

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202393313** (13) **A2**

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

(43) Дата публикации заявки  
2024.03.29

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

(22) Дата подачи заявки  
2021.07.12

---

(54) **КОНЬЮГАТЫ БЕЛОК-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, СОДЕРЖАЩИЕ АНАЛОГИ  
КАМПТОТЕЦИНА, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) 63/051,172; 63/154,531

(32) 2020.07.13; 2021.02.26

(33) US

(62) 202390110; 2021.07.12

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

(72) Изобретатель:  
**Хан Эми (US)**

(74) Представитель:  
**Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,  
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,  
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин  
Ш.Ф. (RU)**

---

(57) В настоящем документе описаны конъюгаты белок-лекарственное средство и их композиции, которые можно применять, например, для мишень-специфической доставки терапевтических фрагментов, например аналогов и/или производных камптотецина. В некоторых вариантах осуществления обеспечены специфические и эффективные способы получения конструкций белок-лекарственное средство (например, конъюгатов антитело-лекарственное средство) с использованием комбинации методов трансглутаминазы и 1,3-циклоприсоединения. Предлагаются аналоги камптотецина, конъюгаты антитело-лекарственное средство и композиции, которые содержат глутаминил-модифицированные антитела и полезные нагрузки аналога камптотецина.

---

**202393313**

**A2**

**A2**

**202393313**

## **КОНЬЮГАТЫ БЕЛОК-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, СОДЕРЖАЩИЕ АНАЛОГИ КАМПТОТЕЦИНА, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/935819, поданной 13 июля 2020 года, и 63/154531, поданной 26 февраля 2021 года, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

### **Область техники, к которой относится изобретение**

[0002] Настоящее изобретение относится к конъюгатам белок-лекарственное средство (например, конъюгатам антитело-лекарственное средство), фармацевтическим композициям и способам лечения заболеваний с их помощью. Также обеспечены специфические и эффективные способы получения конструкций белок-лекарственное средство с использованием комбинации методов трансглутаминазы и 1,3-циклоприсоединения. Более конкретно, настоящее изобретение относится к конъюгатам белок-лекарственное средство (например, конъюгатам антитело-лекарственное средство), содержащим аналоги и производные камптотецина.

### **Перечень последовательностей**

[0003] Официальная копия перечня последовательностей подана одновременно с описанием посредством EFS-Web в виде бумажной копии перечня последовательностей в формате ASCII с названием файла 250298\_000244\_SL.txt и размером приблизительно 996 килобайт, и созданного 12 июля 2021 г. Перечень последовательностей, содержащийся в этой бумажной копии документа в формате ASCII, является частью описания и включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

[0004] Проллиферативные заболевания характеризуются неконтролируемым ростом и распространением аномальных клеток. Если распространение не контролировать, это может привести к смерти. Аномальная пролиферация, например рак, вызывается как внешними факторами (например, табаком, химическими веществами, радиацией и инфекционными организмами), так и внутренними факторами (наследственными

мутациями, состояниями иммунной системы, мутациями, возникающими в результате метаболизма). Эти причинные факторы могут действовать вместе или последовательно, чтобы инициировать или способствовать аномальной пролиферации. Рак лечится путем оперативного вмешательства, облучения, химиотерапии, гормонов и иммунотерапии. Однако существует потребность в более эффективных антипролиферативных лекарственных средствах.

**[0005]** Идеальная антипролиферативная терапия должна обеспечивать таргетную доставку высокоцитотоксических агентов к опухолевым клеткам и не затрагивать нормальные клетки. Общепринятые химиотерапевтические методы лечения ограничены из-за токсических побочных эффектов, возникающих в результате эффектов лекарственного средства на неопухолевые клетки. Были опробованы различные подходы к таргетной доставке лекарственных средств, включая применение конъюгатов нацеленных на опухоль зондов (таких как антитела или факторы роста) с токсинами, такими как токсины синегнойной палочки или дифтерии, которые останавливают синтез белков и клеток. Однако побочные эффекты включают реакцию иммунной системы на нечеловеческие компоненты конъюгатов. Кроме того, период полувыведения конъюгатов лекарственных средств был ограничен из-за элиминации из кровотока посредством почечной фильтрации и схематической деградации, поглощения ретикулоэндотелиальной системой (RES) и накопления в нецелевых органах и тканях.

**[0006]** В другом подходе используются пассивные носители лекарственных средств, такие как полимеры, липосомы и полимерные мицеллы, чтобы воспользоваться гиперпроницаемостью эндотелия сосудов опухолевой ткани. Полимерные лекарственные средства и макромолекулы накапливаются в солидных опухолях благодаря повышенной проницаемости и механизму удержания. Однако препятствия для применения таких таргетных доставок включают быстрое выведение чужеродных частиц из крови, а также технологические трудности в получении высокостандартизированных, фармацевтически приемлемых систем доставки лекарственных средств с необходимой специфичностью и селективностью для связывания опухолевых клеток.

**[0007]** Белковые конъюгаты, такие как конъюгаты антител, используют селективное связывание связывающего агента для доставки полезной нагрузки к мишеням в тканях субъекта. Полезная нагрузка может представлять собой терапевтический фрагмент, способный воздействовать на мишень.

**[0008]** Доступно несколько методов конъюгации линкеров и полезных нагрузок с антителами. Многие конъюгаты получают путем неселективного ковалентного присоединения к остаткам цистеина или лизина в антителе. Этот неселективный метод может привести к образованию гетерогенной смеси продуктов с конъюгациями в различных сайтах и с разным количеством конъюгаций на антитело. Таким образом, в данной области существует потребность в способах и методах, которые обеспечивают сайт-селективную конъюгацию антител.

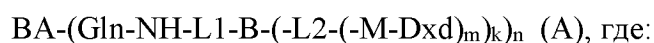
**[0009]** В данной области существует потребность в дополнительных безопасных и эффективных противоопухолевых нацеливающих агентах, которые могут связываться с различными антигенами, чтобы обеспечить улучшенные методы лечения заболеваний, таких как рак, для применения в монотерапии и комбинированных терапиях. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение удовлетворяет потребности и обеспечивает другие преимущества.

**[0010]** Вышеизложенное обсуждение представлено исключительно для обеспечения лучшего понимания природы проблем, стоящих перед данной областью техники, и никоим образом не должно толковаться как признание предшествующего уровня техники, а цитирование какой-либо ссылки здесь не должно рассматриваться как признание того, что такая ссылка представляет собой «известный уровень техники» настоящей заявки.

### **Краткое описание изобретения**

**[0011]** Ниже описаны различные неограничивающие аспекты и варианты осуществления изобретения.

**[0012]** В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает соединение, имеющее структуру в соответствии с формулой (A):

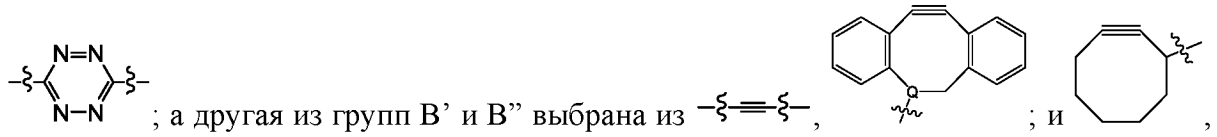


VA представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

Gln представляет собой остаток глутамина;

L1 отсутствует или представляет собой первый линкер;

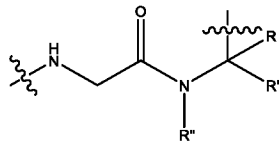
B представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере один аддукт группы B' и группы B'', где одна из групп B' и B'' выбрана из -N<sub>3</sub> и



где Q представляет собой С или N;

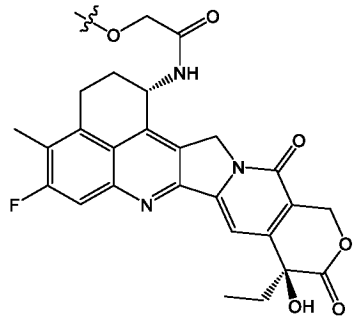
L2 представляет собой второй линкер, ковалентно присоединенный к разветвленной единице В через по меньшей мере одну группу В'';

М отсутствует или представляет собой фрагмент, имеющий структуру



водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо;

Dxd представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):

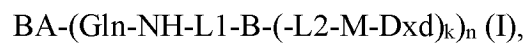


k представляет собой целое число от 1 до 12;

m представляет собой целое число от 1 до 30, и

n представляет собой целое число от 1 до 30.

**[0013]** В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает соединение, имеющее структуру в соответствии с формулой (I):



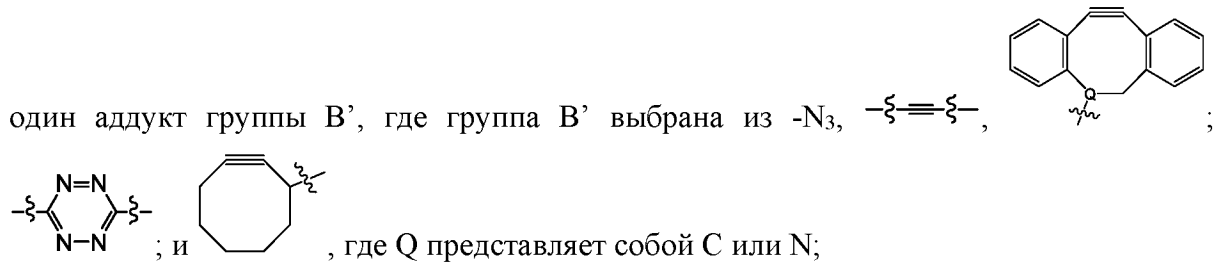
где:

BA представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

Gln представляет собой остаток глутамина;

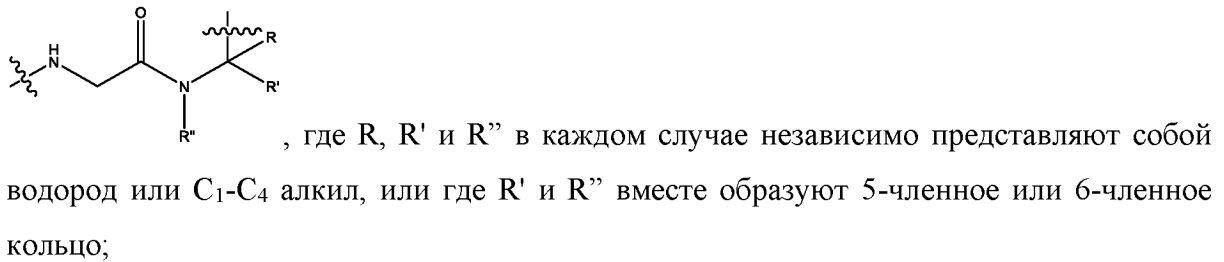
L1 отсутствует или представляет собой первый линкер;

В представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере

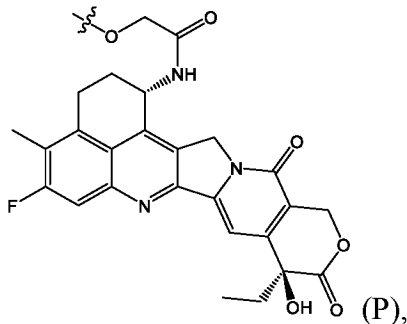


L2 представляет собой второй линкер, ковалентно присоединенный к разветвленной единице В через по меньшей мере одну группу В'', где группа В' и группа В'' образуют по меньшей мере один аддукт;

М отсутствует или представляет собой фрагмент, имеющий структуру



Dxd представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):



k представляет собой целое число от 1 до 12, и

n представляет собой целое число от 1 до 30.

**[0014]** В одном варианте осуществления ВА представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

**[0015]** В одном варианте осуществления ВА представляет собой анти-HER2 антитело, анти-HER2/HER2 биспецифическое антитело, анти-STEAP2 антитело, анти-MET антитело, анти-MET/MET биспецифическое антитело, анти-EGFRVIII антитело, анти-MUC16 антитело, анти-PRLR антитело, анти-PSMA антитело, анти-FGFR2 антитело, анти-FOLR1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

**[0016]** В одном варианте осуществления ВА представляет собой анти-STEAP2 антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, представленных в таблице 1.

**[0017]** В одном варианте осуществления ВА представляет собой анти-HER2/HER2 биспецифическое антитело. В одном варианте осуществления ВА связывает два отдельных эпитопа белка HER2.

**[0018]** В одном варианте осуществления анти-HER2/HER2 биспецифическое антитело содержит:

первый антигенсвязывающий домен (D1); и

второй антигенсвязывающий домен (D2);

при этом D1 специфически связывается с первым эпитопом HER2 человека; и

при этом D2 специфически связывается со вторым эпитопом HER2 человека.

**[0019]** В одном варианте осуществления D1 и D2 не конкурируют друг с другом за связывание с HER2 человека.

**[0020]** В одном варианте осуществления ВА представляет собой анти-MET/MET биспецифическое антитело. В одном варианте осуществления ВА связывает два отдельных эпитопа белка MET.

**[0021]** В одном варианте осуществления анти-MET/MET биспецифическое антитело содержит:

первый антигенсвязывающий домен (D1); и

второй антигенсвязывающий домен (D2);

при этом D1 специфически связывается с первым эпитопом MET человека; и

при этом D2 специфически связывается со вторым эпитопом MET человека.

**[0022]** В одном варианте осуществления D1 и D2 не конкурируют друг с другом за связывание с MET человека.

**[0023]** В одном варианте осуществления ВА представляет собой анти-MET/MET биспецифическое антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, представленных в таблице 3.

**[0024]** В одном варианте осуществления ВА представляет собой анти-MET/MET биспецифическое антитело, содержащее антигенсвязывающий домен D1 и антигенсвязывающий домен D2, где антигенсвязывающий домен D1 содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 2012/2092, или набор CDR тяжелой и легкой цепей (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащий SEQ ID NO: 2014-2016-2018-2094-2096-2098, и где антигенсвязывающий

домен D2 содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 2036/2092, или набор CDR тяжелой и легкой цепей (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащий SEQ ID NO: 2038-2040-2042-2094-2096-2098.

**[0025]** В одном варианте осуществления ВА представляет собой анти-MET/MET биспецифическое антитело H4H14639D, которое содержит D1, полученный из H4H13306P2, и D2, полученный из H4H13312P2.

**[0026]** В одном варианте осуществления анти-STEAP2 содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10; 18/26; 34/42; 50/58; 66/58; 74/58; 82/58; 90/58; 98/58; 106/114; 122/130; 138/146; 154/162; 170/178; 186/194; 202/210; 218/226; 234/242; 250/258; 266/274; 282/290; 298/306; 314/322; 330/338; 346/354; 362/370; и 378/386.

**[0027]** В одном варианте осуществления остаток глутамина Gln естественным образом присутствует в домене CH2 или CH3 ВА.

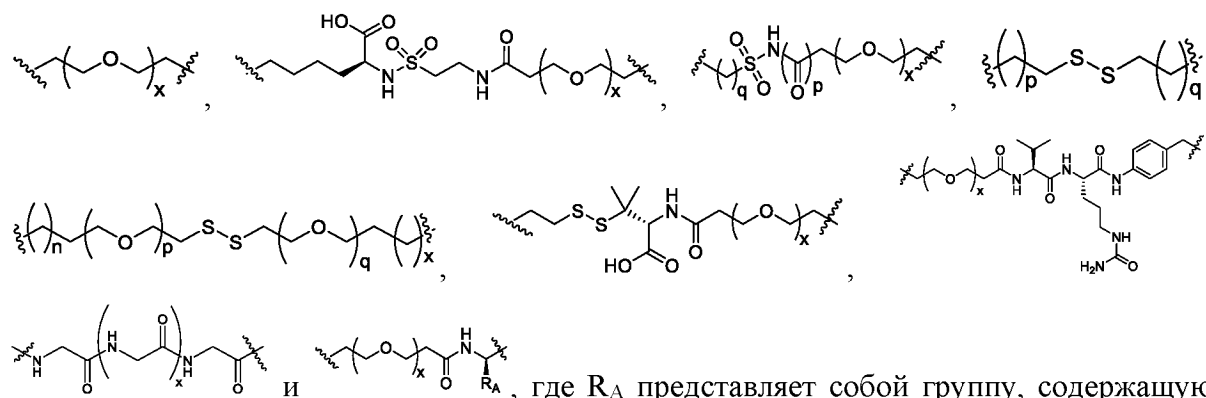
**[0028]** В одном варианте осуществления остаток глутамина Gln вводят в ВА путем модификации одной или нескольких аминокислот.

**[0029]** В одном варианте осуществления Gln представляет собой Q295 или N297Q.

**[0030]** В одном варианте осуществления ВА нацелено на рак, выбранный из группы, состоящей из рака молочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, рака легких, рака печени или рака головного мозга.

**[0031]** В одном варианте осуществления L1 содержит C<sub>1-6</sub> алкил, фенил, -NH-, -C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-NH-C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-NH-, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>v</sub>-C(O)-NH-, пептидную единицу, содержащую от 2 до 4 аминокислот, или их комбинации, каждая из которых может быть необязательно замещена одним или несколькими из -S-, -S(O<sub>2</sub>)-, -C(O)-, -C(O<sub>2</sub>)-; и CO<sub>2</sub>H, где нижние индексы u и v независимо представляют собой целое число от 1 до 8.

**[0032]** В одном варианте осуществления L1 выбран из группы, состоящей из:

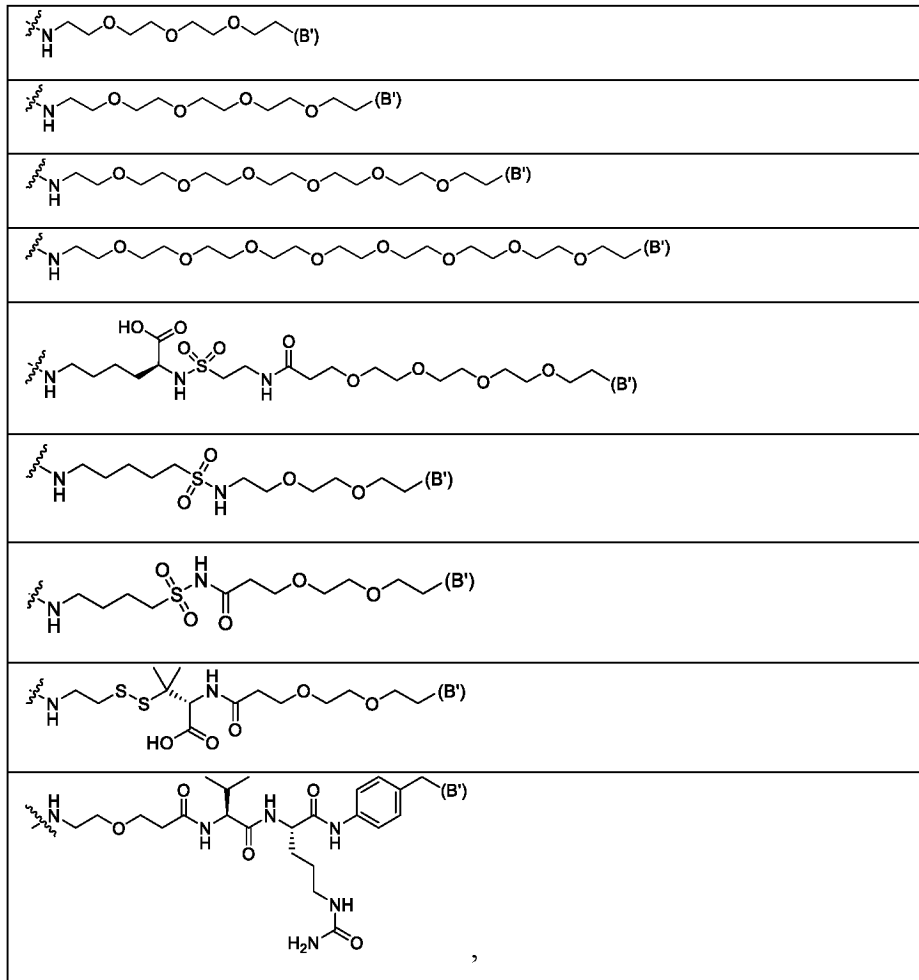




алкин, азид, тетразин, транс-циклооктен, малеимид, амин, кетон, альдегид, карбоновую кислоту, сложный эфир, тиол, сульфоновую кислоту, тозилат, галогенид, силан, цианогруппу, углеводную группу, биотиновую группу, липидный остаток, и где нижние индексы  $x$ ,  $n$ ,  $p$  и  $q$  независимо представляют собой целое число от 0 до 12, и их комбинации.

**[0033]** В одном варианте осуществления В содержит один аддукт группы В'.

**[0034]** В одном варианте осуществления соединение  $-NH-L1-B'$  выбрано из группы, состоящей из:



где  представляет собой amino точку присоединения к остатку глутамина

ВА.

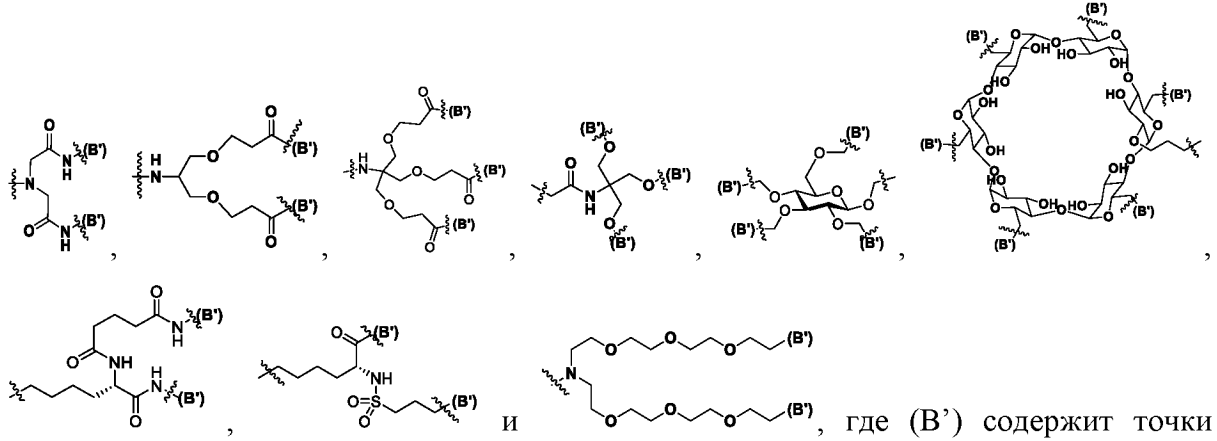
**[0035]** В одном варианте осуществления группа В' представляет собой азид ( $-N_3$ ), а аддукт группы В' содержит триазол.

**[0036]** В одном варианте осуществления В содержит два аддукта группы В'.

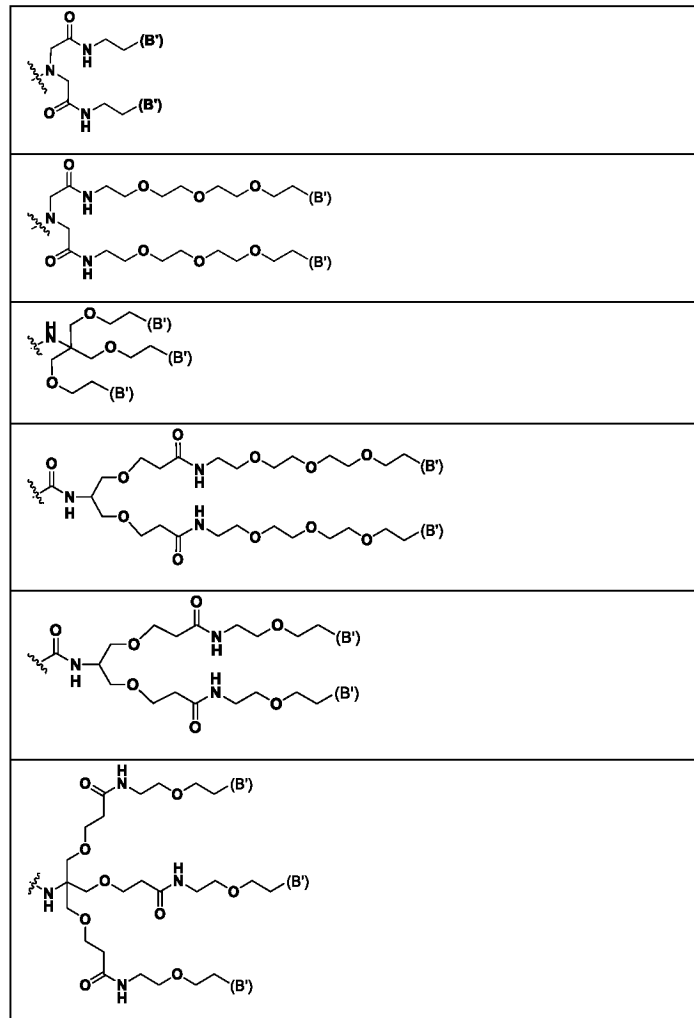
**[0037]** В одном варианте осуществления В содержит три аддукта группы В'.

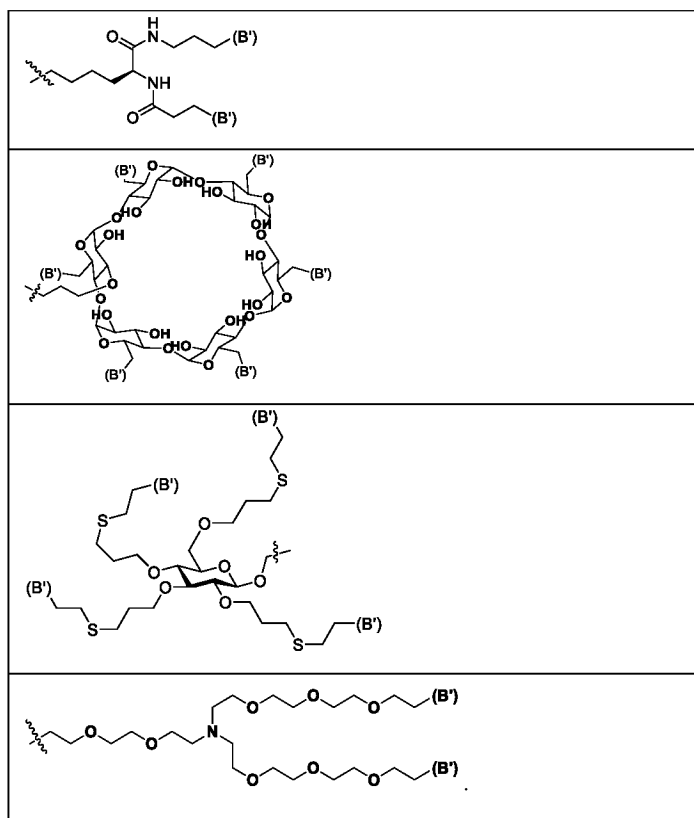
[0038] В одном варианте осуществления В содержит по меньшей мере четыре аддукта группы В'.

[0039] В одном варианте осуществления В содержит группу, выбранную из группы, состоящей из:

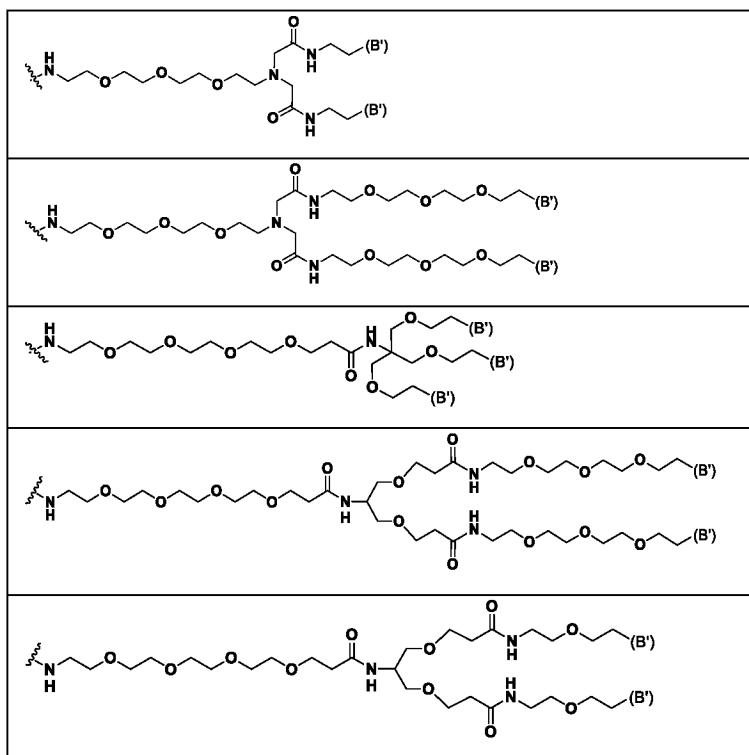


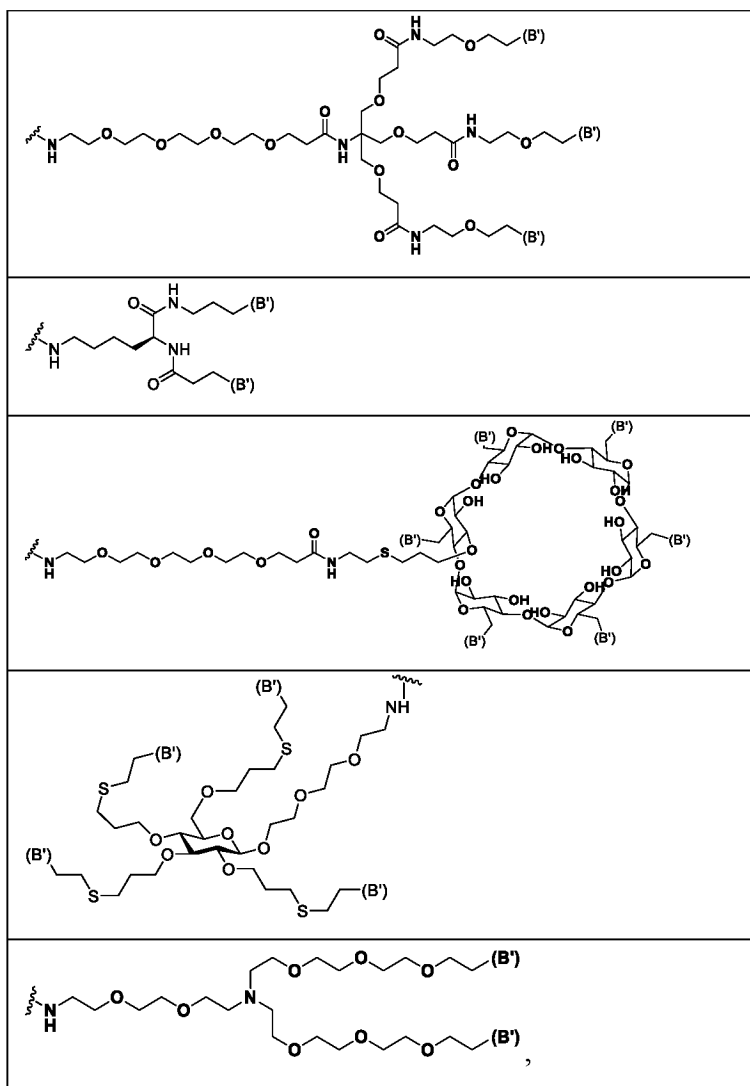
[0040] В одном варианте осуществления В выбран из группы, состоящей из:






[0041] В одном варианте осуществления соединение -NH-L1-B выбрано из группы, состоящей из:

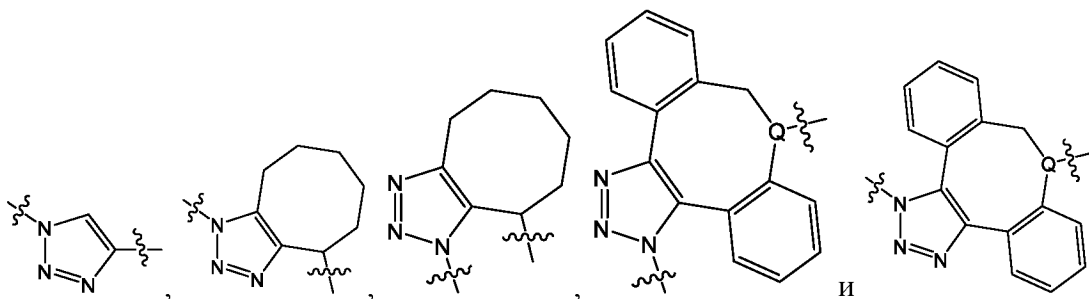




где  представляет собой amino точку присоединения к остатку глутамина ВА.

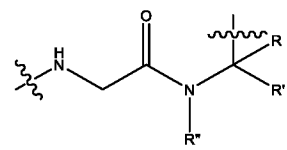
**[0042]** В одном варианте осуществления группа В' представляет собой азид (-N<sub>3</sub>), а аддукт группы В' содержит триазол.

**[0043]** В одном варианте осуществления аддукт группы В' и группы В'' имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из:



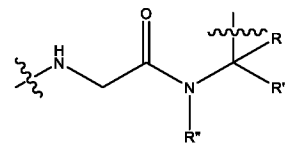
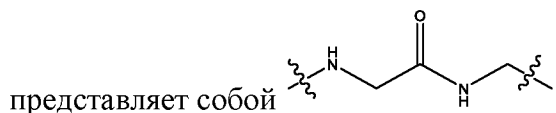
где Q представляет собой С или N.

[0044] В одном варианте осуществления М отсутствует.



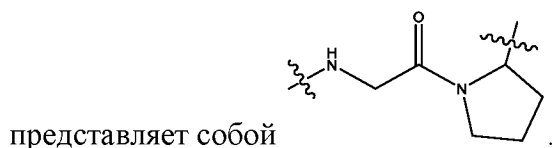
[0045] В одном варианте осуществления М представляет собой

где R, R' и R'' в каждом случае представляют собой атомы водорода, т.е. М



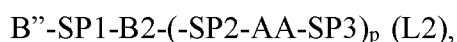
[0046] В одном варианте осуществления М представляет собой

где R представляет собой водород, а R' и R'' вместе образуют 5-членное кольцо, т.е. М



[0047] В одном варианте осуществления n равно 2. В одном варианте осуществления n равно 4. В одном варианте осуществления n равно 8. В одном варианте осуществления n равно 12. В одном варианте осуществления n равно 16. В одном варианте осуществления n равно 24.

[0048] В одном варианте осуществления L2 имеет структуру в соответствии с формулой (L2):



в которой:

B'' представляет собой группу, способную ковалентно присоединяться к группе B';

SP1 отсутствует или представляет собой первую спейсерную единицу;

B2 отсутствует или представляет собой разветвленную единицу;

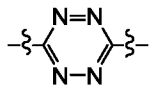
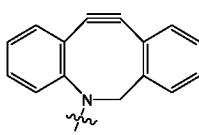
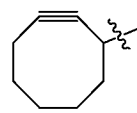
SP2 отсутствует или представляет собой вторую спейсерную единицу;

AA отсутствует или представляет собой пептидную единицу, содержащую от 2 до 4 аминокислот;

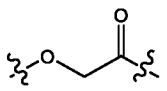
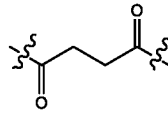
SP3 отсутствует или представляет собой третью спейсерную единицу, ковалентно присоединенную к Dxd, и

p представляет собой целое число от 1 до 12.

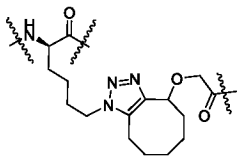
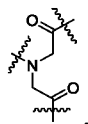
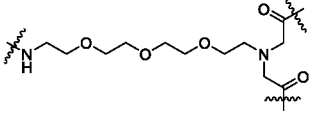
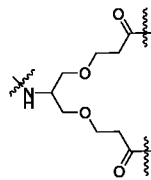
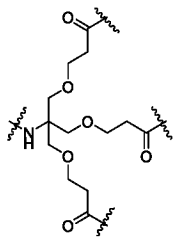
**[0049]** В одном варианте осуществления по меньшей мере одна группа В'' выбрана из

группы, состоящей из  $-N_3$ , ,  $-\xi \equiv N$ ,  $-\xi \equiv \xi-$ , ,  и их комбинаций.

**[0050]** В одном варианте осуществления SP1 отсутствует или выбрана из группы,

состоящей из  и .

**[0051]** В одном варианте осуществления B2 отсутствует или выбрана из группы,

состоящей из , , ,  и .

**[0052]** В одном варианте осуществления SP2 отсутствует или выбрана из группы, состоящей из  $C_{1-6}$  алкила,  $-(CH_2-CH_2-O)_v-$ ,  $-NH-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-NH-C(O)-$ ,  $-NH-(CH_2)_u-$ ,  $-NH-(CH_2)_u-C(O)-$ ,  $-NH-(CH_2-CH_2-O)_v-$ ,  $-NH-(CH_2-CH_2-O)_v-C(O)-$ ,  $-NH-(CH_2-CH_2-O)_v-(CH_2)_u-$ ,  $-NH-(CH_2-CH_2-O)_v-(CH_2)_u-C(O)-$ ,  $-(CH_2)_u-NH-C(O)-$ ,  $-NH-(CH_2)_u-NH-C(O)-$ ,  $-NH-(CH_2)_u-C(O)-NH-$  или их комбинаций; где индексы  $u$  и  $v$  независимо представляют собой целое число от 1 до 8.

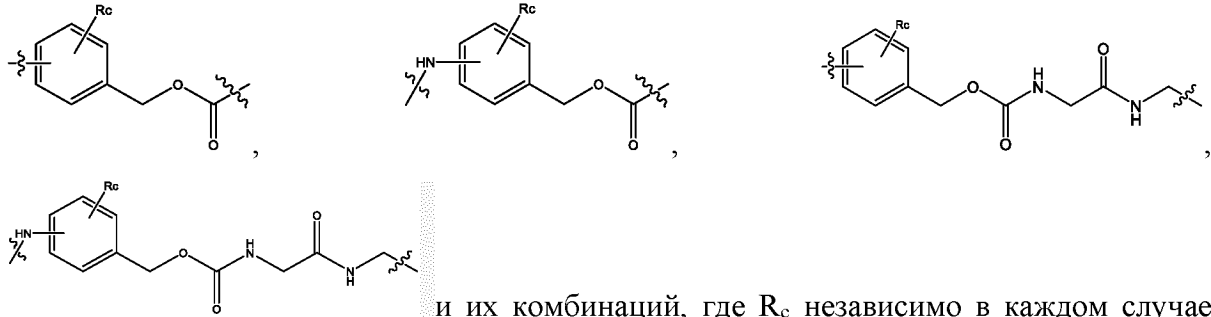
**[0053]** В одном варианте осуществления AA представляет собой пептидную единицу, содержащую от 2 до 4 аминокислот, выбранных из глицина, валина, фенилаланина, пролина, глутаминовой кислоты, лизина, фенилаланина и цитруллина, и их комбинаций.

**[0054]** В одном варианте осуществления AA представляет собой валин-цитруллин, валин-аланин или фенилаланин-лизин.

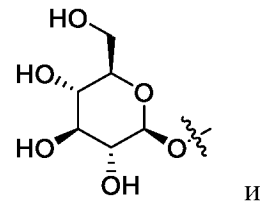
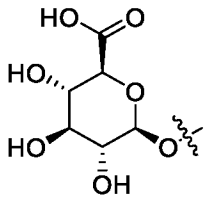
**[0055]** В одном варианте осуществления AA выбирают из группы, состоящей из глицин-глицин-глицина (GGG), глицин-глицин-глицин-глицина (GGGG (SEQ ID NO: 2113)), глицин-глицин-фенилаланина (GGF), глицин-глицин-фенилаланин-глицина

(GGFG (SEQ ID NO: 2114)), L-глутаминовая кислота-валин-цитруллина (<sup>L</sup>EVC) и D-глутаминовая кислота-валин-цитруллина (<sup>D</sup>EVC).

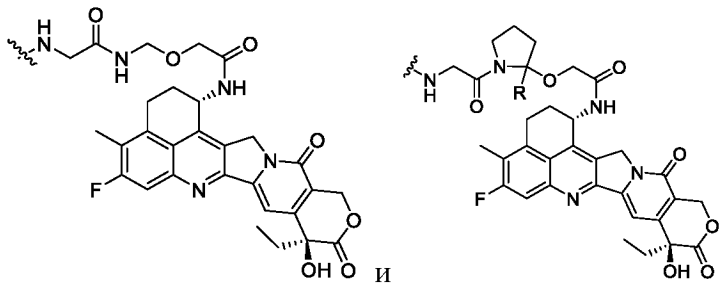
**[0056]** В одном варианте осуществления SP3 отсутствует или выбрана из группы, состоящей из



отсутствует или представляет собой группу, выбранную из

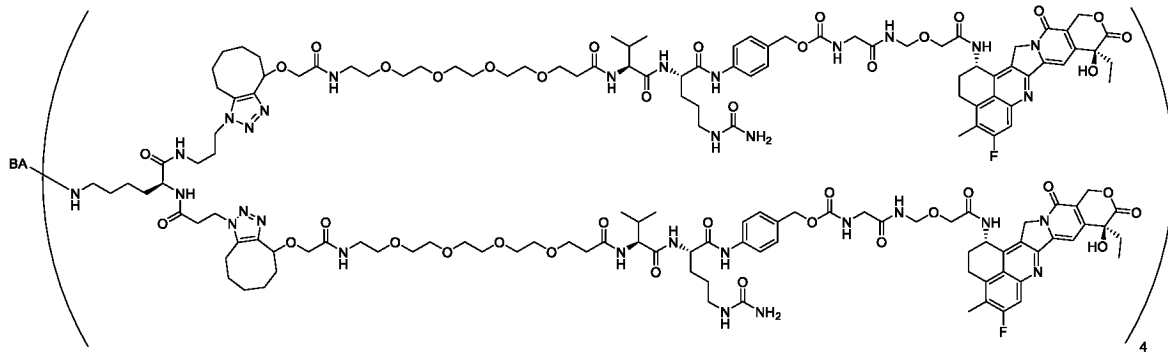


**[0057]** В одном варианте осуществления M-Dxd имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из

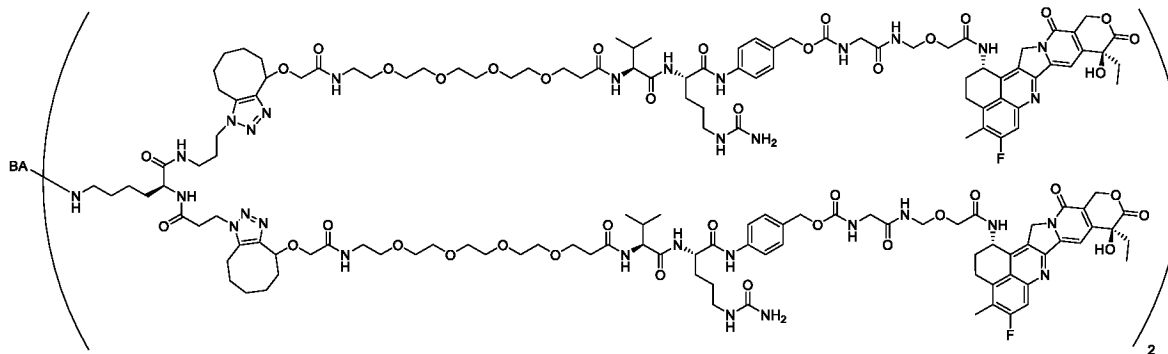


где R представляет собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, и где ~~~ представляет собой точку присоединения к L2.

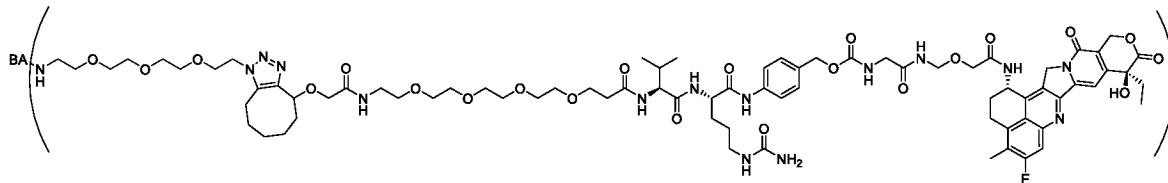
**[0058]** В одном варианте осуществления соединение имеет структуру:



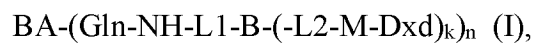
[0059] В одном варианте осуществления соединение имеет структуру:



[0060] В одном варианте осуществления соединение имеет структуру:



[0061] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает соединение, имеющее структуру в соответствии с формулой (I):



в которой:

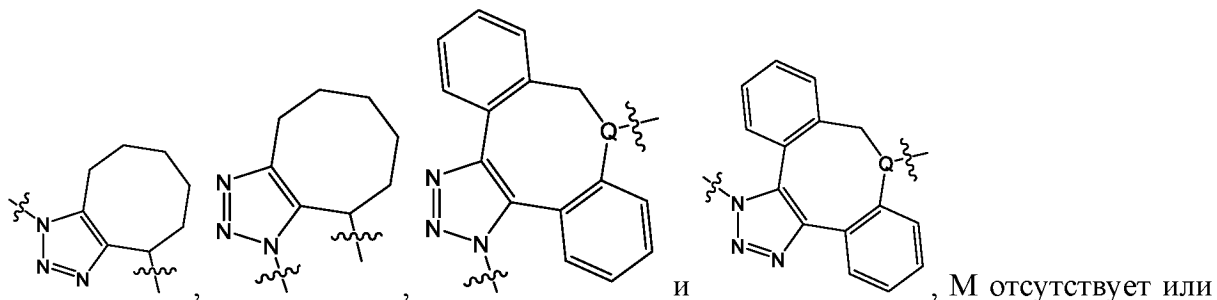
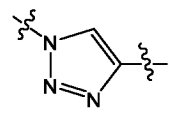
BA представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

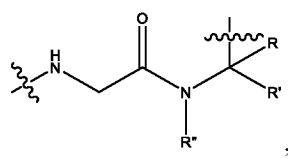
Gln представляет собой остаток глутамина;

L1 отсутствует или представляет собой первый линкер;

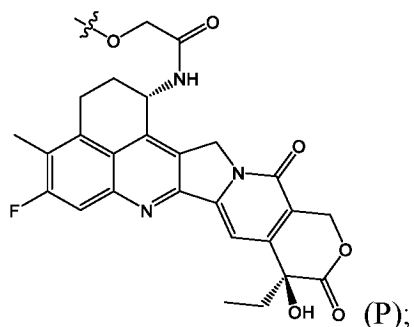


В представляет собой разветвленную единицу, содержащую



представляет собой фрагмент, имеющий структуру , где R, R' и R'' независимо в каждом случае представляют собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо;

Dxd представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):



k представляет собой целое число от 1 до 12, и

n представляет собой целое число от 1 до 30.

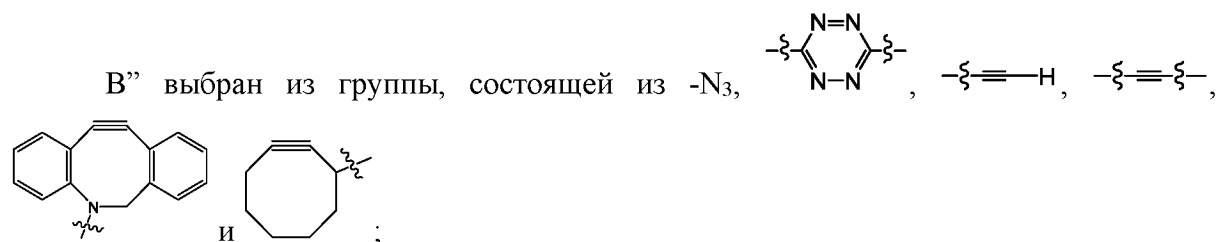
[0062] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает соединение в соответствии с формулой (L2-P), (L2'-P) или (L2''-P):

B''-SP1-B2-(-SP2-AA-SP3-M-Dxd)<sub>p</sub> (L2-P),

H<sub>2</sub>N-SP1-B2-(-SP2-AA-SP3-M-Dxd)<sub>p</sub> (L2'-P),

малеимид-N-SP1-B2-(-SP2-AA-SP3-M-Dxd)<sub>p</sub> (L2''-P),

в которой:



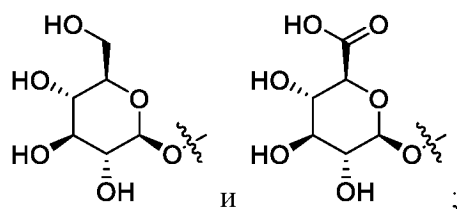
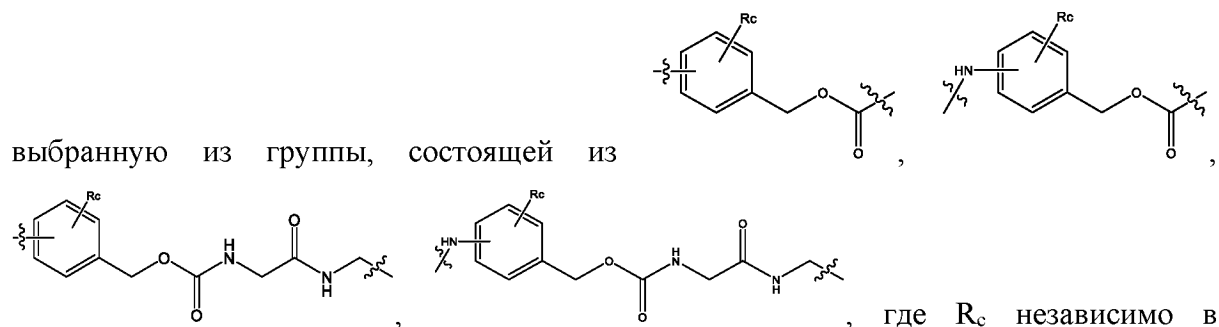
SP1 отсутствует или представляет собой первую спейсерную единицу,

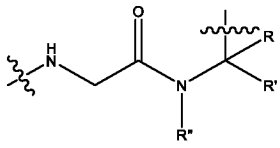


SP2 отсутствует или представляет собой вторую спейсерную единицу, выбранную из группы, состоящей из C<sub>1-6</sub> алкила, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-, -NH-, -C(O)-, -NH-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-NH-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-NH-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-NH-, или их комбинаций; где индексы u и v независимо представляют собой целое число от 1 до 8;

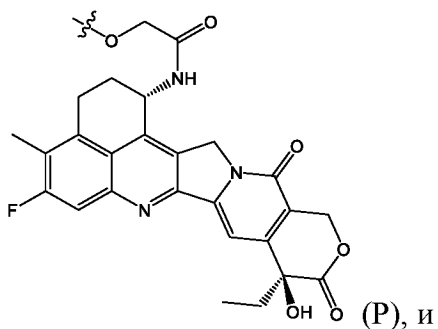
AA отсутствует или представляет собой пептидную единицу, содержащую от 2 до 4 аминокислот;

SP3 отсутствует или представляет собой третью спейсерную единицу,



M отсутствует или представляет собой , где R, R' и R'' в каждом случае независимо представляют собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо; и

Dxd представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):



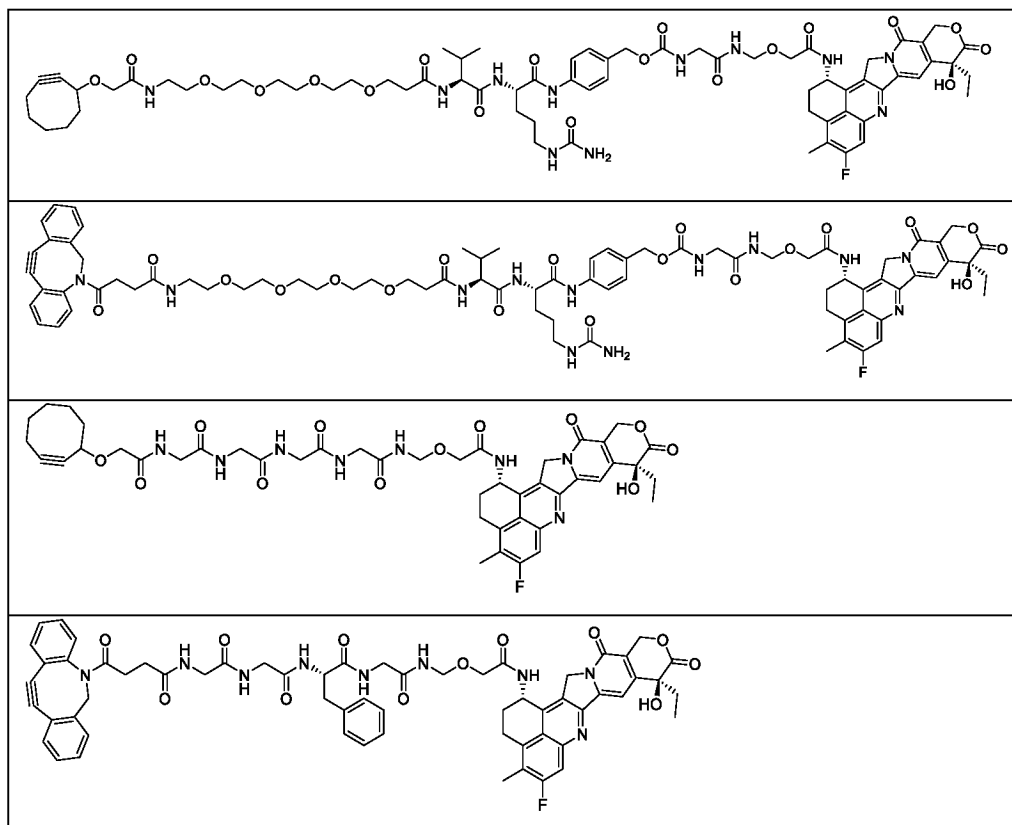
р представляет собой целое число от 1 до 12.

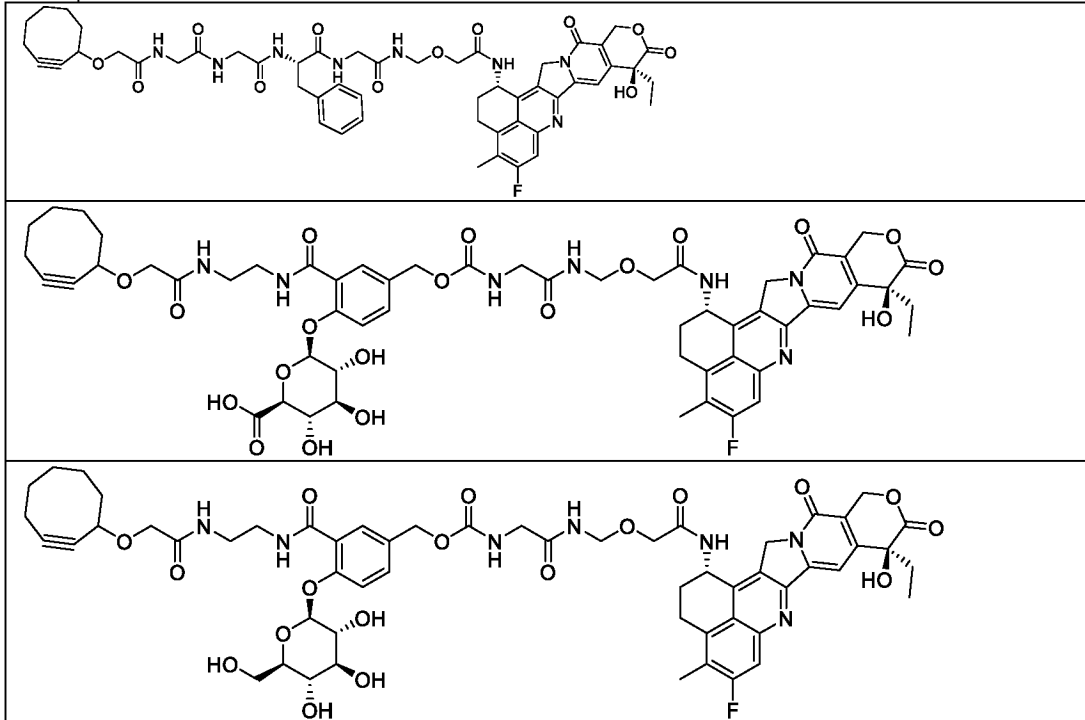
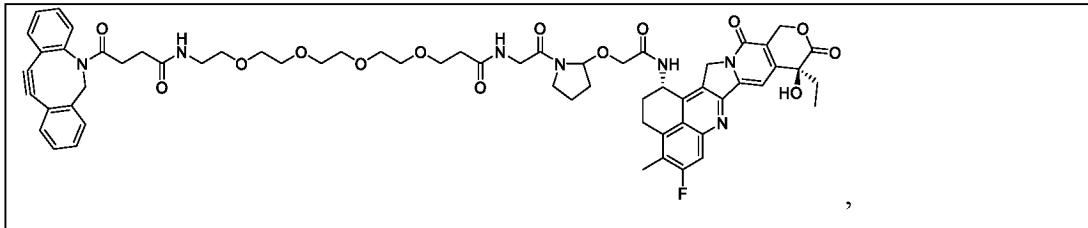
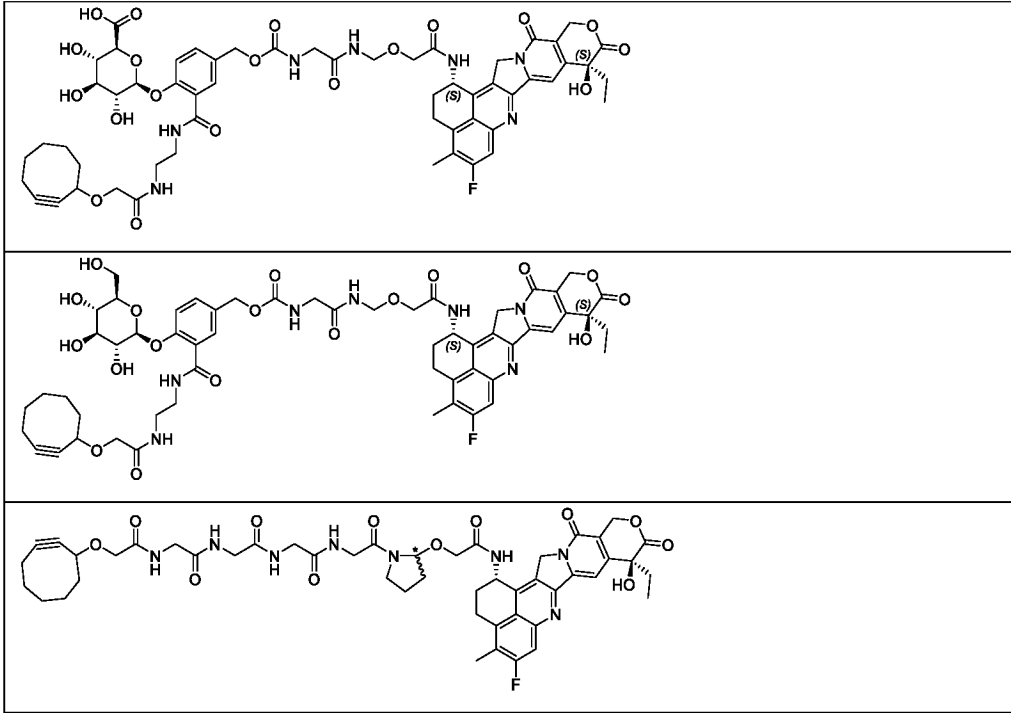
**[0063]** В одном варианте осуществления АА представляет собой пептидную единицу, содержащую от 2 до 4 аминокислот, выбранных из глицина, валина, фенилаланина, пролина, глутаминовой кислоты, лизина, аланина и цитруллина, и их комбинаций.

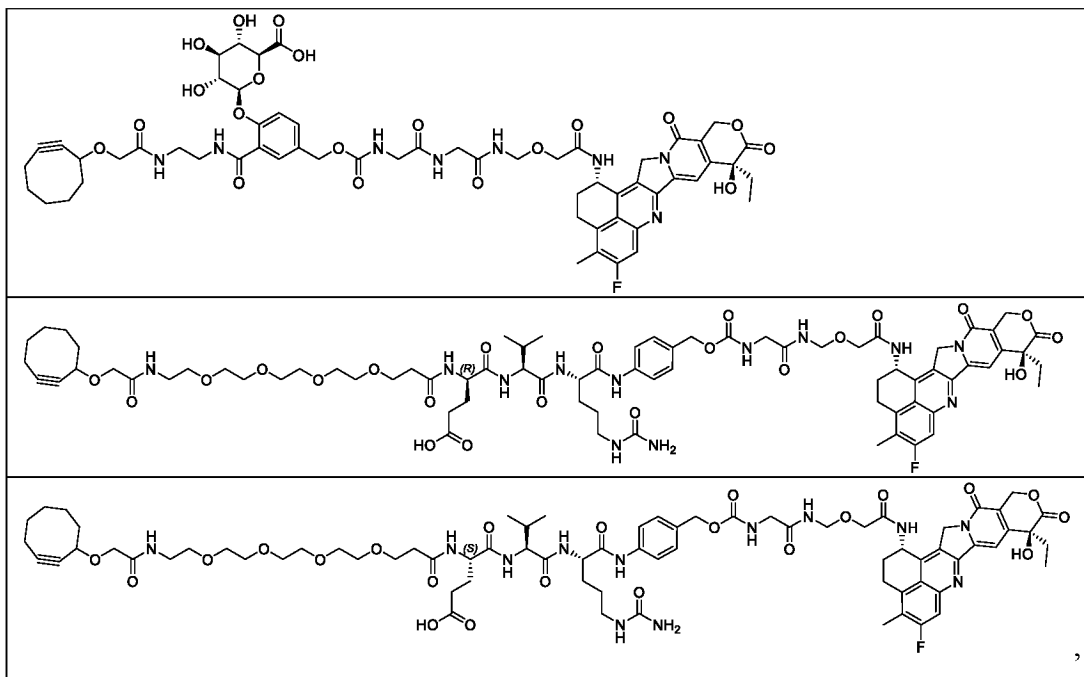
**[0064]** В одном варианте осуществления АА представляет собой валин-цитруллин, валин-аланин или фенилаланин-лизин.

**[0065]** В одном варианте осуществления АА выбирают из группы, состоящей из глицин-глицин-глицина (GGG), глицин-глицин-глицин-глицина (GGGG (SEQ ID NO: 2113)), глицин-глицин-фенилаланина (GGF), глицин-глицин-фенилаланин-глицина (GGFG (SEQ ID NO: 2114)) и глутаминовая кислота-валин-цитруллина (EVC).

**[0066]** В одном варианте осуществления соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из:

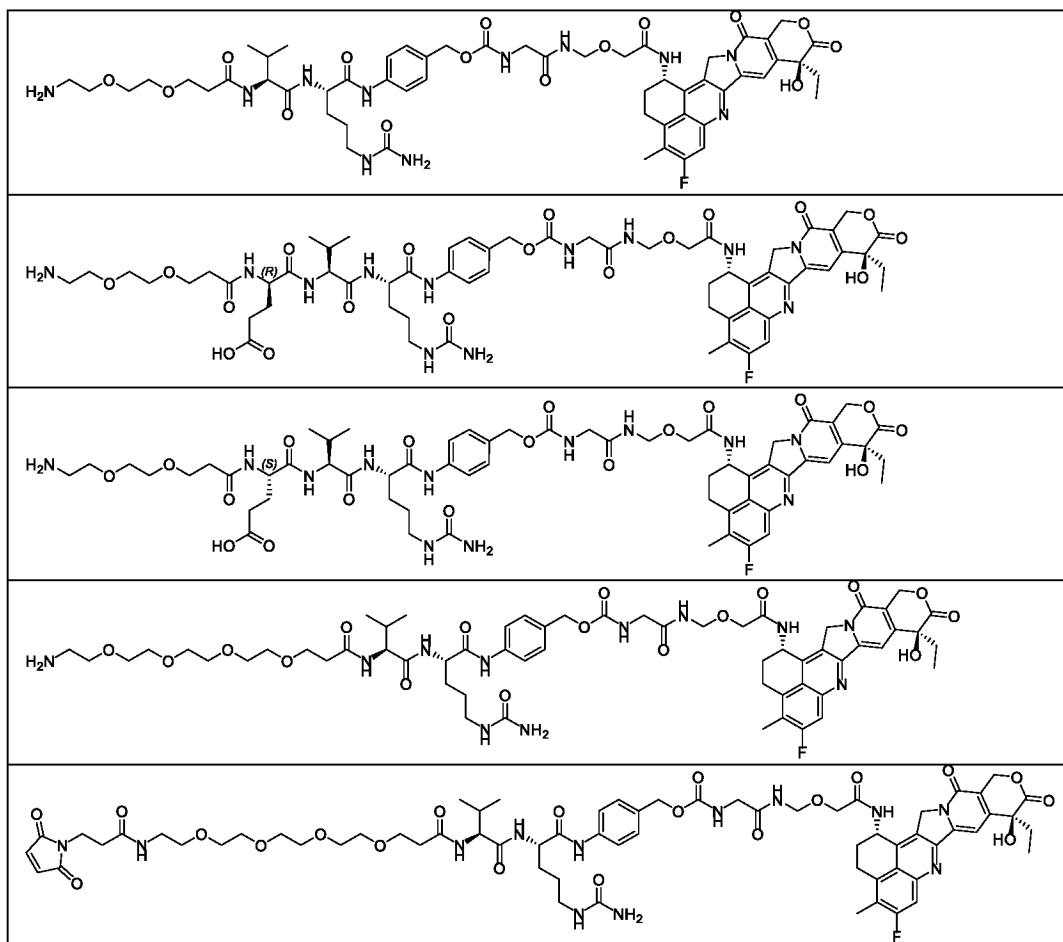


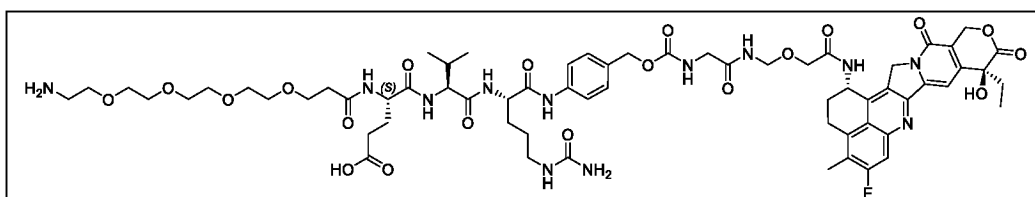
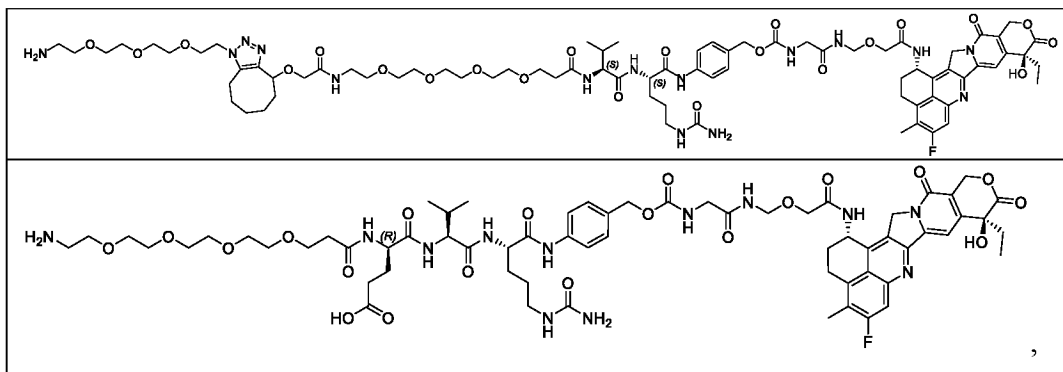




или его фармацевтически приемлемая соль.

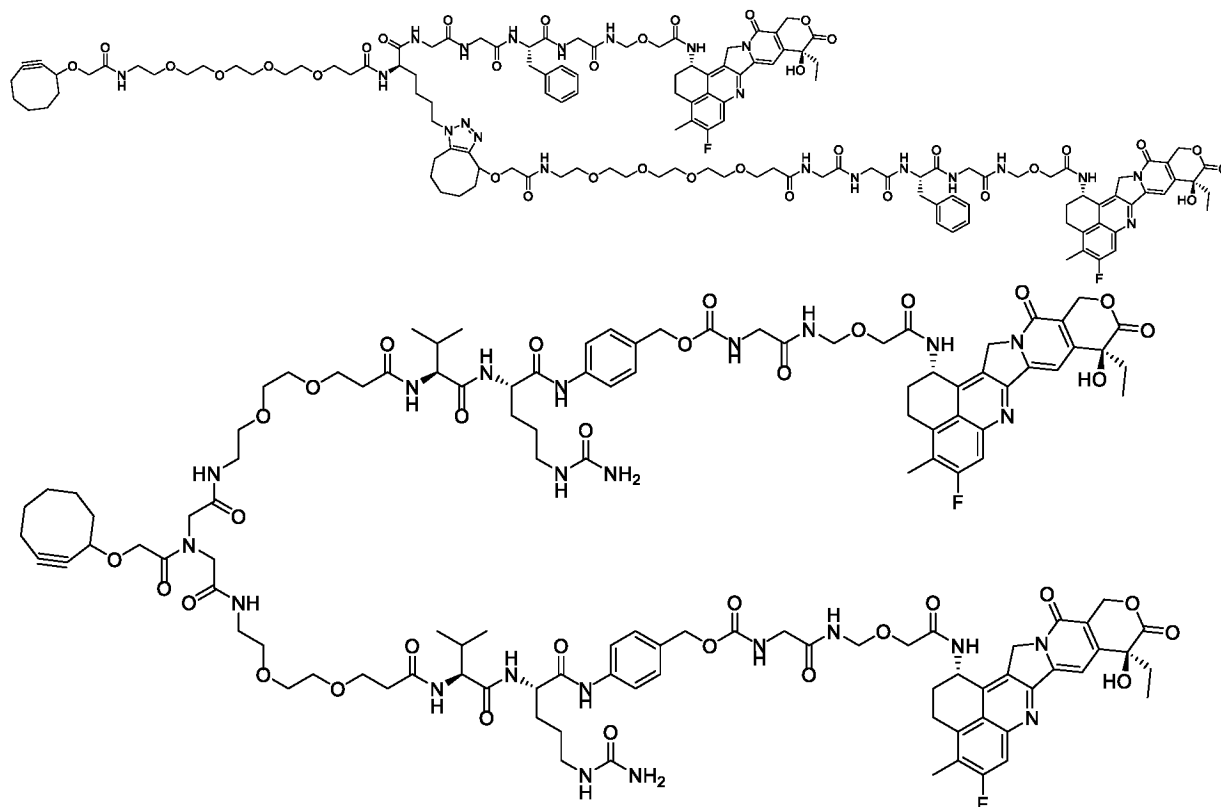
[0067] В одном варианте осуществления соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из:

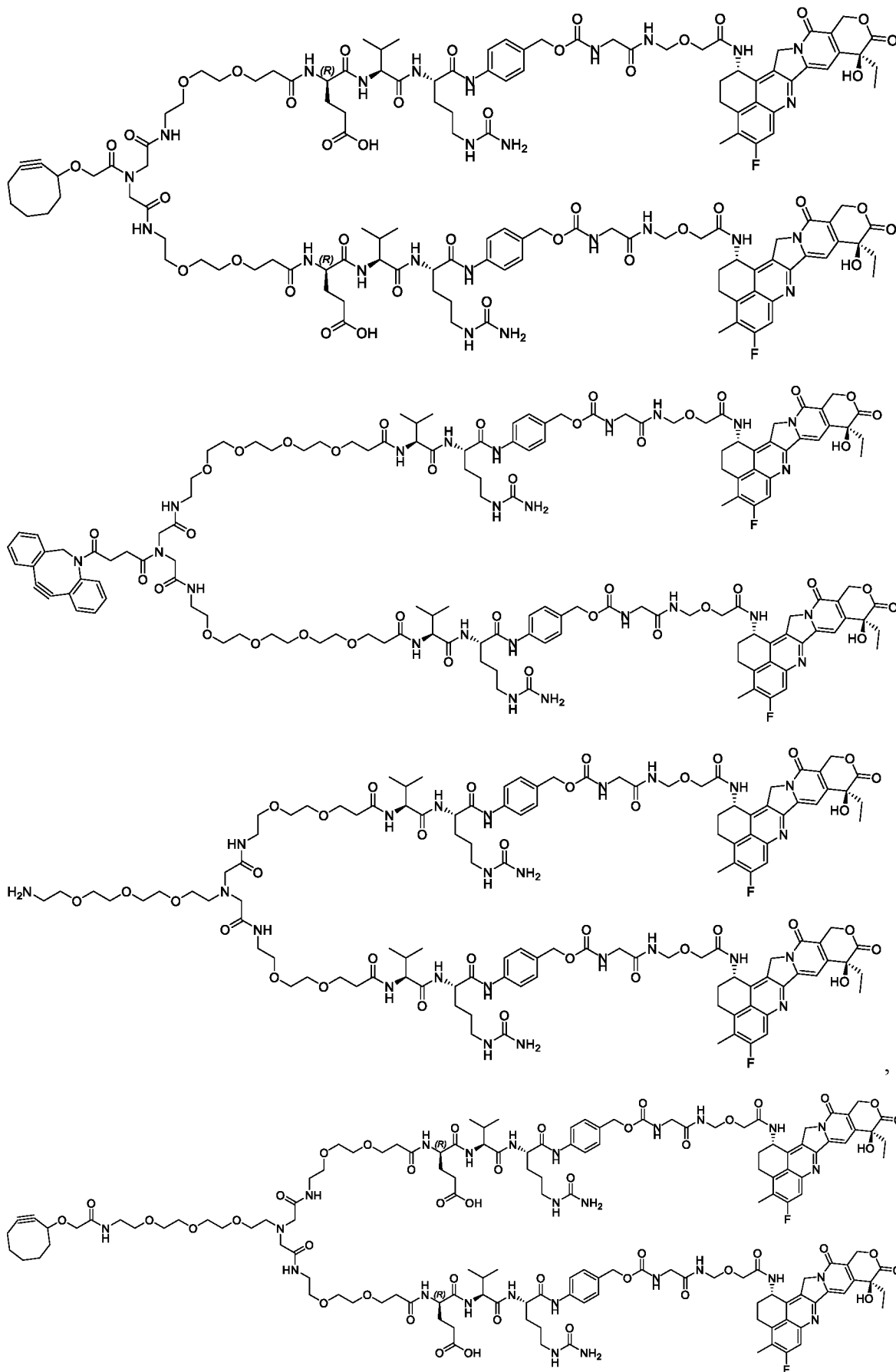


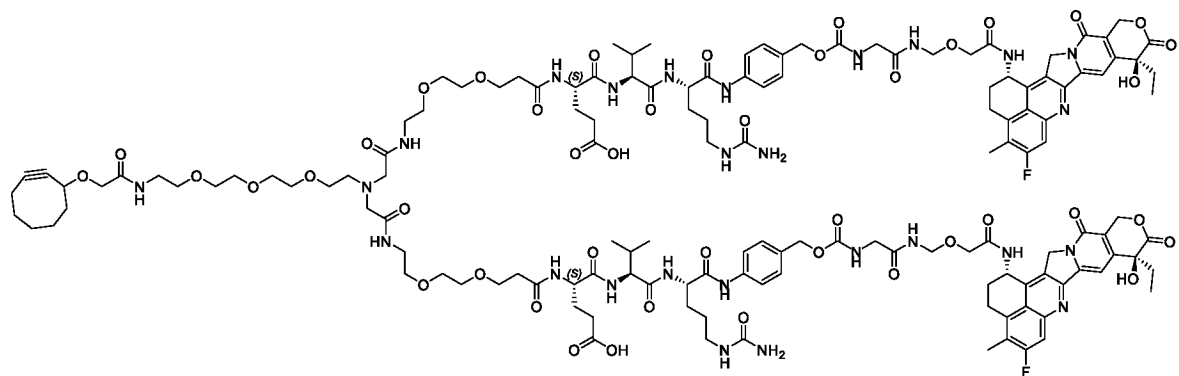
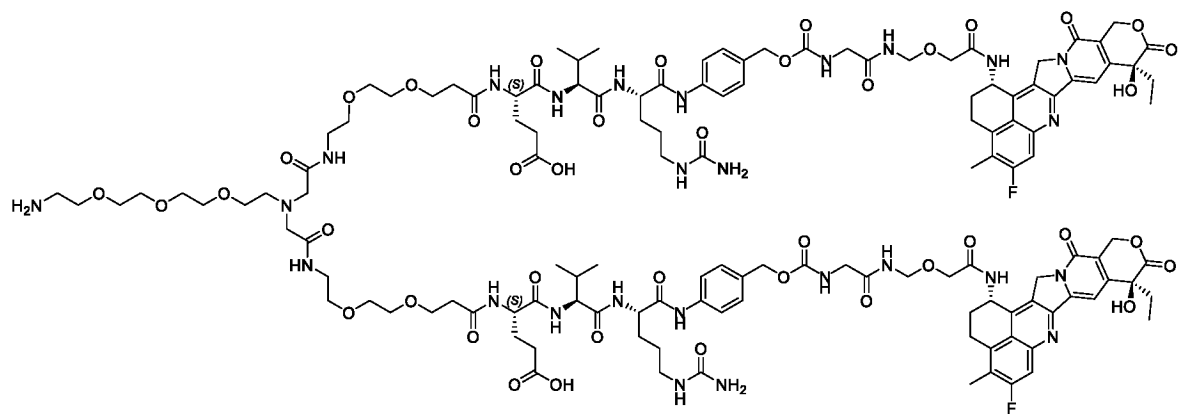
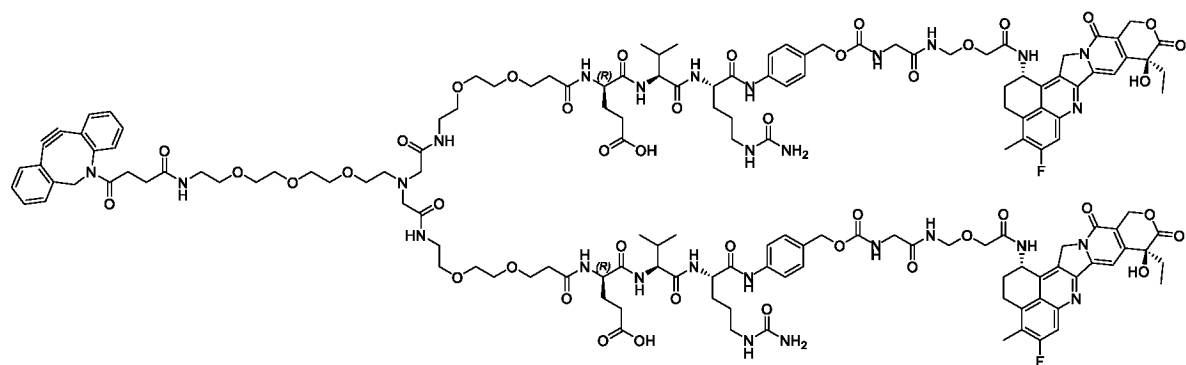
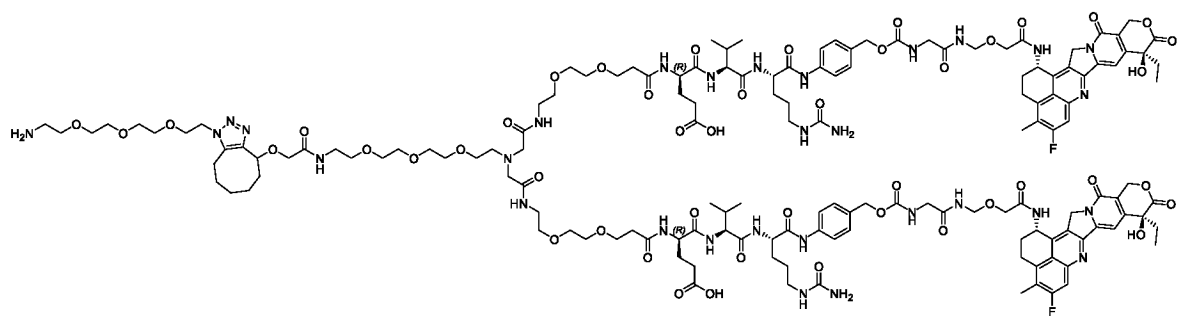


или его фармацевтически приемлемая соль.

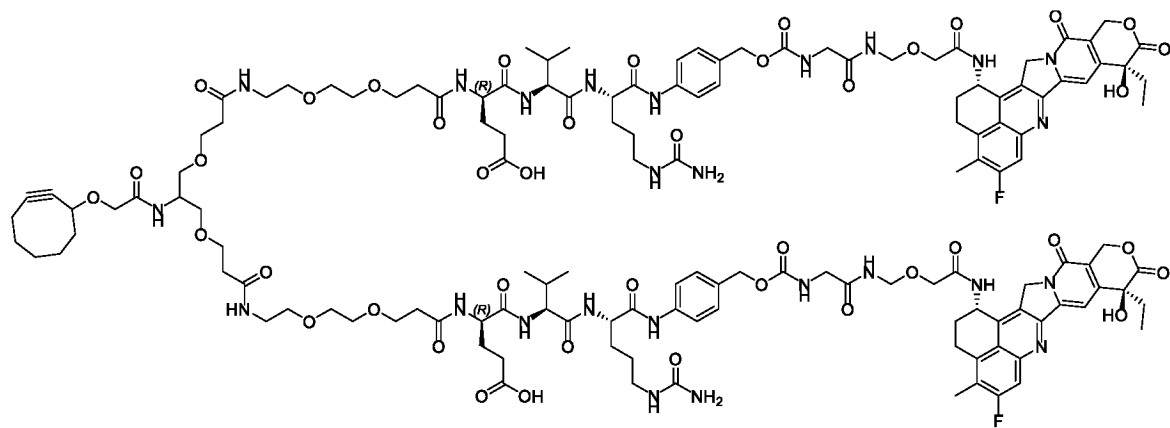
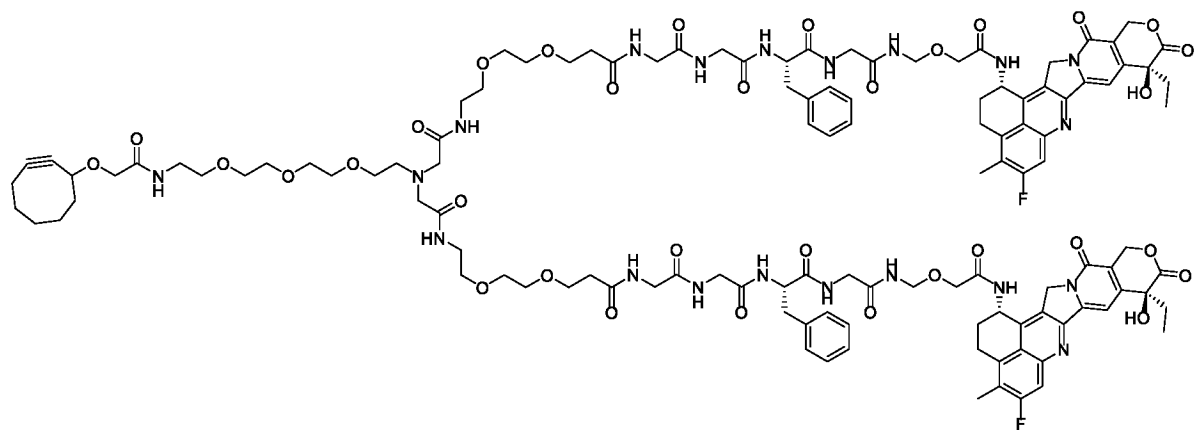
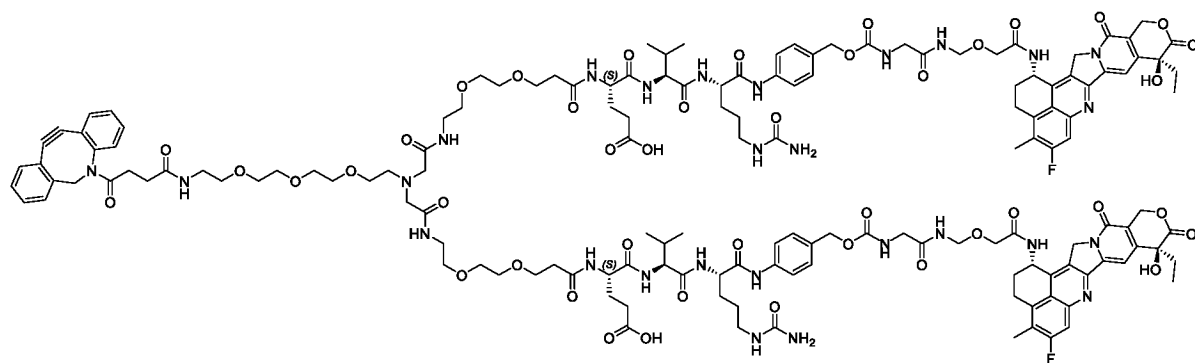
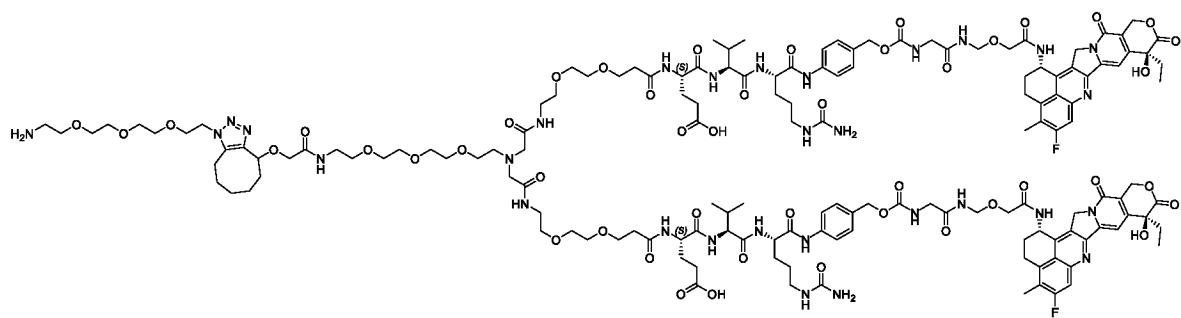
**[0068]** В одном варианте осуществления соединение имеет структуру в соответствии с формулой (L2-P), (L2'-P) или (L2''-P), выбранную из группы, состоящей из:

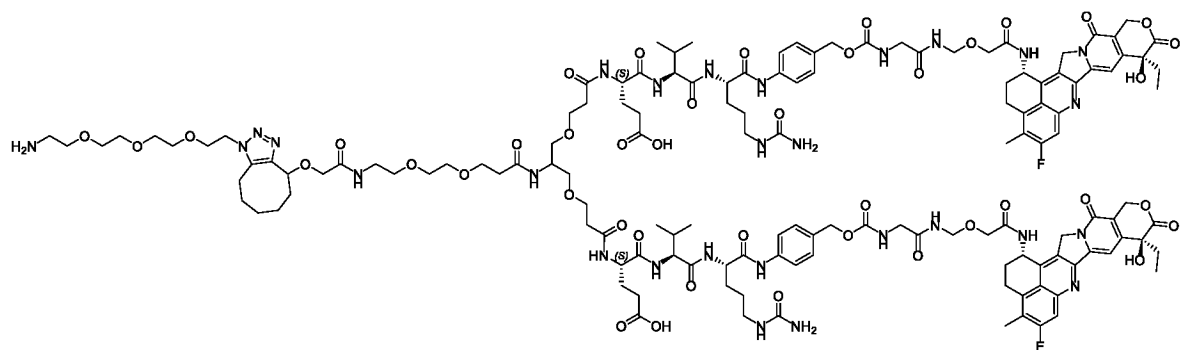
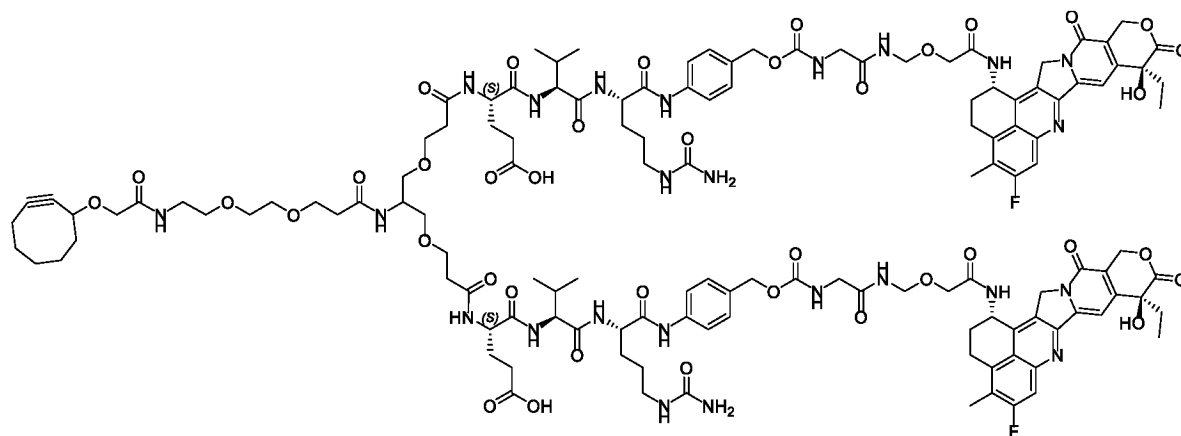
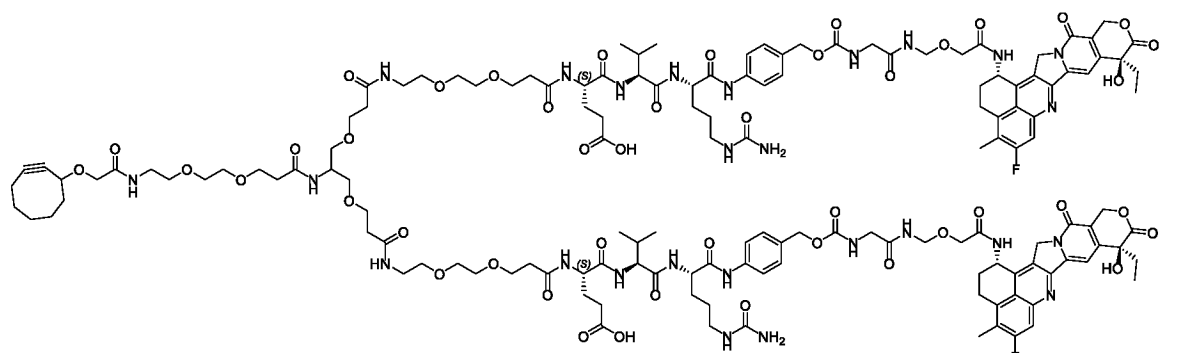
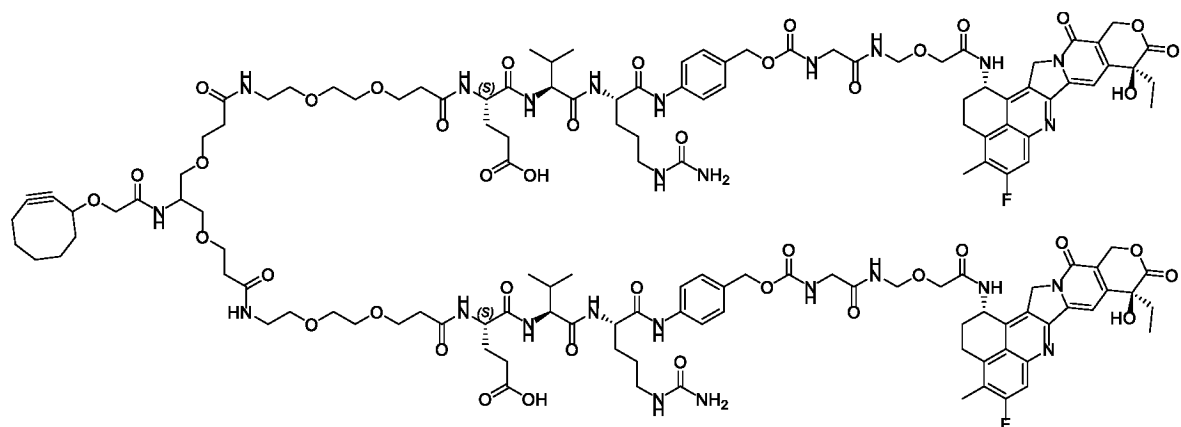


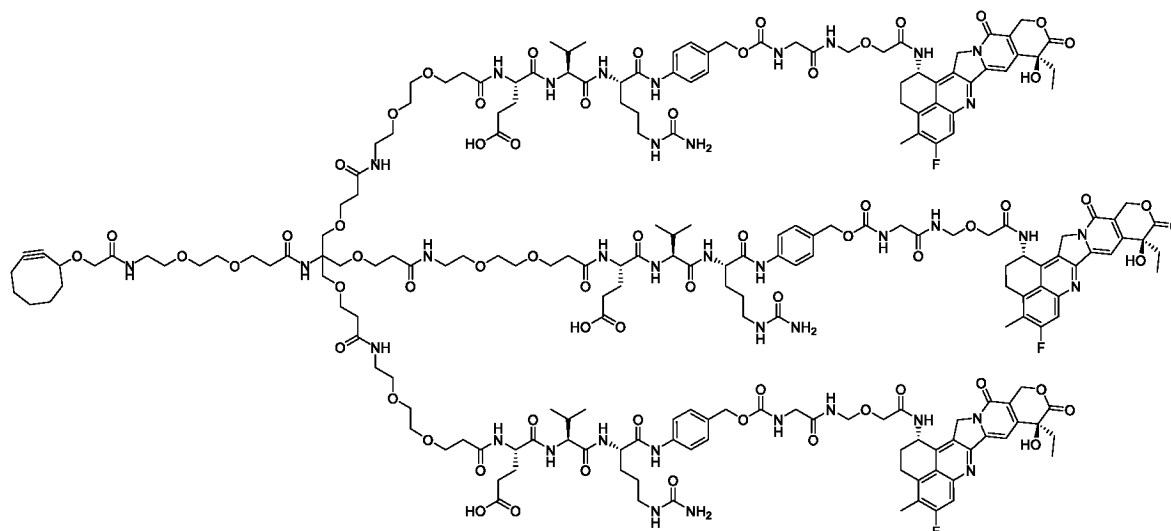




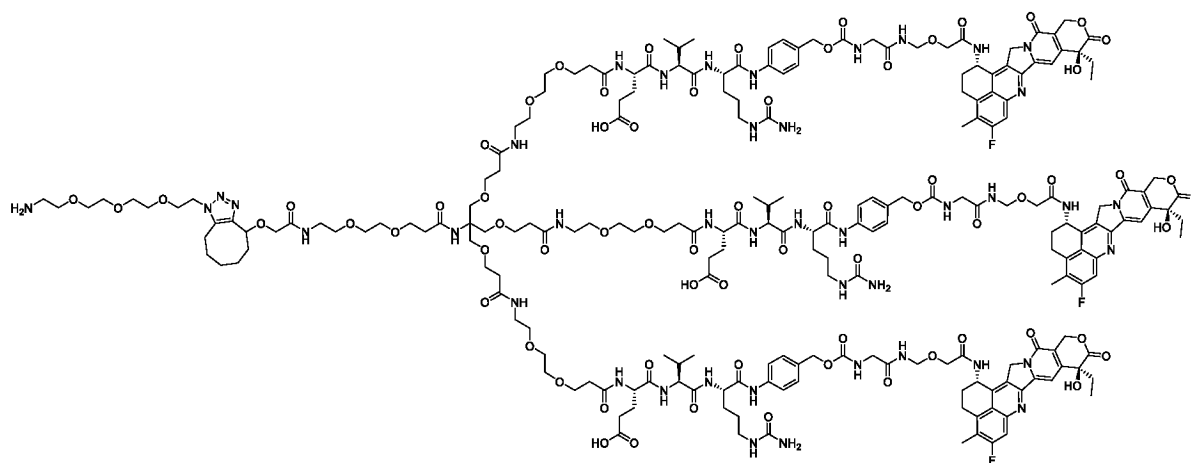




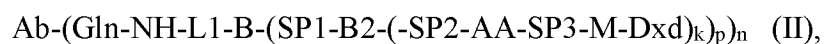




И



[0069] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает конъюгат антитело-лекарственное средство в соответствии с формулой (II):

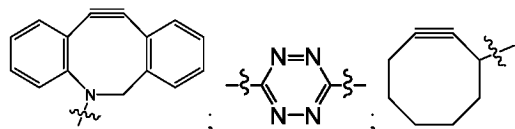


где Ab представляет собой антитело;

Gln представляет собой остаток глутамина;

L1 отсутствует или представляет собой первый линкер;

B представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере один аддукт группы B' и группы B'', где группа B' выбрана из  $-\text{N}_3$ ,  $-\xi \equiv \xi-$ ,

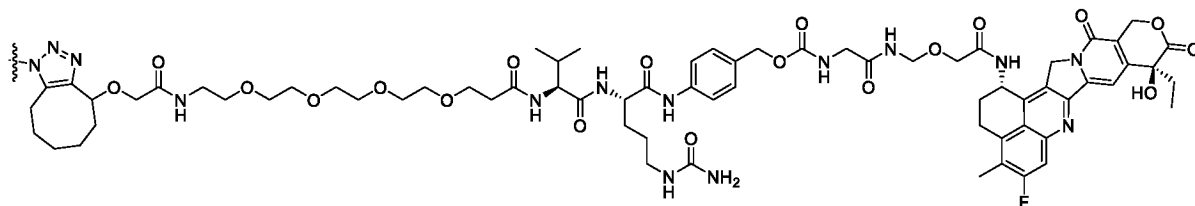


и по меньшей мере одну группу B'', где

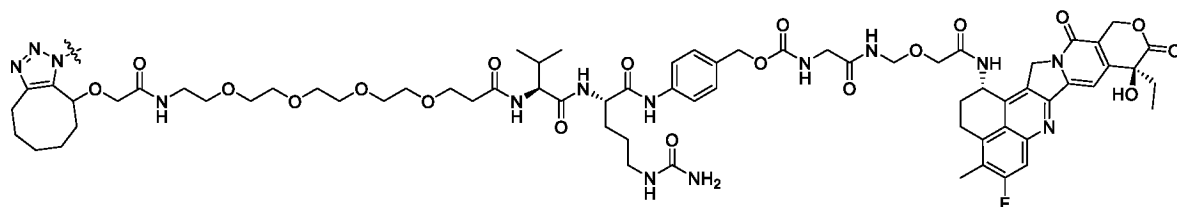
$\text{B}''\text{-SP1-B2}-(\text{-SP2-AA-SP3-M-Dxd})_p$  представляет собой соединение в соответствии с формулой (L2-P) в соответствии с любым из предыдущих вариантов

осуществления, и где соединение формулы (L2-P) ковалентно присоединено к антителу через аддукт группы В' и группы В''; k представляет собой целое число от 1 до 12, р представляет собой целое число от 1 до 30, n представляет собой целое число от 1 до 30.

**[0070]** В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело и соединение линкер-полезная нагрузка, где соединение линкер-полезная нагрузка имеет структуру:



или



где  $\sim$  представляет собой точку присоединения к антителу непосредственно или через второй линкер, или его фармацевтически приемлемая соль.

**[0071]** В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую совокупность соединений в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, имеющую соотношение лекарственное средство-антитело (DAR) от около 0,5 до около 30,0.

**[0072]** В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением имеет DAR от около 1,0 до около 2,5. В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением имеет DAR около 2.

**[0073]** В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением имеет DAR от около 3,0 до около 4,5. В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением имеет DAR около 4.

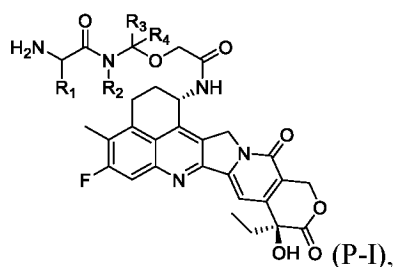
**[0074]** В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением имеет DAR от около 6,5 до около 8,5. В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением имеет DAR около 8.

**[0075]** В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением имеет DAR от около 10 до около 14. В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением имеет DAR около 12.

[0076] В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением имеет DAR от около 14 до около 18. В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением имеет DAR около 16.

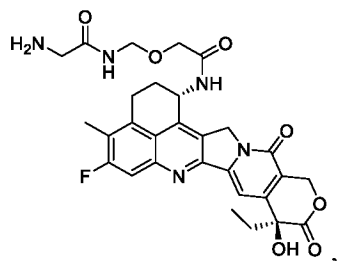
[0077] В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением имеет DAR от около 22 до около 24,5. В одном варианте осуществления композиция в соответствии с изобретением имеет DAR около 24.

[0078] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает соединение, имеющее структуру в соответствии с формулой (P-I):



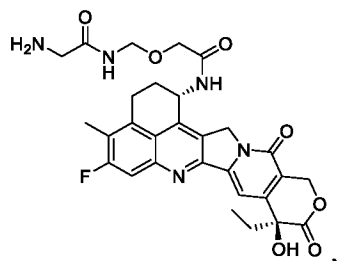
где  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляют собой водород или  $C_1$ - $C_4$  алкил, или где  $R_2$  и  $R_3$  образуют 5-членное или 6-членное кольцо, или его фармацевтически приемлемую соль.

[0079] В одном варианте осуществления соединение представляет собой



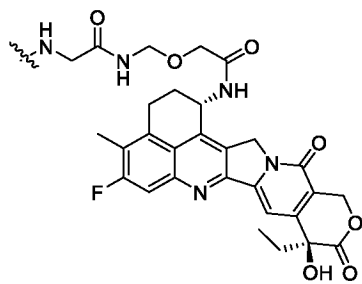
или его фармацевтически приемлемую соль.

[0080] Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело, линкер и полезную нагрузку, где полезная нагрузка представляет собой



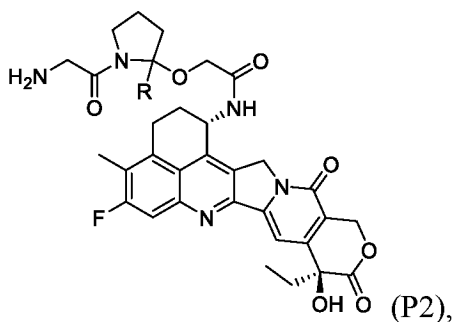
или его фармацевтически приемлемую соль.

[0081] Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело, линкер и полезную нагрузку, где полезная нагрузка представляет собой



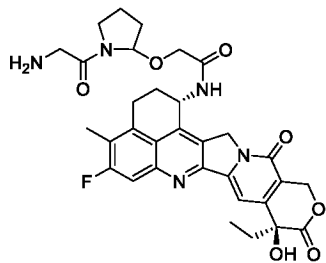
, или его фармацевтически приемлемую соль, где  $\sim$  представляет собой точку присоединения к линкеру.

**[0082]** В одном варианте осуществления соединение имеет структуру в соответствии с формулой (P2):



где R представляет собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, или его фармацевтически приемлемую соль.

**[0083]** В одном варианте осуществления соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

**[0084]** В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую соединение в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, и разбавитель, носитель и/или вспомогательное вещество.

**[0085]** В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, или композиции в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления.

**[0086]** В одном варианте осуществления патологическое состояние представляет собой рак.

[0087] В одном варианте осуществления рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, рака легких, рака печени или рака головного мозга.

[0088] В одном варианте осуществления патологическое состояние представляет собой HER2+ рак молочной железы.

[0089] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ селективной доставки соединения в клетку, где соединение соответствует любому соединению из предыдущих вариантов осуществления.

[0090] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ селективного нацеливания на антиген на поверхности клетки с помощью соединения, где соединение соответствует любому соединению из предыдущих вариантов осуществления.

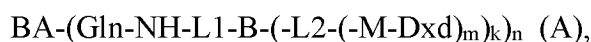
[0091] В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего.

[0092] В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку человека.

[0093] В одном варианте осуществления клетка представляет собой раковую клетку.

