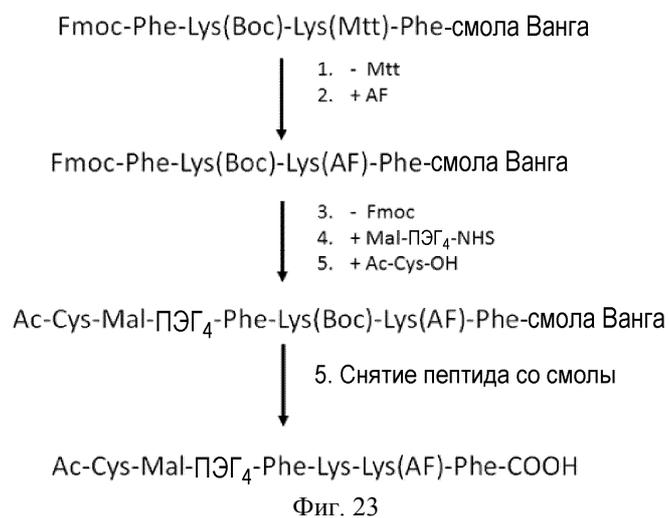
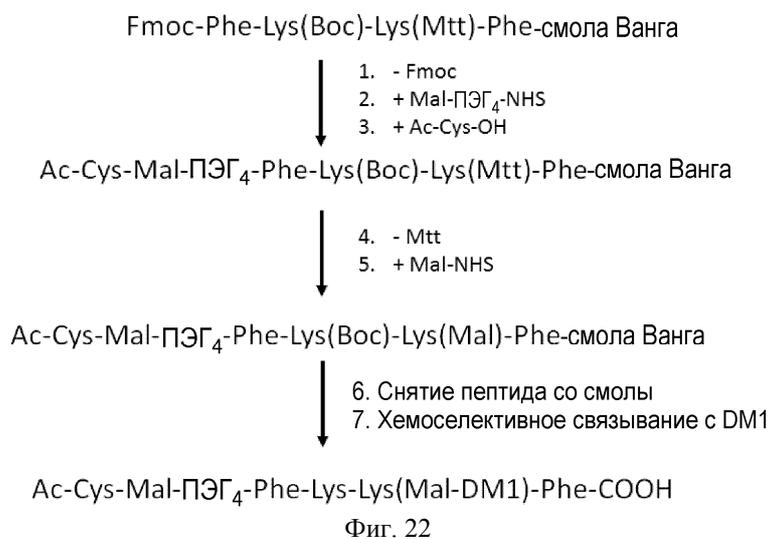
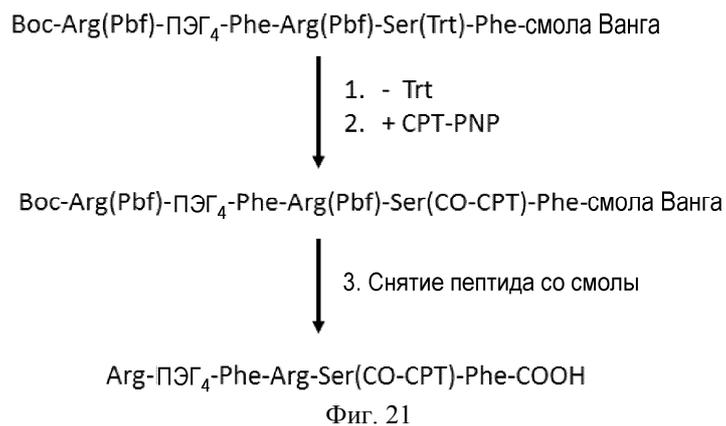
Фиг. 12

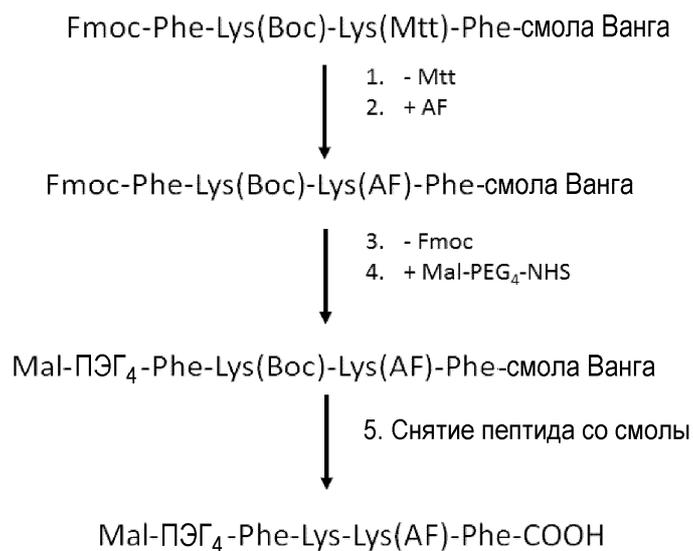


Фиг. 13

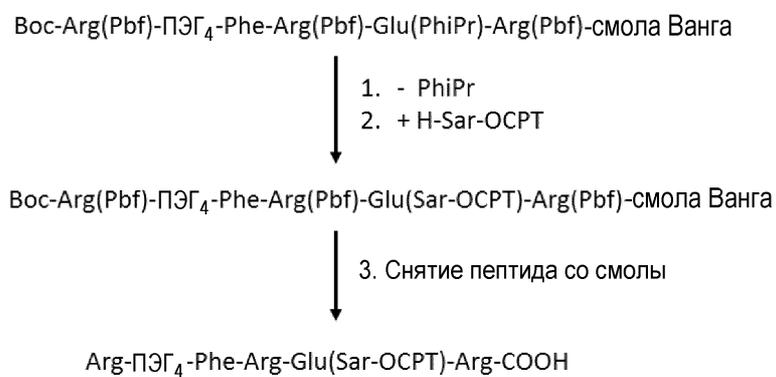




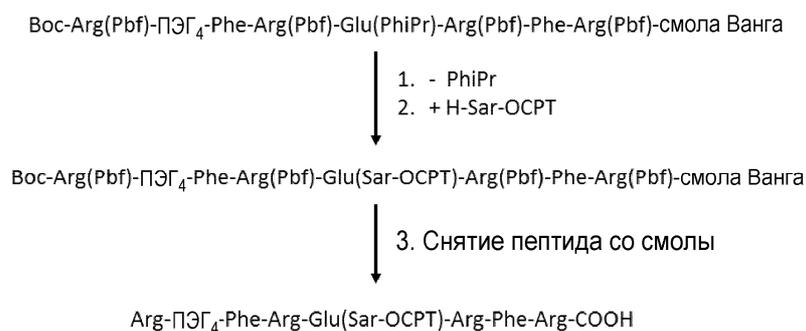




Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26

Вос-Arg(Pbf)-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg(Pbf)-Glu(PhiPr)-Phe-Glu(PhiPr)-Phe-смола Ванга