[0094] В одном варианте осуществления раковая клетка выбрана из группы, состоящей из клетки рака молочной железы, клетки рака яичника, клетки рака предстательной железы, клетки рака легкого, клетки рака печени или клетки рака головного мозга.

[0095] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения, имеющего структуру в соответствии с формулой (A):



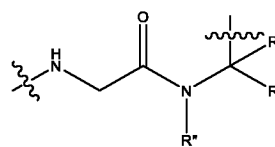
где VA представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

Gln представляет собой остаток глутамина;

L1 представляет собой первый линкер;

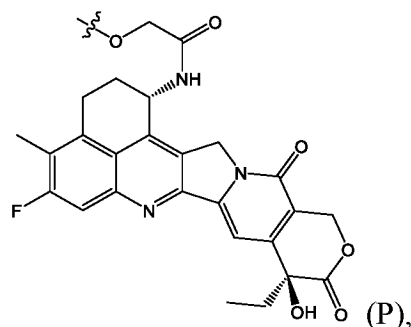
B представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере один аддукт группы B' и группы B'';

L2 представляет собой второй линкер, ковалентно присоединенный к разветвленной единице B через по меньшей мере одну группу B'';



M отсутствует или представляет собой  $\text{H}$ , где R, R' и R'' в каждом случае независимо представляют собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо;

Dxd представляет собой противоопухолевый агент, содержащий структуру в соответствии с формулой (P):



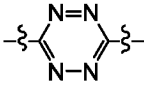
k и m независимо представляют собой целое число от 1 до 12, а n представляет собой целое число от 1 до 30,

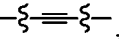
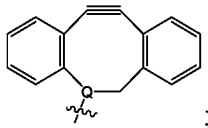
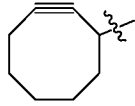
где:

способ включает следующие стадии:

a) приведение в контакт, в присутствии трансглутаминазы, ВА, содержащего по меньшей мере один остаток глутамина Gln (ВА-Gln-NH<sub>2</sub>), с соединением L1-B, где разветвленная единица В содержит по меньшей мере одну группу В',

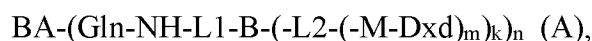
b) приведение в контакт продукта, полученного на стадии a), с k или более эквивалентами соединения L2-(-M-Dxd)<sub>m</sub>, где линкер L2 содержит по меньшей мере одну группу В'',

где одна из групп В' и В'' выбрана из -N<sub>3</sub> и ; а другая из групп В' и В''

выбрана из , ; и , где Q представляет собой С или N; и

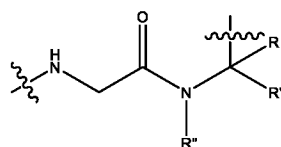
c) выделение полученного соединения формулы (I).

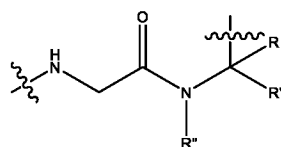
[0096] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения, имеющего структуру в соответствии с формулой (A):

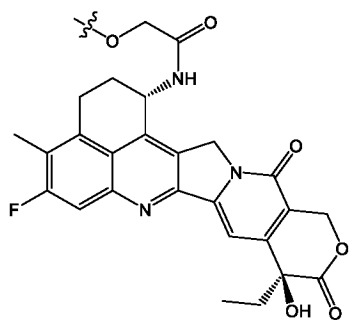


где ВА представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; Gln представляет собой остаток глутамина; L1 представляет собой первый линкер, как описано выше; В представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере один аддукт группы В' и группы В'', как описано выше; L2 представляет собой второй линкер, как описано выше, ковалентно присоединенный к разветвленной единице В через по меньшей мере одну группу В'', как описано выше; М отсутствует





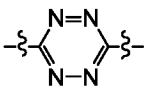
или представляет собой , где R, R' и R'' являются такими, как описано выше; Dxd представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):

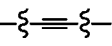
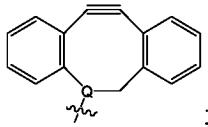
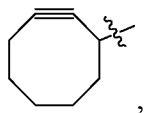


(P), k и m независимо представляют собой целое число от 1 до 12, а n представляет собой целое число от 1 до 30, где:

способ включает следующие стадии:

а) приведение в контакт соединения L1-B, где разветвленная единица B содержит по меньшей мере одну группу B', с k или более эквивалентами соединения L2-(-M-Dxd)<sub>m</sub>, где линкер L2 содержит по меньшей мере одну группу B'', способную ковалентно связываться с группой B',

где одна из групп B' и B'' выбрана из -N<sub>3</sub> и ; а другая из групп B' и B''

выбрана из , ; и ,

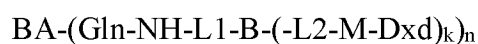
где Q представляет собой C или N;

тем самым получая L1-B-(-L2-(-M-Dxd)<sub>m</sub>)<sub>k</sub>;

б) приведение в контакт, в присутствии транsgлутаминазы, ВА, содержащего по меньшей мере один остаток глутамина Gln (ВА-Gln-NH<sub>2</sub>), с продуктом L1-B-(-L2-(-M-Dxd)<sub>m</sub>)<sub>k</sub>, полученным на стадии а), и

с) выделение полученного соединения формулы (I).

[0097] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения, имеющего структуру в соответствии с формулой (I):



(I),

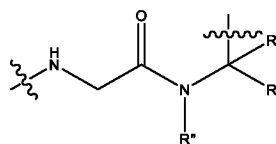
где ВА представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

Gln представляет собой остаток глутамина;

L1 представляет собой первый линкер;

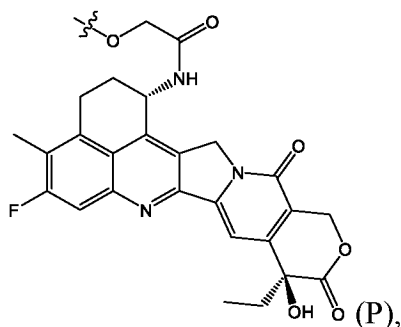
B представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере один аддукт группы B' и группы B'';

L2 представляет собой второй линкер, ковалентно присоединенный к разветвленной единице B через по меньшей мере одну группу B'';



M отсутствует или представляет собой , где R, R' и R'' в каждом случае независимо представляют собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо;

Dxd представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):

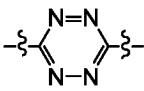


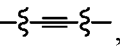
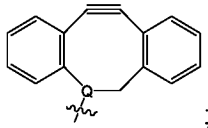
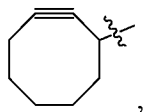
k представляет собой целое число от 1 до 12, а n представляет собой целое число от 1 до 30, где:

способ включает следующие стадии:

a) приведение в контакт, в присутствии трансглутаминазы, BA, содержащего по меньшей мере один остаток глутамина Gln (BA-Gln-NH<sub>2</sub>), с соединением L1-B, где разветвленная единица B содержит по меньшей мере одну группу B',

b) приведение в контакт продукта, полученного на стадии a), с k или более эквивалентами соединения L2-M-Dxd, где линкер L2 содержит по меньшей мере одну группу B'', способную ковалентно присоединяться к группе B',

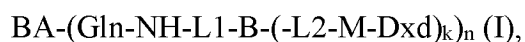
где одна из групп B' и B'' выбрана из -N<sub>3</sub> и ; а другая из групп B' и B''

выбрана из , ; и ,

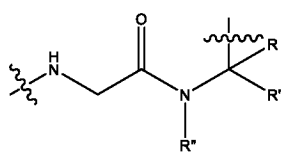
где Q представляет собой C или N; и

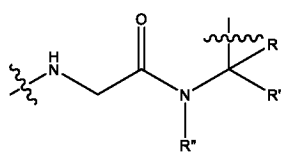
с) выделение полученного соединения формулы (I).

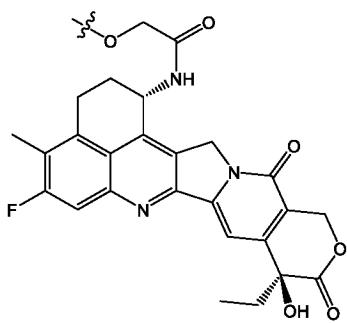
[0098] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения, имеющего структуру в соответствии с формулой (I):



где VA представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; Gln представляет собой остаток глутамина; L1 представляет собой первый линкер, как описано выше; B представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере один аддукт группы B' и группы B'', как описано выше; L2 представляет собой второй линкер, как описано выше, ковалентно присоединенный к разветвленной единице B через по меньшей мере одну группу B'', как описано выше; M отсутствует



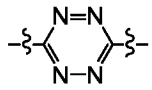
или представляет собой , где R, R' и R'' являются такими, как описано выше; Dxd представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):

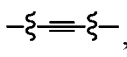
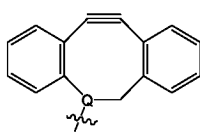
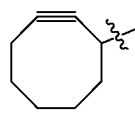


(P), k представляет собой целое число от 1 до 12, а n представляет собой целое число от 1 до 30, где:

способ включает следующие стадии:

а) приведение в контакт соединения L1-B, где разветвленная единица B содержит по меньшей мере одну группу B', с k или более эквивалентами соединения L2-M-Dxd, где линкер L2 содержит по меньшей мере одну группу B'', тем самым

получая L1-B-(-L2-M-Dxd)<sub>k</sub>, где одна из групп B' и B'' выбрана из -N<sub>3</sub> и ; а

другая из групп B' и B'' выбрана из , ; и , где Q представляет собой C или N;

b) приведение в контакт, в присутствии трансклутаминазы, связывающего агента ВА, содержащего по меньшей мере один остаток глутамина Gln (ВА-Gln-NH<sub>2</sub>), с продуктом L1-B-(-L2-M-Dxd)<sub>k</sub>, полученным на стадии а), и

с) выделение полученного соединения формулы (I).

[0099] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения, имеющего структуру в соответствии с формулой (III):



где ВА представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; Gln представляет собой остаток глутамина; L2'-P представляет собой H<sub>2</sub>N-SP1-B2-(-SP2-AA-SP3-M-Dxd)<sub>p</sub>, как описано выше, и n представляет собой целое число от 1 до 30;

SP1 отсутствует или представляет собой первую спейсерную единицу,

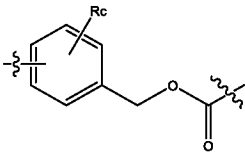
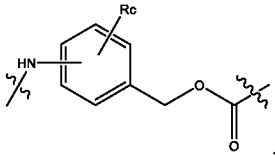
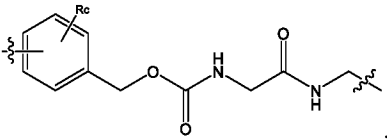
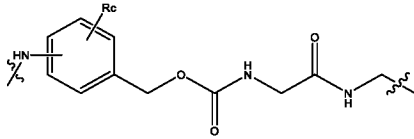
выбранную из группы, состоящей из  и  ;

B2 отсутствует или представляет собой разветвленную единицу;

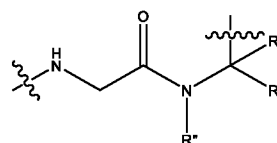
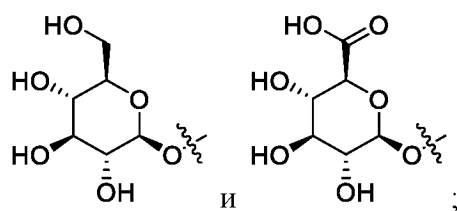
SP2 отсутствует или представляет собой вторую спейсерную единицу, выбранную из группы, состоящей из C<sub>1-6</sub> алкила, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-, -NH-, -C(O)-, -NH-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-NH-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-NH-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-NH-, или их комбинаций; где индексы u и v независимо представляют собой целое число от 1 до 8;

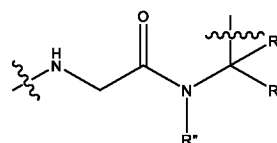
AA отсутствует или представляет собой пептидную единицу, содержащую от 2 до 4 аминокислот;

SP3 отсутствует или представляет собой третью спейсерную единицу,

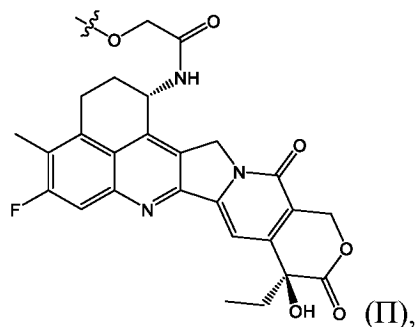
выбранную из группы, состоящей из  ,  ,  ,  , где R<sub>c</sub> независимо в

каждом случае отсутствует, или представляет собой группу, выбранную из



M отсутствует или представляет собой , где R, R' и R'' в каждом случае независимо представляют собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо; и

Dxd представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):



p представляет собой целое число от 1 до 30;

при этом способ включает следующие стадии:

- b) приведение в контакт, в присутствии трансглутаминазы, ВА, содержащего по меньшей мере один остаток глутамин Gln (ВА-Gln-NH<sub>2</sub>), с L2'-P, и
- c) выделение полученного соединения формулы (III).

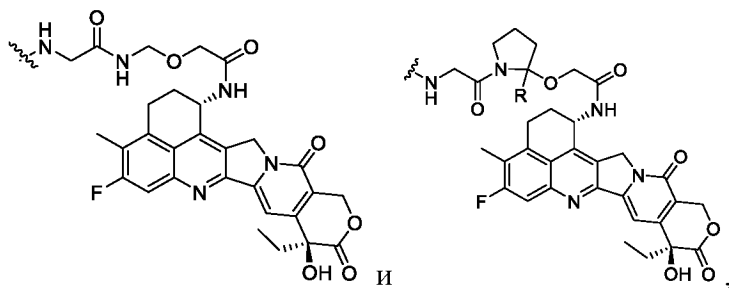
[0100] В одном варианте осуществления остаток глутамин Gln естественным образом присутствует в домене CH<sub>2</sub> или CH<sub>3</sub> ВА.

[0101] В одном варианте осуществления остаток глутамин Gln вводят в ВА путем модификации одной или нескольких аминокислот.

[0102] В одном варианте осуществления Gln представляет собой Q295 или N297Q.

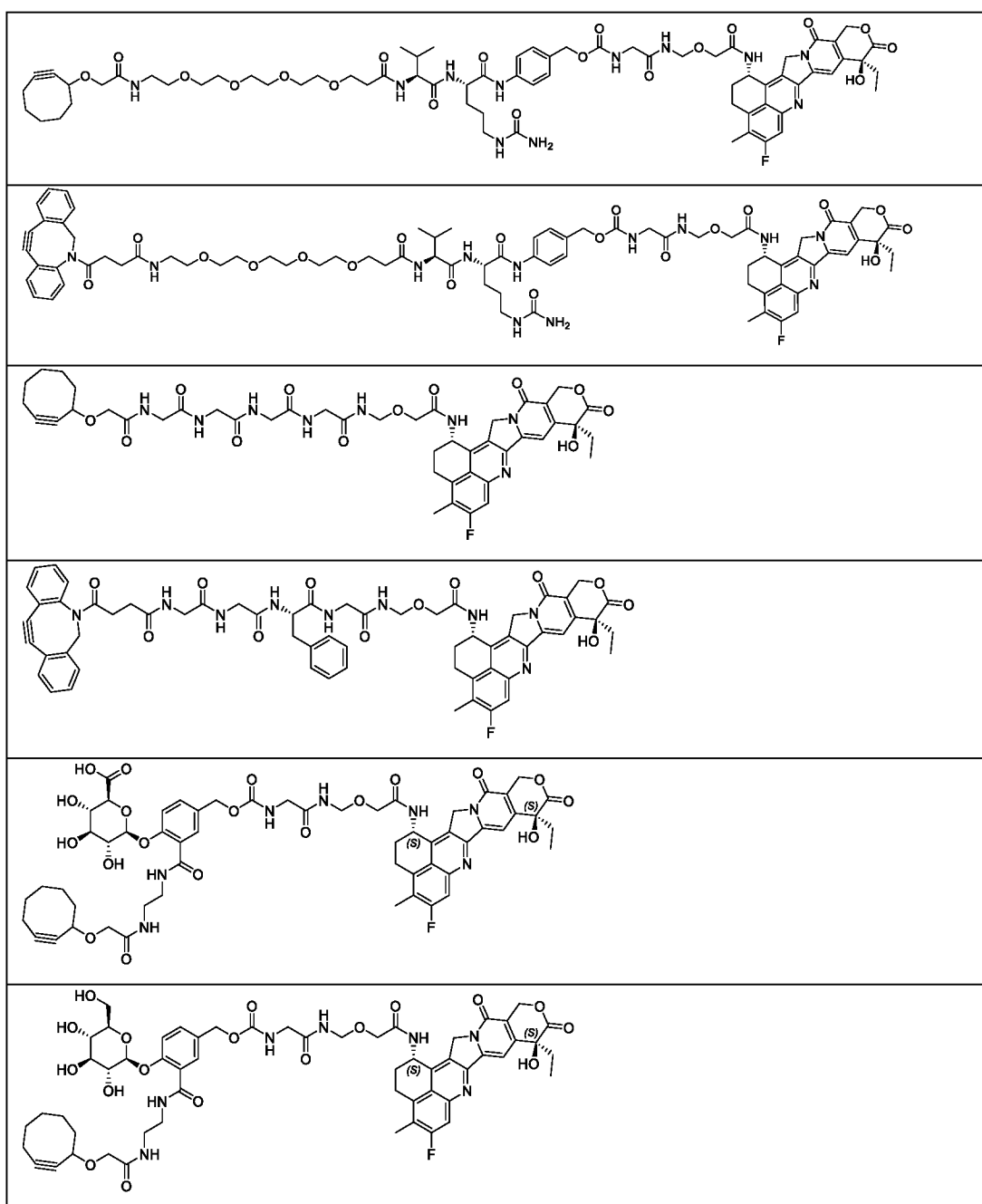
[0103] В одном варианте осуществления трансглутаминаза представляет собой микробную трансглутаминазу (MTG).

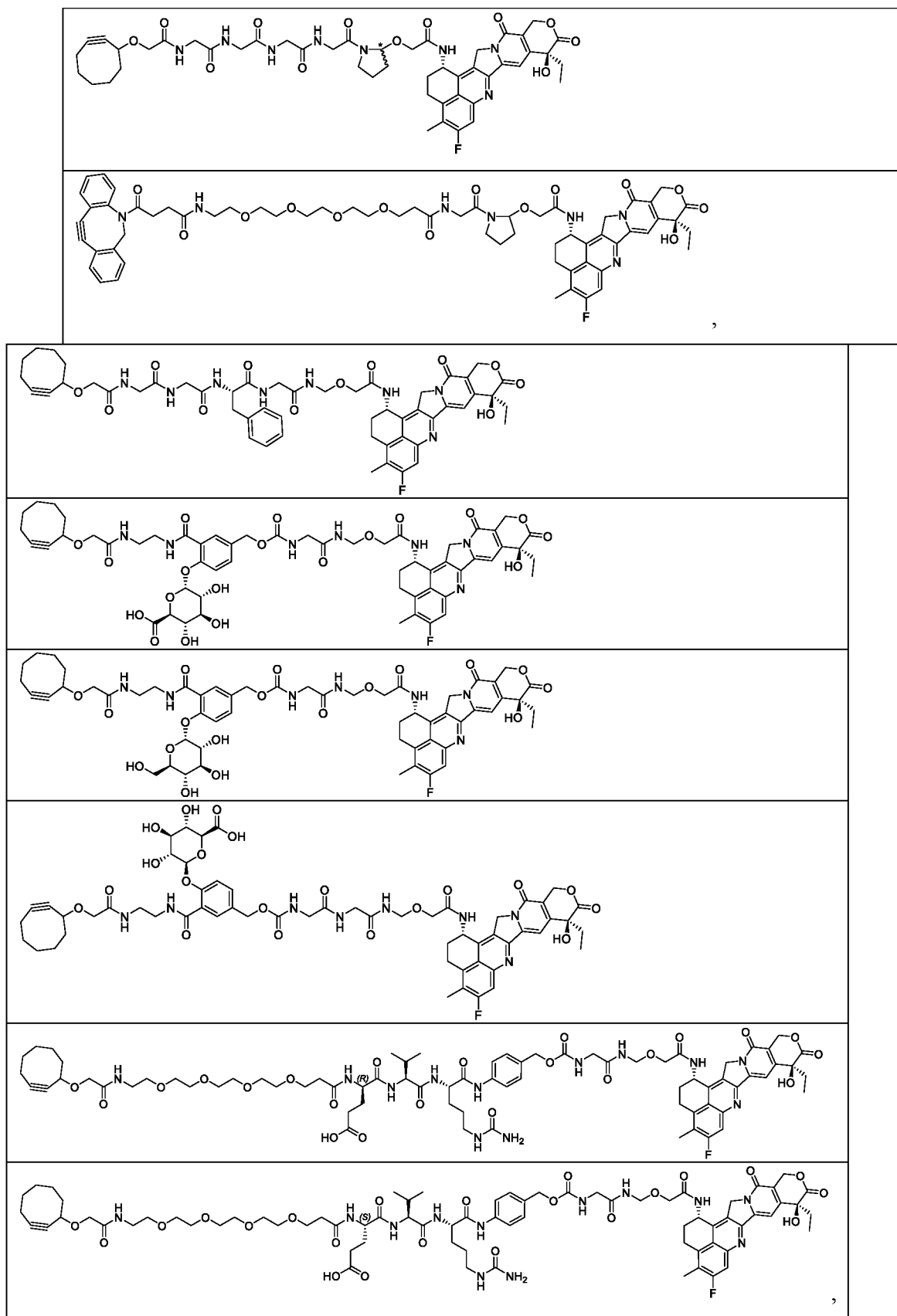
[0104] В одном варианте осуществления M отсутствует или M-Dxd имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из



где R представляет собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, и где  $\sim$  представляет собой точку присоединения к L2.

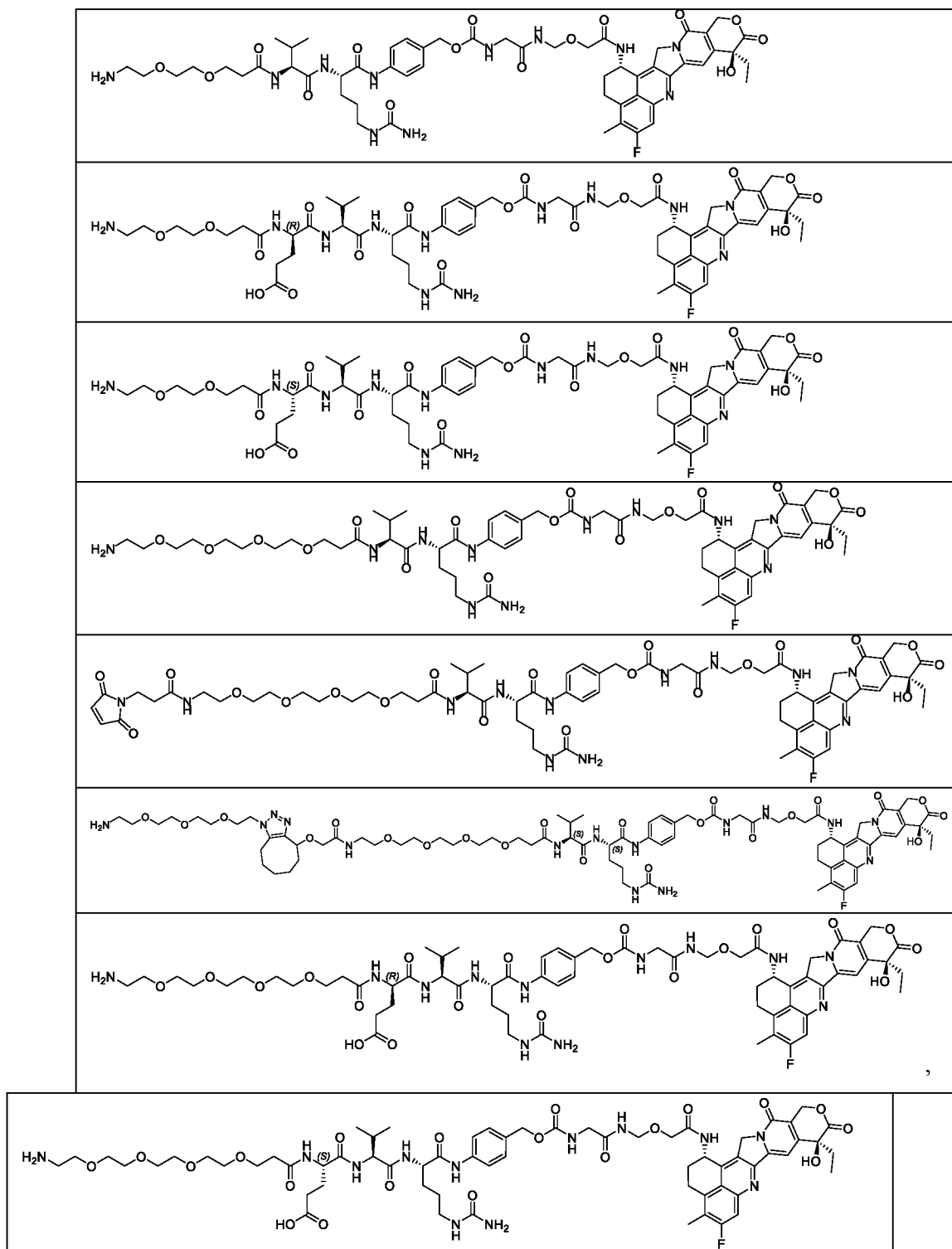
[0105] В одном варианте осуществления соединение L2-Dxd имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из:





или его фармацевтически приемлемая соль.

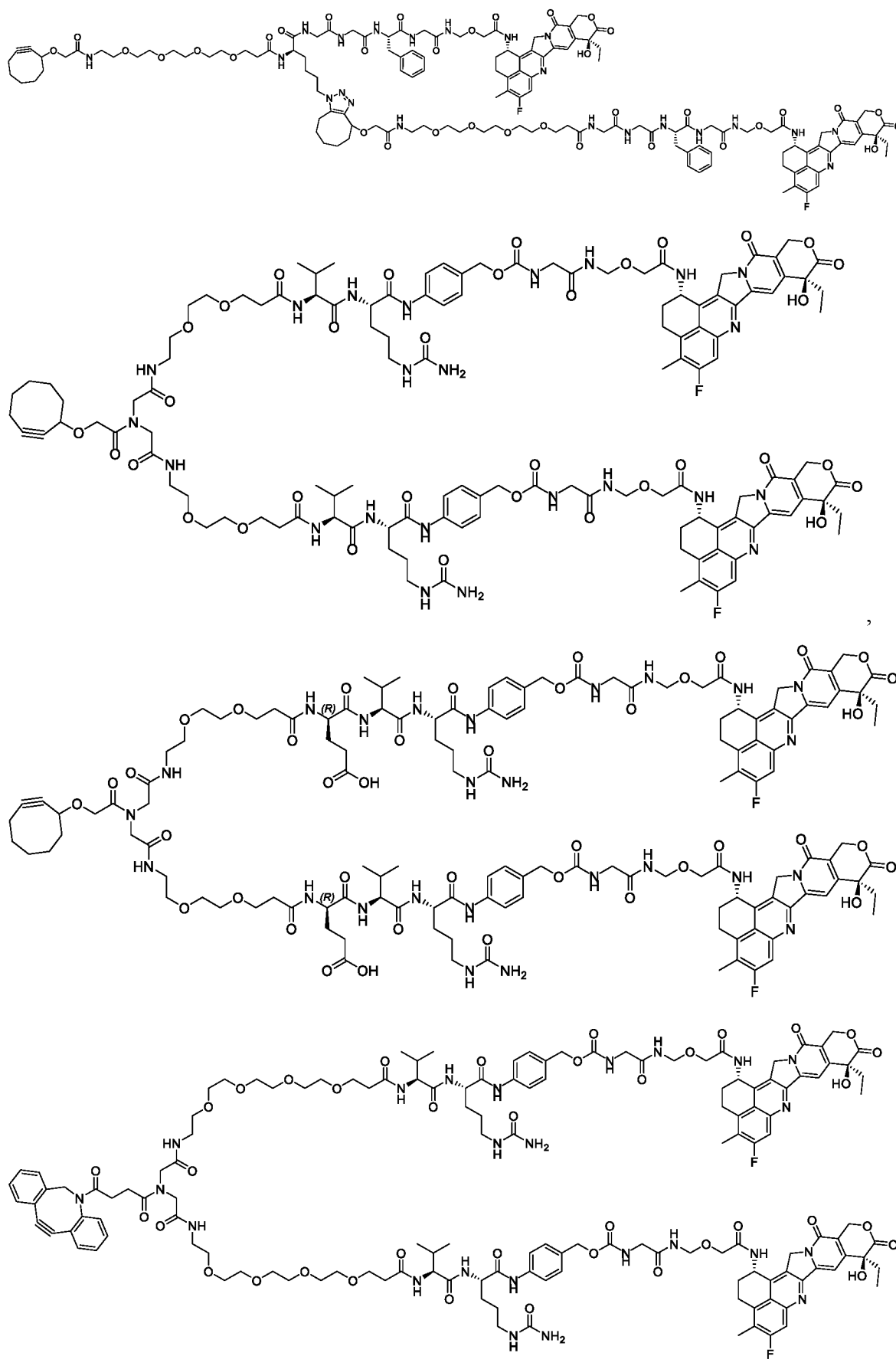
[0106] В одном варианте осуществления соединение L2-Dxd имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из:

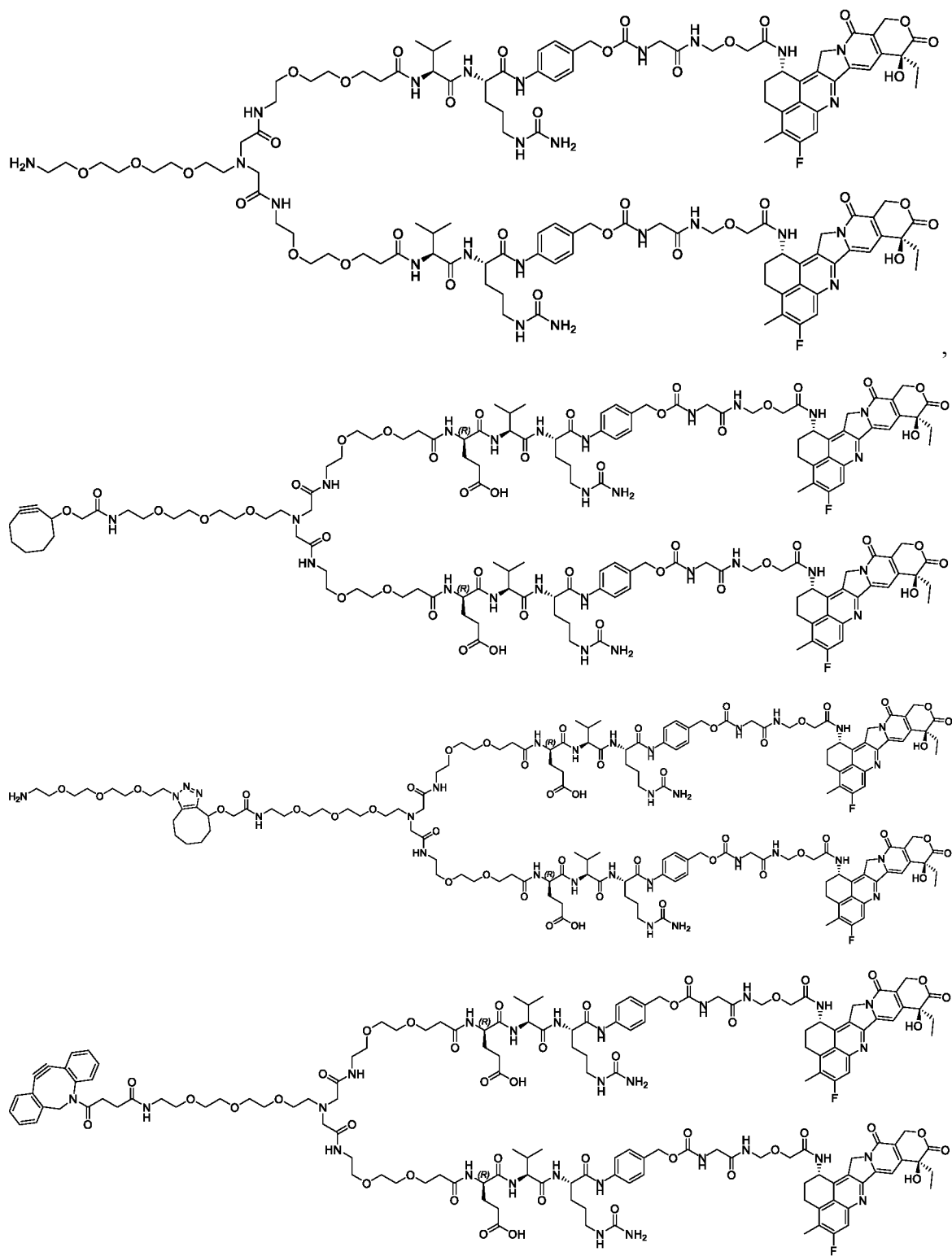


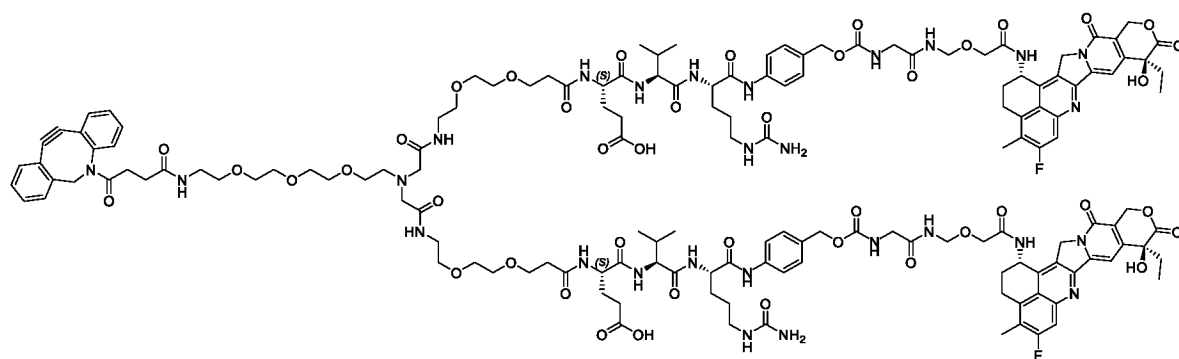
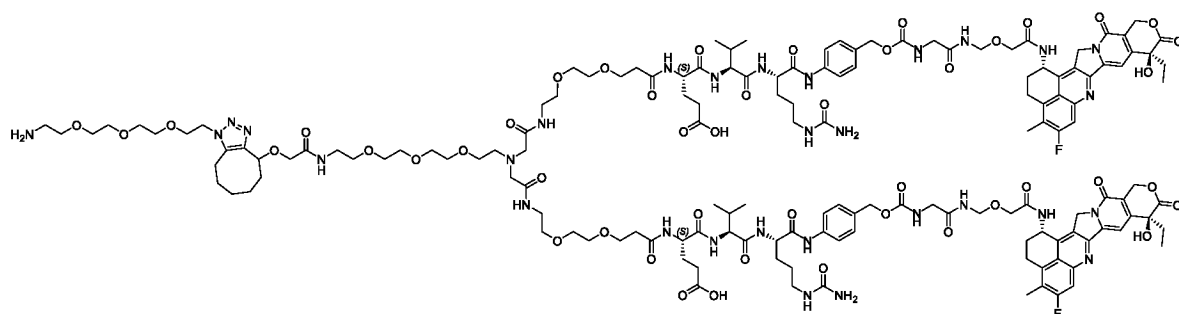
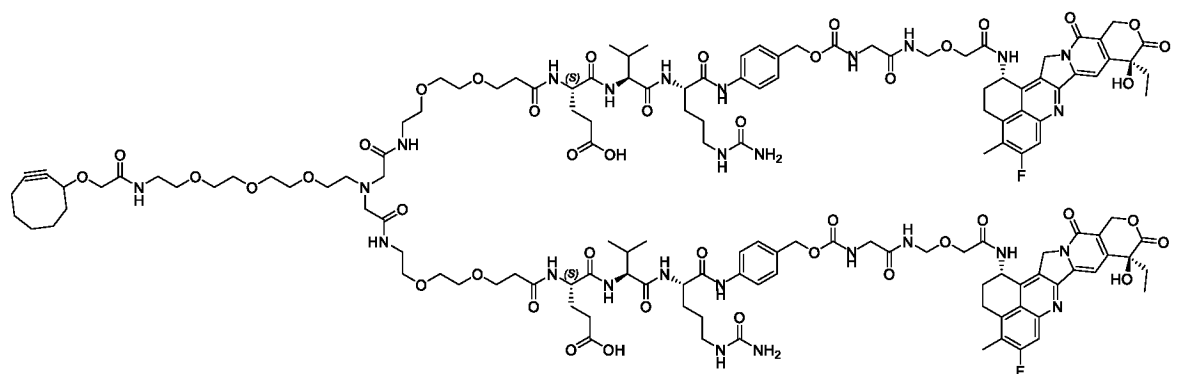
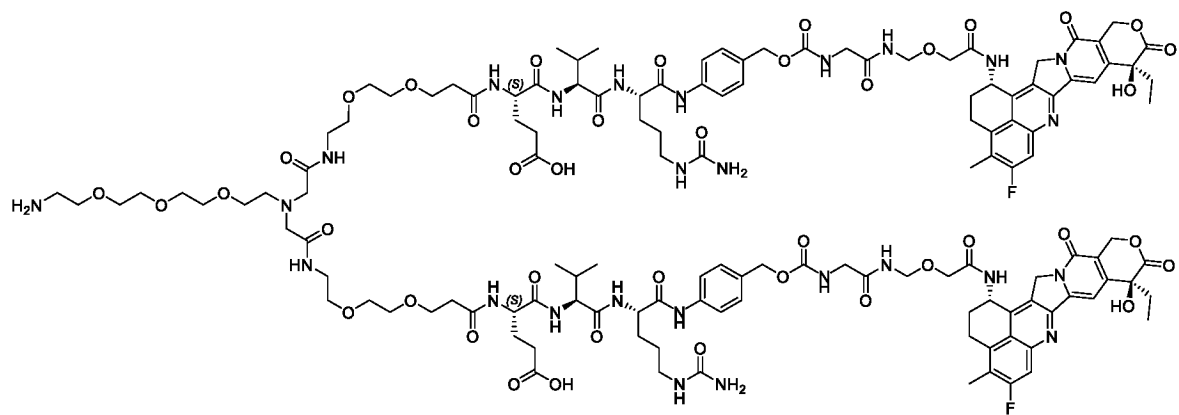
или его фармацевтически приемлемая соль.

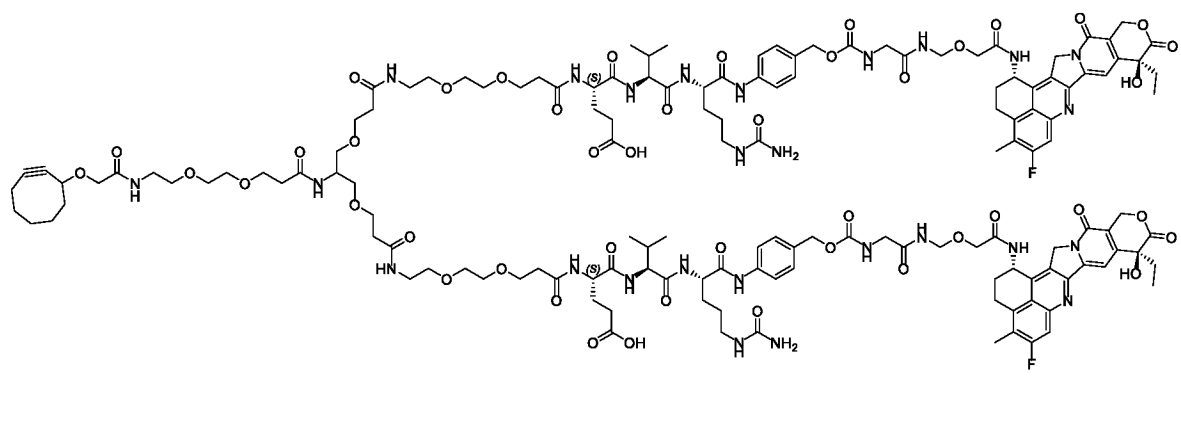
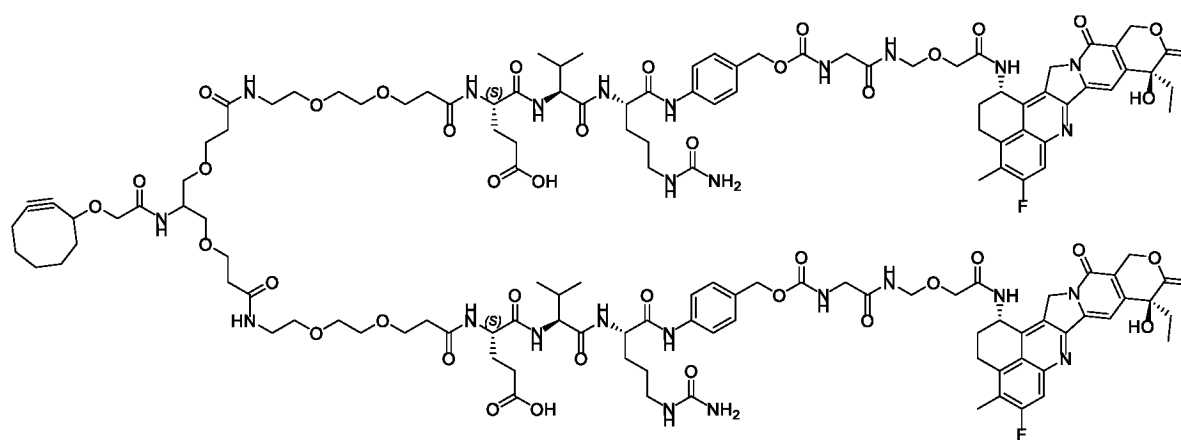
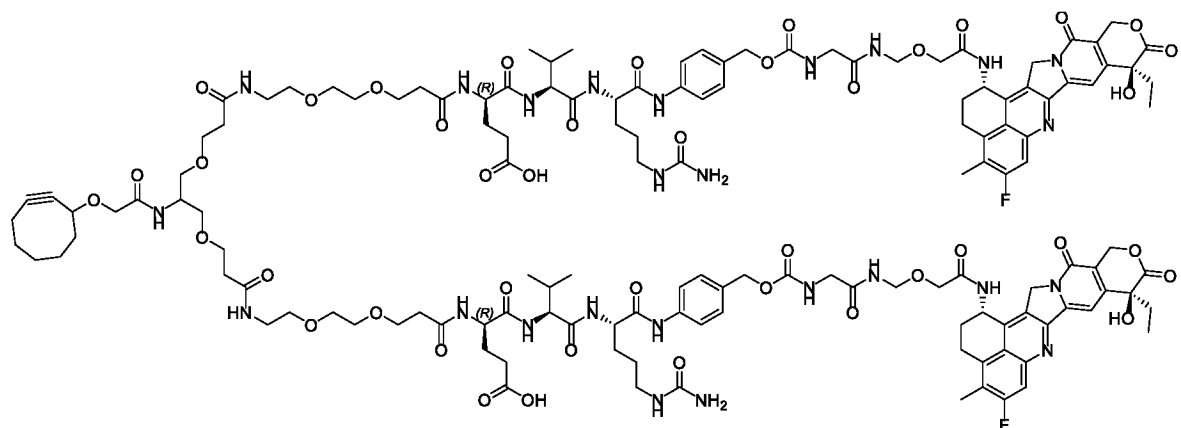
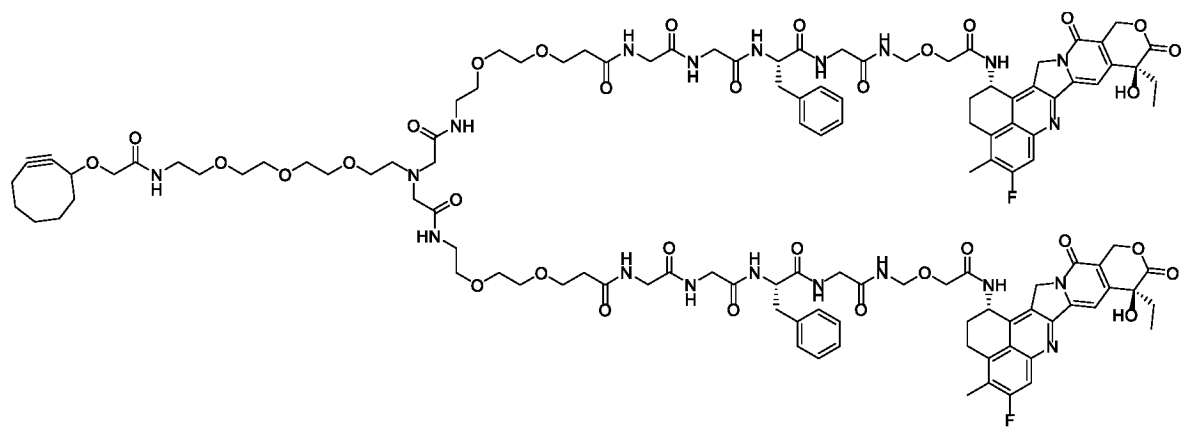
[0107] В одном варианте осуществления соединение L2-Dxd имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из:

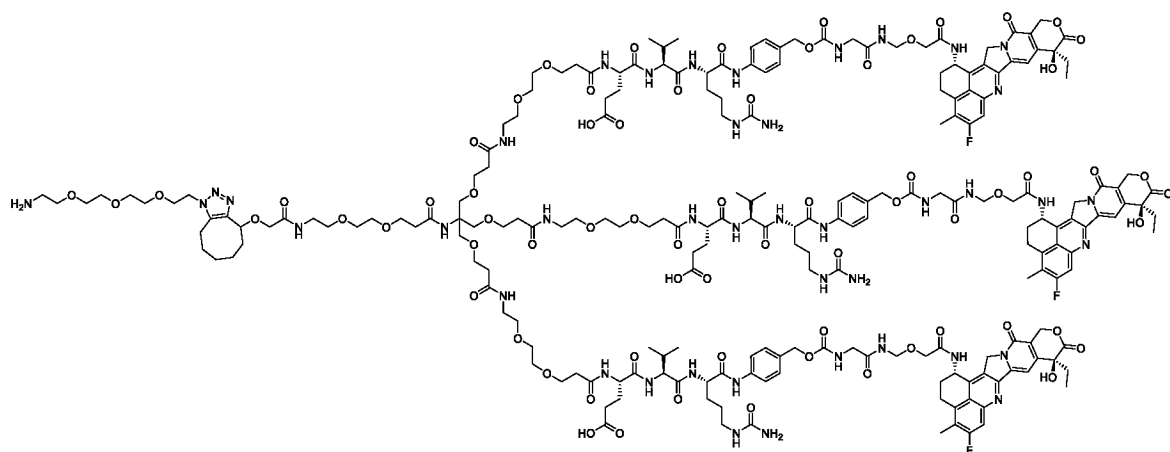
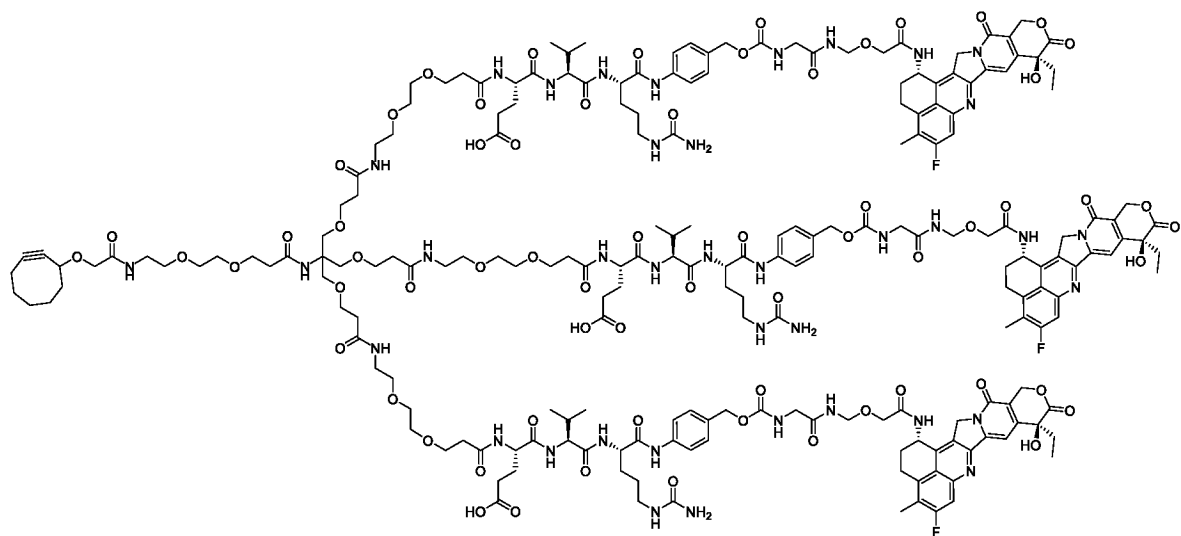
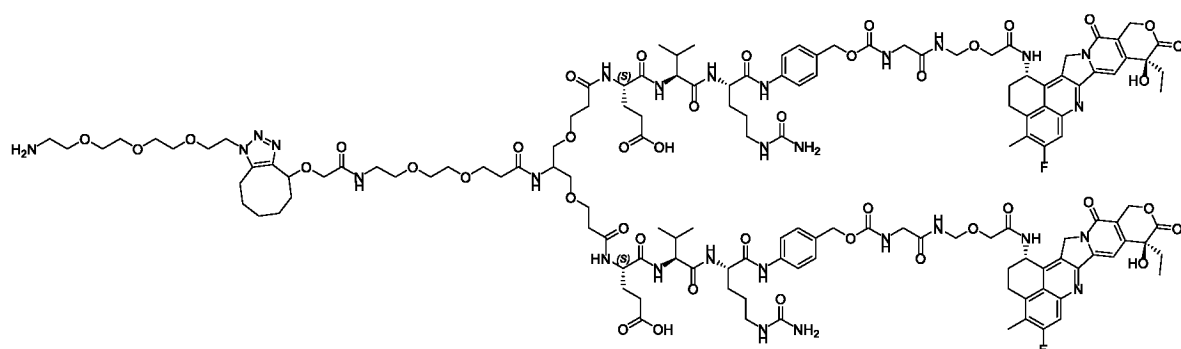
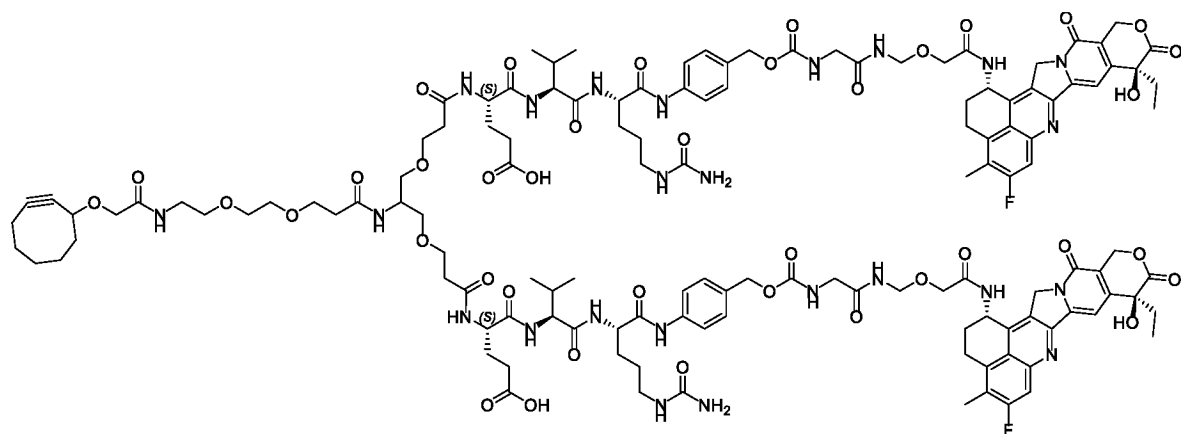












H

[0108] Эти и другие аспекты настоящего изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения следующего подробного описания изобретения, включая прилагаемую формулу изобретения.

### **Краткое описание чертежей**

[0109] Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один чертеж, выполненный в цвете. Копии публикации этого патента или патентной заявки с цветным чертежом(ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и за уплату необходимой пошлины.

[0110] **Фигура 1** представляет собой схему, демонстрирующую двухстадийное сайт-специфическое образование Dxd-ADC в соответствии с вариантом осуществления изобретения. Первой стадией является конъюгация одного или нескольких первых линкеров (**L1-B'**) с остатком глутамина на антителе посредством реакции конъюгации, опосредованной трансклутаминазой (например, MTG). Вторая стадия представляет собой конъюгацию соединения антитело-L1-B с одним или несколькими соединениями линкер 2-полезные нагрузки (**L2P**).

[0111] **Фигуры 2A и 2B** представляют собой схемы, демонстрирующие конкретные неограничивающие варианты осуществления изобретения. **Фигура 2A** представляет собой схему двухстадийного сайт-специфического образования соединений Dxd-ADC с остатками глутамина в положении 295, имеющих DAR  $2 \times n \times m$ , в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения. **Фигура 2B** представляет собой схему двухстадийного сайт-специфического образования соединений Dxd-ADC с остатком глутамина в положениях 295 и 297, имеющих DAR  $4 \times n \times m$ , в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0112] **Фигура 3A** представляет собой схему, демонстрирующую двухстадийное сайт-специфическое образование одного конкретного варианта осуществления соединения Dxd-ADC в соответствии с изобретением. Первой стадией является конъюгация линейного первого линкера 1 (**L1-B'**), содержащего один азидный фрагмент ( $-N_3$ ), с остатками глутамина в положениях 295 и 297 антитела посредством MTG-опосредованной реакции конъюгации с получением антитела, имеющего 4 присоединенных к нему азид-содержащих линкера ( $Ab-(N_3)_4$ ). Второй стадией является присоединение  $Ab-(N_3)_4$  к специфическому соединению линкер2-полезная нагрузка (**L2P**) посредством реакции азид-циклоалкинового 1,3-циклоприсоединения с образованием Dxd-ADC с DAR 4. На **фигуре 3B** представлены схематические

изображения ADC и иллюстративных амино азидо линкеров, имеющих DAR 2 или 4, подходящих для применения в варианте осуществления настоящего изобретения, изображенном на **фигуре 3А**.

[0113] **Фигура 4А** представляет собой схему, демонстрирующую двухстадийное сайт-специфическое образование одного конкретного варианта осуществления Dxd-ADC в соответствии с изобретением. Первой стадией является конъюгация разветвленного первого линкера 1 (**L1-B'**), содержащего два азидных фрагмента ( $-N_3$ ), с остатками глутамина в положениях 295 и 297 антитела посредством MTG-опосредованной реакции конъюгации, с получением антитела, имеющего 8 присоединенных к нему азид-содержащих линкеров ( $Ab-(N_3)_8$ ). Второй стадией является присоединение  $Ab-(N_3)_8$  к специфическому соединению линкер2-полезная нагрузка (**L2P**) посредством реакции азид-циклоалкинового 1,3-циклоприсоединения с образованием Dxd-ADC с DAR 8. На **фигуре 4В** изображены схематические изображения ADC и иллюстративные разветвленные алкил-азид-аминовые линкеры, подходящие для использования в варианте осуществления настоящего изобретения, изображенном на **фигуре 4А**.

[0114] **Фигура 5** представляет собой схему, демонстрирующую три подхода к получению сайт-специфических ADC с DAR4-DAR24 на антителе-Q295/297 в соответствии с вариантом осуществления изобретения.

[0115] **Фигура 6** представляет собой схему, демонстрирующую три подхода к получению сайт-специфических ADC с DAR2-DAR12 на антителе-Q295 в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

[0116] **Фигура 7А** представляет собой схему, демонстрирующую двухстадийный подход I к изготовлению иллюстративного ADC с 8DAR разветвленный линкер-полезная нагрузка ( $Ab-AL1-LP39$ ). **Фигура 7В** представляет собой схему, демонстрирующую двухстадийный подход II к изготовлению иллюстративного ADC с 8DAR разветвленный линкер-полезная нагрузка ( $Ab-BL2-LP22$ ). **Фигура 7С** представляет собой схему, демонстрирующую одностадийный подход III к изготовлению ADC с 4DAR линейный линкер-полезная нагрузка и ADC с 8DAR разветвленный линкер-полезная нагрузка.

[0117] На **фигуре 8А** (SNU16, FGFR2-амплифицированный рак желудка) и на **фигуре 8В** (мыши, несущие опухоль SNU16) показана зависимость объема опухоли от дней после лечения для ADC (DAR8) анти-FGFR2b Dxd в соответствии с описанием. Эти

ADC продемонстрировали значительную противоопухолевую эффективность в отношении ксенотрансплантатов рака желудка человека SNU-16.

**[0118]** На **фигуре 9А** (SNU16, FGFR2-амплифицированный рак желудка) и на **фигуре 9В** (мыши, несущие опухоль SNU16) показана зависимость объема опухоли от дней после лечения для ADC (DAR4) анти-FGFR2b Dxd в соответствии с описанием. Эти ADC продемонстрировали значительную противоопухолевую эффективность в отношении ксенотрансплантатов рака желудка человека SNU-16.

**[0119]** **Фигура 10** представляет собой матрицу, иллюстрирующую компоненты 272 иллюстративных MET x MET биспецифических антител, раскрытых в настоящем документе. Каждая пронумерованная ячейка матрицы идентифицирует уникальное биспецифическое антитело, содержащее антигенсвязывающий домен «D1» и антигенсвязывающий домен «D2», где антигенсвязывающий домен D1 содержит переменный домен иммуноглобулина (пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR) или CDR из соответствующего анти-MET антитела, указанного по оси Y, и где антигенсвязывающий домен D2 содержит переменный домен иммуноглобулина (пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR) или CDR из соответствующего анти-MET антитела, указанного по оси X.

#### **Подробное описание изобретения**

**[0120]** В настоящем документе раскрыты подробные варианты осуществления настоящего изобретения; однако следует понимать, что раскрытые варианты осуществления являются лишь иллюстрацией изобретения, которое может быть воплощено в различных формах. Кроме того, каждый из примеров, приведенных в связи с различными вариантами осуществления изобретения, предназначен для иллюстрации, а не для ограничения. Следовательно, конкретные структурные и функциональные детали, раскрытые в настоящем документе, не должны интерпретироваться как ограничивающие, а лишь как репрезентативная основа для обучения специалистов в данной области различным применениям настоящего изобретения.

#### **Определения**

**[0121]** Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение.

**[0122]** Используемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа «а», «an» и «the» включают ссылки во множественном числе, если



из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на «способ» включает один или несколько способов и/или стадий типа, описанного в настоящем документе, и/или которые станут очевидными для специалистов в данной области после прочтения настоящего описания.

**[0123]** Термины «лечить» или «лечение» состояния, нарушения или патологического состояния включают: (1) предупреждение, отсрочку или снижение частоты и/или вероятности появления по меньшей мере одного клинического или субклинического симптома состояния, нарушения или патологического состояния, развивающегося у субъекта, который может быть поражен или предрасположен к состоянию, нарушению или патологическому состоянию, но еще не испытывает или не проявляет клинических или субклинических симптомов состояния, нарушения или патологического состояния; или (2) ингибирование состояния, нарушения или патологического состояния, т.е. остановку, уменьшение или задержку развития заболевания или его рецидива, или по меньшей мере одного его клинического или субклинического симптома; или (3) облегчение заболевания, т.е. вызывание регрессии состояния, нарушения или патологического состояния, или по меньшей мере одного из его клинических или субклинических симптомов. Польза для субъекта, подлежащего лечению, является либо статистически значимой, либо по меньшей мере заметной для пациента или врача. В некоторых вариантах осуществления лечение включает способы, в которых клетки удаляются таким образом, что косвенно воздействует на заболевание. В некоторых вариантах осуществления лечение включает истощение иммунных клеток в качестве режима кондиционирования кроветворения перед терапией.

**[0124]** «Субъект», или «пациент», или «индивидуум», или «животное» в данном контексте относится к людям, ветеринарным животным (например, кошкам, собакам, коровам, лошадям, овцам, свиньям и т.д.) и экспериментальным животным моделям заболеваний (например, мышам, крысам). В предпочтительном варианте осуществления субъектом является человек.

**[0125]** Используемый в настоящем документе термин «эффективный» применительно к дозе или количеству относится к такому количеству соединения или фармацевтической композиции, которое является достаточным для достижения желаемой активности при введении субъекту, нуждающемуся в этом. Следует отметить, что при введении комбинации активных ингредиентов эффективное количество комбинации может включать или не включать количества каждого ингредиента, которые были бы эффективными при введении по отдельности. Точное требуемое количество будет

варьироваться от субъекта к субъекту в зависимости от вида, возраста и общего состояния субъекта, тяжести состояния, подлежащего лечению, конкретного применяемого лекарственного средства или лекарственных средств, способа введения и т.п.

**[0126]** Фраза «фармацевтически приемлемая соль», используемая в связи с композициями по настоящему изобретению, относится к любой соли, подходящей для введения пациенту. Подходящие соли включают, но без ограничения, соли, раскрытые в Berge et al., "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66:1, включенном в настоящий документ в качестве ссылки. Примеры солей включают, но без ограничения, кислые, щелочные, органические, неорганические соли, соли аминов и щелочных или щелочноземельных металлов, включая, но без ограничения, соли кальция, соли магния, соли калия, соли натрия, соли соляной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты, азотной кислоты, фосфорной кислоты, уксусной кислоты, пропионовой кислоты, гликолевой кислоты, пировиноградной кислоты, щавелевой кислоты, малеиновой кислоты, малоновой кислоты, янтарной кислоты, фумаровой кислоты, винной кислоты, лимонной кислоты, бензойной кислоты, коричной кислоты, миндальной кислоты, метансульфоновой кислоты, этансульфоновой кислоты, п-толуолсульфоновой кислоты, салициловой кислоты и т.п. В некоторых примерах полезная нагрузка, описанная в настоящем документе (например, аналог рифамицина, описанный в настоящем документе), содержит третичный амин, при этом атом азота в третичном амине представляет собой атом, через который полезная нагрузка связана с линкером или линкером-спейсером. В таких случаях связывание с третичным амином полезной нагрузки дает четвертичный амин в молекуле линкер-полезная нагрузка. Положительный заряд четвертичного амина может быть уравновешен противоположно (например, хлором, бромом, йодом или любым другим соответствующим образом заряженным фрагментом, таким как описанные в настоящем документе).

**[0127]** Диапазоны могут быть выражены в настоящем документе как от «около» или «приблизительно» одного конкретного значения и/или до «около» или «приблизительно» другого конкретного значения. Когда указан такой диапазон, другой вариант осуществления включает от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения.

**[0128]** Под «включающим в себя» или «содержащим» или «включающим» подразумевается, что по меньшей мере названное соединение, элемент, частица или стадия способа присутствует в композиции, изделии или способе, но не исключает

присутствия других соединений, материалов, частиц или стадий способа, даже если другие такие соединения, материал, частицы или стадии способа имеют ту же функцию, что и названные.

**[0129]** Соединения по настоящему изобретению включают соединения, описанные в общих чертах в настоящем документе, и дополнительно проиллюстрированы классами, подклассами и видами, раскрытыми в настоящем документе. Используемые в настоящем документе следующие определения должны применяться, если не указано иное. Для целей настоящего изобретения химические элементы идентифицируют в соответствии с Периодической таблицей элементов, версия CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed. Кроме того, общие принципы органической химии описаны в "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, и "March's Advanced Organic Chemistry", 5th Ed., Ed.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001, полное содержание которых включено в настоящий документ в качестве ссылки.

**[0130]** Используемый в настоящем документе термин «алкил» имеет свое обычное значение в данной области и может включать насыщенные алифатические группы, включая алкильные группы с прямой цепью, алкильные группы с разветвленной цепью, циклоалкильные (алициклические) группы, алкилзамещенные циклоалкильные группы, и циклоалкилзамещенные алкильные группы. В некоторых вариантах осуществления алкил с прямой или разветвленной цепью имеет примерно 1-20 атомов углерода в основной цепи (например, C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> для прямой цепи, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> для разветвленной цепи) и, альтернативно, примерно 1-10 атомов углерода, или примерно 1-6 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления циклоалкильное кольцо имеет примерно 3-10 атомов углерода в своей кольцевой структуре, где такие кольца являются моноциклическими или бициклическими, и, альтернативно, примерно 5, 6 или 7 атомов углерода в кольцевой структуре. В некоторых вариантах осуществления алкильная группа может представлять собой низшую алкильную группу, при этом низшая алкильная группа содержит 1-4 атома углерода (например, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> для низших алкилов с прямой цепью).

**[0131]** Используемый в настоящем документе термин «алкенил» относится к алкильной группе, как определено в настоящем документе, имеющей одну или несколько двойных связей.

**[0132]** Используемый в настоящем документе термин «алкинил» относится к алкильной группе, как определено в настоящем документе, имеющей одну или несколько тройных связей.

**[0133]** Термин «гетероатом» означает один или несколько атомов кислорода, серы, азота, фосфора или кремния (включая любую окисленную форму атома азота, серы, фосфора или кремния; кватернизированную форму любого основного атома азота; или способный к замещению атом азота гетероциклического кольца).

**[0134]** Термин «галоген» означает F, Cl, Br или I; термин «галогенид» относится к галогеновому радикалу или заместителю, а именно -F, -Cl, -Br или -I.

**[0135]** Термин «аддукт», например, «аддукт группы B'» по настоящему изобретению охватывает любой фрагмент, содержащий продукт реакции присоединения, например, реакции присоединения группы B', независимо от предпринятых стадий синтеза для получения фрагмента.

**[0136]** Термин «ковалентное присоединение» означает образование ковалентной связи, т.е. химической связи, которая включает совместное использование одной или более электронных пар между двумя атомами. Ковалентная связь может включать множество видов взаимодействия, включая, но без ограничения,  $\sigma$ -связь,  $\pi$ -связь, связь металл-металл, агостические взаимодействия, деформированные связи и трехцентровые двухэлектронные связи. Когда говорится, что первая группа «способна ковалентно присоединиться» ко второй группе, это означает, что первая группа способна образовывать ковалентную связь со второй группой, непосредственно или опосредованно, например, посредством использования катализатора или в определенных условиях реакции. Неограничивающие примеры групп, способных ковалентно связываться друг с другом, могут включать, например, амин и карбоновую кислоту (с образованием амидной связи), диен и диенофил (через реакцию Дильса-Альдера), азид и алкин (с образованием триазола в результате реакции 1,3-циклоприсоединения).

**[0137]** Как описано в настоящем документе, соединения по изобретению могут содержать «необязательно замещенные» фрагменты. В общем, термин «замещенный», независимо от того, предшествует ли ему термин «необязательно» или нет, означает, что один или несколько атомов водорода в обозначенном фрагменте замещены подходящим заместителем. Если не указано иное, «необязательно замещенная» группа может иметь подходящий заместитель в каждом замещаемом положении группы, и когда более чем одно положение в любой данной структуре может быть замещено

более чем одним заместителем, выбранным из указанной группы, заместитель может быть одинаковым или различным в каждом положении. Комбинации заместителей, представленных в данном изобретении, предпочтительно являются такими, которые приводят к образованию стабильных или химически возможных соединений. Термин «стабильный», используемый в настоящем документе, относится к соединениям, которые по существу не изменяются, когда подвергаются условиям, обеспечивающим их получение, обнаружение и, в некоторых вариантах осуществления, их выделение, очищение и использование для одной или более раскрытых в настоящем документе целей.

**[0138]** Если не указано иное, структуры, изображенные в настоящем документе, также включают все изомерные (например, энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные)) формы указанной структуры; например, R и S конфигурации для каждого асимметрического центра, (Z) и (E) изомеры двойной связи, и (Z) и (E) конформационные изомеры. Следовательно, в объем настоящего изобретения входят отдельные стереохимические изомеры, а также энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные) смеси данных соединений.

**[0139]** Если не указано иное, то в объем настоящего изобретения входят все таутомерные формы соединений по настоящему изобретению.

**[0140]** Кроме того, если не указано иное, то структуры, изображенные в настоящем документе, также предназначены для включения соединений, которые отличаются только наличием одного или нескольких изотопно-обогащенных атомов. Например, соединения, имеющие представленные структуры, за исключением замены водорода дейтерием или тритием, или замены углерода  $^{11}\text{C}$ - или  $^{13}\text{C}$ -, или  $^{14}\text{C}$ -обогащенным углеродом, входят в объем настоящего изобретения.

**[0141]** Также следует понимать, что упоминание одного или нескольких стадий способа не исключает наличия дополнительных стадий способа или промежуточных стадий способа между этими конкретно указанными стадиями. Также следует понимать, что упоминание одного или нескольких компонентов в устройстве или системе не исключает наличия дополнительных компонентов или промежуточных компонентов между этими конкретно указанными компонентами.

**[0142]** Если не указано иное, все кристаллические формы соединений по изобретению и их соли также входят в объем изобретения. Соединения по изобретению могут быть выделены в различных аморфных и кристаллических формах, включая без ограничения

формы, которые являются безводными, гидратированными, несольватированными или сольватированными. Примеры гидратов включают полугидраты, моногидраты, дигидраты и т.п. В некоторых вариантах осуществления соединения по изобретению являются безводными и несольватированными. Под «безводным» подразумевается, что кристаллическая форма соединения практически не содержит связанной воды в структуре кристаллической решетки, т.е. соединение не образует кристаллогидрат.

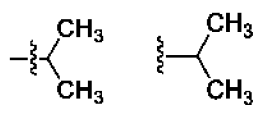
**[0143]** Используемый в настоящем документе термин «кристаллическая форма» относится к определенной конфигурации решетки кристаллического вещества. Различные кристаллические формы одного и того же вещества обычно имеют разные кристаллические решетки (например, элементарные ячейки), что связано с различными физическими свойствами, характерными для каждой из кристаллических форм. В некоторых случаях разные конфигурации решетки имеют разное содержание воды или растворителя. Различные кристаллические решетки можно идентифицировать методами определения характеристик твердого тела, такими как порошковая рентгеновская дифракция (PXRD). Другие способы характеристики, такие как дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC), термогравиметрический анализ (TGA), динамическая сорбция паров (DVS), ЯМР твердого тела и т.п., дополнительно помогают идентифицировать кристаллическую форму, а также помогают определить стабильность и содержание растворителя/воды.

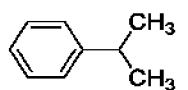
**[0144]** Кристаллические формы вещества включают как сольватированные (например, гидратированные), так и несольватированные (например, безводные) формы. Гидратированная форма представляет собой кристаллическую форму, которая включает воду в кристаллической решетке. Гидратированные формы могут быть стехиометрическими гидратами, где вода присутствует в решетке в определенном соотношении вода/молекула, например, для полугидратов, моногидратов, дигидратов и т.д. Гидратированные формы также могут быть нестехиометрическими, где содержание воды варьируется и зависит от внешних условий, таких как влажность.

**[0145]** В некоторых вариантах осуществления соединения по изобретению являются по существу изолированными. Под «по существу изолированными» подразумевается, что конкретное соединение является по меньшей мере частично изолированным от примесей. Например, в некоторых вариантах осуществления соединения по изобретению содержит менее чем около 50%, менее чем около 40%, менее чем около 30%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5%, менее чем около 2,5%, менее чем около 1% или менее чем около 0,5%

примесей. Примеси обычно включают все, что по существу не представляет собой изолированное соединение, включая, например, другие кристаллические формы и другие вещества.

**[0146]** Некоторые группы, фрагменты, заместители и атомы изображены волнистой линией. Волнистая линия может пересекать или закрывать связь или связи. Волнистая линия указывает на атом, через который присоединяются группы, фрагменты, заместители или атомы. Например, фенильная группа, замещенная пропильной

группой, изображенной как: , имеет следующую структуру:



**[0147]** Выражение «HER2» или «рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа» относится к члену семейства рецепторов эпидермального фактора роста человека. Белок также известен как NEU; NGL; HER2; TKR1; CD340; HER-2; MLN 19; HER-2/neu. HER2 может относиться к аминокислотной последовательности, указанной в NCBI под номером доступа NP\_004439.2. Было показано, что амплификация или сверхэкспрессия этого онкогена играет важную роль в развитии и прогрессировании некоторых агрессивных типов рака молочной железы. В последние годы белок стал важным биомаркером и мишенью терапии примерно для 30% больных раком молочной железы. Все ссылки на белки, полипептиды и белковые фрагменты в настоящем документе предназначены для обозначения человеческой версии соответствующего белка, полипептида или белкового фрагмента, если явно не указывается, что они происходят от вида, отличного от человека. Таким образом, выражение «HER2» означает человеческий HER2, если не указано, что он происходит от вида, отличного от человека, например, «мышинный HER2», «обезьяний HER2» и т. д.

**[0148]** Фраза «антитело, которое связывается с HER2» или «анти-HER2 антитело» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают HER2.

**[0149]** Фраза «анти-HER2/HER2 антитело», например, «анти-HER2/HER2 биспецифическое антитело» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают два разных эпитопа HER2. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела и их антигенсвязывающие фрагменты содержат первый антигенсвязывающий домен (D1), который специфически

связывается с первым эпитопом HER2 человека, и второй антигенсвязывающий домен (D2), который специфически связывается со вторым эпитопом HER2 человека.

**[0150]** Используемое в настоящем документе выражение «STEAP2» относится к шести-трансмембранному эпителиальному антигену простаты 2. STEAP2 представляет собой интегральный шести-трансмембранный белок, который в высокой степени экспрессируется в эпителиальных клетках простаты и является маркером клеточной поверхности для рака предстательной железы, например, было обнаружено, что STEAP2 экспрессируется на значительных уровнях в линии клеток предстательной железы LNCaP (Porkka, et al. *Lab Invest* 2002, 82:1573–1582). STEAP2 (UniProtKB/Swiss-Prot: Q8NFT2.3) представляет собой белок из 490 аминокислот, кодируемый геном *STEAP2*, расположенным в хромосомной области 7q21 у человека, см., например, аминокислотную последовательность STEAP2 человека, представленную в таблицах 1 и 2.

**[0151]** Используемый в настоящем документе термин «антитело, которое связывается с STEAP2» или «анти-STEAP2 антитело» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают STEAP2.

**[0152]** Фраза «антитело, которое связывается с MET» или «анти-MET антитело» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают MET. Выражения «MET», «с-Met» и т.п., используемые в настоящем документе, относятся к трансмембранной рецепторной тирозинкиназе человека.

**[0153]** Выражение «анти-MET/MET антитело», например, «анти-MET/MET биспецифическое антитело» включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают два разных эпитопа MET. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела и их антигенсвязывающие фрагменты содержат первый антигенсвязывающий домен (D1), который специфически связывается с первым эпитопом MET человека, и второй антигенсвязывающий домен (D2), который специфически связывается со вторым эпитопом MET человека.

**[0154]** Все аббревиатуры аминокислот, используемые в данном изобретении, являются аббревиатурами, принятыми Ведомством США по патентам и товарным знакам, как указано в 37 C.F.R. § 1.822 (B) (J).

**[0155]** Термин «белок» означает любой аминокислотный полимер, содержащий более чем около 20 аминокислот, ковалентно связанных посредством амидных связей. Используемый в настоящем документе термин «белок» включает биотерапевтические белки, рекомбинантные белки, используемые в исследованиях или терапии, белки-



ловушки и другие Fc-слитые белки, химерные белки, антитела, моноклональные антитела, человеческие антитела, биспецифические антитела, фрагменты антител, нанотела, химеры рекомбинантных антител, scFv-слитые белки, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белки могут быть получены с использованием систем продуцирования на основе рекомбинантных клеток, таких как баккуловирусовая система экспрессии в клетках насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia* sp.), системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1).

**[0156]** Все ссылки на белки, полипептиды и белковые фрагменты в настоящем документе предназначены для обозначения человеческой версии соответствующего белка, полипептида или белкового фрагмента, если явно не указано, что они происходят от вида, отличного от человека. Таким образом, выражение «STEAP2» означает STEAP2 человека, если не указано, что он относится к нечеловеческим видам, например, «STEAP2 мыши», «STEAP2 обезьяны» и т.д.

**[0157]** Аминокислотная последовательность антитела может быть пронумерована с использованием любых известных схем нумерации, включая схемы, описанные Kabat et al. (схема нумерации «Кабат»); Al-Lazikani et al., 1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948 (схема нумерации «Чютия»); MacCallum et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (схема нумерации «Контакт»); Lefranc et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 2003, 27:55-77 (схема нумерации «IMGT»); и Honegge and Pluckthun, *J. Mol. Biol.*, 2001, 309:657-70 (схема нумерации «АНО»). Если не указано иное, используемая в настоящем документе схема нумерации представляет собой схему нумерации Кабат. Однако выбор схемы нумерации не подразумевает различий в последовательностях, где они не существуют, и специалист в данной области может легко подтвердить положение последовательности, изучив аминокислотную последовательность одного или нескольких антител. Если не указано иное, «схема нумерации EU» обычно используется в отношении остатка в константной области тяжелой цепи антитела (например, как сообщалось у Kabat et al., см. выше).

**[0158]** Термин «глутаминил-модифицированное антитело» относится к антителу по меньшей мере с одной ковалентной связью от боковой цепи глутамина к соединению первичного амина по настоящему изобретению. В конкретных вариантах осуществления соединение первичного амина связано амидной связью на боковой цепи глутамина. В некоторых вариантах осуществления глутамин представляет собой эндогенный глутамин. В других вариантах осуществления глутамин представляет

собой эндогенный глутамин, сделанный реакционноспособным посредством конструирования полипептида (например, путем делеции, вставки, замены или мутации аминокислот в полипептиде). В дополнительных вариантах осуществления глутамин представляет собой полипептид, сконструированный с помощью донора ацила глутамин-содержащей метки (например, глутамин-содержащие пептидные метки, Q-метки или метку распознавания TGase).

**[0159]** Термин «метка распознавания TGase» относится к последовательности аминокислот, содержащей акцепторный остаток глутамина, которая при включении (например, при присоединении) в полипептидную последовательность в подходящих условиях распознается TGase и приводит к перекрестному связыванию TGase посредством реакции между боковой цепью аминокислоты в последовательности аминокислот и партнером по реакции. Метка распознавания может представлять собой пептидную последовательность, которая в природе не присутствует в полипептиде, содержащем метку распознавания TGase. В некоторых вариантах осуществления метка распознавания TGase содержит по меньшей мере один Gln. В некоторых вариантах осуществления метка распознавания TGase содержит аминокислотную последовательность XXQX (SEQ ID NO: 1935), где X представляет собой любую аминокислоту (например, обычную аминокислоту Leu, Ala, Gly, Ser, Val, Phe, Tyr, His, Arg, Asn, Glu, Asp, Cys, Gln, Ile, Met, Pro, Thr, Lys или Trp, или нетрадиционную аминокислоту). В некоторых вариантах осуществления донор ацила глутамин-содержащая метка содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из LLQGG (SEQ ID NO:1936), LLQG (SEQ ID NO:1937), LSLSQG (SEQ ID NO:1938), gGLLQGG (SEQ ID NO:1939), gLLQG (SEQ ID NO:1940), LLQ, gSPLAQSHGG (SEQ ID NO:1941), gLLQGGG (SEQ ID NO:1942), gLLQGG (SEQ ID NO:1943), gLLQ (SEQ ID NO:1944), LLQLLQGA (SEQ ID NO:1945), LLQGA (SEQ ID NO:1946), LLQYQGA (SEQ ID NO:1947), LLQGS (SEQ ID NO:1948), LLQYQG (SEQ ID NO:1949), LLQLLQG (SEQ ID NO:1950), SLLQG (SEQ ID NO:1951), LLQLQ (SEQ ID NO:1952), LLQLLQ (SEQ ID NO:1953) и LLQGR (SEQ ID NO:1954). См., например, WO 2012059882, полное содержание которой включено в настоящий документ.

**[0160]** Используемый в настоящем документе термин «антитело» означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается с конкретным антигеном или взаимодействует с ним. Термин «антитело»

включает молекулы иммуноглобулина, состоящие из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, взаимосвязанных дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно именуется в настоящем документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно именуется в настоящем документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL1). Области VH и VL могут быть далее подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В разных вариантах осуществления FR антитела (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусная последовательность аминокислот может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR.

**[0161]** Используемый в настоящем документе термин «антитело» также включает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п., используемые в настоящем документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генно-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антитела с помощью любых подходящих стандартных способов, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные генно-инженерные методики, включающие манипуляции и экспрессию ДНК, кодирующую переменный и необязательно константный домены антитела. Такая ДНК известна и/или легкодоступна, например, из коммерческих источников, ДНК-библиотек (включая, например, библиотеки фаг-антитело) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и с ней можно манипулировать химическим путем или с помощью способов молекулярной биологии, например,

расположить один или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации, или ввести кодоны, создать остатки цистеина, модифицировать, добавлять или удалять аминокислоты, и т.д.

**[0162]** Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные Fv (scFv) молекулы; (vi) dAb-фрагменты; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гиперпеременную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как CDR3-пептид), или ограниченный FR3-CDR3-FR4 пептид. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с присоединенными CDR, диатела, триатела, тетраатела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунные лекарственные препараты (SMIP) и шарк-переменные домены IgNAR, также охватываются выражением «антигенсвязывающий фрагмент», используемым в настоящем документе.

**[0163]** Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может быть любого размера или любого аминокислотного состава и, как правило, включает по меньшей мере одну CDR, которая примыкает к одной или нескольким каркасным последовательностям или находится в рамке считывания. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен VH, связанный с доменом VL, домены VH и VL могут быть расположены относительно друг друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры VH-VH, VH-VL или VL-VL.

**[0164]** Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен VH или VL.

**[0165]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменного и константного доменов, которые могут быть обнаружены в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему описанию, включают: (i) VH-CH1; (ii) VH-CH2; (iii) VH-CH3; (iv) VH-CH1-CH2; (v) VH-CH1-CH2-CH3; (vi) VH-CH2-CH3; (vii) VH-CL; (viii) VL-CH1; (ix) VL-CH2; (x) VL-CH3; (xi) VL-CH1-CH2; (xii) VL-CH1-CH2-CH3; (xiii) VL-CH2-CH3; и (xiv) VL-CL. В

любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любые иллюстративные конфигурации, перечисленных в настоящем документе, переменный и константный домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны при помощи полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые дают в результате гибкую или полугибкую связь между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле.

**[0166]** Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему описанию может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любых конфигураций переменного и константного доменов, перечисленных в настоящем документе, в нековалентной связи друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными VH или VL доменами (например, при помощи дисульфидной связи(ей)).

**[0167]** Как и полноразмерные молекулы антитела, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно состоит по меньшей мере из двух различных переменных доменов, где каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с разными эпитопами одного и того же антигена. Любой мультиспецифический формат антитела, включая типичные биспецифические форматы антитела, описанные в настоящем документе, может быть адаптирован для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему описанию с помощью рутинных способов, применяемых в данной области.

**[0168]** Антитела по настоящему описанию могут функционировать через комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) или антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC). «Комплементзависимая цитотоксичность» (CDC) относится к лизису антиген-экспрессирующих клеток при помощи антитела по изобретению в присутствии комплемента. «Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» (ADCC) относится к клеточно-опосредованной реакции, при которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, клетки-естественные киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги) распознают связанное антитело на клетке-мишени и, тем самым, приводят к лизису клетки-мишени. CDC и ADCC можно определять с помощью анализов, которые хорошо известны и доступны в данной области. (См., например, патенты

США 5500362 и 5821337, и Clynes et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656). Константная область антитела важна в способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточно-зависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основании того, предпочтительно ли для антитела опосредовать цитотоксичность.

**[0169]** В некоторых вариантах осуществления антитела по описанию, например, анти-HER2 антитела или анти-HER2/HER2 биспецифические антитела, или анти-MET антитела, или анти-MET/MET биспецифические антитела, или анти-STEAP2 антитела представляют собой человеческие антитела. Термин «человеческое антитело», используемый в настоящем документе, включает антитела с переменной и константной областями, полученными из последовательностей зародышевой линии иммуноглобулинов человека. Человеческие антитела по описанию могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями зародышевой линии иммуноглобулинов человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или при помощи соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и в определенную CDR3. Однако термин «человеческое антитело», используемый в настоящем документе, не должен включать антител, в которых CDR-последовательности, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты к человеческим каркасным последовательностям.

**[0170]** В некоторых вариантах осуществления антитела могут представлять собой рекомбинантные антитела человека. Термин «рекомбинантное антитело человека», используемый в настоящем документе, включает все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, например, антитела, экспрессируемые с помощью рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяин (описано дополнительно ниже), антитела, выделенные из рекомбинантных, комбинаторных библиотек антител человека (дополнительно описано ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным для генов иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295) или антитела, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей

зародышевой линии иммуноглобулинов человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, когда используется животное, трансгенное для Ig-последовательностей человека, соматический мутагенез *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности VH и VL областей рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, несмотря на то, что получены от и родственны VH и VL последовательностям зародышевой линии человека, могут не естественным образом существовать в пределах совокупности зародышевой линии антител человека *in vivo*.

**[0171]** Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина состоит из стабильной четырехцепочечной конструкции около 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе с помощью соединяющих тяжелые цепи дисульфидных связей. Во второй форме димеры не связаны между собой через межцепочечные дисульфидные связи, и образуется молекула около 75-80 кДа, составленная из ковалентно связанных легких и тяжелых цепей (полуантитело). Эти формы чрезвычайно трудно отделить, даже после аффинной очистки. Частота появления второй формы в различных изоформах интактных IgG обусловлена, без ограничения, структурными различиями, связанными с шарнирной областью изоформы антитела. Единичная аминокислотная замена в шарнирной области шарнира IgG4 человека позволяет значительно уменьшить появление второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30: 105) до уровней, обычно наблюдаемых при помощи шарнира IgG1 человека. Настоящее описание охватывает антитела, имеющие одну или несколько мутаций в шарнирной, CH2- или CH3-области, что может оказаться желательным, например, при производстве, для повышения выхода требуемой формы антитела.

**[0172]** Антитела по описанию могут представлять собой выделенные или очищенные антитела. «Выделенное антитело» или «очищенное антитело», как используется в настоящем документе, означает антитело, которое было идентифицировано, выделено и/или очищено по меньшей мере от одного компонента окружающей среды. Например, антитело, которое было выделено или удалено по меньшей мере из одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которой антитело естественным образом существует или образуется естественным путем, является «выделенным антителом» для целей по настоящему описанию. Например, антитело, которое было очищено по

меньшей мере от одного компонента реакции или последовательности реакций, является «очищенным антителом» или полученным в результате очистки антитела. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* внутри рекомбинантной клетки. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по крайней мере одной стадии очистки или выделения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления выделенное антитело или очищенное антитело может практически не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

**[0173]** Антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях переменных областей тяжелой и легкой цепи доменов, по сравнению с аналогичными последовательностями зародышевой линии, из которой были получены антитела. Такие мутации могут быть легко установлены в результате сравнения последовательностей аминокислот, описанных в настоящем документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее описание включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе, где одна или несколько аминокислот в пределах одной или нескольких каркасных и/или CDR-областей мутируют в соответствующий остаток(ки) последовательностей зародышевой линии, из которой было получено антитело, или соответствующий остаток(ки другой последовательности зародышевой линии человека, или консервативной аминокислотной замене соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности называются в настоящем документе в совокупности «мутации эмбрионального типа»). Специалист в данной области, начиная с последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепи, описанных в настоящем документе, может легко получить множество антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций эмбрионального типа или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления каждый из каркасных и/или CDR остатков в VH и/или VL доменах мутирует обратно в остатки, обнаруживаемые в исходной эмбриональной последовательности, из которой были получены антитела. В других вариантах осуществления только некоторые остатки мутируют обратно к исходной эмбриональной последовательности, например, только мутантные остатки, расположенные в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8



аминокислот FR4, или только мутантные остатки, расположенные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или несколько каркасных и/или CDR остатков(а) мутируют в соответствующие остатки(ок) отличной эмбриональной последовательности (т.е. эмбриональной последовательности, которая отличается от эмбриональной последовательности, из которой было изначально получено антитело).

**[0174]** Кроме того, антитела по настоящему описанию могут содержать любую комбинацию из двух или более эмбриональных мутаций в пределах каркасной и/или CDR областей, например, где определенные индивидуальные остатки мутируют в соответствующие остатки в определенной эмбриональной последовательности, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной эмбриональной последовательности, сохраняются или мутируют в соответствующие остатки отличной эмбриональной последовательности. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько эмбриональных мутаций, могут быть легко проверены на одно или более необходимых свойств, таких как улучшение специфичности связывания, увеличение аффинности связывания, увеличенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), сниженная иммуногенность, улучшенное соотношение лекарственное средство-антитело (DAR) для конъюгатов антитело-лекарственное средство и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом, охватываются настоящим описанием.

**[0175]** Термин «агликозилированное антитело» относится к антителу, которое не содержит последовательности гликозилирования, которая может препятствовать реакции трансглутаминирования, например, к антителу, которое не имеет сахаридной группы в положении N297 на одной или нескольких тяжелых цепях. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь антитела имеет мутацию N297. Другими словами, антитело мутировано, чтобы больше не иметь остатка аспарагина в положении 297 в соответствии с системой нумерации EU, как описано Kabat et al. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь антитела имеет мутацию N297Q или N297D. Такое антитело может быть получено с помощью сайт-направленного мутагенеза для удаления или отключения последовательности гликозилирования или с помощью сайт-направленного мутагенеза для вставки остатка глутамина в сайт отдельно от любого мешающего сайта гликозилирования или любой другой мешающей структуры. Такое антитело также может быть выделено из природных или искусственных источников. Агликозилированные антитела также включают антитела,

содержащие T299 или S298P или другие мутации, или комбинации мутаций, которые приводят к отсутствию гликозилирования.

**[0176]** Термин «дегликозилированное антитело» относится к антителу, в котором сахаридная группа удалена для облегчения опосредованной трансглутаминазой конъюгации. Сахариды включают, но без ограничения, N-связанные олигосахариды. В некоторых вариантах осуществления дегликозилирование проводят по остатку N297. В некоторых вариантах осуществления удаление сахаридных групп осуществляют ферментативно, в том числе, но без ограничения, с помощью PNGазы.

**[0177]** Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут иметь различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть либо конформационными, либо линейными. Конформационный эпитоп образуется пространственно сближенными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, образуемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать части сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

**[0178]** Термины «конъюгированный белок» или «конъюгированное антитело», используемые в настоящем документе, относятся к белку или антителу, ковалентно связанному с одним или несколькими химическими фрагментами. Химический фрагмент может включать соединение амина по настоящему изобретению. Линкеры (**L**) и полезные нагрузки (**D**), подходящие для использования с настоящим изобретением, подробно описаны в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления конъюгированное антитело, содержащее терапевтический фрагмент, представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), также называемый конъюгатом антитело-полезная нагрузка или конъюгатом антитело-линкер-полезная нагрузка.

**[0179]** Термин «соотношение лекарственного средства к антителу» или (DAR) представляет собой среднее количество терапевтических фрагментов, например, лекарственных средств, конъюгированных со связывающим агентом по настоящему изобретению.

**[0180]** Термин «соотношение линкер-антитело» или (LAR), также обозначаемый строчной буквой l в некоторых вариантах осуществления, представляет собой среднее количество реакционноспособных соединений первичного амина, конъюгированных со связывающим агентом по настоящему изобретению. Такие связывающие агенты, например антитела, могут быть конъюгированы с соединениями первичного амина, включающими, например, подходящий азид или алкин. Полученный связывающий агент, функционализированный азидом или алкином, может впоследствии реагировать с терапевтическим фрагментом, содержащим соответствующий азид или алкин, посредством реакции 1,3-циклоприсоединения.

**[0181]** Выражение «фармацевтически приемлемое количество» относится к количеству, эффективному или достаточному для лечения, уменьшения, облегчения или модулирования эффектов или симптомов по меньшей мере одной проблемы со здоровьем у нуждающегося в этом субъекта. Например, фармацевтически приемлемое количество антитела или конъюгата антитело-лекарственное средство представляет собой количество, эффективное для модулирования биологической мишени с использованием антитела или конъюгатов антитело-лекарственное средство, предложенных в настоящем документе. Подходящие фармацевтически приемлемые количества включают, но без ограничения, от примерно 0,001% до примерно 10% и любое промежуточное количество, такое как примерно 0,01%, примерно 0,02%, примерно 0,03%, примерно 0,04%, примерно 0,05%, примерно 0,06%, примерно 0,07%, примерно 0,08%, примерно 0,09%, примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9 %, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9% или примерно 10% антитела или конъюгата антитело-лекарственное средство, обеспеченного в настоящем документе.

**[0182]** Выражение «рН реакции» относится к рН реакции после добавления всех компонентов реакции или реагентов.

**[0183]** Термин «существенная идентичность» или «в существенной степени идентичный» в случае, когда речь идет о нуклеиновой кислоте или ее фрагменте, указывает на то, что в случае оптимального выравнивания с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) идентичность нуклеотидной последовательности составляет по меньшей мере около 95%, еще предпочтительнее по меньшей мере около 96%, 97%,

98% или 99% нуклеотидных оснований, как определено при помощи любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательности, такого как FASTA, BLAST или GAP, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может в некоторых случаях кодировать полипептид, имеющий ту же или в существенной степени сходную аминокислотную последовательность аминокислот, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

**[0184]** Применительно к полипептидам, термин «значительное сходство» или «по существу сходный» означает, что две пептидные последовательности в случае выравнивания оптимальным образом, например, по программам GAP или BESTFIT, используя по умолчанию веса пробелов, составляют по меньшей мере 95% идентичности последовательности, даже более предпочтительно по меньшей мере 98% или 99% идентичности последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не идентичны, отличаются путем консервативных аминокислотных замен. «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, заряд или гидрофобность). В общем, консервативная аминокислотная замена не приведет к существенному изменению функциональных свойств белка. В случаях, когда две или более последовательностей аминокислот отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степени сходства могут быть скорректированы в сторону увеличения, чтобы скорректировать консервативный характер замещения. Средства для реализации этого корректирования хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи с подобными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. В некоторых вариантах осуществления группы консервативных аминокислотных замен представляют собой: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин.

[0185] Альтернативно, консервативная замена представляет собой какие-либо изменения, имеющее положительное значение в PAM250 log-матрице вероятности, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445. «Умеренно консервативная» замена представляет собой любую замену, имеющую неотрицательное значение в PAM250 log-матрице вероятности.

[0186] Сходство последовательностей для полипептидов, которое также называют идентичностью последовательностей, как правило, оценивают с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для белкового анализа сопоставляет сходные последовательности с помощью средств сходства, определенных для различных замен, делеций и других модификаций, в том числе консервативных аминокислотных замен. Например, программное обеспечение GCG содержит программы, такие как GAP и Bestfit, которые могут быть использованы с параметрами по умолчанию, чтобы определить гомологию последовательностей или идентичность последовательностей близкородственных полипептидов, например, таких как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и белком, образуемым в результате их мутации. См., например, GCG версия 6.1. Полипептидные последовательности также могут быть сравнены с помощью FASTA, используя параметры по умолчанию или рекомендуемые параметры, программа в GCG версия 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) предоставляет выравнивания и процент идентичности последовательности областей наилучшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска (Pearson (2000), см. выше). Другой рекомендуемый алгоритм сравнения последовательности по изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей из разных организмов, представляет собой компьютерную программу BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, используя параметры по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 and Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

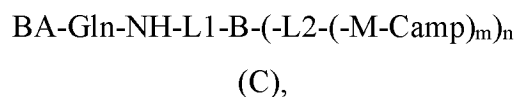
#### **Соединения конъюгатов белок-лекарственное средство**

[0187] В соответствии с вышеуказанной и другими целями настоящее изобретение обеспечивает соединения конъюгатов белок-лекарственное средство, например, соединения конъюгатов антитело-лекарственное средство, а также к их предшественники и промежуточные соединения, фармацевтические композиции, и способы лечения определенных заболеваний у субъекта, нуждающегося в таком лечении. В соответствии с изобретением соединения конъюгатов белок-лекарственное

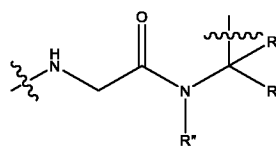
средство, обеспеченные в настоящем документе, содержат глутаминил-модифицированный связывающий агент, конъюгированный с соединением первичного амина, связанным с терапевтическим фрагментом, например, фрагментом аналога камптотецина, как описано в настоящем документе.

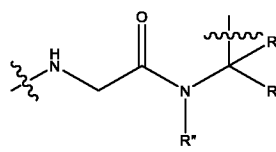
**[0188]** В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает соединения, содержащие связывающий агент в соответствии с настоящим изобретением (например, антитело или его фрагмент), имеющий один или несколько остатков глутамина, конъюгированных с одним или несколькими аналогами камптотецина, например, Dxd, через необязательный первый линкер, разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере один аддукт, и необязательный второй линкер. Иллюстративные неограничивающие примеры включают формулу (I) и формулу (II), описанные в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления конъюгата белок-лекарственное средство в соответствии с изобретением, где связывающий агент представляет собой антитело (например, моноклональное антитело), необязательно используется термин «конъюгат антитело-лекарственное средство» или ADC.

**[0189]** В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает соединение, имеющее структуру в соответствии с формулой (C):

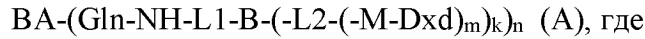


где VA представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; Gln представляет собой остаток глутамина; L1 отсутствует или представляет собой первый линкер; B представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере один аддукт группы B' и группы B'', где группа B' представляет собой первый компонент, например, первый компонент циклоприсоединения; L2 представляет собой второй линкер, ковалентно присоединенный к разветвленной единице B через по меньшей мере одну группу B'', где B'' представляет собой второй компонент, например, второй компонент циклоприсоединения, и где группа B' и группа B'' образуют по меньшей мере один аддукт; M отсутствует или представляет



собой фрагмент, имеющий структуру , где R, R' и R'' независимо в каждом случае представляют собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> алкил, или где R' и R'' вместе образуют кольцо; Camp представляет собой аналог камптотецина, а m и n независимо представляют собой целое число от 1 до 30.

[0190] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает соединение, имеющее структуру в соответствии с формулой (A):

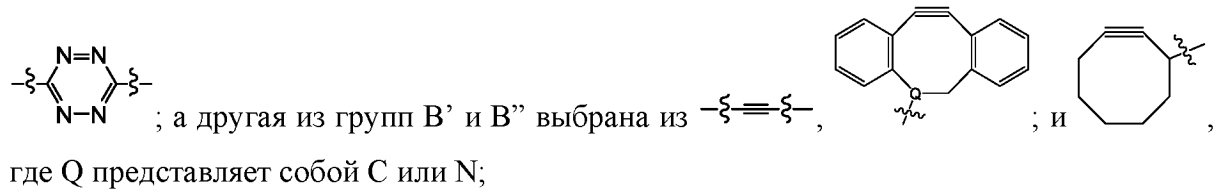


BA представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

Gln представляет собой остаток глутамина;

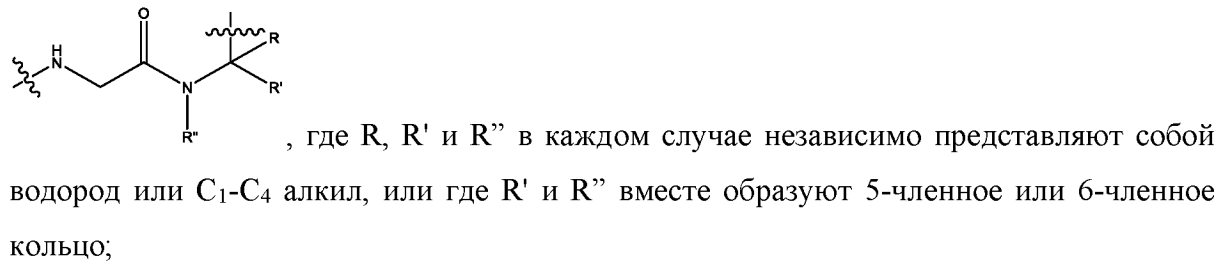
L1 отсутствует или представляет собой первый линкер;

B представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере один аддукт группы В' и группы В'', где одна из групп В' и В'' выбрана из -N<sub>3</sub> и

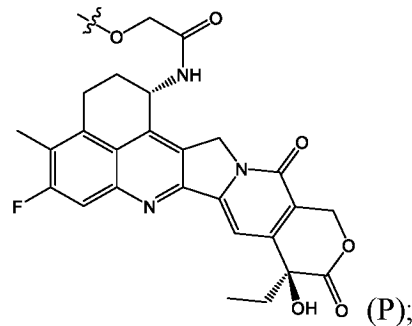


L2 представляет собой второй линкер, ковалентно присоединенный к разветвленной единице В через по меньшей мере одну группу В'';

M отсутствует или представляет собой фрагмент, имеющий структуру



Dxd представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):

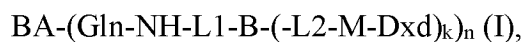


k представляет собой целое число от 1 до 12;

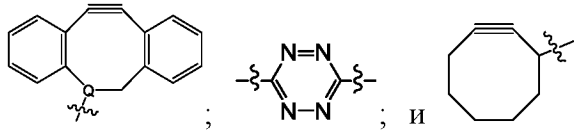
m представляет собой целое число от 1 до 30, и

n представляет собой целое число от 1 до 30.

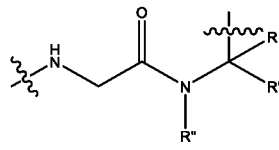
[0191] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает соединение, имеющее структуру в соответствии с формулой (I):



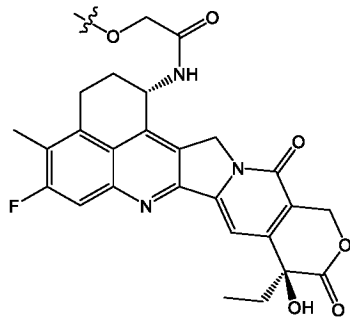
где ВА представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; Gln представляет собой остаток глутамина; L1 отсутствует или представляет собой первый линкер; В представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере один аддукт группы В', где группа В' выбрана из  $-N_3$ ,  $-\xi \equiv \xi-$ ,



где Q представляет собой С или N; L2 представляет собой второй линкер, ковалентно присоединенный к разветвленной единице В через по меньшей мере одну группу В'', где группа В' и группа В'' образуют по меньшей мере один аддукт; М отсутствует или представляет собой фрагмент,



имеющий структуру , где R, R' и R'' независимо друг от друга в каждом случае представляют собой водород или  $C_1$ - $C_4$  алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо; Dxd представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):



(P), а k и n независимо представляют собой целое число от 1 до 30.

### Линкер L1

[0192] В некоторых вариантах осуществления линкер L1 отсутствует.

[0193] В некоторых вариантах осуществления линкер L1 присутствует и ковалентно присоединен к амину остатка глутамина связывающего агента ВА.

[0194] В некоторых вариантах осуществления линкер L1 содержит алкил (например,  $C_{1-20}$  алкил, или  $C_{1-12}$  алкил, или  $C_{1-6}$  алкил),  $-NH-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-(CH_2)_u-NH-C(O)-$ ,  $-(CH_2)_u-C(O)-NH-$ ,  $-(CH_2-CH_2-O)_v-$ ,  $-(CH_2)_u-(O-CH_2-CH_2)_v-C(O)-NH-$ , пептидную единицу, содержащую от 2 до 4 аминокислот, или их комбинаций, каждая из которых может быть необязательно замещена одним или несколькими из  $-S-$ ,  $-S(O_2)-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O_2)-$ ; или  $-CO_2H$ , где нижние индексы u и v независимо представляют собой целое число от 1 до 8.



[0195] В некоторых вариантах осуществления свободный (неконъюгированный) линкер L1 содержит первичный амин для присоединения к остатку глутамина посредством реакции трансклутаминирования.

[0196] В одном варианте осуществления линкер L1 содержит одно или несколько единиц полиэтиленгликоля (PEG). В одном варианте осуществления L1 содержит 2 или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 8, или 9, или 10 единиц PEG.

[0197] В одном варианте осуществления линкер L1 содержит дисульфидную (-S-S-) связь.

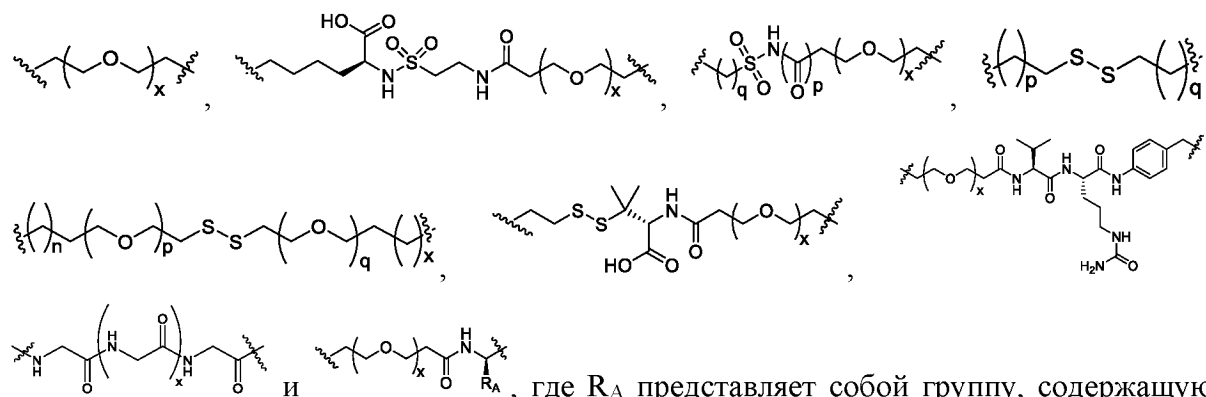
[0198] В одном варианте осуществления линкер L1 содержит фрагмент -S(O<sub>2</sub>)-.

[0199] В одном варианте осуществления один или несколько атомов углерода на линкере L1 замещены -CO<sub>2</sub>H.

[0200] В одном варианте осуществления линкер L1 содержит пептидную единицу, содержащую от 2 до 4 аминокислот, или пептидную единицу, содержащую 2 аминокислоты, пептидную единицу, содержащую 3 аминокислоты, или пептидную единицу, содержащую 4 аминокислоты.

[0201] В одном варианте осуществления линкер L1 содержит пептидную единицу, содержащую 2 аминокислоты, выбранные из глицина, валина, фенилаланина, пролина, глутаминовой кислоты и цитруллина, и их комбинаций. В одном конкретном варианте осуществления линкер L1 содержит единицу валин-цитруллин.

[0202] В одном варианте осуществления линкер L1 выбран из группы, состоящей из:



и  $\text{R}_A$ , где  $\text{R}_A$  представляет собой группу, содержащую алкин, азид, тетразин, транс-циклооктен, малеимид, амин, кетон, альдегид, карбоновую кислоту, сложный эфир, тиол, сульфоновую кислоту, тозилат, галогенид, силан, цианогруппу, углеводную группу, биотиновую группу, липидный остаток, и где нижние индексы x, n, p и q независимо представляют собой целое число от 0 до 12, и их комбинации.

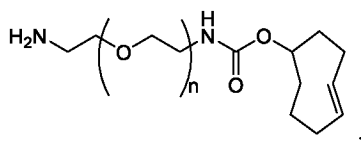
### Разветвленная единица B

[0203] Разветвленная единица В содержит по меньшей мере один аддукт группы В'. В некоторых вариантах осуществления В содержит один аддукт группы В'. В некоторых вариантах осуществления В содержит два аддукта группы В'. В некоторых вариантах осуществления В содержит три аддукта группы В'.

[0204] В некоторых вариантах осуществления В содержит по меньшей мере четыре аддукта группы В'. В некоторых вариантах осуществления В содержит четыре аддукта группы В'. В некоторых вариантах осуществления В содержит пять аддуктов группы В'. В некоторых вариантах осуществления В содержит шесть аддуктов группы В'.

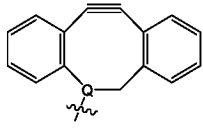
[0205] Как правило, аддукт группы В' в соответствии с настоящим изобретением включает любой фрагмент, содержащий продукт реакции присоединения группы В', независимо от стадий синтеза, используемых для получения фрагмента.

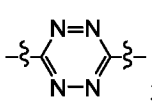
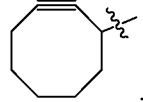
[0206] В некоторых вариантах осуществления аддукт группы В' может представлять собой продукт замещенного малеимида и, например, тиол, или замещенный транс-циклооктен, например:

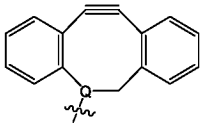
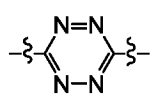
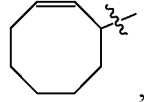


где n представляет собой целое число от 0 до 12, и, например, тетразин.

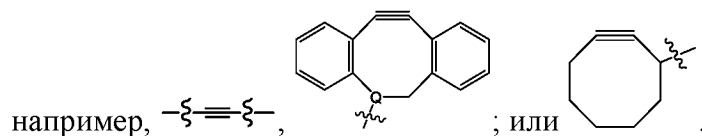
[0207] В некоторых вариантах осуществления аддукт группы В' может представлять собой продукт реакции 1,3-циклоприсоединения между азидом и алкиновым фрагментом. Не желая быть связанным теорией, азид-алкиновое циклоприсоединение представляет собой 1,3-диполярное циклоприсоединение между азидом и концевым или внутренним алкином с получением 1,2,3-триазола.

[0208] Более конкретно, аддукт группы В', выбранный из  $-N_3$ ,  $-\xi \equiv \xi-$ ,  ;

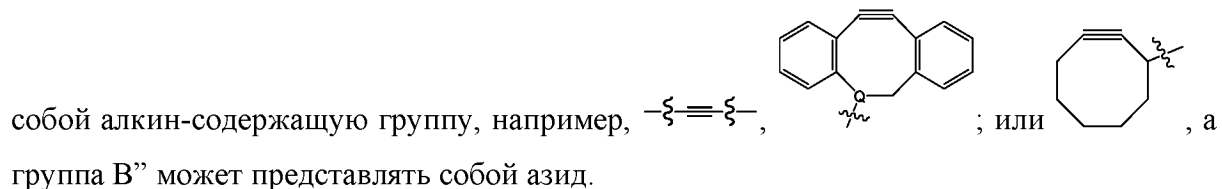
 ; и  , где Q представляет собой С или N, может включать аддукт 1,3-циклоприсоединения группы В' и группы В'', выбранный из  $-N_3$ ,  $-\xi \equiv \xi-$ ,

 ;  ; и  , где Q представляет собой С или N, где группа В'' является комплементарной группе В', с образованием аддукта 1,3-циклоприсоединения.

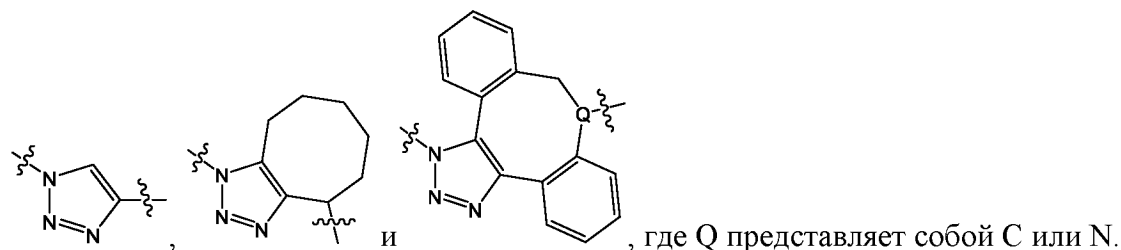
[0209] В качестве неограничивающего примера группа В' может представлять собой азид (-N<sub>3</sub>), а группа В'' может представлять собой алкин-содержащую группу,



[0210] В качестве другого неограничивающего примера группа В' может представлять

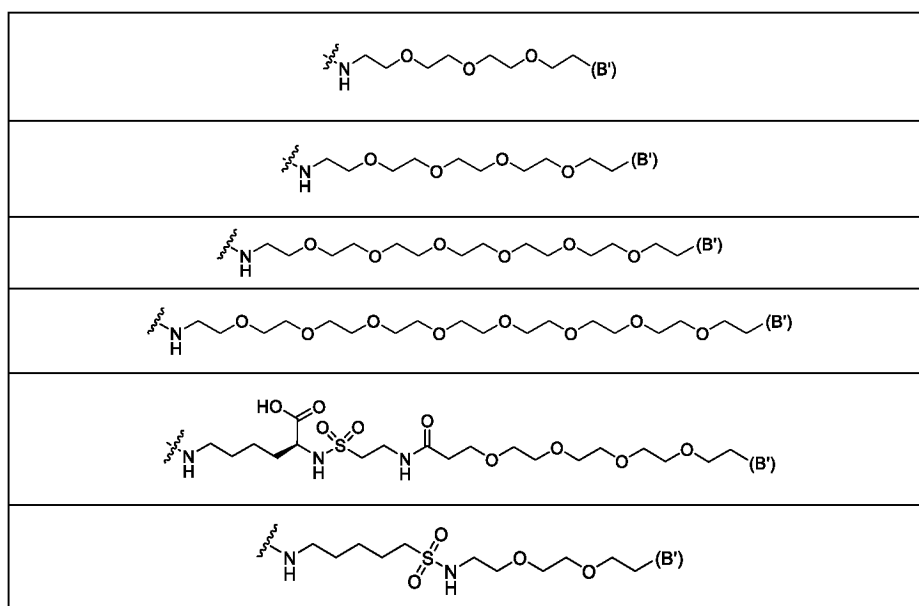


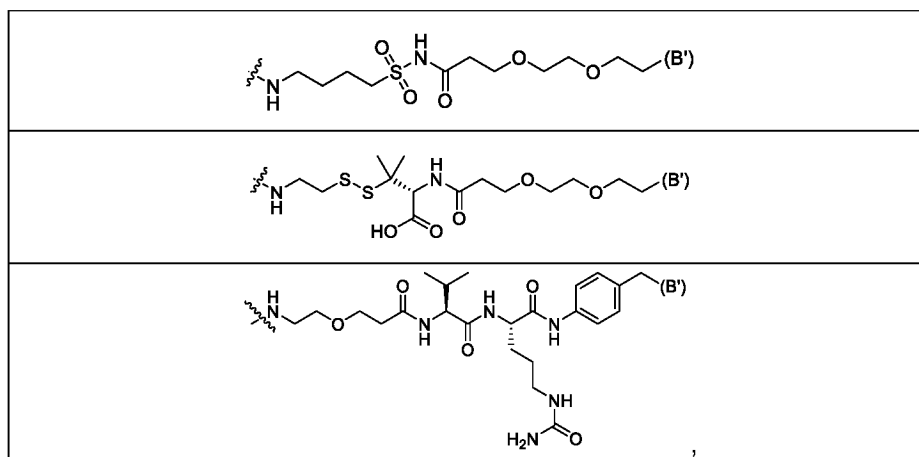
[0211] В одном варианте осуществления аддукт группы В' и группы В'' содержит триазольный фрагмент. В одном конкретном варианте осуществления аддукт группы В' и группы В'' имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из:




[0212] Как указано выше, в одном варианте осуществления В содержит один аддукт группы В'.

[0213] В конкретных вариантах осуществления соединение L1-B выбрано из группы, состоящей из:





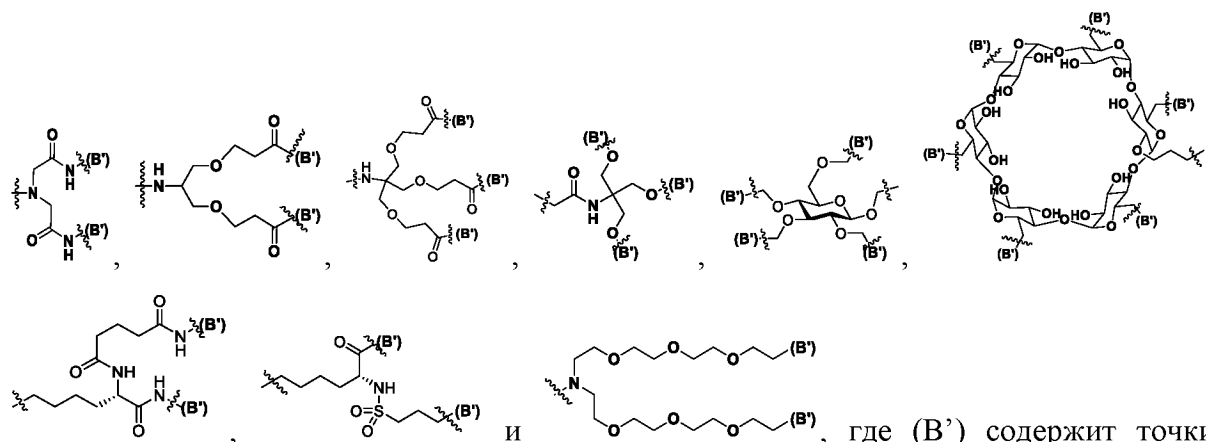
где  представляет собой amino точку присоединения к остатку глутамина ВА, и (В') представляет собой аддукт группы В'.

[0214] В одном варианте осуществления группа В' представляет собой азид (-N<sub>3</sub>), а аддукт группы В' содержит триазол.

[0215] В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения линкеры L1-В могут представлять собой азид-амин-линкеры (AL), которые содержат аминогруппу, которая напрямую присоединена к антителу, PEG-содержащую базовую структуру и азидную функциональную группу В' (n=1).

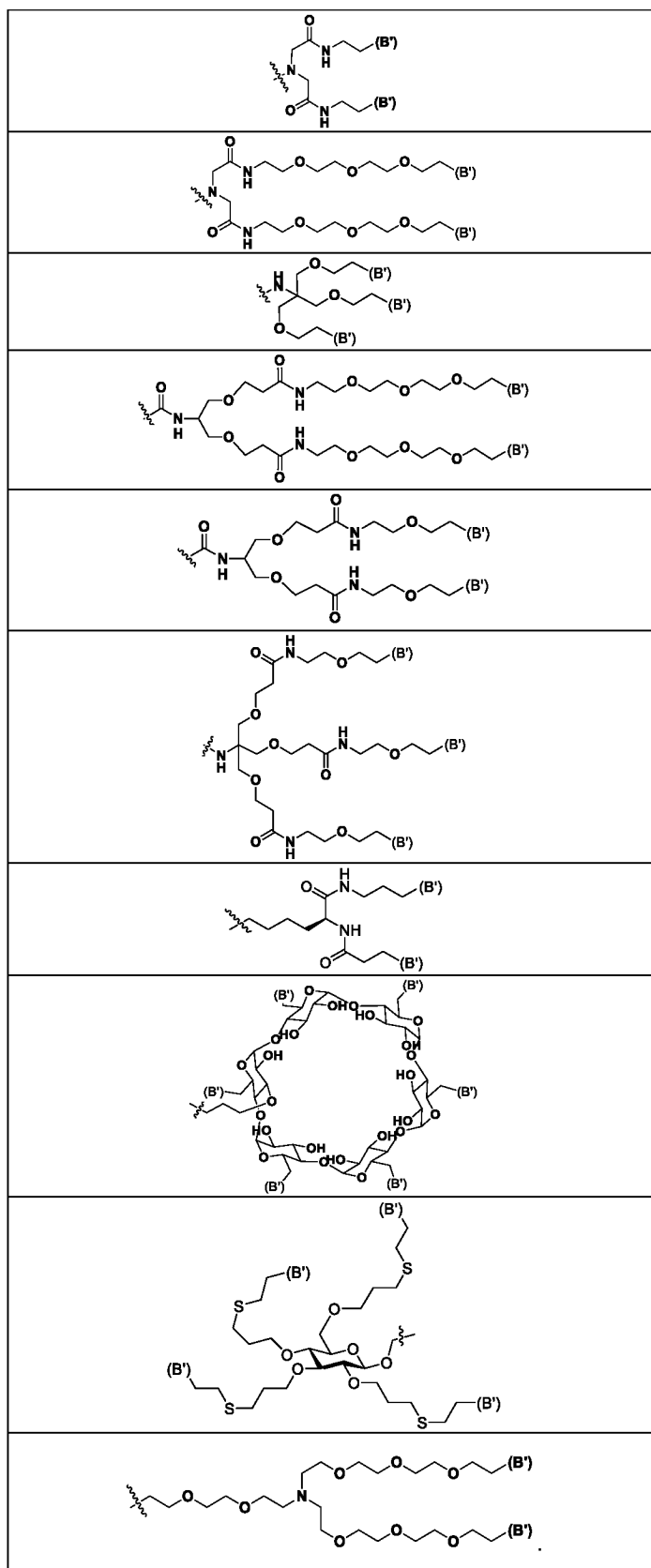
[0216] Структуры основных компонентов неограничивающих иллюстративных азид-амин-линкеров показаны на **фигуре 3В**. Конкретные структуры, синтезированные в качестве примеров, представлены ниже.

[0217] В одном варианте осуществления В содержит по меньшей мере два аддукта группы В'. В конкретных вариантах осуществления В содержит:

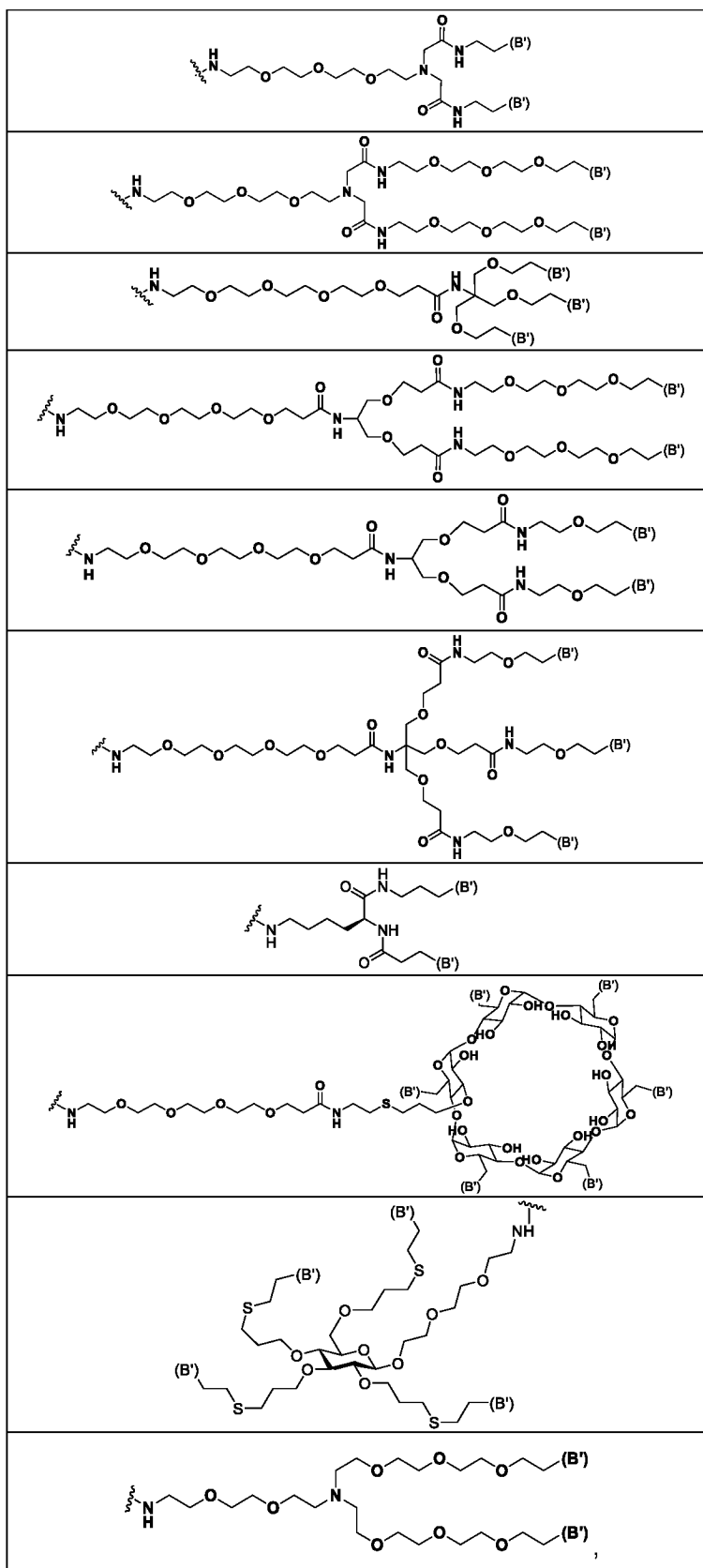



где (В') содержит точки присоединения аддукта группы В'.

[0218] В конкретных вариантах осуществления В выбирают из группы, состоящей из:



[0219] В конкретных вариантах осуществления L1-B выбирают из группы, состоящей из:



где  представляет собой amino точку присоединения к глутаминовому остатку ВА.

[0220] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения линкеры L1-B могут представлять собой разветвленный алкил-азид-амин линкеры (BL), содержащие аминогруппу, которая напрямую присоединена к ВА (например, антителу), основную структуру, содержащую разветвленный алкил-PEG, и от 2 до 6 азидных функциональных групп В' (n=2-6).

[0221] Структуры основных компонентов иллюстративных неограничивающих линкеров разветвленный алкил-азид-амин представлены на **фигуре 4В**. Конкретные структуры, синтезированные в качестве примеров, представлены ниже.

### Линкер L2

[0222] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения L2 имеет структуру в соответствии с формулой (L2):

$B''\text{-SP1-B2-(-SP2-AA-SP3)}_p$  (L2), где:

B'' представляет собой группу, способную ковалентно присоединяться к группе В';

SP1 отсутствует или представляет собой первую спейсерную единицу;

B2 отсутствует или представляет собой разветвленную единицу;

SP2 отсутствует или представляет собой вторую спейсерную единицу;

AA отсутствует или представляет собой пептидную единицу, содержащую от 2 до 4 аминокислот;

SP3 отсутствует или представляет собой третью спейсерную единицу, и

p представляет собой целое число от 1 до 12.

[0223] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения L2 имеет структуру в соответствии с формулой (L2'):

$H_2N\text{-SP1-B2-(-SP2-AA-SP3)}_p$  (L2'),

где:

SP1 отсутствует или представляет собой первую спейсерную единицу;

B2 отсутствует или представляет собой разветвленную единицу;

SP2 отсутствует или представляет собой вторую спейсерную единицу;

AA отсутствует или представляет собой пептидную единицу, содержащую от 2 до 4 аминокислот;

SP3 отсутствует или представляет собой третью спейсерную единицу, и

p представляет собой целое число от 1 до 12.

[0224] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения L2 имеет структуру в соответствии с формулой (L2''):

Малеимид-N-SP1-B2-(-SP2-AA-SP3)<sub>p</sub> (L2''),

где:

SP1 отсутствует или представляет собой первую спейсерную единицу;

B2 отсутствует или представляет собой разветвленную единицу;

SP2 отсутствует или представляет собой вторую спейсерную единицу;

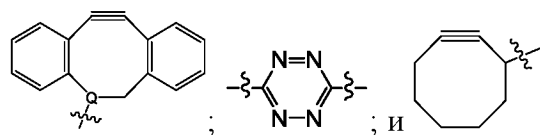
AA отсутствует или представляет собой пептидную единицу, содержащую от 2 до 4 аминокислот;

SP3 отсутствует или представляет собой третью спейсерную единицу, и

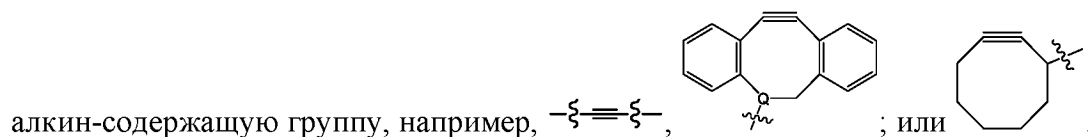
p представляет собой целое число от 1 до 12.

[0225] В некоторых вариантах осуществления линкер L2 содержит группу B'', способную ковалентно присоединяться к группе B', как описано выше.

[0226] В некоторых вариантах осуществления группа B'' выбрана из -N<sub>3</sub>, -ξ≡ξ-,



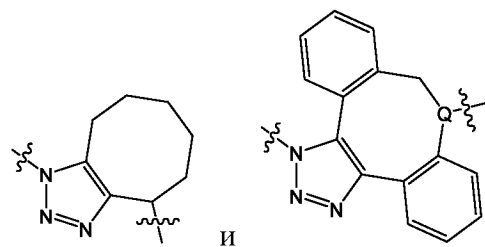
[0227] В качестве неограничивающего примера, группа B'' может представлять собой



[0228] В качестве другого неограничивающего примера группа B'' может представлять собой азид.

[0229] В одном варианте осуществления аддукт группы B' и группы B'' содержит триазольный фрагмент. В одном конкретном варианте осуществления аддукт группы

B' и группы B'' имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из:

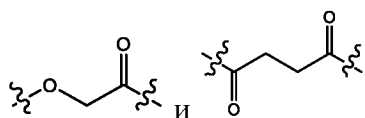


региоизомер.

[0230] В одном варианте осуществления первый спейсер SP1 отсутствует.



[0231] В другом варианте осуществления SP1 выбран из группы, состоящей из



[0232] В одном варианте осуществления разветвленная единица B2 отсутствует.

[0233] В одном варианте осуществления разветвленная единица B2 в соответствии с изобретением имеет структуру одной из **B1-B5**, изображенных ниже.

Разветвленная единица B2	B1	B2	B3	B4	B5
Структура					

[0234] В одном варианте осуществления второй спейсер SP2 отсутствует.

[0235] В другом варианте осуществления SP2 выбирают из группы, состоящей из алкила (например, C<sub>1-20</sub> алкила или C<sub>1-12</sub> алкила, или C<sub>1-10</sub> алкила, или C<sub>1-8</sub> алкила, или C<sub>1-6</sub> алкила), -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-, -NH-, -C(O)-, -NH-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-NH-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-NH-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-NH-, или их комбинаций; где индексы u и v независимо представляют собой целое число от 1 до 8.

[0236] В некоторых вариантах осуществления AA представляет собой пептидную единицу, содержащую от 2 до 4 аминокислот, выбранных из глицина, валина, фенилаланина, пролина, глутаминовой кислоты, лизина, фенилаланина и цитруллина, и их комбинаций.

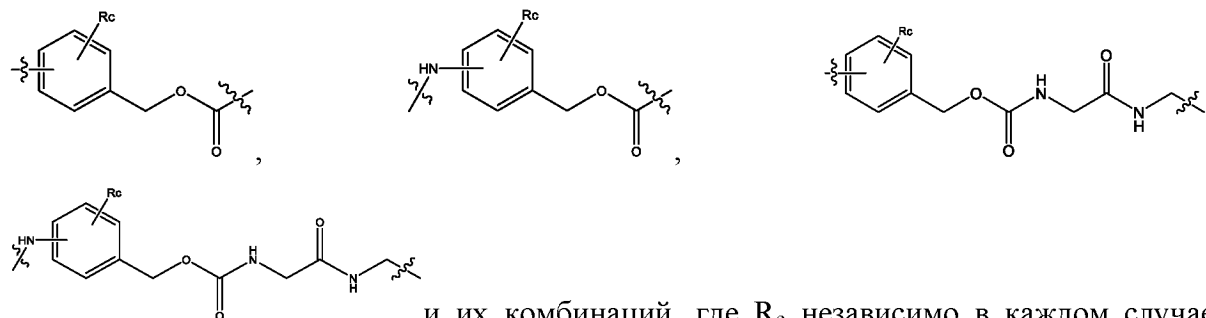
[0237] В одном варианте осуществления AA представляет собой пептидную единицу, содержащую 2 аминокислоты. В одном варианте осуществления AA представляет собой пептидную единицу, содержащую 3 аминокислоты. В одном варианте осуществления AA представляет собой пептидную единицу, содержащую 4 аминокислоты.

[0238] В одном конкретном варианте осуществления AA представляет собой валин-цитруллин, валин-аланин или фенилаланин-лизин.

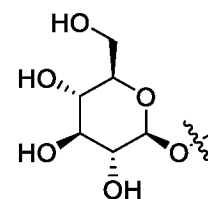
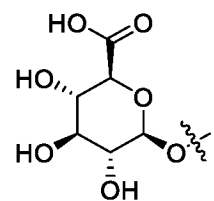
[0239] В другом конкретном варианте осуществления AA выбирают из группы, состоящей из глицин-глицин-глицина (GGG), глицин-глицин-глицин-глицина (GGGG (SEQ ID NO: 2113)), глицин-глицин-фенилаланина (GGF) и глицин-глицин-фенилаланин-глицина (GGFG (SEQ ID NO: 2114)) и глутаминовая кислота-валин-цитруллин (EVC).

[0240] В одном варианте осуществления третий спейсер SP3 отсутствует.

[0241] В другом варианте осуществления SP3 выбирают из группы, состоящей из



отсутствует или представляет собой группу, выбранную из



и

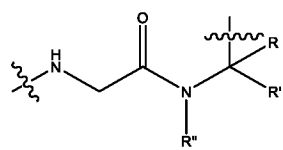
[0242] В одном варианте осуществления спейсер SP3 ковалентно присоединен к аналогу камптотецина, например, Dxd или M-Dxd.

[0243] В одном варианте осуществления линкер L2 содержит от около 1 до около 12, или от около 1 до около 10, или от около 1 до около 8, или от около 1 до около 6, или от около 1 до около 4, или от около 1 до около 2 фрагментов (SP2-AA-SP3), и линкер-полезная нагрузка L2-Dxd содержит от около 1 до около 12, или от около 1 до около 10, или от около 1 до около 8, или от около 1 до около 6, или от около 1 до около 4, или от около 1 до около 2 молекул полезной нагрузки Dxd.

### Фрагмент М

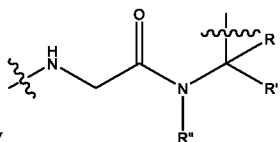
[0244] В некоторых вариантах осуществления фрагмент М отсутствует.

[0245] В некоторых вариантах осуществления М присутствует и имеет структуру



, где R, R' и R'' независимо в каждом случае представляют собой водород или алкил, или где R' и R'' вместе образуют кольцо, например, 3-8-членное кольцо.

[0246] В некоторых вариантах осуществления М присутствует и имеет



структуру , где R, R' и R'' независимо в каждом случае представляют собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо.

[0247] В одном варианте осуществления R представляет собой водород.

[0248] В одном варианте осуществления R' представляет собой водород. В одном варианте осуществления R' представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил.

[0249] В одном варианте осуществления R'' представляет собой водород. В одном варианте осуществления R'' представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил.

[0250] В одном варианте осуществления R' и R'' вместе образуют 5-членное кольцо. В одном варианте осуществления R' и R'' вместе представляют собой -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-.

[0251] В одном варианте осуществления R' и R'' вместе образуют 6-членное кольцо. В одном варианте осуществления R' и R'' вместе представляют собой -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-.

[0252] В одном варианте осуществления R, R' и R'' представляют собой атомы

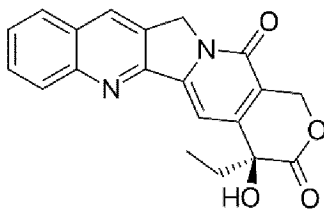
водорода в каждом случае, то есть М представляет собой

[0253] В другом варианте осуществления R представляет собой водород, а R' и R'' вместе образуют 5-членное кольцо, например, R' и R'' вместе представляют собой –

(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, а М представляет собой

### Полезные нагрузки

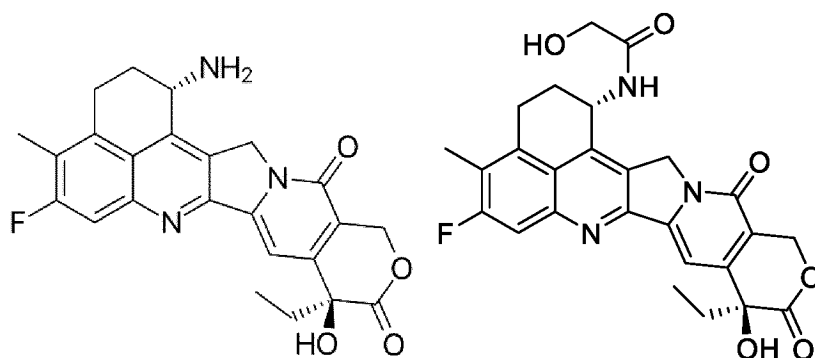
[0254] В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки по настоящему изобретению представляют собой аналоги и/или производные камптотецина.



### Камптотецин

[0255] Камптотецин (СРТ), показанный выше, представляет собой яд топоизомеразы. Он был открыт в 1966 году М. Э. Уоллом и М. К. Вани при систематическом скрининге натуральных продуктов на противораковые лекарственные средства. Он был выделен из коры и ствола *Camptotheca acuminata* (Camptotheca, Happy tree), дерева, произрастающего в Китае, которое используется для лечения рака в традиционной китайской медицине. Камптотецин показал замечательную противораковую активность в предварительных клинических испытаниях. Однако он обладает низкой растворимостью, поэтому химики в области синтетической химии и медицины разработали разные способы синтеза камптотецина и различных производных для увеличения преимуществ химического вещества с хорошими результатами. Четыре аналога камптотецина были одобрены и сегодня используются в химиотерапии рака: топотекан, иринотекан, белотекан и дерукстекан (Dxd).

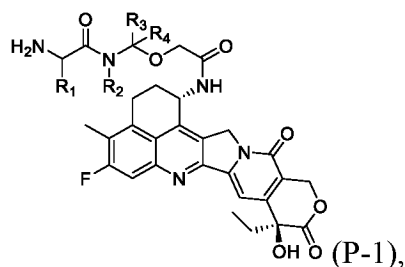
[0256] Трастузумаб дерукстекан (Т-Dxd) представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, который включает конъюгат антитела трастузумаба, направленного против рецептора эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2), и дерукстекана, являющегося ингибитором топоизомеразы I (Dxd, производное эксатекана). Он был одобрен для использования в Соединенных Штатах в декабре 2019 года. Эксатекан, показанный ниже, является аналогом камптотецина.



### Эксатекан (слева) и дерукстекан (Dxd) справа

[0257] В одном варианте осуществления полезная нагрузка по настоящему изобретению представляет собой дерукстекан (Dxd).

[0258] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка по настоящему изобретению представляет собой соединение, имеющее структуру P-I:



где  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$ , и  $R_4$  независимо представляют собой водород или алкил, например,  $C_1$ - $C_{12}$  алкил или  $C_1$ - $C_8$  алкил, или  $C_1$ - $C_6$  алкил, или  $C_1$ - $C_4$  алкил, или где  $R_2$  и  $R_3$  вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо,

или его фармацевтически приемлемая соль.

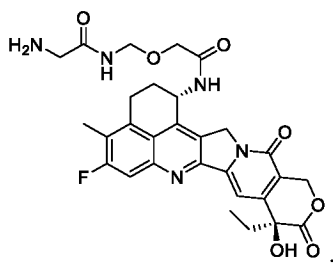
[0259] В одном варианте осуществления  $R_1$  представляет собой водород.

[0260] В одном варианте осуществления  $R_2$  представляет собой водород. В одном варианте осуществления  $R_2$  представляет собой  $C_1$ - $C_4$  алкил.

[0261] В одном варианте осуществления  $R_3$  представляет собой водород. В одном варианте осуществления  $R_3$  представляет собой  $C_1$ - $C_4$  алкил.

[0262] В одном варианте осуществления  $R_4$  представляет собой водород. В одном варианте осуществления  $R_4$  представляет собой  $C_1$ - $C_4$  алкил.

[0263] В одном варианте осуществления  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$ , и  $R_4$  в каждом случае представляют собой водород. В одном варианте осуществления соединение по настоящему изобретению представляет собой



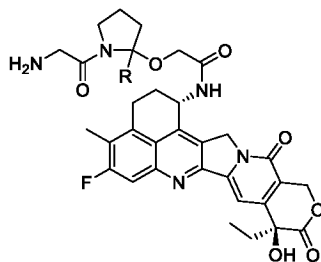
или его фармацевтически приемлемую соль.

[0264] В одном варианте осуществления  $R_2$  и  $R_3$  вместе образуют 5-членное кольцо. В одном варианте осуществления  $R_2$  и  $R_3$  вместе представляют собой  $-(CH_2)_3-$ .

[0265] В одном варианте осуществления  $R_2$  и  $R_3$  вместе образуют 6-членное кольцо. В одном варианте осуществления  $R_2$  и  $R_3$  вместе представляют собой  $-(CH_2)_4-$ .

[0266] В одном варианте осуществления  $R_1$  представляет собой водород, а  $R_2$  и  $R_3$  вместе образуют 5-членное кольцо.

[0267] В одном варианте осуществления соединение по настоящему изобретению имеет структуру в соответствии с формулой (P-II):

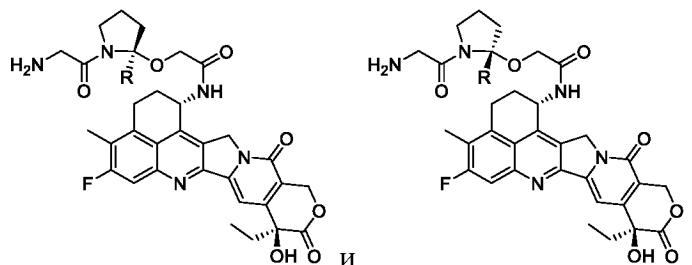


(P-II),

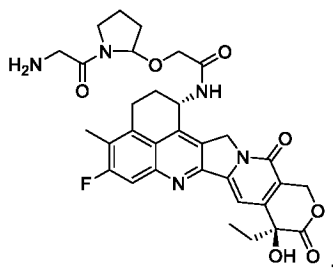
где R представляет собой водород или алкил, например, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил, или C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил, или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[0268] Специалисту в данной области должно быть понятно, что соединение P-II, изображенное выше, также включает все изомерные (например, энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные)) формы структуры. Например, R- и S-конфигурации для каждого асимметричного центра входят в объем настоящего изобретения. В качестве примера, два изомера, изображенные ниже, входят в объем настоящего изобретения:



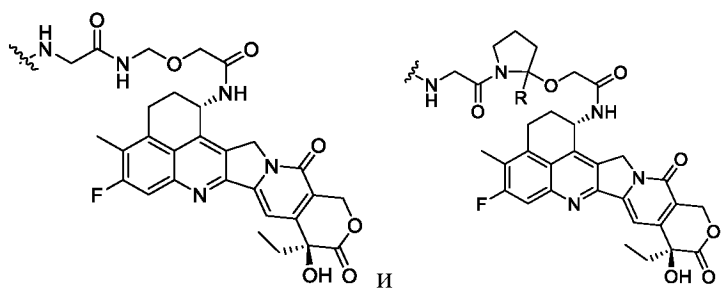
[0269] В одном варианте осуществления соединение по настоящему изобретению представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

[0270] В одном варианте осуществления полезная нагрузка в соответствии с изобретением конъюгирована с образованием конъюгата белок-лекарственное средство (например, конъюгата антитело-лекарственное средство). В одном варианте

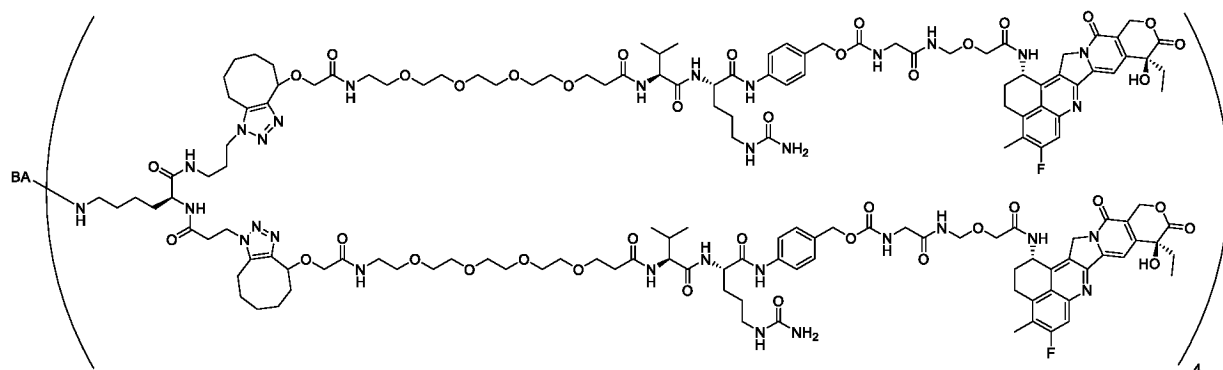
осуществления полезная нагрузка ковалентно присоединена к фрагменту М. В одном варианте осуществления полезная нагрузка представляет собой М-Dxd. В одном варианте осуществления М-Dxd имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из



где R представляет собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, и где ~~~ представляет собой точку присоединения к L2.

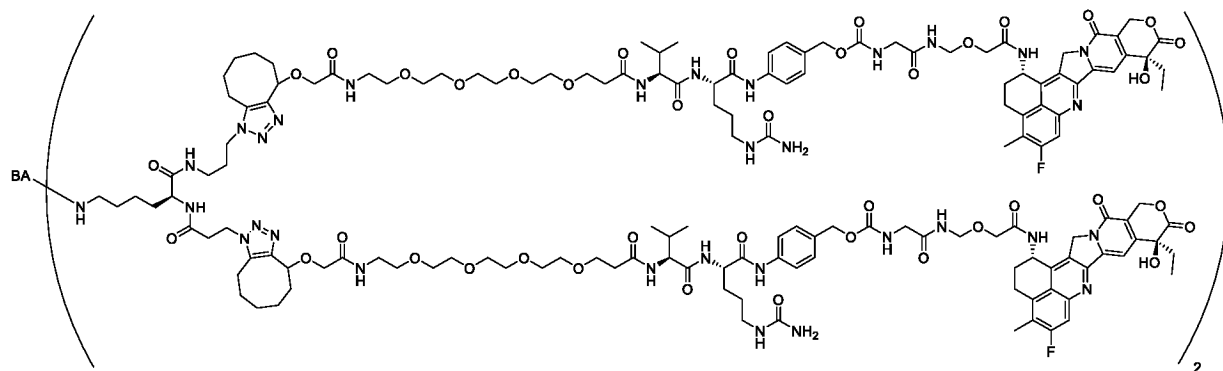
**[0271]** Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество соединения, как описано выше, или его фармацевтически приемлемой соли, и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

**[0272]** В одном варианте осуществления соединение в соответствии с изобретением имеет следующую структуру:



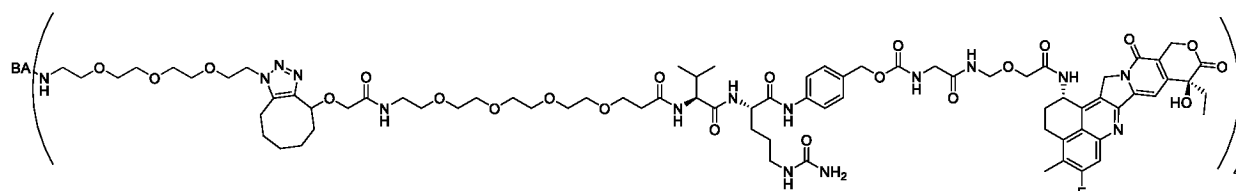
где ВА представляет собой связывающий агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент).

**[0273]** В одном варианте осуществления соединение в соответствии с изобретением имеет следующую структуру:



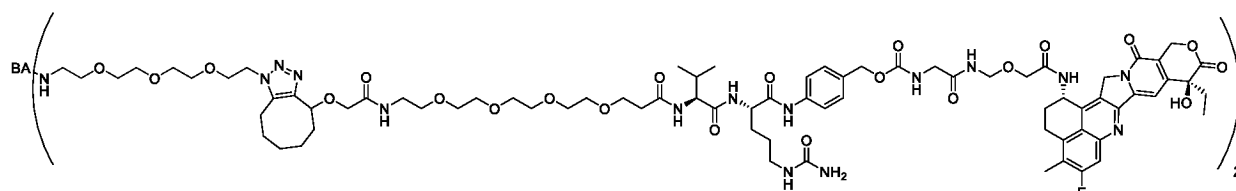
где ВА представляет собой связывающий агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент).

[0274] В одном варианте осуществления соединение в соответствии с изобретением имеет следующую структуру:



где ВА представляет собой связывающий агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент).

[0275] В одном варианте осуществления соединение в соответствии с изобретением имеет следующую структуру:



где ВА представляет собой связывающий агент (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент).

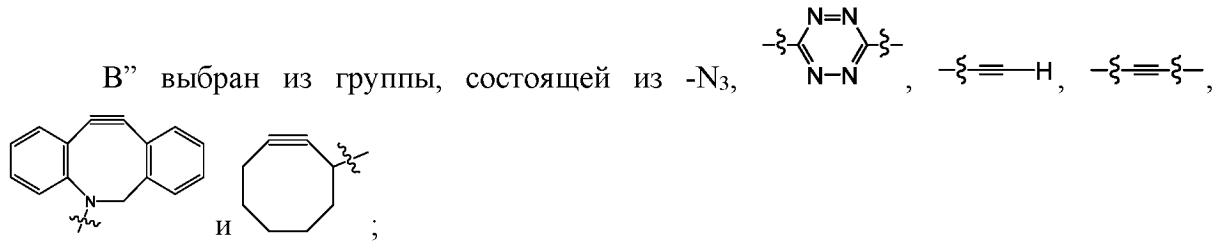
[0276] Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество соединения, как описано выше, или его фармацевтически приемлемой соли, и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

#### Линкер-полезные нагрузки (L2-P)

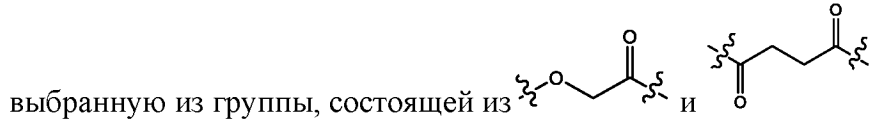
[0277] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает соединение в соответствии с формулой (L2-P):

$B''-SP1-B2-(-SP2-AA-SP3-M-Dxd)_p$  (L2-P), где:





SP1 отсутствует или представляет собой первую спейсерную единицу,

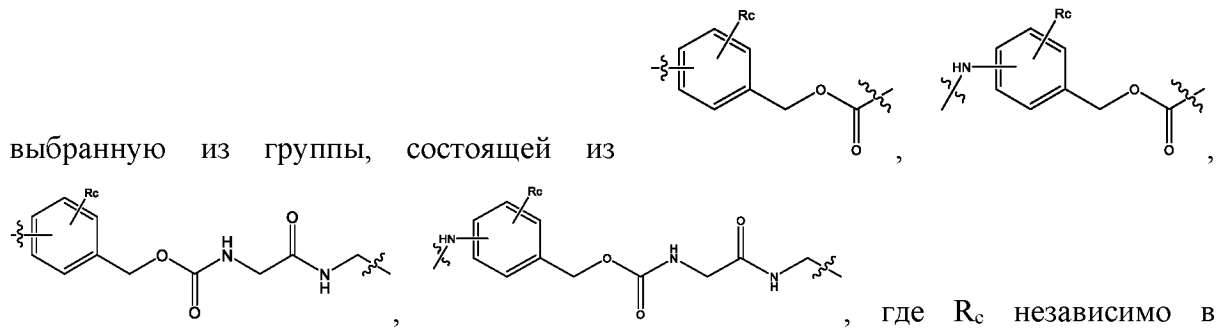


B2 отсутствует или представляет собой разветвленную единицу;

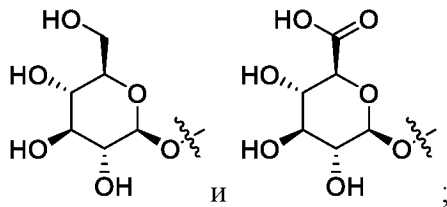
SP2 отсутствует или представляет собой вторую спейсерную единицу, выбранную из группы, состоящей из  $C_{1-6}$  алкила,  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_u-$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_u-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v-$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v-(\text{CH}_2)_u-$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v-(\text{CH}_2)_u-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-(\text{CH}_2)_u-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_u-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_u-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ , или их комбинации; где индексы  $u$  и  $v$  независимо представляют собой целое число от 1 до 8;

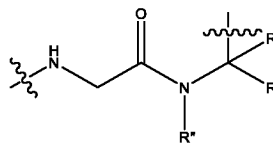
AA отсутствует или представляет собой пептидную единицу, содержащую от 2 до 4 аминокислот;

SP3 отсутствует или представляет собой третью спейсерную единицу,



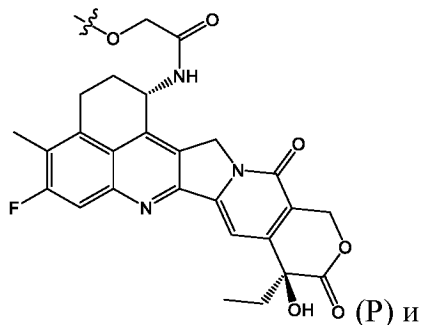
каждом случае отсутствует или представляет собой группу, выбранную из





M отсутствует или представляет собой  $\text{---}\xi\text{---}$ , где R, R' и R'' в каждом случае независимо представляют собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо; и

Dxd представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):

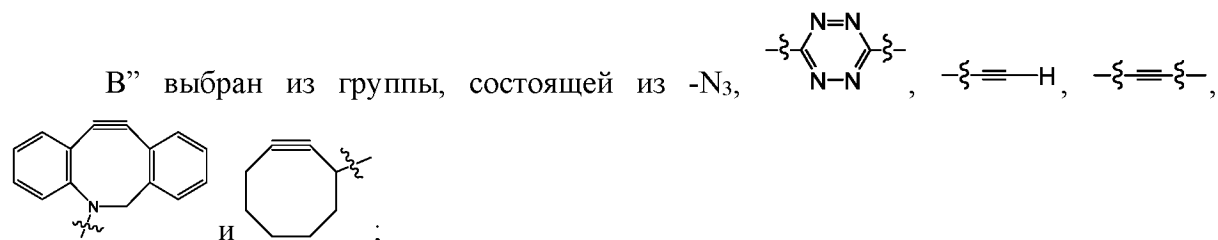


p представляет собой целое число от 1 до 12.

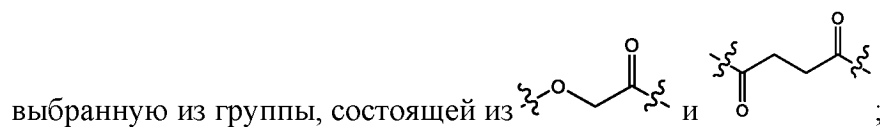
**[0278]** В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает соединение в соответствии с формулой (L2'-P):



где:



SP1 отсутствует или представляет собой первую спейсерную единицу,

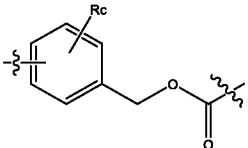
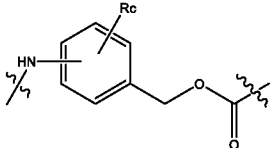
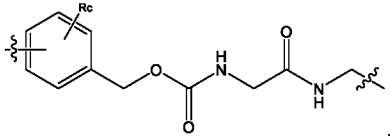
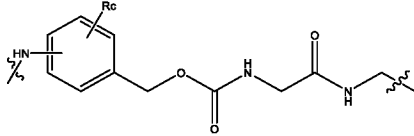


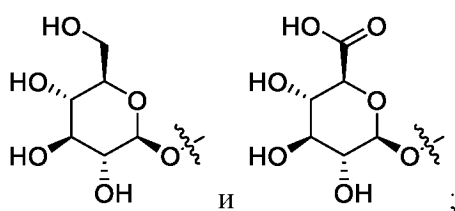
B2 отсутствует или представляет собой разветвленную единицу;

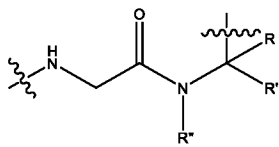
SP2 отсутствует или представляет собой вторую спейсерную единицу, выбранную из группы, состоящей из C<sub>1-6</sub> алкила, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-, -NH-, -C(O)-, -NH-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-NH-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-NH-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-NH-, или их комбинаций; где индексы u и v независимо представляют собой целое число от 1 до 8;

AA отсутствует или представляет собой пептидную единицу, содержащую от 2 до 4 аминокислот;

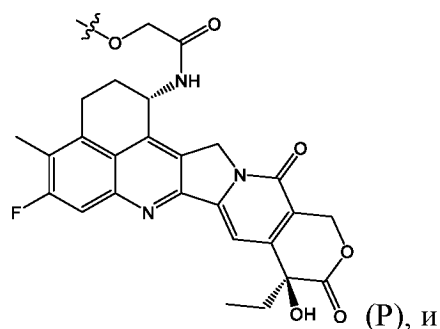
SP3 отсутствует или представляет собой третью спейсерную единицу,

выбранную из группы, состоящей из , , , , где R<sub>c</sub> независимо в каждом случае отсутствует или представляет собой группу, выбранную из



M отсутствует или представляет собой , где R, R' и R'' в каждом случае независимо представляют собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо; и

D<sub>x</sub>d представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):

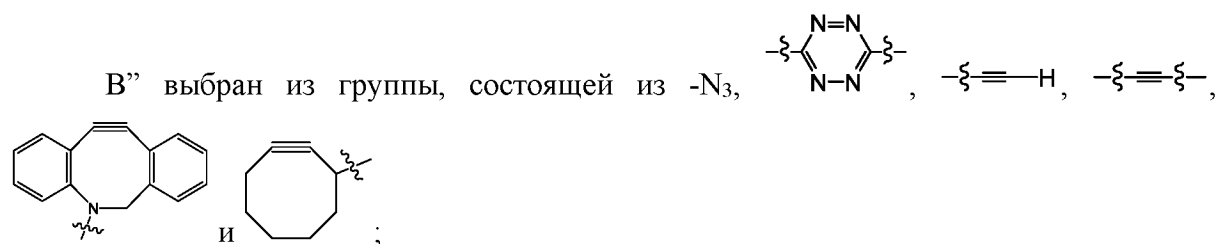


p представляет собой целое число от 1 до 12.

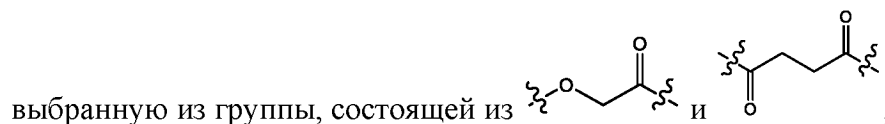
[0279] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает соединение в соответствии с формулой (L2''-P):

Малеимид-N-SP1-B2-(-SP2-AA-SP3-M-D<sub>x</sub>d)<sub>p</sub> (L2''-P),

где:



SP1 отсутствует или представляет собой первую спейсерную единицу,

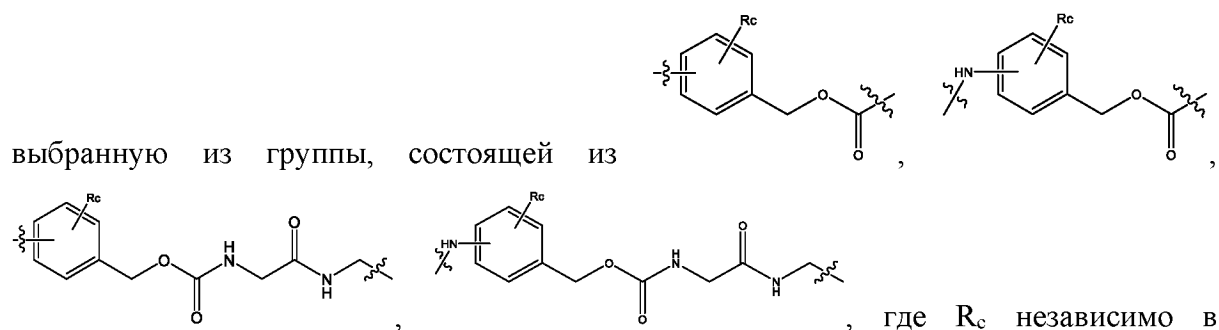


B2 отсутствует или представляет собой разветвленную единицу;

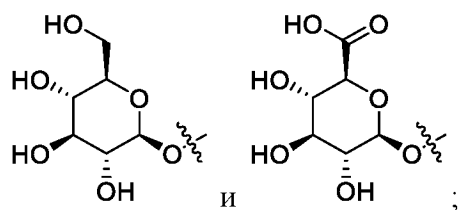
SP2 отсутствует или представляет собой вторую спейсерную единицу, выбранную из группы, состоящей из  $C_{1-6}$  алкила,  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_u-$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_u-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v-$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v-(\text{CH}_2)_u-$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_v-(\text{CH}_2)_u-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-(\text{CH}_2)_u-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_u-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_u-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ , или их комбинаций, где индексы  $u$  и  $v$  независимо представляют собой целое число от 1 до 8;

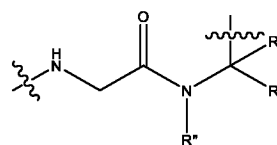
AA отсутствует или представляет собой пептидную единицу, содержащую от 2 до 4 аминокислот;

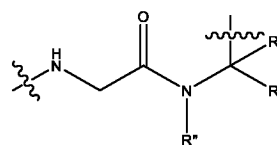
SP3 отсутствует или представляет собой третью спейсерную единицу,



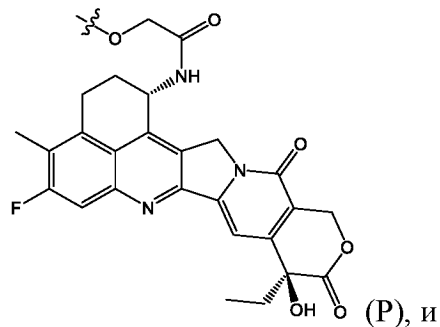
каждом случае отсутствует или представляет собой группу, выбранную из





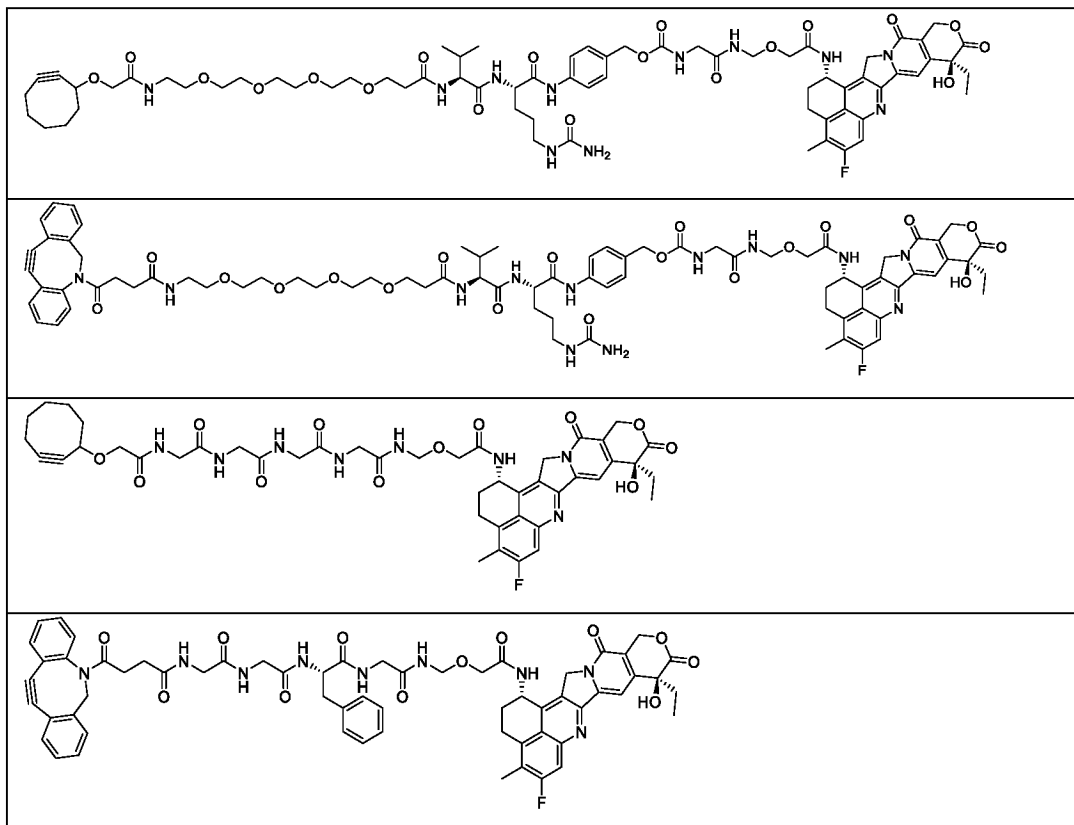
M отсутствует или представляет собой , где R, R' и R'' в каждом случае независимо представляют собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо; и

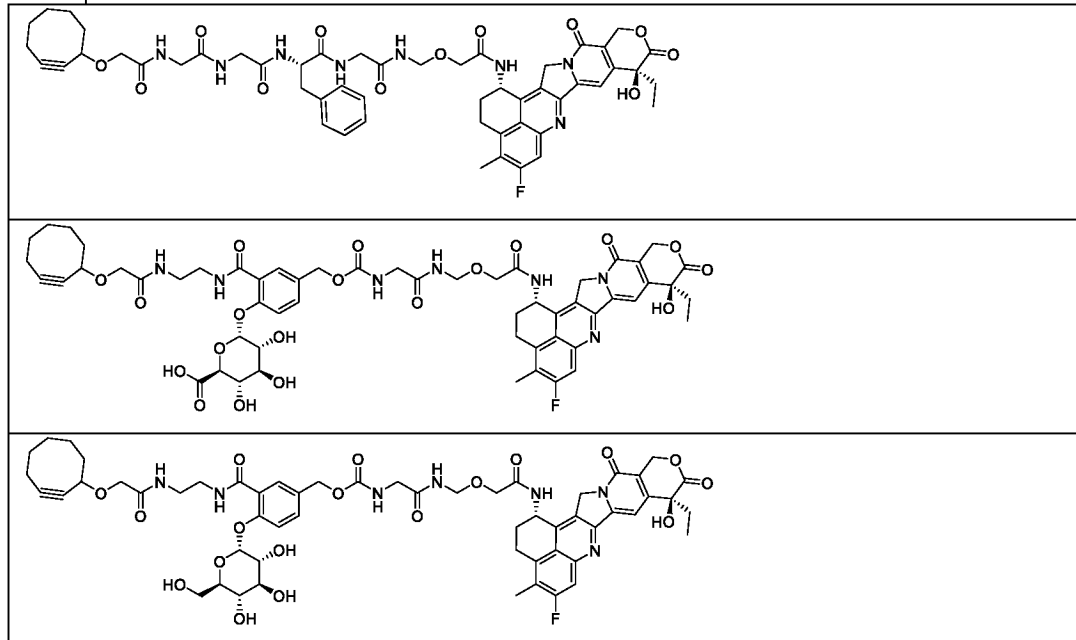
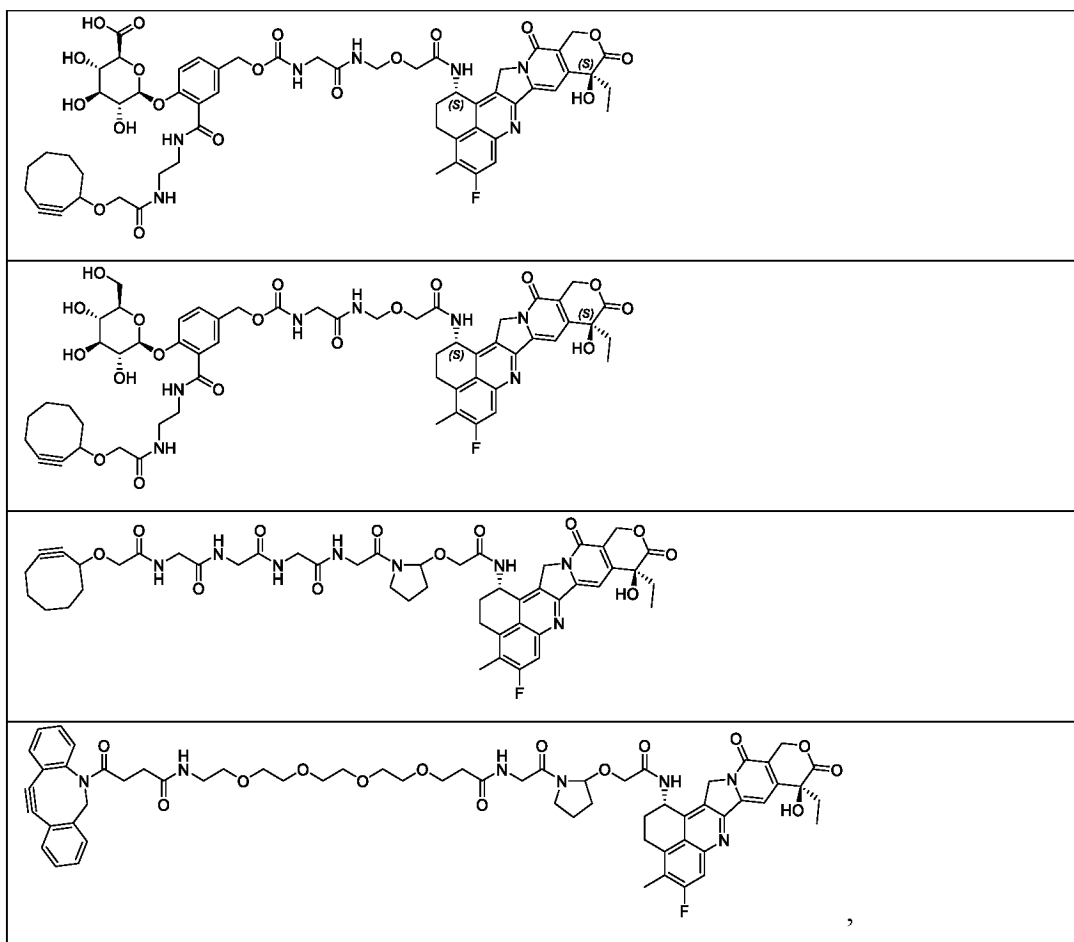
Dxd представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):

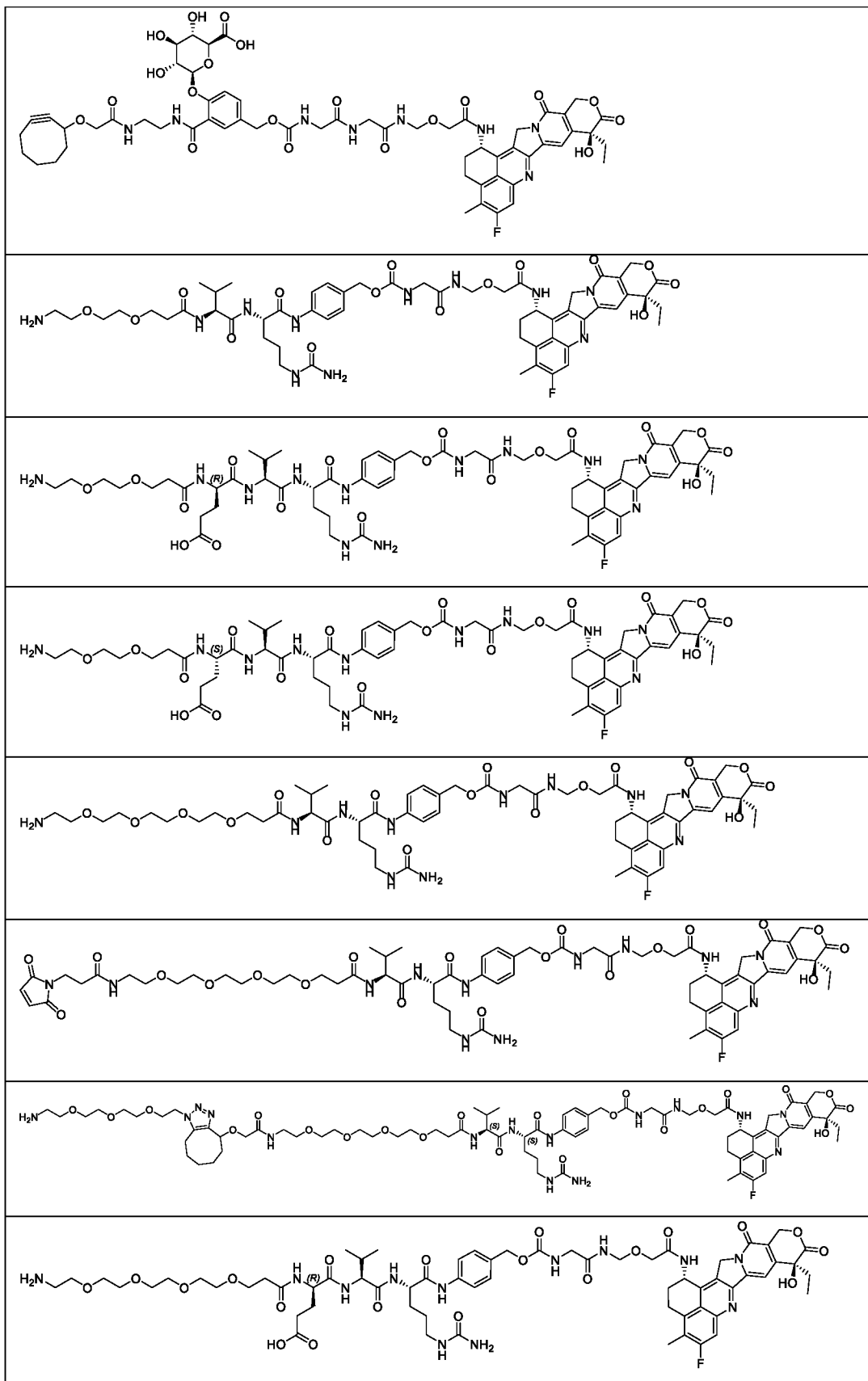


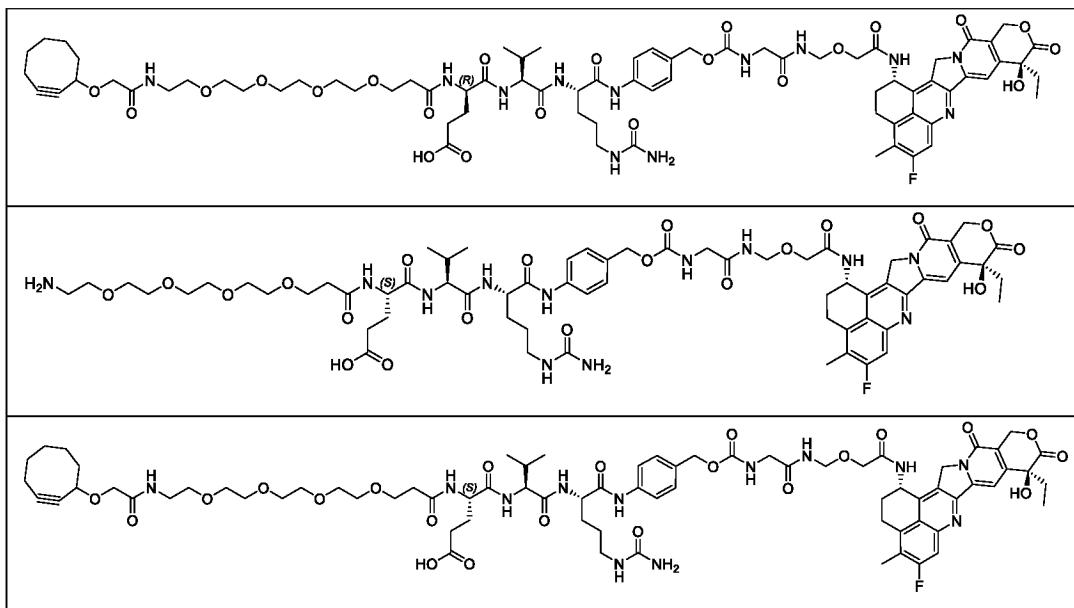
r представляет собой целое число от 1 до 12.

[0280] В некоторых вариантах осуществления соединения линкер-полезная нагрузка L2-P, L2'-P, L2''-P в соответствии с изобретением имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из:









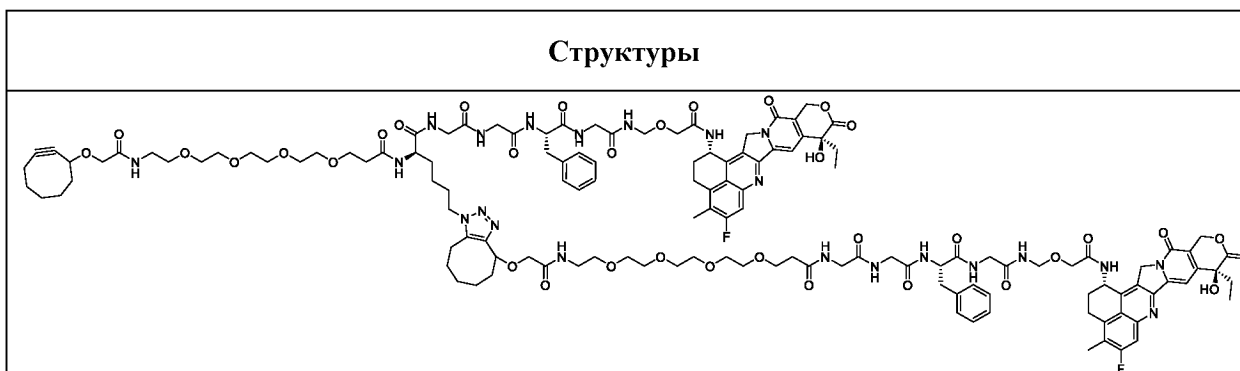
или его фармацевтически приемлемая соль.

**[0281]** Разветвленный линкер2-полезные нагрузки (**BL2P**)

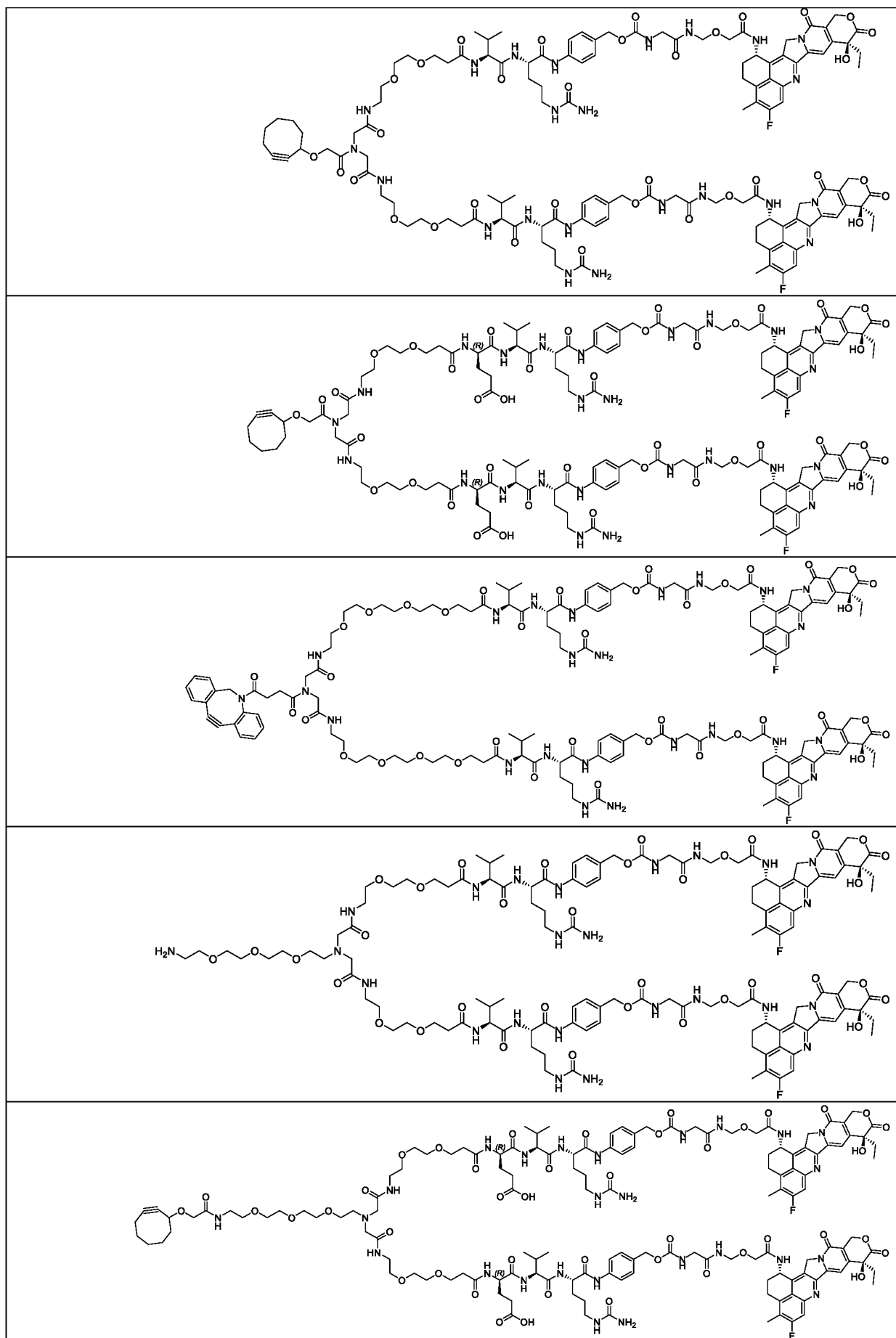
**[0282]** В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает L2-P, которые содержат одну или несколько разветвленных единиц. Иллюстративные разветвленные единицы **B1-B5** в соответствии с изобретением показаны ниже.

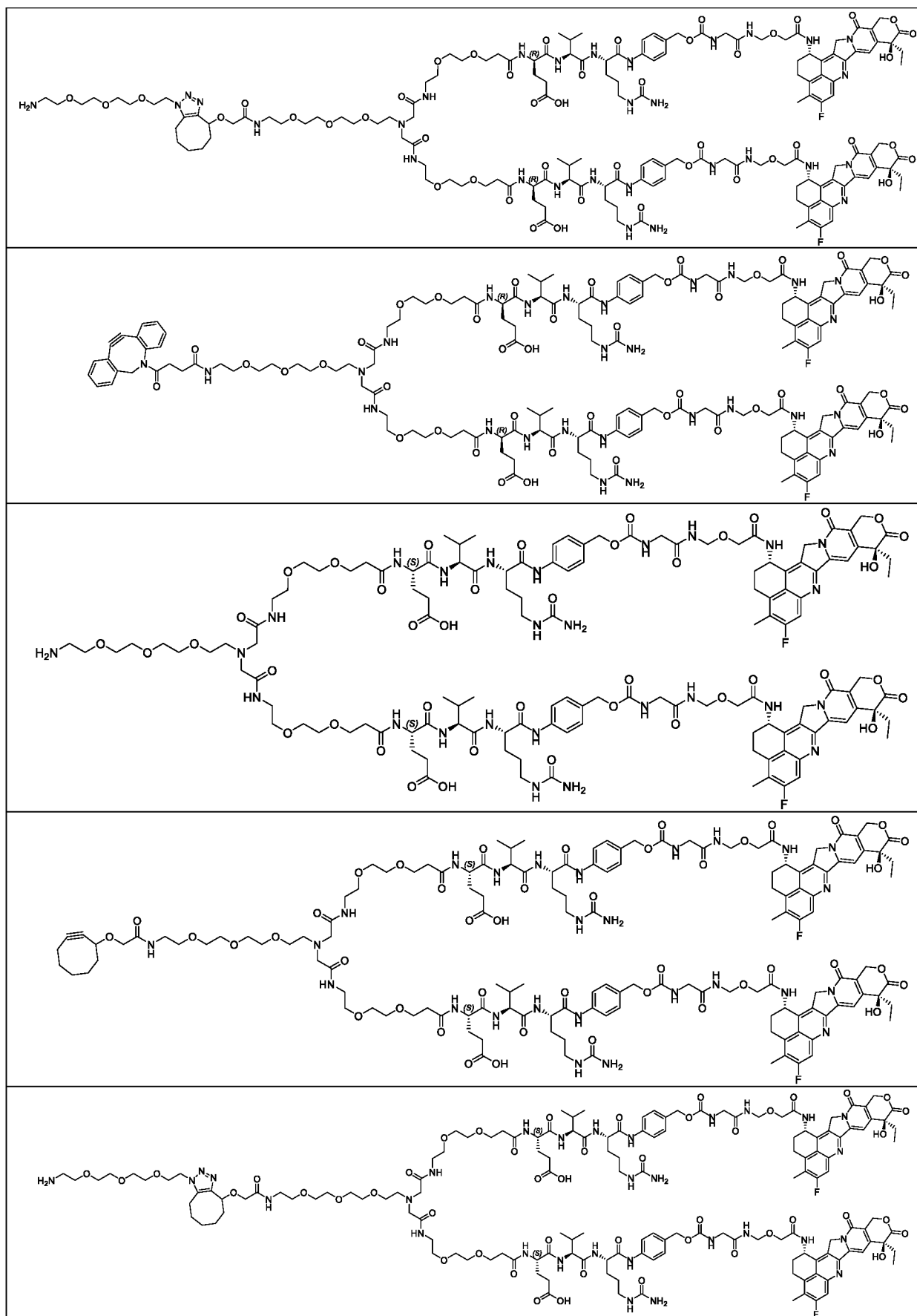
Ветвь В	B1	B2	B3	B4	B5
Структура					

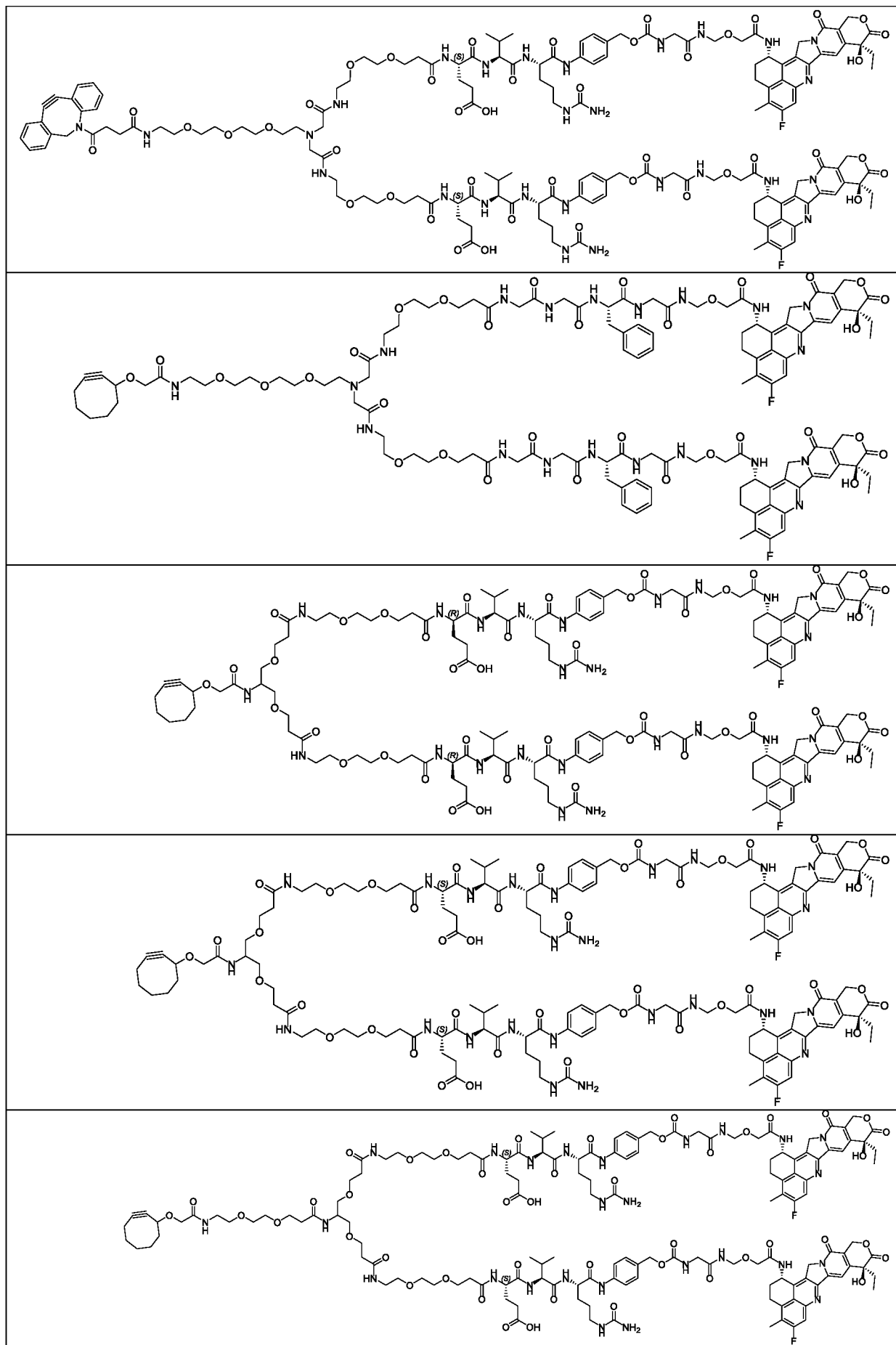
**[0283]** Структуры иллюстративных соединений разветвленный линкер2-полезные нагрузки (**BL2P**) в соответствии с изобретением представлены ниже.

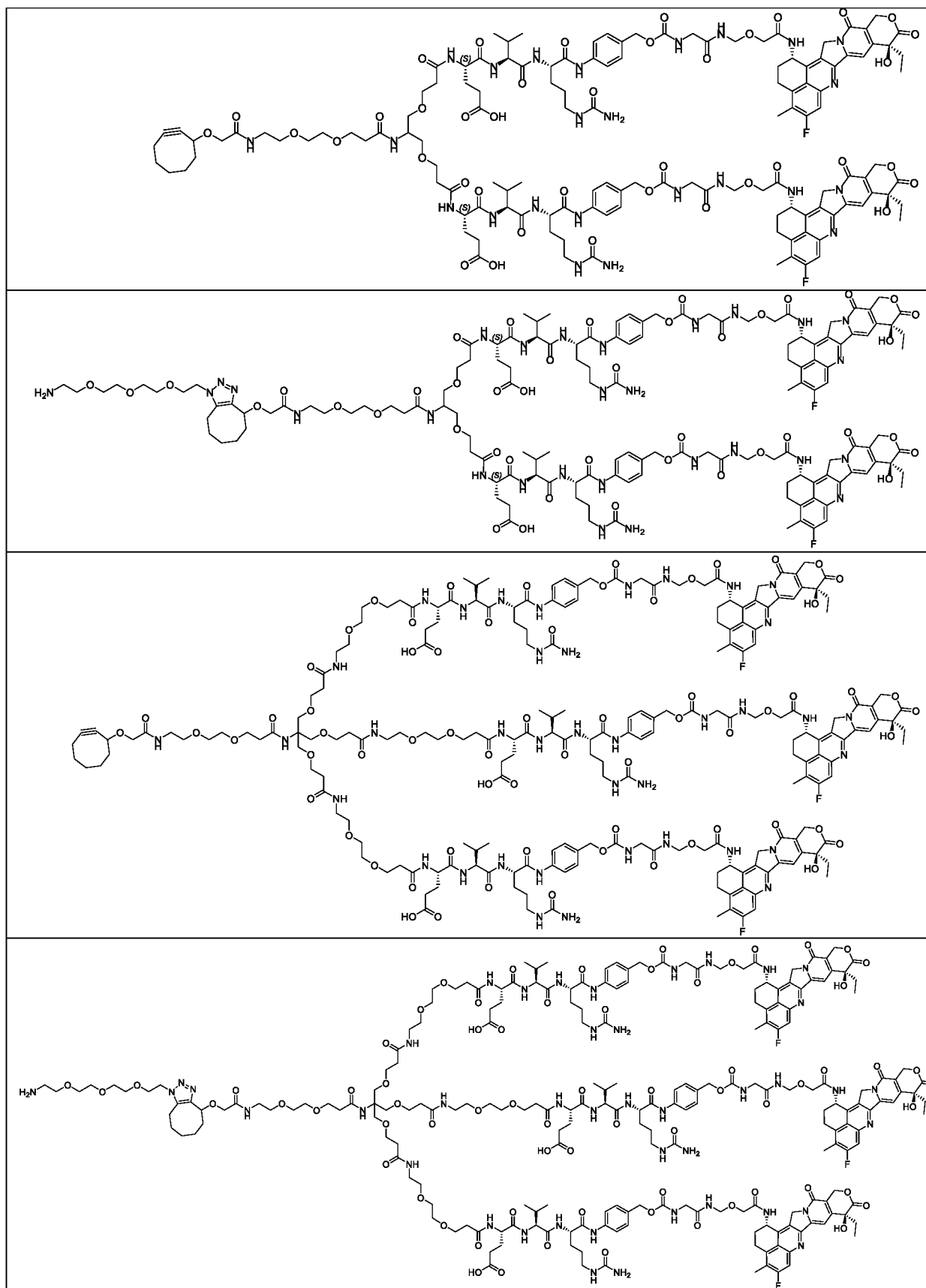




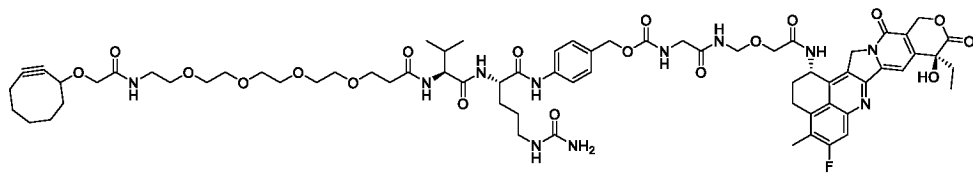






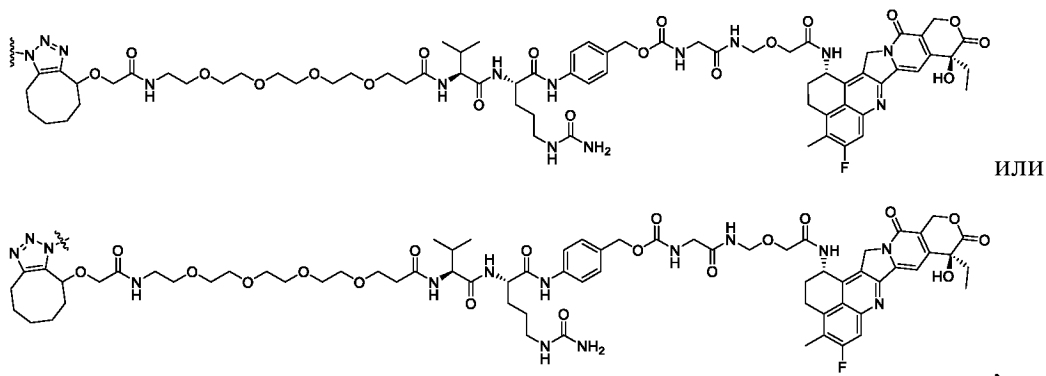


[0284] В одном варианте осуществления соединение (т.е. линкер-полезная нагрузка) в соответствии с изобретением имеет структуру:



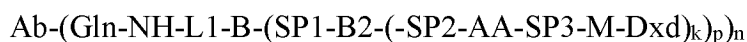
или его фармацевтически приемлемая соль.

**[0285]** В одном варианте осуществления соединение (т.е. линкер-полезная нагрузка) в соответствии с изобретением имеет структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль.

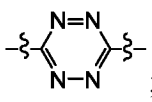
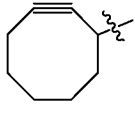
**[0286]** В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает конъюгат антитело-лекарственное средство в соответствии с формулой (II):



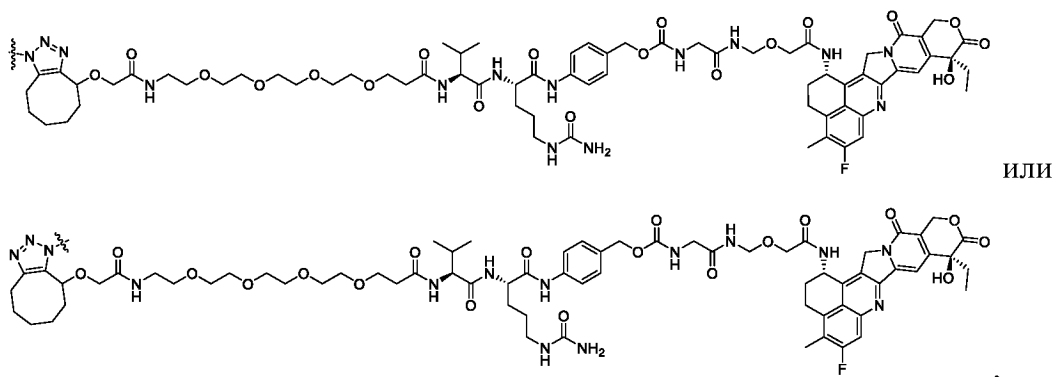
(II),

где Ab представляет собой антитело; Gln представляет собой остаток глутамина; L1 отсутствует или представляет собой первый линкер, как описано выше; B представляет собой разветвленную единицу, как описано выше, содержащую по меньшей мере один

аддукт группы B' и группы B'', где группа B' выбрана из  $-\text{N}_3$ ,  $-\xi \equiv \xi-$ ,  ;

 ;  и по меньшей мере одну группу B'', где B''-SP1-B2-( $-\text{SP2-AA-SP3-M-Dxd}$ )<sub>p</sub> представляет собой соединение формулы (L2-P), как описано выше, и где соединение формулы (L2-P) ковалентно присоединено к антителу через аддукт группы B' и группы B'', k представляет собой целое число от 1 до 12, а p и n независимо представляют собой целое число от 1 до 30.

**[0287]** В одном варианте осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство в соответствии с настоящим изобретением содержит антитело и линкер-полезную нагрузку, при этом линкер-полезная нагрузка имеет структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль, где  $\sim$  представляет собой точку присоединения к связывающему агенту (например, антителу), напрямую или через второй линкер.

### Связывающие агенты

**[0288]** В одном варианте осуществления эффективность вариантов осуществления конъюгата белок-лекарственное средство, описанных в настоящем документе, зависит от селективности связывающего агента в отношении связывания с его партнером по связыванию. В одном варианте осуществления настоящего изобретения связывающий агент представляет собой любую молекулу, способную с некоторой специфичностью связываться с данным партнером по связыванию. В одном варианте осуществления связывающий агент находится внутри млекопитающего, где взаимодействие может привести к терапевтическому применению. В альтернативном варианте осуществления связывающий агент находится *in vitro*, где взаимодействие может привести к диагностическому применению. В некоторых аспектах связывающий агент способен связываться с клеткой или клеточной популяцией.

**[0289]** Подходящие связывающие агенты по настоящему изобретению включают белки, которые связываются с партнером по связыванию, при этом связывающий агент содержит один или несколько остатков глутамина. Подходящие связывающие агенты включают, но без ограничения, антитела, лимфокины, гормоны, факторы роста, вирусные рецепторы, интерлейкины или любые другие молекулы или вещества, связывающиеся с клетками или пептидами.

**[0290]** В одном варианте осуществления связывающий агент представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из моноклональных антител, поликлональных антител, фрагментов антител (Fab, Fab' и F(ab)<sub>2</sub>, минител, диател, триатела и т.п.). Антитела по настоящему изобретению могут быть гуманизированы с использованием способов, описанных в патенте США №

6596541 и публикации США № 2012/0096572, каждый из которых полностью включен в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления соединений конъюгатов белок-лекарственное средство по настоящему изобретению ВА представляет собой гуманизированное моноклональное антитело. Например, ВА может представлять собой моноклональное антитело, которое связывается с HER2, MET или STEAP2. В некоторых вариантах осуществления соединений конъюгатов белок-лекарственное средство по настоящему изобретению ВА представляет собой биспецифическое антитело, например, анти-HER2/HER2 биспецифическое антитело или анти-MET/MET биспецифическое антитело.

**[0291]** В настоящем изобретении антитело может представлять собой любое антитело, которое специалист в данной области сочтет подходящим. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит по меньшей мере один остаток глутамина по меньшей мере в одной последовательности полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит один или несколько остатков gln295. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит два полипептида тяжелой цепи, каждый из которых содержит один остаток gln295. В дополнительных вариантах осуществления антитело содержит один или несколько остатков глутамина в сайте, отличном от 295 тяжелой цепи. Такие антитела могут быть выделены из природных источников или сконструированы таким образом, что они содержат один или несколько остатков глутамина. Методы конструирования остатков глутамина в полипептидную цепь антитела находятся в компетенции специалистов-практиков в данной области. В некоторых вариантах осуществления антитело является агликозилированным.

**[0292]** Антитело может быть представлено в любой форме, известной специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит легкую цепь. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь представляет собой легкую каппа-цепь. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь представляет собой легкую лямбда-цепь.

**[0293]** В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgA. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgD. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgE. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgG. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgM. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgG1. В некоторых аспектах тяжелая цепь

представляет собой IgG2. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgG3. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgG4. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgA1. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgA2.

**[0294]** В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой фрагмент антитела. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fv. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент F(ab')<sub>2</sub>. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab'. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент scFv (sFv). В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент scFv-Fc.

**[0295]** В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой поликлональное антитело.

**[0296]** В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое антитело.

**[0297]** Антитело может обладать специфичностью связывания с любым антигеном, который считается подходящим для специалистов в данной области. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой трансмембранную молекулу (например, рецептор) или фактор роста. Иллюстративные антигены включают, но без ограничения, молекулы такие как ренин; гормон роста, включая гормон роста человека и гормон роста крупного рогатого скота; фактор высвобождения гормона роста; паратгормон; тиреотропный гормон; липопротеины; альфа<sub>1</sub>-антитрипсин; А-цепь инсулина; В-цепь инсулина; проинсулин; фолликулостимулирующий гормон; кальцитонин; лютеинизирующий гормон; глюкагон; факторы свертывания крови, такие как фактор vms, фактор IX, тканевой фактор (TF) и фактор фон Виллебранда; факторы, препятствующие свертыванию крови, такие как белок С; предсердный натрийуретический фактор; легочный сурфактант; активатор плазминогена, такой как урокиназа или моча человека, или активатор плазминогена тканевого типа (t-PA); бомбезин; тромбин; гемопозитический фактор роста; фактор некроза опухоли-альфа и -бета; энкефалиназа; RANTES (регулируемый активацией, нормально экспрессируемый и секретируемый Т-клетками); воспалительный белок макрофагов человека (MIP-I-



альфа); сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин; вещество, ингибирующее вещество Мюллера; А-цепь релаксина; В-цепь релаксина; прорелаксин; мышинный гонадотропин-ассоциированный пептид; микробный белок, такой как беталактамаза; ДНКаза; 19Е; антиген, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA), такой как CTLA-4; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов (VEGF); рецепторы для гормонов или факторов роста; белок А или D; ревматоидные факторы; нейротрофический фактор, такой как костный нейротрофический фактор (BDNF), нейротрофин-3, -4, -5 или -6 (NT-3, NT4, NT-5 или NT-6), или фактор роста нервов, такой как как NGF-β; фактор роста тромбоцитов (PDGF); фактор роста фибробластов, такой как aFGF и bFGF; рецептор 2 фактора роста фибробластов (FGFR2), эпидермальный фактор роста (EGF); трансформирующий фактор роста (TGF), такой как TGF-альфа и TGF-бета, включая TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 или TGF-β5; инсулиноподобный фактор роста-1 и -2 (IGF-1 и IGF-2); des(I-3)-IGF-1 (мозговой IGF-1), белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста, рецепторы EpcAM, gD3, FLT3, PSMA, PSCA, MUC1, MUC16, STEAP, STEAP2, CEA, TENB2, EphA, рецепторы EphB, рецептор фолиевой кислоты, FOLRI, мезотелин, крипто, alphavbeta6, интегрин, VEGF, VEGFR, EGFR, рецептор трансферрина, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5; белки CD, такие как CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, CD152, или антитело, которое связывается с одним или несколькими опухолеассоциированными антигенами или рецепторами клеточной поверхности, раскрытыми в публикации США № 2008/0171040 или публикации США № 2008/0305044, которые полностью включены посредством ссылки; эритропоэтин; остеоиндуктивные факторы; иммунотоксины; костный морфогенетический белок (BMP); интерферон, такой как интерферон-альфа, -бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (CSF), например, M-CSF, gM-CSF и g-CSF; интерлейкины (IL), например, от IL-1 до IL-10; супероксиддисмутаза; Т-клеточные рецепторы; белки на поверхности мембран; фактор ускорения распада; вирусный антиген, такой как, например, часть оболочки HIV; транспортные белки; «хоминг»-рецепторы; адресины; регуляторные белки; интегрин, такие как CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 и VCAM; ассоциированный с опухолью антиген, такой как белки AFP, ALK, B7H4, BAGE, β-катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9 (карбоангидраза IX), каспаза-8, CD20, CD40, CD123, CDK4, CEA, CLEC12A, c-kit, cMET, CTLA4, циклин-

B1, CYP1B1, EGFR, EGFRVIII, эндоглин, Ерсam, EphA2, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3, ErbB4/HER4, ETV6-AML, Fra-1, FOLR1, белки gAGE (например, gAGE-1, -2), gD2, gD3, globoH, глипикан-3, gM3, gp100, HER2, HLA/B-raf, HLA/EBNA1, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R, LGR5, LMP2, белки MAGE (например, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 и -12), MART-1, мезотелин, mL-IAP, Muc1, Muc16 (CA-125), MET, MUM1, NA17, NGEF, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PLAC1, PRLR, PRAME, PSCA, PSGR, PSMA (FOLH1), белки RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, STEAP1, STEAP2, STn, сурвивин, TAG-72, TGF- $\beta$ , TMPRSS2, Tn, TNFRSF17, TRP-1, TRP-2, тирозиназа и уроплакин-3, и фрагменты любого из перечисленных в настоящем документе полипептидов.

**[0298]** Иллюстративные антигены также включают, но без ограничения, BCMA, SLAMF7, B7H4, gPNMB, UPK3A и LGR5. Иллюстративные антигены также включают, но без ограничения, MUC16, PSMA, STEAP2 и HER2.

**[0299]** В некоторых вариантах осуществления антигены также включают, но без ограничения, гематологические мишени, например, CD22, CD30, CD33, CD79a и CD79b.

**[0300]** Некоторые варианты осуществления в настоящем документе являются мишень-специфическими для терапевтического или диагностического применения. В одном варианте осуществления связывающие агенты получают для взаимодействия и связывания с антигенами, определенными как опухолевые антигены, которые включают антигены, специфические для типа опухоли, или антигены, которые являются общими, сверхэкспрессированными или модифицированными на конкретном типе опухоли. Примеры включают: альфа-актинин-4 при раке легкого, ARTC1 при меланоме, слитый белок BCR-ABL при хроническом миелоидном лейкозе, B-RAF, CLPP или Cdc27 при меланоме, CASP-8 при плоскоклеточной карциноме и hsp70-2 при почечно-клеточной карциноме, а также следующие общие опухолеспецифические антигены, например: BAGE-1, gAGE, gnTV, KK-LC-1, MAGE-A2, NA88-A, TRP2-INT2. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой PRLR или HER2. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с STEAP2, MUC16, EGFR, EGFRVIII, FGR2 или PRLR.