1. - PhiPr
2. + H-Sar-OCPT

Вос-Arg(Pbf)-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg(Pbf)-[-Glu(Sar-OCPT)-Phe-]<sub>2</sub>-смола Ванга

3. Снятие пептида со смолы

Arg-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg-[-Glu(Sar-OCPT)-Phe-]<sub>2</sub>-COOH

Фиг. 27

Вос-Arg(Pbf)-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Arg(Pbf)-Glu(PhiPr)-Arg(Pbf)-Phe-Arg(Pbf)-Glu(PhiPr)-Arg(Pbf)-смола Ванга

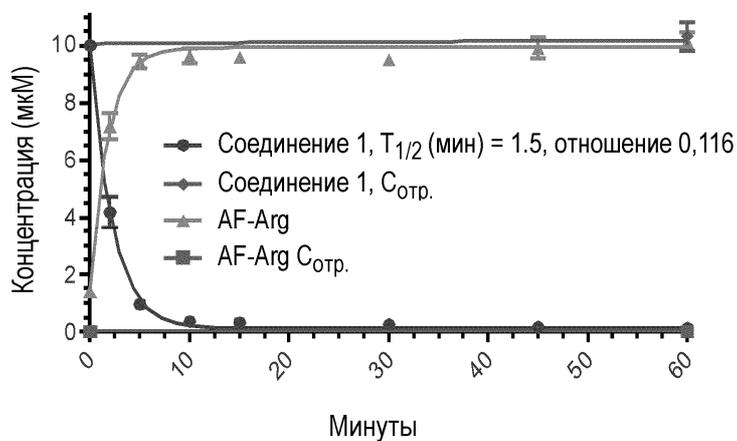
1. - PhiPr
2. + H-Sar-OCPT

Вос-Arg(Pbf)-ПЭГ<sub>4</sub>-[-Phe-Arg(Pbf)-Glu(Sar-OCPT)-Arg(Pbf)-]<sub>2</sub>-смола Ванга

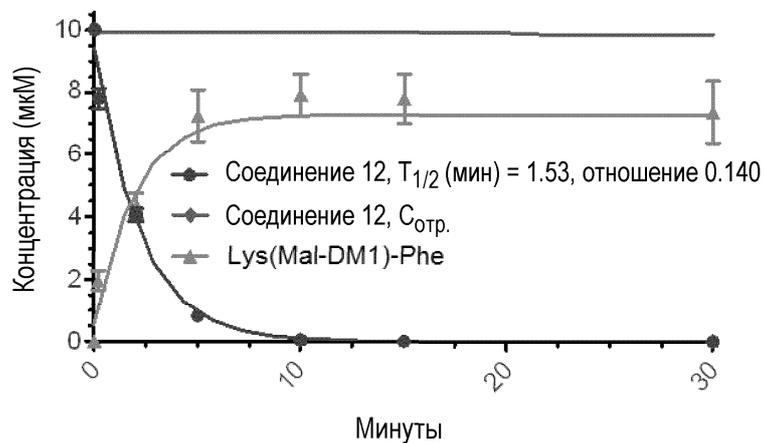
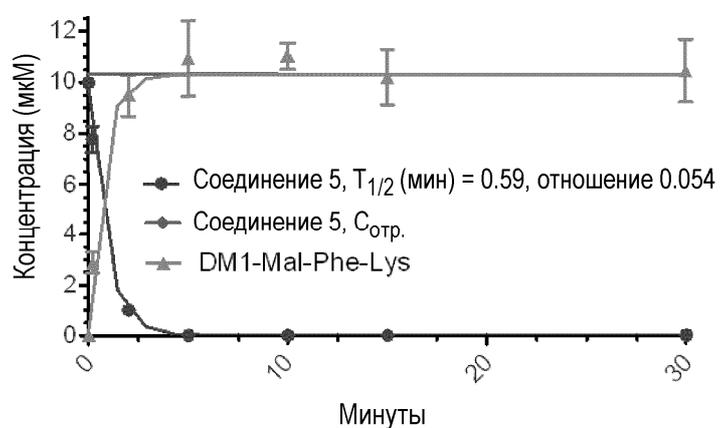
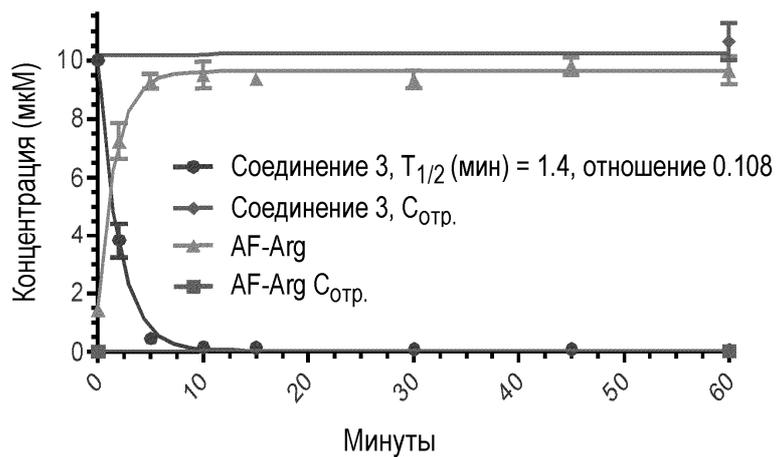
3. Снятие пептида со смолы

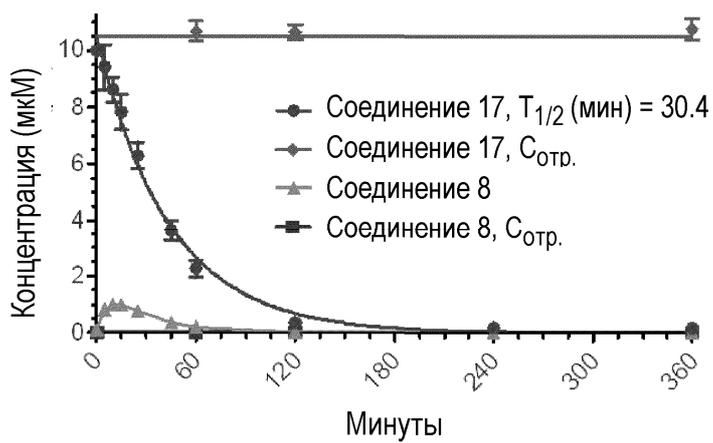
Arg-ПЭГ<sub>4</sub>-[-Phe-Arg-Glu(Sar-OCPT)-Arg-]<sub>2</sub>-COOH