**[0301]** В некоторых вариантах осуществления антигены включают HER2. В некоторых вариантах осуществления антигены включают STEAP2. В некоторых вариантах осуществления антигены включают MET. В некоторых вариантах осуществления

антигены включают EGFRVIII. В некоторых вариантах осуществления антигены включают MUC16. В некоторых вариантах осуществления антигены включают PRLR. В некоторых вариантах осуществления антигены включают PSMA. В некоторых вариантах осуществления антигены включают FGFR2.

**[0302]** В некоторых вариантах осуществления ВА представляет собой анти-HER2 антитело, анти-STEAP2 антитело, анти-MET антитело, анти-EGFRVIII антитело, анти-MUC16 антитело, анти-PRLR антитело, анти-PSMA антитело, анти-FGFR2 антитело, анти-HER2/HER2 биспецифическое антитело, анти-MET/MET биспецифическое антитело или анти-FOLR1 антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент.

**[0303]** В некоторых вариантах осуществления ВА направленно воздействует на рак, выбранный из группы, состоящей из рака молочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, рака легких, рака печени или рака головного мозга.

**Анти-HER2 антитела, подходящие для конъюгатов белок-лекарственное средство**

**[0304]** В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой анти-HER2 антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой трастузумаб, пертузумаб (2C4) или маргетуксимаб (MGAH22). В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой трастузумаб. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конъюгаты белок-лекарственное средство, например, ADC, в соответствии с изобретением содержат анти-HER2 антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-HER2 антитело может включать антитела, описанные в WO 2019/212965 A1.

**[0305]** В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой анти-HER2/HER2 биспецифическое антитело, которое содержит первый антигенсвязывающий домен (D1), который специфически связывается с первым эпитопом HER2 человека, и второй антигенсвязывающий домен (D2), который специфически связывается со вторым эпитопом человеческого HER2.

**[0306]** В некоторых вариантах осуществления домены D1 и D2 анти-HER2/HER2 биспецифического антитела не конкурируют друг с другом. Отсутствие конкуренции между D1 и D2 за связывание с HER2 означает, что соответствующие моноспецифические антигенсвязывающие белки, из которых были получены D1 и D2, не конкурируют друг с другом за связывание с HER2 человека. Иллюстративные анализы на конкуренцию между антигенсвязывающими белками известны в данной области.

[0307] В некоторых вариантах осуществления D1 и D2 связываются с разными (например, неперекрывающимися или частично перекрывающимися) эпитопами на HER2.

[0308] В одном неограничивающем варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает конъюгаты белок-лекарственное средство, содержащие биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

первый антигенсвязывающий домен (D1); и

второй антигенсвязывающий домен (D2);

где D1 специфически связывается с первым эпитопом HER2 человека; и

где D2 специфически связывается со вторым эпитопом HER2 человека.

[0309] Анти-HER2/HER2 биспецифические антитела могут быть сконструированы с использованием антигенсвязывающих доменов двух отдельных моноспецифических анти-HER2 антител. Например, коллекцию моноклональных моноспецифических анти-HER2 антител можно получить с использованием стандартных способов, известных в данной области. Полученные таким образом индивидуальные антитела можно тестировать попарно друг против друга на предмет перекрестной конкуренции с белком HER2. Если два разных анти-HER2 антитела способны связываться с HER2 одновременно (т.е. не конкурируют друг с другом), то антигенсвязывающий домен первого анти-HER2 антитела и антигенсвязывающий домен второго, неконкурентного анти-HER2 антитела может быть сконструировано в виде одного анти-HER2/HER2 биспецифического антитела в соответствии с настоящим изобретением.

[0310] В соответствии с настоящим изобретением биспецифическая антигенсвязывающая молекула может представлять собой один многофункциональный полипептид, или мультимерный комплекс из двух или более полипептидов, которые ковалентно или нековалентно связаны друг с другом. Как становится очевидным из настоящего описания, любая антигенсвязывающая конструкция, обладающая способностью одновременно связывать два отдельных неидентичных эпитопа молекулы HER2, рассматривается как биспецифическая антигенсвязывающая молекула. Любая из биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в настоящем документе, или их варианты могут быть сконструированы с использованием стандартных молекулярно-биологических методов (например, технологии экспрессии рекомбинантной ДНК и белка), как будет известно специалисту в данной области.

**[0311]** В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с HER2, и фармацевтически приемлемый носитель. В одном неограничивающем варианте осуществления антитело может связывать два отдельных эпитопа на белке HER2, т.е. антитело представляет собой биспецифическое антитело к HER2/HER2. В родственном аспекте в описании представлена композиция, которая представляет собой комбинацию анти-HER2/HER2 антитела и второго терапевтического агента. В одном варианте осуществления второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который целесообразно комбинировать с анти-HER2/HER2 антителом. Дополнительные комбинированные терапии и совместные составы, включающие анти-HER2/HER2 биспецифические антитела по настоящему изобретению, раскрыты в другом месте настоящего документа.

**[0312]** В другом аспекте настоящего изобретения обеспечены терапевтические способы нацеливания/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих HER2, с использованием анти-HER2/HER2 биспецифического антитела по настоящему изобретению, при этом терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей анти-HER2/HER2-антитело по настоящему изобретению, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых случаях анти-HER2/HER2 антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты) могут быть использованы для лечения рака молочной железы или могут быть модифицированы для повышения цитотоксичности с помощью способов, включающих, но без ограничения, модифицированные домены Fc для увеличения ADCC (см., например, Shield et al. (2002) JBC 277:26733), радиоиммунотерапию, конъюгаты антитело-лекарственное средство или другие способы повышения эффективности удаления опухоли.

**[0313]** Настоящее изобретение также включает применение анти-HER2 антитела по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения (например, рака), связанного или вызванного HER2-экспрессирующими клетками. В одном аспекте изобретение относится к соединению, содержащему анти-HER2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-HER2/HER2 биспецифическое антитело, как раскрыто в настоящем документе, для применения в медицине. В другом аспекте изобретение относится к соединению, содержащему конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), как раскрыто в настоящем документе, для применения в медицине.

[0314] В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает анти-HER2/HER2 биспецифические антитела для диагностических применений, таких как, например, реагенты для визуализации.

**Анти-STEAP2 антитела, подходящие для конъюгатов белок-лекарственное средство**

[0315] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой анти-6-трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 2 (STEAP2), т.е. анти-STEAP2 антитело. STEAP2, работающий как челнок между комплексом Гольджи и плазматической мембраной, представляет собой металлоредуктазу, которая восстанавливает железо и медь, облегчая их импорт в клетку. STEAP2 в основном локализуется в эпителиальных клетках предстательной железы. STEAP2 также экспрессируется в нормальном сердце, головном мозге, поджелудочной железе, яичниках, скелетных мышцах, молочной железе, яичках, матке, почках, легких, трахее, толстой кишке и печени. STEAP2 сверхэкспрессируется в злокачественных тканях, включая опухоли предстательной железы, мочевого пузыря, шейки матки, легких, толстой кишки, почки, молочной железы, поджелудочной железы, желудка, матки и яичников (Gomes, I.M. et al., 2012, Mol. Cancer Res. 10:573-587; Challita-Eid- P.M., et al., 2003, WO 03/087306; Emtage, P.C.R., 2005, WO 2005/079490).

[0316] В одном аспекте подходящими анти-STEAP антителами являются антитела, раскрытые в US 2018/0104357. Иллюстративные анти-STEAP2 антитела в соответствии с настоящим изобретением перечислены в таблицах 1 и 2 настоящего документа. В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелых цепей (HCVR) и переменных областей легких цепей (LCVR), а также областей, определяющих комплементарность тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и областей, определяющих комплементарность легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) иллюстративных анти-STEAP2 антител. В таблице 2 представлены идентификаторы последовательностей молекул нуклеиновых кислот, кодирующих HCVRs, LCVRs, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 иллюстративных анти-STEAP2 антител.

[0317] Настоящее изобретение обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, или из по существу подобной им последовательности, имеющей по

меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0318]** Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1, или из по существу подобной им последовательности, имеющей по меньшей мере 90% по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0319]** Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), имеющую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленные в таблице 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных анти-STEAP2 антител, перечисленных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 250/258 (например, H2M11162N).

**[0320]** Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 1, или по существу подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0321]** Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 1, или по существу подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0322]** Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1, или по существу подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0323]** Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 1, или по существу подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0324]** Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 1, или по существу подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0325]** Настоящее изобретение также относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1, или по существу подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0326]** Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленные в таблице 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение



обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных анти-STEAP2 антител, перечисленных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 256/264 (например, H2M11162N).

**[0327]** Настоящее изобретение также обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любом из иллюстративных анти-STEAP2 антител, перечисленных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 252-254-256-260-262-264 (например, H2M11162N).

**[0328]** В родственном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в парной аминокислотной последовательности HCVR/LCVR, как определено любым из иллюстративных анти-STEAP2 антител, перечисленных в таблице 1. Например, настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 250/258 (например, H2M11162N). Способы и технологии идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и могут быть применены для идентификации CDR в указанных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, описанных в настоящем документе. Типовые соглашения, которые могут быть применены для определения границ CDR, включают, *например*, определение по Кабату, определение по Чотиа и определение AbM. В общем случае определение по Кабату основано на вариабельности последовательности, определение по Чотиа основано на местоположении структурных петлевых областей, а определение по AbM является компромиссом между подходами по Кабату и Чотиа. См., *например*, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); and Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Публичные базы данных также доступны для идентификации последовательностей CDR в антителе.

**[0329]** Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие анти-STEAP2 антитела или их части. Например, в настоящем изобретении обеспечены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой последовательности нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0330]** Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0331]** Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR1, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0332]** Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR2, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0333]** Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0334]** Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0335]** Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0336]** Настоящее изобретение также обеспечивает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 1; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0337]** В настоящем изобретении также обеспечены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, при этом HCVR содержит набор из трех CDR (т.е. HCDR1-

HCDR2-HCDR3), при этом набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено любыми типовыми анти-STEAP2 антителами, перечисленными в таблице 1.

**[0338]** В настоящем изобретении также обеспечены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, при этом LCVR содержит набор из трех CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-LCDR3), при этом набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким, как определено любыми типовыми анти-STEAP2 антителами, перечисленными в таблице 1.

**[0339]** В настоящем изобретении также обеспечены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как HCVR, так и LCVR, при этом HCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 1, и при этом LCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот HCVR, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичности последовательности, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, перечисленных в таблице 2, или по существу подобную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с этим аспектом изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где HCVR и LCVR получены из того же анти-STEAP2 антитела, указанного в таблице 1.

**[0340]** Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным экспрессирующим векторам, способным к экспрессии полипептида, содержащего переменную область тяжелой или легкой цепи анти-STEAP2 антитела. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие любую из упомянутых выше молекул нуклеиновой кислоты, то есть молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, как указано в таблице 1. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые вводили такие векторы, а также способы получения антител или их частей

путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать антитела или фрагменты антител, и восстановление антител и фрагментов антител, полученных таким образом.

**[0341]** Настоящее изобретение включает анти-STEAP2 антитела, имеющие модифицированный профиль гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования может быть полезна или антителом, лишенное фукозного фрагмента, присутствующего в олигосахаридной цепи, например, для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях, модификация галактозилирования может быть сделана с целью изменения комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

**[0342]** В другом аспекте настоящего изобретения обеспечена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, которое специфически связывает STEAP2, и фармацевтически приемлемый носитель. В связанном аспекте данное изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию анти-STEAP2 антитела и второго терапевтического агента. В одном варианте осуществления вторым терапевтическим агентом является любой агент, который целесообразно комбинировать с анти-STEAP2 антителом. Дополнительные комбинированные терапии и комбинированные составы, включающие анти-STEAP2 антитела по настоящему изобретению, описаны в другом месте настоящего документа.

**[0343]** В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает терапевтические способы нацеливания/уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих STEAP2, с использованием анти-STEAP2 антитела по настоящему изобретению, в котором терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей анти-STEAP2 антитело по данному изобретению нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых случаях анти-STEAP2 антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты) могут быть использованы для лечения рака предстательной железы или могут быть модифицированы для придания им большей цитотоксичности способами, включая, но без ограничения, модифицированные Fc-домены для увеличения ADCC (см. например, Shield et al. (2002) JBC 277:26733), радиоиммунотерапию, конъюгаты антитело-лекарственное средство или другие способы повышения эффективности абляции опухоли.

**[0344]** Настоящее изобретение также включает использование анти-STEAP2 антитела по изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения (например, рака), связанного с STEAP2-экспрессирующими клетками или вызванного ими. В одном аспекте изобретение относится к соединению, содержащему анти-STEAP2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическому антителу STEAP2xCD3, как описано в настоящем документе, для применения в медицине. В другом аспекте изобретение относится к соединению, содержащему конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), как описано в настоящем документе, для применения в медицине.

**[0345]** В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает моноспецифические анти-STEAP2 антитела для диагностических применений, такие как, например, реагенты для визуализации.

**[0346]** В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает терапевтические способы стимуляции активации Т-клеток с использованием анти-CD3 антитела или антигенсвязывающей части антитела по настоящему изобретению, где терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело.

**[0347]** В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывает клетки C4-2, экспрессирующие STEAP2, с EC<sub>50</sub> менее 50 нМ, как измерено в анализе FACS. В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается и интернализуется клетками C4-2, экспрессирующими STEAP2.

**[0348]** Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует за связывание с STEAP2 человека с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в таблице 1. В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание с STEAP2 человека с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 2/10; 18/26; 34/42; 50/58; 66/58; 74/58; 82/58; 90/58; 98/58; 106/114; 122/130; 138/146; 154/162; 170/178; 186/194; 202/210; 218/226; 234/242; 250/258; 266/274; 282/290; 298/306; 314/322; 330/338; 346/354; 362/370; и 378/386.

**[0349]** Кроме того, изобретение обеспечивает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом на STEAP2 человека, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в таблице. 1. В другом аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом на STEAP2 человека, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 2/10; 18/26; 34/42; 50/58; 66/58; 74/58; 82/58; 90/58; 98/58; 106/114; 122/130; 138/146; 154/162; 170/178; 186/194; 202/210; 218/226; 234/242; 250/258; 266/274; 282/290; 298/306; 314/322; 330/338; 346/354; 362/370; и 378/386.

**[0350]** Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с STEAP2 человека, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: определяющие комплементарность участки (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), имеющей аминокислотную последовательность, указанную в таблице 1; и CDR вариабельной области легкой цепи (LCVR), имеющий аминокислотную последовательность, как указано в таблице 1. В другом аспекте выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR тяжелой и легкой цепи пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NOs: 2/10; 18/26; 34/42; 50/58; 66/58; 74/58; 82/58; 90/58; 98/58; 106/114; 122/130; 138/146; 154/162; 170/178; 186/194; 202/210; 218/226; 234/242; 250/258; 266/274; 282/290; 298/306; 314/322; 330/338; 346/354; 362/370; и 378/386. В еще одном аспекте выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NOs: 4-6-8-12-14-16; 20-22-24-28-30-32; 36-38-40-44-46-48; 52-54-56-60-62-64; 68-70-72-60-62-64; 76-78-80-60-62-64; 84-86-88-60-62-64; 92-94-96-60-62-64; 100-102-104-60-62-64; 108-110-112-116-118-120; 124-126-128-132-134-136; 140-142-144-148-150-152; 156-158-160-164-166-168; 172-174-176-180-182-184; 188-190-192-196-198-200; 204-206-208-212-214-216; 220-222-224-228-230-232; 236-238-240-244-246-248; 252-254-256-260-262-264; 268-270-272-276-278-280; 284-286-288-292-294-296; 300-302-304-308-310-312; 316-318-320-324-326-328; 332-334-336-340-342-344; 348-350-352-356-358-360; 364-366-368-372-374-376; и 380-382-384-388-390-392.

**[0351]** В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает STEAP2 человека, где

указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (а) переменную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 74, 82, 90, 98, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362 и 378; и (b) переменную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: SEQ ID NOs: 10; 26; 42; 58 114; 130; 146; 162; 178; 194; 210; 226, 242; 258; 274; 290; 306; 322; 338; 354; 370; и 386. В дополнительном аспекте выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:2/10; 18/26; 34/42; 50/58; 66/58; 74/58; 82/58; 90/58; 98/58; 106/114; 122/130; 138/146; 154/162; 170/178; 186/194; 202/210; 218/226; 234/242; 250/258; 266/274; 282/290; 298/306; 314/322; 330/338; 346/354; 362/370; и 378/386.

**[0352]** В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение обеспечивает конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие анти-STEAP2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как описано выше, и терапевтический агент (например, противоопухолевый агент, например, аналог камптотецина, например, Dxd). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и противоопухолевый агент ковалентно связаны через линкер, как обсуждалось выше. В различных вариантах осуществления анти-STEAP2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут представлять собой любое из описанных в настоящем документе анти-STEAP2 антител или фрагментов.

**[0353]** *Аминокислотные и нуклеиновые последовательности переменных областей тяжелых и легких цепей анти-STEAP2 антител*

**[0354]** В таблице 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, и CDR выбранных анти-STEAP2 антител в соответствии с изобретением. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в **таблице 2**.

**Таблица 1: Идентификаторы аминокислотных последовательностей анти-STEAP2 антител**

	SEQ ID NO:							
Обозначение	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3



антитела								
H1H11243N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H11878P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H11880P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H11888P2	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H11892P2	66	68	70	72	58	60	62	64
H1H11893P2	74	76	78	80	58	60	62	64
H1H11894P2	82	84	86	88	58	60	62	64
H1H11895P2	90	92	94	96	58	60	62	64
H1H11896P2	98	100	102	104	58	60	62	64
H1H11897P2	106	108	110	112	114	116	118	120
H1H7968P	122	124	126	128	130	132	134	136
H1H7969P	138	140	142	144	146	148	150	152
H1H7970P	154	156	158	160	162	164	166	168
H1H7971P	170	172	174	176	178	180	182	184
H1H7972P	186	188	190	192	194	196	198	200
H1M7804N	202	204	206	208	210	212	214	216
H1M7814N	218	220	222	224	226	228	230	232
H1M7832N	234	236	238	240	242	244	246	248
H2M11162N	250	252	254	256	258	260	262	264
H2M11163N	266	268	270	272	274	276	278	280
H2M11164N	282	284	286	288	290	292	294	296
H2M7806N	298	300	302	304	306	308	310	312
H2M7807N	314	316	318	320	322	324	326	328
H2M7809N	330	332	334	336	338	340	342	344
H2M7810N	346	348	350	352	354	356	358	360
H2M7811N	362	364	366	368	370	372	374	376
H2M7812N	378	380	382	384	386	388	390	392

**Таблица 2: Идентификаторы нуклеотидных последовательностей анти-STEAP2 антител**

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H11243N	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H11878P	17	19	21	23	25	27	29	31
H1H11880P	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H11888P2	49	51	53	55	57	59	61	63
H1H11892P2	65	67	69	71	57	59	61	63
H1H11893P2	73	75	77	79	57	59	61	63
H1H11894P2	81	83	85	87	57	59	61	63
H1H11895P2	89	91	93	95	57	59	61	63
H1H11896P2	97	99	101	103	57	59	61	63
H1H11897P2	105	107	109	111	113	115	117	119
H1H7968P	121	123	125	127	129	131	133	135
H1H7969P	137	139	141	143	145	147	149	151
H1H7970P	153	155	157	159	161	163	165	167
H1H7971P	169	171	173	175	177	179	181	183

H1H7972P	185	187	189	191	193	195	197	199
H1M7804N	201	203	205	207	209	211	213	215
H1M7814N	217	219	221	223	225	227	229	231
H1M7832N	233	235	237	239	241	243	245	247
H2M11162N	249	251	253	255	257	259	261	263
H2M11163N	265	267	269	271	273	275	277	279
H2M11164N	281	283	285	287	289	291	293	295
H2M7806N	297	299	301	303	305	307	309	311
H2M7807N	313	315	317	319	321	323	325	327
H2M7809N	329	331	333	335	337	339	341	343
H2M7810N	345	347	349	351	353	355	357	359
H2M7811N	361	363	365	367	369	371	373	375

**[0355] Анти-MET антитела к, подходящие для конъюгатов белок-лекарственное средство**

**[0356]** В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой анти-MET антитело. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления конъюгаты белок-лекарственное средство, например, ADC, в соответствии с настоящим изобретением содержат анти-MET антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-MET антитело может включать антитела, описанные в US 2018/0134794.

**[0357]** В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой анти-MET/MET биспецифическое антитело, которое содержит первый антигенсвязывающий домен (D1), который специфически связывается с первым эпитопом MET человека, и второй антигенсвязывающий домен (D2), который специфически связывается со вторым эпитопом MET человека. В некоторых вариантах осуществления анти-MET/MET биспецифическое антитело может включать антитела, описанные в US 2018/0134794.

**[0358]** В некоторых вариантах осуществления домены D1 и D2 анти-MET/MET биспецифического антитела не конкурируют друг с другом. Отсутствие конкуренции между D1 и D2 за связывание с MET означает, что соответствующие моноспецифические антигенсвязывающие белки, из которых были получены D1 и D2, не конкурируют друг с другом за связывание с MET человека. Типичные анализы конкуренции антигенсвязывающего белка известны в данной области.

**[0359]** В некоторых вариантах осуществления D1 и D2 связываются с разными (например, неперекрывающимися или частично перекрывающимися) эпитопами на MET.

**[0360]** В одном неограничивающем варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает конъюгаты белок-лекарственное средство, содержащие биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

первый антигенсвязывающий домен (D1); и

второй антигенсвязывающий домен (D2);

где D1 специфически связывается с первым эпитопом MET человека; и

где D2 специфически связывается со вторым эпитопом MET человека.

**[0361]** Анти-MET/MET биспецифические антитела могут быть сконструированы с использованием антигенсвязывающих доменов двух отдельных моноспецифических анти-MET антител. Например, коллекцию моноклональных моноспецифических анти-MET антител можно получить с использованием стандартных способов, известных в данной области. Полученные таким образом индивидуальные антитела можно тестировать попарно друг против друга на предмет перекрестной конкуренции с белком MET. Если два разных анти-MET антитела способны связываться с MET одновременно (т.е. не конкурируют друг с другом), то антигенсвязывающий домен первого анти-MET антитела и антигенсвязывающий домен второго, неконкурентного анти-MET антитела можно сконструировать в единое анти-MET/MET биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением.

**[0362]** В соответствии с настоящим изобретением биспецифическая антигенсвязывающая молекула может представлять собой единый многофункциональный полипептид или мультимерный комплекс, состоящий из двух или более полипептидов, которые ковалентно или нековалентно связаны друг с другом. Как станет очевидным из настоящего изобретения, любая антигенсвязывающая конструкция, обладающая способностью одновременно связывать два отдельных неидентичных эпитопа молекулы MET, рассматривается как биспецифическая антигенсвязывающая молекула. Любая из биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в настоящем документе, или их вариантов может быть сконструирована с использованием стандартных молекулярно-биологических методов (например, технологии экспрессии рекомбинантной ДНК и белка), как будет известно специалисту в данной области.

**[0363]** Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые содержат первый антигенсвязывающий домен (D1), который специфически связывается с первым эпитопом MET человека, и второй антигенсвязывающий домен (D2), который специфически связывается со вторым эпитопом MET человека, могут упоминаться в

настоящем документе как «биспецифические антитела к MET/MET», «биспецифические антитела к MET x MET», «MET/MET», «MET x MET» или с использованием другой родственной терминологии. В некоторых вариантах осуществления первый эпитоп MET человека содержит аминокислоты 192-204 из SEQ ID NO:2109. В некоторых вариантах осуществления второй эпитоп MET человека содержит аминокислоты 305-315 и 421-455 из SEQ ID NO:2109. В некоторых вариантах осуществления первый эпитоп MET человека содержит аминокислоты 192-204 из SEQ ID NO:2109; и второй эпитоп MET человека содержит аминокислоты 305-315 и 421-455 из SEQ ID NO:2109.

**[0364]** Иллюстративные антигенсвязывающие домены (D1 и D2), которые могут быть включены в биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET x MET, представленные в настоящем документе, включают антигенсвязывающие домены, полученные из любого из анти-MET антител, описанных в настоящем документе. Например, настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET x MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 3, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0365]** Также в настоящем документе обеспечены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET x MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 3, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0366]** В настоящем документе обеспечены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET x MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 3, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение обеспечивает биспецифические

антигенсвязывающие молекулы MET x MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных анти-MET антител, перечисленных в таблице 3.

**[0367]** Также в настоящем документе обеспечены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET x MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 3, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0368]** Также обеспечены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET x MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 3, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0369]** Также обеспечены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET x MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 3, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0370]** Также обеспечены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET x MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 3, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0371]** Также обеспечены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET x MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий CDR2 легкой

цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 3, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0372]** Также обеспечены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET х MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 3, или по существу подобную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

**[0373]** Также обеспечены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET х MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 3, спаренную с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 3. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных анти-MET антител, перечисленных в таблице 3.

**[0374]** Также обеспечены биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET х MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в любом из иллюстративных анти-MET антитела, перечисленных в таблице 3.

**[0375]** В связанном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET х MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий набор из шести CDR (т.е. HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено для любого из иллюстративных анти-MET антител, перечисленных в таблице 3.

**[0376]** Биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET х MET, обеспеченные в настоящем документе, могут содержать антигенсвязывающий домен D1, полученный

из любого из анти-MET антител из таблицы 3, и антигенсвязывающий домен D2, полученный из любого другого анти-MET антитела из таблицы 3. Неограничивающие примеры биспецифических антител MET x MET по настоящему изобретению изображены на фигуре 10. Фигура 10 представляет собой матрицу, иллюстрирующую компоненты 272 иллюстративных MET x MET биспецифических антител. Каждая пронумерованная ячейка матрицы (пронумерованная от 1 до 272) идентифицирует уникальное биспецифическое антитело, содержащее антигенсвязывающий домен «D1» и антигенсвязывающий домен «D2», где антигенсвязывающий домен D1 содержит переменный домен иммуноглобулина (пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR) или CDR из соответствующего анти-MET антитела, представленные по оси Y, и где антигенсвязывающий домен D2 содержит переменный домен иммуноглобулина (пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR) или CDR из соответствующего анти-MET антитела, представленные по оси X. Так, например, биспецифическая антигенсвязывающая молекула MET x MET «номер 10», показанная в матрице, содержит антигенсвязывающий домен D1, содержащий пару HCVR/LCVR или набор из 6-CDR из иллюстративного анти-MET антитела H4H13290P2, и антигенсвязывающий домен D2, содержащий пару HCVR/LCVR или набор из 6-CDR из иллюстративного анти-MET антитела H4H13321P2.

**[0377]** В качестве неограничивающего иллюстративного примера настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы MET x MET, содержащие антигенсвязывающий домен D1 и антигенсвязывающий домен D2, где антигенсвязывающий домен D1 содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR из SEQ ID NO: 2012/2092, или набор CDR тяжелой и легкой цепей (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащий SEQ ID NO: 2014-2016-2018-2094-2096-2098, и где антигенсвязывающий домен D2 содержит пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR из SEQ ID NO: 2036/2092, или набор CDR тяжелой и легкой цепей (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащий SEQ ID NO: 2038-2040-2042-2094-2096-2098. Иллюстративное биспецифическое антитело MET x MET, имеющее эти характеристики последовательности, представляет собой биспецифическое антитело, обозначенное H4H14639D, также называемое биспецифическим антителом No. 2076, которое содержит D1, полученный из H4H13306P2, и D2, полученный из H4H13312P2.

**[0378]** *Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот переменных областей тяжелых и легких цепей для анти-MET и MET/MET антител.*

[0379] В таблице 3 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелых и легких цепей, и CDR выбранных анти-МЕТ антител, описанных в настоящем документе. (Как отмечалось выше, все анти-МЕТ антитела по настоящему изобретению обладают одинаковой переменной областью легкой цепи и, следовательно, одинаковыми последовательностями CDR легкой цепи). Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в таблице 4.

**Таблица 3: Идентификаторы аминокислотных последовательностей**

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4N13290P2	1956	1958	1960	1962	2092	2094	2096	2098
H4N13291P2	1964	1966	1968	1970	2092	2094	2096	2098
H4N13295P2	1972	1974	1976	1978	2092	2094	2096	2098
H4N13299P2	1980	1982	1984	1986	2092	2094	2096	2098
H4N13300P2	1988	1990	1992	1994	2092	2094	2096	2098
H4N13301P2	1996	1998	2000	2002	2092	2094	2096	2098
H4N13302P2	2004	2006	2008	2010	2092	2094	2096	2098
H4N13306P2	2012	2014	2016	2018	2092	2094	2096	2098
H4N13309P2	2020	2022	2024	2026	2092	2094	2096	2098
H4N13311P2	2028	2030	2032	2034	2092	2094	2096	2098
H4N13312P2	2036	2038	2040	2042	2092	2094	2096	2098
H4N13313P2	2044	2046	2048	2050	2092	2094	2096	2098
H4N13316P2	2052	2054	2056	2058	2092	2094	2096	2098
H4N13318P2	2060	2062	2064	2066	2092	2094	2096	2098
H4N13319P2	2068	2070	2072	2074	2092	2094	2096	2098
H4N13325P2	2076	2078	2080	2082	2092	2094	2096	2098
H4N13331P2	2084	2086	2088	2090	2092	2094	2096	2098

**Таблица 4: Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот**



Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H4H13290P2	1955	1957	1959	1961	2091	2093	2095	2097
H4H13291P2	1963	1965	1967	1969	2091	2093	2095	2097
H4H13295P2	1971	1973	1975	1977	2091	2093	2095	2097
H4H13299P2	1979	1981	1983	1985	2091	2093	2095	2097
H4H13300P2	1987	1989	1991	1993	2091	2093	2095	2097
H4H13301P2	1995	1997	1999	2001	2091	2093	2095	2097
H4H13302P2	2003	2005	2007	2009	2091	2093	2095	2097
H4H13306P2	2011	2013	2015	2017	2091	2093	2095	2097
H4H13309P2	2019	2021	2023	2025	2091	2093	2095	2097
H4H13311P2	2027	2029	2031	2033	2091	2093	2095	2097
H4H13312P2	2035	2037	2039	2041	2091	2093	2095	2097
H4H13313P2	2043	2045	2047	2049	2091	2093	2095	2097
H4H13316P2	2051	2053	2055	2057	2091	2093	2095	2097
H4H13318P2	2059	2061	2063	2065	2091	2093	2095	2097
H4H13319P2	2067	2069	2071	2073	2091	2093	2095	2097
H4H13325P2	2075	2077	2079	2081	2091	2093	2095	2097
H4H13331P2	2083	2085	2087	2089	2091	2093	2095	2097

**[0380]** Антитела, как правило, названы в настоящем документе в соответствии со следующей системой обозначений: префикс, соответствующий Fc (*например*, «H4H»), затем следует числовой идентификатор (*например*, «13290», «13291», «13295» и *т.д.*), затем следует суффикс «P2», как показано в таблицах 3 и 4. Таким образом, в соответствии с такой системой обозначений антитело в настоящем документе может быть названо, *например*, «H4H13290P2», «H4H13291P2», «H4H13295P2» и *т.д.* Префикс в применяемых в настоящем документе обозначениях антител указывает на конкретный изотип Fc-области антитела. В частности, антитело «H4H» содержит Fc IgG4 человека (все переменные области являются полностью человеческими, на что указывает первая буква «H» в обозначении антитела). Как будет понятно специалистам в данной области, антитело с Fc конкретного изотипа можно преобразовать в антитело с Fc другого изотипа (*например*, антитело с Fc IgG4 мыши можно преобразовать в

антитело с IgG1 человека и *т.д.*), но, в любом случае, вариабельные домены (включая CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в таблицах 3 и 4, будут оставаться такими же, а свойства связывания, как ожидается, будут идентичными или в значительной степени подобными, независимо от природы Fc-домена.

### **Конъюгация антител**

**[0381]** Методы и линкеры для конъюгации с остатками антитела или антигенсвязывающего фрагмента известны в данной области. Примеры аминокислотных присоединений, которые можно использовать в контексте этого аспекта, включают, *например*, лизин (*см., например*, US 5208020; US 2010/0129314; Hollander *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19:358-361; WO 2005/089808; US 5714586; US 2013/0101546; и US 2012/0585592), цистеин (*см., например*, US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546; и US 7750116), селеноцистеин (*см., например*, WO 2008/122039; и Hofer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2008, 105:12451-12456), формилглицин (*см., например*, Carrico *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321-322; Agarwal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2013, 110:46-51, и Rabuka *et al.*, *Nat. Protocols*, 2012, 10:1052-1067), неприродные аминокислоты (*см., например*, WO 2013/068874 и WO 2012/166559) и кислые аминокислоты (*см., например*, WO 2012/05982). Конъюгация лизина также может происходить через NHS (N-гидроксисукцинимид). Линкеры также могут быть конъюгированы с остатками цистеина, включая остатки цистеина расщепленной межцепочечной дисульфидной связи, путем образования углеродного мостика между тиолами (*см., например*, US 9951141 и US 9950076). Линкеры также могут быть конъюгированы с антигенсвязывающим белком посредством присоединения к углеводам (*см., например*, US 2008/0305497, WO 2014/065661 и Ryan *et al.*, *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, 13:127-130) и дисульфидным линкерам (*см., например*, WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611, и Shaunak *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2006, 2:312-313). Сайт-специфические методы конъюгации также можно использовать для прямой конъюгации с конкретными остатками антитела или антигенсвязывающего белка (*см., например*, Schumacher *et al.* *J Clin Immunol* (2016) 36 (Suppl 1): 100). В определенных вариантах осуществления, обсуждаемых более подробно ниже, методы сайт-специфической конъюгации включают конъюгацию глутамина посредством трансглутаминазы (*см., например*, Schibli, *Angew Chemie Inter Ed.* 2010, 49, 9995).

**[0382]** Полезные нагрузки в соответствии с изобретением, связанные через лизин и/или цистеин, например, посредством конъюгации с малеимидом или амидом, включены в объем настоящего изобретения.

**[0383]** В некоторых вариантах осуществления конъюгаты белок-лекарственное средство по настоящему изобретению получают в соответствии с двухстадийным процессом, в котором стадия 1 представляет собой конъюгацию с линкером на основе лизина, например, с линкером на основе сложного эфира NHS, и стадия 2 представляет собой реакцию конъюгации с полезной нагрузкой (например, реакцию 1,3-циклоприсоединения).

**[0384]** В некоторых вариантах осуществления конъюгаты белок-лекарственное средство по настоящему изобретению получают в соответствии с двухстадийным процессом, в котором стадия 1 представляет собой конъюгацию с линкером на основе цистеина, например, с малеимидным линкером, и стадия 2 представляет собой реакцию конъюгации с полезной нагрузкой (например, реакцию 1,3-циклоприсоединения).

**[0385]** В некоторых вариантах осуществления конъюгаты белок-лекарственное средство по настоящему изобретению получают в соответствии с двухстадийным процессом, в котором стадия 1 представляет собой опосредованную транsgлутаминазой сайт-специфическую конъюгацию, и стадия 2 представляет собой реакцию конъюгации с полезной нагрузкой (например, реакцию 1,3-циклоприсоединения).

**Стадия 1: Сайт-специфическая конъюгация, опосредованная транsgлутаминазой**

**[0386]** В некоторых вариантах осуществления белки (например, антитела) могут быть модифицированы в соответствии с известными способами с получением белков, модифицированных глутаминилом. Методы конъюгации антител и соединений первичных аминов известны в данной области. В настоящем документе использованы методы сайт-специфической конъюгации для непосредственной конъюгации с глутамином с использованием конъюгации с глутамином через транsgлутаминазу (*см., например, Schibli, Angew Chemie Inter Ed. 2010, 49, 9995*).

**[0387]** Содержащие первичный амин соединения (например, линкеры L1) по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с одним или несколькими остатками глутаминилового агента (например, белка, например, антитела) посредством химико-ферментативной конъюгации на основе транsgлутаминазы (*см., например, Dennler et al., Protein Conjugate Chem. 2014, 25, 569-578, и WO 2017/147542*). Например, в присутствии транsgлутаминазы один или несколько остатков глутаминилового агента могут быть связаны с линкерным соединением первичного амина. Вкратце, в

некоторых вариантах осуществления связывающий агент, имеющий остаток глутамина (*например*, gln295, т.е. остаток Q295), обрабатывают первичным амин-содержащим линкером L1, описанным выше, в присутствии фермента трансглутаминазы. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент является агликозилированным. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент является дегликозилированным.

**[0388]** В некоторых вариантах осуществления связывающий агент (*например*, белок, *например*, антитело) содержит по меньшей мере один остаток глутамина по меньшей мере в одной последовательности полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент содержит два полипептида тяжелой цепи, каждый из которых содержит один остаток gln295. В дополнительных вариантах осуществления связывающий агент содержит один или несколько остатков глутамина в сайте, отличном от 295 тяжелой цепи.

**[0389]** В некоторых вариантах осуществления связывающий агент, такой как антитело, может быть получен путем сайт-направленного мутагенеза для вставки остатка глутамина в сайт без нарушения функции антитела или его связывания. *Например*, в настоящем документе включены антитела, несущие мутацию(и) Asn297Gln (N297Q), как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитело, имеющее остаток gln295 и/или мутацию N297Q, содержит один или несколько дополнительных естественным образом присутствующих остатков глутамина в своих вариабельных областях, которые могут быть доступны для трансглутаминазы и, следовательно, способны к конъюгации с линкером или конструкцией линкер-полезная нагрузка. Иллюстративный естественным образом присутствующий остаток глутамина может быть обнаружен, *например*, в Q55 легкой цепи. В таких случаях связывающий агент, *например*, антитело, конъюгированное посредством трансглутаминазы, может иметь более высокое значение LAR, чем ожидалось (*например*, LAR выше 4). Любые такие антитела могут быть выделены из природных или искусственных источников.

**[0390]** В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соотношение линкер-антитело или LAR составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 молекул линкера L1 на антитело. В некоторых вариантах осуществления LAR составляет от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления LAR составляет от 1 до 6. В некоторых вариантах осуществления LAR составляет от 2 до 4. В некоторых случаях LAR составляет от 2 до 3. В некоторых случаях LAR составляет от 0,5 до 3,5. В некоторых вариантах осуществления LAR составляет около 1 или около 1,5, или около 2, или около 2,5, или

около 3, или около 3,5. В некоторых вариантах осуществления LAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления LAR равно 4.

### **Стадия 2: Реакция конъюгации с полезной нагрузкой**

**[0391]** В некоторых вариантах осуществления линкера L1 в соответствии с настоящим изобретением содержат разветвленную единицу В, которая содержит по меньшей мере одну реакционноспособную группу В', способную к дальнейшей реакции после трансклутаминирования. В этих вариантах осуществления глутаминил-модифицированный белок (например, антитело) способен вступать в дальнейшую реакцию с реакционноспособным соединением полезной нагрузки или реакционноспособным соединением линкер-полезная нагрузка (например, L2-P, как раскрыто в настоящем документе) с образованием конъюгата белок-полезная нагрузка. Более конкретно, реакционноспособное соединение линкер-полезная нагрузка L2-P может содержать реакционноспособную группу В'', которая способна вступать в реакцию с реакционноспособной группой В' линкера L1. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа В' в соответствии с настоящим изобретением содержит фрагмент, способный подвергаться реакции 1,3-циклоприсоединения. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа В' представляет собой азид. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа В'' содержит алкин (например, концевой алкин или алкин с внутренним напряжением). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения реакционноспособная группа В' совместима со связывающим агентом и условиями реакции трансклутаминирования.

**[0392]** В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы линкера L1 содержат разветвленную единицу В, которая содержит одну реакционноспособную группу В'. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы линкера L1 содержат разветвленную единицу В, которая содержит более одной реакционноспособной группы В'.

**[0393]** В некоторых вариантах осуществления реакционноспособное соединение линкер-полезная нагрузка L2-P содержит одну молекулу полезной нагрузки ( $n = 1$ ). В некоторых других вариантах осуществления реакционноспособное соединение линкер-полезная нагрузка L2-P содержит две или более молекул полезной нагрузки ( $n \geq 2$ ). В некоторых вариантах осуществления реакционноспособное соединение линкер-полезная нагрузка L2-P содержит от 1 до 12 молекул полезной нагрузки, или от 1 до 10 молекул полезной нагрузки, или от 1 до 8 молекул полезной нагрузки, или от 1 до 6

молекул полезной нагрузки, или от 1 до 4 молекул полезной нагрузки, или от 1 до 2 молекул полезной нагрузки.

**[0394]** В некоторых вариантах осуществления реакционноспособное соединение линкер-полезная нагрузка L2-P содержит одну молекулу полезной нагрузки. Когда такое соединение L2-P вступает в реакцию с BA-L1-B, значение DAR будет примерно равно значению LAR BA-L1-B. Например, если соединение L2-P, содержащее одну молекулу полезной нагрузки, вступает в реакцию с BA-L1-B со значением LAR, равным 4 (например, посредством трансклутаминирования Q295 и N297Q), то полученный в результате конъюгат белок-лекарственное средство будет иметь значение DAR, равное 4.

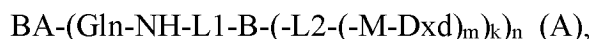
**[0395]** В некоторых вариантах осуществления реакционноспособное соединение линкер-полезная нагрузка L2-P содержит 2 молекулы полезной нагрузки. Когда такое соединение L2-P вступает в реакцию с BA-L1-B, значение DAR будет примерно в 2 раза больше значения LAR BA-L1-B. Например, если соединение L2-P, содержащее 2 молекулы полезной нагрузки, вступает в реакцию с BA-L1-B со значением LAR, равным 4 (например, посредством трансклутаминирования Q295 и N297Q), полученный в результате конъюгат белок-лекарственное средство будет иметь значение DAR, равное 8.

**[0396]** Например, если соединение L2-P, содержащее 3 молекулы полезной нагрузки, вступает в реакцию с BA-L1-B со значением LAR, равным 8 (например, посредством трансклутаминирования Q295 и N297Q разветвленной единицы L1-B, содержащей 2 группы В), полученный в результате конъюгат белок-лекарственное средство будет иметь значение DAR, равное 24.

**[0397]** В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение лекарственное средство-антитело или DAR (например, сокращенно обозначенное строчной буквой n) составляет от около 1 до около 30 или от около 1 до около 24, или от около 1 до около 20, или от около 1 до около 16, или от около 1 до около 12, или от около 1 до около 10, или от около 1 до около 8, или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 молекул полезной нагрузки на антитело. В некоторых вариантах осуществления значение DAR составляет от 1 до 30. В некоторых вариантах осуществления значение DAR составляет от 1 до 24. В некоторых вариантах осуществления значение DAR составляет от 1 до 16. В некоторых вариантах осуществления значение DAR составляет от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления значение DAR составляет от 1 до 6. В некоторых вариантах осуществления значение DAR составляет от 2 до 4. В некоторых случаях значение

DAR составляет от 2 до 3. В некоторых случаях значение DAR составляет от 0,5 до 3,5. В некоторых случаях значение DAR составляет от 10 до 14. В некоторых случаях значение DAR составляет от 14 до 18. В некоторых случаях значение DAR составляет от 20 до 24,5. В некоторых вариантах осуществления значение DAR составляет около 1 или около 1,5, или около 2, или около 2,5, или около 3, или около 3,5. В некоторых вариантах осуществления значение DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления значение DAR равно 4. В некоторых вариантах осуществления значение DAR равно 8. В некоторых вариантах осуществления значение DAR равно 12. В некоторых вариантах осуществления значение DAR равно 16. В некоторых вариантах осуществления значение DAR равно 24.

**[0398]** В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения, имеющего структуру в соответствии с формулой (A):



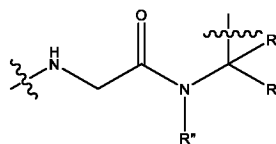
где BA представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

Gln представляет собой остаток глутамина;

L1 представляет собой первый линкер;

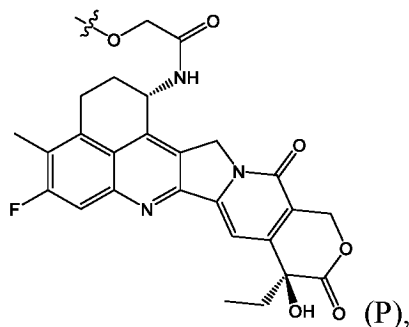
B представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере один аддукт группы B' и группы B'';

L2 представляет собой второй линкер, ковалентно присоединенный к разветвленной единице B через по меньшей мере одну группу B'';



M отсутствует или представляет собой  $\text{C}_1\text{-C}_4$  алкил, где R, R' и R'' в каждом случае независимо представляют собой водород или  $\text{C}_1\text{-C}_4$  алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо;

Dxd представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):



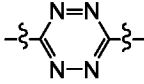
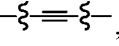
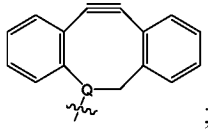
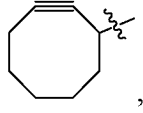
k и m независимо представляют собой целое число от 1 до 12, а n представляет собой целое число от 1 до 30,

где:

способ включает следующие стадии:

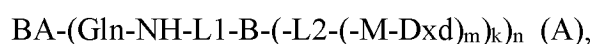
a) приведение в контакт, в присутствии транsgлyтаминазы, ВА, содержащего по меньшей мере один остаток глyтамина Gln (ВА-Gln-NH<sub>2</sub>), с соединением L1-B, где разветвленная единица В содержит по меньшей мере одну группу В',

b) приведение в контакт продукта, полученного на стадии a), с k или более эквивалентами соединения L2-(-M-Dxd)<sub>m</sub>, где линкер L2 содержит по меньшей мере одну группу В'',

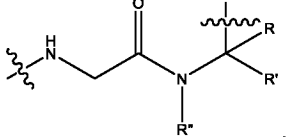
где одна из групп В' и В'' выбрана из -N<sub>3</sub> и ; а другая из групп В' и В'' выбрана из , ; и , где Q представляет собой С или N; и

c) выделение полученного соединения формулы (I).

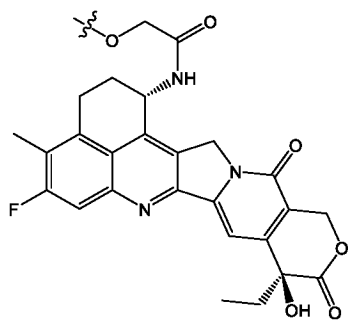
[0399] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения, имеющего структуру в соответствии с формулой (A):



где ВА представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; Gln представляет собой остаток глyтамина; L1 представляет собой первый линкер, как описано выше; В представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере один аддукт группы В' и группы В'', как описано выше; L2 представляет собой второй линкер, как описано выше, ковалентно присоединенный к разветвленной единице В через по меньшей мере одну группу В'', как описано выше; М отсутствует

или представляет собой , где R, R' и R'' являются такими, как описано выше; Dxd представляет собой противоопухолевый агент, содержащий структуру в соответствии с формулой (P):

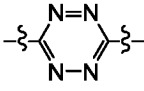


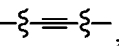
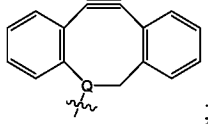
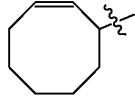


(P),  $k$  и  $m$  независимо представляют собой целое число от 1 до 12, а  $n$  представляет собой целое число от 1 до 30, где:

способ включает следующие стадии:

a) приведение в контакт соединения L1-B, где разветвленная единица B содержит по меньшей мере одну группу B', с  $k$  или более эквивалентами соединения L2-(-M-Dxd)<sub>m</sub>, где линкер L2 содержит по меньшей мере одну группу B'', способную ковалентно связываться с группой B',

где одна из групп B' и B'' выбрана из -N<sub>3</sub> и ; а другая из групп B' и B''

выбрана из , ; и ,

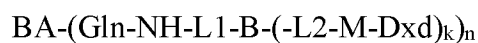
где Q представляет собой C или N;

с получением таким образом L1-B-(-L2-(-M-Dxd)<sub>m</sub>)<sub>k</sub>;

b) приведение в контакт в присутствии трансглутаминазы BA, содержащего по меньшей мере один остаток глутамина Gln (BA-Gln-NH<sub>2</sub>), с продуктом L1-B-(-L2-(-M-Dxd)<sub>m</sub>)<sub>k</sub>, полученным на стадии a), и

c) выделение полученного соединения формулы (I).

[0400] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения, имеющего структуру в соответствии с формулой (I):



(I),

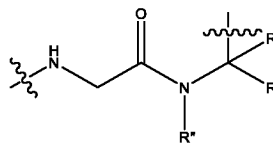
где BA представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

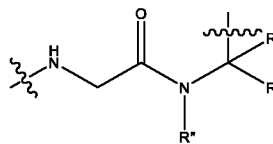
Gln представляет собой остаток глутамина;

L1 представляет собой первый линкер;

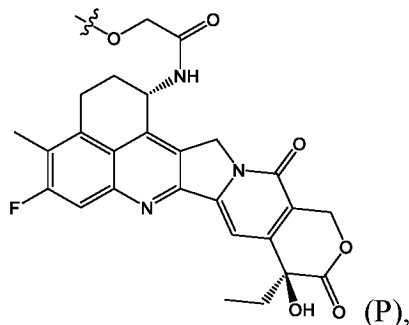
B представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере один аддукт группы B' и группы B'';

L2 представляет собой второй линкер, ковалентно присоединенный к разветвленной единице B через по меньшей мере одну группу B'';



M отсутствует или представляет собой , где R, R' и R'' в каждом случае независимо представляют собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо;

Dxd представляет собой противоопухолевый агент, содержащий структуру в соответствии с формулой (P):

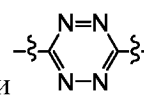


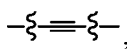
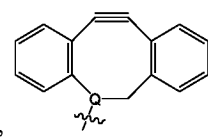
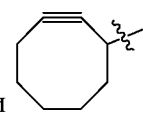
k представляет собой целое число от 1 до 12, а n представляет собой целое число от 1 до 30, где:

способ включает следующие стадии:

a) приведение в контакт, в присутствии трансглутаминазы, ВА, содержащего по меньшей мере один остаток глутамина Gln (ВА-Gln-NH<sub>2</sub>), с соединением L1-B, где разветвленная единица В содержит по меньшей мере одну группу В',

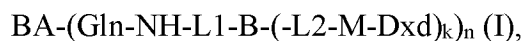
b) приведение в контакт продукта, полученного на стадии a), с k или более эквивалентами соединения L2-M-Dxd, где линкер L2 содержит по меньшей мере одну группу В'', способную ковалентно присоединяться к группе В',

где одна из групп В' и В'' выбрана из -N<sub>3</sub> и ; а другая из групп В' и В''

выбрана из , ; и , где Q представляет собой С или N; и

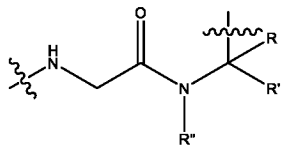
c) выделение полученного соединения формулы (I).

[0401] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения, имеющего структуру в соответствии с формулой (I):

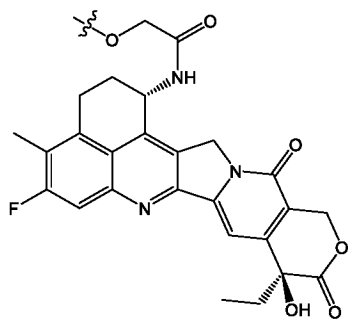


где ВА представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; Gln представляет собой остаток глутамина; L1 представляет собой первый линкер, как

описано выше; В представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере один аддукт группы В' и группы В'', как описано выше; L2 представляет собой второй линкер, как описано выше, ковалентно присоединенный к разветвленной единице В через по меньшей мере одну группу В'', как описано выше; М отсутствует



или представляет собой  $\text{---}\xi\text{---}$ , где R, R' и R'' являются такими, как описано выше; Dxd представляет собой противоопухолевый агент, содержащий структуру в соответствии с формулой (P):



(P), k представляет собой целое число от 1 до 12, а n представляет собой целое число от 1 до 30, где:

способ включает следующие стадии:

a) приведение в контакт соединения L1-B, в котором разветвленная единица В содержит по меньшей мере одну группу В', с k или более эквивалентами соединения L2-M-Dxd, где линкер L2 содержит по меньшей мере одну группу В'', с получением таким образом L1-B-(-L2-M-Dxd)<sub>k</sub>, где одна из групп В' и В'' выбрана из -N<sub>3</sub> и



где Q представляет собой С или N;

b) приведение в контакт, в присутствии трансклутаминазы, связывающего агента ВА, содержащего по меньшей мере один остаток глутамина Gln (ВА-Gln-NH<sub>2</sub>), с продуктом L1-B-(-L2-M-Dxd)<sub>k</sub>, полученным на стадии a), и

c) выделение полученного соединения формулы (I).

[0402] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения, имеющего структуру в соответствии с формулой (III):



где ВА представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; Gln представляет собой остаток глутамина; L2'-P представляет собой H<sub>2</sub>N-SP1-B2-(-

SP2-AA-SP3-M-Dxd)р, как описано выше, и n представляет собой целое число от 1 до 30;

SP1 отсутствует или представляет собой первую спейсерную единицу,

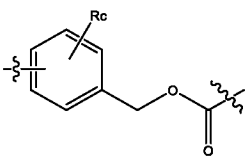
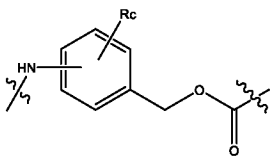
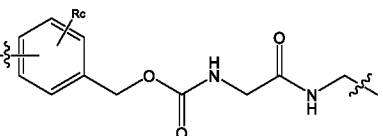
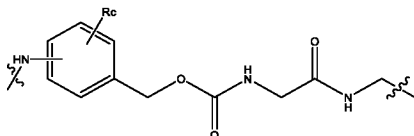
выбранную из группы, состоящей из  и  ;

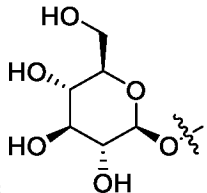
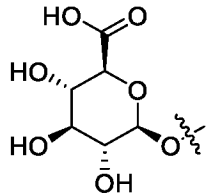
B2 отсутствует или представляет собой разветвленную единицу;

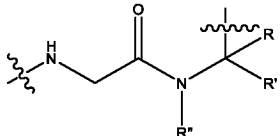
SP2 отсутствует или представляет собой вторую спейсерную единицу, выбранную из группы, состоящей из C<sub>1-6</sub> алкила, -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-, -NH-, -C(O)-, -NH-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>v</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-NH-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-NH-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-C(O)-NH-, или их комбинаций; где индексы u и v независимо представляют собой целое число от 1 до 8;

AA отсутствует или представляет собой пептидную единицу, содержащую от 2 до 4 аминокислот;

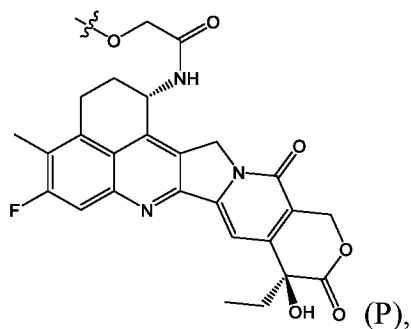
SP3 отсутствует или представляет собой третью спейсерную единицу,

выбранную из группы, состоящей из , , , , где R<sub>c</sub> независимо в каждом случае отсутствует или представляет собой группу, выбранную

из  и  ;

M отсутствует или представляет собой , где R, R' и R'' в каждом случае независимо представляют собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо; и

Dxd представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):



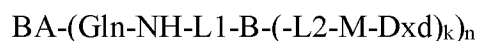
p представляет собой целое число от 1 до 30;

где способ включает следующие стадии:

b) приведение в контакт, в присутствии трансклутаминазы, ВА, содержащего по меньшей мере один остаток глутамина Gln (ВА-Gln-NH<sub>2</sub>), с L2'-P, и

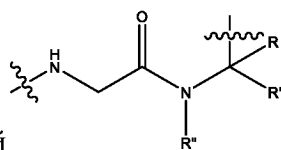
c) выделение полученного соединения формулы (III).

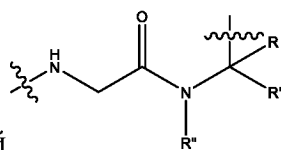
[0403] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения, имеющего структуру в соответствии с формулой (I):

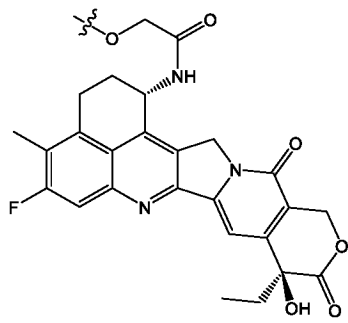


(I),

где ВА представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; Gln представляет собой остаток глутамина; L1 представляет собой первый линкер, как описано выше; В представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере одну группу В', как описано выше; L2 представляет собой второй линкер, как описано выше, ковалентно присоединенный к разветвленной единице В через по меньшей мере одну группу В'', как описано выше, где группа В' и группа В'' образуют по меньшей мере один аддукт, как описано выше; М отсутствует или



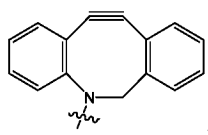
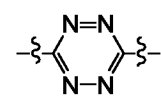
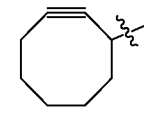
представляет собой , где R, R' и R'' являются такими, как описано выше; Dxd представляет собой противоопухолевый агент, содержащий структуру в соответствии с формулой (P):



(P),  $k$  представляет собой целое число от 1 до 12, а  $n$  представляет собой целое число от 1 до 30, где:

способ включает следующие стадии:

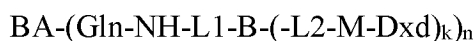
a) приведение в контакт, в присутствии трансклутаминазы, связывающего агента ВА, содержащего по меньшей мере один остаток глутамина Gln (ВА-Gln-NH<sub>2</sub>), с соединением L1-B, где разветвленная единица В содержит по меньшей мере одну

группу В', выбранную из -N<sub>3</sub>,  $-\xi \equiv \xi-$ , , , , с получением таким образом ВА-Gln-NH-L1-B;

b) приведение в контакт продукта, полученного на стадии a), с  $k$  или более эквивалентами соединения L2-M-Dxd, где линкер L2 содержит по меньшей мере одну группу В'', способную ковалентно связываться с группой В', и

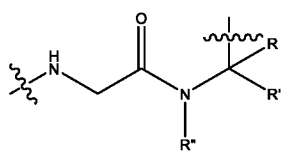
c) выделение полученного соединения формулы (I).

[0404] В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения соединения, имеющего структуру в соответствии с формулой (I):



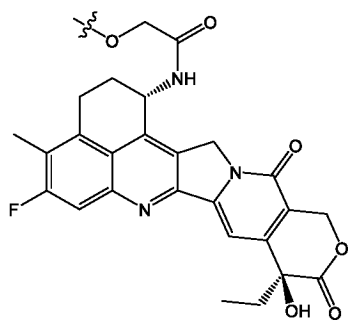
(I),

где ВА представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент; Gln представляет собой остаток глутамина; L1 представляет собой первый линкер, как описано выше; В представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере одну группу В', как описано выше; L2 представляет собой второй линкер, как описано выше, ковалентно присоединенный к разветвленной единице В через по меньшей мере одну группу В'', как описано выше, где группа В' и группа В'' образуют по меньшей мере один аддукт, как описано выше; М отсутствует или



представляет собой , где R, R' и R'' являются такими, как описано

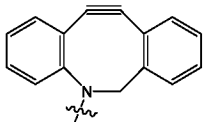
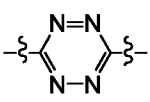
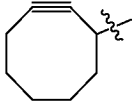
выше; Dxd представляет собой противоопухолевый агент, содержащий структуру в соответствии с формулой (P):



(P), k представляет собой целое число от 1 до 12, а n представляет собой целое число от 1 до 30, где:

способ включает следующие стадии:

a) приведение в контакт соединения L1-B, где разветвленная единица B

содержит по меньшей мере одну группу B', выбранную из  $-N_3$ ,  $-\xi \equiv \xi-$ , , , , с k или более эквивалентами соединения L2-M-Dxd, где линкер L2 содержит по меньшей мере одну группу B'', способную ковалентно связываться с группой B', образуя таким образом L1-B-(-L2-M-Dxd)<sub>k</sub>;

b) приведение в контакт, в присутствии трансклутаминазы, связывающего агента BA, содержащего по меньшей мере один остаток глутамина Gln (BA-Gln-NH<sub>2</sub>), с продуктом L1-B-(-L2-M-Dxd)<sub>k</sub>, полученным на стадии a), и

c) выделение полученного соединения формулы (I).

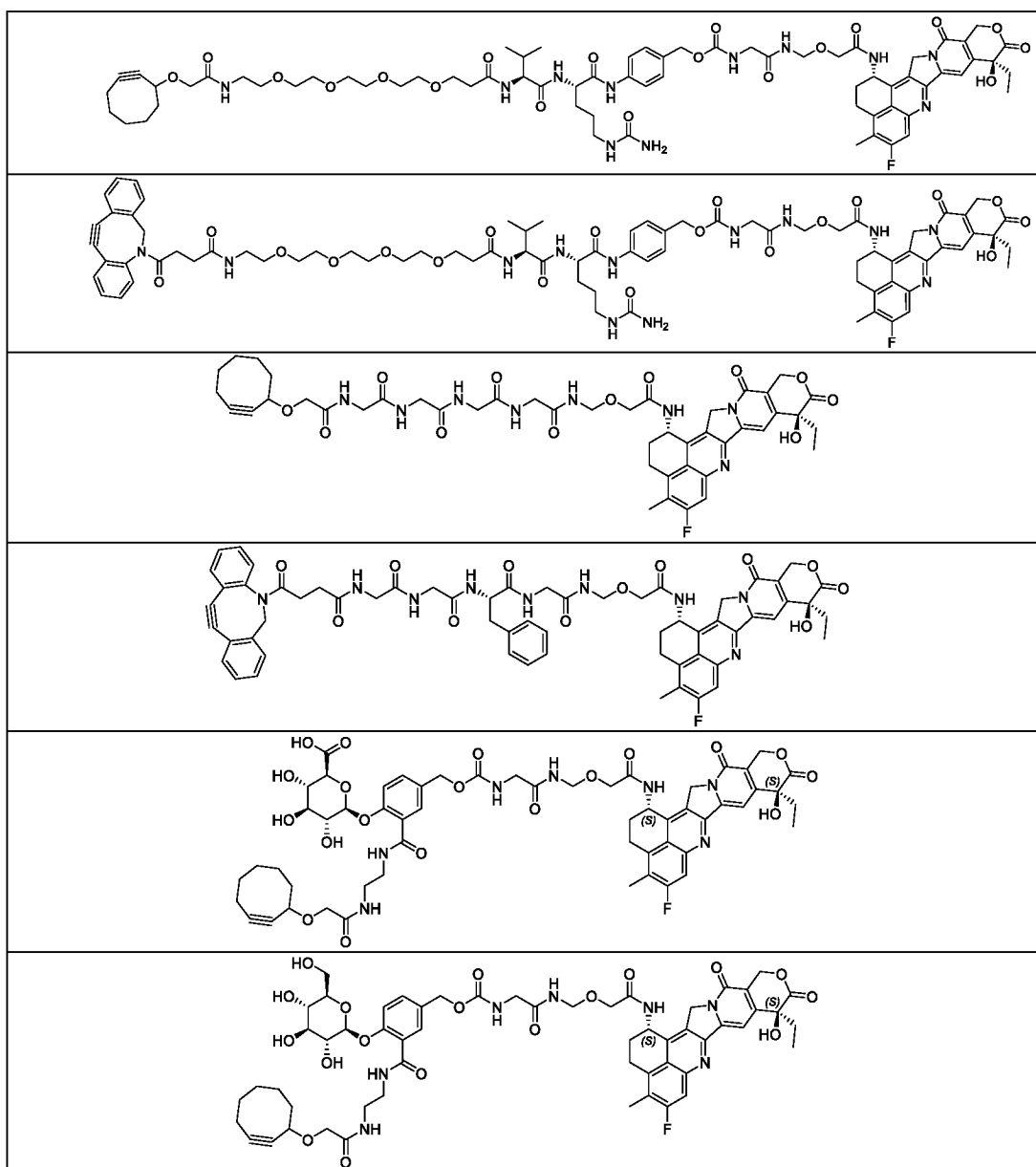
**[0405]** В одном варианте осуществления остаток глутамина Gln естественным образом присутствует в домене CH<sub>2</sub> или CH<sub>3</sub> BA. В другом варианте осуществления остаток глутамина Gln вводят в BA путем модификации одной или нескольких аминокислот. В одном варианте осуществления Gln представляет собой Q295 или N297Q.

**[0406]** В одном варианте осуществления трансклутаминаза представляет собой микробную трансклутаминазу (MTG). В одном варианте осуществления трансклутаминаза представляет собой бактериальную трансклутаминазу (BTG).

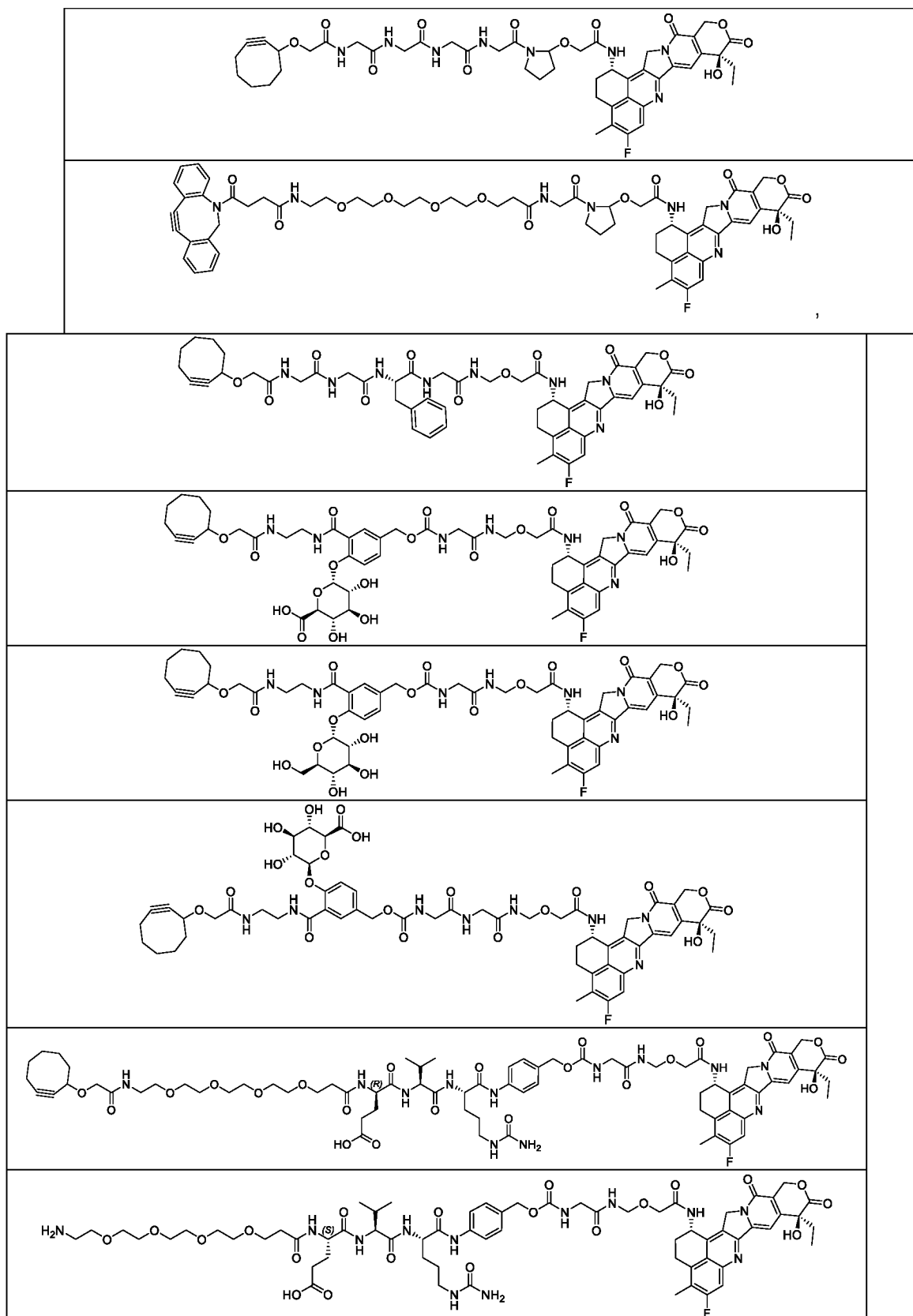
**[0407]** В одном варианте осуществления M отсутствует. В другом варианте осуществления M-Dxd имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из

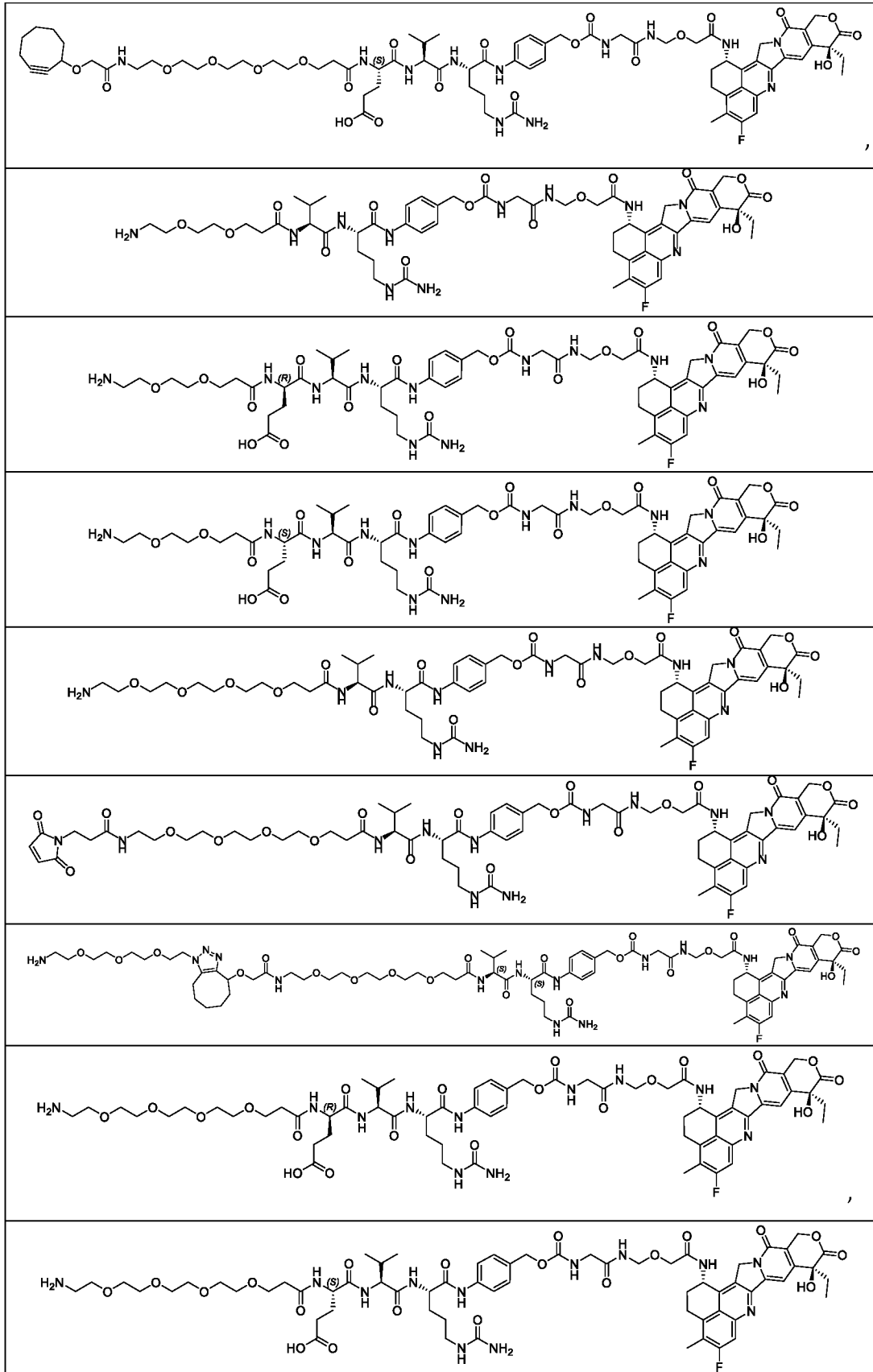


**[0408]** В одном варианте осуществления соединение L2-Dxd имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из:





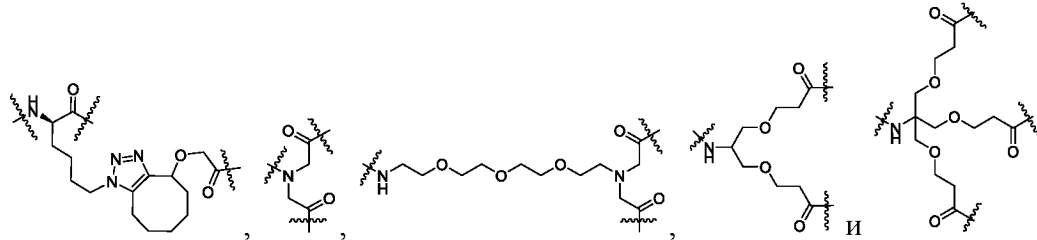




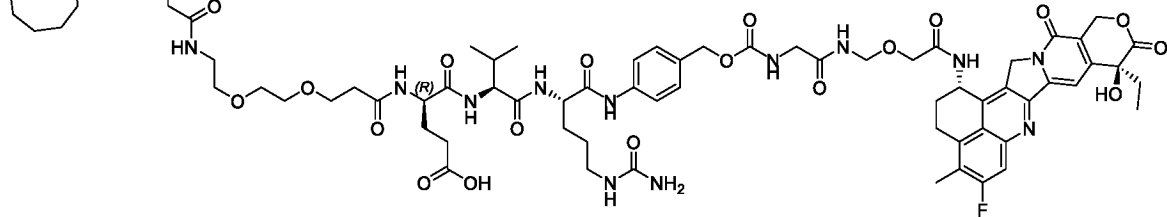
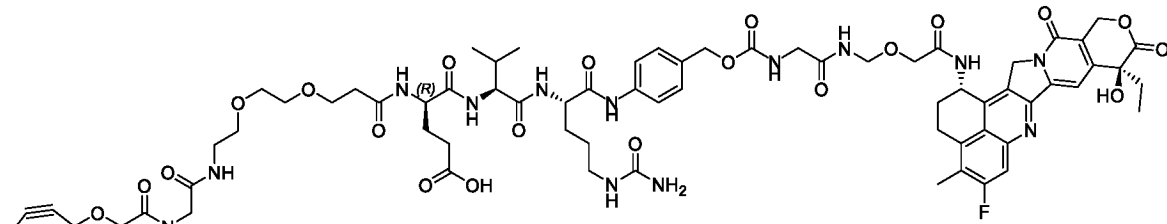
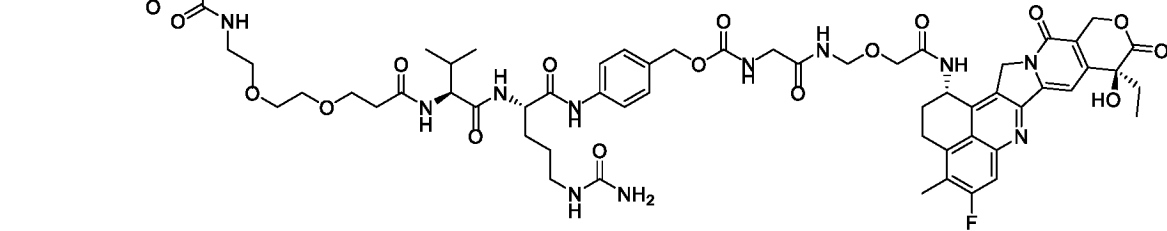
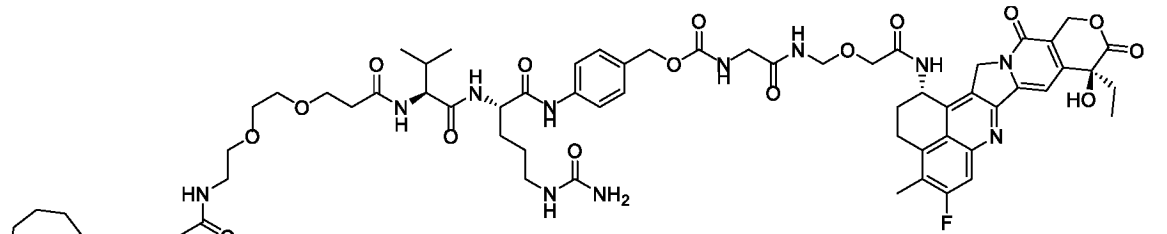
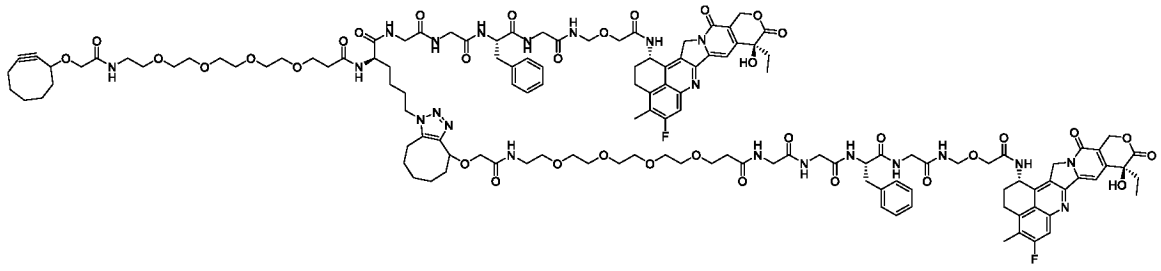
или его фармацевтически приемлемая соль.

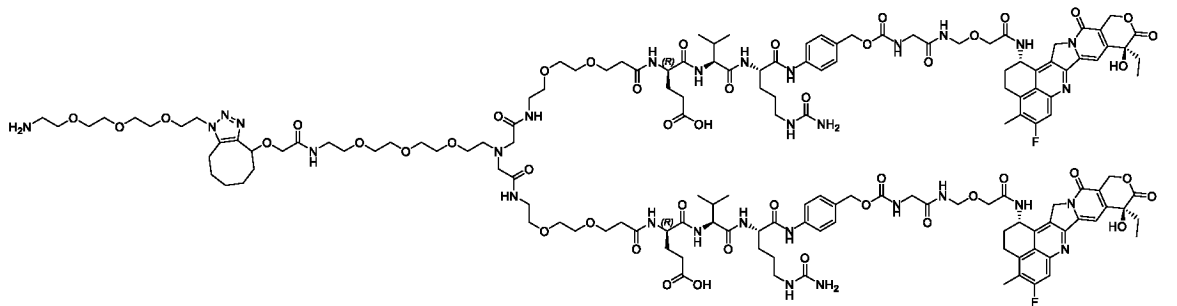
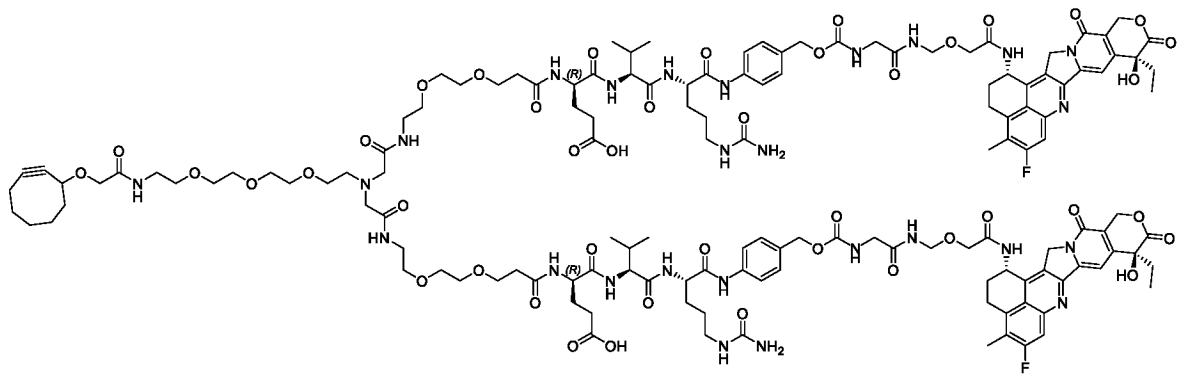
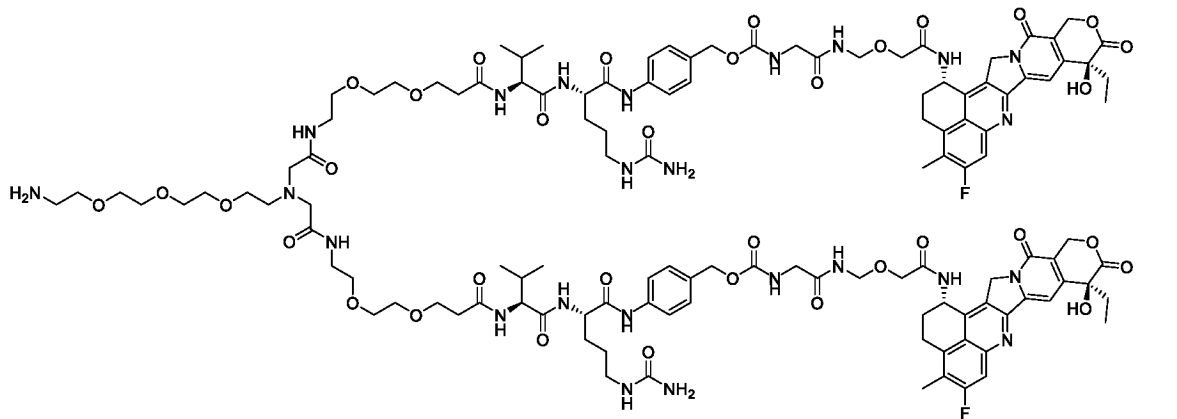
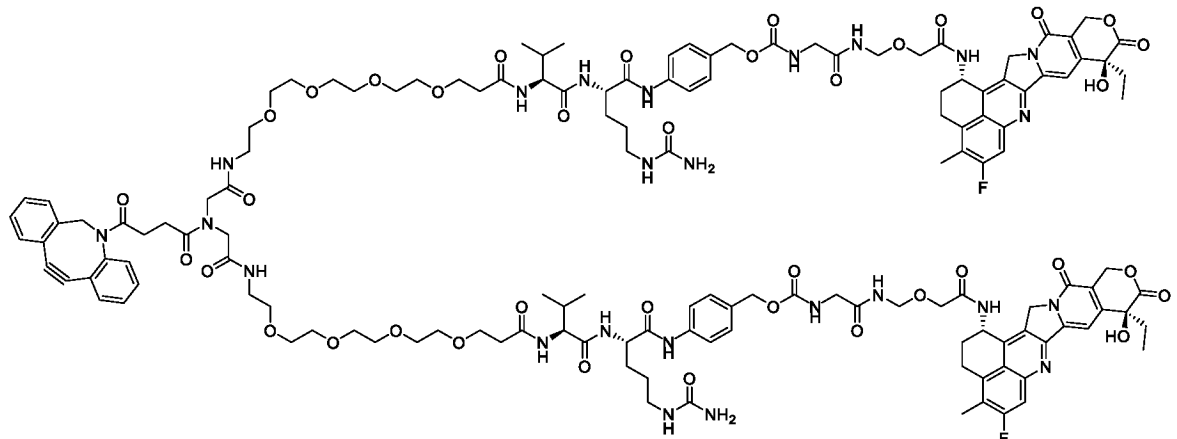
**[0409]** В одном варианте осуществления соединение L2-Dxd включает необязательную разветвленную единицу B2. В таких вариантах осуществления соединение L2-Dxd содержит 2 или более единиц Dxd.

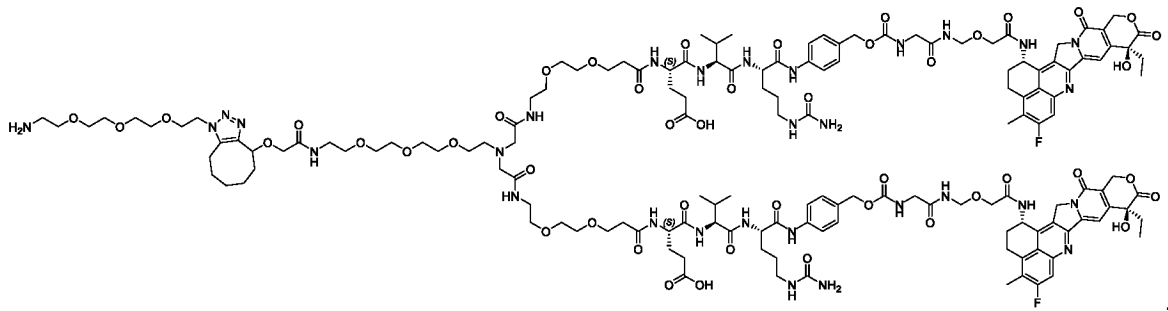
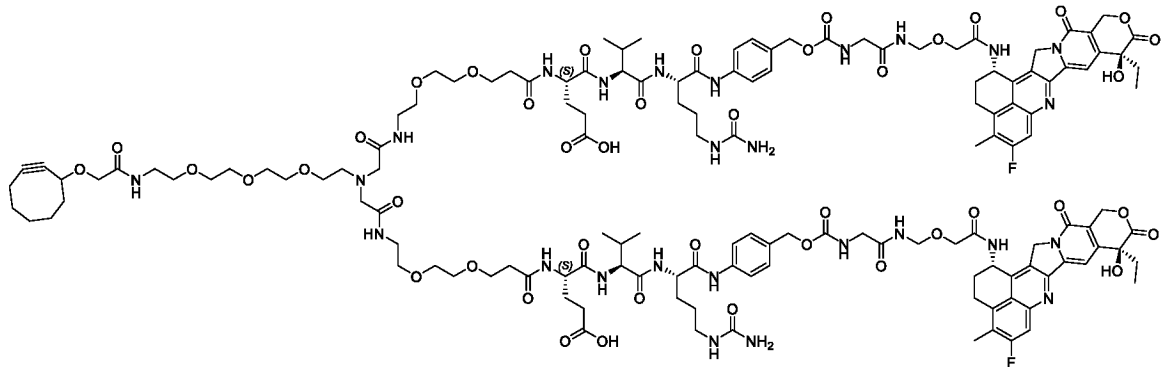
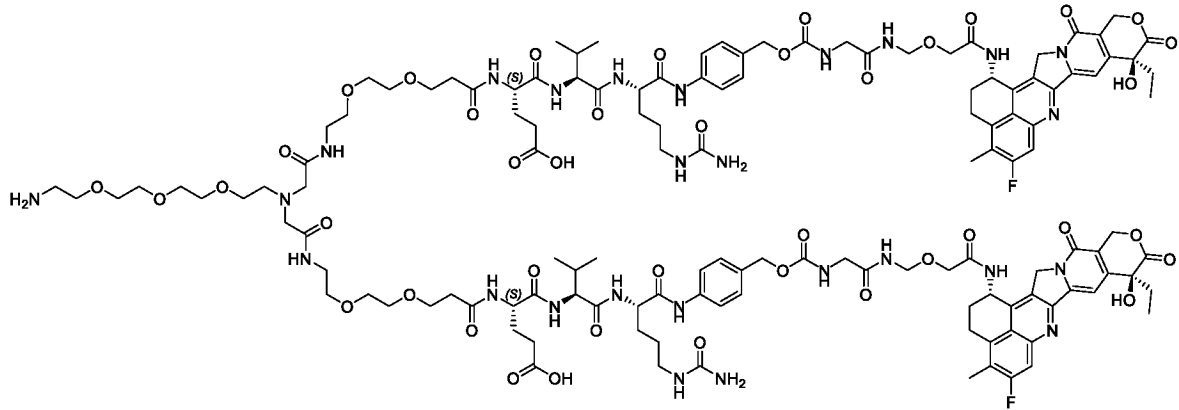
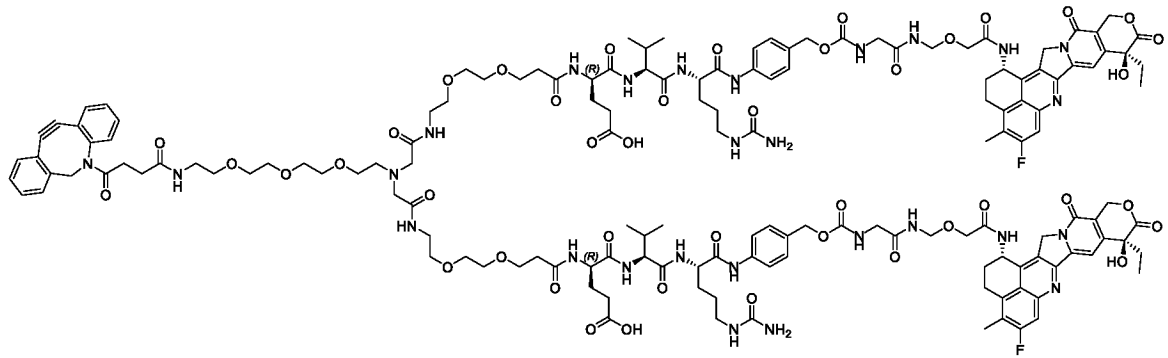
**[0410]** В одном варианте осуществления разветвленная единица B2 имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из:

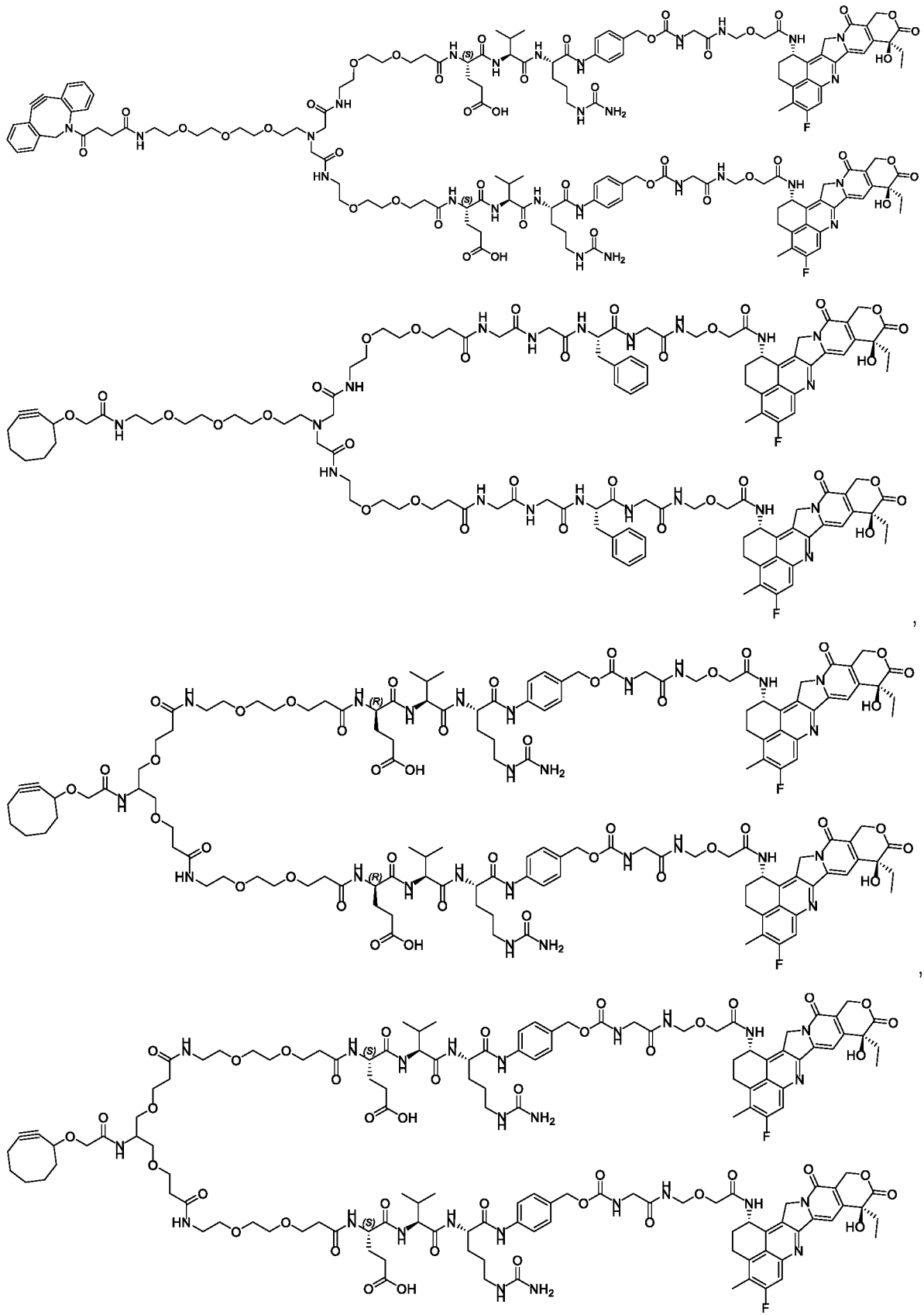


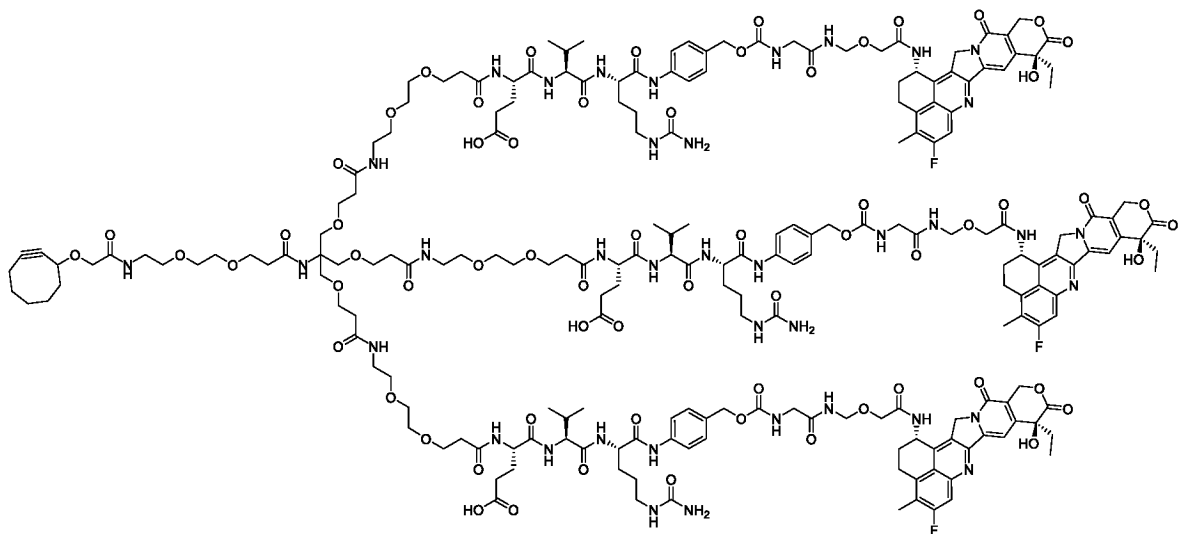
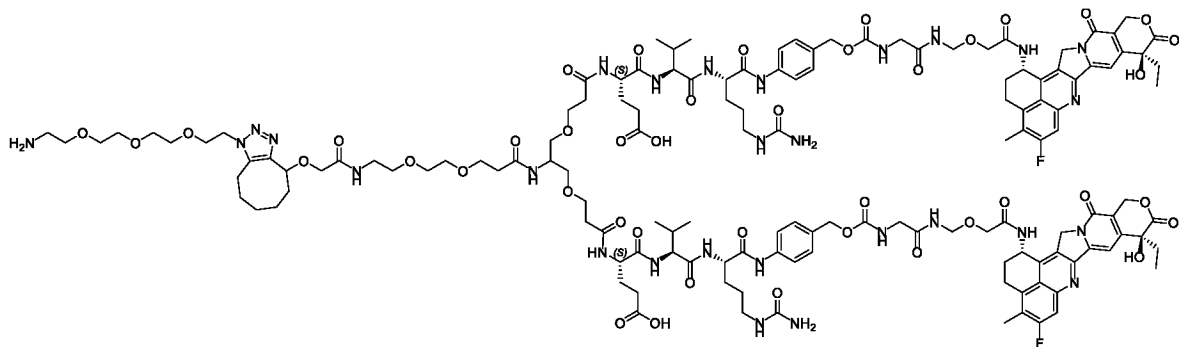
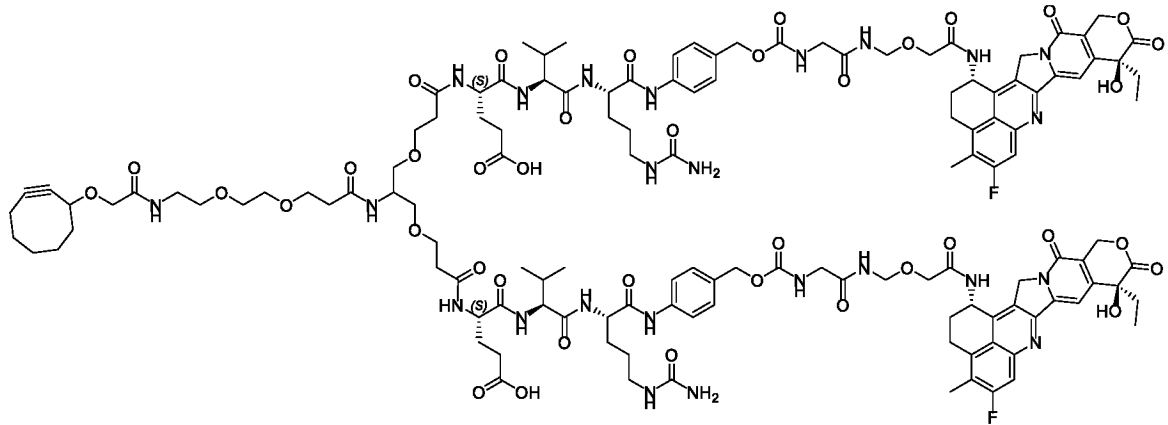
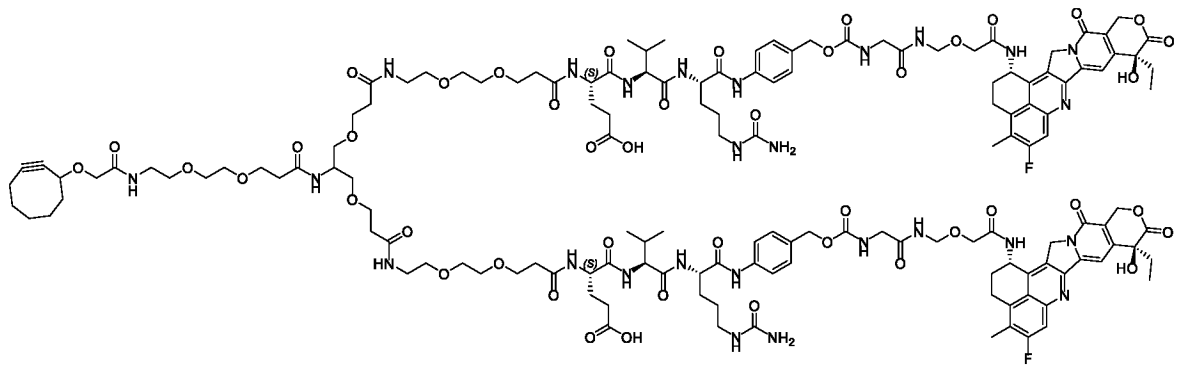
**[0411]** В одном варианте осуществления соединение L2-Dxd имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из:



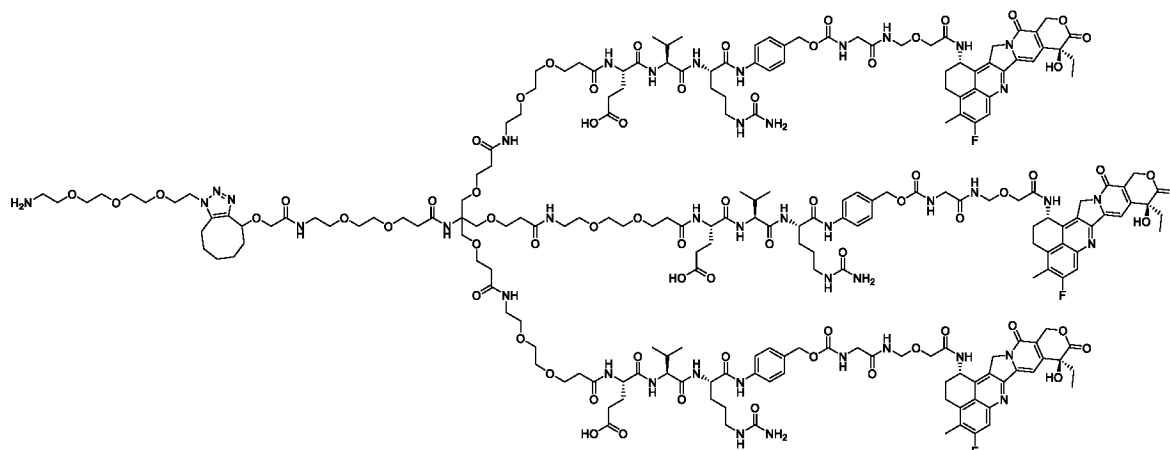












или его фармацевтически приемлемая соль.

### Терапевтический состав и введение

[0412] Настоящее изобретение обеспечивает фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты белок-лекарственное средство по настоящему изобретению.

[0413] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает композиции, содержащие совокупность конъюгатов белок-лекарственное средство в соответствии с настоящим изобретением, имеющих соотношение лекарственное средство-антитело (DAR) от около 0,5 до около 30,0.

[0414] В одном варианте осуществления композиция имеет значение DAR от около 1,0 до около 2,5.

[0415] В одном варианте осуществления композиция имеет значение DAR около 2.

[0416] В одном варианте осуществления композиция имеет значение DAR от около 3,0 до около 4,5.

[0417] В одном варианте осуществления композиция имеет значение DAR около 4.

[0418] В одном варианте осуществления композиция имеет значение DAR от около 6,5 до около 8,5.

[0419] В одном варианте осуществления композиция имеет значение DAR около 8.

[0420] В одном варианте осуществления композиция имеет значение DAR от около 10 до около 14.

[0421] В одном варианте осуществления композиция имеет значение DAR около 12.

[0422] В одном варианте осуществления композиция имеет значение DAR от около 14 до около 18.

[0423] В одном варианте осуществления композиция имеет значение DAR около 16.

[0424] В одном варианте осуществления композиция имеет значение DAR от около 20 до около 24,5.