Фиг. 28

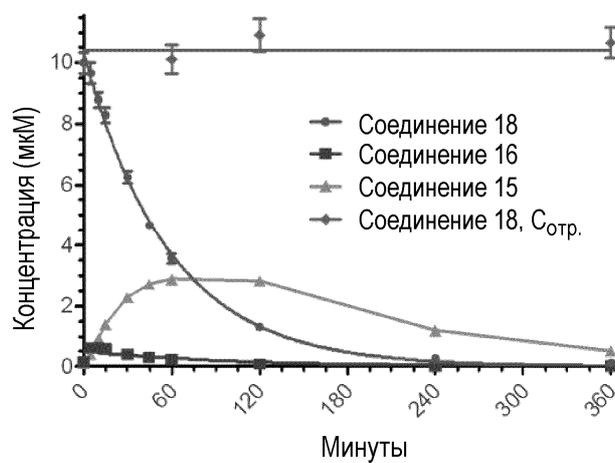


Фиг. 29

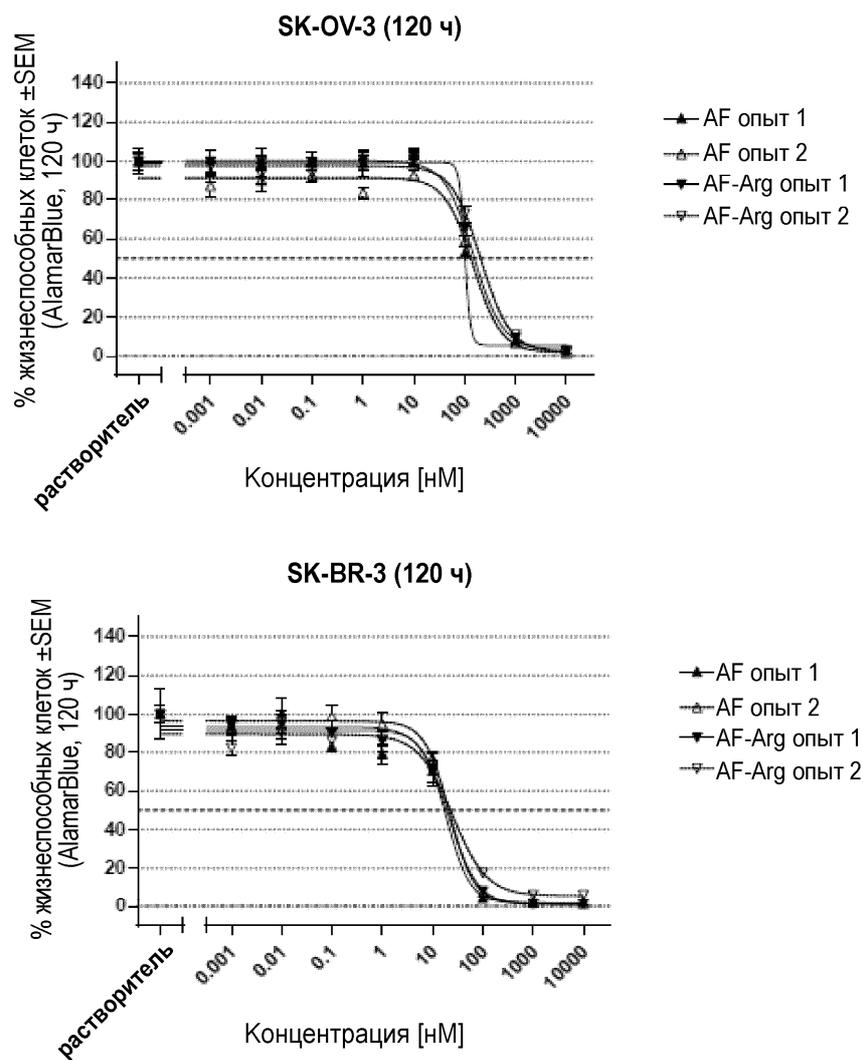




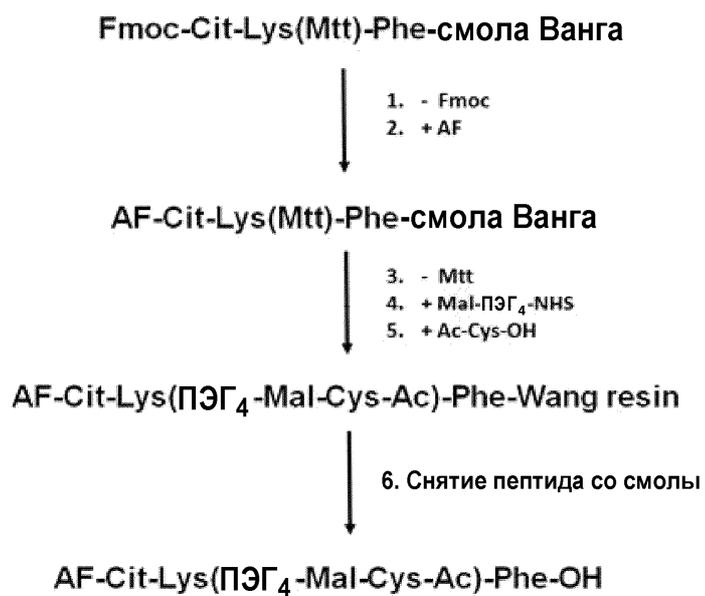
Фиг. 33



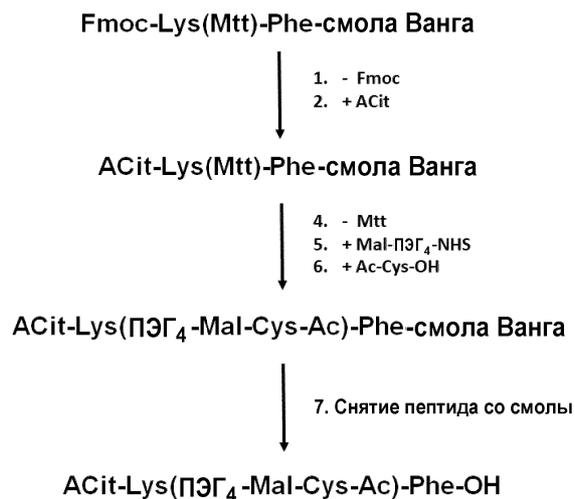
Фиг. 34



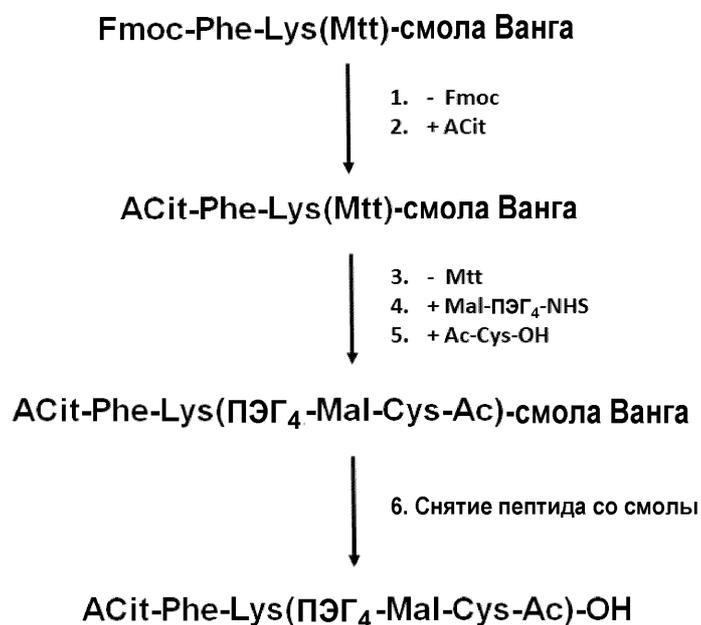
Фиг. 35



Фиг. 36



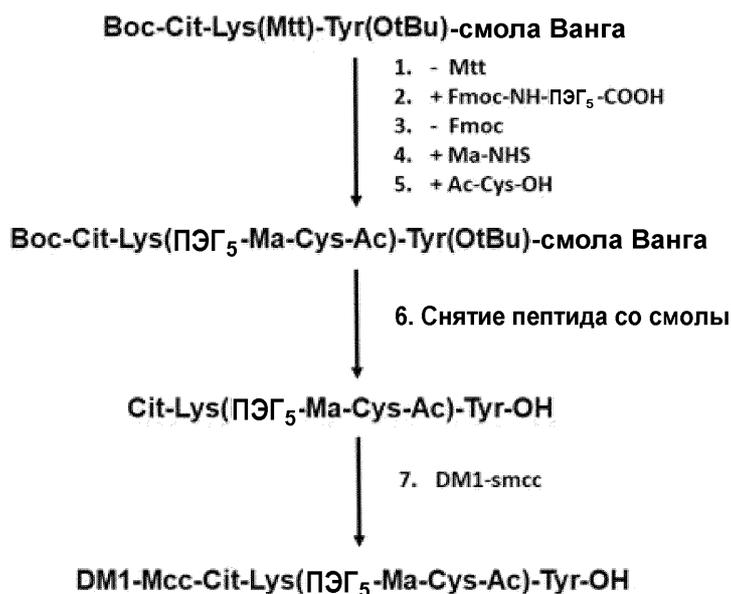
Фиг. 37



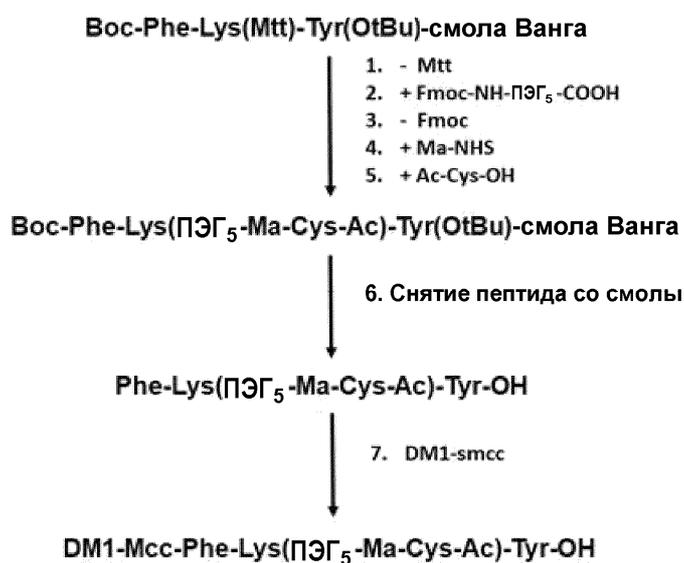
Фиг. 38



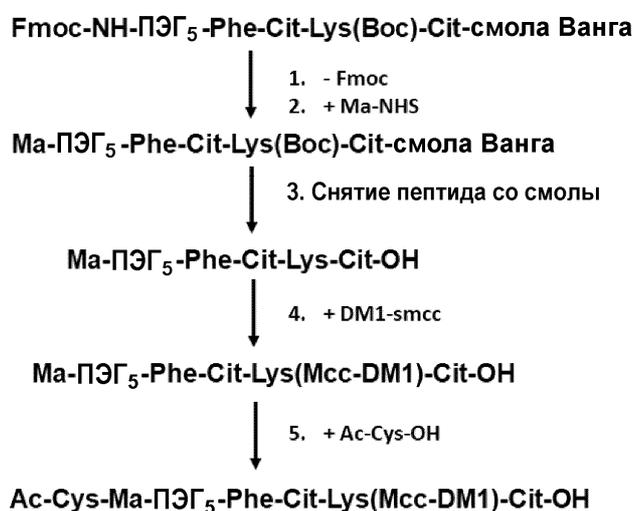
Фиг. 39



Фиг. 40



Фиг. 41



Фиг. 42

**Fmoc-NH-ПЭГ<sub>5</sub>-Phe-Cit-Lys(Вос)-Cit-смола Ванга**

- ↓  
 1. - Fmoc  
 2. + Ma-NHS

**Ma-ПЭГ<sub>5</sub>-Phe-Cit-Lys(Вос)-Cit-смола Ванга**

- ↓  
 3. Снятие пептида со смолы