**[0425]** В одном варианте осуществления композиция имеет значение DAR около 24.

**[0426]** Композиции в соответствии с настоящим изобретением составляют с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими агентами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.п. Множество подходящих составов можно найти в формуляре, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии типа масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии на основе карбовакса (полиэтиленгликоли с разной молекулярной массой), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

**[0427]** Доза конъюгата белок-лекарственное средство, вводимая пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, состояния, пути введения и т.п. Подходящая доза обычно рассчитывается в зависимости от массы тела или площади поверхности тела. Когда конъюгат белок-лекарственное средство по настоящему изобретению применяют в терапевтических целях у взрослого пациента, может быть выгодным внутривенное введение конъюгата белок-лекарственное средство по настоящему изобретению, как правило, в однократной дозе от около 0,01 до около 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от около 0,02 до около 7, от около 0,03 до около 5 или от около 0,05 до около 3 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния частота и длительность лечения могут быть скорректированы. Эффективные дозы и схемы введения конъюгата белок-лекарственное средство могут быть определены опытным путем; например, прогресс пациента можно контролировать путем периодической оценки, и дозу корректировать соответствующим образом. Кроме того, межвидовое масштабирование доз может быть выполнено с использованием хорошо известных в данной области способов (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

**[0428]** Известны различные системы доставки, которые могут быть применены для введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению, например, инкапсулирования в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецепторами эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы

введения включают, но без ограничения, внутрикожные, внутримышечные, внутрибрюшинные, внутривенные, подкожные, интраназальные, эпидуральные и пероральные пути введения. Композицию можно вводить любым удобным путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизистые выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, ректальную и кишечную слизистую оболочку и т.п.), и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или локальным.

**[0429]** Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в отношении подкожной доставки, шприц-ручку можно легко применять для доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Такая шприц-ручка может быть многоразовой или одноразовой. Многоразовая шприц-ручка обычно использует сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После введения всей содержащейся в картридже фармацевтической композиции, и после того, как картридж становится пустым, его можно легко выбросить и заменить новым картриджем, содержащим фармацевтическую композицию. После этого шприц-ручку можно повторно использовать. В одноразовой шприц-ручке нет сменного картриджа. То есть одноразовая шприц-ручка приходит предварительно заполненной фармацевтической композицией, удерживаемой в резервуаре внутри устройства. Как только резервуар опустеет от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывается.

**[0430]** Многочисленные повторно используемые шприц-ручки и шприц-тюбики находят применение для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Примеры включают, но без ограничения, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Germany), и это лишь некоторые из них. Примеры одноразовых шприц-ручек, которые применяются для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, но без

ограничения, шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), шприц-тюбик SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRATM (Abbott Labs, Abbott Park IL), и это лишь некоторые из них.

**[0431]** В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления можно использовать насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В еще одном варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может быть расположена вблизи мишени композиции, таким образом требуется лишь доля системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

**[0432]** Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных вливаний и т.д. Эти инъекционные препараты могут быть приготовлены общеизвестными способами. Например, инъекционные препараты могут быть приготовлены, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно применяемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций существуют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные вещества и т.п., которые могут быть применены в комбинации с соответствующим солюбилизующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтилен (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.п. В качестве масляной среды применяют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.п., которые могут быть применены в комбинации с солюбилизующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.п. Приготовленную таким образом инъекцию предпочтительно помещают в подходящую ампулу.

**[0433]** Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в виде дозированных форм в

единичной дозе, подходящей для дозы активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в единичной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.п. Количество содержащегося вышеупомянутого антитела обычно составляет от около 5 до около 500 мг на лекарственную форму в единичной дозе; особенно в форме инъекции, предпочтительно, чтобы вышеуказанное антитело содержалось в количестве от около 5 до около 100 мг и от около 10 до около 250 мг для других дозированных форм.

**Терапевтическое применение конъюгатов белок-лекарственное средство, соединений линкер-полезные нагрузки и полезных нагрузок**

**[0434]** В другом аспекте конъюгаты белок-лекарственное средство, например, ADC, раскрытые в настоящем документе, можно применять, среди прочего, для лечения, предупреждения и/или ослабления заболевания, нарушения или патологического состояния у нуждающегося в таком лечении.

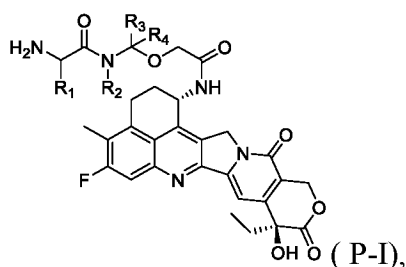
**[0435]** В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения патологического состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения (например, конъюгата антитело-лекарственное средство, соединения линкер-полезная нагрузка и/или полезной нагрузки) в соответствии с изобретением или композиции, содержащей любое соединение в соответствии с настоящим изобретением.

**[0436]** В одном варианте осуществления конъюгаты белок-лекарственное средство, например, ADC, раскрытые в настоящем документе, можно применять для лечения рака. В одном варианте осуществления конъюгаты белок-лекарственное средство, например, ADC, раскрытые в настоящем документе, можно применять для лечения рака, выбранного из группы, состоящей из рака молочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, рака легких, рака печени или рака головного мозга. В одном варианте осуществления конъюгаты белок-лекарственное средство, например, ADC, раскрытые в настоящем документе, можно применять для лечения HER2+ рака молочной железы. В одном варианте осуществления конъюгаты белок-лекарственное средство, например, ADC, раскрытые в настоящем документе, можно применять для лечения рака предстательной железы.

**[0437]** В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ селективной доставки соединения в клетку. В одном варианте осуществления способ селективной доставки соединения в клетку включает связывание соединения с целевым антителом. В одном варианте осуществления соединение представляет собой полезную нагрузку,

как описано выше. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку человека. В одном варианте осуществления клетка представляет собой раковую клетку. В одном варианте осуществления раковая клетка выбрана из группы, состоящей из клетки рака молочной железы, клетки рака яичника, клетки рака предстательной железы, клетки рака легкого, клетки рака печени или клетки рака головного мозга.

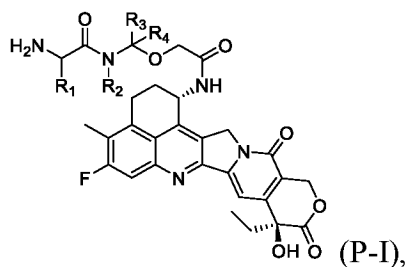
**[0438]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ селективной доставки в клетку соединения, имеющего структуру P-I:



где R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> и R<sub>3</sub>, и R<sub>4</sub> независимо представляют собой водород или алкил, например, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил, или C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил, или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, или где R<sub>2</sub> и R<sub>3</sub> вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо, или его фармацевтически приемлемую соль.

**[0439]** В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ селективного нацеливания соединения на антиген на поверхности клетки. В одном варианте осуществления способ селективного нацеливания соединения на антиген на поверхности клетки включает связывание соединения с целевым антителом. В одном варианте осуществления соединение представляет собой полезную нагрузку, как описано выше. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку человека. В одном варианте осуществления клетка представляет собой раковую клетку. В одном варианте осуществления раковая клетка выбрана из группы, состоящей из клетки рака молочной железы, клетки рака яичника, клетки рака предстательной железы, клетки рака легкого, клетки рака печени или клетки рака головного мозга.

**[0440]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ селективного нацеливания соединения на антиген на поверхности клетки, имеющего структуру P-I:



где  $R_1$ ,  $R_2$  и  $R_3$ , и  $R_4$  независимо представляют собой водород или алкил, например,  $C_1$ - $C_{12}$  алкил или  $C_1$ - $C_8$  алкил, или  $C_1$ - $C_6$  алкил, или  $C_1$ - $C_4$  алкил, или где  $R_2$  и  $R_3$  вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо, или его фармацевтически приемлемой соли.

### **Конъюгаты анти-HER2 антитело-лекарственное средство**

**[0441]** В некоторых вариантах осуществления конъюгаты белок-лекарственное средство, например, ADC, раскрытые в настоящем документе, можно применять, среди прочего, для лечения, предупреждения и/или ослабления любого заболевания или нарушения, связанного с экспрессией или активностью HER2, или опосредованного ими, или поддающегося лечению путем связывания HER2 без конкуренции с модифицированным LDL, или и/или стимулирования интернализации рецептора HER2, и/или уменьшения количества рецепторов клеточной поверхности.

**[0442]** Конъюгаты белок-лекарственное средство по настоящему изобретению (и содержащие их терапевтические композиции) можно применять, среди прочего, для лечения любого заболевания или нарушения, для которого были бы полезными стимуляция, активация и/или направленное воздействие на иммунный ответ. В частности, конъюгаты анти-HER2 белок-лекарственное средство, включая как моноспецифические анти-HER2 антитела, так и биспецифические анти-HER2/HER2 антитела по настоящему изобретению, можно применять для лечения, предупреждения и/или ослабления любого заболевания или нарушения, связанного или опосредованного экспрессией или активностью HER2, или пролиферацией клеток HER2+. Механизм действия, с помощью которого достигаются терапевтические способы по настоящему изобретению, включает уничтожение клеток, экспрессирующих HER2, в присутствии эффекторных клеток, например, с помощью CDC, апоптоза, ADCC, фагоцитоза или комбинации двух или более из этих механизмов. Клетки, экспрессирующие HER2, которые можно ингибировать или уничтожать с помощью конъюгатов белок-лекарственное средство по настоящему изобретению, включают, например, клетки опухоли молочной железы.

**[0443]** В одном варианте осуществления конъюгаты белок-лекарственное средство по настоящему изобретению (и содержащие их терапевтические композиции и содержащие их дозированные формы) содержат биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую:

первый антигенсвязывающий домен (D1); и

второй антигенсвязывающий домен (D2);

где D1 специфически связывается с первым эпитопом HER2 человека; и

где D2 специфически связывается со вторым эпитопом HER2 человека.

**[0444]** В одном варианте осуществления вышеизложенного D1 и D2 не конкурируют друг с другом за связывание с HER2 человека.

**[0445]** Конъюгаты белок-лекарственное средство по настоящему изобретению можно применять для лечения, например, первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в предстательной железе, мочевом пузыре, шейке матки, легких, толстой кишке, почках, молочной железе, поджелудочной железе, желудке, матке и/или яичнике. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты белок-лекарственное средство по настоящему изобретению применяют для лечения одного или нескольких из следующих видов рака: рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак легких, рак толстой кишки, рак почки, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак матки и рак яичников. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения анти-HER2 антитела или анти-HER2/HER2 биспецифические антитела можно применять для лечения пациента, пораженного клеткой рака молочной железы, которая является IHC2+ или более. В соответствии с другими связанными вариантами осуществления настоящего изобретения обеспечены способы, включающие введение анти-HER2 антитела или анти-HER2/HER2 антитела, как раскрыто в настоящем документе, пациенту, пораженному клеткой рака молочной железы, которая является IHC2+ или более. Аналитические/диагностические способы, известные в данной области, такие как сканирование опухоли и т.д., могут быть использованы для установления того, имеется ли у пациента кастрационно-резистентная опухоль.

**[0446]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также включает способы лечения остаточного рака у субъекта. Термин «остаточный рак» означает наличие или сохранение одной или нескольких раковых клеток у субъекта после противораковой терапии.



**[0447]** Конъюгаты белок-лекарственное средство по настоящему изобретению (и содержащие их терапевтические композиции) можно применять, среди прочего, для лечения любого заболевания или нарушения, для которого были бы полезными стимуляция, активация и/или направленное воздействие на иммунный ответ. В частности, конъюгаты белок-лекарственное средство, содержащие анти-HER2 антитела или анти-HER2/HER2 антитела по настоящему изобретению, можно применять для лечения, предупреждения и/или ослабления любого заболевания или нарушения, связанного с экспрессией или активностью HER2, или пролиферацией клеток HER2+, или опосредованного ими. Механизм действия, с помощью которого достигаются терапевтические способы по настоящему изобретению, включает уничтожение клеток, экспрессирующих HER2, в присутствии эффекторных клеток, например, с помощью CDC, апоптоза, ADCC, фагоцитоза, или комбинации двух или более из этих механизмов. Клетки, экспрессирующие HER2, которые можно ингибировать или уничтожить с помощью конъюгатов белок-лекарственное средство по настоящему изобретению, включают, например, клетки опухоли молочной железы.

**[0448]** В соответствии с некоторыми аспектами настоящее изобретение обеспечивает способы лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией HER2 (например, рака молочной железы), включающие введение одного или нескольких конъюгатов анти-HER2 белок-лекарственное средство или анти-HER2/HER2 биспецифический белок-лекарственное средство, описанных в других разделах настоящего документа, субъекту после того, как у субъекта был выявлен рак молочной железы (например, рак молочной железы IHC2+). Например, настоящее изобретение включает способы лечения рака молочной железы, включающие введение конъюгата белок-лекарственное средство, содержащего анти-HER2 антитело или антигенсвязывающую молекулу, или анти-HER2/HER2 биспецифическое антитело или антигенсвязывающую молекулу, пациенту 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 1 год или более после того, как субъект получил гормональную терапию (например, антиандрогенную терапию).

**[0449]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также включает применение анти-HER2 антитела по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения (например, рака), связанного с HER2-экспрессирующими клетками, или вызванного ими. В одном аспекте настоящее изобретение относится к конъюгату белок-лекарственное средство,

содержащему анти-HER2 антителу или антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическое анти-HER2/HER2 антителу или антигенсвязывающий фрагмент, как раскрыто в настоящем документе, для применения в медицине. В одном аспекте настоящее изобретение относится к соединению, содержащему конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), как раскрыто в настоящем документе, для применения в медицине.

### **Конъюгаты анти-STEAP2 антитело-лекарственное средство**

**[0450]** В некоторых вариантах осуществления конъюгаты белок-лекарственное средство, например, ADC, раскрытые в настоящем документе, можно применять, среди прочего, для лечения, предупреждения и/или ослабления любого заболевания или нарушения, связанного с экспрессией или активностью STEAP2, или опосредованного ими, или поддающегося лечению путем связывания с STEAP2 без конкуренции с модифицированным LDL, или и/или стимулирования интернализации рецептора STEAP2, и/или уменьшения количества рецепторов клеточной поверхности.

**[0451]** Конъюгаты белок-лекарственное средство по настоящему изобретению (и содержащие их терапевтические композиции) можно применять, среди прочего, для лечения любого заболевания или нарушения, для которого были бы полезными стимуляция, активация и/или направленное воздействие на иммунный ответ. В частности, конъюгаты анти-STEAP2 белок-лекарственное средство по настоящему изобретению можно применять для лечения, предупреждения и/или облегчения любого заболевания или нарушения, связанного или опосредованного экспрессией или активностью STEAP2, или пролиферацией клеток STEAP2+. Механизм действия, с помощью которого достигаются терапевтические способы по настоящему изобретению, включает уничтожение клеток, экспрессирующих STEAP2, в присутствии эффекторных клеток, например, с помощью CDC, апоптоза, ADCC, фагоцитоза или комбинации двух или более из этих механизмов. Клетки, экспрессирующие STEAP2, которые можно ингибировать или уничтожать с помощью конъюгатов белок-лекарственное средство по настоящему изобретению, включают, например, клетки опухоли предстательной железы.

**[0452]** Конъюгаты белок-лекарственное средство по настоящему изобретению можно применять для лечения, например, первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в предстательной железе, мочевом пузыре, шейке матки, легких, толстой кишке, почках, молочной железе, поджелудочной железе, желудке, матке и/или яичнике. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты белок-лекарственное

средство по настоящему изобретению применяют для лечения одного или нескольких из следующих видов рака: рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак легких, рак толстой кишки, рак почки, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак матки и рак яичников. Аналитические/диагностические способы, известные в данной области, такие как сканирование опухоли и т.д., могут быть использованы для установления того, имеется ли у пациента кастрационно-резистентная опухоль.

**[0453]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также включает способы лечения остаточного рака у субъекта. Термин «остаточный рак» означает наличие или сохранение одной или нескольких раковых клеток у субъекта после противораковой терапии.

**[0454]** В соответствии с некоторыми аспектами настоящее изобретение обеспечивает способы лечения заболевания или нарушения, связанные с экспрессией STEAP2 (например, рака предстательной железы), включающие введение субъекту одного или нескольких конъюгатов анти-STEAP2 белок-лекарственное средство, описанных в другом месте настоящего документа, после выявления у субъекта рака предстательной железы. Например, настоящее изобретение обеспечивает способы лечения рака предстательной железы, включающие введение конъюгата белок-лекарственное средство, содержащего анти-STEAP2 антитело или антигенсвязывающую молекулу, пациенту 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 1 год или более после того, как субъект получил гормональную терапию (например, антиандрогенную терапию).

**[0455]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также включает применение анти-STEAP2 антитела по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения (например, рака), связанного или вызванного STEAP2-экспрессирующими клетками. В одном аспекте настоящее изобретение относится к конъюгату белок-лекарственное средство, содержащему анти-STEAP2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как раскрыто в настоящем документе, для применения в медицине. В другом аспекте настоящее изобретение относится к соединению, содержащему конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), как раскрыто в настоящем документе, для применения в медицине.

**Конъюгаты анти-MET антитело-лекарственное средство**

**[0456]** В некоторых вариантах осуществления конъюгаты белок-лекарственное средство, например, ADC, раскрытые в настоящем документе, можно применять, среди прочего, для лечения, предупреждения и/или ослабления любого заболевания или нарушения, связанного или опосредованного экспрессией или активностью MET, или поддающегося лечению путем связывания с MET без конкуренции с модифицированными LDL, и/или стимуляции интернализации рецептора MET, и/или уменьшения количества рецепторов клеточной поверхности.

**[0457]** Конъюгаты белок-лекарственное средство по настоящему изобретению (и содержащие их терапевтические композиции) можно применять, среди прочего, для лечения любого заболевания или нарушения, при котором были бы полезными стимуляция, активация и/или нацеливание на иммунный ответ. В частности, конъюгаты анти-MET или анти-MET/MET биспецифический белок-лекарственное средство по настоящему изобретению можно применять для лечения, предупреждения и/или ослабления любого заболевания или нарушения, связанного или опосредованного экспрессией или активностью MET, или пролиферацией клеток MET+. Механизм действия, с помощью которого достигаются терапевтические способы по настоящему изобретению, включает уничтожение клеток, экспрессирующих MET, в присутствии эффекторных клеток, например, с помощью CDC, апоптоза, ADCC, фагоцитоза, или комбинации двух или более из этих механизмов. Клетки, экспрессирующие MET, которые можно ингибировать или уничтожать с помощью конъюгатов белок-лекарственное средство по настоящему изобретению, включают, например, клетки опухоли легких.

**[0458]** Конъюгаты белок-лекарственное средство по настоящему изобретению можно применять для лечения, например, первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в предстательной железе, мочевом пузыре, шейке матки, легких, толстой кишке, почках, молочной железе, поджелудочной железе, желудке, матке и/или яичнике. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты белок-лекарственное средство по настоящему изобретению применяют для лечения одного или нескольких из следующих видов рака: рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак легких, рак толстой кишки, рак почки, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак матки и рак яичников. Аналитические/диагностические способы, известные в данной области, такие как сканирование опухоли и т.д., могут быть использованы для выявления у пациента кастрационно-резистентной опухоли.

**[0459]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также включает способы лечения остаточного рака у субъекта. Термин «остаточный рак» означает наличие или сохранение одной или нескольких раковых клеток у субъекта после противораковой терапии.

**[0460]** В соответствии с некоторыми аспектами в настоящем изобретении обеспечены способы лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией MET (например, рака легкого), включающие введение одного или нескольких конъюгатов анти-MET или анти-MET/MET биспецифический белок-лекарственное средство, описанных в другом месте настоящего документа, субъекту после выявления у субъекта рака легких. Например, настоящее изобретение включает способы лечения рака легкого, включающие введение пациенту конъюгата белок-лекарственное средство, содержащего анти-MET или анти-MET/MET биспецифическое антитело, или антигенсвязывающую молекулу, 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели или 4 недели, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 1 год или более после того, как субъект получил гормональную терапию (например, антиандрогенную терапию).

**[0461]** Например, конъюгаты анти-MET антитело-лекарственное средство и конъюгаты MET x MET биспецифическое антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению можно применять для лечения опухолей, которые экспрессируют (или сверхэкспрессируют) MET. Например, конъюгаты анти-MET антитело-лекарственное средство и конъюгаты MET x MET биспецифическое антитело-лекарственное средство можно применять для лечения первичных и/или метастатических опухолей, возникающих в головном мозге и мозговых оболочках, ротоглотке, легких и бронхиальном дереве, желудочно-кишечном тракте, мужских и женских половых путях, мышце, кости, коже и придатках, соединительной ткани, селезенке, иммунной системе, кроветворных клетках и костном мозге, печени и мочевыводящих путях, а также специальных органах чувств, таких как глаза. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты анти-MET антитело-лекарственное средство и конъюгаты MET x MET биспецифическое антитело-лекарственное средство применяют для лечения одного или нескольких из следующих видов рака: острый миелогенный лейкоз, Т-клеточный лейкоз взрослых, астроцитомы, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, холангиокарцинома, хронический миелоидный лейкоз, колоректальный рак, рак эндометрия, рак пищевода, рак желудка (например, рак желудка с усилением MET), глиобластома, рак головы и шеи (например,

плоскоклеточный рак головы и шеи [HNSCC]), саркома Капоши, рак почки, лейомиосаркома, рак печени, рак легкого (*например*, немелкоклеточный рак легкого [NSCLC]), лимфомы, злокачественные глиомы, злокачественная мезотелиома, меланома, мезотелиома, MFH/фибросаркома, множественная миелома, рак носоглотки, остеосаркома, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, почечно-клеточный рак, рабдомиосаркома, мелкоклеточный рак легкого, синовиальная саркома, рак щитовидной железы и опухоль Вильмса.

**[0462]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также включает применение конъюгата анти-MET антитело-лекарственное средство или конъюгата MET x MET биспецифическое антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения (*например*, рака), связанного с MET-экспрессирующими клетками или вызванного ими. В одном аспекте настоящее изобретение относится к конъюгату белок-лекарственное средство, содержащему конъюгат анти-MET антитело-лекарственное средство или конъюгат MET x MET биспецифическое антитело-лекарственное средство, как раскрыто в настоящем документе, для применения в медицине. В одном аспекте настоящее изобретение относится к соединению, содержащему конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), как раскрыто в настоящем документе, для применения в медицине.

### **Комбинированные терапии и составы**

**[0463]** В настоящем изобретении обеспечены способы, которые включают введение фармацевтической композиции, содержащей любой из иллюстративных конъюгатов белок-лекарственное средство (*например*, конъюгатов антитело-лекарственное средство), соединений линкер-полезные нагрузки и полезных нагрузок, описанных в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами. Иллюстративные дополнительные терапевтические агенты, которые можно комбинировать или вводить в комбинации с конъюгатами белок-лекарственное средство (*например*, конъюгатами антитело-лекарственное средство), соединениями линкер-полезные нагрузки и полезными нагрузками по настоящему изобретению, включают, *например*, антагонист HER2 (*например*, анти-HER2 антитело [*например*, трастузумаб] или низкомолекулярный ингибитор HER2, или конъюгат анти-HER2 антитело-лекарственное средство, или анти-HER2/HER2 биспецифическое антитело, или конъюгат анти-HER2/HER2 биспецифическое антитело-лекарственное средство), антагонист EGFR (*например*, анти-EGFR антитело

[например, цетуксимаб или панитумумаб] или низкомолекулярный ингибитор EGFR [например, гефитиниб или эрлотиниб]), антагонист другого члена семейства EGFR, такого как HER2/ErbB2, ErbB3 или ErbB4 (например, анти-ErbB2, анти-ErbB3 или анти-ErbB4 антитело или низкомолекулярный ингибитор активности ErbB2, ErbB3 или ErbB4), антагонист EGFRvIII (например, антитело, которое специфически связывается с EGFRvIII), антагонист cMET (например, анти-cMET антитело), антагонист IGF1R (например, анти-IGF1R антитело) ингибитор B-raf (например, вемурафениб, сорафениб, gDC-0879, PLX-4720), ингибитор PDGFR-альфа (например, анти-PDGFR-альфа антитело), ингибитор PDGFR-бета (например, анти-PDGFR-бета антитело), антагонист VEGF (например, VEGF-Trap, см., например, US 7087411 (также упоминаемый в настоящем документе как «VEGF-ингибирующий гибридный белок»), анти-VEGF антитело (например, бевацизумаб), низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)), антагонист DLL4 (например, анти-DLL4 антитело, раскрытое в US 2009/0142354), антагонист Ang2 (например, анти-Ang2 антитело, раскрытое в US 2011/0027286, такое как H1H685P), антагонист FOLH1 (PSMA), антагонист PRLR (например, анти-PRLR антитело), антагонист STEAP1 или STEAP2 (например, анти-STEAP1 антитело или анти-STEAP2 антитело), антагонист TMPRSS2 (например, анти-TMPRSS2 антитело), антагонист MSLN (например, анти-MSLN антитело), антагонист CA9 (например, анти-CA9 антитело), антагонист уроплакина (например, анти-уроплакин антитело), и т.д.

**[0464]** Другие агенты, которые можно эффективно вводить в комбинации с конъюгатами белок-лекарственное средство (например, конъюгатами антитело-лекарственное средство), соединениями линкер-полезные нагрузки и полезными нагрузками по изобретению, включают ингибиторы цитокинов, в том числе низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, или с их соответствующими рецепторами. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению (например, фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты анти-HER2, анти-HER2/HER2 биспецифический, анти-MET, анти-MET/MET биспецифический или анти-STEAP2 белок-лекарственное средство (например, конъюгат антитело-лекарственное средство, описанный в настоящем документе), также можно вводить как часть терапевтического режима, включающего одну или несколько терапевтических комбинаций, выбранных из «ICE»: ифосфамид (например, Ifex®), карбоплатин (например, Paraplatin®), этопозид (например,

Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16); «DHAP»: дексаметазон (например, Decadron®), цитарабин (например, Cytosar-U®, цитозинарабинозид, ara-C), цисплатин (например, Platinol® -AQ); и «ESHAP»: этопозид (например, Etopophos®, Toposar®, VePesid®, VP-16), метилпреднизолон (например, Medrol®), высокие дозы цитарабина, цисплатин (например, Platinol®-AQ).

**[0465]** Настоящее изобретение также включает терапевтические комбинации, содержащие любой из конъюгатов белок-лекарственное средство (например, конъюгатов антитело-лекарственное средство), соединений линкер-полезные нагрузки и полезных нагрузок, упомянутых в настоящем документе, и ингибитор одного или нескольких из HER2, VEGF, Ang2, DLL4, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFRvIII, cMet, IGF1R, B-raf, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , FOLH1 (PSMA), PRLR, STEAP1, STEAP2, TMPRSS2, MSLN, CA9, уроплакина, или любого из вышеупомянутых цитокинов, где ингибитор представляет собой аптамер, антисмысловую молекулу, рибозим, siRNA, пептидное тело, нанотело или фрагмент антитела (например, Fab-фрагмент; F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент; Fd-фрагмент; Fv-фрагмент; scFv; фрагмент dAb; или другие сконструированные молекулы, такие как диатела, триантела, тетратела, минитела и минимальные распознающие единицы). Антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению также можно вводить и/или совместно составлять в комбинации с противовирусными средствами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами и/или NSAID. Антигенсвязывающие молекулы по изобретению также можно вводить как часть схемы лечения, которая также включает лучевую терапию и/или стандартную химиотерапию.

**[0466]** Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить непосредственно перед, одновременно с или вскоре после введения антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению; (для целей настоящего изобретения такие схемы введения считаются введением антигенсвязывающей молекулы «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом).

**[0467]** Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых конъюгаты белок-лекарственное средство (например, конъюгаты антитело-лекарственное средство), соединения линкер-полезные нагрузки и/или полезные нагрузки по настоящему изобретению совместно составляют с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в других местах настоящего документа.

#### **Режимы введения**



**[0468]** В соответствии с некоторыми вариантам осуществления настоящего изобретения, многократные дозы конъюгата белок-лекарственное средство (например, конъюгата анти-HER2, анти-HER2/HER2 биспецифическое, анти-MET, анти-MET/MET биспецифическое или анти-STEAP2 антитело-лекарственное средство), соединения линкер-полезная нагрузка и/или полезной нагрузки можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы в соответствии с этим аспектом изобретения включают последовательное введение субъекту множества доз конъюгата белок-лекарственное средство (например, конъюгата анти-HER2, анти-HER2/HER2 биспецифическое, анти-MET, анти-MET/MET биспецифическое, или анти-STEAP2 антитело-лекарственное средство), соединения линкер-полезная нагрузка и/или полезной нагрузки по изобретению. Используемый в настоящем документе термин «последовательное введение» означает, что каждую дозу конъюгата белок-лекарственное средство (например, конъюгата анти-HER2, анти-HER2/HER2 биспецифическое, анти-MET, анти-MET/MET биспецифическое или анти-STEAP2 антитело-лекарственное средство), соединения линкер-полезная нагрузка и/или полезной нагрузки вводят субъекту в другой момент времени, например, в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). Настоящее изобретение включает способы, которые предусматривают последовательное введение пациенту однократной начальной дозы конъюгата белок-лекарственное средство (например, конъюгата анти-HER2, анти-HER2/HER2 биспецифическое, анти-MET, анти-MET/MET биспецифическое или анти-STEAP2 антитело-лекарственное средство), соединения линкер-полезная нагрузка и/или полезной нагрузки с последующим введением одной или нескольких вторичных доз конъюгата белок-лекарственное средство (например, конъюгата анти-HER2, анти-HER2/HER2 биспецифическое, анти-MET, анти-MET/MET биспецифическое или анти-STEAP2 антитело-лекарственное средство), соединения линкер-полезная нагрузка и/или полезной нагрузки, и необязательно с последующей одной или несколькими третичными дозами конъюгата белок-лекарственное средство (например, конъюгата анти-HER2, анти-HER2/HER2 биспецифическое, анти-MET, анти-MET/MET биспецифическое или анти-STEAP2 антитело-лекарственное средство), соединения линкер-полезная нагрузка и/или полезной нагрузки.

**[0469]** Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения конъюгата белок-лекарственное средство (например, конъюгата анти-HER2, анти-HER2/HER2 биспецифическое, анти-MET,

анти-MET/MET биспецифическое или анти-STEAP2 антители-лекарственное средство), соединения линкер-полезная нагрузка и/или полезной нагрузки по настоящему изобретению. Таким образом, «начальная доза» представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также называемую «базовой дозой»); «вторичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и «третичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут содержать одинаковое количество конъюгата белок-лекарственное средство (например, конъюгата анти-HER2, анти-HER2/HER2 биспецифическое, анти-MET, анти-MET/MET биспецифическое или анти-STEAP2 антители-лекарственное средство), соединения линкер-полезная нагрузка и/или полезной нагрузки, но обычно отличаются друг от друга по частоте введения. Однако в некоторых вариантах осуществления количество конъюгата белок-лекарственное средство (например, конъюгата анти-HER2, анти-HER2/HER2 биспецифическое, анти-MET, анти-MET/MET биспецифическое или анти-STEAP2 антители-лекарственное средство), соединения линкер-полезная нагрузка и/или полезной нагрузки, содержащееся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличаются друг от друга (например, корректируются в сторону увеличения или уменьшения в зависимости от ситуации) в ходе курса лечения. В некоторых вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале режима лечения в качестве «нагрузочных доз», за которыми следуют последующие дозы, которые вводят менее часто (например, «поддерживающие дозы»).

**[0470]** В одном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (например, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Используемая в настоящем документе фраза «непосредственно предшествующая доза» означает, в последовательности многократных введений, дозу конъюгата белок-лекарственное средство (например, конъюгата анти-HER2, анти-HER2/HER2 биспецифическое, анти-MET, анти-MET/MET биспецифическое или анти-STEAP2 антители-лекарственное средство), соединения линкер-полезная нагрузка и/или полезной нагрузки, которую вводят пациенту до введения следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

**[0471]** Способы в соответствии с этим аспектом изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз конъюгата белок-лекарственное средство (например, конъюгата анти-HER2, анти-HER2/HER2 биспецифическое, анти-MET, анти-MET/MET биспецифическое или анти-STEAP2 антитело-лекарственное средство), соединения линкер-полезная нагрузка и/или полезной нагрузки. Например, в некоторых вариантах осуществления пациенту вводят только однократную вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления пациенту вводят только однократную третичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

**[0472]** В вариантах осуществления, включающих многократные вторичные дозы, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих многократные третичные дозы, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. Альтернативно, частота, с которой пациенту вводят вторичные и/или третичные дозы, может изменяться в зависимости от хода курса лечения. Частота введения также может быть скорректирована врачом в ходе курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

## **ПРИМЕРЫ**

**[0473]** Следующие примеры иллюстрируют конкретные аспекты настоящего описания. Примеры не следует рассматривать как ограничивающие, поскольку примеры просто обеспечивают конкретное понимание и практическое применение вариантов осуществления и их различных аспектов.

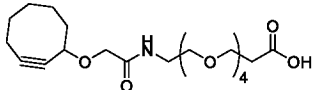
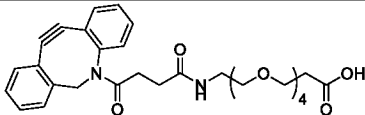
### ***Сокращения***

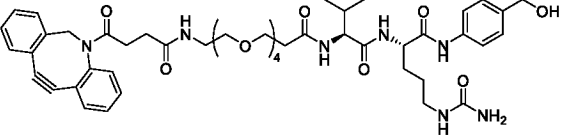
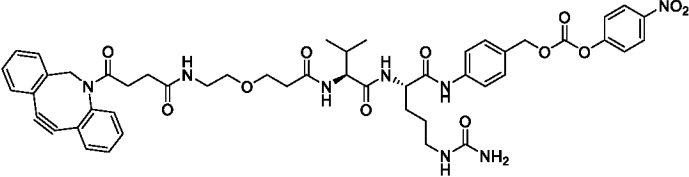
ADC	Конъюгат антитело-лекарственное средство
Агликозилированное антитело	Антитело не содержит какого-либо гликана
<i>водн.</i>	Водный
Woc	N-трет-бутоксикарбонил

ВурН	Продукт Thermo Scientific Prod # 28372, содержащий 100 мМ фосфата натрия и 150 мМ хлорида натрия, не содержит калия, значение рН доведено от 7,2 до 7,6-7,8 MQ, если не указано иное
COT	Циклооктинол
Да	Дальтон
DAR	Отношение лекарственного средства к антителу
DCM	Дихлорметан
DIBAC	Дибенз[b,f]азоцин, 11,12-дидегидро-5,6-дигидро-
DIBAC-Suc	Дибенз[b,f]азоцин-5(6H)-бутановая кислота, 11,12-дидегидро
DIBACT	3H-Бензо[c]-1,2,3-триазоло[4,5-e][1]бензазоцин, 8,9-дигидро-
DIPEA	Диизопропилэтиламин
DMF	N,N-диметилформамид
DMSO	Диметилсульфоксид
ELSD	Испарительный детектор светорассеяния
Экв.	Эквивалент
ESI	Ионизация электрораспылением
г	Грамм
GUL-азид	((S)-5-(4-азидобутанамидо)-1-карбокспентил)карбамоил)-L-глутаминовая кислота
HATU	2-(7-Аза-1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат
HC	Тяжелая цепь иммуноглобулина
HEK	Эмбриональная почка человека (клетки)
HPLC	Высокоэффективная жидкостная хроматография
hr или hrs	Часы
LC	Легкая цепь иммуноглобулина
LC	Жидкостная хроматография
мг	миллиграммы
мин	минуты
мл	миллилитры
мкл	микролитры
мМ	миллимолярный

мкМ	микромольный
MS	Масс-спектрометрия
MSD	Масс-селективный детектор
MW	Молекулярная масса
NHS	N-гидроксисукцинимид
нМ	наномольный
NMR	Ядерный магнитный резонанс
PAB	Пара-аминобезилокси (карбонил)
PBS	10 мМ натрий-фосфатный буфер и 150 мМ хлорид натрия
PBSg	10 мМ фосфат, 150 мМ хлорид натрия, 5% глицерин
PEG	Полиэтиленгликоль
ppm	Части на миллион (химический сдвиг)
PPTS	пиридиний п-толуолсульфонат
RP	Обращенная фаза
RT	Комнатная температура, кТ
<i>Sat.</i>	Насыщенный
SEC	Эксклюзионная хроматография
Suc	Янтарная кислота
MTBE	<i>трет</i> -бутилметилловый эфир
TEA	Триэтиламин
TFA	Трифторуксусная кислота
TG	Трансглутаминаза
THF	Тетрагидрофуран

[0474] Большинство исходных материалов коммерчески доступны от Sigma-Aldrich®, J&K®, ChemExpress® и т.д. Следующие соединения были синтезированы в соответствии с соответствующими ссылками.

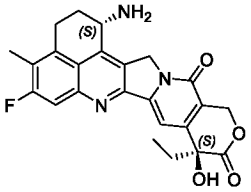
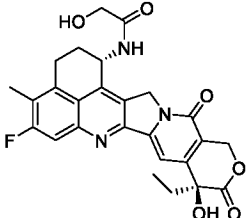
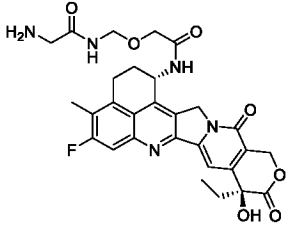
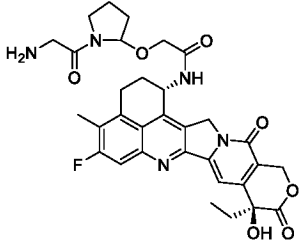
№ Соединения	Структура	CAS	Ссылка
LP1-1		2226472-26-8	WO2018089373
LP2-1		1537170-85-6	WO2018089373

LP2-2		2226472-27-9	WO2018089373
LP2-3		2226472-28-0	WO2018089373

### Общие способы

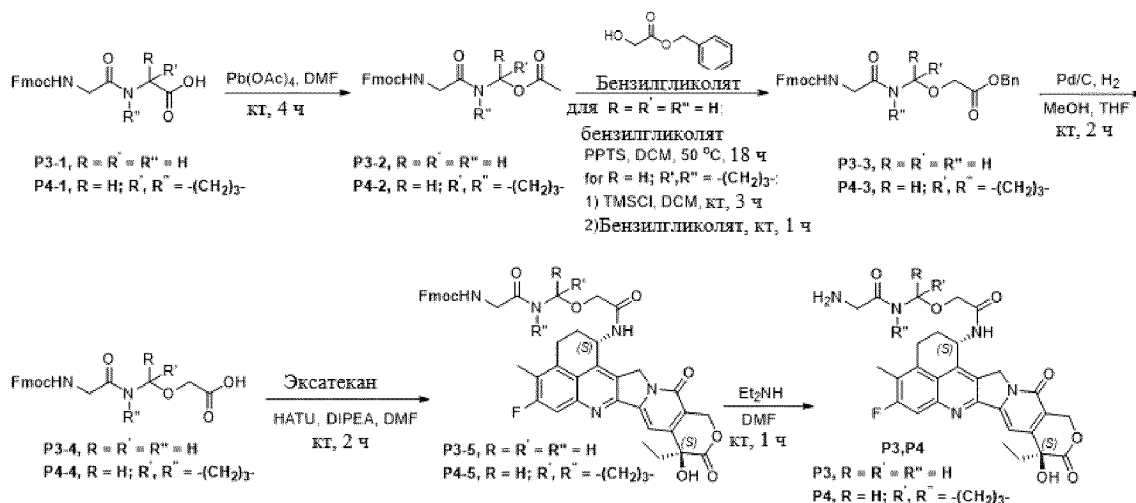
[0475] ПРИМЕР 1: Синтез производных камптотецина (полезные нагрузки)

Таблица 5: Иллюстративные полезные нагрузки аналога камптотецина P1-P4 в соответствии с изобретением

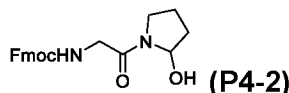
#	Название	Структура	cLogP	MF	MW	Чистота (%)	m/z	Соль
P1	Эксатекан		1.45	$C_{24}H_{22}FN_3O_4 \cdot CH_4O_3S$	531.56	97	436.1 [M+H], 893.2 [2M+Na]	MsOH
P2	Dxd		0.55	$C_{26}H_{24}FN_3O_6$	493.48	100	494.2 [M+H]	NA
P3			-0.60	$C_{29}H_{30}FN_5O_7 \cdot C_2HF_3O_2$	693.59	97	580.2 [M+H], 1159.2 [2M+H]	TFA
P4			0.02	$C_{32}H_{34}FN_5O_7$	619.64	88	620.3 [M+H]	NA

[0476] Полезная нагрузка **P1**, мезилат эксатекана, коммерчески получали от *MCE*. Полезные нагрузки **P2** и **P3** синтезировали, как описано в WO 2015155998, включенном в настоящий документ в качестве ссылки, а полезную нагрузку **P4**, производную камптотецина, синтезировали, как описано на схеме 1А, и в соответствии со стадиями синтеза, описанными в примерах 1А-1Е:

**Схема 1: Синтез производных камптотецина (полезные нагрузки) P3 и P4**



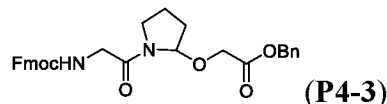
[0477] Пример 1А: Синтез 9*H*-флуорен-9-илметил *N*-[2-(2-гидроксипирролидин-1-ил)-2-оксоэтил]карбамата (**P4-2**)



[04728] К смеси Fmoc-Gly-Pro-OH **P4-1** (0,10 г, 0,26 ммоль) в сухом DMF (1 мл) добавляли тетраацетат свинца (0,14 г, 0,31 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут; ход реакции контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь фильтровали через целит, фильтрат разбавляли этилацетатом, промывали водой и рассолом, сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали *in vacuo*. Остаток очищали хроматографией на колонке с силикагелем (0-10% этилацетата в петролейном эфире) с получением соединения **P4-2** (50 мг, выход 53%) в виде белого твердого вещества, и получали не содержащее ацетат промежуточное соединение. ESI *m/z*: 389 (*M* + 23)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO) δ 7.90 (d, *J* = 7.4 Гц, 2H), 7.73 (d, *J* = 7.5 Гц, 2H), 7.47-7.37 (m, 3H), 7.33 (t, *J* = 7.3 Гц, 2H), 5.86 (br s, 1H), 5.48 (d, *J* = 4.0 Гц, 0.25H), 5.39 (d, *J* = 4.0 Гц, 0.75H), 4.33-4.18 (m, 3H), 3.96

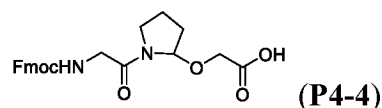
(d,  $J = 6.0$  Гц, 1.5H), 3.75 (d,  $J = 6.0$  Гц, 0.5H), 3.59-3.33 (m, 1H), 3.22-3.11 (m, 1H), 2.00-1.59 (m, 4H) ppm.

**[0479]** Пример 1В: Синтез бензил 2-{[1-(2-{[(9H-флуорен-9-илметокси)-карбонил]амино}ацетил)пирролидин-2-ил]окси}ацетата (**P4-3**)



**[0480]** К раствору соединения **P4-2** (0,30 г, 0,82 ммоль) в DCM (25 мл) добавляли хлортриметилсилан (TMSCl) (0,27 г, 2,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов; ход реакции контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь концентрировали *в вакууме* и остаток разбавляли DCM (25 мл). К раствору добавляли бензилгликолят (0,27 г, 1,6 ммоль) и DIPEA (0,21 г, 1,6 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа; завершение реакции контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь концентрировали *в вакууме* и остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в водном растворе бикарбоната аммония (0,05%)) с получением соединения **P4-3** (0,11 г, выход 25%, чистота > 99% и 50 мг, чистота 75%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 537.3 (M + Na)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.91-7.89 (m, 2H), 7.74-7.69 (m, 2H), 7.63-7.48 (m, 1H), 7.42-7.25 (m, 9H), 5.51-5.09 (m, 2H), 4.35-4.21 (m, 5H), 4.00-3.77 (m, 2H), 3.52-3.38 (m, 2H), 3.30-3.18 (m, 1H), 2.19-1.64 (m, 4H) ppm.

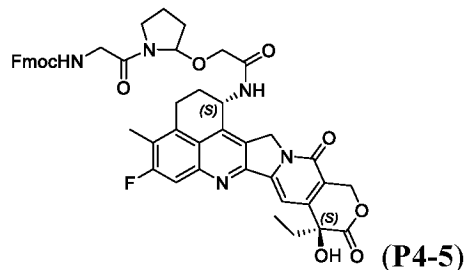
**[0481]** Пример 1С: Синтез 2-{[1-(2-{[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}-ацетил)пирролидин-2-ил]окси}уксусной кислоты (**P4-4**)



**[0482]** К раствору соединения **P4-3** (89 мг, 0,17 ммоль) в метаноле (3 мл) и THF (7 мл) добавляли влажный палладий-на-угле (10% Pd, 20 мг) в атмосфере азота. Смесь дегазировали и перемешивали под давлением баллона водорода при комнатной температуре в течение 2 часов, и завершение реакции контролировали с помощью LCMS. Реакционную смесь фильтровали через целит и фильтрат концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в водном растворе бикарбоната аммония (0,05%)) с получением соединения **P4-4** (36 мг, выход 49%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 447,1 (M + Na)<sup>+</sup>.

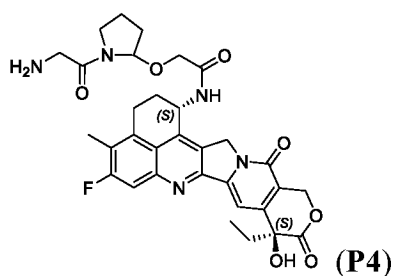


**[0483]** Пример 1D: 9*H*-Флуорен-9-илметил N-{2-[2-({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,<sup>14</sup>.0<sup>4</sup>,<sup>13</sup>.0<sup>6</sup>,<sup>11</sup>.0<sup>20</sup>,<sup>24</sup>]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)пирролидин-1-ил]-2-оксоэтил}карбамат (**P4-5**)



**[0484]** К смеси соединения **P4-4** (63 мг, 0,15 ммоль) и мезилата эксатекана (66 мг, 0,12 ммоль) в DMF (2 мл) добавляли HATU (61 мг, 0,16 ммоль) и DIPEA (46 мг, 0,36 ммоль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов; завершение реакции контролировали с помощью LCMS. Реакционную смесь непосредственно очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в водном растворе бикарбоната аммония (10 мМ)) с получением соединения **P4-5** (45 мг, выход 44%) в виде твердого вещества желтого цвета. ESI m/z: 842,3 (M+H)<sup>+</sup>.

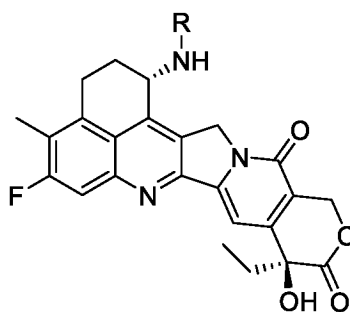
**[0485]** Пример 1E: 2-{[1-(2-Аминоацетил)пирролидин-2-ил]окси}-N-[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>,<sup>14</sup>.0<sup>4</sup>,<sup>13</sup>.0<sup>6</sup>,<sup>11</sup>.0<sup>20</sup>,<sup>24</sup>]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]ацетамид (**P4**)



**[0486]** К раствору соединения **P4-5** (45 мг, 54 мкмоль) в DCM (4 мл) добавляли диэтиламин (20 мг, 0,27 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. За завершением реакции следили с помощью LCMS. Реакционную смесь концентрировали *in vacuo* и остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (0-10% метанол в DCM) с получением соединения **P4** (9,5 мг, выход 28%) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 620,3 (M+H)<sup>+</sup>. В приведенной ниже **таблице 6**

представлены данные о цитотоксичности и ADME (абсорбция, распределение, метаболизм и экскреция) для полезных нагрузок **P1-P3** в соответствии с изобретением.

**Таблица 6. Результаты цитотоксичности и ADME полезных нагрузок**



#	Сылочный номер	Структуры	НСТ-15			
			IC <sub>50</sub> (нМ) -v	Отношение к ММАЕ -v	IC <sub>50</sub> (нМ) +v	Отношение к ММАЕ +v
	ММАЕ		14.810	1x	0.946	1x
<b>P1</b>	Эксатекан	H	1.292	0.087x	1.734	1.833x
<b>P2</b>	Dxd	COCH <sub>2</sub> OH	6.995	0.472x	2.654	2.805x
<b>P3</b>			44.857	3.011x	22.161	23.426x

[0487] Здесь "-v" означает без верапамила, а "+v" означает с верапамилем. Верапамил является известным ингибитором Р-гликопротеина и может блокировать отток, модулируемый Р-гликопротеином.

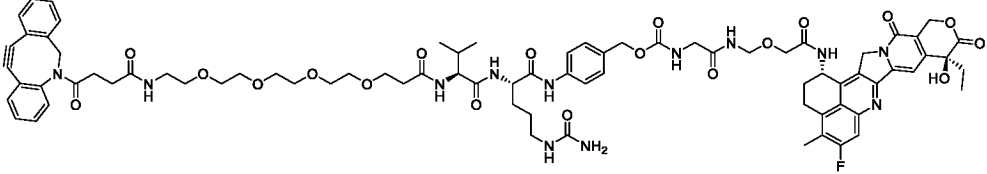
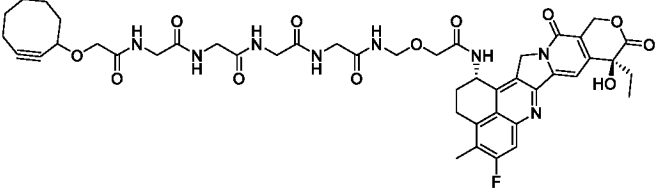
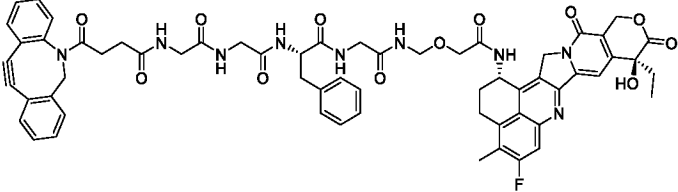
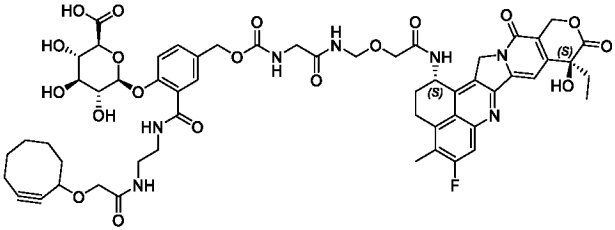
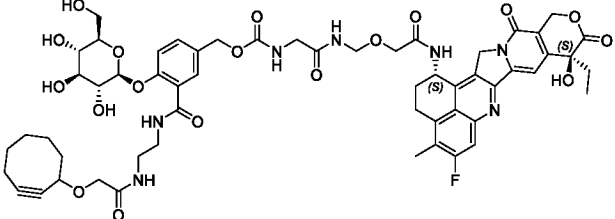
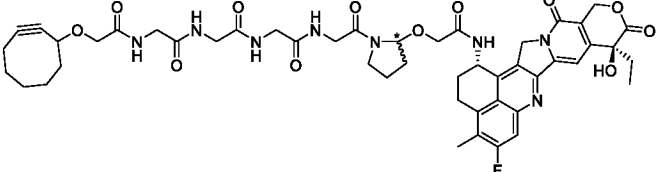
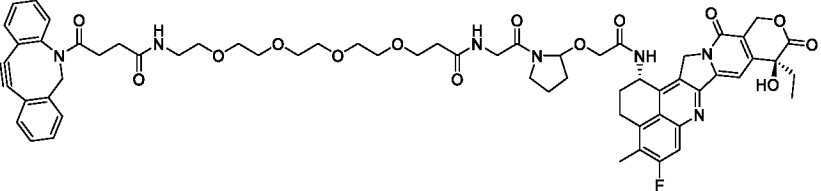
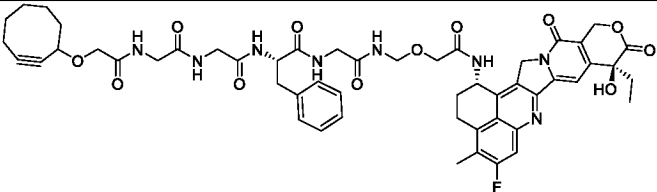
[0488] Пример 2: Соединение линкер2-полезные нагрузки

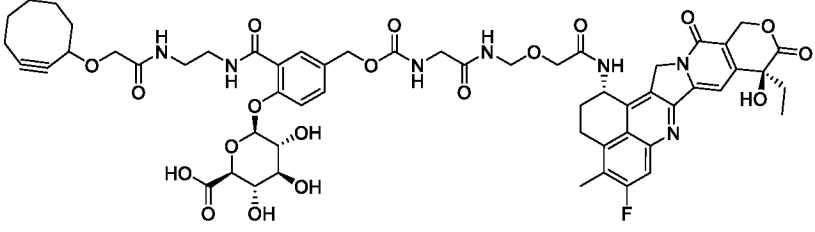
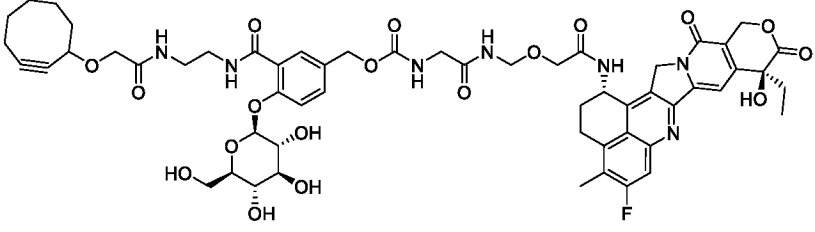
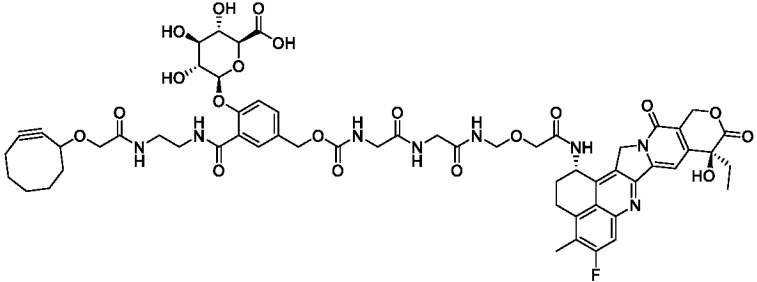
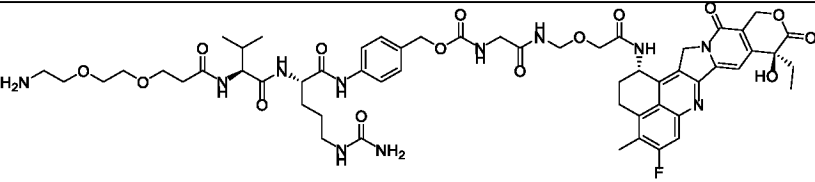
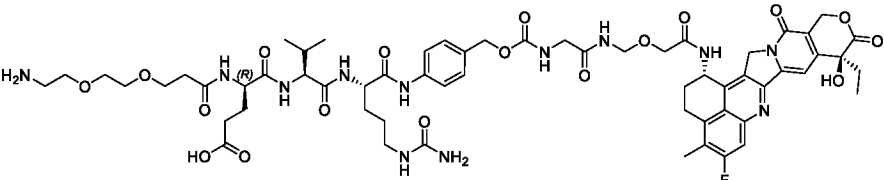
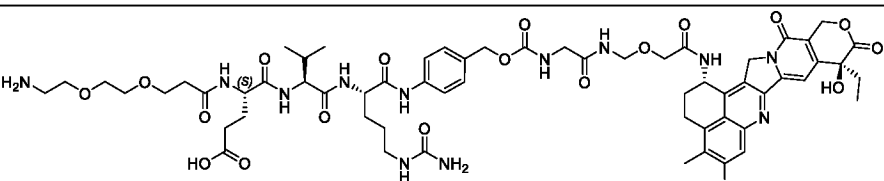
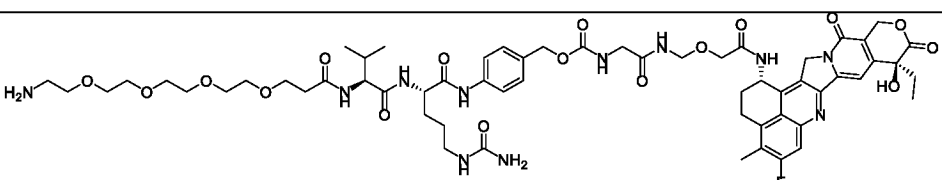
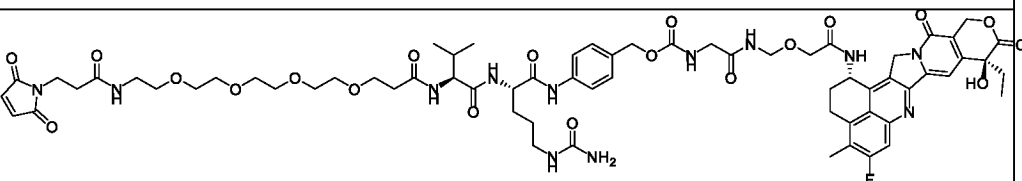
[0489] Пример 2А: Соединение линейный линкер2-полезные нагрузки (**LL2P**)

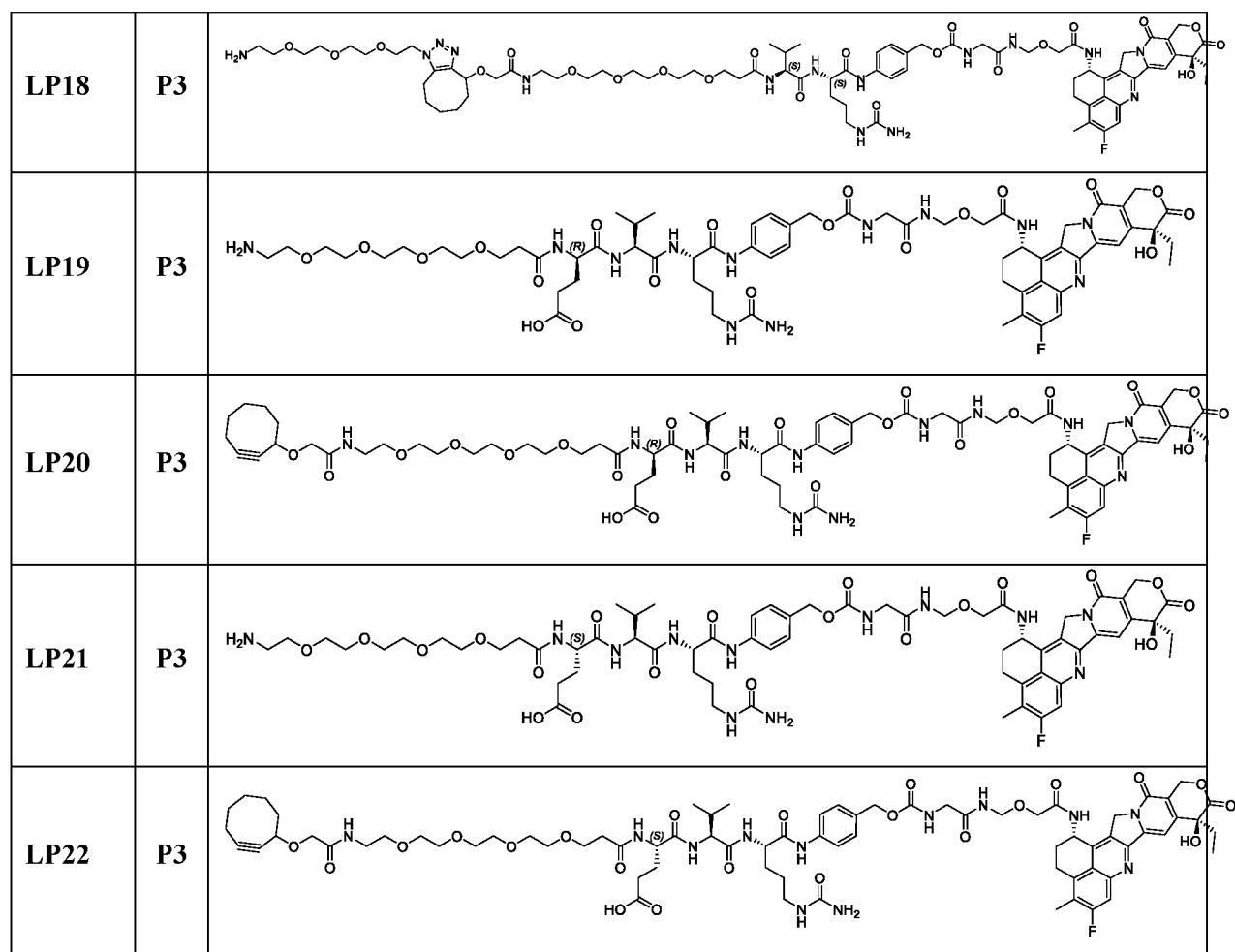
[0490] В приведенной ниже **таблице 7** представлены структуры иллюстративных соединений линейный линкер2-полезные нагрузки (**LL2P**) в соответствии с изобретением.

**Таблица 7. Структуры соединений линейный линкер2-полезные нагрузки (**LL2P**)**

#	(P)	Структуры
<b>LP1</b>	<b>P3</b>	

LP2	P3	
LP3	P3	
LP4	P3	
LP5	P3	
LP6	P3	
LP7 LP7'	P4	
LP8	P4	
LP9	P3	

LP10	P3	
LP11	P3	
LP12	P3	
LP13	P3	
LP14	P3	
LP15	P3	
LP16	P3	
LP17	P3	



[0491] В приведенной ниже таблице 8 представлены химические свойства иллюстративных соединений линейный линкер2-полезные нагрузки (LL2P) в соответствии с изобретением.

Таблица 8. Химические свойства соединений линкер2-полезные нагрузки (LL2P)

#	Название линкера	Полезные нагрузки	cLogP	MF	MW	Чистота (%)	m/z
LP1	COT-PEG4-vcPAB	P3 (Gly-NHCH <sub>2</sub> O-Dxd)	0.72	C <sub>69</sub> H <sub>90</sub> FN <sub>11</sub> O <sub>19</sub> .C <sub>2</sub> HF <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	1510.54	96	698.8 (M/2+H)
LP2	DIBAC-PEG4-vcPAB	P3 (Gly-NHCH <sub>2</sub> O-Dxd)	1.46	C <sub>78</sub> H <sub>91</sub> FN <sub>12</sub> O <sub>19</sub>	1519.65	95*	760.5 (M/2+H)
LP3	COT-GGG	P3 (Gly-NHCH <sub>2</sub> O-Dxd)	-1.84	C <sub>45</sub> H <sub>51</sub> FN <sub>8</sub> O <sub>12</sub>	914.95	99	915.3 (M+H)
LP4	DIBAC-GGF	P3 (Gly-NHCH <sub>2</sub> O-	1.12	C <sub>61</sub> H <sub>58</sub> FN <sub>9</sub> O <sub>12</sub>	1128.16	99	1128.4 (M+H)

		Dxd)					
LP5	COT-EDA-(GLCA)PAB	<b>P3</b> (Gly-NHCH <sub>2</sub> O-Dxd)	-0.73	C <sub>56</sub> H <sub>62</sub> FN <sub>7</sub> O <sub>19</sub>	1156.14	97	1156.3 (M+H)
LP6	COT-EDA-(GLC)PAB	<b>P3</b> (Gly-NHCH <sub>2</sub> O-Dxd)	-0.66	C <sub>56</sub> H <sub>64</sub> FN <sub>7</sub> O <sub>18</sub>	1142.16	>95	1143.3 (M+H)
LP7 LP7'	COT-GGG	<b>P4</b> (Gly-ProO-Dxd)	-1.23	C <sub>48</sub> H <sub>55</sub> FN <sub>8</sub> O <sub>12</sub>	955.01	>95*	955.3 (M+H)
LP8	DIBAC-PEG4	<b>P4</b> (Gly-ProO-Dxd)	1.77	C <sub>62</sub> H <sub>68</sub> FN <sub>7</sub> O <sub>14</sub>	1154.24	99*	592.1 (fragment)
LP9	COT-GGF	<b>P3</b> (Gly-NHCH <sub>2</sub> O-Dxd)	0.38	C <sub>52</sub> H <sub>57</sub> FN <sub>8</sub> O <sub>12</sub>	1005.1		1005.0 (M+H)
LP10	COT-PAB(GLCA)	<b>P3</b> (Gly-NHCH <sub>2</sub> O-Dxd)	-0.73	C <sub>56</sub> H <sub>62</sub> FN <sub>7</sub> O <sub>19</sub>	1156.1		1156.3 (M+H)
LP11	COT-PAB(GLC)	<b>P3</b> (Gly-NHCH <sub>2</sub> O-Dxd)	-0.66	C <sub>56</sub> H <sub>64</sub> FN <sub>7</sub> O <sub>18</sub>	1142.2		1142.3 (M+H)
LP12	COT-PAB(GLCA)-G	<b>P3</b> (Gly-NHCH <sub>2</sub> O-Dxd)	-1.84	C <sub>58</sub> H <sub>65</sub> FN <sub>8</sub> O <sub>20</sub>	1213.2		607.4 (M/2+H)
LP13	NH <sub>2</sub> -PEG2-vcPAB	<b>P3</b> (Gly-NHCH <sub>2</sub> O-Dxd)	-1.26	C <sub>55</sub> H <sub>70</sub> FN <sub>11</sub> O <sub>15</sub>	1144.2		573.0 (M/2+H)
LP14	NH <sub>2</sub> -PEG2- <sup>D</sup> EvCPAB	<b>P3</b> (Gly-NHCH <sub>2</sub> O-Dxd)	-4.41	C <sub>60</sub> H <sub>77</sub> FN <sub>12</sub> O <sub>18</sub>	1273.3		637.5 (M/2+H)
LP15	NH <sub>2</sub> -PEG2- <sup>L</sup> EvCPAB	<b>P3</b> (Gly-NHCH <sub>2</sub> O-Dxd)	-4.41	C <sub>60</sub> H <sub>77</sub> FN <sub>12</sub> O <sub>18</sub>	1273.3		637.4 (M/2+H)
LP16	NH <sub>2</sub> -PEG4-vcPAB	<b>P3</b> (Gly-NHCH <sub>2</sub> O-Dxd)	-1.35	C <sub>59</sub> H <sub>78</sub> FN <sub>11</sub> O <sub>17</sub>	1232.3		616.9 (M/2+H)
LP17	Mc(3)-PEG4-vcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -Dxd	<b>P3</b> (Gly-NHCH <sub>2</sub> O-Dxd)	-2.01	C <sub>66</sub> H <sub>83</sub> FN <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	1383.5		692.4 (M/2+H)
LP18		<b>P3</b> (Gly-					

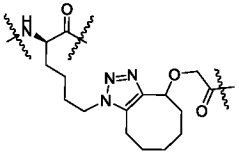
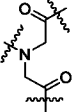
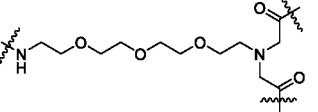
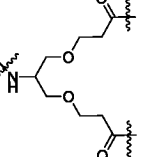
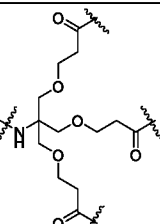
LP19	NH <sub>2</sub> - PEG4- D <sup>D</sup> EvCPAB	NHCH <sub>2</sub> O- Dxd) <b>P3</b> (Gly- NHCH <sub>2</sub> O- Dxd)	-4.51	C <sub>64</sub> H <sub>85</sub> FN <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	1361.4	681.5 (M/2+H)
LP20	COT- PEG4- D <sup>D</sup> EvCPAB	<b>P3</b> (Gly- NHCH <sub>2</sub> O- Dxd)	-0.28	C <sub>74</sub> H <sub>97</sub> FN <sub>12</sub> O <sub>22</sub>	1525.7	763.5 (M/2+H)
LP21	NH <sub>2</sub> - PEG4- L <sup>L</sup> EvCPAB	<b>P3</b> (Gly- NHCH <sub>2</sub> O- Dxd)	-4.51	C <sub>64</sub> H <sub>85</sub> FN <sub>12</sub> O <sub>20</sub>	1361.4	681.4 (M/2+H)
LP22	COT- PEG4- L <sup>L</sup> EvCPAB	<b>P3</b> (Gly- NHCH <sub>2</sub> O- Dxd)	-0.28	C <sub>74</sub> H <sub>97</sub> FN <sub>12</sub> O <sub>22</sub>	1525.7	763.5 (M/2+H)

[0492] \*Смесь лактона и продуктов раскрытия цикла. Значения MW и m/z представляют собой данные для соответствующего лактона.

[0493] Пример 2В: Соединение разветвленный линкер2-полезные нагрузки (**BL2P**)

[0494] В приведенной ниже таблице 9 представлены структуры иллюстративных разветвленных единиц **B1-B5** в соответствии с изобретением.

Таблица 9. Структуры разветвленных единиц **B1-B5**

Ветвь В	B1	B2	B3	B4	B5
Структура					

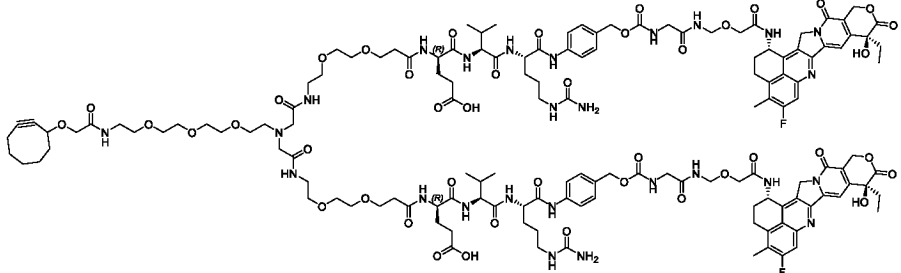
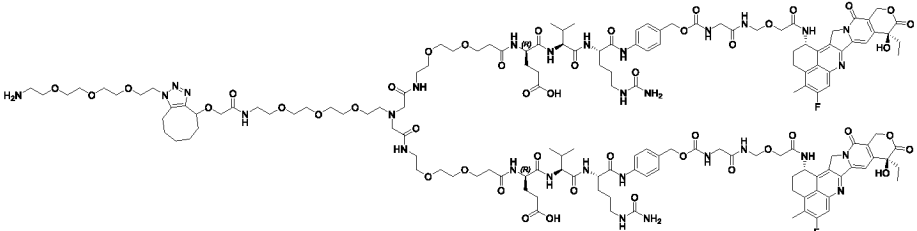
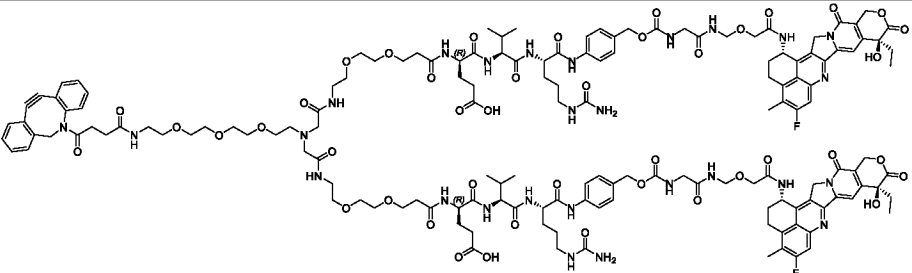
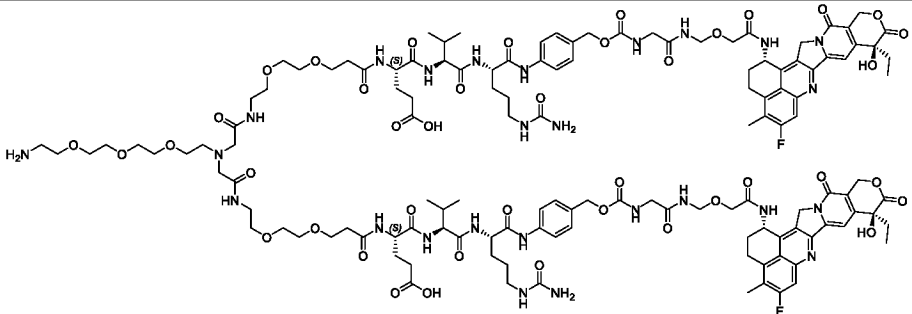
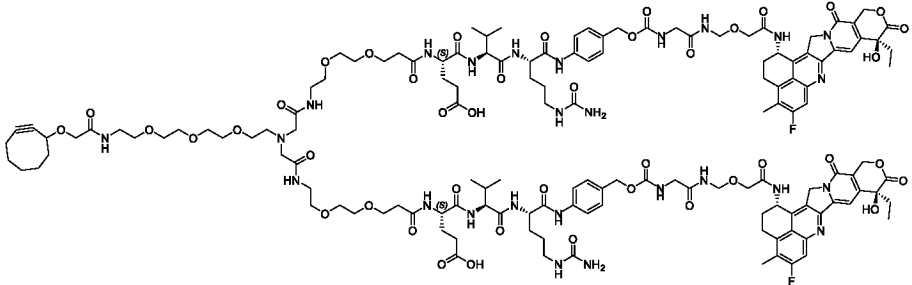
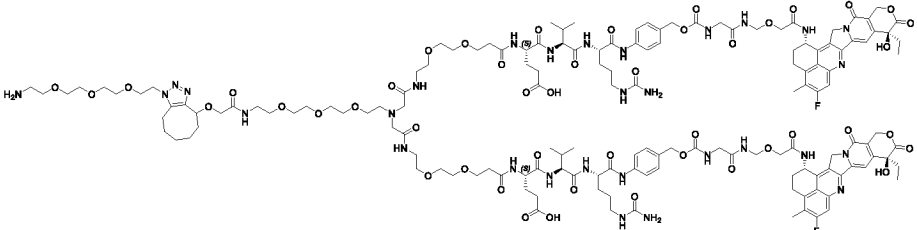
[0495] В приведенной ниже таблице 10 представлены структуры иллюстративных соединений разветвленный линкер2-полезные нагрузки (**BL2P**) в соответствии с изобретением.

Таблица 10. Структуры соединений разветвленный линкер2-полезные нагрузки (**BL2P**)

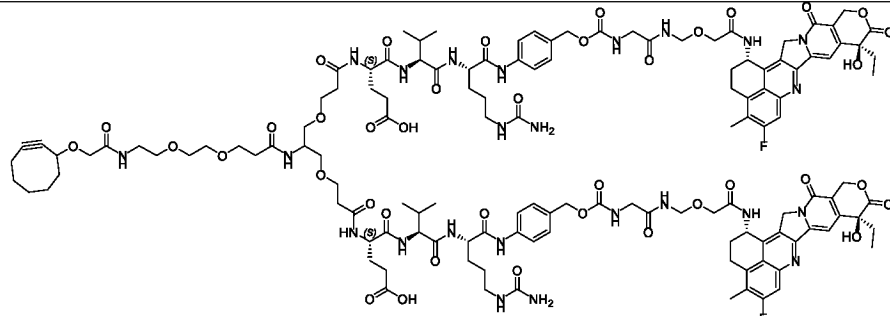
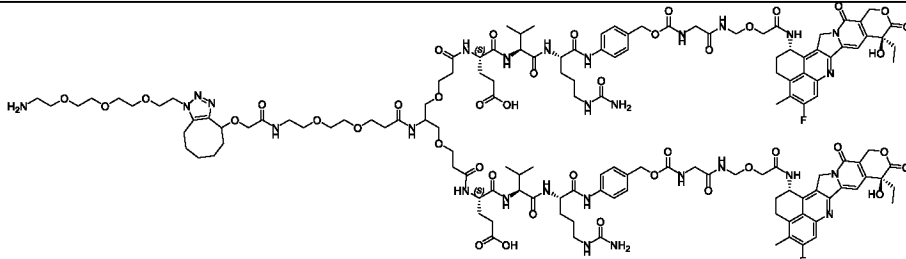
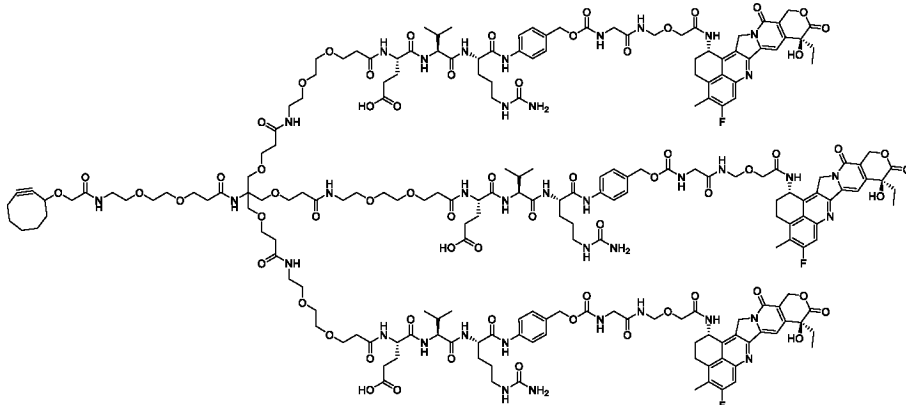
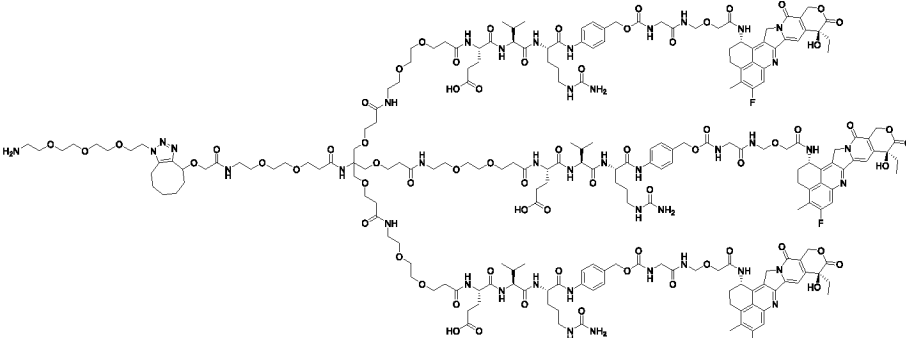
#	Название LP	cLogP	Структуры
---	-------------	-------	-----------

<p>LP23</p>	<p>COT-PEG4-CO-B1-(LP<sup>+</sup>)(LP<sup>+</sup>)</p> <p>LP<sup>+</sup> = GGFG-NHCH<sub>2</sub>-Dxd</p> <p>LP<sup>+</sup> = NH<sub>2</sub>-PEG4-GGFG-NHCH<sub>2</sub>-Dxd</p>	<p>-2.17</p>	
<p>LP24</p>	<p>COT-B2-[NH-PEG2-vcPAB-G-NHCH<sub>2</sub>-Dxd]2</p>	<p>-1.80</p>	
<p>LP25</p>	<p>COT-B2-[NH-PEG2-<sup>D</sup>vcPAB-G-NHCH<sub>2</sub>-Dxd]2</p>	<p>-3.80</p>	
<p>LP26</p>	<p>DIBAC-suc-B2-[NH-PEG4-vcPAB-G-NHCH<sub>2</sub>-Dxd]2</p>	<p>-1.25</p>	
<p>LP27</p>	<p>B3-[NH-PEG2-vcPAB-G-NHCH<sub>2</sub>-Dxd]2</p>	<p>-4.22</p>	



LP28	COT-B3- [NH-PEG2- <sup>D</sup> EvcPAB- G-NHCH2- Dxd]2	-4.15	
qLP29	NH2-PEG3- TCOT-B3- [NH-PEG2- <sup>D</sup> EvcPAB- G-NHCH2- Dxd]2	-8.21	
LP30	DIBAC-suc- B3-[NH- PEG2- <sup>D</sup> EvcPAB- G-NHCH2- Dxd]2	-3.41	
LP31	B3-[NH- PEG2- <sup>L</sup> EvcPAB- G-NHCH2- Dxd]2	-8.57	
LP32	COT-B3- [NH-PEG2- <sup>L</sup> EvcPAB- G-NHCH2- Dxd]2	-4.15	
qLP33	NH2-PEG3- TCOT-B3- [NH-PEG2- <sup>L</sup> EvcPAB- G-NHCH2- Dxd]2	-8.21	

LP34	DIBAC-suc-B3-[NH-PEG2- <sup>14</sup> EvcPAB-G-NHCH2-Dxd]2	-3.41	
LP35	COT-B3-[NH-PEG2-GGFG-NHCH2-Dxd]2	-4.94	
LP36	COT-B4-[NH-PEG2- <sup>D</sup> EVC PAB-G-NHCH2-Dxd]2	-3.59	
LP37	COT-B4-[NH-PEG2- <sup>14</sup> EVC PAB-G-NHCH2-Dxd]2	-3.59	
LP38	COT-PEG2-B4-[NH-PEG2- <sup>14</sup> EVC PAB-G-NHCH2-Dxd]2	-4.55	

LP39	COT-PEG2-B4-[NH- <sup>14</sup> EVC-PAB-G-NHCH2-Dxd]2	-2.63	
qLP40	NH2-PEG3-TCOT-PEG2-B4-[NH- <sup>14</sup> EVC-PAB-G-NHCH2-Dxd]2	-6.69	
LP41	COT-PEG2-B5-[NH-PEG2- <sup>14</sup> EVC-PAB-G-NHCH2-Dxd]3	-6.84	
qLP42	NH2-PEG3-TCOT-PEG2-B5-[NH-PEG2- <sup>14</sup> EVC-PAB-G-NHCH2-Dxd]3	-11.22	

[0496] В приведенной ниже таблице 11 представлены химические свойства иллюстративных соединений разветвленный линкер2-полезные нагрузки (BL2P) в соответствии с изобретением.

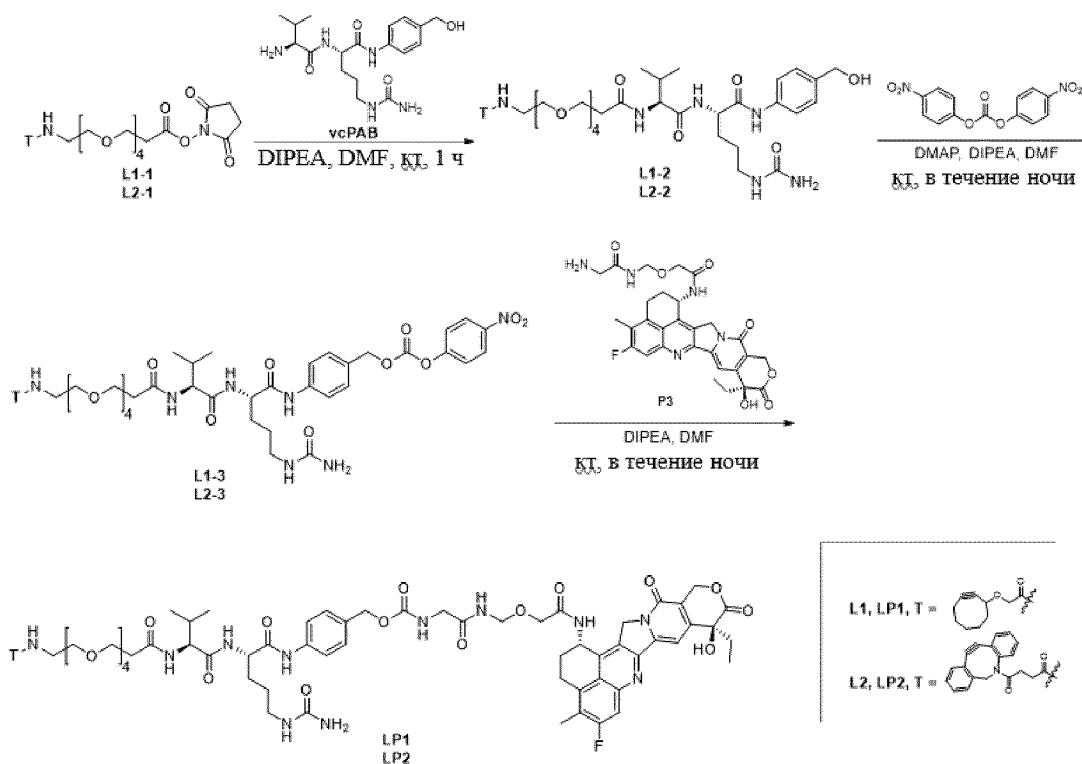
Таблица 11. Химические свойства соединений разветвленный линкер2-полезные нагрузки (BL2P)

#	Название LP	cLogP	MF	MW	Масса
LP23	COT-PEG4-CO-B1-(LP1)(LP2) LP1 = GGFG-NHCH2-Dxd	-2.17	C <sub>132</sub> H <sub>166</sub> F <sub>2</sub> N <sub>22</sub> O <sub>35</sub>	2658.9	887.6 (M/3+H)

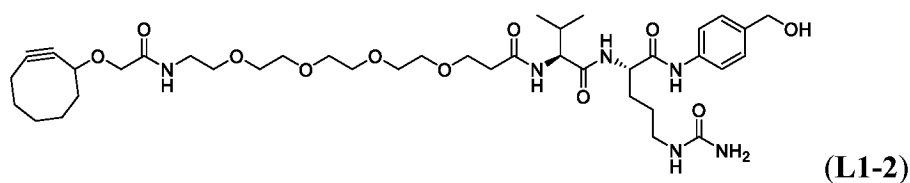
	LP2 = NH <sub>2</sub> -PEG4-GGFG-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d				
LP24	COT-B2-[NH-PEG2-vcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-1.80	C <sub>124</sub> H <sub>155</sub> F <sub>2</sub> N <sub>23</sub> O <sub>34</sub>	2549.7	850.8 (M/3+H)
LP25	COT-B2-[NH-PEG2- <sup>D</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-3.80	C <sub>134</sub> H <sub>169</sub> F <sub>2</sub> N <sub>25</sub> O <sub>40</sub>	2808.0	936.7 (M/3+H)
LP26	DIBAC-suc-B2-[NH-PEG4-vcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-1.25	C <sub>141</sub> H <sub>172</sub> F <sub>2</sub> N <sub>24</sub> O <sub>38</sub>	2849.1	717.3 (M/4+H) (ring-open form) 950.2 (M/3+H) (lactone form)
LP27	B3-[NH-PEG2-vcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-4.22	C <sub>122</sub> H <sub>160</sub> F <sub>2</sub> N <sub>24</sub> O <sub>35</sub>	2560.8	1280.9 (M/2+H)
LP28	COT-B3-[NH-PEG2- <sup>D</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-4.15	C <sub>142</sub> H <sub>186</sub> F <sub>2</sub> N <sub>26</sub> O <sub>43</sub>	2983.2	995.2 (M/3+H)
qLP29	NH <sub>2</sub> -PEG3-TCOT-B3-[NH-PEG2- <sup>D</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-8.21	C <sub>150</sub> H <sub>204</sub> F <sub>2</sub> N <sub>30</sub> O <sub>46</sub>	3201.4	801.3 (M/4+H), 1067.8 (M/3+H)
LP30	DIBAC-suc-B3-[NH-PEG2- <sup>D</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-3.41	C <sub>151</sub> H <sub>187</sub> F <sub>2</sub> N <sub>27</sub> O <sub>43</sub>	3106.3	786.4 (M/4+H) (both ring-open); 781.8 (M/4+H) (mono ring-open); 1036.2 (M/3+H) (lactone)
LP31	B3-[NH-PEG2- <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-8.57	C <sub>132</sub> H <sub>174</sub> F <sub>2</sub> N <sub>26</sub> O <sub>41</sub>	2819.0	940.5 (M/3+H)
LP32	COT-B3-[NH-PEG2- <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-4.15	C <sub>142</sub> H <sub>186</sub> F <sub>2</sub> N <sub>26</sub> O <sub>43</sub>	2983.2	995.5 (M/3+H)
qLP33	NH <sub>2</sub> -PEG3-TCOT-B3-[NH-PEG2- <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-8.21	C <sub>150</sub> H <sub>204</sub> F <sub>2</sub> N <sub>30</sub> O <sub>46</sub>	3201.4	801.0 (M/4+H)
LP34	DIBAC-suc-B3-[NH-PEG2- <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-3.41	C <sub>151</sub> H <sub>187</sub> F <sub>2</sub> N <sub>27</sub> O <sub>43</sub>	3106.3	786.5 (M/4+H) (both ring-open), 1042.3 (M/3+H) (mono ring-open), 1036.1 (M/3+H) (lactone)
LP35	COT-B3-[NH-PEG2-GGFG-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-4.94	C <sub>120</sub> H <sub>148</sub> F <sub>2</sub> N <sub>20</sub> O <sub>33</sub>	2436.6	812.7 (M/3+H)
LP36	COT-B4-[NH-PEG2- <sup>D</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-3.59	C <sub>139</sub> H <sub>179</sub> F <sub>2</sub> N <sub>25</sub> O <sub>42</sub>	2910.1	970.8 (M/3+H)
LP37	COT-B4-[NH-PEG2- <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-3.59	C <sub>139</sub> H <sub>179</sub> F <sub>2</sub> N <sub>25</sub> O <sub>42</sub>	2910.1	970.6 (M/3+H)
LP38	COT-PEG2-B4-[NH-PEG2- <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-4.55	C <sub>150</sub> H <sub>200</sub> F <sub>2</sub> N <sub>26</sub> O <sub>47</sub>	3157.4	936.7 (M/3+H)
LP39	COT-PEG2-B4-[NH- <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-2.63	C <sub>132</sub> H <sub>166</sub> F <sub>2</sub> N <sub>24</sub> O <sub>39</sub>	2750.9	917.3 (M/3+H)
qLP40	NH <sub>2</sub> -PEG3-TCOT-PEG2-B4-[NH- <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>2</sub>	-6.69	C <sub>140</sub> H <sub>184</sub> F <sub>2</sub> N <sub>28</sub> O <sub>42</sub>	2969.2	991.2 (M/3+H)
LP41	COT-PEG2-B5-[NH-PEG2- <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>3</sub>	-6.84	C <sub>210</sub> H <sub>273</sub> F <sub>3</sub> N <sub>38</sub> O <sub>65</sub>	4426.7	1107.6 (M/4+H)
qLP42	NH <sub>2</sub> -PEG3-TCOT-PEG2-B5-[NH-PEG2- <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -D <sub>x</sub> d] <sub>3</sub>	-11.22	C <sub>218</sub> H <sub>291</sub> F <sub>3</sub> N <sub>42</sub> O <sub>68</sub>	4644.9	929.7 (M/5+H), 1161.9 (M/4+H)

[0497] ПРИМЕР 3: Синтез соединений vsPAB-карбаматный линкер-полезные нагрузки  
 [0498] Соединения линкер-полезные нагрузки **LP1** и **LP2** синтезировали, как описано на **схеме 2** и в примерах 3A-3C (для **LP1**) и 2D (для **LP2**) ниже. Исходные материалы **L1-1** (CAS 2226472-26-8) и **L2-3** (CAS 2226472-28-0) синтезировали в соответствии с WO2018089373A2, полностью включенным в настоящий документ посредством ссылки.

**Схема 2. Синтез соединений vsPAB-карбаматный линкер-полезные нагрузки**



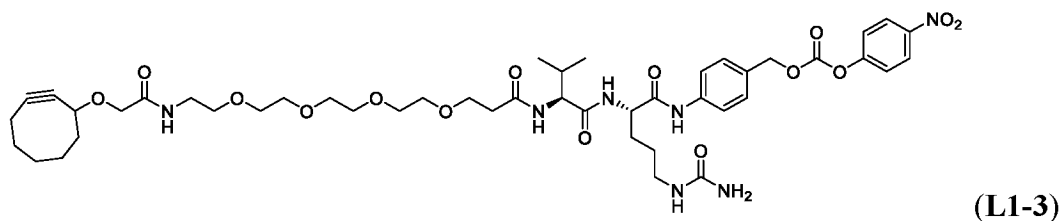
[0499] Пример 3A: *N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(Карбамоиламино)-1-{[4-(гидроксиметил)фенил]-карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)-ацетида]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (**L1-2**)



[0500] К раствору соединения **L1-1** (0,17 г, 0,33 ммоль) в DMF (10 мл) последовательно добавляли DIPEA (0,13 г, 1,0 ммоль) и vsPAB (0,13 г, 0,34 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа. За ходом реакции до ее завершения следили с помощью LCMS. Полученную смесь непосредственно очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-80% ацетонитрила в воде) с получением

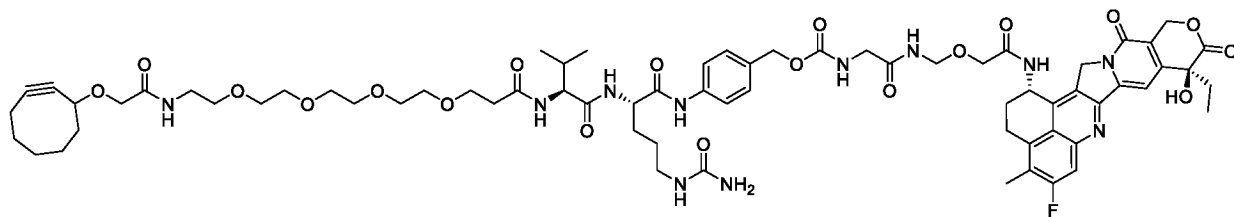
соединения **L1-2** (0,18 г, выход 70%) в виде бесцветного масла. ESI  $m/z$ : 791.3 ( $M + H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  9.91 (s, 1H), 8.11 (d,  $J = 8.4$  Гц, 1H), 7.89 (d,  $J = 8.8$  Гц, 1H), 7.61 (t,  $J = 5.6$  Гц, 1H), 7.55 (d,  $J = 8.4$  Гц, 2H), 7.23 (d,  $J = 8.4$  Гц, 2H), 5.98 (t,  $J = 5.6$  Гц, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.10 (br s, 1H), ), 4.43 (s, 2H), 4.39-4.37 (m, 1H), 4.30-4.21 (m, 2H), 3.87 (d,  $J = 14.8$  Гц, 1H), 3.75(d,  $J = 14.8$  Гц, 1H), 3.62-3.58 (m, 2H), 3.50-3.46 (m, 12H), 3.43 (t,  $J = 6.0$  Гц, 2H), 3.27-3.22 (m, 2H), 3.06-2.92 (m, 2H), 2.41-2.32 (m, 2H), 2.26-2.05 (m, 3H), 1.99-1.66 (m, 6H), 1.62-1.55 (m, 3H), 1.44-1.35 (m, 3H), 0.89 (d,  $J = 6.8$  Гц, 3H), 0.83 (d,  $J = 6.8$  Гц, 3H) ppm.

**[0501]** Пример 3В: {4-[(2S)-5-(Карбамоиламино)-2-[(2S)-2-{1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}-3-метилбутанамидо]-пентанамидо]фенил}метил-4-нитрофенилкарбонат (**L1-3**)



**[0502]** Суспензию соединения **L1-2** (80 мг, 0,10 ммоль), DMAP (12 мг, 0,10 ммоль) и DIPEA (26 мг, 0,20 ммоль) в сухом DMF (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут перед добавлением бис(4-нитрофенил)карбоната (61 мг, 0,20 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. За ходом реакции до ее завершения следили с помощью LCMS. Полученную смесь непосредственно очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-80% ацетонитрила в воде) с получением соединения **L1-3** (53 мг, выход 55%) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 956,3 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

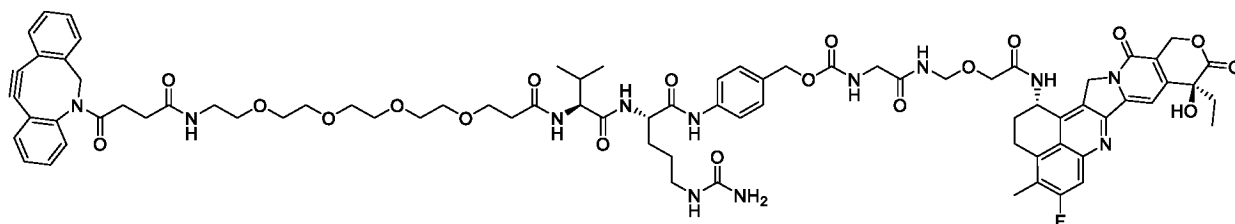
**[0503]** Пример 3С: {4-[(2S)-5-(Карбамоиламино)-2-[(2S)-2-{1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}-3-метилбутанамидо]-пентанамидо]фенил}метил N-({[({[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,<sup>14</sup>.0<sup>4</sup>,<sup>13</sup>.0<sup>6</sup>,<sup>11</sup>.0<sup>20</sup>,<sup>24</sup>]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил}карбамоил}метокси)метил}карбамоил}метил)-карбамат (**LP1**)



(LP1)

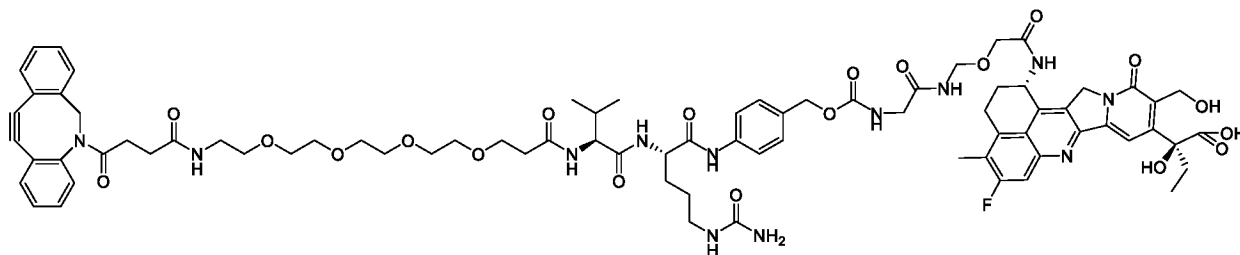
**[0504]** К желтому раствору соединения **L1-3** (16 мг, 17 мкмоль) и P3 (12 мг, 17 мкмоль) в сухом DMF (2 мл) добавляли DIPEA (6,5 мг, 51 мкмоль), и прозрачный реакционный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. За ходом реакции до ее завершения следили с помощью LCMS. Полученную смесь очищали непосредственно флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-60% ацетонитрила в водн. TFA (0,01%)) с получением соединений линкер-полезная нагрузка **LP1** (15 мг, выход 63% в виде соли TFA) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 698,8 ( $M/2+H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  9.99 (s, 1H), 8.80 (t,  $J = 6.8$  Гц, 1H), 8.50 (d,  $J = 9.2$  Гц, 1H), 8.12 (d,  $J = 7.2$  Гц, 1H), 7.87 (d,  $J = 8.8$  Гц, 1H), 7.79 (d,  $J = 10.8$  Гц, 1H), 7.62-7.58 (m, 3H), 7.42 (t,  $J = 6.0$  Гц, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.28 (d,  $J = 8.4$  Гц, 2H), 6.53 (br s, 1H), 5.98 (t,  $J = 5.2$  Гц, 1H), 5.63-5.57 (m, 1H), 5.46-5.37 (m, 3H), 5.21 (s, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.63 (d,  $J = 6.4$  Гц, 2H), 4.41-4.35 (m, 1H), 4.29-4.21 (m, 2H), 4.02 (s, 2H), 3.87 (d,  $J = 14.4$  Гц, 1H), 3.75 (d,  $J = 14.8$  Гц, 1H), 3.63-3.58 (m, 4H), 3.50-3.48 (m, 12H), 3.46-3.41 (m, 2H), 3.27-3.24 (m, 2H), 3.23-3.12 (m, 2H), 3.07-2.91 (m, 2H), 2.47-2.45 (m, 0.5H), 2.41-2.33 (m, 4.5H), 2.25-2.04 (m, 5H), 1.99-1.69 (m, 9H), 1.63-1.54 (m, 3H), 1.44-1.33 (m, 3H), 0.88-0.82 (m, 9H) ppm. (Протон TFA не наблюдался). <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  -74 (TFA), -111 (Ar-F) ppm.

**[0505]** Пример 3D: {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]}гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)-пентанамидо]фенил}метил *N*-({{[[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2,14</sup>.0<sup>4,13</sup>.0<sup>6,11</sup>.0<sup>20,24</sup>]}тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}-метил)карбамат (**LP2**)



(LP2)

[0506] Следуя методике получения **LP1**, за исключением замены **L1-3** на **L2-3**, получали соединение линкер-полезная нагрузка **LP2** (12 мг, выход 46%) в виде смеси лактонного продукта (**LP2**, изображенного выше) и продукта раскрытия цикла (**LP2-RO**, изображенного ниже) в виде белого твердого вещества после очистки флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% метанола в *водн.* бикарбонате аммония (10 мМ)).



(**LP2-RO**)

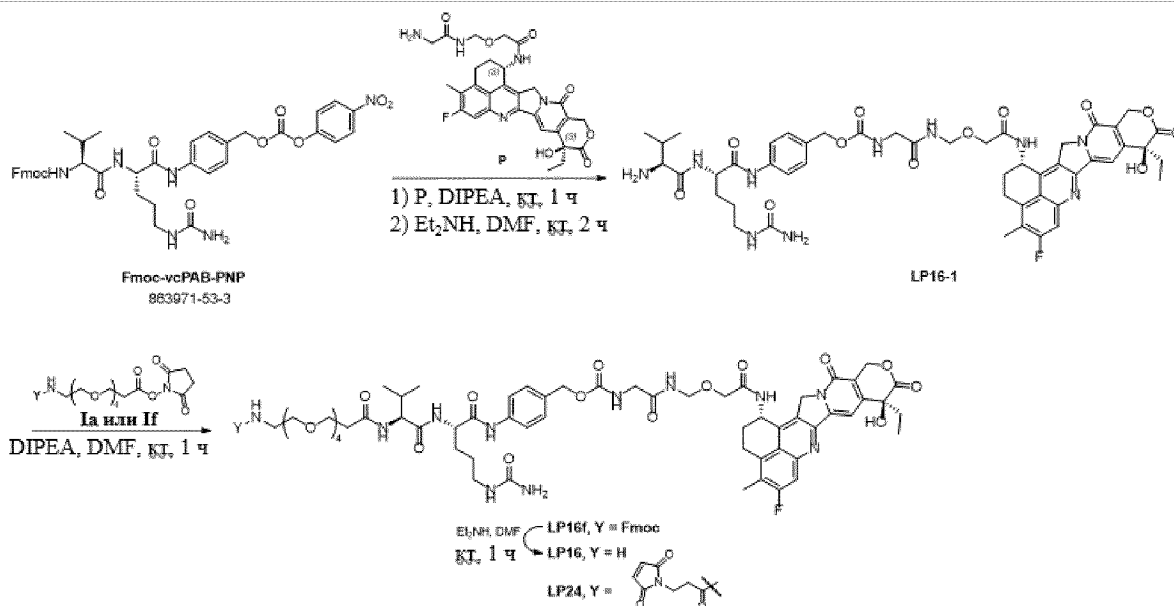
[0507] Лактон **LP2**: чистота HPLC: 67%, время удерживания: 7,41 мин, ESI m/z: 507,3 ( $M/3+H$ )<sup>+</sup>, 760,5 ( $M/2+H$ )<sup>+</sup>; продукт раскрытия цикла **LP2-RO**: чистота HPLC: 33%, время удерживания: 6,61 мин, ESI m/z: 513,3 ( $M/3+H$ )<sup>+</sup>, 769,5 ( $M/2+H$ )<sup>+</sup>.