**Ma-ПЭГ<sub>5</sub>-Phe-Cit-Lys-Cit-OH**

- ↓  
 4. + DM1-smcc

**Ma-ПЭГ<sub>5</sub>-Phe-Cit-Lys(Мсс-DM1)-Cit-OH**

Фиг. 43

**Fmoc-NH-ПЭГ<sub>5</sub>-Phe-Cit-Lys(Вос)-Tyr(OtBu)-смола Ванга**

- ↓  
 1. - Fmoc  
 2. + Ma-NHS

**Ma-ПЭГ<sub>5</sub>-Phe-Cit-Lys(Вос)-Tyr(OtBu)-смола Ванга**

- ↓  
 3. Снятие пептида со смолы

**Ma-ПЭГ<sub>5</sub>-Phe-Cit-Lys-Tyr-OH**

- ↓  
 4. + DM1-smcc

**Ma-ПЭГ<sub>5</sub>-Phe-Cit-Lys(Мсс-DM1)-Tyr-OH**

**Ac-Cys-Ma-ПЭГ<sub>5</sub>-Phe-Cit-Lys(Мсс-DM1)-Tyr-OH**

Фиг. 44

**Fmoc-Phe-Lys(Вос)-Lys(Mtt)-Phe-Phe-Lys(Вос)-смола Ванга**

- ↓  
 1. - Fmoc  
 2. + Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-NHS  
 3. + Ac-Cys-OH

**Ac-Cys-Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Lys(Вос)-Lys(Mtt)-Phe-Phe-Lys(Вос)-смола Ванга**

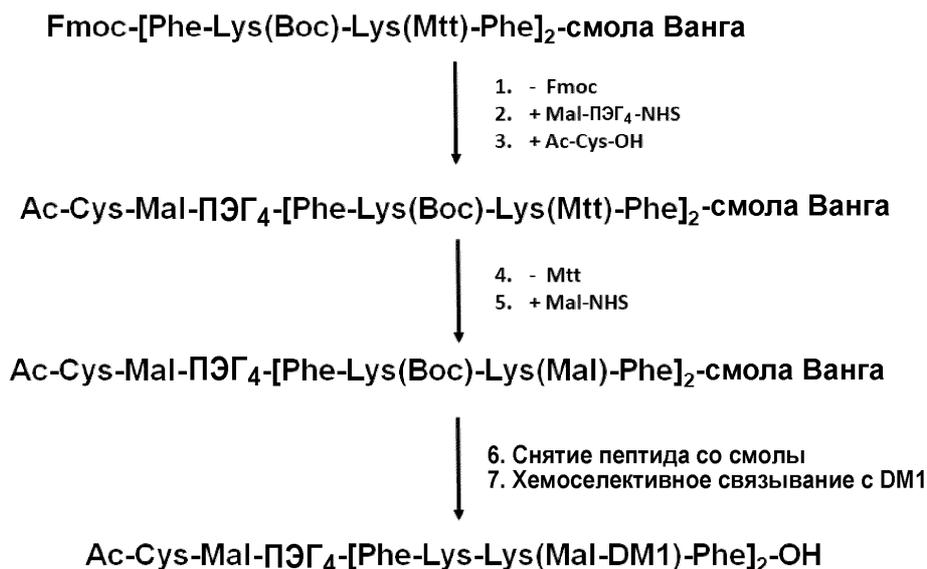
- ↓  
 4. - Mtt  
 5. + Mal-NHS

**Ac-Cys-Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Lys(Вос)-Lys(Mal)-Phe-Phe-Lys(Вос)-смола Ванга**

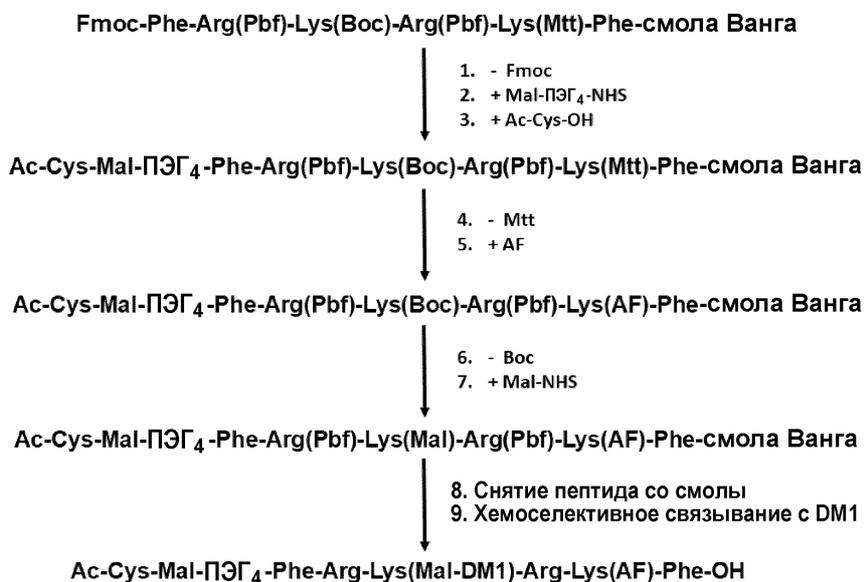
- ↓  
 6. Снятие пептида со смолы  
 7. Хемоселективное связывание с DM1