[0508] Смесь лактонного продукта и продукта раскрытия цикла <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 9.99 (s, 1H), 8.80 (t, *J* = 6.4 Гц, 1H), 8.50 (d, *J* = 8.8 Гц, 1H), 8.12 (d, *J* = 7.2 Гц, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.4 Гц, 1H), 7.80-7.75 (m, 2H), 7.69-7.67 (m, 1H), 7.63-7.58 (m, 3H), 7.51-7.46 (m, 3H), 7.45-7.33 (m, 3H), 7.32-7.26 (m, 4H), 6.53 (s, 1H), 5.98 (t, *J* = 6.0 Гц, 1H), 5.63-5.57 (m, 1H), 5.42 (s, 4H), 5.21 (s, 2H), 5.03 (d, *J* = 14.0 Гц, 1H), 4.93 (s, 2H), 4.63 (d, *J* = 6.8 Гц, 2H), 4.41-4.35 (m, 1H), 4.25-4.21 (m, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.62-3.57 (m, 5H), 3.48-3.45 (m, 12H), 3.31-3.28 (m, 2H), 3.23-3.14 (m, 2H), 3.11-3.07 (m, 2H), 3.05-2.98 (m, 1H), 2.96-2.91 (m, 1H), 2.60-2.55 (m, 1H), 2.46-2.44 (m, 1H), 2.39 (s, 3H), 2.35-2.33 (m, 1H), 2.26-2.15 (m, 3H), 2.03-1.94 (m, 2H), 1.88-1.67 (m, 4H), 1.63-1.57 (m, 1H), 1.46-1.33 (m, 2H), 0.88-0.81 (m, 9H) ppm. <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ -111 ppm

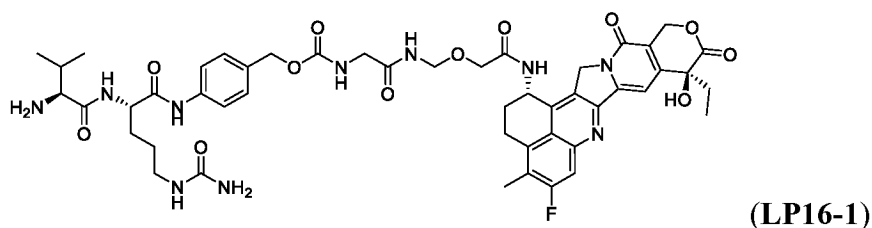
[0509] Соединение линкер-полезные нагрузки **LP16** и **LP17** синтезировали, как описано на **схеме 3** и в примерах 3E-3F (для **LP16**) и 3G (для **LP17**) ниже.

Схема 3. Синтез LP16 и LP17





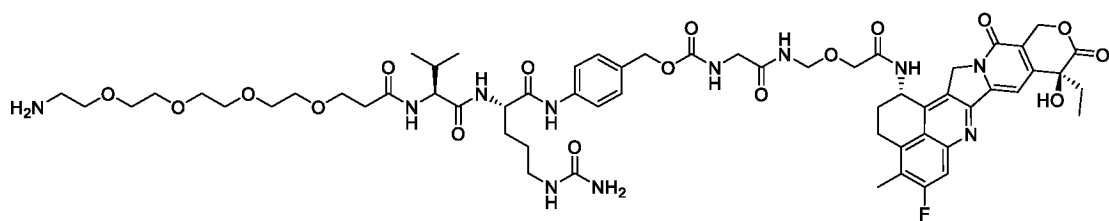
[0510] Пример 3E: {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-Амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)-пентанамидо]фенил}метил *N*-({[[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-дизагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}-метил)карбамат (**LP16-1**)



[0511] К раствору полезной нагрузки **P3** (0,11 г, 0,15 ммоль) в DMF (2 мл) добавляли DIPEA (39 мг, 0,30 ммоль) и Fmoc-vcPAB-PNP (CAS: 863971-53-3, 77 мг, 0,10 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до тех пор, пока смесь не становилась прозрачной и **P** не израсходовался полностью по данным LCMS. Полученный раствор разделяли флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-70% ацетонитрила в водн. TFA (0,01%)) с получением **Fmoc-LP16-1** (98 мг, ESI *m/z*: 494 ( $M_{D_{X,D}}+H$ )<sup>+</sup>, 714,2 ( $M - M_{D_{X,D}} + H$ )<sup>+</sup> в виде светло-желтого твердого вещества, которое растворяли в сухом DMF (4,5 мл). К раствору медленно добавляли диэтиламин (0,5 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Fmoc по данным LCMS. Летучие вещества удаляли в вакууме, и остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-40% ацетонитрила в водн. TFA (0,01%)) с получением **LP16-1** (соль TFA, 45 мг, выход 41% из **P3**). ESI *m/z*: 493.1 ( $M/2 + H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.20 (s, 1H), 8.80

(t,  $J = 6.8$  Гц, 1H), 8.68 (d,  $J = 7.6$  Гц, 1H), 8.50 (d,  $J = 8.8$  Гц, 1H), 8.09-8.01 (m, 3H), 7.79 (d,  $J = 10.8$  Гц, 1H), 7.58 (d,  $J = 8.4$  Гц, 2H), 7.41 (t,  $J = 6.0$  Гц, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.29 (d,  $J = 8.4$  Гц, 2H), 6.53 (s, 1H), 6.05 (t,  $J = 5.6$  Гц, 1H), 5.63-5.57 (m, 1H), 5.54-5.45 (m, 2H), 5.42-5.41 (m, 2H), 5.21 (s, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.63 (d,  $J = 6.4$  Гц, 2H), 4.55-4.50 (m, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.69-3.61 (m, 3H), 3.24-3.12 (m, 1H), 3.08-2.94 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.23-2.18 (m, 2H), 2.14-2.03 (m, 1H), 1.90-1.81 (m, 2H), 1.78-1.68 (m, 1H), 1.64-1.53 (m, 1H), 1.47-1.36 (m, 2H), 0.96 (d,  $J = 3.2$  Гц, 3H), 0.94 (d,  $J = 3.2$  Гц, 3H), 0.87 (t,  $J = 7.6$  Гц, 3H) ppm. (Протон TFA не был выявлен.)  $^{19}\text{F}$  ЯМР (376 МГц,  $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$  at -111, -73 ppm.

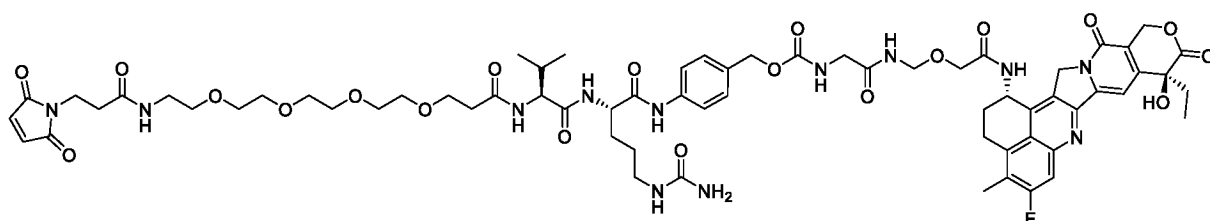
**[0512]** Пример 3F: {4-[(2S)-2-[(2S)-2-(1-Амино-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо)-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-({[({[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил)карбамат (**LP16**)



**[0513]** К раствору **LP16-1** (16 мг, 15 мкмоль) в безводном DMF (1 мл) добавляли DIPEA (4 мг, 29 мкмоль) до достижения значения pH от 8,0 до 9,0, а затем к реакционной смеси добавляли раствор соединения **If** (CAS 1314378-14-7, 9 мг, 15 мкмоль) в безводном DMF (1 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного израсходования исходных материалов по данным LCMS. Полученный раствор разделяли флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в водн. TFA (0,01%)) с получением **LP16f** (18 мг, ESI m/z: 728,3 (M/2 + H)<sup>+</sup>) в виде белого твердое вещество, которое растворяли в безводном DMF (1,9 мл). К раствору добавляли диэтиламин (0,1 мл) и желтый реакционный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение получаса до полного удаления Fmoc по данным LCMS. Полученный раствор концентрировали в вакууме, и остаток очищали препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в водн. муравьиной кислоте (0,01%)) с получением соединения линкер-полезная нагрузка **LP16** (6 мг, выход 34%) в виде светло-желтого твердого вещества. ESI m/z: 616.9 (M/2 + H)<sup>+</sup>.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$  10.03 (s, 1H), 8.80 (d,  $J = 6.8$  Гц, 1H), 8.51 (d,  $J = 9.2$  Гц, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.15 (d,  $J = 6.8$  Гц, 1H), 7.90 (d,  $J = 8.8$  Гц, 1H), 7.79 (d,  $J = 6.8$  Гц, 1H), 7.60 (d,  $J = 8.0$  Гц,

2H), 7.42 (t,  $J = 6.4$  Гц, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.27 (d,  $J = 8.0$  Гц, 2H), 6.56-6.50 (m, 1H), 6.05-6.01 (m, 1H), 5.63-5.58 (m, 1H), 5.43 (s, 4H), 5.21 (s, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.63 (d,  $J = 6.8$  Гц, 2H), 4.42-4.35 (m, 1H), 4.23 (t,  $J = 7.6$  Гц, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.63-3.58 (m, 4H), 3.53-3.49 (m, 12H), 3.46-3.43 (m, 2H), 3.18-3.15 (m, 2H), 3.06-2.93 (m, 2H), 2.79-2.76 (m, 2H), 2.42-2.36 (m, 5H), 2.24-2.12 (m, 2H), 2.03-1.93 (m, 1H), 1.89-1.81 (m, 2H), 1.74-1.65 (m, 1H), 1.65-1.54 (m, 1H), 1.48-1.31 (m, 3H), 0.89-0.82 (m, 9H) ppm.  $^{19}\text{F}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$  -111 ppm.

**[0514]** Пример 3G: {4-[(2*S*)-5-(Карбамоиламино)-2-[(2*S*)-2-{1-[3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)пропанамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метил *N*-({{[[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2,14</sup>.0<sup>4,13</sup>.0<sup>6,11</sup>.0<sup>20,24</sup>]-тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]-карбамоил}метил)карбамат (**LP17**)

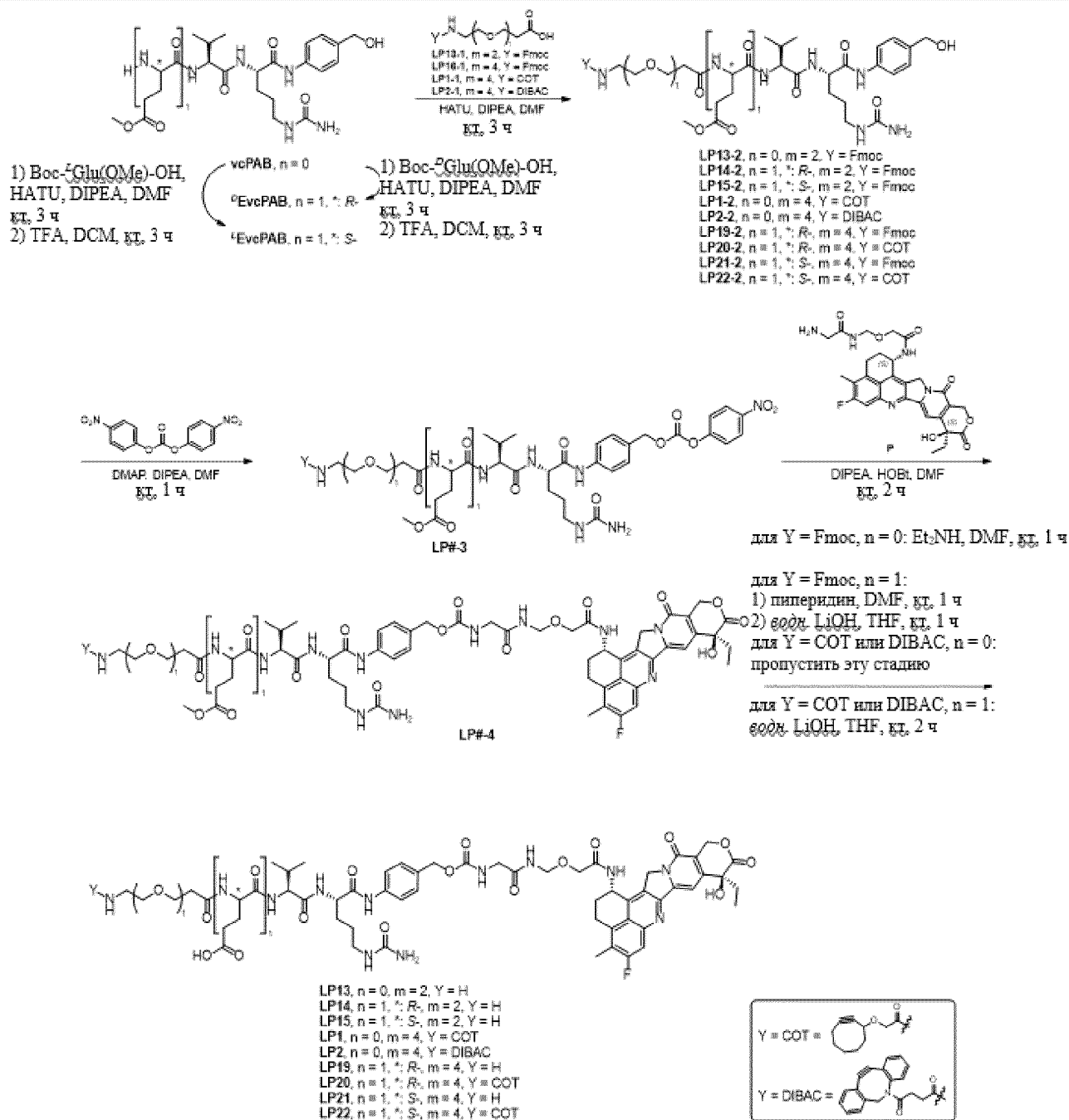


(**LP17**)

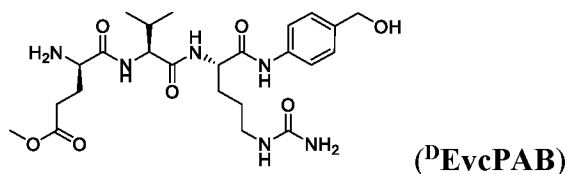
**[0515]** К желтому раствору **LP16-1** (30 мг, 30 мкмоль) в безводном DMF (1,5 мл) добавляли DIPEA (8 мг, 62 мкмоль) и **Ia** (CAS: 756525-99-2, коммерческий, 16 мг, 30 мкмоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного расходования исходных материалов по данным LCMS. Полученную смесь очищали непосредственно препаративной HPLC (0-100% ацетонитрила в водн. TFA (0,05%)) с получением **LP17** (соль TFA, 15 мг, выход 38%) в виде светло-желтого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 692.4 ( $M/2 + H$ ).  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$  9.99 (s, 1H), 8.79 (t,  $J = 6.8$  Гц, 1H), 8.50 (d,  $J = 8.4$  Гц, 1H), 8.11 (d,  $J = 8.0$  Гц, 1H), 8.02 (t,  $J = 6.0$  Гц, 1H), 7.87 (d,  $J = 8.8$  Гц, 1H), 7.79 (d,  $J = 10.8$  Гц, 1H), 7.59 (d,  $J = 8.4$  Гц, 2H), 7.41 (t,  $J = 6.0$  Гц, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.28 (d,  $J = 8.4$  Гц, 2H), 7.00 (s, 2H), 6.52 (br s, 1H), 5.98 (t,  $J = 6.0$  Гц, 1H), 5.63-5.57 (m, 1H), 5.43-5.41 (m, 4H), 5.21 (s, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.63 (d,  $J = 6.8$  Гц, 2H), 4.43-4.34 (m, 1H), 4.25-4.21 (m, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.61-3.57 (m, 6H), 3.49-3.48 (m, 12H), 3.21-3.12 (m, 4H), 3.05-2.91 (m, 4H), 2.49-2.39 (m, 5H), 2.33 (t,  $J = 7.2$  Гц, 2H), 2.22-2.14 (m, 2H), 2.02-1.94 (m, 1H), 1.89-1.80 (m, 2H), 1.75-1.65 (m, 1H), 1.65-1.54 (m, 1H), 1.49-1.32 (m, 2H), 0.87-0.82 (m, 9H) ppm. (Протон TFA не был выявлен.)  $^{19}\text{F}$  ЯМР (376 МГц,  $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$  -111, -73 ppm.

[0516] Соединения линкер-полезные нагрузки LP1, LP2, LP13, LP14, LP15, LP19, LP20, LP21 и LP22 синтезировали, как описано на **схеме 4** и в примерах ЗН-ЗАР ниже.

[0517] Схема 4. Синтез соединений линейный vcPAB-линкер-РЗ LP1, LP2, LP13-LP15 и LP19-LP22

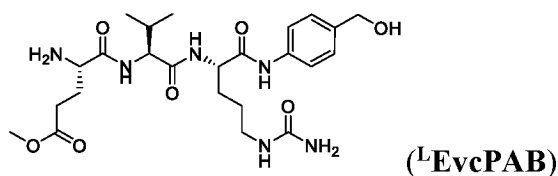


[0518] Пример ЗН: Метил (4R)-4-амино-4-{(1S)-1-{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-бутаноат (<sup>D</sup>EvcpAB)



[0519] К раствору **vcPAB** (0,25 г, 0,95 ммоль) в DMF (3 мл) добавляли DIPEA (0,37 г, 2,9 ммоль) и HATU (0,25 г, 0,95 ммоль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут до добавления Вос-DGlu(OMe)-OH (0,40 г, 1,1 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-70% ацетонитрила в воде) с получением Вос-DEvcPAB (0,35 г, ESI m/z: 623,4 (M+H)<sup>+</sup>) в виде белого твердого вещества, которое растворяли в DCM (5 мл). К раствору добавляли TFA (1,5 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Вос, что контролировали с помощью LCMS. Летучие вещества удаляли в вакууме и остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (10-40% ацетонитрила в воде) с получением <sup>D</sup>EvcPAB (0,27 г, выход 48%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 523,4 (M+H)<sup>+</sup>.

[0520] Пример 3I: Метил (4S)-4-амино-4-{[(1S)-1-{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-1-[[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-бутаноат (<sup>L</sup>EvcPAB)



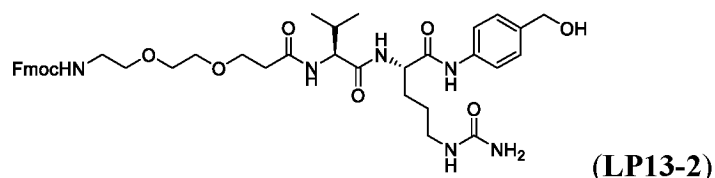
[0521] Следуя методике, аналогичной методике получения <sup>D</sup>EvcPAB, за исключением использования Вос-LGlu(OMe)-OH вместо Вос-DGlu(OMe)-OH, получали промежуточное соединение <sup>L</sup>EvcPAB (0,18 г, выход 49%) в виде светло-желтого твердого вещества. ESI m/z: 523,3 (M+H)<sup>+</sup>, 545,3 (M+Na)<sup>+</sup>.

[0522] Пример 3J: Общая методика получения LP#-2 и синтеза LP13-2, LP16-2, LP1-2 и LP2-2

[0523] К раствору LP13-1, LP16-1, LP1-1 или LP2-1 (1,0 экв.) в DMF (0,25 мМ) добавляли DIPEA (3,3 экв.) и HATU (1,0 экв.) и смесь перемешивали при комнатной температуре или в течение 10 минут перед добавлением **vcPAB** или **EvcPAB** (1,1-1,5 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь непосредственно очищали

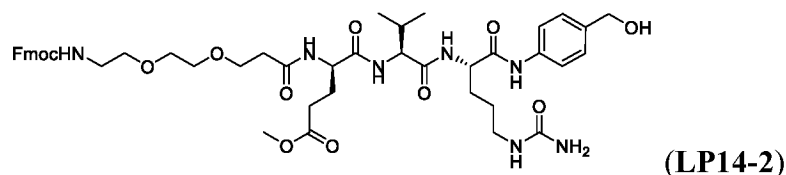
флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в воде) с получением линкера **LP#-2 (LP13-2, LP16-2, LP1-2 или LP2-2)** в виде белого твердого вещества.

**[0524]** Пример 3К: (9H-Флуорен-9-ил)метил N-{2-[2-(2-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}этоксид)этоксид)этил]карбамат (**LP13-2**)



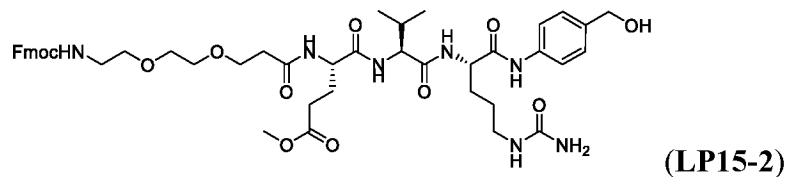
**[0525]** Следуя общей методике с использованием **vcPAB** (0,85 г, 2,2 ммоль) и **LP13-1** (0,60 г, 1,5 ммоль), получали соединение **LP13-2** (1,0 г, выход 87%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 761,3 (M+H)<sup>+</sup>, 783,3 (M+Na)<sup>+</sup>.

**[0526]** Пример 3L: Метил (4R)-4-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-(3-{2-[2-({[(9H-флуорен-9-ил)метокси]карбонил}амино)этоксид)этоксид}пропанамидо)-бутаноат (**LP14-2**)



**[0527]** Следуя общей процедуре, начиная с **LP14-1** (0,19 г, 0,37 ммоль) и **DEvcPAB** (0,14 г, 0,34 ммоль), получали линкер **LP14-2** (0,20 г, выход 66%) в виде белого твердого вещества после очистки флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-70% ацетонитрила в воде). ESI m/z: 904,4 (M+H)<sup>+</sup>.

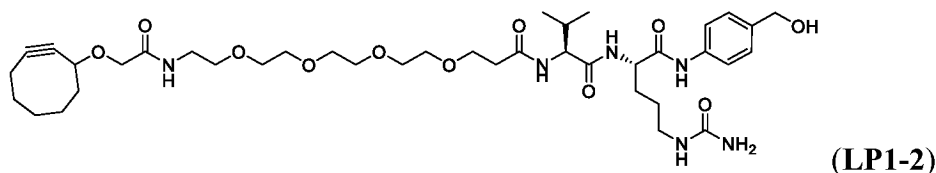
**[0528]** Пример 3М: Метил (4S)-4-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-(3-{2-[2-({[(9H-флуорен-9-ил)метокси]карбонил}амино)этоксид)этоксид}пропанамидо)-бутаноат (**LP15-2**)



**[0529]** Следуя общей методике, начиная с **LP13-1** (0,45 г, 1,1 ммоль) и **<sup>L</sup>EvсPAB** (0,65 г, 1,2 ммоль), получали линкер **LP15-2** (0,70 г, выход 69%) в виде белого твердого

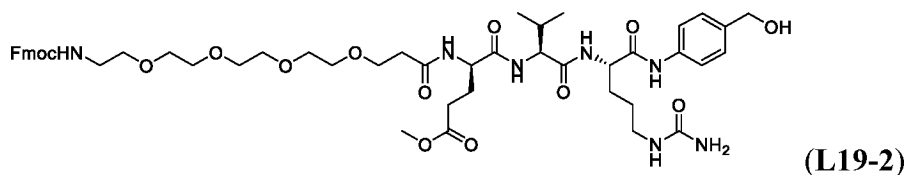
вещества после очистки флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в воде). ESI m/z: 904.5 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 9.94 (s, 1H), 8.15-8.07 (m, 2H), 7.91-7.87 (m, 2H), 7.78 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 7.69 (d, J = 7.2 Гц, 2H), 7.55-7.52 (m, 2H), 7.41 (t, J = 7.6 Гц, 2H), 7.35-7.30 (m, 3H), 7.23 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 6.00-5.93 (m, 1H), 5.42 (bs, 1H), 4.42 (s, 2H), 4.39-4.34 (m, 2H), 4.31-4.27 (m, 2H), 4.24-4.16 (m, 2H), 3.60-3.56 (m, 5H), 3.47 (s, 3H), 3.36-3.34 (m, 2H), 3.14-3.10 (m, 2H), 3.04-3.00 (m, 1H), 2.96-2.91 (m, 1H), 2.44-2.38 (m, 2H), 2.35-2.29 (m, 4H), 2.00-1.95 (m, 1H), 1.92-1.86 (m, 1H), 1.77-1.66 (m, 2H), 1.61-1.55 (m, 1H), 1.46-1.34 (m, 2H), 1.25-1.18 (m, 1H), 0.87-0.80 (m, 6H) ppm.

**[0530]** Пример 3N: N-[(1S)-1-{(1S)-4-(Карбамоиламино)-1-{[4-(гидроксиметил)фенил]-карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)-ацетамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (**LP1-2**)



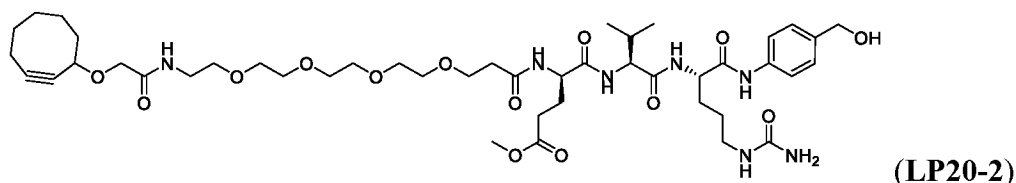
**[0531]** Следуя общей методике, начиная с **LP1-1** и **vcPAB** (3,3 г, 8,0 ммоль), получали линкер **LP1-2** (4,3 г, выход 68%) в виде белого твердого вещества после очистки флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в воде). ESI m/z: 791,5 (M+H)<sup>+</sup>.

**[0532]** Пример 3O: Метил (4R)-4-{(1S)-1-{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-[1-((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил]амино)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]бутаноат (**LP19-2**)



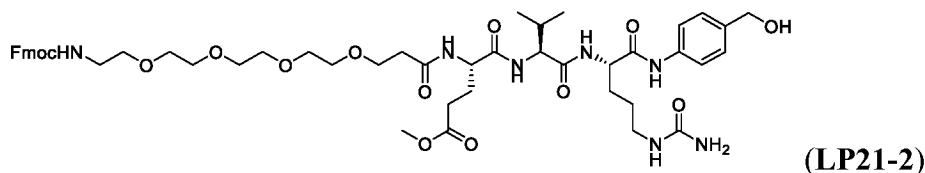
**[0533]** Следуя общей методике, начиная с **DEvcPAB** (0,17 г, 0,34 ммоль) и **LP16-1** (0,17 г, 0,34 ммоль), получали линкер **LP19-2** (0,18 г, выход 53%) в виде светло-желтого твердого вещества. ESI m/z: 993,5 (M+H)<sup>+</sup>.

**[0534]** Пример 3P: Метил (4R)-4-{(1S)-1-{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-[1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]бутаноат (**LP20-2**)



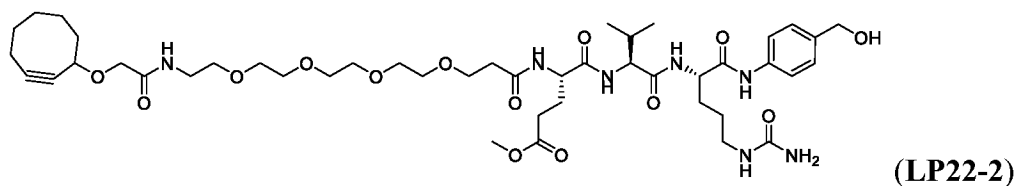
**[0535]** Следуя общей методике, начиная с <sup>D</sup>EvсРАВ (0,28 г, 0,54 ммоль) и LP1-1 (0,25 г, 0,48 ммоль), получали соединение LP20-2 (0,20 г, выход 44%) в виде светло-желтого твердого вещества. ESI m/z: 934,5 (M+H)<sup>+</sup>.

**[0536]** Пример 3Q: Метил (4S)-4-{[(1S)-1-{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-[1-({[(9H-флуорен-9-ил)метокси]карбонил}амино)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]бутаноат (LP21-2)



**[0537]** Следуя общей методике, начиная с <sup>L</sup>EvсРАВ (0,20 г, 0,38 ммоль) и LP16-1 (0,19 г, 0,39 ммоль), получали соединение LP21-2 (0,20 г, выход 53%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 992.5 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.94 (s, 1H), 8.13 (d, J = 7.2 Гц, 1H), 8.08 (d, J = 7.6 Гц, 1H), 7.89 (d, J = 7.2 Гц, 2H), 7.77 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 7.70 (d, J = 7.6 Гц, 2H), 7.54 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 7.44-7.39 (m, 2H), 7.35-7.31 (m, 3H), 7.23 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 5.98 (brs, 1H), 5.41 (br s, 1H), 4.43 (s, 2H), 4.39-4.33 (m, 2H), 4.31-4.29 (m, 2H), 4.23-4.17 (m, 2H), 3.63-3.57 (m, 6H), 3.50-3.46 (m, 12H), 3.41 (t, J = 6.0 Гц, 2H), 3.16-3.10 (m, 2H), 3.10-3.00 (m, 1H), 2.99-2.89 (m, 1H), 2.40-2.30 (m, 4H), 2.02-1.87 (m, 2H), 1.78-1.55 (m, 3H), 1.48-1.32 (m, 2H), 0.86 (d, J = 6.8 Гц, 3H), 0.83 (d, J = 6.8 Гц, 3H) ppm. (протон бензильного спирта не был выявлен).

**[0538]** Пример 3R: Метил (4S)-4-{[(1S)-1-{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-[1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-бутаноат (LP22-2)



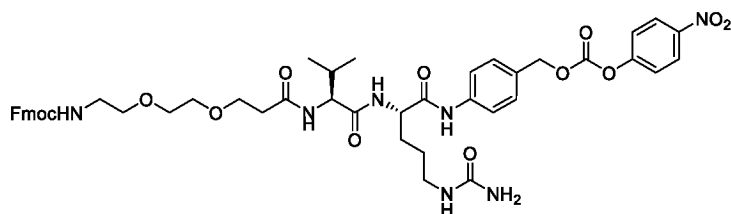


[0539] Следуя общей методике, начиная с **L<sup>1</sup>EvсРАВ** (0,10 г, 0,19 ммоль) и **LP1-1** (81 мг, 0,19 ммоль), получали соединение **LP22-2** (0,11 г, выход 63%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 934,5 (M+H)<sup>+</sup>.

[0540] ПРИМЕР 3S: Общая методика для LP#-3

[0541] К раствору **LP#-2** (1,0 экв.) в DMF (0,15 мМ) добавляли DMAP (1,0 экв.), DIPEA (3,0 экв.) и бис(4-нитрофенил)карбонат (3,0 экв.), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-60% ацетонитрила в воде) с получением **LP#-3** в виде светло-желтого масла.

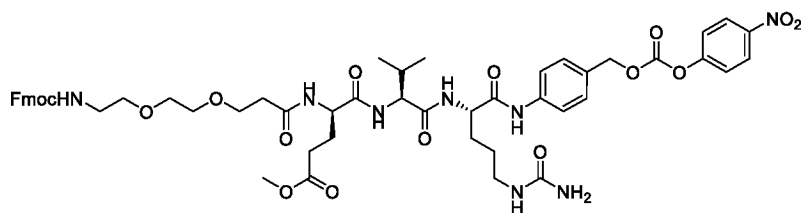
[0542] Пример 3Т: {4-[(2S)-5-(Карбамоиламино)-2-[(2S)-2-(3-{2-[2-({[(9H-флуорен-9-ил)метокси]карбонил}амино)этокси]этокси}пропанамидо)-3-метилбутанамидо]-пентанамидо]фенил}метил-4-нитрофенилкарбонат (**LP13-3**)



(**LP13-3**)

[0543] Следуя общей методике, начиная с **LP13-2** (0,50 г, 0,66 ммоль), получали линкер **LP13-3** (0,40 г, выход 68%) в виде светло-желтого масла, которое затвердевало на воздухе. ESI m/z: 926,5 (M+H)<sup>+</sup>, 948,4 (M+Na)<sup>+</sup>.

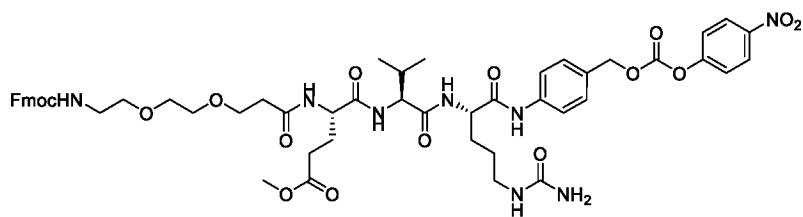
[0544] Пример 3U: Метил (4R)-4-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{4-({[(4-нитрофенокси)карбонил]окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-(3-{2-[2-({[(9H-флуорен-9-ил)метокси]карбонил}амино)-этокси]этокси}пропанамидо)бутаноат (**LP14-3**)



(**LP14-3**)

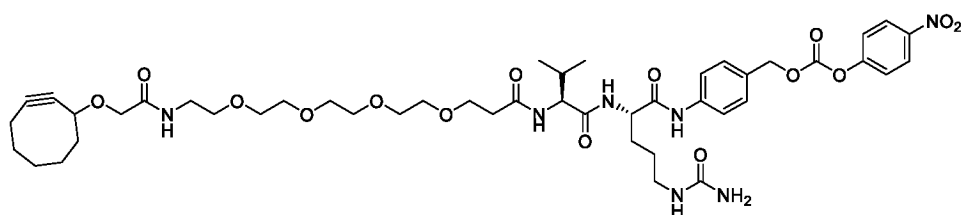
[0545] Следуя общей методике, начиная с **LP14-2** (0,20 г, 0,22 ммоль), получали линкер **LP14-3** (0,18 г, выход 77%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 1069,2 (M+H)<sup>+</sup>.

[0546] Пример 3V: Метил (4S)-4-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{4-({[(4-нитрофенокси)карбонил]окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-(3-{2-[2-({[(9H-флуорен-9-ил)метокси]карбонил}амино)-этокси]этокси}пропанамидо)бутаноат (**LP15-3**)

**(LP15-3)**

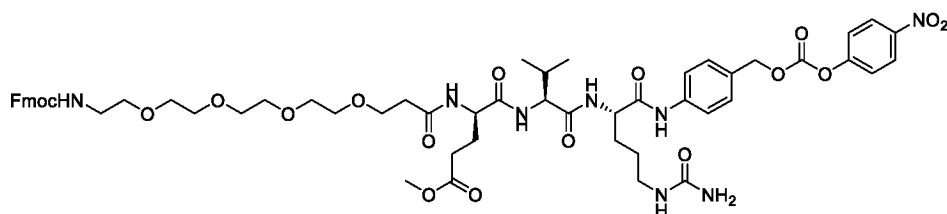
[0547] Следуя общей методике, начиная с **LP15-2** (0,70 г, 0,77 ммоль), получали линкер **LP15-3** (0,50 г, выход 61%) в виде светло-желтого масла. ESI m/z: 1069,5 (M+H)<sup>+</sup>.

[0548] Пример 3W: {4-[(2S)-5-(Карбамоиламино)-2-[(2S)-2-{1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}-3-метилбутанамидо]-пентанамидо]фенил}метил4-нитрофенилкарбонат (**LP1-3**)

**(LP1-3)**

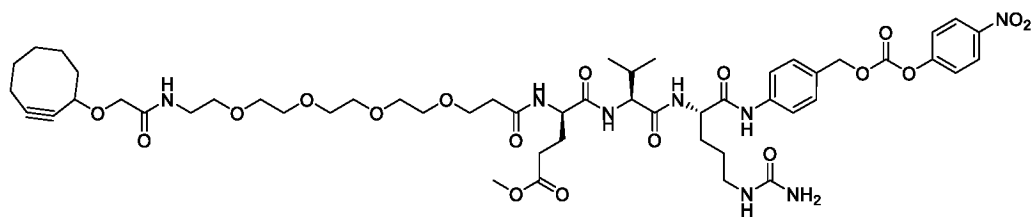
[0549] Следуя общей методике, начиная с **LP1-2** (2,3 г, 2,9 ммоль), получали линкер **LP1-3** (1,9 г, выход 69%) в виде светло-желтого масла. ESI m/z: 978,5 (M + Na)<sup>+</sup>.

[0550] Пример 3X Метил (4R)-4-{{{(1S)-1-{{{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{4-({{(4-нитрофенокси)карбонил]окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-[1-({(9H-флуорен-9-ил)метокси]карбонил}амино)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]бутаноат (**LP19-3**)

**(LP19-3)**

[0551] Следуя общей методике, начиная с **LP19-2** (0,18 г, 0,18 ммоль), получали линкер **LP19-3** (0,18 г, выход 86%) в виде масла светло-желтого цвета. ESI m/z: 1157,5 (M+H)<sup>+</sup>.

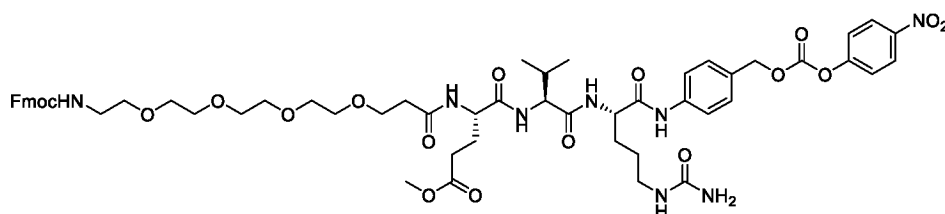
[0552] Пример 3Y: Метил (4R)-4-{{{(1S)-1-{{{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{4-({{(4-нитрофенокси)карбонил]окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-{1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}бутаноат (**LP20-3**)



(LP20-3)

[0553] Следуя общей методике, начиная с **LP20-2** (0,20 г, 0,21 ммоль), получали линкер **LP20-3** (0,20 г, выход 85%) в виде твердого вещества желтого цвета. ESI  $m/z$ : 1099,6 (M+H)<sup>+</sup>.

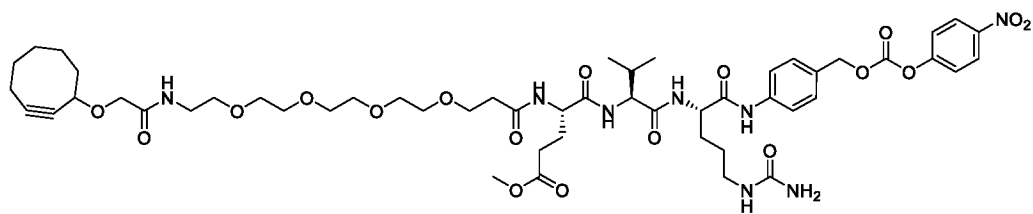
[0554] Пример 3Z: Метил (4S)-4-{[(1S)-1-{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{4-({[(4-нитрофенокси)карбонил]окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-[1-({(9H-флуорен-9-ил)метокси}карбонил)амино]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]бутаноат (**LP21-3**)



(LP21-3)

[0555] Следуя общей методике, начиная с **LP21-2** (0,20 г, 0,20 ммоль), получали линкер **LP21-3** (0,19 г, выход 81%) в виде светло-желтого масла. ESI  $m/z$ : 1157.4 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.11 (s, 1H), 8.32 (d,  $J$  = 8.8 Гц, 2H), 8.17 (d,  $J$  = 7.2 Гц, 1H), 8.09 (d,  $J$  = 8.0 Гц, 1H), 7.89 (d,  $J$  = 7.6 Гц, 2H), 7.77 (d,  $J$  = 8.4 Гц, 1H), 7.69 (d,  $J$  = 7.2 Гц, 2H), 7.65 (d,  $J$  = 8.4 Гц, 2H), 7.57 (d,  $J$  = 9.2 Гц, 2H), 7.44-7.40 (m, 4H), 7.35-7.31 (m, 3H), 5.99 (br s, 1H), 5.42 (br s, 1H), 5.25 (s, 2H), 4.42-4.36 (m, 2H), 4.29 (d,  $J$  = 6.8 Гц, 2H), 4.23-4.17 (m, 2H), 3.61-3.57 (m, 6H), 3.50-3.46 (m, 12H), 3.41 (t,  $J$  = 6.0 Гц, 2H), 3.16-3.11 (m, 2H), 3.12-3.00 (m, 1H), 3.00-2.89 (m, 1H), 2.40-2.30 (m, 4H), 2.01-1.88 (m, 2H), 1.80-1.56 (m, 3H), 1.50-1.33 (m, 2H), 0.87 (d,  $J$  = 6.8 Гц, 3H), 0.83 (d,  $J$  = 6.8 Гц, 3H) ppm.

[0556] Пример 3AA: Метил (4S)-4-{[(1S)-1-{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{4-({[(4-нитрофенокси)карбонил]окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-{1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетидами]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]бутаноат (**LP22-3**)



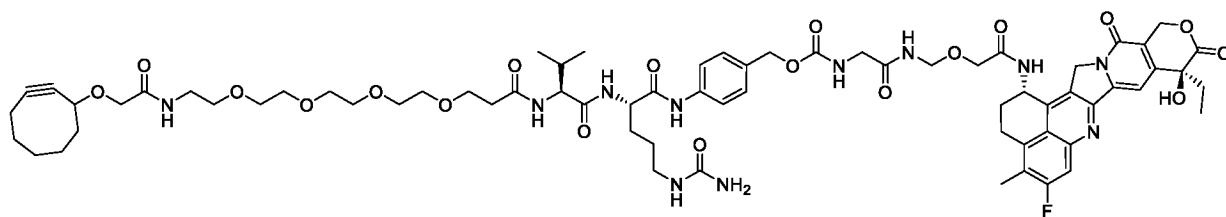
(LP22-3)

[0557] Следуя общей методике, начиная с LP08b-2 (0,10 г, 0,11 ммоль), получали линкер LP08b-3 (71 мг, выход 60%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 550,5 (M/2+H)<sup>+</sup>.

[0558] ПРИМЕР ЗАВ: Общая методика получения **LP1**, **LP2** и **LP#-4**

[0559] К раствору LP#-3 (1,0-1,2 экв.) в DMF (0,15 мМ) добавляли HOBt (0,5 экв.), DIPEA (3,0 экв.) и полезную нагрузку P (1,0 экв.), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь непосредственно очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой с получением **LP1**, **LP2** или **LP#-4** в виде белого твердого вещества.

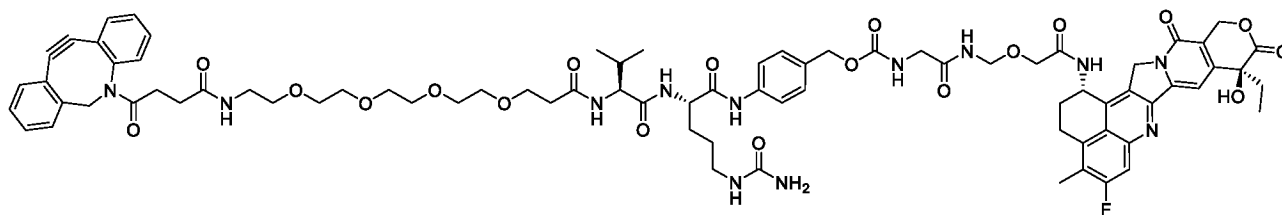
[0560] Пример 3AC: {4-[(2S)-5-(Карбамоиламино)-2-[(2S)-2-{1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}-3-метилбутанамидо]-пентанамидо]фенил}метил N-({[({[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил)-карбамат (**LP1**)



(**LP1**)

[0561] Следуя общей методике, начиная с полезной нагрузки **P3** (0,85 г, 1,2 ммоль) и LP1-3 (1,2 г, 1,2 ммоль), получали соединение линкер-полезная нагрузка **LP1** (1,1 г, выход 62%, соль муравьиной кислоты) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (5-60% ацетонитрила в водн. муравьиной кислоте (0,1%)). ESI m/z: 699.0 (M/2 + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 10.00 (s, 1H), 8.80 (t, J = 6.4 Гц, 1H), 8.51 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 8.13 (d, J = 7.6 Гц, 1H), 7.90 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 7.79 (d, J = 10.8 Гц, 1H), 7.65-7.50 (m, 3H), 7.43 (t, J = 6.0 Гц, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.27 (d, J = 8.8 Гц, 2H), 6.54 (s, 1H), 5.98 (t, J = 5.2 Гц, 1H), 5.63-5.57 (m, 1H), 5.41 (s, 4H), 5.21 (s, 2H), 4.92 (s, 2H), 4.62 (d, J = 6.4 Гц, 2H), 4.43-4.33 (m, 1H), 4.31-4.17 (m, 2H), 4.01 (s, 2H), 3.86 (d, J = 14.4 Гц, 1H), 3.75 (d, J = 14.8 Гц, 1H), 3.67-3.46 (m, 15H), 3.44-3.39 (m, 2H), 3.27-3.10 (m, 4H), 3.06-2.90 (m, 2H), 2.47-2.32 (m, 5H), 2.26-1.64 (m, 14H), 1.63-1.52 (m, 3H), 1.47-1.32 (m, 3H), 0.90-0.80 (m, 9H) ppm. <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ -111 ppm.

**[0562]** Пример 3AD: {4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)-пентанамидо]фенил}метил N-({[({[({[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2,14</sup>.0<sup>4,13</sup>.0<sup>6,11</sup>.0<sup>20,24</sup>]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил)-карбамат (**LP2**)

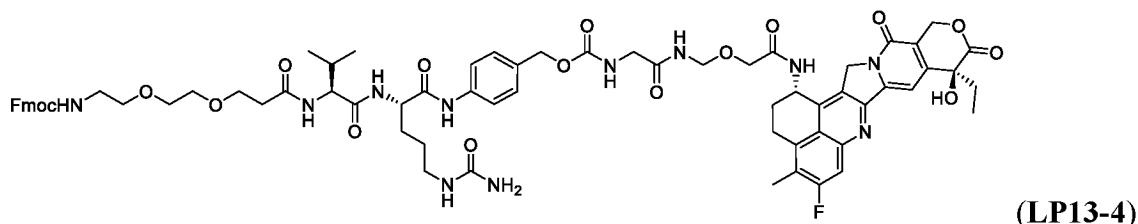


(**LP2**)

**[0563]** Следуя общей методике, начиная с полезной нагрузки **P3** (10 мг, 17 мкмоль) и **LP2-3** (CAS 2226472-28-0, синтезировано в соответствии с WO 2018089373, 18 мг, 17 мкмоль), получали соединение линкер-полезная нагрузка **LP2** (12 мг, выход 46%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (5-95% ацетонитрила в водн. бикарбонате аммония (10 мМ)). ESI m/z: 513.4 (M/3 + H)<sup>+</sup>, Rt = 6.63 мин в HPLC (форма с раскрытием E-цикла, 34%); 507.4 (M/3 + H), 760.5 (M/2 + H), Rt = 7.45 мин в HPLC (лактонная форма, 64%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 9.99 (s, 1H), 8.80 (t, J = 6.4 Гц, 1H), 8.50 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 8.12 (d, J = 7.2 Гц, 1H), 7.87 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 7.80-7.75 (m, 2H), 7.69-7.67 (m, 1H), 7.63-7.58 (m, 3H), 7.51-7.46 (m, 3H), 7.45-7.33 (m, 3H), 7.32-7.26 (m, 4H), 6.53 (s, 1H), 5.98 (t, J = 6.0 Гц, 1H), 5.63-5.57 (m, 1H), 5.42 (s, 4H), 5.21 (s, 2H), 5.03 (d, J = 14.0 Гц, 1H), 4.93 (s, 2H), 4.63 (d, J = 6.8 Гц, 2H), 4.41-4.35 (m, 1H), 4.25-4.21 (m, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.62-3.57 (m, 5H), 3.48-3.45 (m, 12H), 3.31-3.28 (m, 2H), 3.23-3.14 (m, 2H), 3.11-3.07 (m, 2H), 3.05-2.98 (m, 1H), 2.96-2.91 (m, 1H), 2.60-2.55 (m, 1H), 2.46-2.44 (m, 1H), 2.39 (s, 3H), 2.35-2.33 (m, 1H), 2.26-2.15 (m, 3H), 2.03-1.94 (m, 2H), 1.88-1.67 (m, 4H), 1.63-1.57 (m, 1H), 1.46-1.33 (m, 2H), 0.88-0.81 (m, 9H) ppm. <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ -111 ppm.

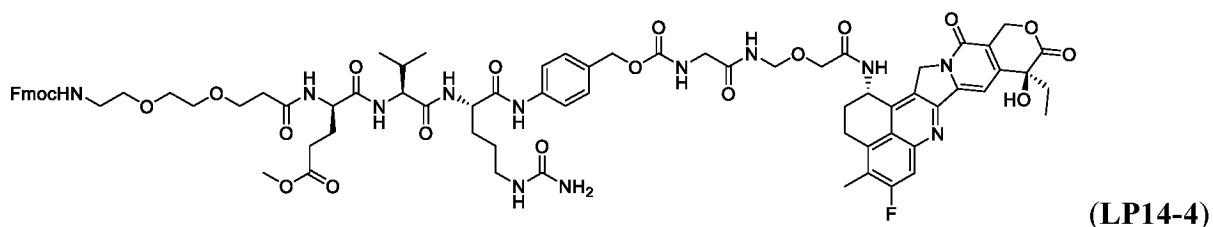
**[0564]** Пример 3AE: (9H-Флуорен-9-ил)метил N-{2-[2-(2-{[(1S)-1-{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{4-({[({[({[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2,14</sup>.0<sup>4,13</sup>.0<sup>6,11</sup>.0<sup>20,24</sup>]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил)-

карбамоил]окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-карбамоил}этокси)этокси]этил}карбамат (**LP13-4**)



**[0565]** Следуя общей методике, начиная с **LP13-3** (0,10 г, 0,11 ммоль) и полезной нагрузки **P3** (77 мг, 0,11 ммоль), получали соединение **LP13-4** (0,12 г, выход 78%) в виде светло-желтого масла после очистки флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в воде в течение 10 минут и затем 100% ацетонитрила в течение 5 минут). ESI m/z: 684,0 (M/2+H)<sup>+</sup>.

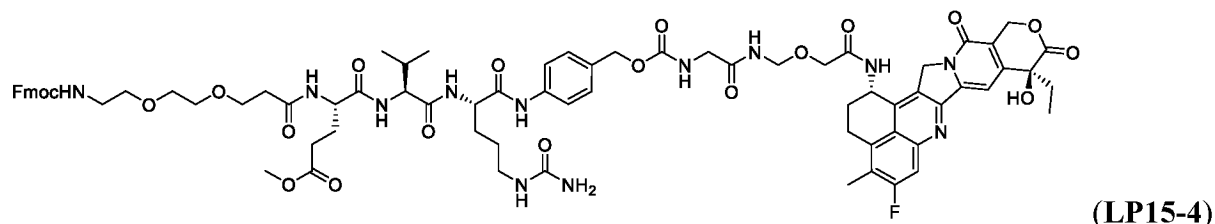
**[0566]** Пример 3AF: Метил (4R)-4-{{(1S)-1-{{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{4-(((10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.020,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил]карбамоил]окси}метил)-фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-(3-{2-[2-((9H-флуорен-9-ил)метокси]карбонил}амино)этокси]этокси}пропанамидо)бутаноат (**LP14-4**)



**[0567]** Следуя общей методике, начиная с **LP14-3** (0,12 г, 0,11 ммоль) и полезной нагрузки **P3** (64 мг, 0,11 ммоль), получали соединение **LP14-4** (0,13 г, выход 78%) в виде белого твердого вещества после очистки флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-60% ацетонитрила в водн. бикарбонате аммония (10 mM)). ESI m/z: 755,7 (M/2+H)<sup>+</sup>.

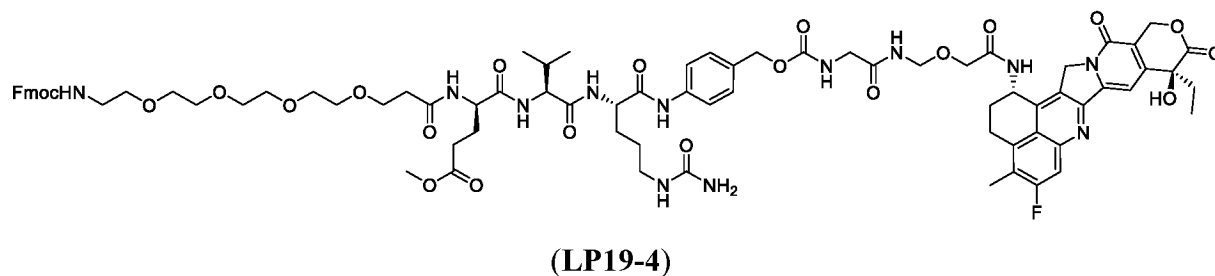
**[0568]** Пример 3AG: Метил (4S)-4-{{(1S)-1-{{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{4-(((10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.04,13.0<sup>6</sup>,11.020,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил]карбамоил]окси}-метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-(3-{2-[2-

({[(9H-флуорен-9-ил)метокси]карбонил}амино)этокси]этокси}пропанамидо)бутаноат  
(LP15-4)



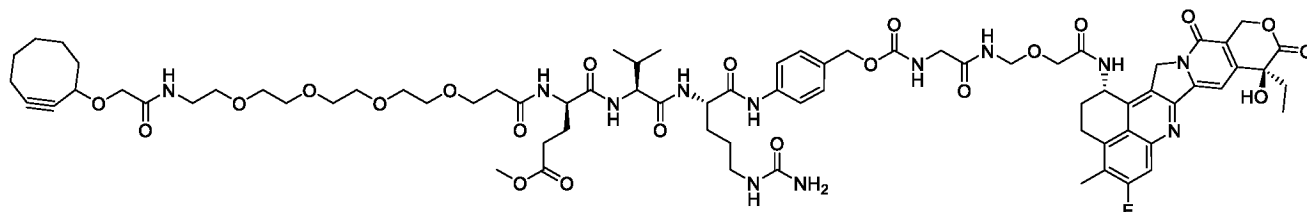
[0569] Следуя общей методике, начиная с LP15-3 (0,50 г, 0,47 ммоль) и P3 (0,22 г, 0,38 ммоль), получали соединение LP15-4 (0,40 г, выход 56%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 755,5 (M/2+H)<sup>+</sup>.

[0570] Пример 3AH: Метил (4R)-4-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-{{({({({({(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил]карбамоил]окси}метил)-фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-[1-({[(9H-флуорен-9-ил)метокси]карбонил}амино)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]бутаноат  
(LP19-4)



[0571] Следуя общей методике, начиная с LP19-3 (80 мг, 69 мкмоль) и полезной нагрузки P3 (40 мг, 69 мкмоль), получали соединение LP19-4 (70 мг, выход 64%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 799,5 (M/2+H)<sup>+</sup>.

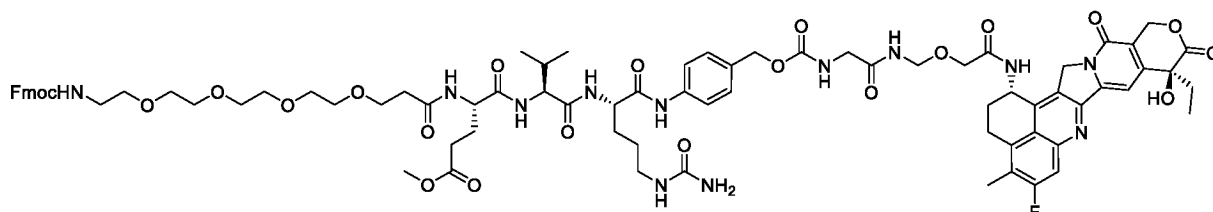
[0572] Пример 3AI: Метил (4R)-4-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-{{({({({({(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил]карбамоил]окси}-метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-{1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиламино]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]бутаноат  
(LP20-4)



(LP20-4)

[0573] Следуя общей методике, начиная с **LP20-3** (95 мг, 86 мкмоль) и полезной нагрузки **P3** (58 мг, 0,10 ммоль), получали соединение **LP20-4** (60 мг, выход 45%) в виде светло-желтого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 770,6 ( $M/2+H$ )<sup>+</sup>.

[0574] Пример 3AJ: Метил (4S)-4-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-{{[[{{[[{{[[10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил]карбамоил]-окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-[1-{{[(9H-флуорен-9-ил)метокси]карбонил}амино)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]бутаноат (**LP21-4**)

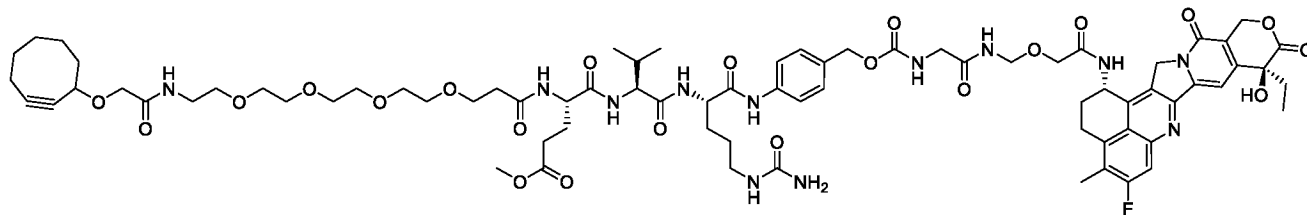


(LP21-4)

[0575] Следуя общей методике, начиная с **LP21-3** (58 мг, 50 мкмоль) и полезной нагрузки **P3** (35 мг, 50 мкмоль), получали соединение **LP21-4** (51 мг, выход 64%) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 799.8 ( $M/2 + H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>д6</sub>)  $\delta$  10.04 (s, 1H), 8.80 (t,  $J = 6.4$  Гц, 1H), 8.51 (d,  $J = 8.4$  Гц, 1H), 8.16 (d,  $J = 7.6$  Гц, 1H), 8.09 (d,  $J = 7.6$  Гц, 1H), 7.88 (d,  $J = 7.6$  Гц, 2H), 7.78 (d,  $J = 10.8$  Гц, 2H), 7.69 (d,  $J = 7.2$  Гц, 2H), 7.58 (d,  $J = 8.8$  Гц, 2H), 7.44-7.39 (m, 3H), 7.34-7.31 (m, 4H), 7.27 (d,  $J = 8.4$  Гц, 2H), 6.53 (br s, 1H), 5.99 (br s, 1H), 5.62-5.57 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.46-5.37 (m, 1H), 5.20 (s, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.63 (d,  $J = 5.6$  Гц, 2H), 4.41-4.33 (m, 2H), 4.30-4.28 (m, 2H), 4.22-4.16 (m, 2H), 4.02 (s, 2H), 3.63-3.57 (m, 8H), 3.50-3.46 (m, 12H), 3.40 (t,  $J = 6.0$  Гц, 2H), 3.26-3.18 (m, 1H), 3.15-3.10 (m, 3H), 3.07-2.99 (m, 1H), 2.99-2.90 (m, 1H), 2.42-2.30 (m, 7H), 2.21-2.14 (m, 2H), 1.97-1.82 (m, 4H), 1.77-1.59 (m, 3H), 1.54-1.32 (m, 2H), 0.88-0.82 (m, 9H) ppm.



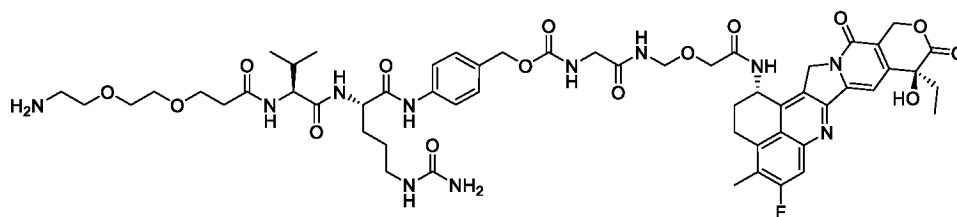
**[0576]** Пример 3AK: Метил (4S)-4-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-{{[[{{[[{{[[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил]карбамоил]окси}-метил]фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-{{1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}бутаноат (**LP22-4**)



(**LP22-4**)

**[0577]** Следуя общей методике, начиная с **LP22-3** (80 мг, 73 мкмоль) и полезной нагрузки **P3** (43 мг, 73 мкмоль), получали соединение **LP22-4** (60 мг, выход 60%) в виде белого твердого вещества после очистки флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-60% ацетонитрила в *водн.* бикарбонате аммония (10 мМ)). ESI m/z: 770,5 (M/2+H)<sup>+</sup>.

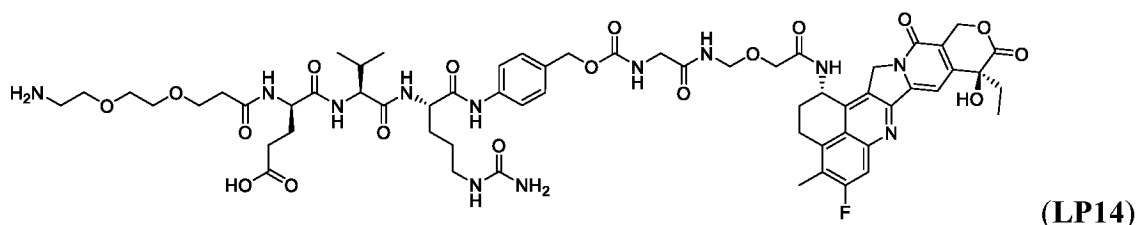
**[0578]** Пример 3AL: {4-[(2S)-2-[(2S)-2-{3-[2-(2-Аминоэтокси)этокси]пропанамидо}-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-({[[{{[[{{[[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил]карбамат (**LP13**)



(**LP13**)

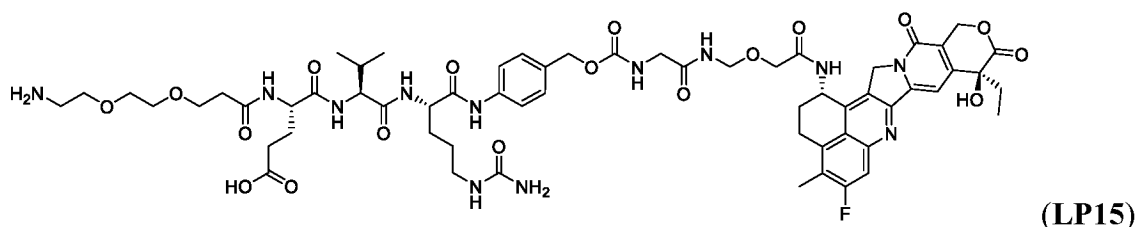
**[0579]** К раствору **LP13-4** (0,12 г, 84 мкмоль) в безводном DMF (1,8 мл) добавляли диэтиламин (0,2 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Fmoc по данным LCMS. Полученный раствор непосредственно разделяли флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%) в течение 10 минут) с получением **LP13** (50 мг, выход 52%) в виде твердого вещества светло-желтого цвета. ESI m/z: 573,0 (M/2+H)<sup>+</sup>.

**[0580]** Пример 3AM: (4R)-4-{3-[2-(2-Аминоэтокс)этокс]пропанамидо}-4-{{(1S)-1-{{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{4-({{({{({{((10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}-метил)карбамоил]окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (**LP14**)



**[0581]** К раствору соединения **LP14-4** (0,10 г, 66 мкмоль) в DMF (3 мл) добавляли пиперидин (56 мг, 0,66 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до удаления Fmoc, что контролировали с помощью LCMS. К реакционной смеси добавляли *водн.* гидроксид лития (0,2 мМ, 1 мл) и THF (3 мл), и смесь перемешивали при комнатной температуре еще в течение часа до полного гидролиза метилового эфира по данным LCMS. После фильтрации полученную смесь подкисляли буфером PBS (рН 3,0) до рН 5,0 и затем концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%)) с получением соединения линкер-полезная нагрузка **LP14** (40 мг, выход 47%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 637,5 (M/2+H)<sup>+</sup>.

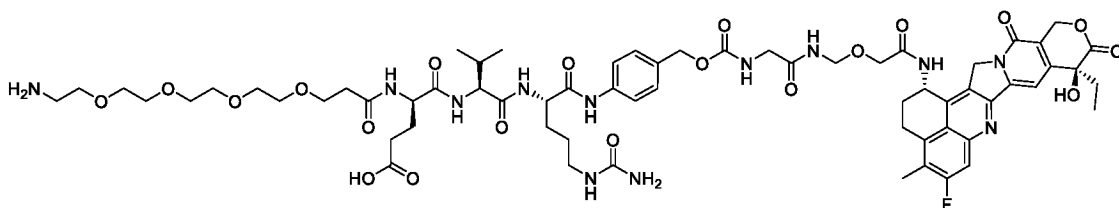
**[0582]** Пример 3AN: (4S)-4-{3-[2-(2-Аминоэтокс)этокс]пропанамидо}-4-{{(1S)-1-{{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{4-({{({{({{((10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}-метил)карбамоил]окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-карбамоил}бутановая кислота (**LP15**)



**[0583]** Следуя методике, аналогичной методике получения **LP14**, за исключением замены LP14-4 на LP15-4, получали соединение линкер-полезная нагрузка **LP15** (50 мг,

выход 14%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,05%)). ESI m/z: 637,4 (M/2+H)<sup>+</sup>.

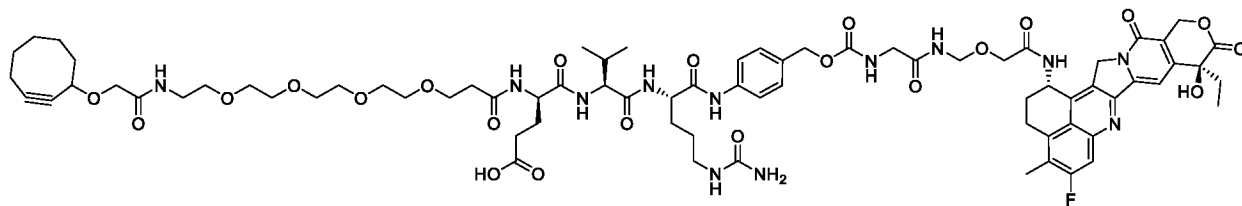
**[0584]** Пример 3АО: (4R)-4-(1-Амино-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо)-4-{{{(1S)-1-{{{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-({{({{({{({{({{10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил)карбамоил]окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-карбамоил}бутановая кислота (**LP19**)



(**LP19**)

**[0585]** Следуя методике, аналогичной методике получения **LP14**, за исключением замены **LP14-4** на **LP19-4** (60 мг, 38 мкмоль), получали соединение линкер-полезная нагрузка **LP19** (12 мг, выход 24%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,05%)). ESI m/z: 681.5 (M/2 + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 9.80 (s, 1H), 8.81 (t, J = 6.4 Гц, 1H), 8.52 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 8.19-8.13 (m, 2H), 8.08 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 7.81-7.75 (m, 3H), 7.61 (d, J = 6.4 Гц, 2H), 7.43 (t, J = 6.0 Гц, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.27 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 6.55 (br s, 1H), 6.04-5.99 (m, 1H), 5.64-5.57 (m, 1H), 5.43-5.40 (m, 2H), 5.20 (s, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.63 (d, J = 6.4 Гц, 2H), 4.40-4.32 (m, 2H), 4.23-4.19 (m, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.63-3.60 (m, 4H), 3.59-3.57 (m, 4H), 3.56-3.54 (m, 3H), 3.51-3.49 (m, 5H), 3.01-2.95 (m, 4H), 2.44-2.41 (m, 1H), 2.39 (s, 3H), 2.31-2.28 (m, 1H), 2.26-2.21 (m, 3H), 2.20-2.15 (m, 2H), 2.09-2.01 (m, 2H), 1.90-1.82 (m, 4H), 1.78-1.72 (m, 2H), 1.66-1.61 (m, 1H), 1.50-1.41 (m, 2H), 1.40-1.35 (m, 1H), 0.90-0.82 (m, 11H) ppm. (протон COOH не был выявлен) <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ -73.70, -111.28 ppm.

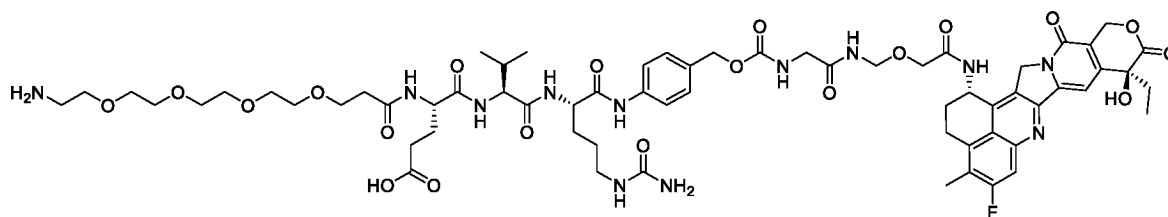
**[0586]** Пример 3АР: (4R)-4-{{{(1S)-1-{{{(1S)-4-(Карбамоиламино)-1-{{[4-({{({{({{({{({{10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил)карбамоил]окси}метил)фенил]-карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-{{1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}бутановая кислота (**LP20**)



(LP20)

[0587] К раствору соединения **LP20-4** (60 мг, 39 мкмоль) в воде (1 мл) и THF (3 мл) добавляли *водн.* гидроксид лития (0,12 М, 1 мл), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного гидролиза сложного метилового эфира, что контролировали с помощью LCMS. Смесь подкисляли буфером PBS (рН 4,0) до рН 6,0 и затем концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,05%)) с получением **LP20** (15 мг, выход 25%) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 763.5 ( $M/2 + H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 9.78 (s, 1H), 8.80 (t,  $J = 6.8$  Гц, 1H), 8.51 (t,  $J = 8.8$  Гц, 1H), 8.18-8.12 (m, 2H), 8.07 (d,  $J = 6.0$  Гц, 1H), 7.78 (d,  $J = 11.2$  Гц, 1H), 7.63-7.59 (m, 3H), 7.43 (t,  $J = 6.0$  Гц, 1H), 7.32-7.22 (m, 4H), 7.11-6.96 (m, 1H), 6.61-6.45 (br s, 1H), 6.02-5.96 (m, 1H), 5.63-5.57 (m, 1H), 5.44-5.38 (m, 3H), 5.20 (s, 2H), 4.92 (s, 2H), 4.63 (d,  $J = 6.0$  Гц, 2H), 4.40-4.33 (m, 2H), 4.29-4.25 (m, 1H), 4.24-4.18 (m, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.89-3.84 (m, 1H), 3.78-3.73 (m, 1H), 3.63-3.60 (m, 2H), 3.57-3.55 (m, 1H), 3.51-3.47 (m, 8H), 3.27-3.21 (m, 4H), 3.17-3.12 (m, 1H), 3.03-2.99 (m, 1H), 2.97-2.93 (m, 1H), 2.44-2.41 (m, 1H), 2.39 (br s, 3H), 2.28-2.14 (m, 7H), 2.08-1.99 (m, 2H), 1.94-1.81 (m, 6H), 1.80-1.71 (m, 5H), 1.63-1.54 (m, 3H), 1.40-1.33 (m, 4H), 0.90-0.81 (m, 11H) ppm. (Протоны кислоты и TFA не были выявлены.) <sup>19</sup>F ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ -73.86, -111.30 ppm.

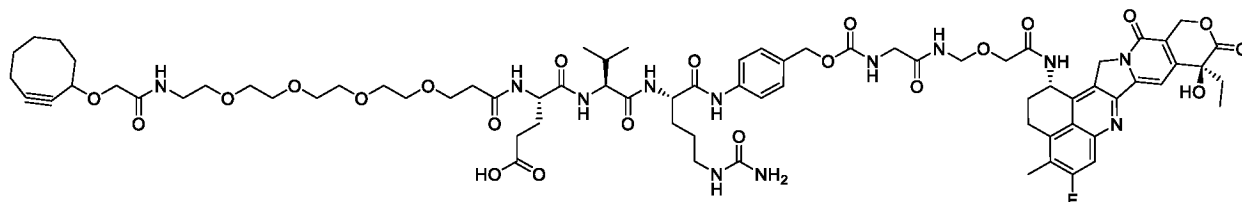
[0588] Пример 3AQ: (4S)-4-(1-Амино-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо)-4-{{{(1S)-1-{{{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[[4-({{[{{[{{[{{(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса -4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)-метил]карбамоил}-метил]карбамоил]окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}бутановая кислота (**LP21**)



(LP21)

**[0589]** Следуя методике, аналогичной методике получения **LP14**, за исключением замены **LP14-4** на **LP21-4** (45 мг, 28 мкмоль), получали соединение линкер-полезная нагрузка **LP21** (10 мг, выход 26%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,05%)). ESI m/z: 681.4 (M/2 + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>д6</sub>) δ 10.05 (s, 1H), 8.81 (t, J = 7.2 Гц, 1H), 8.52 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 8.19 (d, J = 7.6 Гц, 1H), 8.09 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 7.81-7.68 (m, 5H), 7.58 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 7.43 (t, J = 6.8 Гц, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.27 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 6.54 (brs, 1H), 6.03-5.97 (m, 1H), 5.63-5.57 (m, 1H), 5.48-5.42 (m, 3H), 5.21 (s, 2H), 4.92 (s, 2H), 4.63 (d, J = 6.4 Гц, 2H), 4.42-4.31 (m, 2H), 4.22-4.17 (m, 1H), 4.02 (s, 2H), 3.62-3.55 (m, 8H), 3.51-3.48 (m, 12H), 3.20-3.12 (m, 2H), 3.05-2.89 (m, 5H), 2.40 (s, 3H), 2.26-2.21 (m, 2H), 2.20-2.12 (m, 2H), 2.02-1.95 (m, 1H), 1.90-1.80 (m, 3H), 1.74-1.63 (m, 2H), 1.59-1.54 (m, 1H), 1.49-1.31 (m, 2H), 0.88-0.82 (m, 9H) ppm. (Протон COOH не был выявлен) <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>д6</sub>) δ -73, -111 ppm.

**[0590]** Пример 3AR: (4S)-4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(Карбамоиламино)-1-[[4-[[[[(10S, 23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>, 14.0<sup>4</sup>, 13.0<sup>6</sup>, 11.0<sup>20</sup>, 24]]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил)карбамоил]окси}метил)фенил]-карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил]-4-{1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}бутановая кислота (**LP22**)



(**LP22**)

**[0591]** Следуя методике, аналогичной методике получения **LP20**, за исключением замены **LP20-4** на **LP22-4** (60 мг, 39 мкмоль), получали соединение линкер-полезная нагрузка **LP22** (15 мг, выход 26%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,05%)). ESI m/z: 763.5 (M/2 + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>д6</sub>) δ 9.78 (br s, 1H), 8.80 (t, J = 6.8 Гц, 1H), 8.51 (t, J = 8.8 Гц, 1H), 8.18-8.12 (m, 2H), 8.07 (d, J = 6.0 Гц, 1H), 7.78 (d, J = 11.2 Гц, 1H), 7.63-7.59 (m, 3H), 7.43 (t, J = 6.0 Гц, 1H), 7.32-7.22 (m, 4H), 7.11-6.96 (m, 1H), 6.61-6.45 (br s, 1H), 6.02-5.96 (m, 1H), 5.63-5.57 (m, 1H), 5.43-5.40 (m, 2H), 5.20 (s, 2H), 4.92 (s, 2H), 4.63 (d, J = 6.0 Гц, 2H), 4.40-4.33 (m, 2H), 4.29-4.25 (m, 1H), 4.23-4.18 (m, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.89-3.84 (m, 1H), 3.78-3.73 (m, 1H), 3.63-3.60 (m, 2H), 3.57-3.55 (m, 1H), 3.51-3.47 (m, 8H),

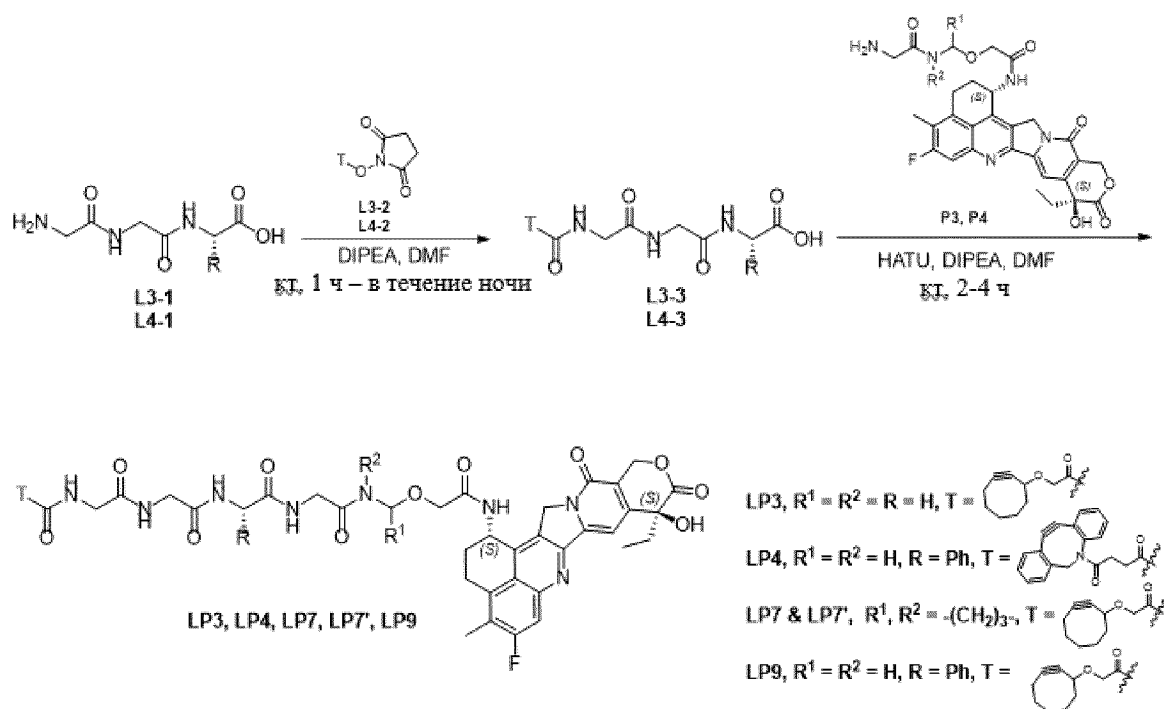
3.46-3.45 (m, 2H), 3.27-3.21 (m, 4H), 3.17-3.13 (m, 1H), 3.03-2.99 (m, 1H), 2.97-2.93 (m, 1H), 2.46-2.41 (m, 1H), 2.39 (s, 3H), 2.36-2.31 (m, 1H), 2.27-2.16 (m, 7H), 2.09-2.00 (m, 1H), 2.00-1.81 (m, 7H), 1.80-1.68 (m, 4H), 1.62-1.54 (m, 3H), 1.40-1.35 (m, 3H), 0.90-0.81 (m, 11H) ppm. (протон COOH не был выявлен)  $^{19}\text{F}$  ЯМР (376 МГц,  $\text{DMSO}_{d6}$ )  $\delta$  -73.86, -111.30 ppm.

[0592] ПРИМЕР 4: Синтез соединений пептидный линкер-полезные нагрузки

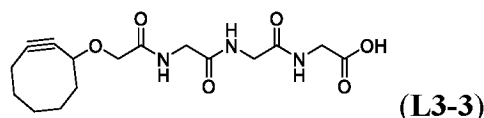
[0593] Соединения линкер-полезные нагрузки **LP3**, **LP4**, **LP7/LP7'** и **LP9** синтезировали, как описано на схеме 5 и в примерах 4A-4F ниже.

[0594] Исходные материалы **L3-2** (CAS 1353016-71-3) и **L4-2** (CAS 1425803-45-7) были коммерчески получены от *Accela*.

**Схема 5: Синтез соединений пептидный линкер-полезные нагрузки**



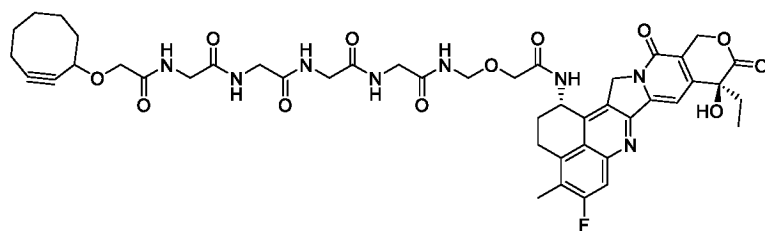
[0595] Пример 4A: 2-(2-{2-[2-(Циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетидами]ацетидами}-ацетидами)уксусная кислота (**L3-3**)



[0596] К суспензии пептида **L3-1** (Gly-Gly-Gly-OH, 0,34 г, 1,8 ммоль) в DMF (13 мл) добавляли раствор **L3-2** (0,50 г, 1,8 ммоль) в THF (6 мл) и DIPEA (0,69 г, 5,4 ммоль), и мутную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 часов. Смесь фильтровали, прозрачный раствор фильтрата концентрировали *в вакууме* и остаток

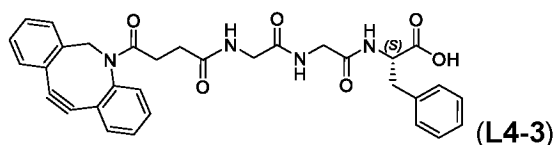
очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-20% ацетонитрила в воде) с получением соединения **L3-3** (0,13 г, выход 21%) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 354.2 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  12.6 (s, 1H), 8.20 (t,  $J$  = 5.6 Гц, 1H), 8.15 (t,  $J$  = 6.0 Гц, 1H), 7.82 (t,  $J$  = 5.6 Гц, 1H), 4.35-4.31 (m, 1H), 3.94 (d,  $J$  = 14.8 Гц, 1H), 3.83-3.73 (m, 7H), 2.29-2.06 (m, 3H), 1.99-1.93 (m, 1H), 1.91-1.71 (m, 3H), 1.63-1.56 (m, 2H), 1.46-1.37 (m, 1H) ppm.

**[0597]** Пример 4В: 2-[2-(2-{2-[2-(Циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]ацетиамидо}-ацетиамидо)ацетиамидо]-*N*-[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил}карбамоил}метокси)метил]ацетиамид (**LP3**)

**(LP3)**

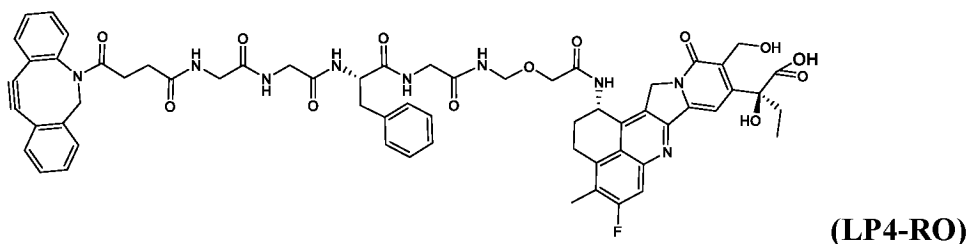
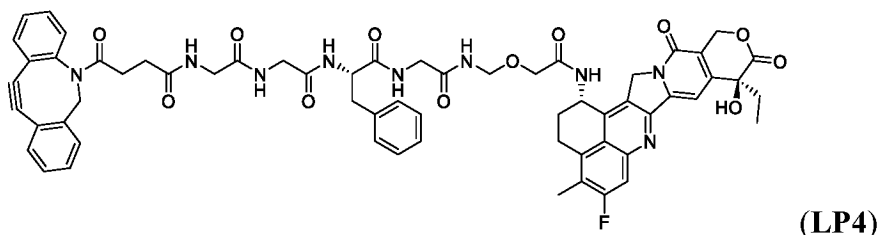
**[0598]** К желтому раствору соединения **L3-3** (9,0 мг, 25 мкмоль) в сухом DMF (14 мл) добавляли DIPEA (9,0 мг, 70 мкмоль) и HATU (10 мг, 26 мкмоль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут перед добавлением полезной нагрузки **P3** (15 мг, 22 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до израсходования большей части исходных материалов по данным LCMS. Полученную смесь очищали непосредственно препаративной HPLC (0-100% ацетонитрила в водн. TFA (0,01%)) с получением соединения линкер-полезная нагрузка **LP3** (8,0 мг, выход 36%, соль TFA) в виде твердого вещества светло-желтого цвета. ESI  $m/z$ : 915.5 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  8.68 (t,  $J$  = 6.6 Гц, 1H), 8.51 (d,  $J$  = 8.8 Гц, 1H), 8.25-8.12 (m, 3H), 7.86-7.75 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.59 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.20 (s, 2H), 4.63 (d,  $J$  = 6.5 Гц, 2H), 4.31 (m, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.92 (d,  $J$  = 14.9 Гц, 1H), 3.75 (m, 9H), 3.18 (s, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.26-2.02 (m, 5H), 1.96-1.70 (m, 6H), 1.63-1.53 (m, 2H), 1.39 (d,  $J$  = 8.7 Гц, 1H), 0.87 (t,  $J$  = 7.3 Гц, 3H) ppm. <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  -74 (TFA), -111 (Ar-F) ppm.

**[0599]** Пример 4С: (2*S*)-2-{2-[2-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0<sup>4</sup>,9]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)ацетиамидо]ацетиамидо}-3-фенилпропановая кислота (**L4-3**)



**[0600]** К раствору соединения **L4-2** (0,28 г, 0,69 ммоль) и пептида **L4-1** (Gly-Gly-Phe-OH, 0,19 г, 0,69 ммоль) в DMF (10 мл) добавляли DIPEA (0,37 мл, 2,1 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа. Завершение реакции контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь непосредственно очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водн.* бикарбонате аммония (10 мМ)) с получением соединения **L4-3** (0,31 г, выход 78%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 567,0 (M+H)<sup>+</sup>.

**[0601]** Пример 4D: 4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-N-{{{[(1S)-1-[[[[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-дизагексацикло[14.7.1.0<sup>2,14</sup>.0<sup>4,13</sup>.0<sup>6,11</sup>.0<sup>20,24</sup>]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}-метил]карбамоил]-2-фенилэтил]карбамоил}метил]карбамоил]метил}-4-оксобутанамид (**LP4**)



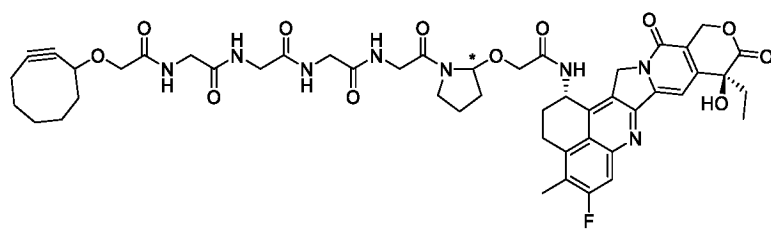
**[0602]** Следуя методике получения **LP3**, за исключением замены **L3-3** на **L4-3**, получали соединение линкер-полезная нагрузка **LP4** с раскрытием и без раскрытия лактонного цикла **LP4-RO** (14 мг, выход 56%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (0-100% ацетонитрила в *водн.* бикарбонате аммония (10 мМ)).

**[0603]** Лактон: чистота HPLC: 75%, время удерживания: 7,93 мин, ESI m/z: 1128,3 (M+H)<sup>+</sup>, 564,8 (M/2+H)<sup>+</sup>; продукт раскрытия цикла: чистота HPLC: 20%, время удерживания: 6,94 мин. ESI m/z: 1169,4 (M + Na)<sup>+</sup>, 1146,3 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.62 (s, 1H), 8.50 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.18-7.91 (m, 3H), 7.78 (d, J



= 11.5 Гц, 1H), 7.70-7.58 (m, 2H), 7.50-7.38 (m, 3H), 7.29 (m, 3H), 7.24-7.11 (m, 5H), 6.51 (s, 1H), 5.58 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.19 (s, 1H), 4.99 (d,  $J = 13.8$  Гц, 1H), 4.62 (d,  $J = 6.1$  Гц, 2H), 4.46 (s, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.70 (m, 3H), 3.56 (m, 3H), 3.22-3.06 (m, 2H), 2.99 (m, 2H), 2.75 (m, 1H), 2.67 (m, 1H), 2.38 (m, 3H), 2.33 (m, 4H), 2.17 (m, 2H), 2.07 (m, 2H), 1.95-1.70 (m, 2H), 0.86 (t,  $J = 7.2$  Гц, 3H) ppm.

**[0604]** Пример 4Е: 2-(Циклоокт-2-ин-1-илокси)-N-{{{[2-(2-((10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло [14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил}метокси)пирролидин-1-ил]-2-оксоэтил}карбамоил}метил]карбамоил}-метил)карбамоил]метил}ацетамид (диастереоизомер 1, **LP7** и диастереоизомер 2, **LP7'**)



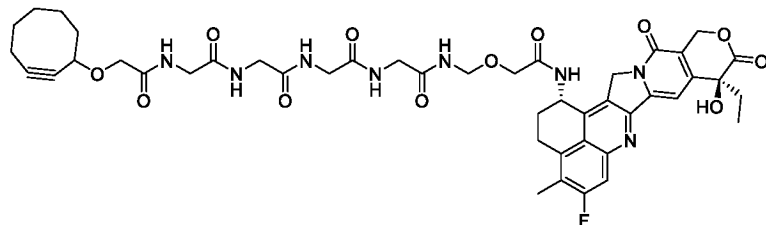
(**LP7/LP7'**)

**[0605]** Следуя методике, аналогичной методике получения **LP3**, за исключением замены **P3** на **P4**, диастереоизомеры **LP7** (с продуктом раскрытия лактонного цикла или без него, 3,0 мг, выход 7%) и **LP7'** (с продуктом раскрытия лактонного цикла или без него, 4,0 мг, выход 9,3%) получали отдельно в виде белых твердых веществ после очистки препаративной HPLC (0-100% ацетонитрила в водн. бикарбонате аммония (8 мМ) с аммиаком (0,05% об.)).

**[0606]** **LP7**: лактон: чистота HPLC: 11%, время удерживания: 6,87 мин, ESI m/z: 955,3 (M+H)<sup>+</sup>, продукт раскрытия цикла: чистота HPLC: 89%, время удерживания: 5,91 мин, ESI m/z: 996.5 (M + Na)<sup>+</sup> <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 8.71-8.57 (m, 1H), 8.30-8.13 (m, 2H), 7.99-7.70 (m, 3H), 7.32-6.67 (m, 2H), 5.63-5.48 (m, 1H), 5.43-5.01 (m, 5H), 4.36-4.27 (m, 1H), 4.21-3.68 (m, 10H), 2.40-2.24 (m, 4H), 2.14-1.33 (m, 22H), 1.14-0.97 (m, 2H), 0.89-0.84 (m, 3H) ppm. <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ -111, -112 ppm.

**[0607]** **LP7'**: лактон: чистота HPLC: 21%, время удерживания: 6,98 мин, ESI m/z: 955.3 (M + H)<sup>+</sup>, продукт раскрытия цикла: чистота HPLC: 79%, время удерживания: 6,02 мин, ESI m/z: 996.5 (M + Na)<sup>+</sup> <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 8.60-8.55 (m, 1H), 8.31-7.69 (m, 5H), 7.32-7.21 (m, 1H), 6.66-6.53 (m, 1H), 5.64-5.56 (m, 1H), 5.43-5.09 (m, 5H), 4.32-4.30 (m, 1H), 4.16-4.02 (m, 2H), 3.98-3.89 (m, 2H), 3.82-3.55 (m, 6H), 2.40-2.31 (m, 4H), 2.22-1.36 (m, 22H), 1.15-0.98 (m, 2H), 0.89-0.84 (m, 3H) ppm. <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ -111, -112 ppm.

**[0608]** Пример 4F: 2-[2-(2-{2-[2-(Циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетидами]-ацетидами}ацетидами)ацетидами]-*N*-[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-дизагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]ацетамид (**LP9**)

**(LP9)**

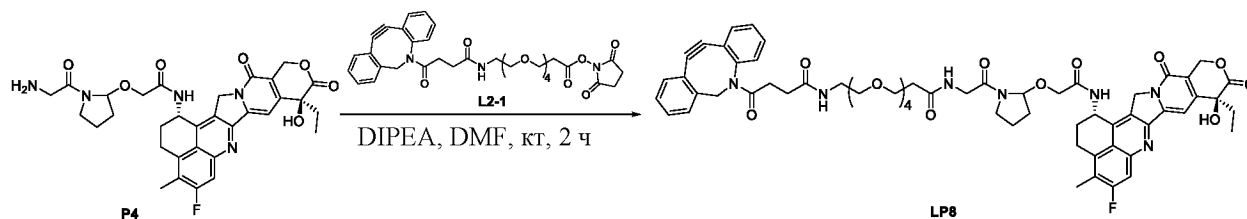
**[0609]** К желтому раствору соединения **L3-3** (пример 4A) (9,0 мг, 25 мкмоль) в сухом DMF (14 мл) добавляли DIPEA (9,0 мг, 70 мкмоль) и HATU (10 мг, 26 мкмоль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут перед добавлением полезной нагрузки **P** (15 мг, 22 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до расходования большей части исходных материалов по данным LCMS. Полученную смесь очищали непосредственно препаративной HPLC (0-100% ацетонитрила в водн. TFA (0,01%)) с получением соединения линкер-полезная нагрузка **LP9** (8,0 мг, выход 36%, соль TFA) в виде твердого вещества светло-желтого цвета. ESI *m/z*: 915.5 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.68 (t, *J* = 6.6 Гц, 1H), 8.51 (d, *J* = 8.8 Гц, 1H), 8.25-8.12 (m, 3H), 7.86-7.75 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.59 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.20 (s, 2H), 4.63 (d, *J* = 6.5 Гц, 2H), 4.31 (m, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.92 (d, *J* = 14.9 Гц, 1H), 3.75 (m, 9H), 3.18 (s, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.26-2.02 (m, 5H), 1.96-1.70 (m, 6H), 1.63-1.53 (m, 2H), 1.39 (d, *J* = 8.7 Гц, 1H), 0.87 (t, *J* = 7.3 Гц, 3H) ppm. <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -74 (TFA), -111 (Ar-F) ppm

**[0610]** ПРИМЕР 5: Синтез соединений кислоточувствительный линкер-полезные нагрузки

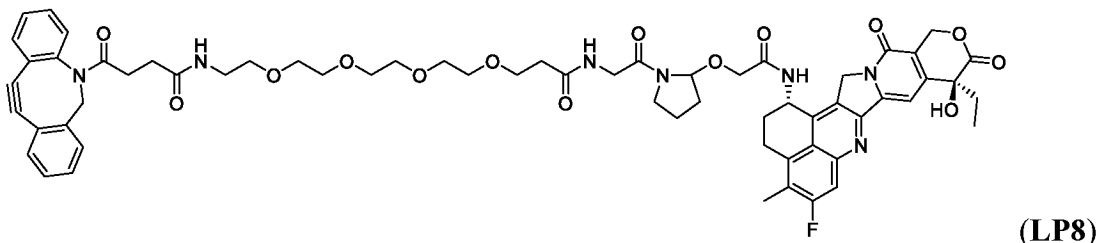
**[0611]** Соединение линкер-полезная нагрузка **LP8** синтезировали, как описано на схеме 6 и как дополнительно описано ниже.

**[0612]** Исходный материал **L2-1** (CAS 1427004-19-0) коммерчески получали от *Accela*.

**Схема 6: Синтез соединений кислоточувствительный линкер-полезные нагрузки**



**[0613]** 1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-*N*-{2-[2-({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2,14</sup>.0<sup>4,13</sup>.0<sup>6,11</sup>.0<sup>20,24</sup>]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил}карбамоил}метокси)пирролидин-1-ил]-2-оксоэтил}-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (**LP8**)



**[0614]** К раствору полезной нагрузки **P4** (6,2 мг, 10 мкмоль) в DMF (1,0 мл) добавляли соединение **L2-1** (6,5 мг, 10 мкмоль) и DIPEA (3,9 мг, 30 мкмоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. За ходом реакции до ее завершения следили с помощью LCMS. Полученную смесь очищали непосредственно препаративной HPLC (5-95% ацетонитрила в водн. бикарбонате аммония (10 мМ)) с получением соединения линкер-полезная нагрузка **LP8** (с продуктом раскрытия лактонного цикла, 3,0 мг, выход 26%) в виде желтого твердого вещества.

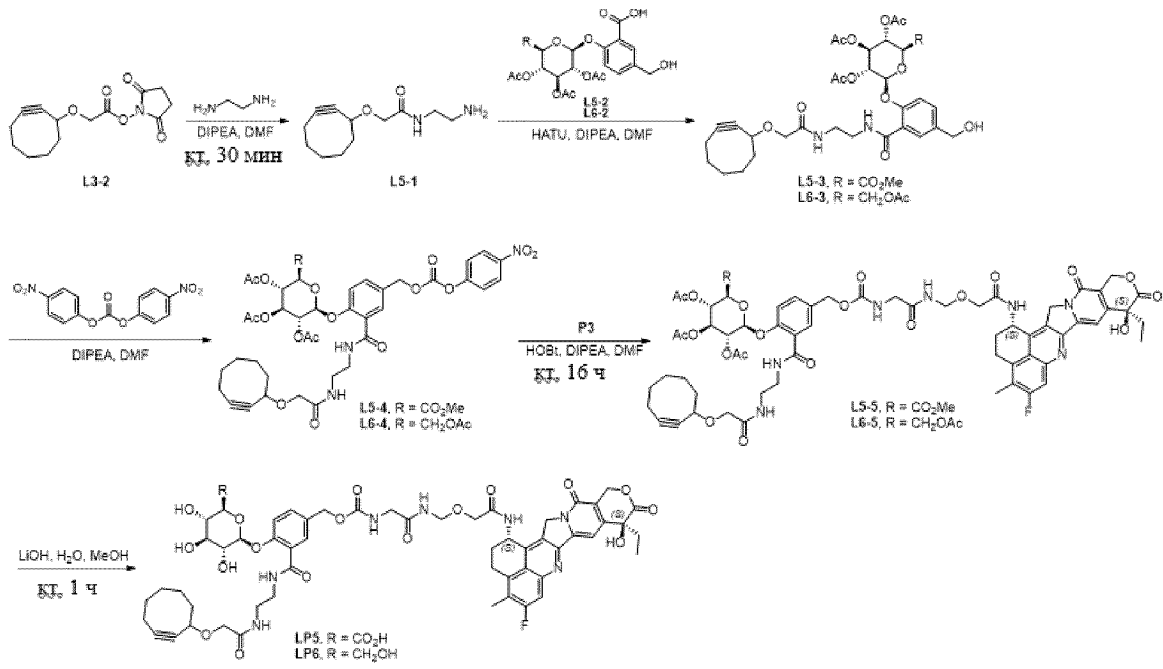
**[0615]** Лактон: чистота HPLC: 80%, время удерживания: 8,12 мин, ESI  $m/z$ : 577,6 ( $M/2+H$ )<sup>+</sup>; продукт раскрытия цикла: чистота HPLC: 20%, время удерживания: 6,91 мин, ESI  $m/z$ : 586,7 ( $M/2+H$ )<sup>+</sup>.

**[0615]** <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>д6</sub>)  $\delta$  7.74-7.67 (m, 2H), 7.63-7.58 (m, 1H), 7.56-7.52 (m, 1H), 7.44-7.36 (m, 3H), 7.32-7.20 (m, 4H), 6.60-6.44 (m, 1H), 5.56-5.49 (m, 1H), 5.34 (s, 2H), 5.28-5.16 (m, 1H), 5.11-5.06 (m, 1H), 4.98-4.92 (m, 1H), 4.10-3.91 (m, 2H), 3.75-3.74 (m, 1H), 3.55-3.50 (m, 3H), 3.40-3.37 (m, 13H), 3.22-3.16 (m, 5H), 3.02-2.99 (m, 3H), 2.54-2.48 (m, 2H), 2.31 (d,  $J = 2.8$  Гц, 2H), 2.22-2.11 (m, 4H), 1.96-1.88 (m, 4H), 1.82-1.72 (m, 2H), 1.67-1.64 (m, 2H), 1.01 (t,  $J = 7.2$  Гц, 2H), 0.92 (t,  $J = 7.2$  Гц, 2H), 0.82-0.76 (m, 3H) ppm. <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>д6</sub>)  $\delta$  -111 ppm.

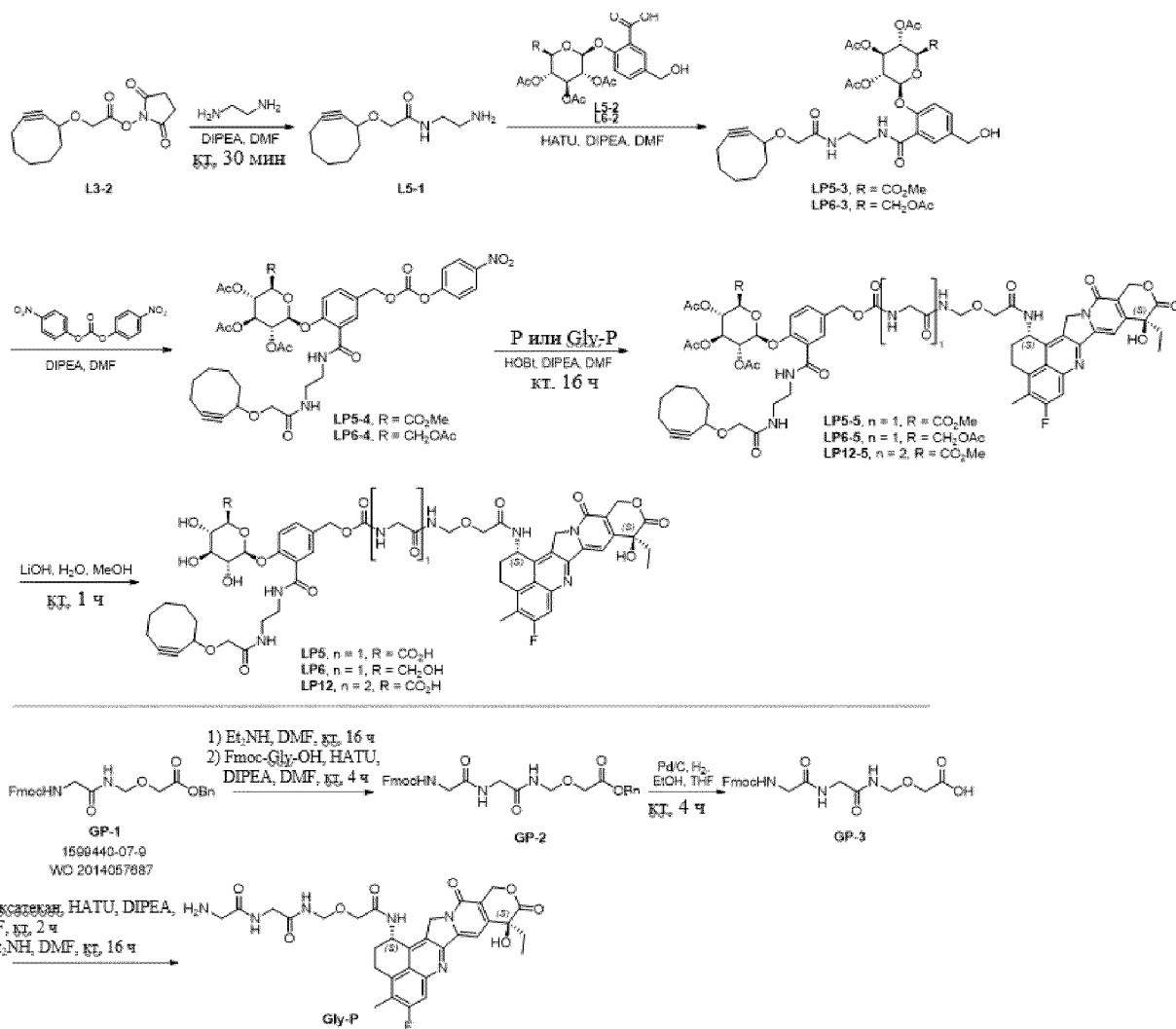
**[0617]** ПРИМЕР 6: Синтез соединений глюкозный линкер-полезные нагрузки

**[0618]** Соединения линкер-полезные нагрузки **LP5** и **LP6** синтезировали, как описано на схемах 7A-7B и примерах 6A-6N ниже.