**Ac-Cys-Mal-ПЭГ<sub>4</sub>-Phe-Lys-Lys(Mal-DM1)-Phe-Phe-Lys-OH**

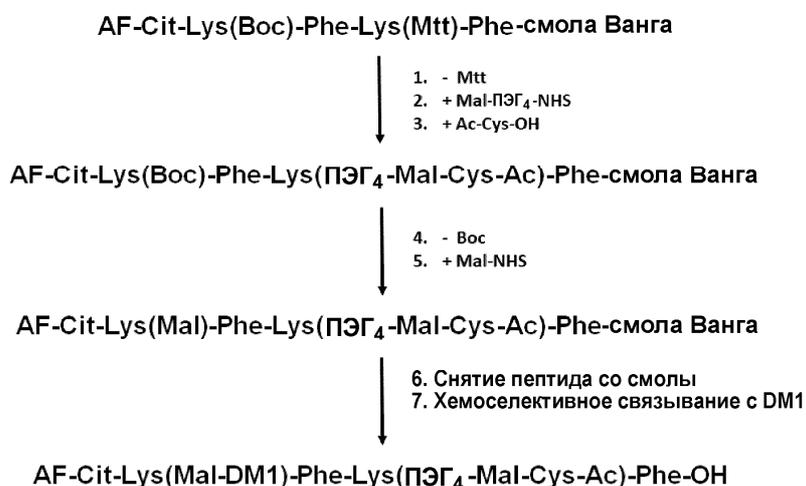
Фиг. 45



Фиг. 46



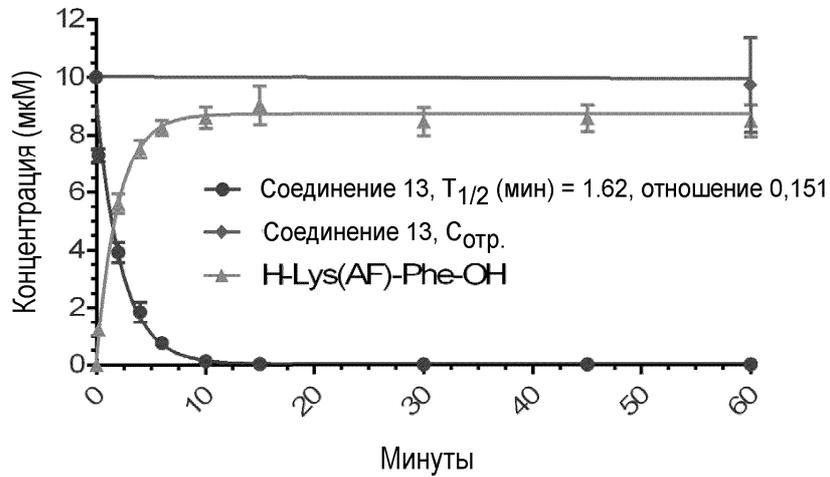
Фиг. 47



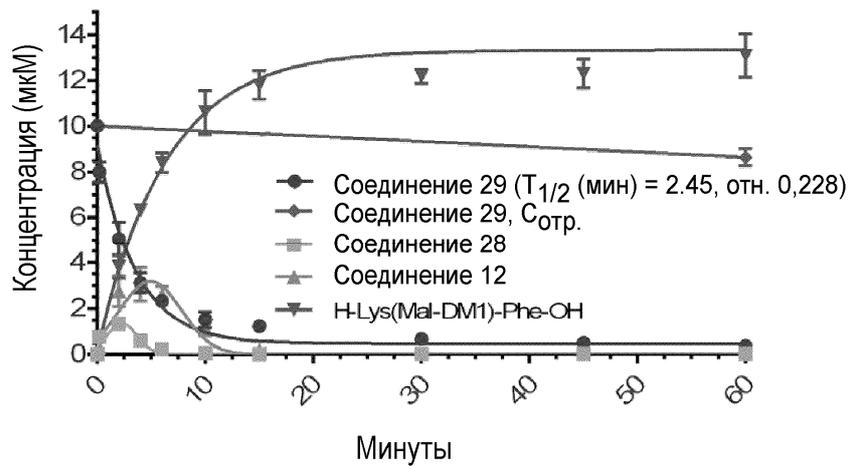
Фиг. 48



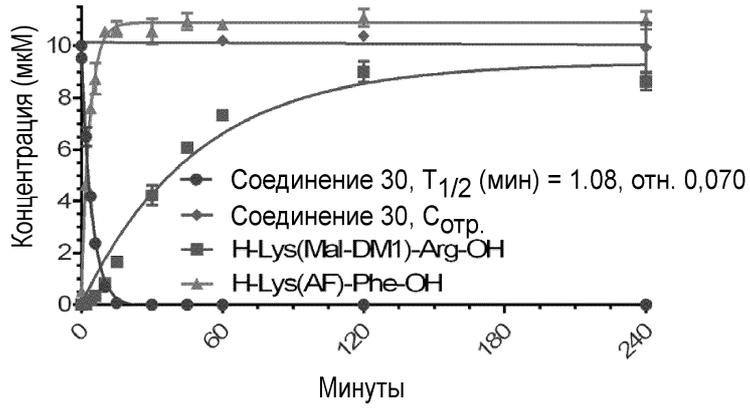
Фиг. 49



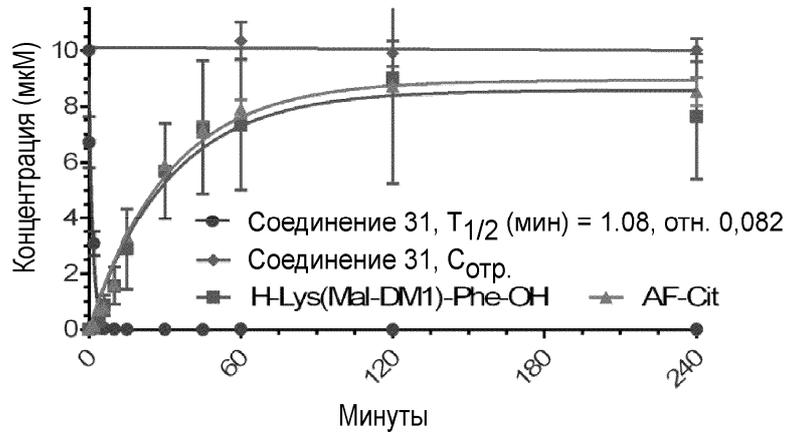
Фиг. 50



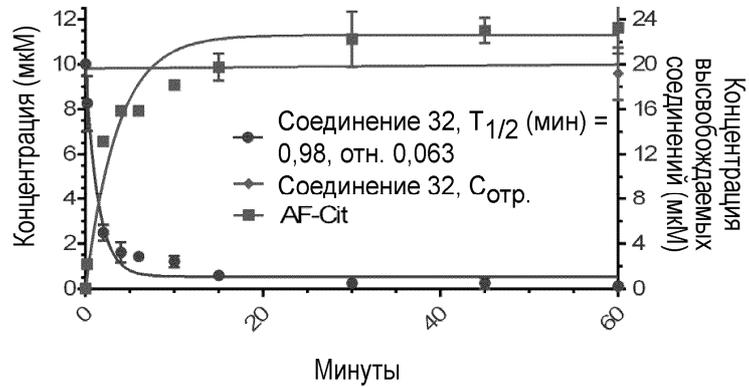
Фиг. 51



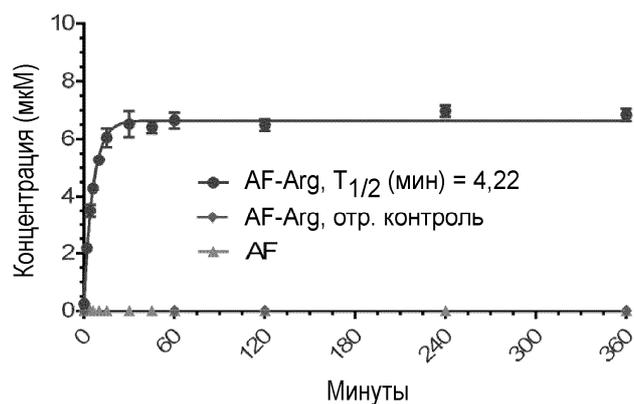
Фиг. 52



Фиг. 53

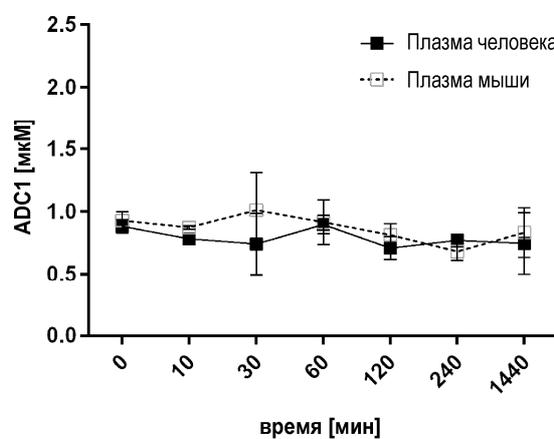


Фиг. 54



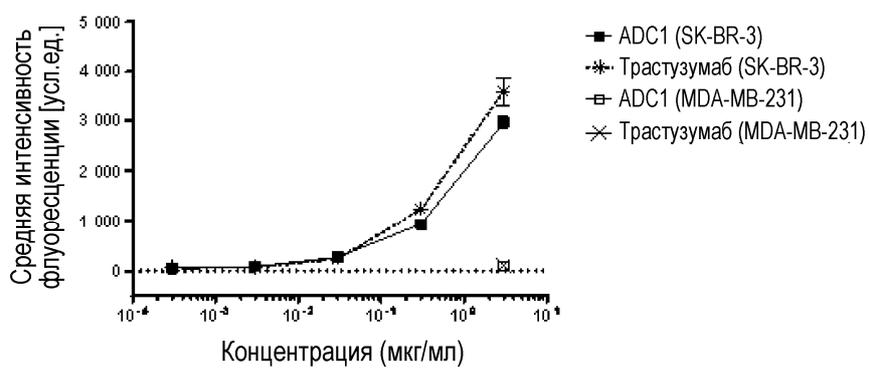
Фиг. 55

Стабильность ADC1 в плазме человека и мыши



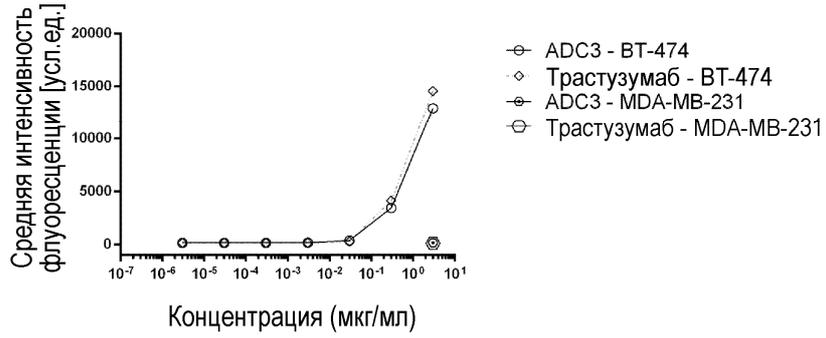
Фиг. 56

Аффинность связывания ADC1

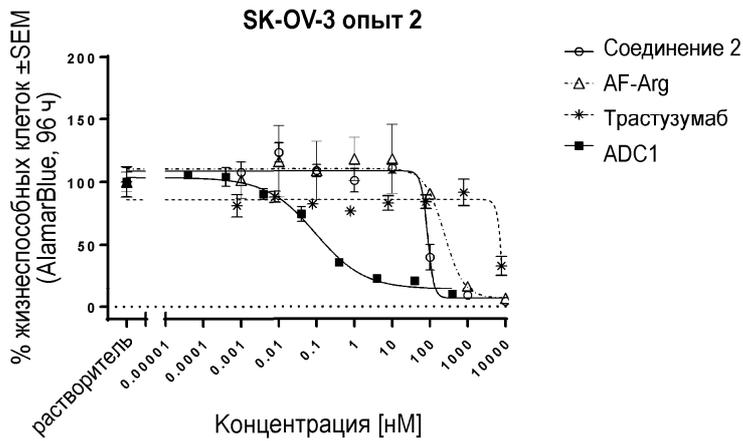
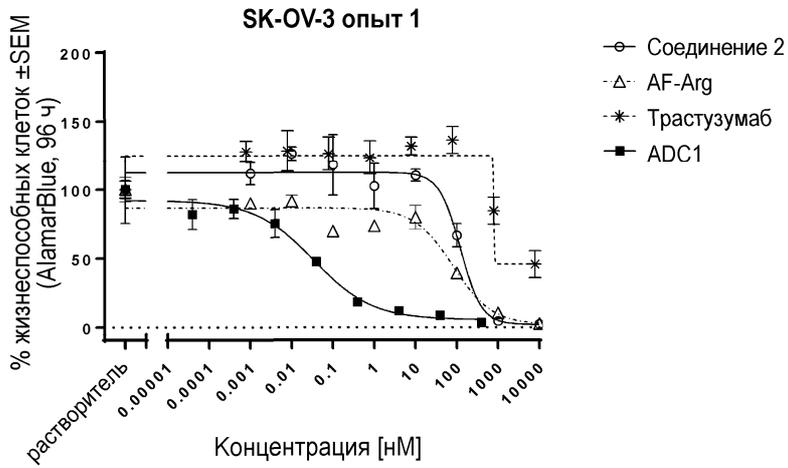


Фиг. 57

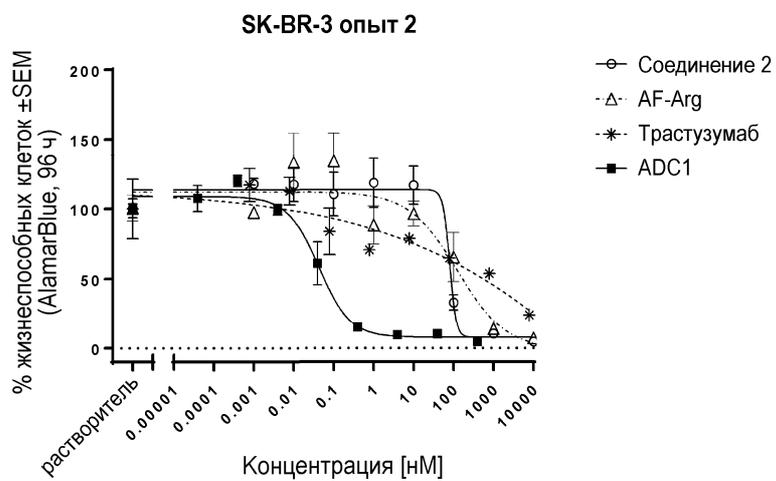
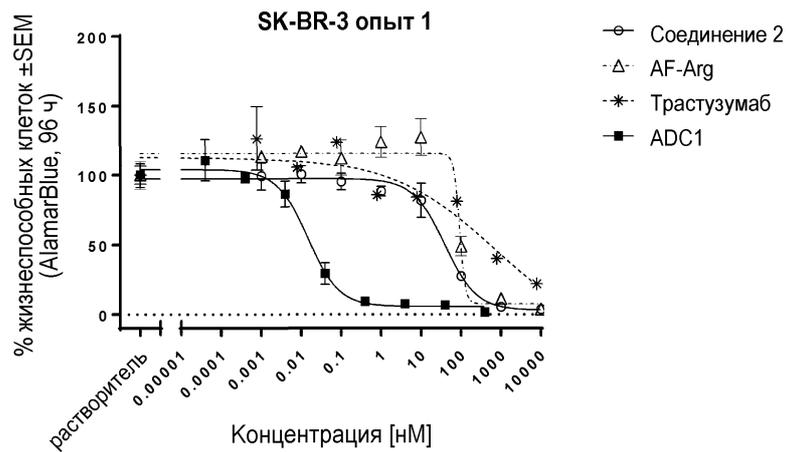
Аффинность связывания ADC3