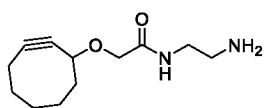
**Схема 7A: Синтез соединений глюкозный линкер-полезные нагрузки L5 и L6**



**Схема 7В: Синтез В соединений глюкозный линкер-полезные нагрузки L5, L6 и L12**



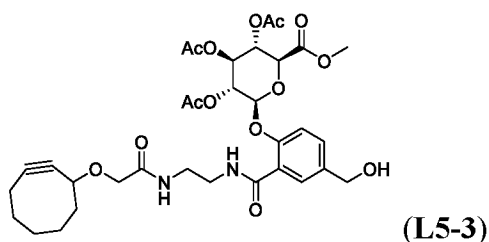
[0619] Пример 6А: N-(2-Аминоэтил)-2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамид (**L5-1**)



(**L5-1**)

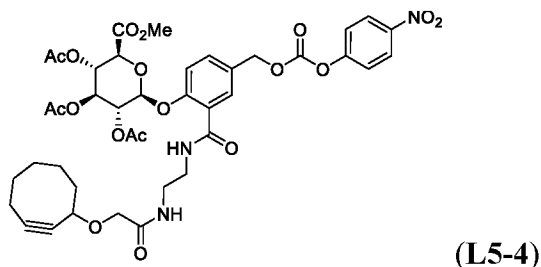
[0620] К раствору этилендиамина (0,71 г, 12 ммоль) в DMF (2,0 мл) медленно добавляли DIPEA (0,30 г, 2,4 ммоль) и раствор соединения **L3-2** (0,33 г, 1,2 ммоль) в DMF (3,0 мл), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. За ходом реакции до ее завершения следили с помощью LCMS. Полученную смесь очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в водн. бикарбонате аммония (0,8 мМ)) с получением соединения **L5-1** (0,18 г, выход 68%) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 225.2 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.74-7.63 (m, 1H), 4.28 (t, J = 5.8 Гц, 1H), 3.88-3.73 (m, 2H), 3.11-3.00 (m, 4H), 2.58 (t, J = 6.4 Гц, 2H), 2.27-2.06 (m, 3H), 1.94-1.71 (m, 4H), 1.66-1.54 (m, 2H), 1.45-1.33 (m, 1H) ppm.

[0621] Пример 6B: Метил (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[2-(2-(циклоокт-2-ин-1)-илокси)ацетиламино]этил карбамоил)-4-(гидроксиметил)фенокси]-оксан-2-карбоксилат (**L5-3**)



[0622] К смеси соединения **L5-2** (синтезированного в соответствии с WO2018182341A1, полностью включенного в настоящее описание посредством ссылки) (0,11 г, 0,23 ммоль) и HATU (96 мг, 0,25 ммоль) в сухом DMF (4 мл) добавляли соединение **L5-1** (51 мг, 0,23 ммоль) и DIPEA (89 мг, 0,69 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного израсходования **L5-2**, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь непосредственно очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%)) с получением соединения **L5-3** (0,14 г, выход 90%) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 691.4 (*M* + *H*)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.06-8.04 (m, 1H), 7.64-7.59 (m, 1H), 7.50-7.47 (m, 1H), 7.22-7.18 (m, 1H), 7.01-6.98 (m, 1H), 5.44-5.28 (m, 5H), 4.68 (s, 2H), 4.30-4.21 (m, 2H), 4.10-4.06 (m, 1H), 3.93-3.88 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.67-3.48 (m, 2H), 2.21-2.07 (m, 15H), 1.93-1.79 (m, 3H), 1.70-1.38 (m, 3H) ppm.

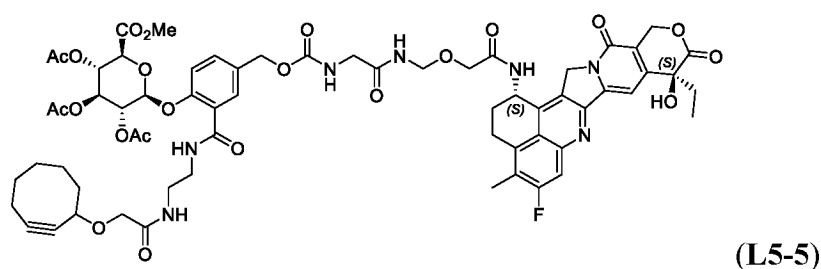
[00623] Пример 6C: Метил (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[2-(2-(циклоокт-2-ин-1)-илокси)ацетиламино]этил карбамоил)-4-[(4-нитрофеноксикарбонил)-окси]метил} фенокси]оксан-2-карбоксилат (**L5-4**)



[0624] К раствору соединения **L5-3** (0,14 г, 0,20 ммоль) в DMF (2,0 мл) добавляли бис(4-нитрофенил)карбонат (55 мг, 0,18 ммоль) и DIPEA (26 мг, 0,20 ммоль) при 0°C в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 минут, а затем при комнатной температуре в течение 3 часов. Реакционную смесь разбавляли водой (10 мл) и экстрагировали этилацетатом (20 мл x 3). Объединенный органический

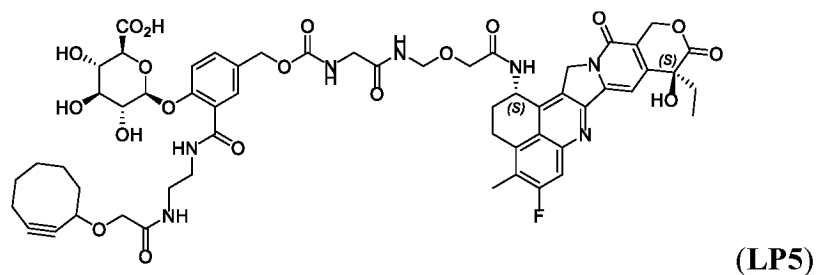
раствор промывали рассолом (10 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали флэш-хроматографией (40-60% этилацетата в петролейном эфире) с получением соединения **L5-4** (85 мг, выход 49%) в виде бесцветного масла. ESI  $m/z$ : 856,0 (M+H)<sup>+</sup>.

**[0625]** Пример 6D: Метил (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[2-({2-[2-(циклоокт-2-ин-1)-илокси]ацетиламино]этил}карбамоил)-4-({[({[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}-метокси)метил]карбамоил}метил]карбамоил]окси}метил)фенокси]-оксан-2-карбоксилат (**L5-5**)



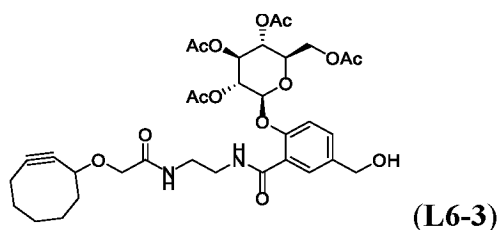
**[0626]** К раствору соединения **L5-4** (17 мг, 20 мкмоль) в DMF (1,0 мл) добавляли **P3** (12 мг, 20 мкмоль), HOBT (2,7 мг, 20 мкмоль) и DIPEA (5,1 мг, 40 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь непосредственно очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%)) с получением соединения **L5-5** (13 мг, выход 20%) в виде твердого вещества желтого цвета. ESI  $m/z$ : 649,0 (M/2+H)<sup>+</sup>.

**[0627]** Пример 6E: (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-[2-({2-[2-(Циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиламино]этил}карбамоил)-4-({[({[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил)-карбамоил]окси}метил)фенокси]-3,4,5-тригидроксиоксан-2-карбоновая кислота (**LP5**)



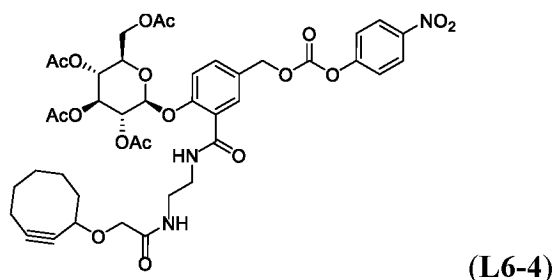
**[0628]** К смеси соединения **L5-5** (13 мг, 10 мкмоль) в метаноле (2 мл) добавляли *водн.* гидроксид лития (0,1 М, 2 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа. За ходом реакции до ее завершения следили с помощью LCMS. После гашения *водн.* HCl (1 N) до pH 4, полученную смесь очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (5-95% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%)) с получением соединения линкер-полезная нагрузка **LP5** (5 мг, выход 43%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 1156,3 (M+H)<sup>+</sup>.

**[0629]** Пример 6F: [(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-3,4,5-Трис(ацетилокси)-6-[2-({2-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиламино]этил} карбамоил)-4-(гидроксиметил)фенокси]оксан-2-ил]-метилацетат (**L6-3**)



**[0630]** Следуя методике получения **L5-3**, за исключением замены **L5-2** на **L6-2**, получали соединение **L6-3** (0,10 г, выход 80%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 705,3 (M+H)<sup>+</sup>.

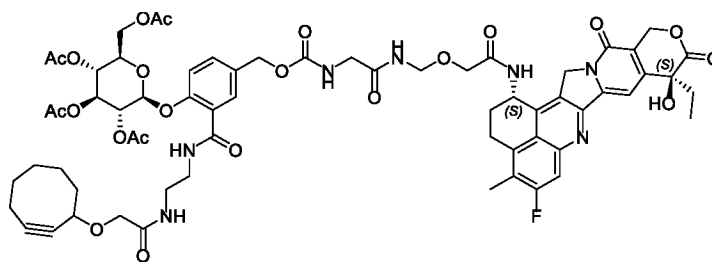
**[0631]** Пример 6G: [(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-3,4,5-Трис(ацетилокси)-6-[2-({2-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиламино]этил} карбамоил)-4-{{(4-нитрофеноксикарбонил)окси}метил}-фенокси]оксан-2-ил]метилацетат (**L6-4**)



**[0632]** Следуя методике получения **L5-4**, за исключением замены **L5-3** на **L6-3**, получали соединение **L6-4** (62 мг, выход 50%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 870,3 (M+H)<sup>+</sup>.

**[0633]** Пример 6H: [(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-3,4,5-Трис(ацетилокси)-6-[2-({2-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиламино]этил} карбамоил)-4-({({({({(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2,14</sup>.0<sup>4,13</sup>.0<sup>6,11</sup>.0<sup>20,24</sup>]-тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]-карбамоил} метил)карбамоил]окси} метил)фенокси]оксан-2-ил]метилацетат (**L6-5**)

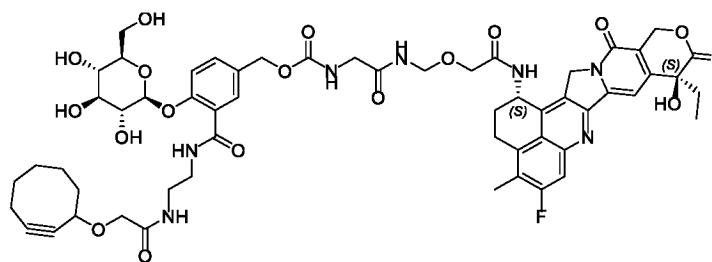




(L6-5)

[0634] Следуя методике получения **L5-5**, за исключением замены **L5-4** на **L6-4**, получали соединение **L6-5** (30 мг, выход 66%) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 655,7 ( $M/2+H$ )<sup>+</sup>.

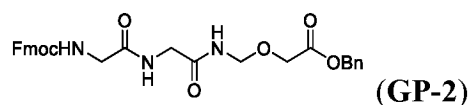
[0635] Пример 6I: [3-({2-[2-(Циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетида]этил}карбамоил)-4-{{(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)оксан-2-ил}окси}фенил]метил *N*-({[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил)карбамат (**LP6**)



(LP6)

[0636] Следуя методике получения **LP5**, за исключением замены **L5-5** на **L6-5**, получали соединение линкер-полезная нагрузка **LP6** (9 мг, выход 34%) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 1142,3 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

[0637] Пример 6J: Бензил-2-({2-[2-({(9*H*-флуорен-9-ил)метокси}карбонил)-амино]ацетида]ацетида}метокси)ацетат (**GP-2**)

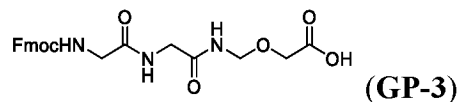


(GP-2)

[0638] К раствору соединения **GP-1** (CAS: 1599440-07-9, синтезировано согласно WO 2014057687, 0,20 г, 0,42 ммоль) в DMF (5 мл) добавляли диэтиламин (0,15 г, 2,1 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь непосредственно разделяли флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в водн. бикарбонате аммония (0,05%)) с получением белого твердого вещества (0,1 г, ESI  $m/z$ : 253,1), которое добавляли в смесь Fmoc-глицин (0,14 г, 0,48 ммоль) и HATU (0,23 г, 0,59 ммоль) в DMF (5 мл) с последующим добавлением DIPEA (0,15 г, 0,59 ммоль).

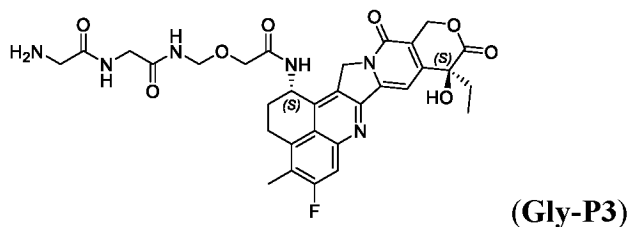
Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь очищали непосредственно препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,05%)) с получением соединения **GP-2** (0,14 г, выход 64%) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 554,3 (M + Na)<sup>+</sup>.

**[0639]** Пример 6K: 2-({2-[2-({[(9H-Флуорен-9-ил)метокси]карбонил}амино)ацетида]-ацетида}метокси)уксусная кислота (**GP-3**)



**[0640]** К раствору соединения **GP-2** (0,10 г, 0,19 ммоль) в этилацетате (10 мл) добавляли палладий-на-угле (0,10 г) в атмосфере азота. Реакционную смесь перемешивали под баллоном с водородом при комнатной температуре в течение 4 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь фильтровали через целит и фильтрат концентрировали *in vacuo* с получением соединения **GP-3** (56 мг, выход 65%) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$  (слабый): 464,0 (M + Na)<sup>+</sup>.

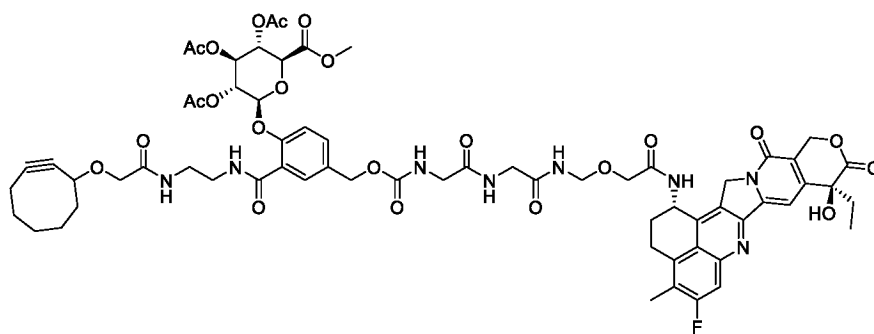
**[0641]** Пример 6L: 2-Амино-*N*-({[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-дизагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,<sup>14</sup>.0<sup>4</sup>,<sup>13</sup>.0<sup>6</sup>,<sup>11</sup>.0<sup>20</sup>,<sup>24</sup>]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}-метил)ацетамид (**Gly-P3**)



**[0642]** К раствору соединения **GP-3** (41 мг, 93 мкмоль) в сухом DMF (5 мл) последовательно добавляли HATU (39 мг, 0,10 ммоль), эксатекан (мезилат, 41 мг, 93 мкмоль) и DIPEA (36 мг, 0,28 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь разделяли флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%)) с получением **Fmoc-Gly-P3** (50 мг, выход 63%, ESI  $m/z$ : 859,0) в виде белого твердого вещества, которое растворяли в DMF (5 мл). К раствору добавляли диэтиламин (20 мг, 0,27 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Полученную смесь разделяли флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%)) с

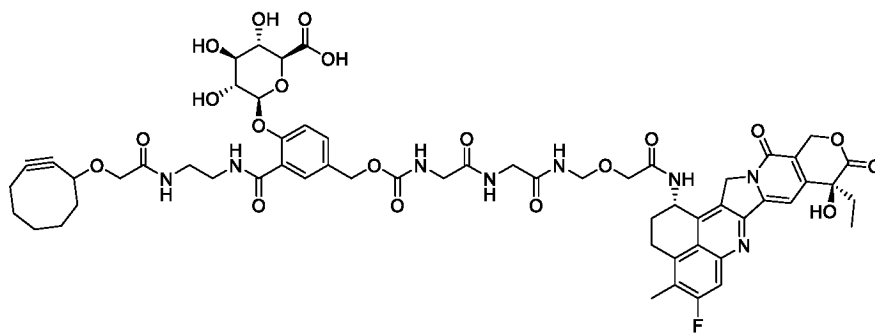
получением **Gly-P3** (соль TFA, 40 мг, выход 57% из эксатекана) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 637,3 (M+H)<sup>+</sup>.

**[0643]** Пример 6M: Метил (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[2-({2-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиламино]этил} карбамоил)-4-{{{[({[({[({[({[10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)карбамоил]метил} карбамоил)окси]-метил} фенокси]оксан-2-карбоксилат (**LP12-5**)



**[0644]** Следуя методике, аналогичной методике получения **LP10-5**, за исключением замены **P3** на **Gly-P3**, получали соединение **LP12-5** (23 мг, выход 39%) в виде желтого твердого вещества. ESI m/z: 860,5 (M – M<sub>DXD</sub> + H)<sup>+</sup>, 677.4 (M/2 + H)<sup>+</sup>.

**[0645]** Пример 6N: (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-[2-({2-[2-(Циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиламино]-этил} карбамоил)-4-{{{[({[({[({[({[10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]карбамоил}-метил)карбамоил]метил} карбамоил)окси]метил} фенокси]-3,4,5-тригидроксиоксан-2-карбоновая кислота (**LP12**)



**[0646]** Следуя методике, аналогичной методике получения **LP10**, за исключением замены **LP10-5** на **LP12-5**, получали соединение линкер-полезная нагрузка **LP12** (3 мг, выход 27%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 607.4 (M/2 + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.72 (t, J = 6.5 Гц, 1H), 8.62-8.49 (m, 2H), 8.19 (t, J = 5.1 Гц, 1H), 7.98-

7.90 (m, 1H), 7.82-7.71 (m, 2H), 7.53 (t,  $J = 6.0$  Гц, 1H), 7.47-7.41 (m, 1H), 7.37-7.28 (m, 2H), 6.56 (s, 1H), 5.69-5.55 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.20 (s, 3H), 4.99 (s, 2H), 4.89 (d,  $J = 5.9$  Гц, 1H), 4.63 (d,  $J = 6.8$  Гц, 2H), 4.31-4.23 (m, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.87 (d,  $J = 14.8$  Гц, 1H), 3.78-3.61 (m, 4H), 3.29-3.12 (m, 5H), 2.39 (s, 3H), 2.26-2.10 (m, 4H), 2.06-1.96 (m, 2H), 1.94-1.78 (m, 4H), 1.77-1.65 (m, 2H), 1.61-1.42 (m, 3H), 1.38-1.18 (m, 6H), 0.90-0.83 (m, 3H) ppm. (Протон кислоты не был выявлен)  $^{19}\text{F}$  ЯМР (376 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  -111.3 ppm.

**[0647] ПРИМЕР 7:** Синтез соединения разветвленный линкер-полезные нагрузки (BL2P)

**[0648] Пример 7A:** Синтез ключевого промежуточного соединения II разветвленного линкера

**[0649]** Ключевые промежуточные соединения II синтезировали, как описано на **схеме 8** и в примерах 7A-7B ниже. На схеме 9 показаны коммерческие исходные материалы, используемые в синтезах.

Схема 8. Синтез ключевого промежуточного соединения II разветвленного линкера

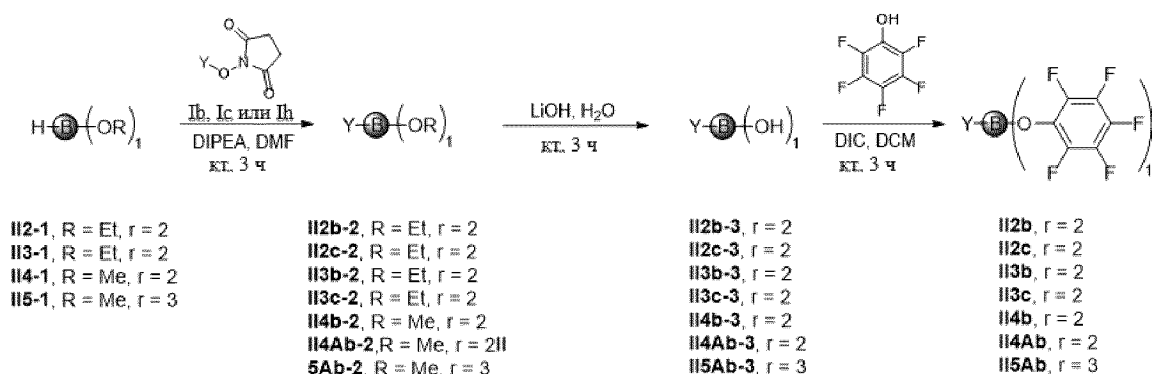


Таблица 12. Коммерческие материалы OSu Ib, Ic и Ih:

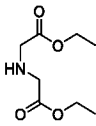
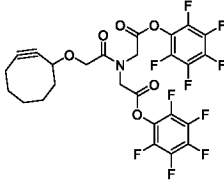
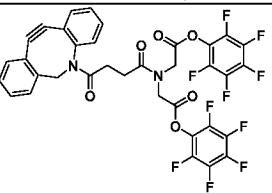
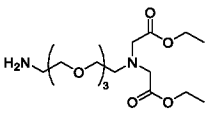
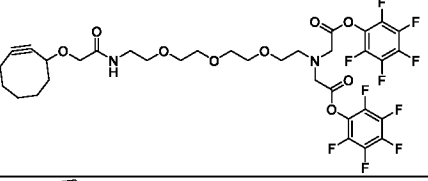
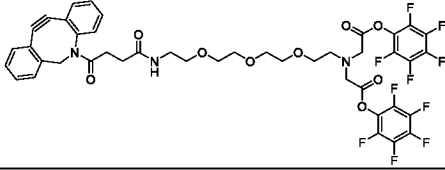
<b>Ib</b>		1425803-45-7
<b>Ic</b>		1353016-71-3
<b>Ih</b>		2101206-22-6

**[0650] Пример 7B:** Общая методика для промежуточного соединения II

**[0651]** К раствору активного сложного эфира I (1,0 экв.) в DMF (0,4 М) добавляли DIPEA (3,0 экв.) и разветвленный амин II-1 (1,0 экв.). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов, что контролировали с

помощью LCMS. Полученную смесь непосредственно очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-70% ацетонитрила в воде) с получением соединения **II-2** в виде белого твердого вещества, которое растворяли в THF (0,5 М). К раствору добавляли воду ( $V_{\text{H}_2\text{O}} : V_{\text{THF}} = 1 : 1$ ) и гидрат гидроксида лития (4 экв. **II-2**). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь непосредственно разделяли флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-70% ацетонитрила в воде) с получением соединения **II-3** в виде белого твердого вещества, которое растворяли в воде (0,1 М). К раствору добавляли ацетонитрил (ацетонитрил :  $V_{\text{H}_2\text{O}} = 1 : 1$ ), пентафторфенол (2,0 экв. **II-3**) и DIC (2,0 экв. **II-3**), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь очищали непосредственно флэш-хроматографией с обращенной фазой (10-99% ацетонитрила в воде) с получением ключевого промежуточного соединения **II** в виде бесцветного масла.

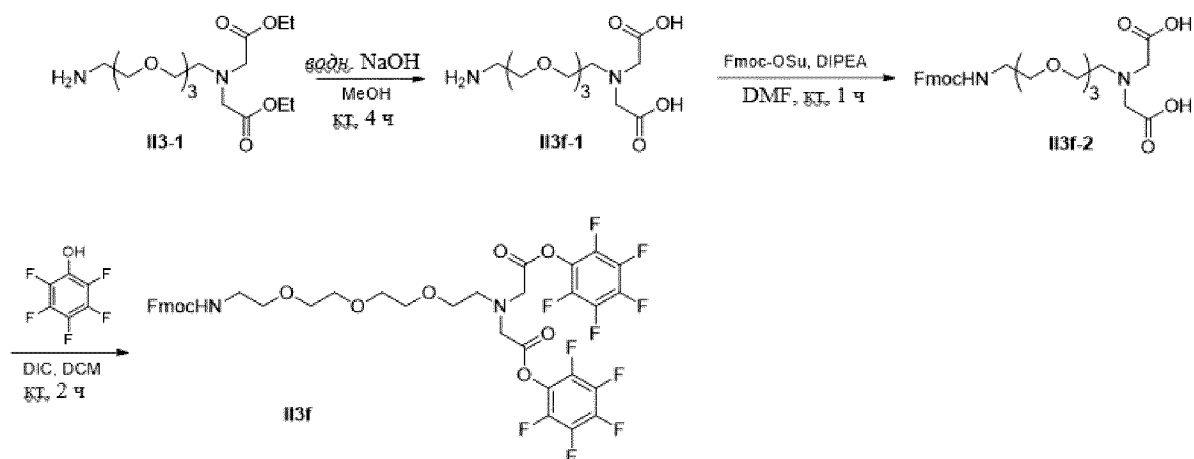
**Таблица 13. Исходные материалы II#-1 и промежуточные соединения II разветвленного линкера**

Исходные материалы II#-1			OSu		Промежуточные соединения разветвленного линкера		
#	Структура	CAS Источники	#	#	Структуры	Выход	ESI m/z
II2 -1		6290-05-7 Коммерческий	Ib	II2b		17%	630.2(M + H) <sup>+</sup> , 652.2 (M + Na) <sup>+</sup> .
			Ic	II2c		17%	753.2 (M + H) <sup>+</sup> , 775.2 (M + Na) <sup>+</sup>
II3 -1		944163-34-2 Синтезировано как тетрагедрон 63 (2007) 5539–5547	Ib	II3b		24%	805.3 (M + H) <sup>+</sup> , 827.3 (M + Na) <sup>+</sup>
			Ic	II3c		11%	928.3 (M + H) <sup>+</sup>

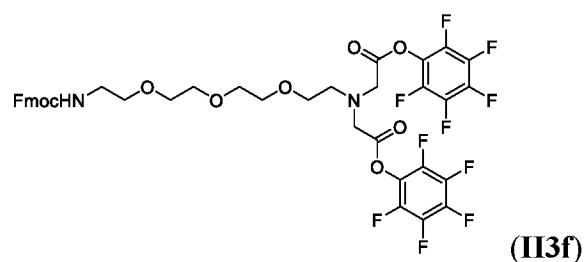
II4 -1		2404597-22-2 Синтезировано как WO2019199621	Ib	II4b		24%	732.0 (M + H) <sup>+</sup> , 754.0 (M + Na) <sup>+</sup>
			Ih	II4Ab		12%	891.3 (M + H) <sup>+</sup> , 913.3 (M + Na) <sup>+</sup>
II5 -1		166047-75-2 Синтезировано как WO2019199621	Ih	II5Ab		12%	1181.3 (M + Na) <sup>+</sup>

[0652] Пример 7С: Синтез промежуточного соединения II3f

Схема 9. Синтез промежуточного соединения II3f разветвленного линкера



[0653] 2,3,4,5,6-Пентафторфенил 1-((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-12-[2-оксо-2-(2,3,4,5,6-пентафторфенокси)этил]-3,6,9-триокса-12-азатетрадекан-14-оат (II3f)



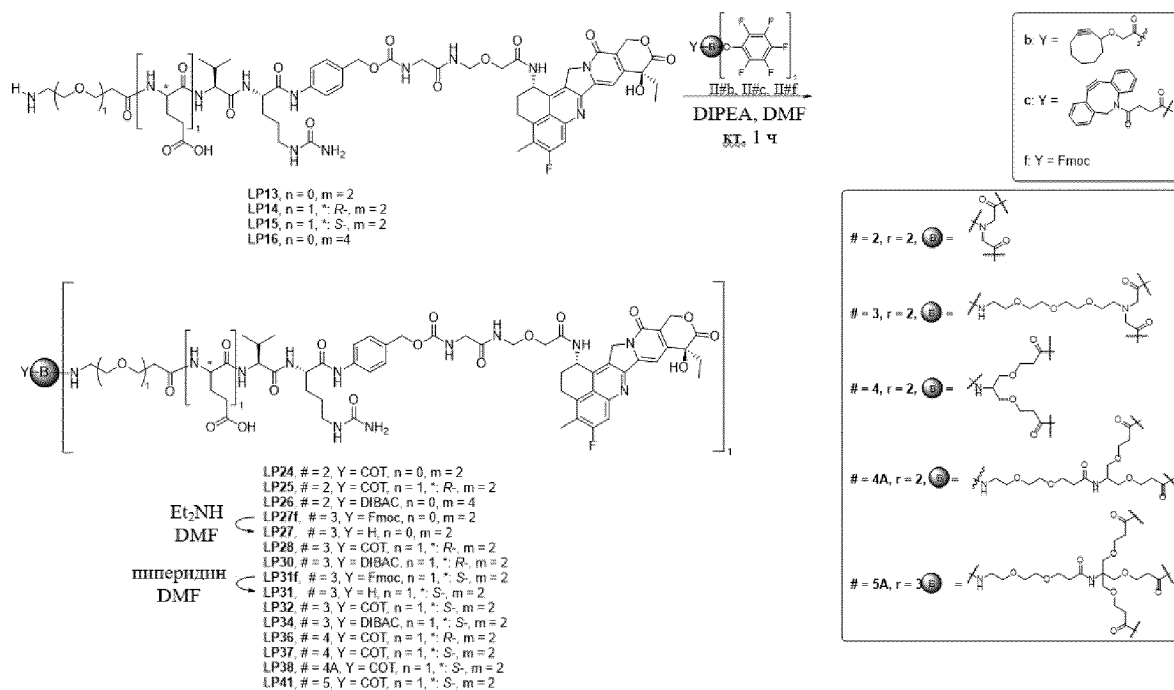
**[0654]** К раствору **ПЗ-1** (2,6 г, 7,0 ммоль) в метаноле (20 мл) добавляли *водн.* гидроксид натрия (1,4 М, 20 мл), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь промывали разбавленным *водн.* гидрохлоридом (1,0 М, 50 мл x 3), водой (100 мл) и рассолом (100 мл). Органический раствор сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме* с получением **ПЗf-1** (2,2 г, неочищенный) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 309,3 (M + H)<sup>+</sup>.

**[0655]** К раствору **ПЗf-1** (0,10 г, неочищенный) в DMF (10 мл) добавляли Fmoc-OSu (CAS: 82911-69-1, 0,11 г, 0,32 ммоль) и DIPEA (0,13 г, 1,0 ммоль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь непосредственно очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,03%)) с получением **ПЗf-2** (0,15 г, выход 90%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 531,3 (M+H)<sup>+</sup>.

**[0656]** К смеси **ПЗf-2** (50 мг, 94 мкмоль) в DCM (10 мл) добавляли пентафторфенол (35 мг, 0,19 ммоль) и DIC (24 мг, 0,19 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь концентрировали *в вакууме* с получением **ПЗf** (56 мг, выход 69%) в виде бесцветного масла, которое использовали непосредственно без дополнительной очистки. ESI m/z: 863,2 (M+H)<sup>+</sup>.

**[0657]** Пример 7D: Синтез соединений разветвленный линкер-P3

**[0658]** Схема 10. Синтез соединений линейный vsPAB линкер-P (LP1, LP2, LP20, LP22, LP24) и разветвленный vsPAB линкер-P (LP24-31, LP36-38, LP41)

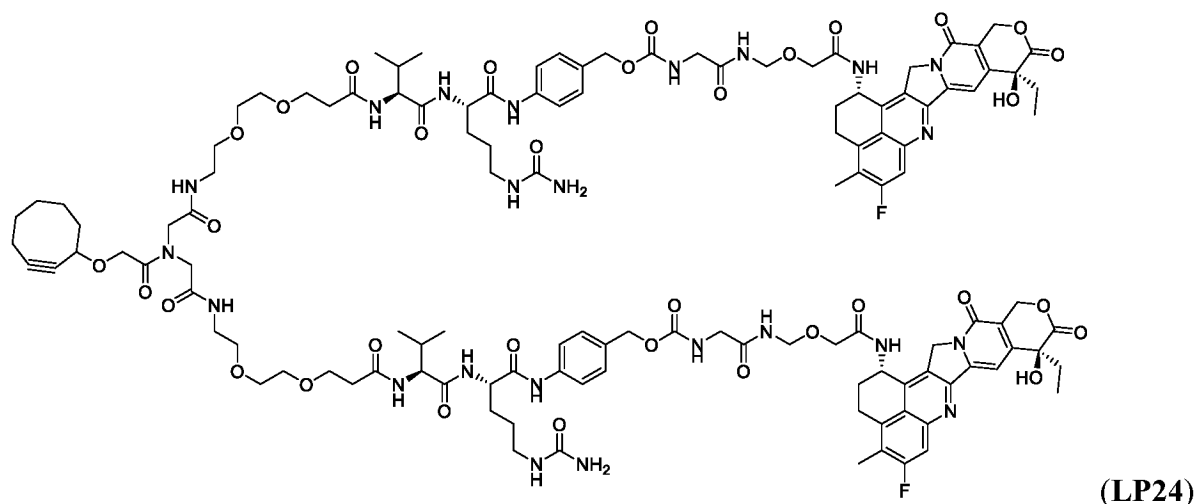


**[0659]** Пример 7E: Общая методика для LP24 – LP42

**[0660]** К раствору промежуточного соединения **II** (1 экв.) в DMF (3 мМ) добавляли DIPEA (10 экв.) и соединение аминокликер-полезная нагрузка (2-3 экв., за исключением 4,0 экв. для **LP41**), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного израсходования соединения аминокликер-полезная нагрузка, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь очищали препаративной HPLC с получением соединения разветвленный кликер-полезная нагрузка в виде белого твердого вещества.

**[0661]** Пример 7F: {4-[(2S)-5-(Карбамоиламино)-2-[(2S)-2-(3-{2-[2-(2-{N-[(2-[2-(2-[(1S)-1-[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{4-([[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-дизагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]-тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]-карбамоил}метил)карбамоил]окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}этокси)этокси]этил}карбамоил)метил]-2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо}ацетиамидо)этокси]этокси}пропанамидо)-3-метилбутанамидо]-пентанамидо]фенил}метил-N-([[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-дизагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил)-карбамат (**LP24**)

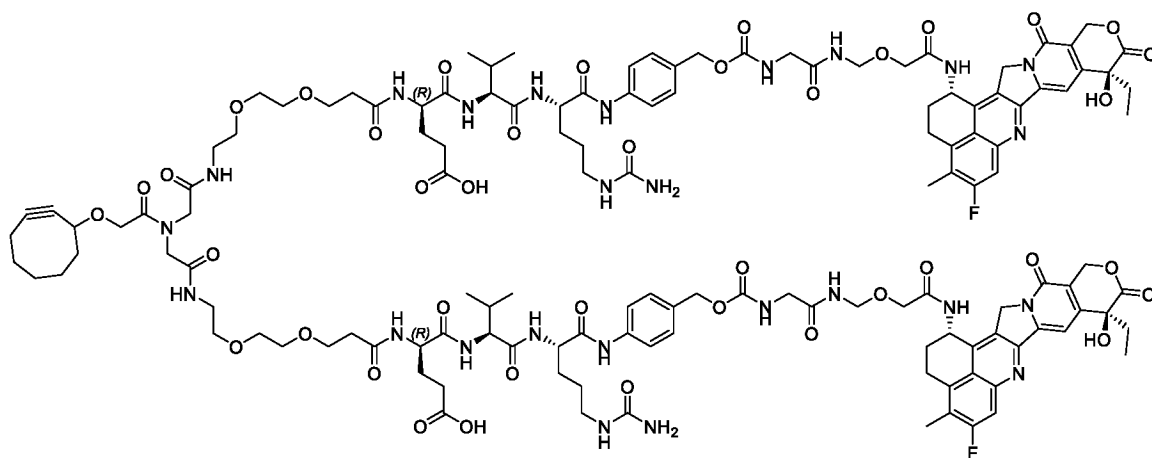




**[0662]** Следуя общей методике, из **LP13** (42 мг, 32 мкмоль) и промежуточного соединения **П2b** (10 мг, 16 мкмоль) получали соединение разветвленной линкер-полезная нагрузка **LP24** (20 мг, выход 44%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (5-95% ацетонитрила в водн. TFA (0,05%)). ESI m/z: 850.8 (M/3 + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 10.0 (s, 2H), 8.81-8.78 (m, 2H), 8.64 (d, J = 5.6 Гц, 1H), 8.50 (d, J = 9.2 Гц, 2H), 8.25 (d, J = 4.8 Гц, 1H), 8.13 (d, J = 7.2 Гц, 2H), 7.88 (d, J = 8.8 Гц, 2H), 7.78 (d, J = 10.4 Гц, 2H), 7.58 (d, J = 8.4 Гц, 4H), 7.42 (t, J = 6.0 Гц, 2H), 7.31 (s, 2H), 7.27 (d, J = 8.4 Гц, 4H), 6.03-5.96 (m, 2H), 5.62-5.57 (m, 2H), 5.46-5.36 (m, 6H), 5.24-5.14 (m, 4H), 4.92 (s, 4H), 4.63 (d, J = 6.4 Гц, 4H), 4.42-4.35 (m, 2H), 4.27-4.22 (m, 3H), 4.14 (d, J = 14.4 Гц, 1H), 4.02-3.99 (m, 6H), 3.94 (d, J = 14.0 Гц, 1H), 3.87 (s, 2H), 3.63-3.57 (m, 9H), 3.51-3.46 (m, 8H), 3.25-3.18 (m, 6H), 3.18-3.05 (m, 2H), 3.02-2.98 (m, 2H), 2.98-2.89 (m, 2H), 2.47-2.45 (m, 2H), 2.41-2.35 (m, 8H), 2.23-2.12 (m, 8H), 2.03-1.91 (m, 4H), 1.86-1.76 (m, 8H), 1.76-1.63 (m, 4H), 1.63-1.51 (m, 5H), 1.45-1.32 (m, 6H), 0.88-0.81 (m, 18H) ppm. (Протон CF<sub>3</sub>COOH не был выявлен) <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ -111, -74 ppm.

**[0663]** Пример 7G: (4R)-4-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(Карбамоиламино)-1-{{[4-({{[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-дизагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил]карбамоил]окси} метил]фенил]-карбамоил} бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-(3-{2-[2-(2-{N-((2-[2-(2-{{[(1R)-1-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-({{[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-дизагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил]карбамоил]окси} метил]фенил]-

карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-3-карбоксивпропил]-  
карбамоил}этокси)этокси]этил}карбамоил)метил]-2-(циклоокт-2-ин-1-  
илокси)ацетамидо}ацетамидо)этокси]этокси}пропанамидо)бутановая кислота (**LP25**)

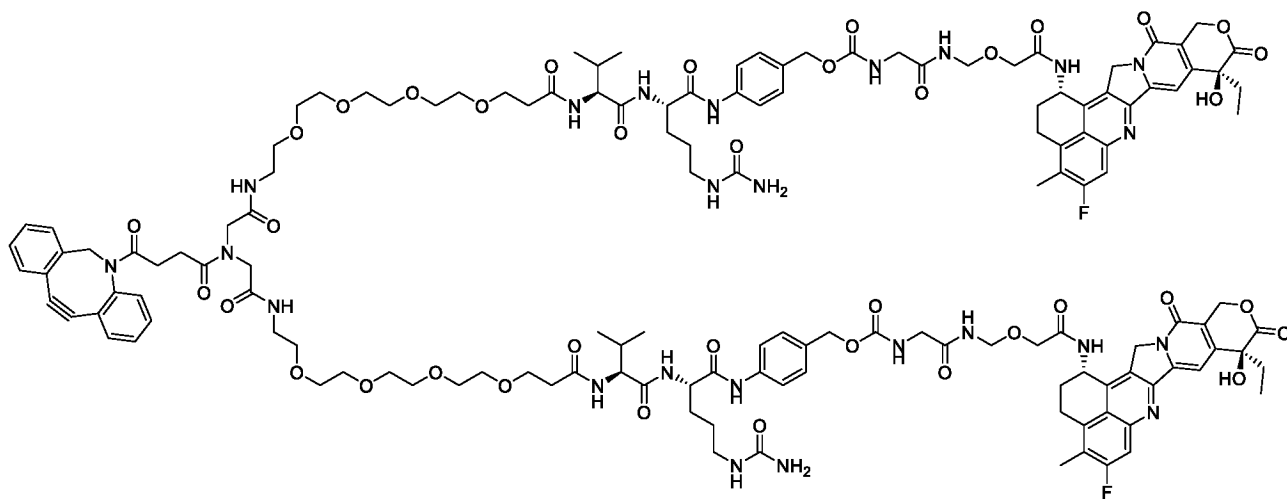


((**LP25**))

[0664] Следуя общей методике, из **LP13** (24 мг, 19 мкмоль) и промежуточного соединения **П2b** (4,0 мг, 6,4 мкмоль) получали соединение разветвленный линкер-полезная нагрузка **LP25** (6 мг, выход 33%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в водн. TFA (0,05%)). ESI  $m/z$ : 936.7 ( $M/3 + H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 9.79 (br s, 2H), 8.80 (t,  $J = 6.4$  Гц, 2H), 8.69 (br s, 1H), 8.51 (d,  $J = 8.4$  Гц, 2H), 8.33-8.26 (m, 2H), 8.18-8.14 (m, 2H), 8.12-8.06 (m, 2H), 7.78 (d,  $J = 11.2$  Гц, 2H), 7.63-7.59 (m, 4H), 7.43 (t,  $J = 6.0$  Гц, 2H), 7.30 (s, 2H), 7.27 (d,  $J = 8.0$  Гц, 4H), 6.53 (br s, 2H), 6.08-6.01 (m, 2H), 5.62-5.57 (m, 2H), 5.48-5.44 (m, 4H), 5.41 (s, 4H), 5.19 (s, 4H), 4.92 (s, 4H), 4.63 (d,  $J = 6.4$  Гц, 4H), 4.37-4.31 (m, 4H), 4.27-4.11 (m, 5H), 4.03-3.98 (m, 6H), 3.96-3.91 (m, 1H), 3.86 (s, 2H), 3.64-3.60 (m, 4H), 3.53-3.49 (m, 2H), 3.47-3.42 (m, 10H), 3.25-3.18 (m, 8H), 3.15-3.10 (m, 2H), 3.04-2.92 (m, 5H), 2.38 (s, 8H), 2.21-2.11 (m, 12H), 2.07-1.98 (m, 4H), 1.88-1.75 (m, 13H), 1.67-1.61 (m, 2H), 1.57-1.53 (m, 2H), 1.47-1.34 (m, 6H), 0.89-0.81 (m, 20H) ppm. <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) - 71.08, -111.30 ppm.

[0665] Пример 7H: {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-{1-[2-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил]-*N*-{[(14-[[[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[[4-([(((10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2,14</sup>.0<sup>6,13</sup>.0<sup>6,11</sup>.0<sup>20,24</sup>]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил]карбамоил]окси}-метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-3,6,9,12-тетраоксаттрадекан-1-ил)карбамоил]метил}-4-оксобутанамидо)ацетамидо]-3,6,9,12-

тетраоксапентадекан-15-амидо}-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)-  
пентанамидо]фенил}метил N-({[({[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-  
5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-  
1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}-  
метил)карбамат (**LP26**)

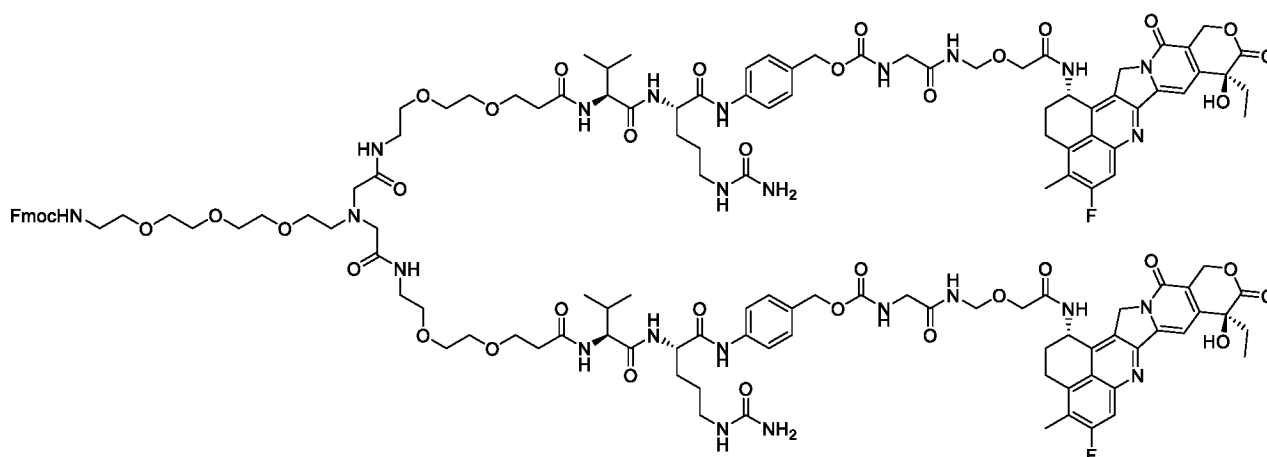


(LP26)

[0666] Следуя общей методике, из **LP16** (6,0 мг, 4,8 мкмоль) и промежуточного соединения **П2с** (2,0 мг, 1,6 мкмоль) получали соединение разветвленный линкер-полезная нагрузка **LP26** (5 мг, выход 65%) в виде светло-желтого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в водн. растворе муравьиной кислоты (0,01%)). ESI  $m/z$ : 717.3 ( $M/4 + H$ )<sup>+</sup> (форма с открытием E-кольца,  $R_t = 6,38$  мин, 14%); 950.2 ( $M/3 + H$ )<sup>+</sup>, 712.9 ( $M/4 + H$ )<sup>+</sup> (лактонная форма,  $R_t = 7,10$  мин, 86%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.99 (s, 2H), 8.80 (t,  $J = 6.8$  Гц, 2H), 8.68-8.64 (m, 1H), 8.50 (d,  $J = 8.8$  Гц, 2H), 8.20 (t,  $J = 6.4$  Гц, 1H), 8.13 (d,  $J = 7.6$  Гц, 2H), 7.88 (d,  $J = 8.4$  Гц, 2H), 7.78 (d,  $J = 10.8$  Гц, 2H), 7.69 (d,  $J = 7.6$  Гц, 1H), 7.61-7.57 (m, 5H), 7.50-7.41 (m, 5H), 7.37-7.26 (m, 9H), 6.53(s, 2H), 5.98 (t,  $J = 5.6$  Гц, 2H), 5.62-5.57 (m, 2H), 5.45-5.36 (m, 8H), 5.19 (s, 4H), 5.01 (d,  $J = 14.4$  Гц, 1H), 4.92 (s, 4H), 4.63 (d,  $J = 6.0$  Гц, 4H), 4.41-4.35 (m, 2H), 4.23 (t,  $J = 8.0$  Гц, 2H), 4.02 (s, 4H), 3.95-3.81 (m, 3H), 3.62-3.56 (m, 8H), 3.47-3.44 (m, 24H), 3.22-3.17 (m, 6H), 3.05-2.98 (m, 2H), 2.93-2.88 (m, 2H), 2.64-2.58 (m, 2H), 2.39-2.35 (m, 8H), 2.22-2.11 (m, 6H), 2.00-1.82 (m, 9H), 1.79-1.53 (m, 9H), 1.49-1.31 (m, 6H), 0.86-0.81 (m, 18H) ppm. <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  -111 ppm.

[0667] Пример 7I: (9H-Флуорен-9-ил)метил N-[1-({2-[2-(2-{{[(1*S*)-1-{{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{{4-({[({[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил)-

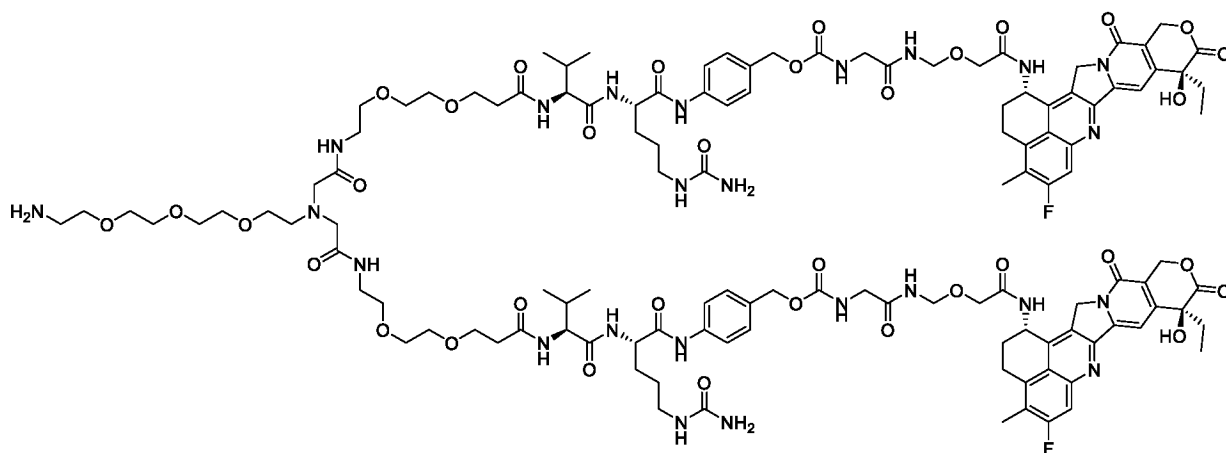
карбамоил]окси} метил)фенил]карбамоил} бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-  
 карбамоил} этокси)этокси]этил} карбамоил)-2-[(2-[2-(2-[(1*S*)-1-[(1*S*)-4-  
 (карбамоиламино)-1-[4-([[(1*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-  
 диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-  
 1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)-  
 карбамоил]окси} метил)фенил]карбамоил} бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-  
 карбамоил} этокси)этокси]этил} карбамоил)метил]-5,8,11-триокса-2-азатридекан-13-  
 ил]карбамат (**LP27f**)



(**LP27f**)

[0668] Следуя общей методике, из **LP13** (67 мг, 58 мкмоль) и промежуточного соединения **ПЗf** (16 мг, 19 мкмоль) получали соединение **LP27f** (21 мг, выход 39%) в виде белого твердого вещества после очистки флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,05%)). ESI *m/z*: 1392,2 (*M*/2+*H*)<sup>+</sup>.

[0669] Пример 7J: {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-{3-[2-(2-{1-Амино-12-[(2-[(2-[(1*S*)-1-[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-[4-([[(1*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]карбамоил}-метил)карбамоил]окси} метил)фенил]карбамоил} бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-карбамоил} этокси)этокси]этил} карбамоил)метил]-3,6,9-триокса-12-азатетрадекан-14-амидо} этокси)этокси]пропанамидо}-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)-пентанамидо]фенил} метил-N-([[(1*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]карбамоил}-метил)карбамат (**LP27f**)

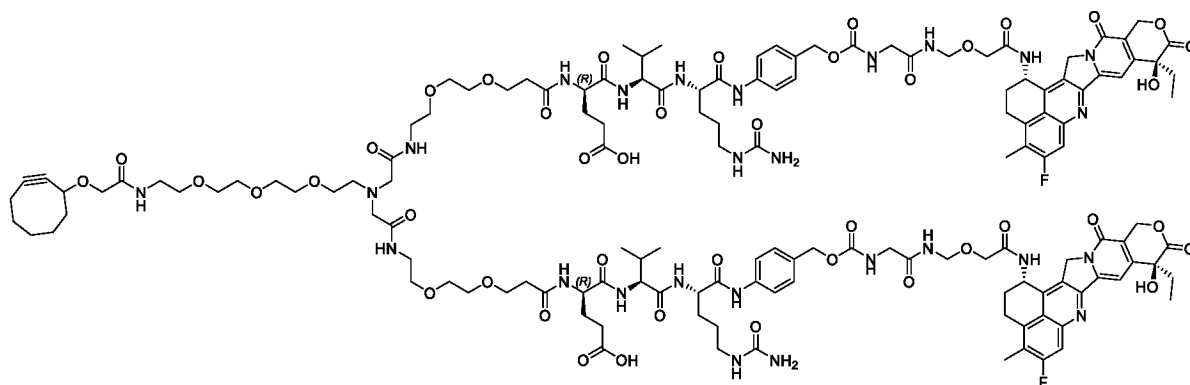


(LP27)

[0670] К раствору соединения **LP27f** (21 мг, 7,5 мкмоль) в DMF (5 мл) добавляли диэтиламин (3 мг, 38 мкмоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Fmoc по данным LCMS. Полученную смесь разделяли флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в водн. TFA (0,01%)) с получением **LP27** (12 мг, выход 60%) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 1280.9 ( $M/2 + H$ )<sup>+</sup>, 854.3 ( $M/3 + H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.02 (s, 1H), 8.84-8.77 (m, 2H), 8.51 (d,  $J = 9.0$  Гц, 2H), 8.24-8.14 (m, 3H), 8.10-8.04 (m, 2H), 7.91 (d,  $J = 9.0$  Гц, 2H), 7.78 (d,  $J = 11.1$  Гц, 2H), 7.63-7.55 (m, 3H), 7.46-7.40 (m, 2H), 7.32-7.24 (m, 4H), 6.53 (s, 2H), 6.05-5.99 (m, 2H), 5.65-5.55 (m, 3H), 5.43 (dd,  $J = 11.8, 1.3$  Гц, 6H), 5.19 (s, 3H), 4.92 (s, 3H), 4.70-4.55 (m, 3H), 4.40-4.35 (m, 2H), 4.26-4.20 (m, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.70-3.37 (m, 42H), 3.25-3.21 (m, 5H), 3.16 (s, 6H), 3.05-2.98 (m, 3H), 2.97-2.89 (m, 4H), 2.69-2.62 (m, 3H), 2.42-2.30 (m, 9H), 2.22-2.11 (m, 5H), 2.00-1.92 (m, 3H), 1.88-1.79 (m, 4H), 1.74-1.65 (m, 3H), 1.63-1.54 (m, 3H), 1.49-1.27 (m, 7H), 0.91-0.78 (m, 11H) ppm. (протоны TFA не были выявлены)

[0671] Пример 7К: (4*R*)-4-{{[(1*S*)-1-{{[(1*S*)-4-(Карбамоиламино)-1-{{4-{{{{[[[(10*S*, 23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-дизагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>, 14.0<sup>4</sup>, 13.0<sup>6</sup>, 11.0<sup>20</sup>, 24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)карбамоил]окси} метил)фенил]-карбамоил} бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-{3-[2-(2-{12-[[2-[2-(2-{{[(1*R*)-1-{{[(1*S*)-1-{{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{{4-{{{{[[[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-дизагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>, 14.0<sup>4</sup>, 13.0<sup>6</sup>, 11.0<sup>20</sup>, 24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)карбамоил]окси} метил)фенил]-карбамоил} бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-3-

карбокситпропил]карбамоил}этокси)этокси]этил}карбамоил)метил]-1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]-3,6,9-триокса-12-азатетрадекан-14-амидо}этокси)этокси]-пропанамидо}бутановая кислота (**LP28**)

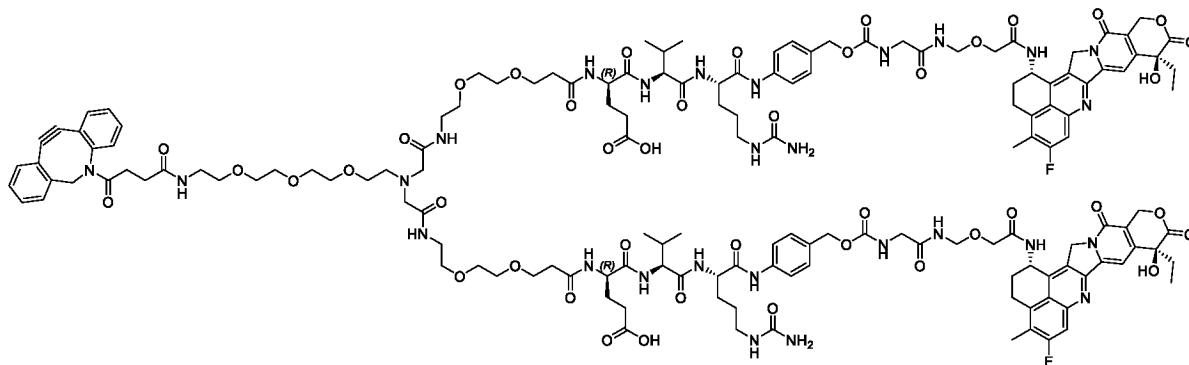


(**LP28**)

[0672] Следуя общей методике, из **LP14** (17 мг, 13 мкмоль) и промежуточного соединения **ПЗb** (4,0 мг, 5,0 мкмоль) получали соединение разветвленный линкер-полезная нагрузка **LP28** (соль TFA, 5 мг, выход 34%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в водн. TFA (0,05%)). ESI  $m/z$ : 995.2 ( $M/3 + H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.82 (s, 2H), 8.81 (t,  $J = 6.4$  Гц, 2H), 8.52 (d,  $J = 8.8$  Гц, 2H), 8.19-8.14 (m, 4H), 8.07 (d,  $J = 8.4$  Гц, 2H), 7.78 (d,  $J = 10.8$  Гц, 2H), 7.61 (d,  $J = 8.4$  Гц, 4H), 7.43 (t,  $J = 5.6$  Гц, 2H), 7.31 (s, 2H), 7.27 (d,  $J = 8.4$  Гц, 4H), 6.48 (br s, 2H), 6.01 (br s, 2H), 5.63-5.57 (m, 2H), 5.43-5.40 (m, 4H), 5.21-5.16 (m, 4H), 4.93 (s, 4H), 4.63 (d,  $J = 6.4$  Гц, 4H), 4.42-4.33 (m, 4H), 4.30-4.25 (m, 2H), 4.24-4.19 (m, 2H), 4.02 (s, 4H), 3.90-3.85 (m, 2H), 3.48-3.73 (m, 2H), 3.69 (br s, 4H), 3.64-3.60 (m, 8H), 3.58-3.55 (m, 6H), 3.52-3.50 (m, 8H), 3.29-3.24 (m, 8H), 3.03-3.00 (m, 2H), 2.97-2.94 (m, 2H), 2.40-2.37 (m, 8H), 2.26-2.15 (m, 14H), 2.09-2.00 (m, 6H), 1.93-1.81 (m, 12H), 1.79-1.70 (m, 8H), 1.66-1.55 (m, 6H), 1.49-1.34 (m, 8H), 0.90-0.81 (m, 20H) ppm. (Протоны COOH и TFA не были выявлены) <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  -71.08, -111.30 ppm.

[0673] Пример 7L: (4*R*)-4-[3-(2-{2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-12-[(2-[2-(2-[(1*R*)-1-[(1*S*)-1-[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{4-([([([([10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2,14</sup>.0<sup>4,13</sup>.0<sup>6,11</sup>.0<sup>20,24</sup>]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}-метил]карбамоил]окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-карбамоил}-3-карбокситпропил]карбамоил}этокси)этокси]этил}карбамоил)метил]-3,6,9-триокса-12-азатетрадекан-14-амидо]этокси)этокси)пропанамидо]-4-[(1*S*)-1-

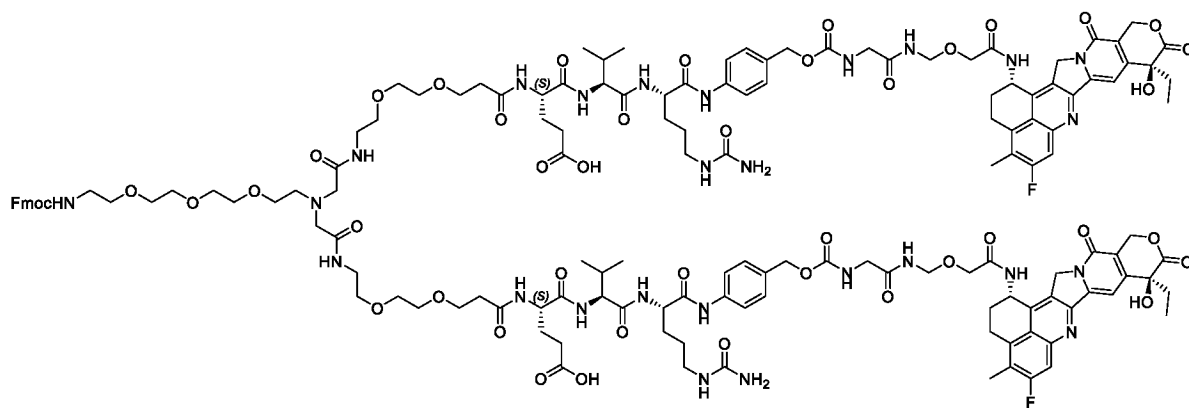
{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{[4-({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}-метил]карбамоил]окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-карбамоил}бутановая кислота (**LP30**)



(**LP30**)

[0674] Следуя общей методике, из **LP14** (16 мг, 12 мкмоль) и промежуточного соединения **ПЗс** (4,0 мг, 4,3 мкмоль) получали соединение разветвленный линкер-полезная нагрузка **LP30** (5 мг, выход 37%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в воде). ESI *m/z*: 786.4 (*M*/4 + *H*)<sup>+</sup> (обе формы с раскрытием Е-цикла, *R*<sub>t</sub> = 5,65 мин, 34%); 781.8 (*M*/4 + *H*)<sup>+</sup> (моно форма с раскрытием Е-цикла, *R*<sub>t</sub> = 5,95 мин, 43%); 777.3 (*M*/4 + *H*)<sup>+</sup>, 1036.2 (*M*/3 + *H*)<sup>+</sup> (лактонная форма, *R*<sub>t</sub> = 6,32 мин, 19%).

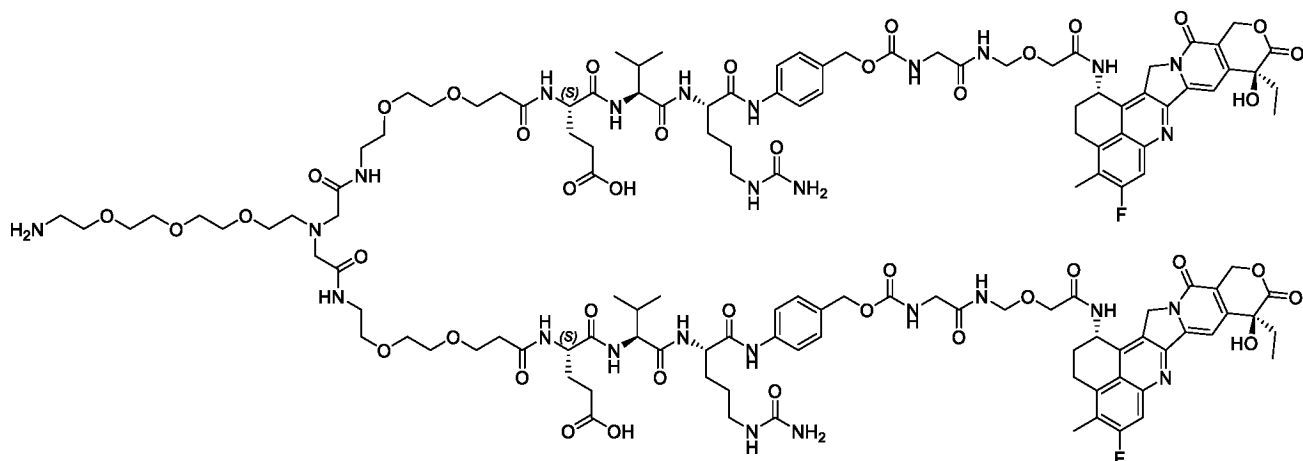
[0675] Пример 7М: (4*S*)-4-{{[(1*S*)-1-{{[(1*S*)-4-(Карбамоиламино)-1-{{[4-({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил)карбамоил]окси}метил)фенил]-карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-{3-[2-(2-{12-{{2-[2-(2-{{[(1*S*)-1-{{[(1*S*)-1-{{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил)карбамоил]окси}метил)фенил]-карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-3-карбоксыпропил]-карбамоил}этокси)этокси]этил}карбамоил)метил]-1-({(9*H*-флуорен-9-ил)метокси]-карбонил}амино)-3,6,9-триокса-12-азатетрадекан-14-амидо}этокси)этокси]-пропанамидо}бутановая кислота (**LP31f**)



(LP31f)

[0676] Следуя общей методике, из **LP15** (28 мг, 22 мкмоль) и промежуточного соединения **ПЗf** (7,0 мг, 8,8 мкмоль) получали соединение **LP31f** (20 мг, выход 75%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в водн. TFA (0,05%). ESI m/z: 761.0 (M/4 + H)<sup>+</sup> (лактонная форма).

[0677] Пример 7N: (4S)-4-{3-[2-(2-{1-Амино-12-[[{2-[2-(2-[[{(1S)-1-[[{(1S)-1-[[{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{4-([({({({({(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]карбамоил}-метил)карбамоил]окси} метил)фенил]карбамоил} бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-карбамоил}-3-карбокиспропил]карбамоил} этокси)этокси]этил} карбамоил)метил]-3,6,9-триокса-12-азатетрадекан-14-амидо} этокси)этокси]пропанамидо}-4-[[{(1S)-1-[[{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{4-([({({({({(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)-карбамоил]окси} метил)фенил]карбамоил} бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-карбамоил} бутановая кислота (**LP31**)

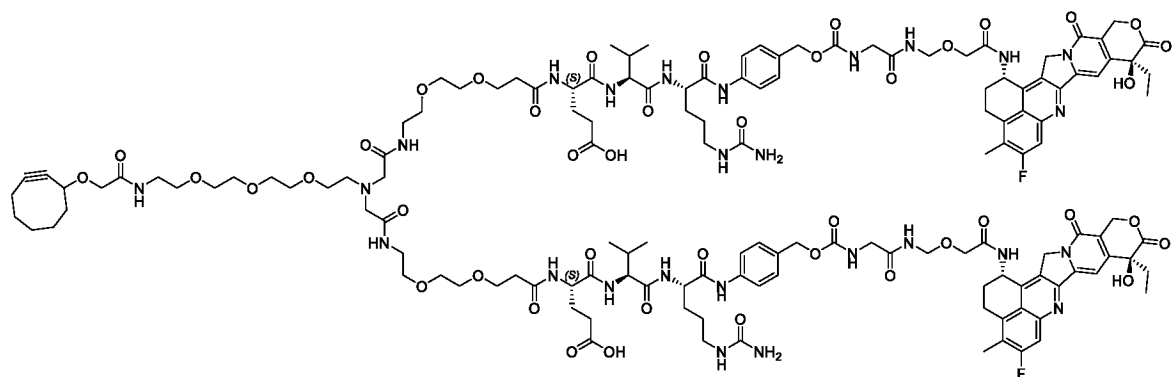


(LP31)



**[0678]** К раствору соединения **LP31f** (20 мг, 6,6 мкмоль) в DMF (2 мл) добавляли пиперидин (6,0 мг, 66 мкмоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Fmoc по данным LCMS. Смесь очищали непосредственно препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,05%)) с получением **LP31** (соль TFA, 13 мг, выход 70%) в виде белого твердого вещества. ESI: 940.5 (M/3 + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 10.05 (br s, 2H), 8.80 (t, J = 7.2 Гц, 2H), 8.51 (d, J = 8.8 Гц, 2H), 8.19 (d, J = 7.2 Гц, 2H), 8.09 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 7.80-7.75 (m, 7H), 7.58 (d, J = 8.4 Гц, 4H), 7.42 (t, J = 5.6 Гц, 2H), 7.31 (s, 2H), 7.27 (d, J = 8.8 Гц, 4H), 7.12-6.98 (s, 1H), 6.53 (br s, 2H), 6.04-6.58 (m, 2H), 5.62-5.57 (m, 2H), 5.46-5.40 (m, 6H), 5.21-5.16 (m, 4H), 4.92 (s, 4H), 4.62 (d, J = 6.4 Гц, 4H), 4.40-4.32 (m, 4H), 4.19 (d, J = 7.6 Гц, 2H), 4.01 (s, 4H), 3.63-3.55 (m, 18H), 3.50-3.46 (m, 10H), 3.27-3.26 (m, 2H), 3.02-2.92 (m, 8H), 2.45-2.31 (m, 16H), 2.26-2.15 (m, 10H), 2.00-1.95 (m, 2H), 1.91-1.80 (m, 8H), 1.73-1.66 (m, 4H), 1.61-1.56 (m, 2H), 1.46-1.31 (m, 6H), 0.89-0.80 (m, 22H) ppm. (Протоны COOH и TFA не были выявлены.) <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ -73.74, -111.29 ppm.

**[0679]** Пример 70: (4S)-4-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(Карбамоиламино)-1-{{[4-({{[{{[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>,<sup>14</sup>.0<sup>4</sup>,<sup>13</sup>.0<sup>6</sup>,<sup>11</sup>.0<sup>20</sup>,<sup>24</sup>]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)карбамоил]окси} метил)фенил]-карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-{3-[2-(2-{12-[(2-[2-(2-{{[(1S)-1-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-({{[{{[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>,<sup>14</sup>.0<sup>4</sup>,<sup>13</sup>.0<sup>6</sup>,<sup>11</sup>.0<sup>20</sup>,<sup>24</sup>]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)карбамоил]окси} метил)фенил]-карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-3-карбоксыпропил]-карбамоил}этокси)этокси]этил} карбамоил)метил]-1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)-ацетамидо]-3,6,9-триокса-12-азатетрадекан-14-амидо}этокси)этокси]пропанамидо}-бутановая кислота (**LP32**)

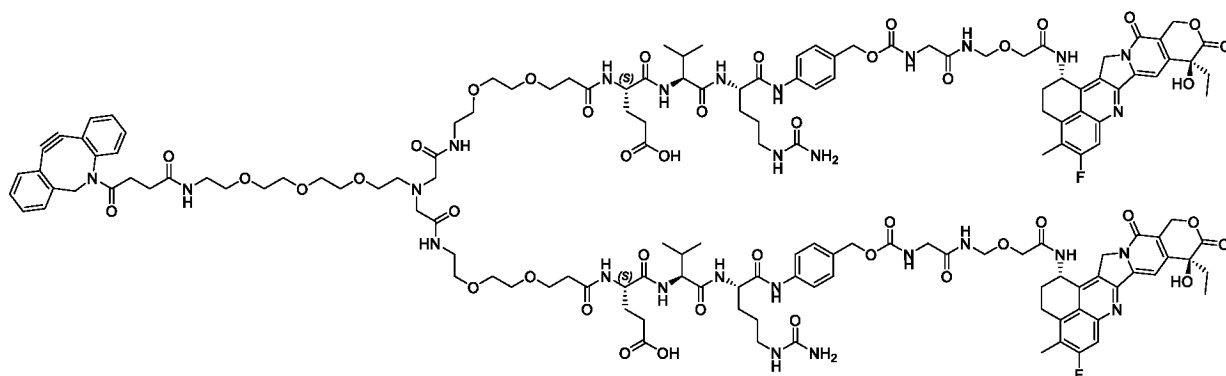


(LP32)

[0680] Следуя общей методике, начиная с **ПЗб** (5,0 мг, 6,9 мкмоль) и **LP15** (22 мг, 17 мкмоль) получали соединение линкер-полезная нагрузка **LP32** (12 мг, выход 62%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в *водн.* муравьиной кислоте (0,05%)). ESI  $m/z$ : 995.5 ( $M/3 + H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  10.04 (br s, 2H), 8.80 (t,  $J = 6.4$  Гц, 2H), 8.51 (d,  $J = 9.2$  Гц, 2H), 8.19 (d,  $J = 7.2$  Гц, 2H), 8.09 (d,  $J = 8.0$  Гц, 2H), 8.02 (t,  $J = 6.0$  Гц, 2H), 7.80-7.75 (m, 4H), 7.58 (d,  $J = 8.4$  Гц, 4H), 7.43 (d,  $J = 6.0$  Гц, 2H), 7.31 (s, 2H), 7.27 (d,  $J = 8.0$  Гц, 4H), 6.53 (s, 2H), 6.01 (br s, 2H), 5.62-5.57 (m, 2H), 5.46-5.40 (m, 8H), 5.19 (s, 4H), 4.92 (s, 4H), 4.62 (d,  $J = 6.4$  Гц, 4H), 4.40-4.32 (m, 4H), 4.29-4.25 (s, 1H), 4.19 (d,  $J = 7.2$  Гц, 2H), 4.01 (s, 4H), 3.89-3.84 (m, 1H), 3.78-3.73 (m, 1H), 3.63-3.57 (m, 8H), 3.51-3.45 (s, 22H), 3.27-3.22 (m, 10H), 3.16 (s, 4H), 3.05-3.00 (m, 3H), 2.96-2.92 (m, 2H), 2.68-2.64 (m, 2H), 2.38 (s, 8H), 2.24-2.15 (m, 10H), 1.97-1.90 (m, 4H), 1.86-1.81 (m, 6H), 1.72-1.67 (m, 4H), 1.61-1.55 (m, 4H), 1.45-1.35 (m, 6H), 1.25-1.21 (m, 2H), 0.89-0.81 (m, 22H) ppm. (протоны COOH не были выявлены) <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  -111.29 ppm

[0681] Пример 7Р: (4*S*)-4-[3-(2-{2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексен-10-ин-2-ил]-4-оксобутанамидо)-12-[(2-[2-(2-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{4-({[({[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2,14</sup>.0<sup>4,13</sup>.0<sup>6,11</sup>.0<sup>20,24</sup>]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]карбамоил}-метил)карбамоил]окси} метил)фенил]карбамоил} бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-карбамоил}-3-карбокиспропил]карбамоил} этокси)этокси]этил]карбамоил)метил]-3,6,9-триокса-12-азатетрадекан-14-амидо]этокси} этокси)пропанамидо]-4-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{4-({[({[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2,14</sup>.0<sup>4,13</sup>.0<sup>6,11</sup>.0<sup>20,24</sup>]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]-карбамоил}-

метил)карбамоил]окси} метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-карбамоил}бутановая кислота (**LP34**)

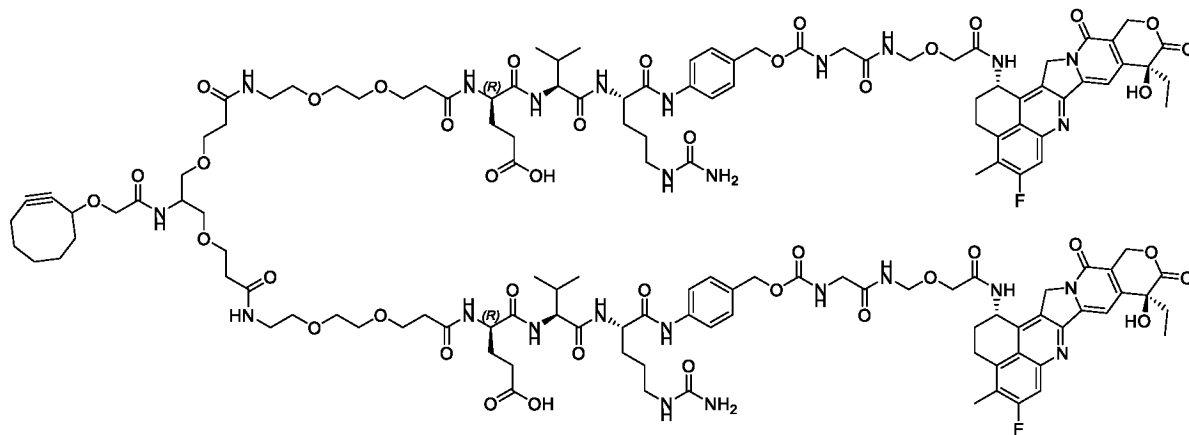


(**LP34**)

[**0682**] Следуя общей методике, начиная с **ПЗс** (2,8 мг, 3 мкмоль) и **LP15** (12 мг, 9 мкмоль) получали соединение линкер-полезная нагрузка **LP34** (4 мг, выход 43%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в *водн.* муравьиной кислоте (0,05%)) и извлекали **LP15** (3 мг). ESI m/z: 629.3 (M/5 + H)<sup>+</sup>, 786.5 (M/4 + H)<sup>+</sup> (обе формы с открытием E кольца, Rt = 5,70 мин, 4%); 1042.2 (M/3 + H)<sup>+</sup>, 781.8 (M/4 + H)<sup>+</sup> (моно форма с открытием E кольца, Rt = 5,98 мин, 28%); 1036.1 (M/3 + H)<sup>+</sup>, 777.4 (M/4 + H)<sup>+</sup> (Rt = 6,33 мин, 65%). <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.04 (s, 2H), 8.80 (t, J = 6.4 Гц, 2H), 8.50 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 8.18 (d, J = 9.6 Гц, 2H), 8.08 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 8.00 (d, J = 5.6 Гц, 2H), 7.80-7.74 (m, 4H), 7.67 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 7.62-7.57 (m, 4H), 7.50-7.41 (m, 6H), 7.37-7.26 (m, 10H), 6.53 (s, 2H), 5.98 (t, J = 5.6 Гц, 2H), 5.64-5.57 (m, 2H), 5.44-5.41 (m, 7H), 5.20 (s, 4H), 5.02 (d, J = 14.4 Гц, 1H), 4.92 (s, 4H), 4.63 (d, J = 6.0 Гц, 4H), 4.41-4.32 (m, 4H), 4.21-4.17 (m, 2H), 4.02 (s, 4H), 3.62-3.58 (m, 8H), 3.58-3.46 (m, 16H), 3.26-3.22 (m, 6H), 3.19-3.15 (m, 4H), 3.11-3.00 (m, 4H), 2.96-2.91 (m, 2H), 2.67-2.61 (m, 2H), 2.41-2.38 (m, 11H), 2.25-2.13 (m, 13H), 2.03-1.93 (m, 4H), 1.88-1.78 (m, 8H), 1.74-1.53 (m, 10H), 1.48-1.32 (m, 6H), 0.88-0.81 (m, 18H) ppm. (Протоны COOH не были выявлены.)

[**0683**] Пример 7Q: (4R)-4-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(Карбамоиламино)-1-{{[4-({{[[[[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)карбамоил]окси} метил)фенил]-карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-(3-{2-[2-(3-{3-[2-({2-[2-(2-{{[(1R)-1-{{[(1S)-1-{{[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-({{[[[[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-

карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)карбамоил]окси} метил)фенил]-  
карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-3-карбокситропил]-  
карбамоил}этокси)этокси]этил}карбамоил)этокси]-2-[2-(циклоокт-2-ин-1-  
илокси)ацетамидо]пропокси} пропанамидо)этокси]этокси} пропанамидо)бутановая  
кислота (**LP36**)

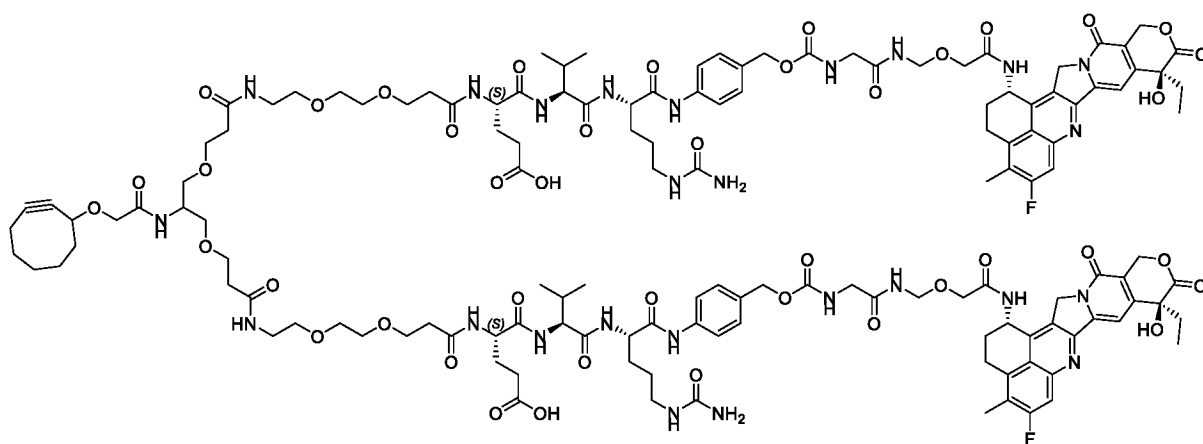


(**LP36**)

**[0684]** Следуя общей методике, начиная с **II4b** (3,0 мг, 4,1 мкмоль) и **LP14** (13 мг, 10 мкмоль), получали соединение линкер-полезная нагрузка **LP36** (соль TFA, 5 мг, выход 38%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в водн. TFA (0,05%)). ESI  $m/z$ : 970.8 ( $M/3 + H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.07 (br s, 2H), 9.80 (s, 2H), 8.81 (t,  $J = 6.4$  Гц, 2H), 8.51 (d,  $J = 8.8$  Гц, 2H), 8.16 (t,  $J = 6.8$  Гц, 4H), 8.08 (d,  $J = 7.6$  Гц, 2H), 7.93 (d,  $J = 5.2$  Гц, 2H), 7.78 (d,  $J = 10.8$  Гц, 2H), 7.63-7.59 (m, 4H), 7.44 (t,  $J = 5.6$  Гц, 2H), 7.36 (d,  $J = 8.4$  Гц, 1H), 7.30 (s, 2H), 7.27 (d,  $J = 8.4$  Гц, 4H), 6.54 (s, 2H), 6.00 (t,  $J = 5.6$  Гц, 2H), 5.63-5.57 (m, 2H), 5.46-5.40 (m, 8H), 5.19 (m, 4H), 4.92 (s, 4H), 4.63 (d,  $J = 6.4$  Гц, 4H), 4.41-4.32 (m, 4H), 4.29-4.25 (m, 1H), 4.23-4.19 (m, 2H), 4.01 (s, 4H), 3.90-3.85 (m, 1H), 3.79-3.74 (m, 1H), 3.63-3.60 (m, 4H), 3.59-3.55 (m, 6H), 3.52-3.49 (m, 2H), 3.46-3.42 (m, 8H), 3.21-3.16 (m, 6H), 3.05-2.89 (m, 6H), 2.40-2.36 (m, 8H), 2.33-2.28 (m, 6H), 2.26-2.13 (m, 12H), 2.09-2.01 (m, 4H), 1.92-1.80 (m, 8H), 1.79-1.70 (m, 6H), 1.64-1.55 (m, 4H), 1.46-1.34 (m, 6H), 0.89-0.81 (m, 23H) ppm. (протоны TFA не были выявлены) <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  -75, -111 ppm.

**[0685]** Пример 7R: (4*S*)-4-{{[(1*S*)-1-{{[(1*S*)-4-(Карбамоиламино)-1-{{[4-({[({[({[({[10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло-[14.7.1.0<sup>2,14</sup>.0<sup>4,13</sup>.0<sup>6,11</sup>.0<sup>20,24</sup>]]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)карбамоил]окси} метил)фенил]-карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-(3-{2-[2-(3-{3-[2-({2-[2-(2-

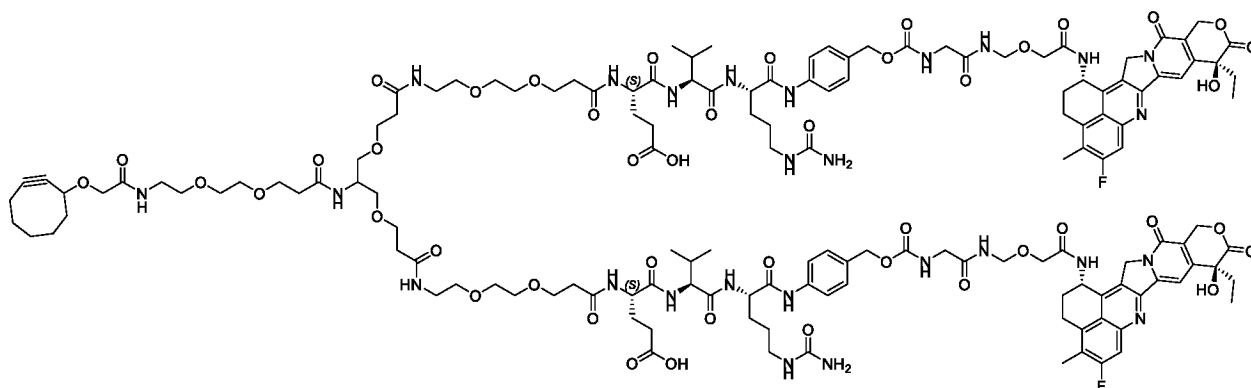
{[(1*S*)-1-{{[(1*S*))-1-{{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-({{({{({{[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]}тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)карбамоил]окси} метил)фенил]-карбамоил} бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-3-карбокиспропил]-карбамоил} этокси)этокси]этил} карбамоил)этокси]-2-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)-ацетамидо]пропокси} пропанамидо)этокси]этокси} пропанамидо)бутановая кислота (LP37)



(LP37)

[0686] Следуя общей методике, начиная с **II4b** (3,0 мг, 4,1 мкмоль) и **LP15** (13 мг, 10 мкмоль), получали соединение линкер-полезная нагрузка **LP37** (соль TFA, 4 мг, выход 31%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в водн. TFA (0,05%)). ESI m/z: 970,6 (M/3+H)<sup>+</sup>.

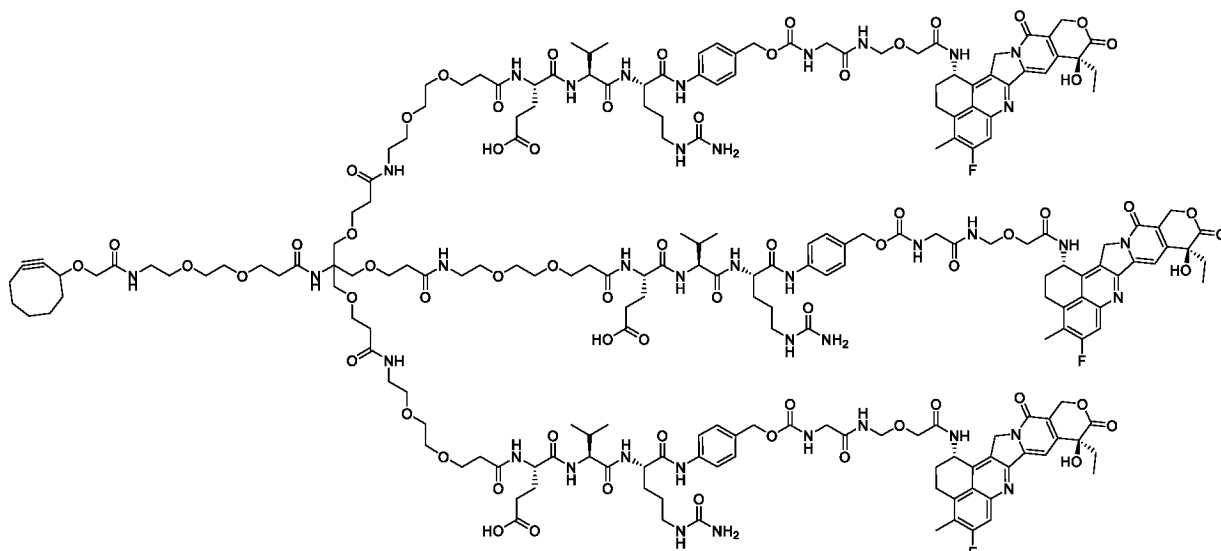
[0687] Пример 7S: (4*S*)-4-{{[(1*S*)-1-{{[(1*S*)-4-(Карбамоиламино)-1-{{[4-({{({{({{[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]}тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)карбамоил]окси} метил)фенил]-карбамоил} бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-(3-{2-[2-(3-{3-[2-({2-[2-({[(1*S*)-1-{{[(1*S*))-1-{{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-({{({{({{[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]}тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)карбамоил]окси} метил)фенил]-карбамоил} бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-3-карбокиспропил]-карбамоил} этокси)этокси]этил} карбамоил)этокси]-2-[3-(2-{2-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]этокси} этокси)пропанамидо]пропокси} пропанамидо)этокси]-этокси} пропанамидо) бутановая кислота (LP38)

**(LP38)**

**[0688]** Следуя общей методике, начиная с **П4Ab** (6,0 мг, 6,9 мкмоль) и **LP15** (22 мг, 17 мкмоль), получали соединение линкер-полезная нагрузка **LP38** (6,5 мг, выход 31%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в *водн.* муравьиной кислоте (0,05%)). ESI  $m/z$ : 1024.3 ( $M/3 + H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.04 (s, 2H), 8.80 (t,  $J = 6.4$  Гц, 2H), 8.51 (d,  $J = 8.4$  Гц, 2H), 8.19 (d,  $J = 6.0$  Гц, 2H), 8.09 (d,  $J = 7.6$  Гц, 2H), 7.93 (t,  $J = 4.8$  Гц, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.78-7.73 (m, 4H), 7.64-7.61 (m, 1H), 7.58 (d,  $J = 8.4$  Гц, 4H), 7.43 (d,  $J = 5.6$  Гц, 2H), 7.31 (s, 2H), 7.27 (d,  $J = 8.4$  Гц, 4H), 6.53 (s, 2H), 6.01 (br s, 2H), 5.62-5.57 (m, 2H), 5.46-5.40 (m, 8H), 5.19 (s, 4H), 4.92 (s, 4H), 4.62 (d,  $J = 6.4$  Гц, 4H), 4.40-4.32 (m, 4H), 4.29-4.25 (m, 1H), 4.19 (d,  $J = 7.6$  Гц, 2H), 4.01 (s, 4H), 3.89-3.84 (m, 1H), 3.78-3.73 (m, 1H), 3.63-3.55 (m, 17H), 3.47 (s, 12H), 3.27-3.23 (m, 4H), 3.21-3.17 (m, 6H), 3.04-3.00 (m, 2H), 2.96-2.92 (m, 2H), 2.38 (s, 8H), 2.36-2.29 (m, 10H), 2.25-2.14 (m, 12H), 1.99-1.94 (m, 2H), 1.90-1.81 (m, 8H), 1.76-1.67 (m, 6H), 1.61-1.55 (m, 4H), 1.46-1.35 (m, 6H), 0.89-0.81 (m, 22H) ppm. (протоны COOH не были выявлены) <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  -111 ppm.

**[0689]** Пример 7Т: (4*S*)-4-{{{[(1*S*)-1-{{{[(1*S*)-4-(Карбамоиламино)-1-{{[4-({[[{[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил]карбамоил]окси}метил)фенил]-карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-(3-{2-[2-(3-{3-[2-({2-[2-(2-{{[(1*S*)-1-{{{[(1*S*)-1-{{{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-({[[{[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло-[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил]карбамоил]окси}метил)фенил]-карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-3-карбокиспропил]-карбамоил}этокси)этокси]этил}карбамоил)этокси]-2-{{2-({2-[2-(2-{{[(1*S*)-1-{{{[(1*S*)-1-{{{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-({[[{[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-

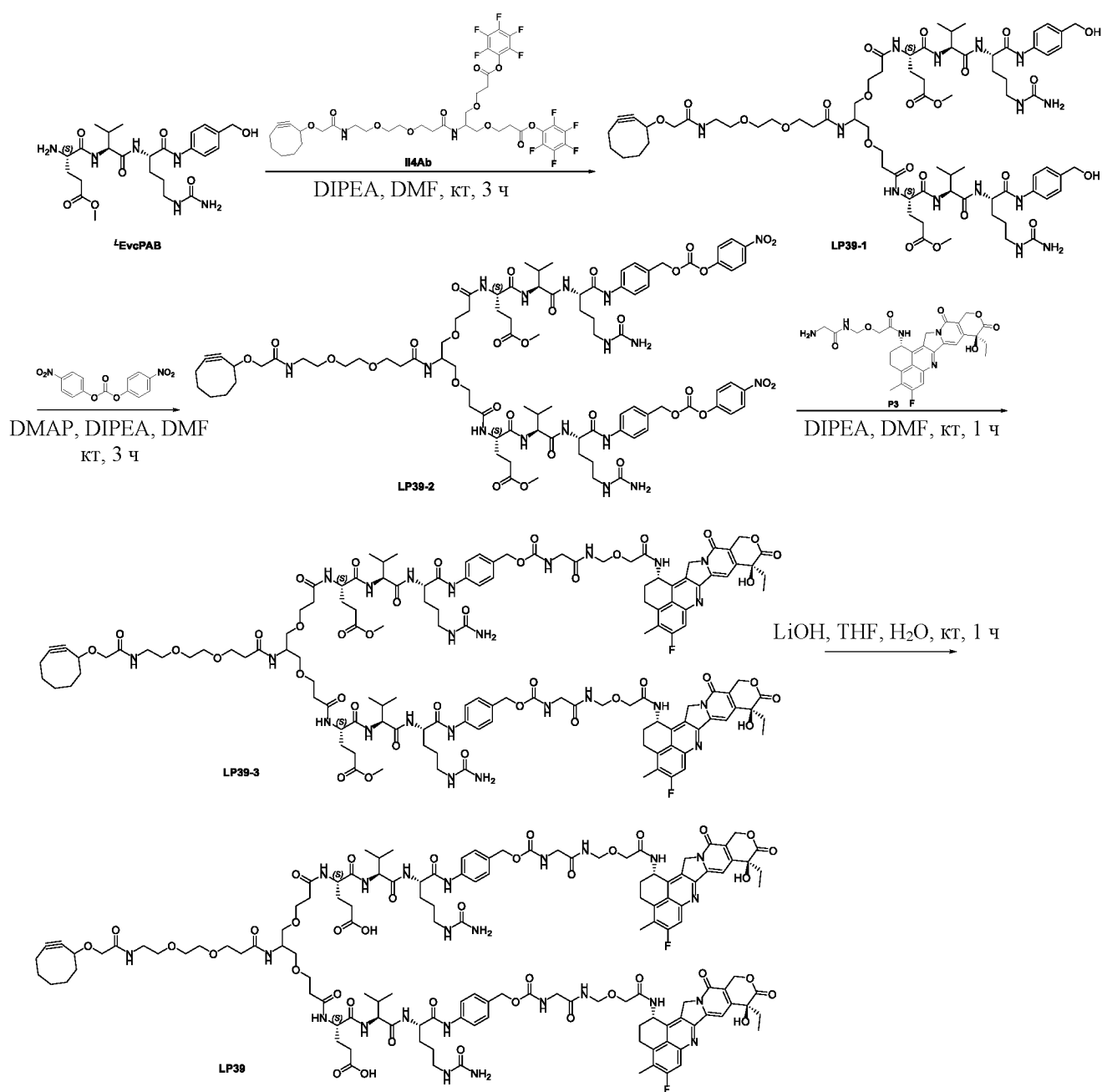
метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил}карбамоил}метокси)метил}карбамоил}-метил)карбамоил]окси}метил)фенил}карбамоил}бутил}карбамоил}-2-метилпропил]-карбамоил}-3-карбокиспропил}карбамоил}этокси)этокси]этил}карбамоил)этокси]-метил}-2-[3-(2-{2-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]этокси}этокси)-пропанамидо]пропокси}пропанамидо)этокси]этокси}пропанамидо)бутановая кислота (LP41)



(LP41)

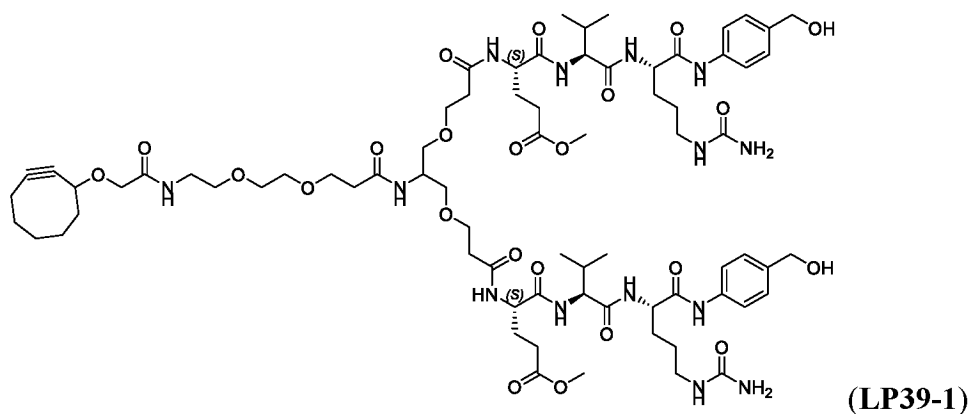
[0690] Следуя общей методике, начиная с П5Ab (5,0 мг, 4,8 мкмоль) и LP15 (24 мг, 19 мкмоль, 4 экв.), получали соединение линкер-полезная нагрузка LP41 (7,1 мг, выход 33%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в водн. муравьиной кислоте (0,1%)). ESI m/z: 1107.6 (M/4 + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 10.04 (br s, 3H), 8.80 (t, J = 6.8 Гц, 3H), 8.50 (d, J = 8.8 Гц, 3H), 8.20 (d, J = 6.4 Гц, 3H), 8.09 (d, J = 7.6 Гц, 3H), 7.94-7.90 (m, 3H), 7.77 (d, J = 10.8 Гц, 6H), 7.58 (d, J = 8.4 Гц, 6H), 7.42 (d, J = 6.4 Гц, 3H), 7.30 (s, 3H), 7.27 (d, J = 8.4 Гц, 6H), 6.52 (s, 3H), 6.01 (br s, 3H), 5.62-5.57 (m, 3H), 5.46-5.40 (m, 13H), 5.20-5.16 (m, 6H), 4.92 (s, 6H), 4.62 (d, J = 6.0 Гц, 6H), 4.40-4.32 (m, 6H), 4.19 (t, J = 7.6 Гц, 3H), 4.01 (s, 6H), 3.89-3.84 (m, 1H), 3.78-3.73 (m, 1H), 3.64-3.51 (m, 30H), 3.47 (s, 15H), 3.40-3.36 (m, 9H), 3.26-3.24 (m, 3H), 3.21-3.17 (m, 9H), 3.03-3.00 (m, 3H), 2.96-2.91 (m, 3H), 2.43-2.41 (m, 3H), 2.38 (s, 9H), 2.36-2.28 (m, 15H), 2.25-2.20 (m, 9H), 2.18-2.14 (m, 6H), 1.98-1.94 (m, 3H), 1.87-1.81 (m, 9H), 1.74-1.70 (m, 3H), 1.60-1.56 (m, 3H), 1.43-1.35 (m, 6H), 0.88-0.79 (m, 33H) ppm. (протоны COOH не были выявлены) <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ -111 ppm.

#### Схема 11. Синтез LP39



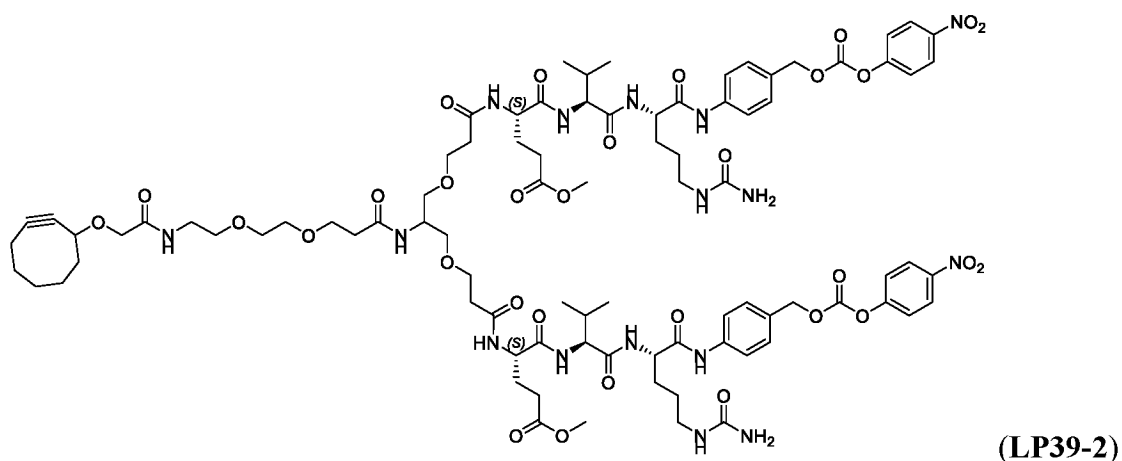
**[0691]** Пример 7U: Метил (4*S*)-4-{{[(1*S*)-1-{{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-{{3-[3-(2-{{[(1*S*)-1-{{[(1*S*)-1-{{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-(гидроксиметил)фенил]-карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-метокси-4-оксобутил]-карбамоил}этокс)-2-[3-(2-{{2-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]этокс)-этокс)пропанамидо]пропокси]пропанамидо}бутаноат (**LP39-1**)





[0692] К раствору соединения **П4Аб** (0,13 г, 0,15 ммоль) в DMF (3 мл) добавляли DIPEA (58 мг, 0,45 ммоль) и **<sup>L</sup>EvcPAВ** (78 мг, 0,15 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-65% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%)) с получением соединения **LP39-1** в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 784,5 (M/2+H)<sup>+</sup>.

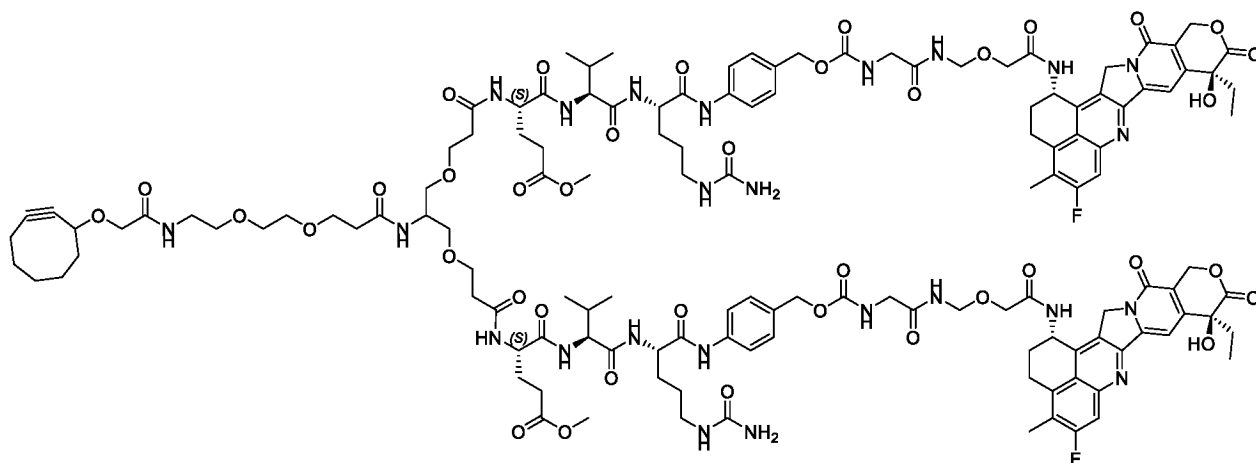
[0693] Пример 7V: Метил (4*S*)-4-{{[(1*S*)-1-{{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{{4-({[(4-нитрофенокси)карбонил]окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-{{3-[[3-(2-{{[(1*S*)-1-{{[(1*S*)-1-{{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{{4-({[(4-нитрофенокси)карбонил]окси}метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-метокси-4-оксобутил]карбамоил}этоксид)-2-[[3-(2-{{2-[[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]этоксид)этоксид]пропанамидо]пропокси]-пропанамидо}бутаноат (**LP39-2**)



[0694] К раствору соединения **LP39-1** (0,15 г, 92 мкмоль) в DMF (5 мл) добавляли DMAP (11 мг, 92 мкмоль), DIPEA (36 мг, 0,28 ммоль) и бис(4-нитрофенил)карбонат (85 мг, 0,28 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь

непосредственно разделяли флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-65% ацетонитрила в воде) с получением соединения **LP39-2** (0,10 г, выход 57%) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 950,0 ( $M/2+H$ )<sup>+</sup>.