Фиг. 58

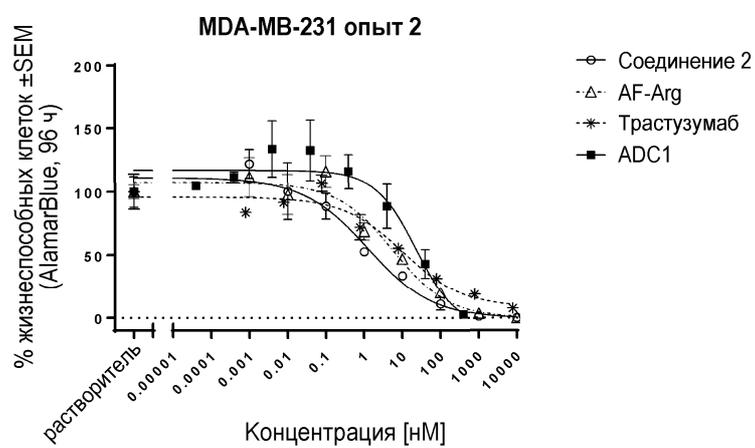
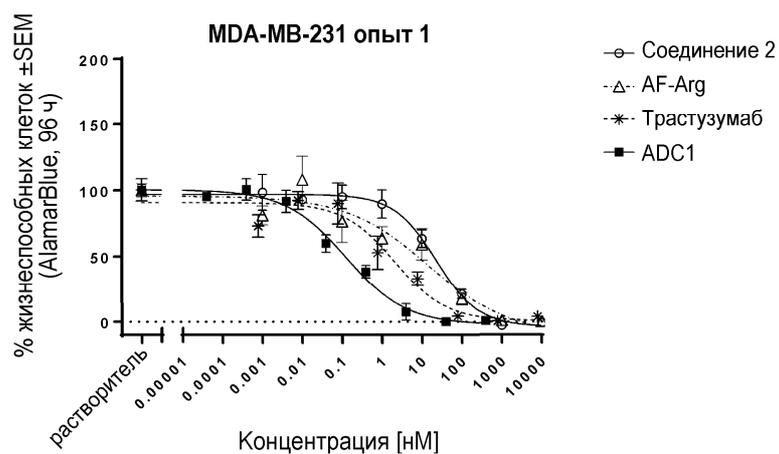


Фиг. 59а

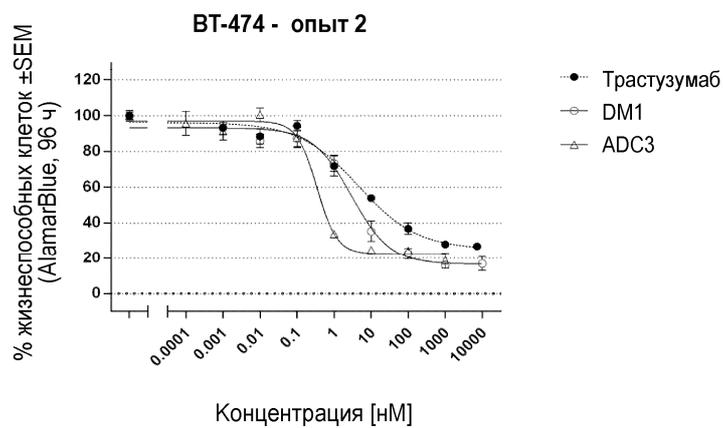
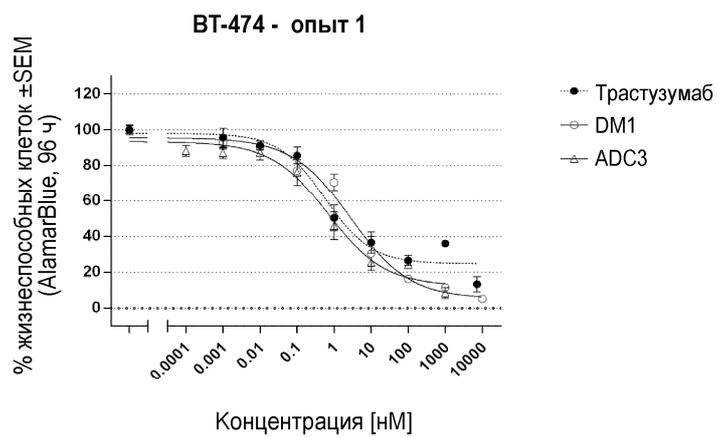


Фиг. 59b

## Цитотоксическая активность ADC1

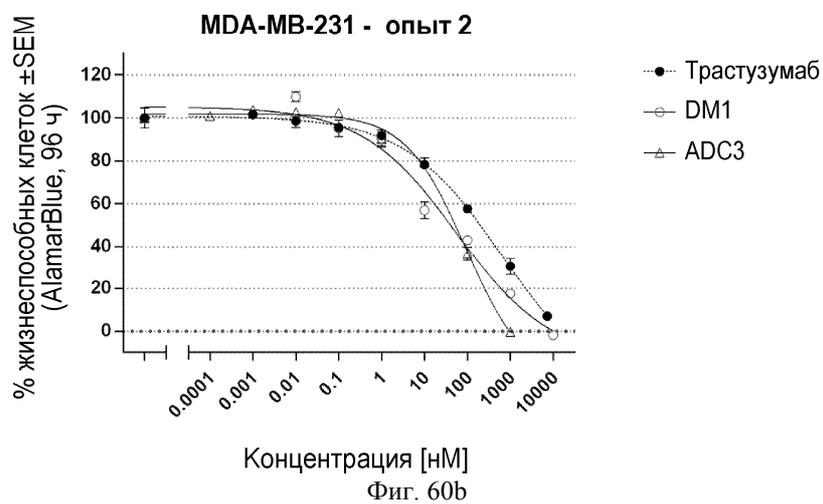
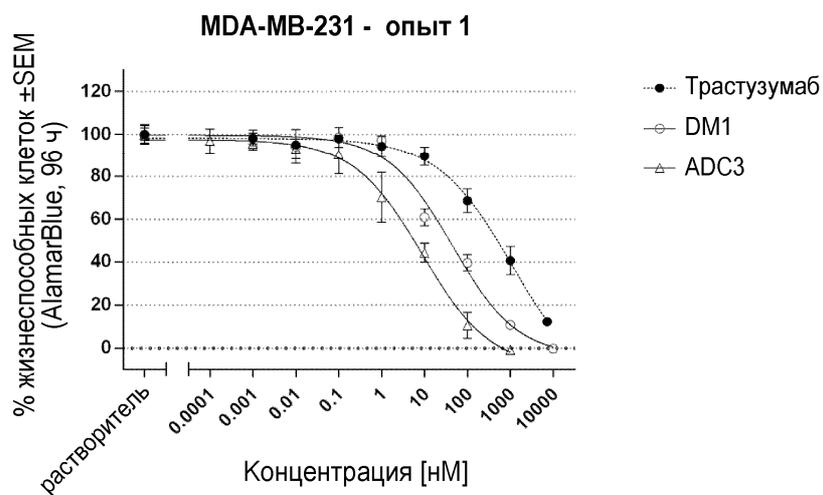


Фиг. 59с



Фиг. 60а

## Цитотоксическая активность ADC3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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