**[0695]** Пример 7W: Метил (4*S*)-4-{{{(1*S*)-1-{{{(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-((( {{{(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил]карбамоил]окси} метил)-фенил]карбамоил} бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-{{3-{{3-{{2-{{{(1*S*)-1-{{{(1*S*)-1-{{{(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{{[4-((( {{{(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]-карбамоил} метил]карбамоил]окси} метил)фенил]карбамоил} бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-метокси-4-оксобутил]карбамоил} этокси)-2-{{3-{{2-{{2-((циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]этокси} этокси)пропанамидо]-пропокси]-пропанамидо} бутаноат (**LP39-3**)

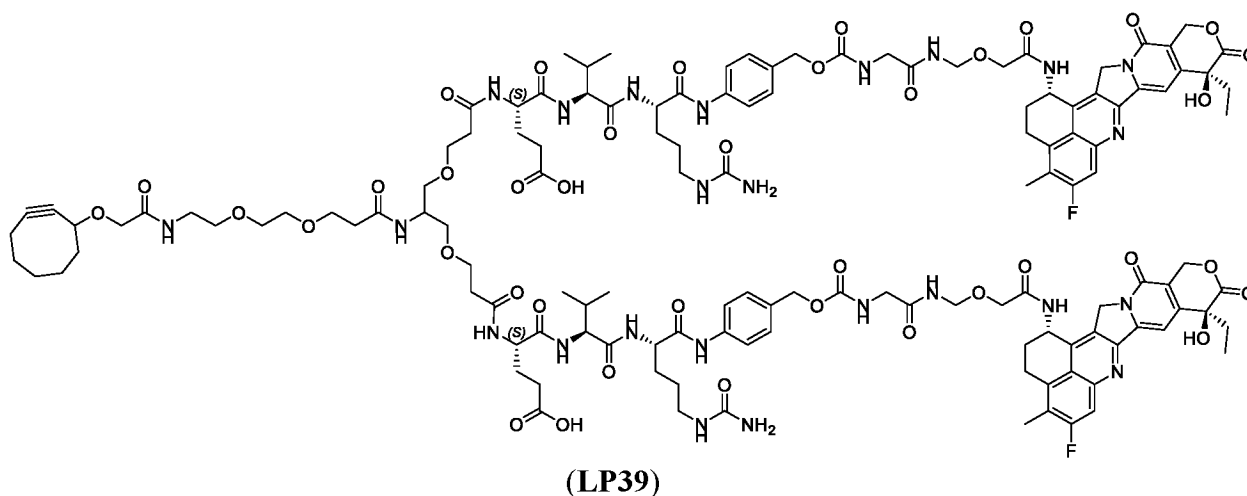


(**LP39-3**)

**[0696]** К раствору соединения **LP39-2** (65 мг, 34 мкмоль) в DMF (3 мл) добавляли DIPEA (22 мг, 0,17 ммоль) и полезную нагрузку **P3** (50 мг, 86 мкмоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-65% ацетонитрила в водн. TFA (0,01%)) с получением соединения **LP39-3** (44 мг, выход 85%) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 927,2 ( $M/3+H$ )<sup>+</sup>.

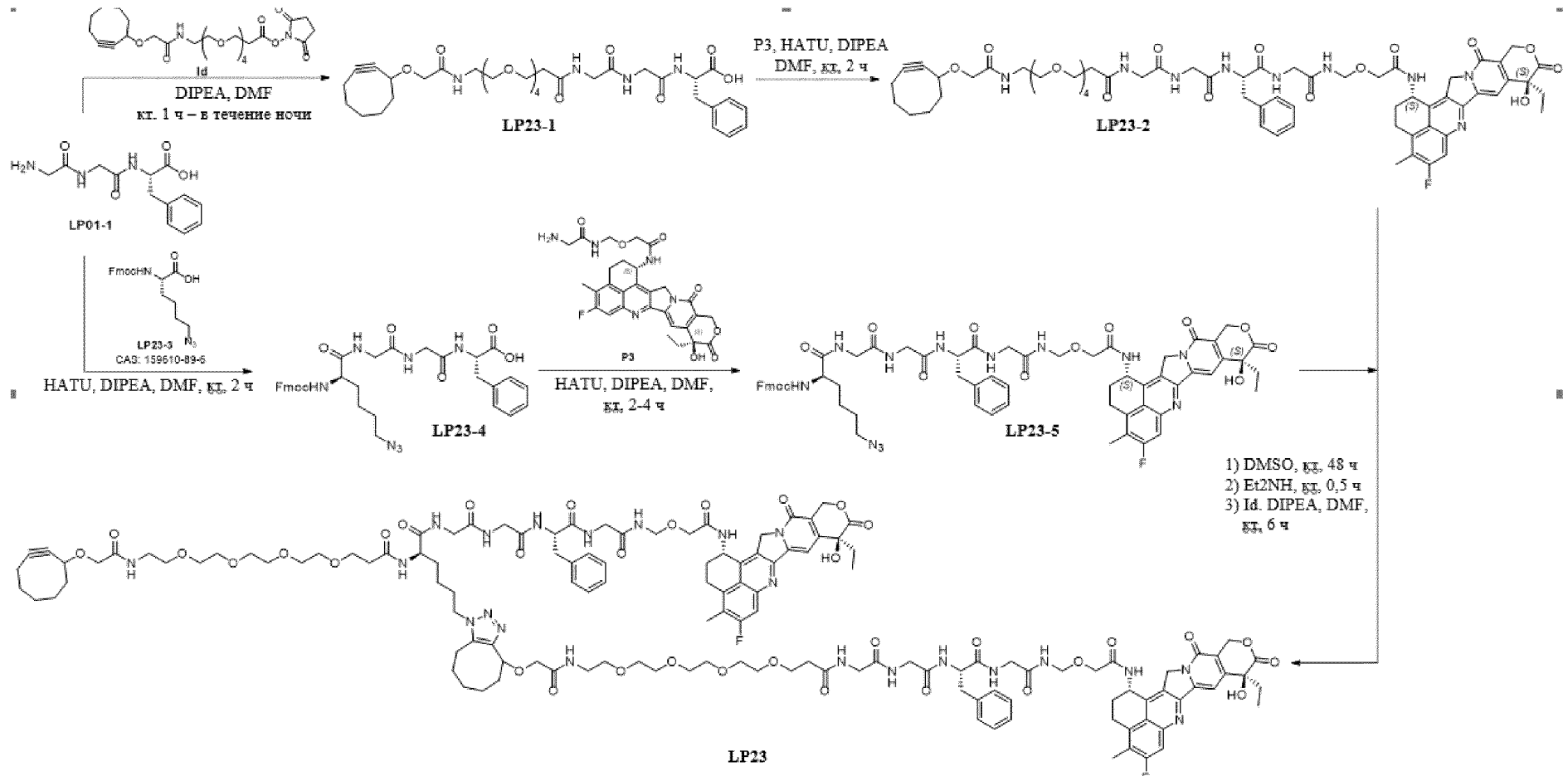
**[0697]** Пример 7X: (4*S*)-4-{{{(1*S*)-1-{{{(1*S*)-4-(Карбамоиламино)-1-{{[4-((( {{{(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-

карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)карбамоил]окси} метил)фенил]-  
 карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-4-{3-[3-(2-{{(1S)-1-{{(1S)-1-  
 {{(1S)-4-(карбамоиламино)-1-{{4-({{({{({{({(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-  
 метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20,24</sup>]тетракоза-  
 1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]карбамоил}-  
 метил)карбамоил]окси} метил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-  
 карбамоил}-3-карбокиспропил]карбамоил}этокси)-2-[3-(2-{2-[2-(циклоокт-2-ин-1-  
 илокси)ацетамидо]этокси}этокси)пропанамидо]пропокси]пропанамидо}бутановая  
 кислота (**LP39**)

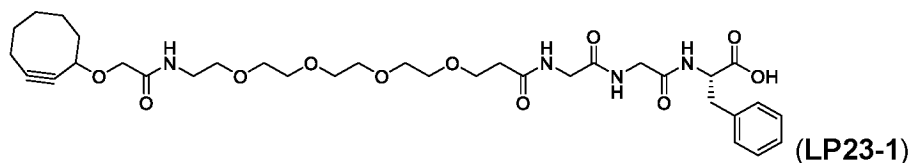


**[0698]** К раствору **LP39-3** (50 мг, 18 мкмоль) в THF (2 мл) добавляли *водн.* гидроксид лития (0,08 М, 2 мл), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа, что контролировали с помощью LCMS. Смесь очищали препаративной HPLC (10-95% ацетонитрила в *водн.* муравьиной кислоте (0,1%)) с получением **LP39** (13 мг, выход 26%) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 917.7 ( $M/3 + H$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  10.03 (s, 2H), 8.79 (t,  $J = 9.2$  Гц, 2H), 8.50 (d,  $J = 9.2$  Гц, 2H), 8.17 (d,  $J = 6.8$  Гц, 2H), 8.07 (d,  $J = 5.2$  Гц, 2H), 7.80-7.75 (m, 4H), 7.74-7.70 (m, 1H), 7.58 (t,  $J = 8.4$  Гц, 4H), 7.45-7.40 (m, 2H), 7.30 (s, 2H), 7.27 (d,  $J = 7.6$  Гц, 4H), 6.52 (s, 2H), 6.01-6.95 (m, 2H), 5.64-5.56 (m, 2H), 5.46-5.39 (m, 8H), 5.21-5.16 (m, 4H), 4.92 (s, 4H), 4.62 (d,  $J = 5.6$  Гц, 4H), 4.40-4.32 (m, 4H), 4.30-4.25 (m, 1H), 4.22-4.16 (m, 2H), 4.01 (s, 4H), 3.90-3.84 (m, 1H), 3.78-3.72 (m, 1H), 3.64-3.55 (m, 10H), 3.47 (s, 4H), 3.43-3.39 (m, 3H), 3.26-3.23 (m, 3H), 3.17-3.12 (m, 2H), 3.05-3.00 (m, 2H), 2.96-2.91 (m, 2H), 2.38 (s, 9H), 2.35-2.30 (m, 5H), 2.26-2.15 (m, 12H), 2.00-1.95 (m, 2H), 1.89-1.80 (m, 7H), 1.73-1.66 (m, 5H), 1.62-1.52 (m, 5H), 1.47-1.31 (m, 6H), 0.90-0.79 (m, 21H) ppm. <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  -73.16, -111.30 ppm.

Схема 12. Синтез соединения асимметричный разветвленный пептидный линкер-полезная нагрузка **LP23**

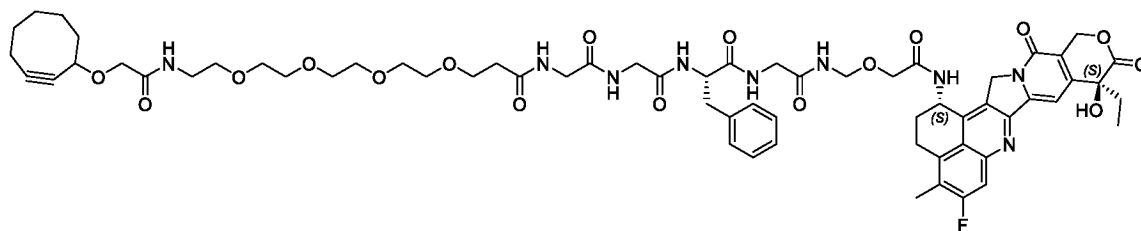


[0699] Пример 7Y: (2S)-2-[2-(2-{1-[2-(Циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}ацетиамидо)ацетиамидо]-3-фенилпропановая кислота (LP23-1)



[0700] Следуя методике, аналогичной методике получения LP9-2, за исключением замены **Ib** на **Id**, линкер LP23-1 (88 мг, выход 53%) получали в виде бесцветного масла после очистки флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-50% ацетонитрила в водн. TFA (0,01%)). ESI m/z: 691,4 (M+H)<sup>+</sup>.

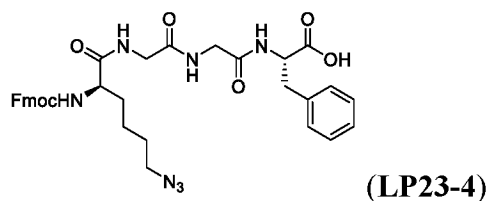
[0701] Пример 7Z: 1-[2-(Циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]-N-{{{[(1S)-1-[[[[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил]карбамоил]-2-фенилэтил]-карбамоил}метил]карбамоил]метил}-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (LP23-2)



(LP23-2)

[0702] Следуя методике, аналогичной методике получения LP9, за исключением замены LP9-2 на LP23-1, получали соединение линкер-полезная нагрузка LP23-2 (47 мг, выход 46%) в виде твердого вещества светло-желтого цвета. ESI m/z: 494,4 (M<sub>Dxd</sub> + 1)<sup>+</sup>.

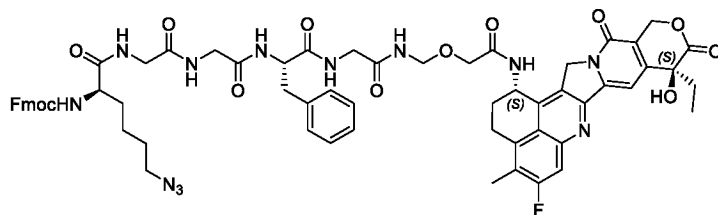
[0703] Пример 7AA: (2S)-2-(2-{2-[(2R)-6-Азидо-2-({[(9H-флуорен-9-ил)метокси]карбонил}амино)гексанамидо]ацетиамидо}ацетиамидо)-3-фенилпропановая кислота (LP23-4)



[0704] К раствору соединения LP23-3 (CAS: 159610-89-6, 0,39 г, 1,0 ммоль) в сухом DMF (5 мл) добавляли NATU (0,38 г, 1,0 ммоль) и раствор перемешивали при

комнатной температуре в течение 5 минут перед добавлением **LP01-1** (0,30 г, 1,0 ммоль) и DIPEA (0,26 г, 2,0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, что контролировали с помощью LCMS. Затем полученный раствор очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-90% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%)) с получением соединения **LP23-4** (0,50 г, выход 76%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 656.3 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.77 (s, 1H), 8.18-8.12 (m, 2H), 8.00 (d, *J* = 5.2 Гц, 1H), 7.90 (d, *J* = 7.6 Гц, 2H), 7.73 (t, *J* = 6.8 Гц, 2H), 7.56 (d, *J* = 8.4 Гц, 1H), 7.44-7.40 (m, 2H), 7.35-7.31 (m, 2H), 7.29-7.19 (m, 5H), 4.47-4.40 (m, 1H), 4.34-4.20 (m, 3H), 4.04-3.98 (m, 1H), 3.77-3.64 (m, 4H), 3.31(t, *J* = 6.8 Гц, 2H), 3.07-3.02 (m, 1H), 2.91-2.85 (m, 1H), 1.75-1.65 (m, 1H), 1.60-1.50 (m, 3H), 21.42-1.28 (m, 2H) ppm.

**[0705]** Пример 7AB: (9*H*-Флуорен-9-ил)метил *N*-[(1*R*)-5-азидо-1-({[({[(1*S*)-1-({[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил]карбамоил]-2-фенилэтил]-карбамоил} метил]карбамоил]метил} карбамоил)пентил]карбамат (**LP23-5**)

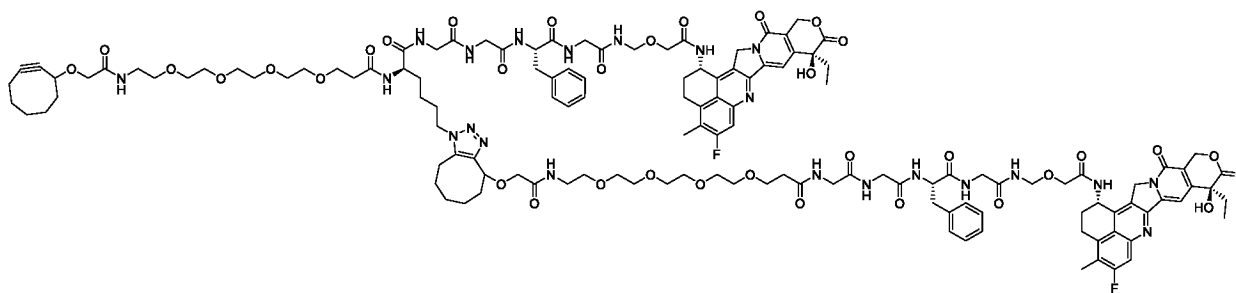


(**LP23-5**)

**[0706]** Следуя методике, аналогичной методике получения **LP9**, за исключением замены **LP9-2** на **LP23-4**, получали соединение **LP23-5** (60 мг, выход 64%) в виде твердого вещества светло-желтого цвета. ESI m/z: масса не обнаружена.

**[0707]** Пример 7AC: 1-[2-(Циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]-*N*-[(1*R*)-1-({[({[(1*S*)-1-({[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил]карбамоил]-2-фенилэтил]-карбамоил} метил]карбамоил]метил} карбамоил)-5-[4-({[14-({[({[(1*S*)-1-({[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]-карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил]карбамоил]-2-фенилэтил]карбамоил}-метил]карбамоил]метил} карбамоил)-3,6,9,12-тетраоксаттрадекан-1-ил]карбамоил}-

метокси)-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[*d*][1,2,3]триазол-1-ил]пентил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (**LP23**)



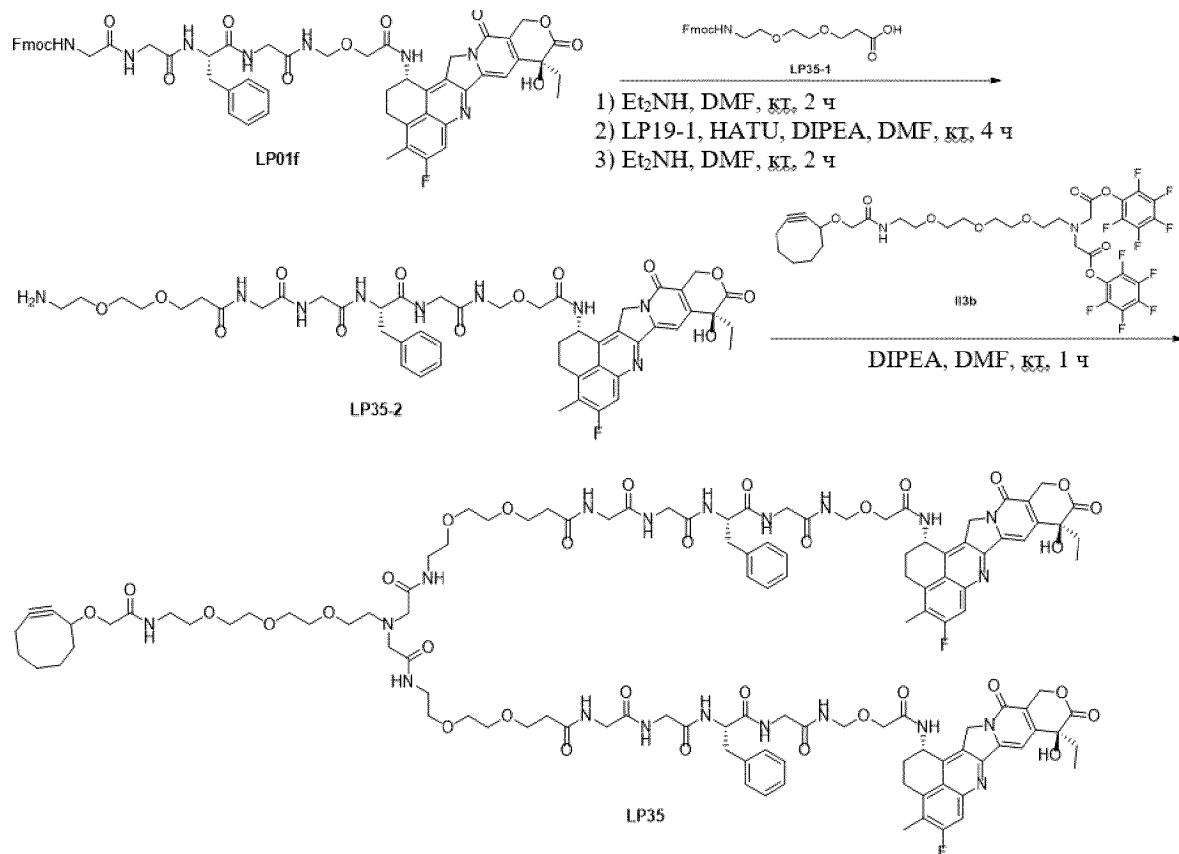
(**LP23**)

[0708] Желтый раствор **LP23-5** (45 мг, 38 мкмоль) и **LP23-2** (47 мг, 38 мкмоль) в DMSO (3 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 48 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь очищали непосредственно флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-50% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%)) с получением твердого вещества светло-желтого цвета (60 мг, ESI *m/z*: 494, *Rt* = 1,88 мин), которое растворяли в DMF (1,8 мл). К раствору добавляли диэтиламин (0,2 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение получаса до полного удаления Fmoc по данным LCMS. Смесь разделяли флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-50% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%)) с получением твердого вещества светло-желтого цвета (30 мг, ESI *m/z*: 494, *Rt* = 1,63 мин), 20 мг которого растворяли в сухом DMF (4 мл). К нему добавляли DIPEA (2,3 мг, 18 мкмоль) и раствор **Id** (4,7 мг, 8,9 мкмоль) в сухом DMF (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 6 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь очищали непосредственно флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01 %)) с получением неочищенного **LP23** (чистота 62%) в виде белого твердого вещества, которое далее очищали препаративной HPLC (0-100% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%)) с получением чистого **LP23** (2,5 мг, выход 3,5%) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 887.6 (*M*/3 + *H*)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*д6*)  $\delta$  8.63 (t, *J* = 6.8 Гц, 2H), 8.50 (d, *J* = 9.2 Гц, 2H), 8.33-8.27 (m, 2H), 8.18-8.09 (m, 4H), 8.05-7.95 (m, 3H), 7.81-7.75 (m, 3H), 7.59 (t, *J* = 6.0 Гц, 1H), 7.31 (s, 2H), 7.26-7.14 (m, 10H), 7.09 (s, 0.5H), 6.97 (s, 0.5H), 6.52 (brs, 2H), 5.62-5.57 (m, 2H), 5.41 (s, 4H), 5.19 (s, 4H), 4.75-4.72 (m, 1H), 4.64 (d, *J* = 6.4 Гц, 4H), 4.52-4.43 (m, 2H), 4.30-4.18 (m, 4H), 4.02 (s, 4H), 3.88-3.84 (m, 1H), 3.79-3.76 (m, 3H), 3.73-3.68 (m, 9H), 3.62-3.56 (m, 4H), 3.51-3.49 (m, 12H), 3.48-3.46 (m, 14H), 3.27-3.23 (m, 4H), 3.19-3.09 (m, 3H), 3.04-2.99 (m, 2H), 2.96-2.90 (m, 1H), 2.81-2.72 (m, 4H), 2.63-2.60 (m, 2H), 2.39-2.37 (m, 8H),

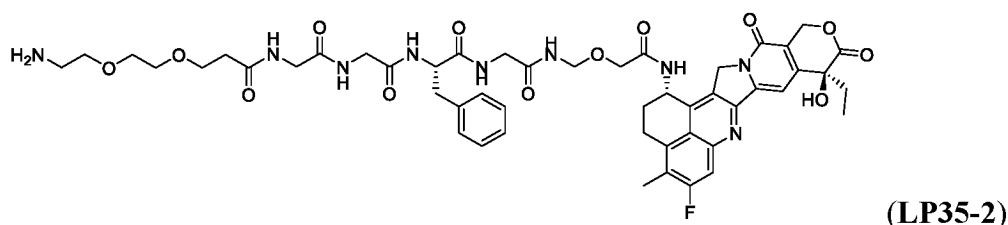
2.22-2.13 (m, 5H), 2.08-1.97 (m, 3H), 1.93-1.80 (m, 9H), 1.78-1.69 (m, 6H), 1.61-1.47 (m, 6H), 1.31-1.24 (m, 6H), 1.10-1.02 (m, 1H), 0.87 (t,  $J = 7.6$  Гц, 6H) ppm.  $^{19}\text{F}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ ) -73 (TFA), -111 (Ar-F) ppm.

Схема 13. Синтез соединения разветвленный пептидный линкер-полезная нагрузка

### LP35



[0709] Пример 7AD: (2*S*)-2-[2-(2-{3-[2-(2-Аминоэтокси)этокси]пропанамидо}-ацетамидо)ацетамидо]-*N*-({[({[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)-3-фенилпропанамид (LP35-2)

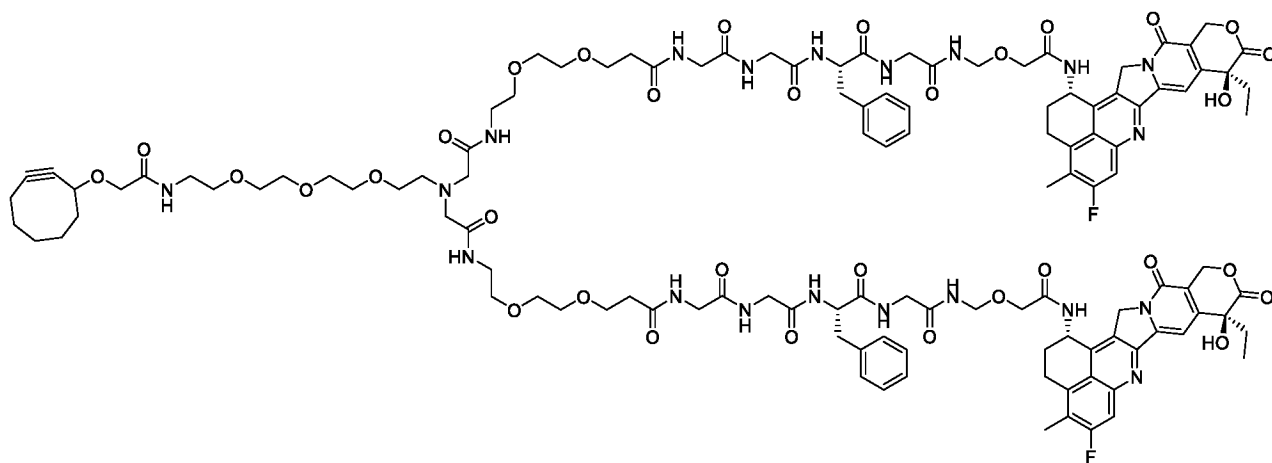


[0710] К раствору LP01f (74 мг, 70 мкмоль) в DMF (5 мл) добавляли диэтиламин (26 мг, 0,35 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Fmoc по данным LCMS. Полученную смесь разделяли флэш-



хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%)) с получением белого твердого вещества (58 мг, ESI  $m/z$ : 841,4 ( $M+H$ )<sup>+</sup>), которое растворяли в DMF (5 мл). К раствору последовательно добавляли соединение **LP35-1** (28 мг, 69 мкмоль), DIPEA (18 мг, 0,14 ммоль) и HATU (40 мг, 0,10 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь разделяли препаративной HPLC (0-100% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,05%)) с получением белого твердого вещества (54 мг, ESI  $m/z$ : 729,3 ( $M - M_{Dxd} + H$ )<sup>+</sup>), которое растворяли в DMF (5 мл). К раствору добавляли диэтиламин (16 мг, 0,22 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Fmoc по данным LCMS. Полученную смесь непосредственно очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%)) с получением **LP35-2** (40 мг, выход 57% из **LP01f**) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 1000,5 ( $M+H$ )<sup>+</sup>, 500,8 ( $M/2+H$ )<sup>+</sup>.

**[0711]** Пример 7AE: 1-[2-(Циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]-*N*-(2-{2-[2-({[({[(1*S*)-1-({[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)карбамоил]-2-фенилэтил]-карбамоил} метил)карбамоил]метил} карбамоил)этоксид)этоксид)этил)-12-{{[2-{{2-2-({[({[(1*S*)-1-({[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0<sup>2</sup>,14.0<sup>4</sup>,13.0<sup>6</sup>,11.0<sup>20</sup>,24]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)карбамоил]-2-фенилэтил]-карбамоил} метил)карбамоил]метил} карбамоил)этоксид)этоксид)этил)карбамоил]-метил}-3,6,9-триокса-12-азатетрадекан-14-амид (**LP35**)



(**LP35**)

[0712] Следуя методике, аналогичной методике получения **LP24**, за исключением того, что начинали с **LP35-2** (40 мг, 40 мкмоль) и промежуточного соединения **ПЗb** (16 мг, 20 мкмоль), получали соединение разветвленный линкер-полезная нагрузка **LP35** (12 мг, выход 24%) в виде белого твердого вещества после очистки препаративной HPLC (5-95% ацетонитрила в водн. TFA (0,05%)). ESI m/z: 812.7 (M/3 + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>д6</sub>) δ 8.64 (t, J = 6.6 Гц, 2H), 8.52 (d, J = 8.7 Гц, 2H), 8.31 (t, J = 5.9 Гц, 2H), 8.19-8.09 (m, 4H), 8.05-7.98 (m, 3H), 7.77 (d, J = 10.9 Гц, 2H), 7.65-7.56 (m, 2H), 7.31 (s, 2H), 7.29-7.12 (m, 8H), 6.53 (s, 2H), 5.65-5.56 (m, 3H), 5.42 (s, 3H), 5.20-5.15 (m, 3H), 4.70-4.60 (m, 3H), 4.50-4.44 (m, 2H), 4.30-4.22 (m, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.86 (d, J = 14.8 Гц, 2H), 3.78-3.66 (m, 9H), 3.63-3.55 (m, 6H), 3.53-3.40 (m, 27H), 3.27-3.19 (m, 6H), 3.15 (s, 4H), 3.09-3.00 (m, 2H), 2.81-2.72 (m, 2H), 2.70-2.63 (m, 2H), 2.42-2.32 (m, 8H), 2.25-2.11 (m, 6H), 2.09-1.97 (m, 3H), 1.94-1.68 (m, 9H), 1.63-1.51 (m, 3H), 1.43-1.34 (m, 2H), 1.29-1.20 (m, 3H), 0.87 (t, J = 7.3 Гц, 6H) ppm. <sup>19</sup>F ЯМР (376 МГц, DMSO<sub>д6</sub>) δ -111.24 ppm. (нет сигнала TFA)

[0713] ПРИМЕР 8: Погашенные соединения линкер-полезные нагрузки qLP18, qLP29, qLP33, qLP40, qLP42

[0714] Общий синтез погашенного соединения линкер-полезная нагрузка

[0715] К раствору соединения линкер-полезная нагрузка (1 экв.) в DMF (1-5 мМ) добавляли amino-азид **AL1** (1-1,5 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1-3 часов до полного гашения соединения линкер-полезная нагрузка, что контролировали с помощью LCMS. Затем смесь очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой с получением погашенного соединения линкер-полезная нагрузка в виде белого твердого вещества.

**Таблица 13: Химические свойства погашенных соединений линкер-полезные нагрузки**

LP#	qLP#	Название	выход	ESI m/z	Rt (мин) в LCMS
LP1	qLP18	NH <sub>2</sub> -PEG <sub>3</sub> -TCOT-PEG <sub>4</sub> -vcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -Dxd	59%	808.5 (M/2 + H) <sup>+</sup> , 539.2 (M/3 + H) <sup>+</sup>	1.03
LP28	qLP29	NH <sub>2</sub> -PEG <sub>3</sub> -TCOT-B3-[NH-PEG <sub>2</sub> - <sup>D</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -Dxd] <sub>2</sub>	37%	801.3 (M/4 + H) <sup>+</sup> , 1067.8 (M/3 + H) <sup>+</sup>	1.41
LP32	qLP33	NH <sub>2</sub> -PEG <sub>3</sub> -TCOT-B3-[NH-PEG <sub>2</sub> - <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -Dxd] <sub>2</sub>	35%	801.0 (M/4 + H) <sup>+</sup>	1.43
LP39	qLP40	NH <sub>2</sub> -PEG <sub>3</sub> -TCOT-PEG <sub>2</sub> -B4-[NH- <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -Dxd] <sub>2</sub>	34%	991.2 (M/3 + H) <sup>+</sup>	1.44
LP41	qLP42	NH <sub>2</sub> -PEG <sub>3</sub> -TCOT-PEG <sub>2</sub> -B5-[NH-PEG <sub>2</sub> - <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH <sub>2</sub> -Dxd] <sub>3</sub>	38%	929.7 (M/5 + H) <sup>+</sup> , 1161.9 (M/4 + H) <sup>+</sup>	1.47

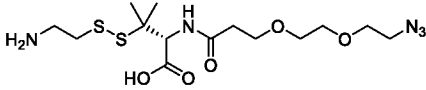
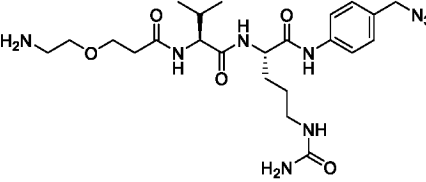
**[0716] ПРИМЕР 9:** Иллюстративные линкеры L1-B для биоконъюгации трансглутаминазы

**[0717]** В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения линкеры L1-B могут представлять собой азид-аминовые линкеры (**AL**), которые содержат аминогруппу, которая непосредственно присоединяется к антителу, PEG-содержащую базовую структуру и азидную функциональную группу (**B'**,  $n=1$ ).

**[0718]** Два азид-аминовых линкера конъюгировали с остатком Q295 антител с Fc-доменом WT, которые ферментативно дегликозилированы, или антител с мутацией N297D, в результате чего получали азидо-функционализированное антитело с двумя присоединениями и двумя азидными функциональными группами, доступными для дальнейшей модификации ( $DAR = 2n$ ). Четыре азид-аминовых линкера конъюгировали с остатками Q295 и Q297 антител с мутацией N297Q в Fc-домене, в результате чего получали азидо-функционализированное антитело с четырьмя присоединяемыми и четырьмя азидными функциональными группами, доступными для дальнейшей модификации ( $DAR = 4n$ ). Структуры основных компонентов неограничивающих иллюстративных азид-аминовых линкеров показаны на **фигуре 3B**. Конкретные структуры, синтезированные в качестве примеров, представлены ниже в **таблице 14**.

**Таблица 14: Амино-азидо линкеры, синтезированные в качестве примеров**

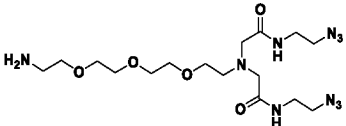
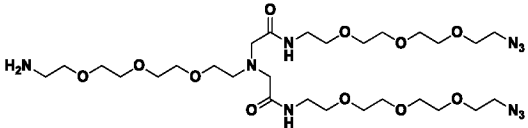
Cpd#	Структура	LC-MS m/z (100%)	MF	FW
AL1		219.2 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	218.25
AL2		263.2 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> .2CF <sub>3</sub> COOH	490.35
AL3		351.3 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	350.41
AL4		439.3 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>32</sub> H <sub>68</sub> N <sub>8</sub> O <sub>14</sub>	438.52
AL5		527.6 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> N <sub>6</sub> O <sub>9</sub> S	526.60
AL6		324.2 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S.HC OOH	369.44
AL7		338.2 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S.HC OOH	383.42

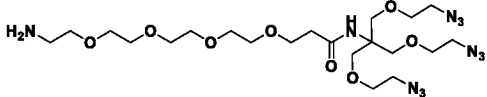
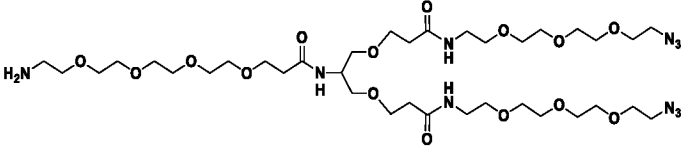
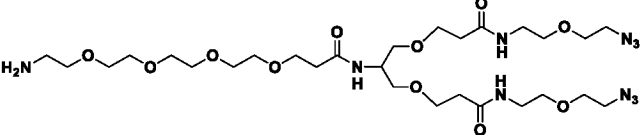
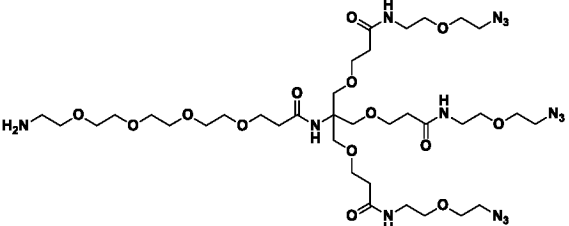
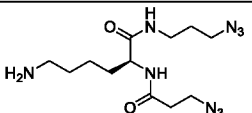
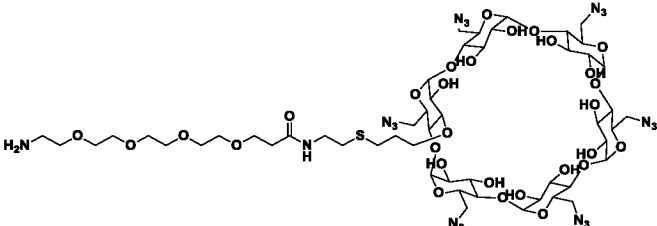
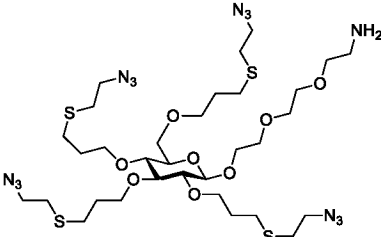
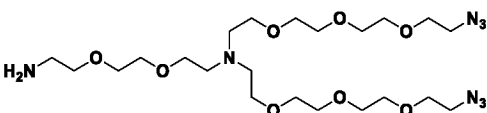
AL8		410.0 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>27</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub> .CF <sub>3</sub> COOH	523.55
AL9		520.3 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> N <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	519.60

[0719] В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения линкеры L1 могут представлять собой разветвленные алкил-азид-аминовые линкеры (BL), содержащие аминогруппу, которая непосредственно присоединяется к разветвленной, содержащей алкил-PEG базовой структуре антитела, и 2-6 азидных функциональных групп (n=2-6).

[0720] Два разветвленных алкил-азид-аминовых линкера конъюгируют с остатком Q295 антител с Fc-доменом WT, которые ферментативно дегликозилированы, или антител с мутациями N297D, в результате чего получают азидофункционализированное антитело с двумя присоединениями и 4-12 азидными функциональными группами (2 x n, где n представляет собой количество азидов на каждом разветвленном линкере BL1), доступными для дальнейшей модификации. Четыре разветвленных алкил-азид-аминовых линкера конъюгируют с остатками Q295 и Q297 антител с мутацией N297Q в Fc-домене, в результате чего получают азидофункционализированное антитело с четырьмя присоединениями и 8-24 азидными функциональными группами (4 x n), доступными для дальнейшей модификации. Структуры основных компонентов возможных разветвленных алкил-азид-аминовых линкеров представлены на **фигуре 4В**. Конкретные структуры, синтезированные в качестве примеров, представлены в **таблице 15**.

**Таблица 15: Разветвленные линкеры, синтезированные в качестве примеров**

Соед#	Структура	LC-MS m/z (100%)	MF	FW
BL1		445.3 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> N <sub>10</sub> O <sub>5</sub> .CF <sub>3</sub> COOH	558.51
BL2		709.5 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>56</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	708.8

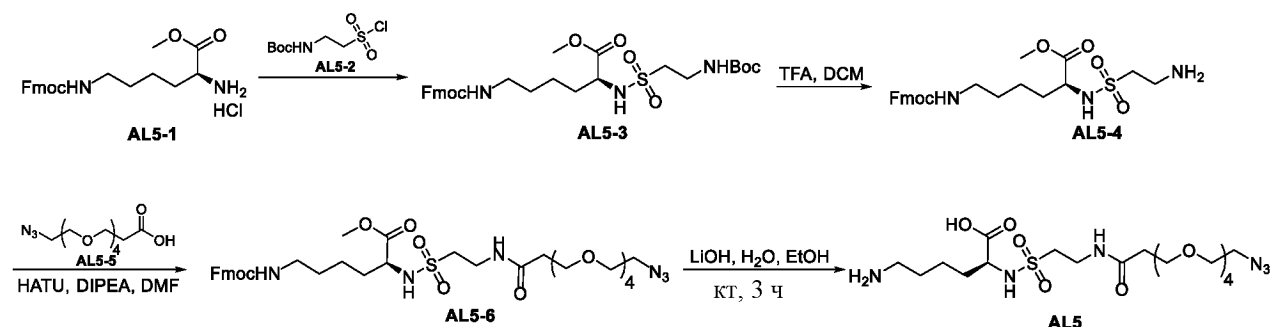
BL3		576.4 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>41</sub> N <sub>11</sub> O <sub>8</sub>	575.63
BL4		883.5 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>36</sub> H <sub>70</sub> N <sub>10</sub> O <sub>15</sub>	883.00
BL5		707.4 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>54</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>	706.79
BL6		921.6 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>36</sub> H <sub>68</sub> N <sub>14</sub> O <sub>14</sub>	921.01
BL7		326.2 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> N <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	325.38
BL10		1488.2 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>52</sub> H <sub>86</sub> N <sub>20</sub> O <sub>29</sub> S	1487.42
BL11		884.5 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>37</sub> N <sub>13</sub> O <sub>8</sub>	587.59
BL12				550.66

[0721] Амино-азидо линкеры **AL1** (CAS: 134179-38-7), **AL2** (CAS: 951671-92-4), **AL3** (CAS: 957486-82-7) и **AL4** (CAS: 857891-82-8) были получены коммерчески. Амино-тетразиновый линкер **AL10** (CAS: 2055646-21-2) описан в WO 2016209062, включенном в настоящее описание в качестве ссылки. О разветвленном линкере **BL7** (CAS: 2253947-15-6) сообщается в WO2018218004, включенном в настоящее описание посредством ссылки.

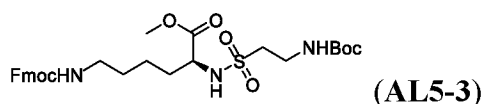
[0722] ПРИМЕР 10: Синтез линкера AL5

[0723] Амино-азидо линкер AL5 синтезировали, как описано на схеме 14 и в примерах 10A-10D ниже.

**Схема 14: Синтез амино-азидо линкера AL5**

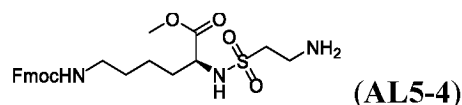


[0724] Пример 10A: Метил (2*S*)-2-(2-{{(трет-бутокси)карбонил}амино}-этансульфонамидо)-6-{{(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил}амино}гексаноат (AL5-3)



[0725] К раствору H-Lys(Fmoc)-OMe·HCl (AL5-1, CAS: 201009-98-5) (0,38 г, 1,0 ммоль) в DCM (10 мл) добавляли триэтиламин (0,30 г, 3,0 ммоль), DMAP (0,12 г, 1,0 ммоль) и соединение AL5-2 (CAS: 134019-73-1) (0,25 г, 1,0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов; завершение реакции контролировали с помощью LCMS. Смесь непосредственно очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в водн. TFA (0,01%)) с получением соединения AL5-3 (0,30 г, выход 50%) в виде вязкого масла. ESI  $m/z$ : 612,3 (M + Na)<sup>+</sup>.

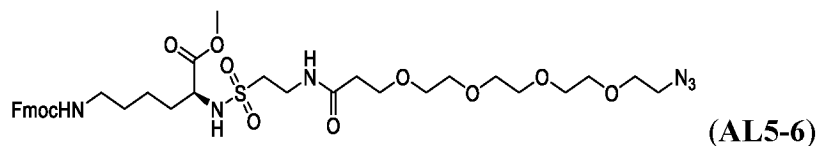
[0726] Пример 10B: Метил-(2*S*)-2-(2-аминоэтансульфонамидо)-6-{{(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил}амино}гексаноат (AL5-4)



[0727] К раствору соединения AL5-3 (0,30 г, 0,51 ммоль) в DCM (10 мл) добавляли TFA (2 мл), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов до полного удаления Boc, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь концентрировали в вакууме и остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в водн. TFA (0,01%)) с получением соединения AL5-4 (0,20 г, выход 80%) в виде вязкого масла. ESI  $m/z$ : 490,1 (M+H)<sup>+</sup>.

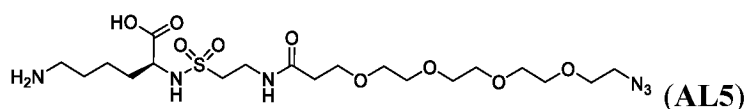
[0728] Пример 10C: Метил (2*S*)-2-[2-(1-азидо-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-

амидо)этансульфонамидо]-6-{[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}гексаноат  
(AL5-6)



[0729] К раствору соединения AL5-5 (0,12 г, 0,41 ммоль) в DMF (10 мл) добавляли соединение NATU (0,16 г, 0,42 ммоль) и DIPEA (0,11 г, 0,85 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут перед добавлением соединения AL5-4 (0,20 г, 0,41 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Полученную смесь непосредственно очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в водн. бикарбонате аммония (10 мМ)) с получением соединения AL5-6 (0,25 г, выход 80%) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 763,3 (M+H)<sup>+</sup>.

[0730] Пример 10D: (2S)-6-Амино-2-[2-(1-азидо-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо)этансульфонамидо]гексановая кислота (AL5)

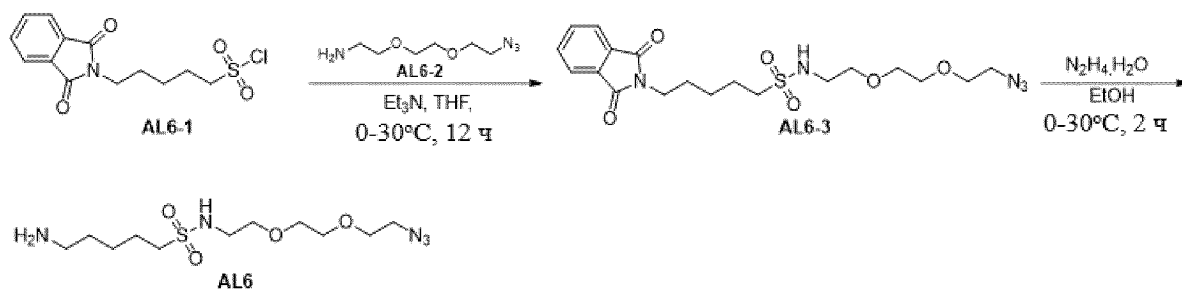


[0731] К раствору соединения AL5-6 (25 мг, 33 мкмоль) в этаноле (0,5 мл) добавляли водн. гидроксид лития (0,33 М, 0,5 мл), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, что контролировали с помощью LCMS. Реакцию гасили водн. гидрохлоридом (1 М) до pH 7, и полученную смесь непосредственно разделяли флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в водн. муравьиной кислоте (0,01%)) с получением амино-азидо линкера AL5 (5,0 мг, выход 28%) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 527,3 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 8.20 (s, 1H), 7.90-7.80 (m, 2H), 7.50-7.40 (m, 1H), 3.80-3.10 (m, 27H), 3.10-3.05 (m, 1H), 2.80-2.75 (m, 1H), 2.35-2.30 (m, 1H), 1.80-1.50 (m, 2H), 1.45-1.40 (m, 1H) ppm. (Кислотный протон не обнаружен. Отсутствие альдегидного протона указывает на то, что линкер не является формой соли муравьиной кислоты.)

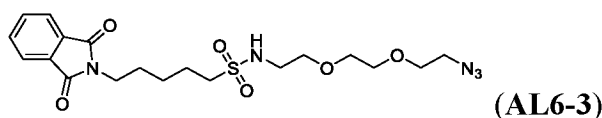
[0732] ПРИМЕР 11: Синтез линкера AL6

[0733] Амино-азидо линкер AL6 синтезировали, как описано на схеме 15 и в примерах 11А-11В ниже.

**Схема 15: Синтез амино-азидо линкера AL6**

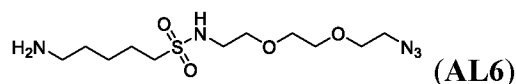


[0734] *Пример 11А:* *N*-{2-[2-(2-Азидоэтокси)этокси]этил}-5-(1,3-диоксо-2,3-дигидро-1*H*-изоиндол-2-ил)пентан-1-сульфаниламид (**AL6-3**)



[0735] К раствору амино-PEG<sub>2</sub>-азида (**AL6-2**) (0,41 г, 2,4 ммоль) в THF (30 мл) добавляли триэтиламин (0,36 г, 3,6 ммоль), а затем соединение **AL6-1** (0,83 г, 2,6 ммоль, CAS: 63345-34-6) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 12 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь концентрировали *in vacuo* с получением неочищенного **AL6-3** (0,91 г) в виде желтого масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ESI *m/z*: 454,2 (M+H)<sup>+</sup>.

[0736] *Пример 11В:* 5-Амино-*N*-{2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этил}пентан-1-сульфонамид (**AL6**)



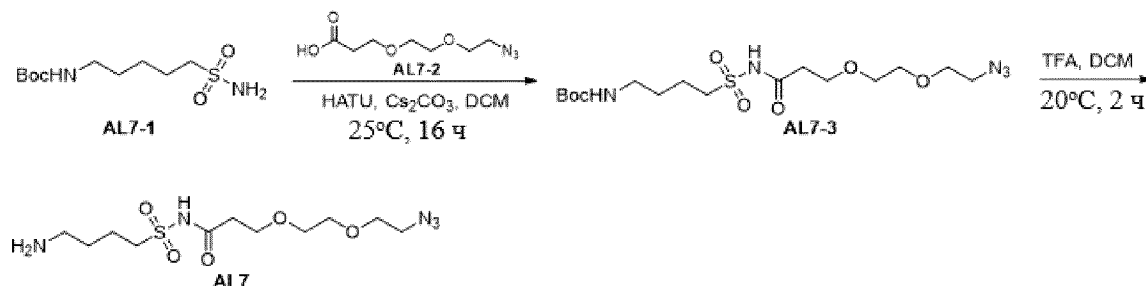
[0737] К раствору соединения **AL6-3** (0,90 г, 1,9 ммоль) в этаноле (10 мл) добавляли гидразингидрат (85%, 2,2 г, 38 ммоль) при 0°C, и реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение 2 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь концентрировали *in vacuo* и остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (10-30% ацетонитрила в водн. муравьиной кислоте (0,225%)) с получением амино-азида линкера **AL6** (0,18 г, выход 20% за 2 стадии из **AL6-2**, соль муравьиной кислоты) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 324.2 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.43 (br s, 1H), 3.63-3.58 (m, 2H), 3.57-3.51 (m, 4H), 3.45 (t, *J* = 5.8 Гц, 2H), 3.41-3.36 (m, 2H), 3.08 (t, *J* = 5.9 Гц, 2H), 3.03-2.95 (m, 2H), 2.75-2.64 (m, 2H), 1.69-1.57 (m, 2H), 1.56-1.46 (m, 2H), 1.44-1.33 (m, 2H) ppm.

[0738] ПРИМЕР 12: Синтез линкера AL7

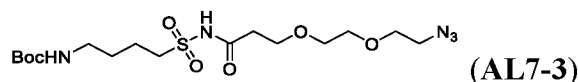


[0739] Амино-азидо линкер AL7 синтезировали, как описано на схеме 16 и в примерах 12А-12В ниже.

**Схема 16: Синтез амино-азидо линкера AL7**

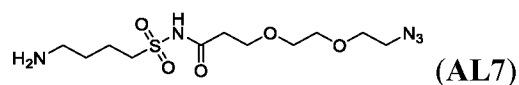


[0740] Пример 12А: *tert*-Бутил *N*-[4-({3-[2-(2-азидоэтокси)этокси]пропанамидо}-сульфонил)бутил]карбамат (AL7-3)



[0741] К раствору соединения AL7-2 (14 мг, 69 мкмоль, CAS: 1312309-63-9) в DCM (1,5 мл) добавляли HATU (29 мг, 76 мкмоль) при 25°C. Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов перед добавлением карбоната цезия (49 мг, 0,15 ммоль) и соединения AL7-1 (21 мг, 83 мкмоль, CAS: 1862014-38-7). Затем реакцию перемешивали при 25°C в течение 16 часов. За завершением реакции следили с помощью LCMS. Полученную смесь разбавляли DCM (8,0 мл) и гасили водой (4,0 мл). Двухфазную смесь подкисляли *водн.* бисульфатом калия (0,5 М) до pH 5. Органический раствор отделяли и промывали водой (4,0 мл) и рассолом (4,0 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-45% ацетонитрила в *водн.* уксусной кислоте (0,4%)) с получением соединения AL7-3 (15 мг, выход 45%) в виде твердого вещества желтого цвета. ESI m/z: 438,2 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.64 (br s, 1H), 3.82-3.76 (m, 2H), 3.75-3.66 (m, 6H), 3.51-3.41 (m, 4H), 3.16 (br d, J = 6.9 Гц, 2H), 2.66-2.59 (m, 2H), 1.92-1.83 (m, 2H), 1.65 (quin, J = 7.3 Гц, 2H), 1.45 (s, 9H) ppm.

[0742] Пример 12В: *N*-(4-аминобутансульфонил)-3-[2-(2-азидоэтокси)этокси]-пропанамид (AL7)



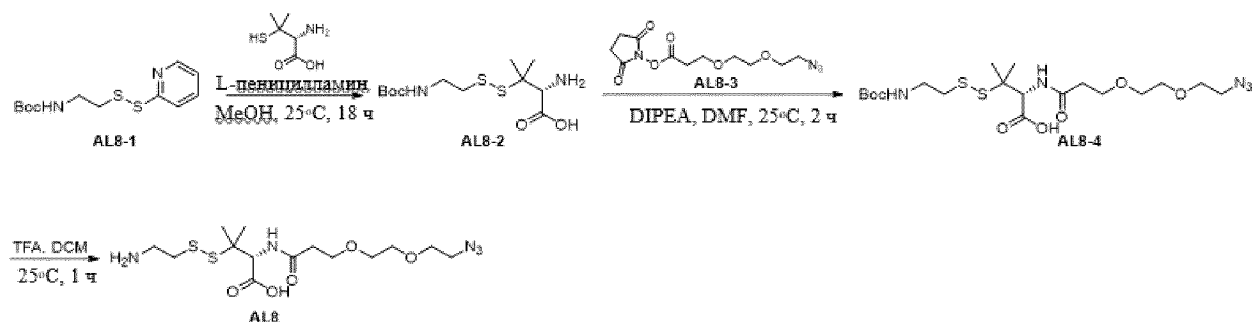
[0743] К раствору соединения AL7-3 (8,0 мг, 18 мкмоль) в DCM (1,5 мл) добавляли TFA (0,3 мкл, 4,1 мкмоль), и реакцию перемешивали при 20°C в течение 2

часов до полного удаления Boc, что контролировалось с помощью LCMS. Полученную смесь концентрировали *в вакууме* и остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (8-28% ацетонитрила в *водн.* муравьиной кислоте (0,225%)) с получением амино-азидо линкера **AL7** (6,0 мг, выход 86%, соль муравьиной кислоты) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 338.2 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 3.63-3.59 (m, 2H), 3.57-3.53 (m, 4H), 3.51-3.46 (m, 4H), 2.97 (br s, 2H), 2.79 (br s, 2H), 2.20 (t, J = 7.2 Гц, 2H), 1.60 (br s, 4H) ppm.

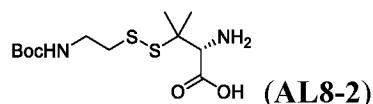
[0744] ПРИМЕР 13: Синтез линкера AL8

[0745] Амино-азидо линкер AL8 синтезировали, как описано на схеме 17 и в примерах 13А-13С ниже.

**Схема 17: Синтез амино-азидо линкера AL8**

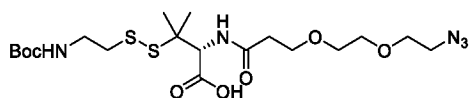


[0746] Пример 13А: (2*R*)-2-Амино-3-[(2-{{(трет-бутоксикарбонил)амино}этил)-дисульфанил]-3-метилбутановая кислота (**AL8-2**)



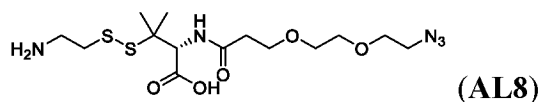
[0747] К раствору соединения **AL8-1** (1,0 г, 1,8 ммоль, CAS: 535943-48-7) в метаноле (20 мл) добавляли *L*-пеницилламин (0,78 г, 5,2 ммоль, CAS: 1113-41-3), и реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 18 часов. За завершением реакции следили с помощью LCMS. Полученную смесь концентрировали *в вакууме* и остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (15-35% ацетонитрила в *водн.* муравьиной кислоте (0,225%)) с получением соединения **AL8-2** (0,52 г, выход 80%, соль муравьиной кислоты) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 6.97 (br t, J = 5.6 Гц, 1H), 3.27 (s, 1H), 3.21-3.12 (m, 2H), 2.77 (t, J = 6.9 Гц, 2H), 1.45 (s, 3H), 1.37 (s, 9H), 1.24 (s, 3H) ppm.

[0748] Пример 13В: (2*R*)-2-{{3-[2-(2-Азидоэтоксидэтокси)пропанамидо]}-3-[(2-{{(трет-бутоксикарбонил)амино}этил)дисульфанил]-3-метилбутановая кислота (**AL8-4**)



[0749] К раствору соединения **AL8-2** (0,20 г, 0,54 ммоль, соль муравьиной кислоты) в DMF (2 мл) добавляли DIPEA (0,14 г, 1,1 ммоль) и соединение **AL8-3** (0,20 г, 0,67 ммоль, CAS: 1312309-64 0), и реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 2 часов. За завершением реакции следили с помощью LCMS. Полученную смесь концентрировали *в вакууме* и остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (40-60% ацетонитрила в *водн.* муравьиной кислоте (0,225%)) с получением соединения **AL8-4** (0,20 г, выход 73%) в виде бесцветного масла.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8.20-8.07 (m, 1H), 6.91 (br t,  $J = 5.4$  Гц, 1H), 4.50 (d,  $J = 9.0$  Гц, 1H), 3.63-3.57 (m, 4H), 3.56-3.52 (m, 2H), 3.51-3.48 (m, 2H), 3.39 (br s, 2H), 3.18-3.12 (m, 2H), 2.79-2.67 (m, 2H), 2.48-2.36 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 1.35 (s, 3H), 1.29 (s, 3H) ppm.

[0750] Пример 13С: (2R)-3-[(2-Аминоэтил)дисульфанил]-2-{3-[2-(2-азидоэтокси)-этокси]пропанамидо}-3-метилбутановая кислота (**AL8**)



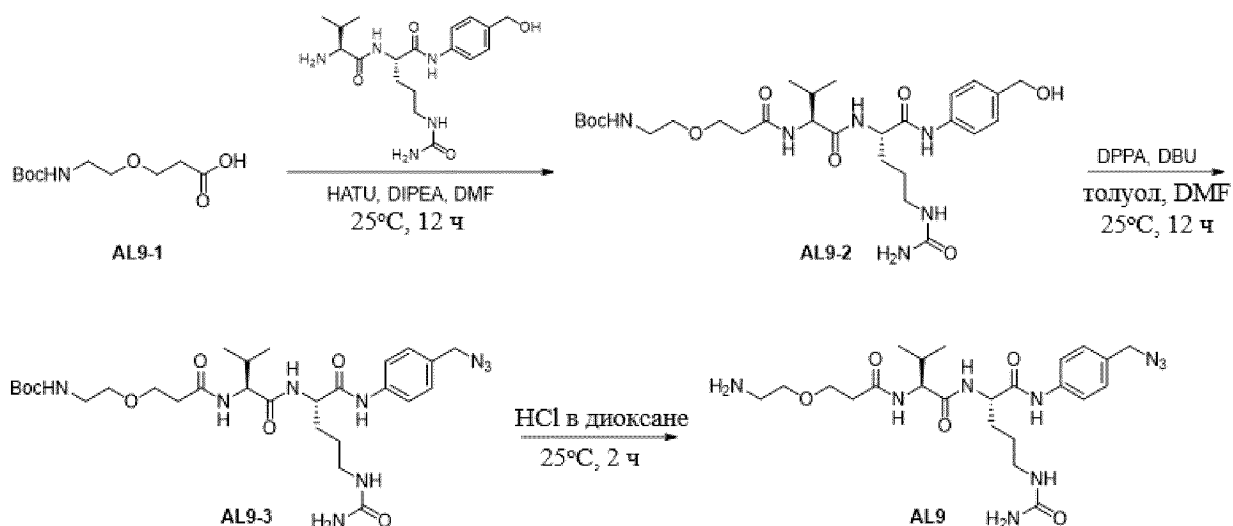
[0751] К раствору соединения **AL8-4** (0,25 г, 0,49 ммоль) в DCM (2,0 мл) добавляли TFA (2,0 мл) и реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение часа, что контролировали с помощью TLC. Смесь концентрировали *в вакууме* с получением неочищенного линкера **AL8** (0,20 г) в виде соли TFA. Неочищенную соль (45 мг, 86 мкмоль) растворяли в смеси растворителя DMF (1 мл) и метанола (1 мл), и полученный раствор подвергали флэш-хроматографии с обращенной фазой (12-32% ацетонитрила в *водн.* аммиаке (0,05%)) с получением **AL8** (12 мг, выход 33%, аммониевая соль) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 410.2 ( $\text{M} + \text{H}$ )<sup>+</sup>.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.44 (s, 1H), 3.82 (t,  $J = 5.7$  Гц, 2H), 3.76-3.65 (m, 6H), 3.55-3.47 (m, 2H), 3.36 (t,  $J = 6.4$  Гц, 2H), 3.09-2.95 (m, 2H), 2.71-2.54 (m, 2H), 1.46 (s, 3H), 1.41 (s, 3H) ppm.

[0752]  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{DMSO-}d_6$ ) для **AL8** соль TFA:  $\delta$  8.25-8.16 (m, 1H), 7.88 (br s, 3H), 4.56 (d,  $J = 9.3$  Гц, 1H), 3.63-3.48 (m, 8H), 3.43-3.36 (m, 2H), 3.12-3.00 (m, 2H), 2.93-2.87 (m, 2H), 2.47-2.38 (m, 2H), 1.37 (s, 3H), 1.31 (s, 3H) ppm.

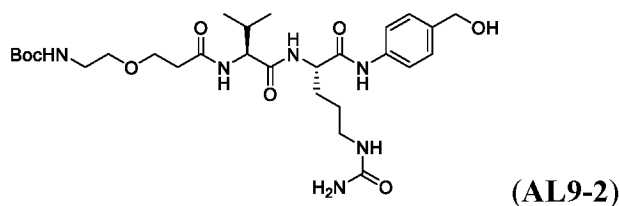
[0753] ПРИМЕР 14: Синтез линкера AL9

[0754] Амино-азидо линкер AL9 синтезировали, как описано на схеме 18 и в примерах 14А-14С ниже.

**Схема 18: Синтез амино-азидо линкера AL9**

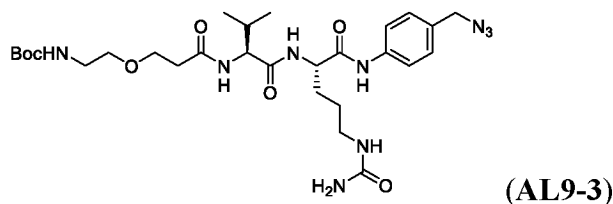


[0755] Пример 14А: *трет*-Бутил *N*-[2-(2-{{(1*S*)-1-{{(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{{4-(гидроксиметил)фенил}карбамоил}бутил}карбамоил}-2-метилпропил}карбамоил}-этокси)этил]карбамат (AL9-2)



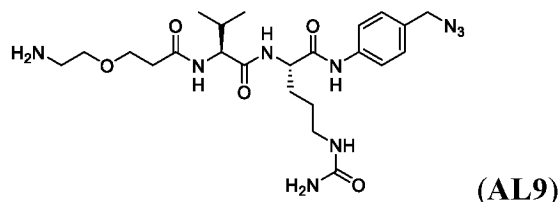
[0756] К раствору **vcPAB** (0,60 г, 1,6 ммоль, CAS: 159857-79-1) в DMF (5 мл) добавляли HATU (0,60 г, 1,6 ммоль), DIPEA (0,61 г, 4,7 ммоль) и AL9-1 (0,41 г, 1,7 ммоль, CAS: 1260092-44-1), и реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 12 часов. За завершением реакции следили с помощью LCMS. Смесь концентрировали *в вакууме* и остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-35% ацетонитрила в воде) с получением соединения AL9-2 (0,85 г, выход 86%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 495,3 (M – Boc + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>д6</sub>) δ 9.89 (s, 1H), 8.10 (d, J = 7.4 Гц, 1H), 7.86 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 7.54 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 7.22 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 6.70 (br s, 1H), 6.02-5.91 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.08 (t, J = 5.6 Гц, 1H), 4.42 (d, J = 5.4 Гц, 2H), 4.26-4.20 (m, 1H), 3.62-3.53 (m, 3H), 3.07-2.88 (m, 6H), 2.03-1.91 (m, 1H), 1.68 (br d, J = 8.9 Гц, 1H), 1.63-1.50 (m, 1H), 1.36 (s, 13H), 0.86 (d, J = 6.8 Гц, 3H), 0.82 (d, J = 6.8 Гц, 3H) ppm.

[0757] Пример 14В: *трет*-Бутил *N*-[2-(2-{{(1*S*)-1-{{(1*S*)-1-{{4-(азидометил)фенил}карбамоил}-4-(карбамоиламино)бутил}карбамоил}-2-метилпропил}карбамоил}-этокси)этил]карбамат (AL9-3)



**[0758]** К раствору соединения **AL9-2** (0,40 г, 0,67 ммоль) в толуоле (18 мл) и DMF (2 мл) добавляли DBU (0,26 г, 1,7 ммоль) и DPPA (0,46 г, 1,7 ммоль). Смесь перемешивали при 25°C в течение 12 часов. За завершением реакции следили с помощью LCMS. Полученную смесь концентрировали *in vacuo* и остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (0-12% метанола в DCM) с получением соединения **AL9-3** (0,32 г, выход 61%) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.03 (s, 1H), 8.14 (br d, *J* = 6.8 Гц, 1H), 7.87 (br d, *J* = 8.8 Гц, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.5 Гц, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.4 Гц, 2H), 6.78-6.66 (m, 1H), 6.02-5.93 (m, 1H), 5.41 (s, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.24 (br t, *J* = 7.6 Гц, 1H), 3.63-3.52 (m, 3H), 3.08-2.88 (m, 6H), 2.01-1.92 (m, 1H), 1.72-1.65 (m, 1H), 1.65-1.59 (m, 1H), 1.36 (s, 13H), 0.86 (br d, *J* = 6.8 Гц, 3H), 0.83 (br d, *J* = 6.6 Гц, 3H) ppm.

**[0759]** Пример 14С: (2*S*)-2-[(2*S*)-2-[3-(2-Аминоэтокси)пропанамидо]-3-метилбутанамидо]-*N*-[4-(азидометил)фенил]-5-(карбамоиламино)пентанамид (**AL9**)

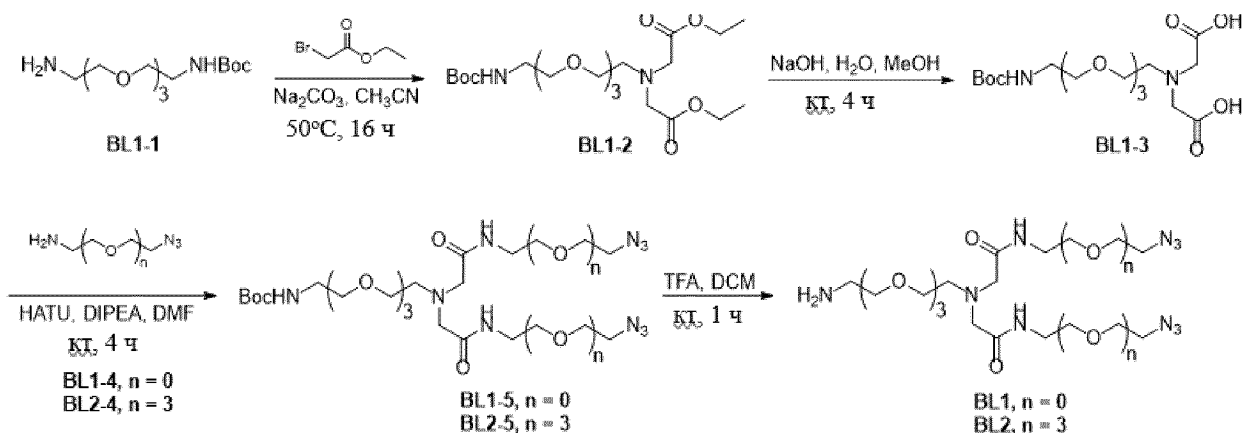


**[0760]** К раствору гидрохлорида в диоксане (4 N, 5 мл) добавляли соединение **AL9-3** (0,17 г, 0,21 ммоль), и полученный раствор перемешивали при 25°C в течение 2 часов до полного удаления Boc, что контролировали с помощью LCMS. Смесь непосредственно очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (34-74% ацетонитрила в *водн.* аммиаке (0,05%)) с получением линкера **AL9** (68 мг, выход 61%) в виде белого твердого вещества. ESI *m/z*: 520.3 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.04 (s, 1H), 8.16 (br d, *J* = 7.4 Гц, 1H), 7.90 (br d, *J* = 8.4 Гц, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.5 Гц, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.5 Гц, 2H), 6.06-5.94 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 4.44-4.33 (m, 3H), 4.24 (br dd, *J* = 6.8, 8.6 Гц, 1H), 3.65-3.54 (m, 2H), 3.07-2.90 (m, 2H), 2.68-2.65 (m, 2H), 2.46-2.34 (m, 4H), 2.00-1.93 (m, 1H), 1.81-1.21 (m, 6H), 0.86 (d, *J* = 6.8 Гц, 3H), 0.83 (d, *J* = 6.8 Гц, 3H) ppm.

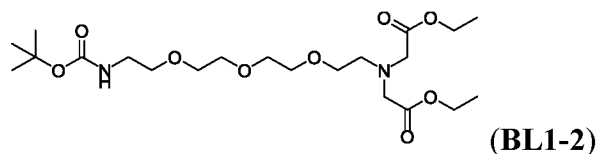
**[0761]** ПРИМЕР 15: Синтез разветвленных линкеров BL1 и BL2

[0762] Разветвленные линкеры BL1 и BL2 синтезировали, как описано на схеме 19 и в примерах 15A-15F ниже.

**Схема 19: Синтез разветвленных линкеров BL1 и BL2**

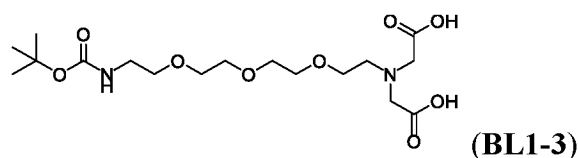


[0763] Пример 15A: Этил 1-{[(*tert*-бутоксикарбонил)амино]}-12-(2-этокси-2-оксоэтил)-3,6,9-триокса-12-азатетрадекан-14-оат (**BL1-2**)



[0764] К раствору соединения **BL1-1** (CAS: 101187-40-0) (0,29 г, 1,0 ммоль) в ацетонитриле (50 мл) добавляли этилбромацетат (0,37 г, 2,2 ммоль) и карбонат натрия (0,27 г, 2,5 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 16 часов. Завершение реакции контролировали с помощью TLC ( $R_f = 0,6$ , 10% метанола в DCM). После охлаждения до комнатной температуры смесь фильтровали и фильтрат концентрировали *in vacuo* с получением неочищенного продукта **BL1-2** (0,40 г, выход неочищенного продукта 86%) в виде желтого масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ESI  $m/z$ : 465,1 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

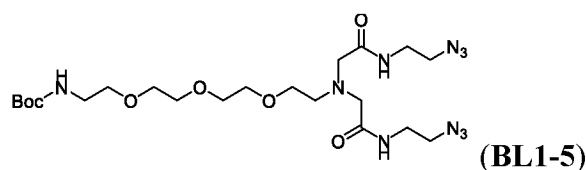
[0765] Пример 15B: 1-{[(*tert*-Бутоксикарбонил)амино]}-12-(карбоксиметил)-3,6,9-триокса-12-азатетрадекан-14-овая кислота (**BL1-3**)



[0766] К раствору неочищенного соединения **BL1-2** (0,23 г, 0,50 ммоль, полученного выше) в метаноле (5 мл) добавляли водн. гидроксид натрия (2 М, 5 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Метанол удаляли *in vacuo*.

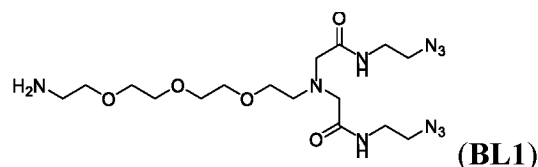
*вакууме* и остаточный водный раствор подкисляли до pH 3 с помощью *водн.* гидрохлорида (1 N). Полученную смесь экстрагировали DCM (10 мл x 3), объединенный органический раствор сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме* с получением неочищенного продукта **BL1-3** (81 мг, выход 40%) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 409,1 (M+H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 3.55-3.35 (m, 17H), 3.08-3.06 (m, 4H), 1.37 (s, 9H) ppm.

[0767] Пример 15C: *трет*-Бутил *N*-{1-[(2-азидоэтил)карбамоил]-2-[[2-азидоэтил)карбамоил]метил]-5,8,11-триокса-2-азатридекан-13-ил} карбамат (**BL1-5**)



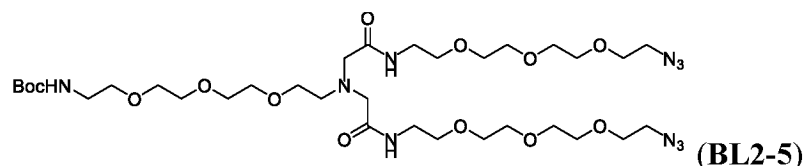
[0768] К раствору соединения **BL1-3** (75 мг, 0,18 ммоль) и 2-азидоэтанамина **BL1-4** (47 мг, 0,55 ммоль) в DMF (5 мл) добавляли HATU (0,21 г, 0,55 ммоль) и DIPEA (0,14 г, 1,1 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь подвергали флэш-хроматографии с обращенной фазой (30-90% ацетонитрила в *водн.* бикарбонате аммония (10 mM)) с получением соединения **BL1-5** (63 мг, выход 64%) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 545,3 (M+H)<sup>+</sup>.

[0769] Пример 15D: 1-Амино-*N*-(2-азидоэтил)-12-[[2-азидоэтил)карбамоил]метил]-3,6,9-триокса-12-азатетрадекан-14-амид, соль TFA (**BL1**)



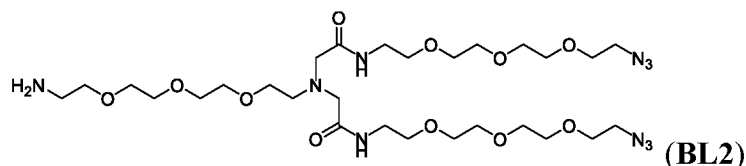
[0770] К раствору соединения **BL1-5** (0,10 г, 0,18 ммоль) в DCM (10 мл) добавляли TFA (3 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа. Летучие вещества удаляли *в вакууме*, и остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%)) с получением разветвленного линкера **BL1** (25 мг, выход 31%, соль TFA) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 445.2 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO<sub>d6</sub>) δ 8.48 (br s, 2H), 7.88 (br s, 3H), 3.63-3.50 (m, 16H), 3.42-3.38 (m, 4H), 3.34-3.28 (m, 4H), 3.05-2.95 (m, 4H) ppm.

[0771] Пример 15E: *трет*-Бутил *N*-{1-[(2-{2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]-этокси}этил)карбамоил]-2-[[2-{2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси}этил)карбамоил]-метил]-5,8,11-триокса-2-азатридекан-13-ил} карбамат (**BL2-5**)



[0772] Следуя методике, аналогичной методике получения соединения **BL1-5**, за исключением замены **BL1-4** на **BL2-4**, получали соединение **BL2-5** (0,27 г, выход 74%) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 809,5 (M+H)<sup>+</sup>.

[0773] Пример 15F: 1-Амино-*N*-(2-{2-[2-(2-азидоэтоксид)этоксид]этоксид}этил)-12-{{2-[2-(2-азидоэтоксид)этоксид]этоксид}этил}карбамоил)метил}-3,6,9-триокса-12-азатетрадекан-14-амид (**BL2**)

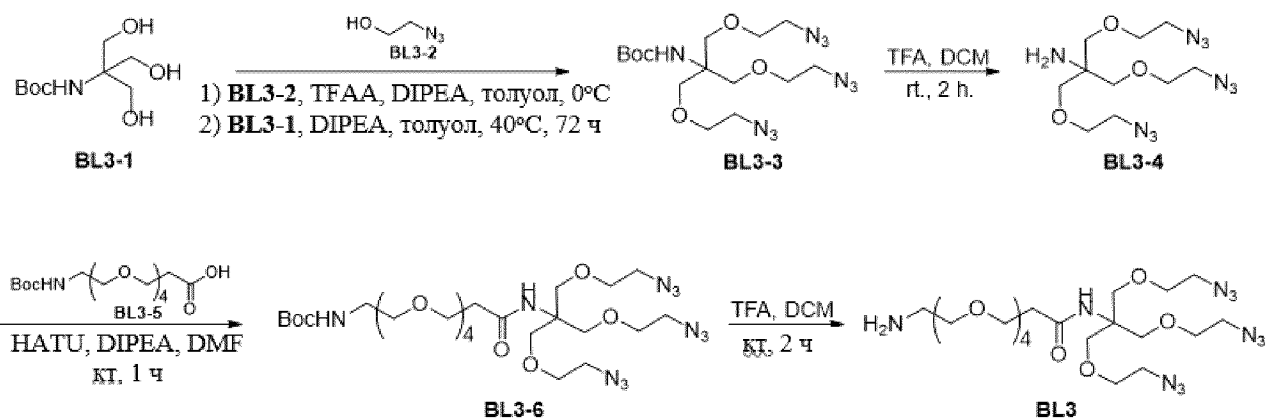


[0774] Следуя методике, аналогичной методике получения **BL1**, за исключением замены **BL1-5** на **BL2-5**, получали разветвленный линкер **BL2** (94 мг, выход 39%) в виде бесцветного масла после очистки флеш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в водн. бикарбонате аммония (10 мМ)). ESI m/z: 709.5 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.02 (t, J = 5.6 Гц, 2H), 3.60 (t, J = 4.4 Гц, 4H), 3.57-3.45 (m, 26H), 3.45-3.37 (m, 8H), 3.34 (t, J = 6.0 Гц, 2H), 3.28-3.20 (m, 4H), 3.15 (s, 4H), 2.70-2.60 (m, 4H) ppm.

[0775] ПРИМЕР 16: Синтез разветвленного линкера BL3

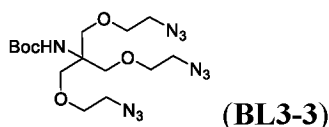
[0776] Разветвленный линкер **BL3** синтезировали, как описано на схеме 20 и в примерах 16A-16D ниже.

**Схема 20: Синтез amino-азидо линкера BL3**



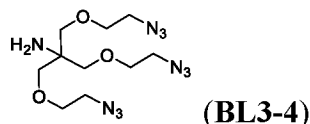
[0777] Пример 16A: *tert*-Бутил *N*-[1,3-бис(2-азидоэтоксид)-2-[(2-азидоэтоксид)метил]-пропан-2-ил]карбамат (**BL3-3**)





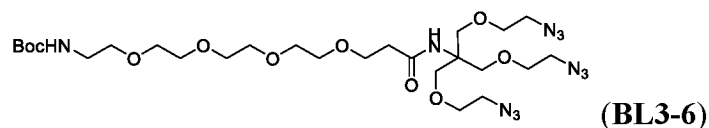
[0778] К раствору 2-азидоэтанола (**BL3-2**) (1,1 г, 13 ммоль) в толуоле (6 мл) добавляли DIPEA (1,9 г, 15 ммоль) и TFAA (3,7 г, 13 ммоль) при температуре от -2°C до 2°C, и реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 часов. К полученной смеси добавляли DIPEA (1,9 г, 15 ммоль), толуол (6 мл) и соединение **BL3-1** (CAS: 146651-71-0) (0,24 г, 1,1 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 72 часов. Затем реакцию гасили пиридином (0,2 мл) и разбавляли этилацетатом (100 мл). Органический раствор промывали *водн.* лимонной кислотой (1 М), *водн.* бикарбонатом натрия (10%), водой и рассолом, сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водн.* бикарбонате аммония (10 мМ)) с получением соединения **BL3-3** (30 мг, выход 6,4%) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 451.0 (M + Na)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.78 (s, 6H), 3.66 (t, J = 5.0 Гц, 6H), 3.34 (t, J = 5.0 Гц, 6H), 1.43 (s, 9H) ppm.

[0779] Пример 16В: 1,3-Бис(2-азидоэтокси)-2-[(2-азидоэтокси)метил]пропан-2-амин (**BL3-4**)



[0780] К раствору соединения **BL3-3** (56 мг, 0,13 ммоль) в DCM (4 мл) добавляли TFA (1 мл), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Boc, что контролировали с помощью LCMS. Смесь концентрировали *в вакууме* с получением неочищенного соединения **BL3-4** (43 мг, выход 100% неочищенного соединения) в виде желтого масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ESI m/z: 329,1 (M+H)<sup>+</sup>.

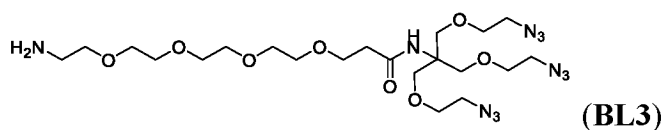
[0781] Пример 16С: *трет*-Бутил N-(14-{[1,3-бис(2-азидоэтокси)-2-[(2-азидоэтокси)метил]пропан-2-ил]карбамоил}-3,6,9,12-тетраоксаттрадекан-1-ил)-карбамат (**BL3-6**)



[0782] К раствору соединения **BL3-5** (53 мг, 0,14 ммоль) в DMF (3 мл) добавляли NATU (69 мг, 0,18 ммоль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в

течение 5 минут. К перемешиваемому раствору последовательно добавляли раствор неочищенного соединения **BL3-4** (43 мг), полученного выше, в DMF (1 мл) и DIPEA (50 мг, 0,39 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа. За завершением реакции следили с помощью LCMS. Реакционный раствор непосредственно очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водн.* бикарбонате аммония (10 mM)) с получением соединения **BL3-6** (65 мг, выход 73% за 2 стадии) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 676,4 (M+H)<sup>+</sup>.

**[0783]** Пример 16D: 1-Амино-N-[1,3-бис(2-азидоэтокси)-2-[(2-азидоэтокси)метил]-пропан-2-ил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (**BL3**)

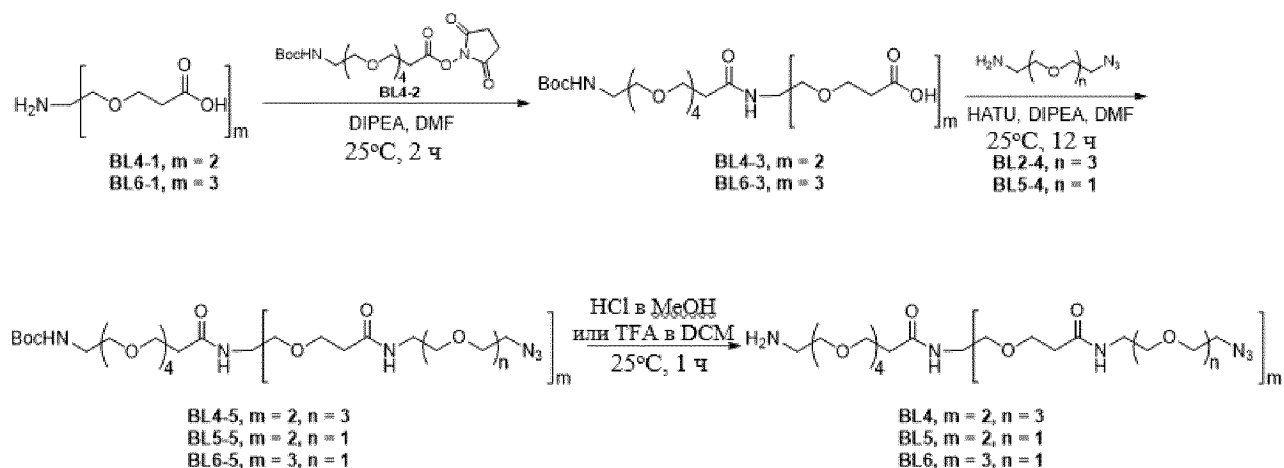


**[0784]** К раствору соединения **BL3-6** (65 мг, 96 мкмоль) в DCM (4 мл) добавляли TFA (1 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Boc, что контролировали с помощью LCMS. Летучие вещества удаляли *в вакууме* и остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водн.* бикарбонате аммония (10 mM)) с получением разветвленного линкера **BL3** (44 мг, выход 79%) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 576.3 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.25 (s, 1H), 3.69 (s, 6H), 3.56-3.60 (m, 8H), 3.47-3.52 (m, 12H), 3.44 (t, *J* = 5.5 Гц, 4H), 3.35-3.37 (m, 6H), 2.76 (t, *J* = 5.5 Гц, 2H), 2.35 (t, *J* = 6.5 Гц, 2H) ppm.

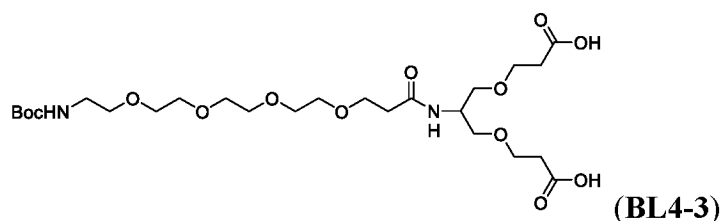
**[0785]** ПРИМЕР 17: Синтез разветвленных линкеров **BL4**, **BL5** и **BL6**

**[0786]** Разветвленные линкеры **BL4**, **BL5** и **BL6** синтезировали, как описано на схеме 21 и примерах 17A-17H ниже.

**Схема 21: Синтез amino-азидо линкеров BL4, BL5 и BL6**

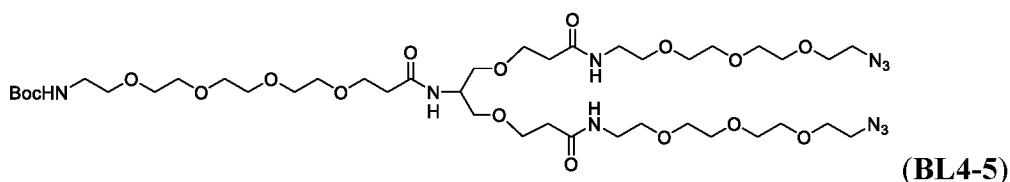


[0787] Пример 17А: 3-[2-(1-{{(трет-Бутокси)карбонил}амино}-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо)-3-(2-карбоксииэтокси)пропокси]пропановая кислота (BL4-3)



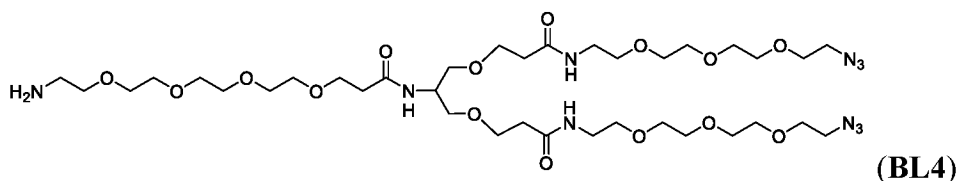
[0788] К раствору соединения BL4-1 (0,15 г, 0,64 ммоль, CAS: 1020112-73-5) в DMF (5 мл) добавляли DIPEA (0,16 г, 1,3 ммоль) и Вос-N-амидо-PEG4-сложный эфир NHS (BL4-2) (0,37 г, 0,80 ммоль, CAS: 859230-20-9), и реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение часа. Завершение реакции контролировали с помощью LCMS. Реакционную смесь концентрировали в вакууме и остаток очищали препаративной HPLC (20-40% ацетонитрила в водн. гидроксиде аммония (0,05% об.)) с получением соединения BL4-3 (0,15 г, выход 39%) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 605.2 (M + Na)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.71 (d, J = 8.1 Гц, 1H), 6.75 (br s, 1H), 4.01-3.88 (m, 1H), 3.58 (t, J = 6.3 Гц, 6H), 3.52-3.44 (m, 14H), 3.39-3.36 (m, 4H), 3.09-3.02 (m, 2H), 2.43 (t, J = 6.3 Гц, 3H), 2.32 (t, J = 6.4 Гц, 2H), 1.37 (s, 9H) ppm.

[0789] Пример 17В: трет-Бутил N-(14-{{[1,3-бис({2-[(2-{{2-[2-(2-азидоэтокси)-этокси]этокси}этил)карбамоил]этокси})пропан-2-ил]карбамоил}-3,6,9,12-тетраоксаттрадекан-1-ил)карбамат (BL4-5)



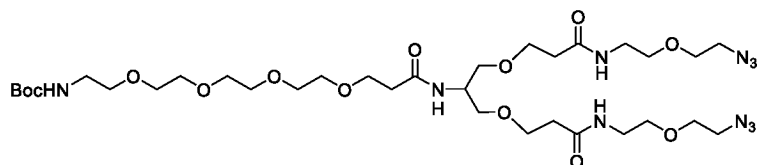
[0790] К раствору соединения BL4-3 (75 мг, 0,13 ммоль) в DMF (2 мл) добавляли DIPEA (0,10 г, 0,77 ммоль), HATU (0,15 г, 0,39 ммоль) и соединение BL2-4 (70 мг, 0,32 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение 12 часов. За завершением реакции следили с помощью LCMS. Полученную смесь концентрировали в вакууме и остаток очищали препаративной HPLC (33-53% ацетонитрила в водн. муравьиной кислоте (0,225%)) с получением соединения BL4-5 (50 мг, выход 40%) в виде бесцветного масла. ESI m/z: 983.6 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, MeOD-d<sub>4</sub>) δ 4.13 (quin, J = 5.4 Гц, 2H), 3.76-3.68 (m, 12H), 3.66-3.58 (m, 19H), 3.56-3.46 (m, 12H), 3.22 (t, J = 5.6 Гц, 4H), 2.54 (t, J = 6.1 Гц, 8H), 2.47 (t, J = 6.3 Гц, 4H), 1.44 (s, 13H) ppm.

[0791] Пример 17С: 1-Амино-*N*-[1,3-бис({2-[(2-{2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси}-этил)карбамоил]этокси})пропан-2-ил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (**BL4**)



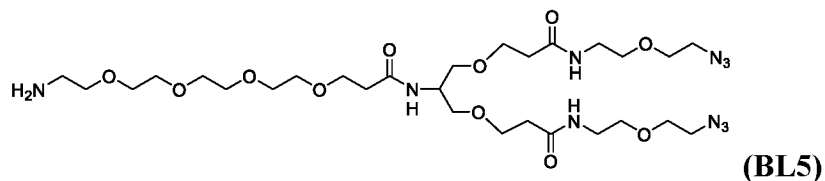
[0792] Смесь соединения **BL4-5** (30 мг, 31 мкмоль) в растворе гидрохлорида в метаноле (4 М, 5 мл) перемешивали при 25°C в течение часа до полного удаления Вос, что контролировали с помощью TLC (элюирование этилацетатом). Затем реакционную смесь концентрировали *in vacuo* и остаток очищали препаративной HPLC (35-55% ацетонитрила в водн. гидроксиде аммония (0,05%)) с получением разветвленного линкера **BL4** (15 мг, выход 33%) в виде бесцветного масла. ESI  $m/z$ : 883.5 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, MeOD<sub>d4</sub>) δ 4.17-4.08 (m, 2H), 3.80-3.69 (m, 20H), 3.67-3.61 (m, 19H), 3.52-3.44 (m, 8H), 3.15 (br d,  $J = 4.3$  Гц, 4H), 2.58 (t,  $J = 6.0$  Гц, 8H), 2.49 (t,  $J = 5.9$  Гц, 4H) ppm.

[0793] Пример 17D: *tert*-Бутил *N*-(14-{[1,3-бис(2-{[2-(2-азидоэтокси)этил]-карбамоил}этокси)пропан-2-ил]карбамоил}-3,6,9,12-тетраоксаттрадекан-1-ил)карбамат (**BL5-5**)



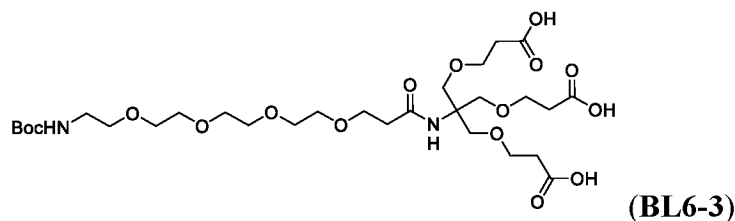
[0794] Следуя методике, аналогичной методике получения **BL4-5**, за исключением замены **BL2-4** на **BL5-4**, получали соединение **BL5-5** (0,10 г, выход 61%) в виде бесцветного масла. ESI  $m/z$ : 807.5 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.90 (t,  $J = 5.5$  Гц, 2H), 7.72 (d,  $J = 8.3$  Гц, 1H), 6.78-6.70 (m, 1H), 3.96-3.88 (m, 1H), 3.62-3.54 (m, 10H), 3.52-3.42 (m, 16H), 3.41-3.35 (m, 10H), 3.26-3.18 (m, 4H), 3.10-3.02 (m, 2H), 2.38-2.27 (m, 6H), 1.37 (s, 9H) ppm.

[0795] Пример 17E: 1-Амино-*N*-[1,3-бис(2-{[2-(2-азидоэтокси)этил]карбамоил}-этокси)пропан-2-ил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (**BL5**)



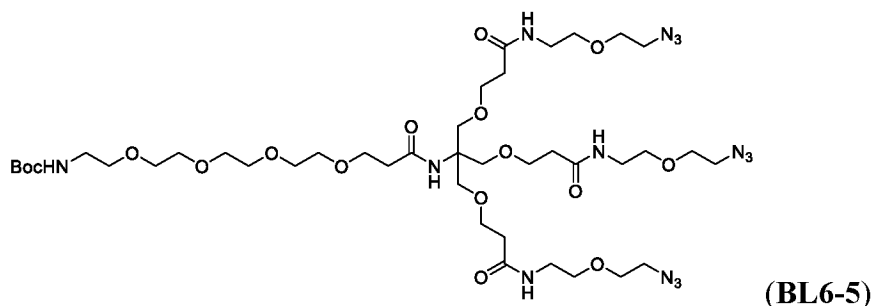
[0796] К раствору соединения **BL5-5** (0,10 г, 0,12 ммоль) в DCM (2 мл) добавляли TFA (2 мл). Смесь перемешивали при 25°C в течение часа. Окончание реакции контролировали с помощью TLC (элюирование этилацетатом). Полученную смесь концентрировали *в вакууме* и остаток очищали препаративной HPLC (35-55% ацетонитрила в *водн.* аммиаке (0,05%)) с получением разветвленного линкера **BL5** (40 мг, выход 45%) в виде бесцветного масла. ESI  $m/z$ : 707.5 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.98 (br d,  $J = 8.0$  Гц, 1H), 6.64 (br s, 2H), 4.22 (td,  $J = 4.6, 8.8$  Гц, 1H), 3.80 - 3.37 (m, 40H), 2.89 (t,  $J = 5.1$  Гц, 2H), 2.51 (t,  $J = 6.0$  Гц, 2H), 2.45 (t,  $J = 5.9$  Гц, 4H) ppm.

[0797] Пример 17F: 3-[2-(1-[(*трет*-Бутокси)карбонил]амино}-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо)-3-(2-карбоксиэтокси)-2-[(2-карбоксиэтокси)метил]-пропокси]пропановая кислота (**BL6-3**)



[0798] Следуя методике, аналогичной методике получения **BL4-3**, за исключением замены **BL4-1** на **BL6-1** (CAS: 174362-95-9), получали соединение **BL6-3** (75 мг, выход 22%) в виде белого твердого вещества. ESI  $m/z$ : 685.3 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, MeOD<sub>*д4*</sub>)  $\delta$  3.78-3.59 (m, 26H), 3.52 (t,  $J = 5.6$  Гц, 2H), 3.24 (t,  $J = 5.6$  Гц, 2H), 2.50 (t,  $J = 6.3$  Гц, 2H), 2.41 (t,  $J = 6.7$  Гц, 6H), 1.44 (s, 9H) ppm.

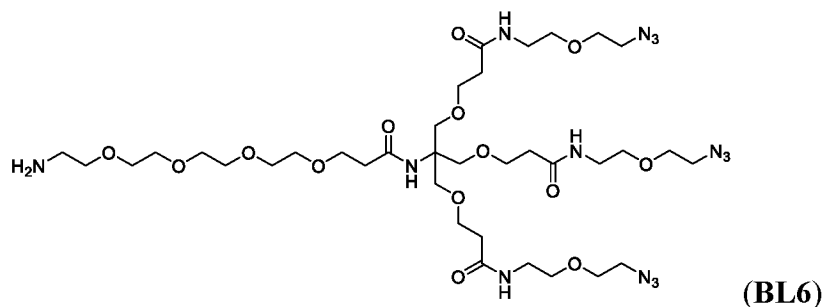
[0799] Пример 17G: *трет*-Бутил *N*-(14-[[1,3-бис(2-[[2-(2-азидоэтокси)этил]-карбамоил]этокси)-2-[(2-[[2-(2-азидоэтокси)этил]карбамоил]этокси)метил]пропан-2-ил]карбамоил]-3,6,9,12-тетраоксаттрадекан-1-ил)карбамат (**BL6-5**)



[0800] Следуя методике, аналогичной методике получения **BL4-5**, за исключением замены **BL2-4** на **BL5-4** и замены **BL4-3** на **BL6-3**, получали соединение **BL6-5** (8 мг, выход 9%) в виде желтого масла. ESI  $m/z$ : 1022.4 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, MeOD<sub>*д4*</sub>)

$\delta$  3.72-3.49 (m, 40H), 3.43-3.35 (m, 12H), 3.26-3.18 (m, 2H), 2.50-2.41 (m, 8H), 1.44 (s, 9H) ppm.

**[0801]** Пример 17Н: 1-Амино-*N*-[1,3-бис(2-{[2-(2-азидоэтокс)этил]карбамоил}этокс)-2-[(2-{[2-(2-азидоэтокс)этил]карбамоил}этокс)метил]пропан-2-ил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (**BL6**)

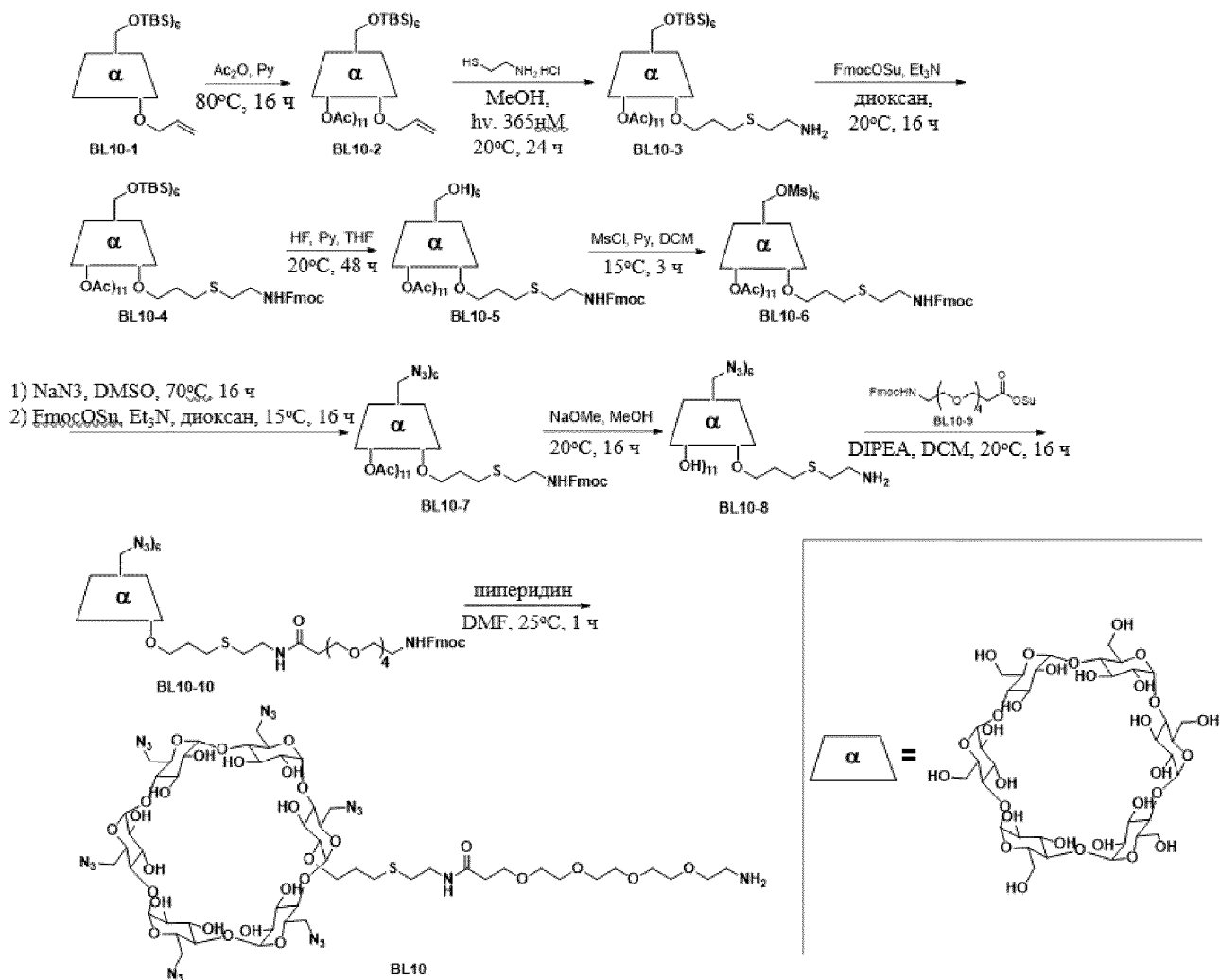


**[0802]** Следуя методике, аналогичной методике получения **BL5**, за исключением замены **BL5-5** на **BL6-5**, получали разветвленный линкер **BL6** (4 мг, выход 55%) в виде бесцветного масла. ESI  $m/z$ : 921.6 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, MeCN<sub>d3</sub>)  $\delta$  6.90 (br s, 3H), 6.83 (br s, 1H), 3.67-3.55 (m, 30H), 3.52 (br t,  $J = 5.6$  Гц, 6H), 3.40-3.32 (m, 10H), 2.95 (br s, 2H), 2.47-2.40 (m, 4H), 2.39-2.32 (m, 12H) ppm.

**[0803]** ПРИМЕР 18: Синтез циклодекстринового линкера **BL10**

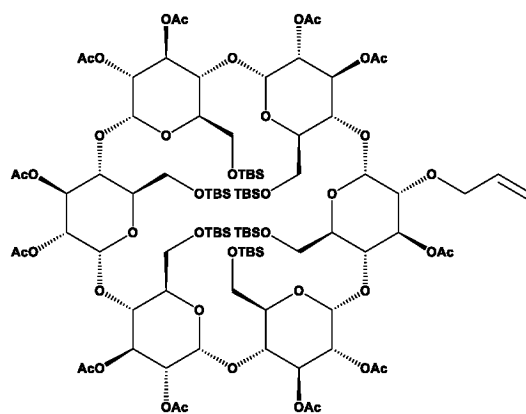
**[0804]** Циклодекстриновый линкер **BL10** синтезировали, как описано на схеме 22 и в примерах 18А-18І ниже.

**Схема 22: Синтез циклодекстринового линкера **BL10****



[0805] Соединение **BL10-1** синтезировали согласно *J. Org. Chem.*, 1995, 60(15), 4786-97.

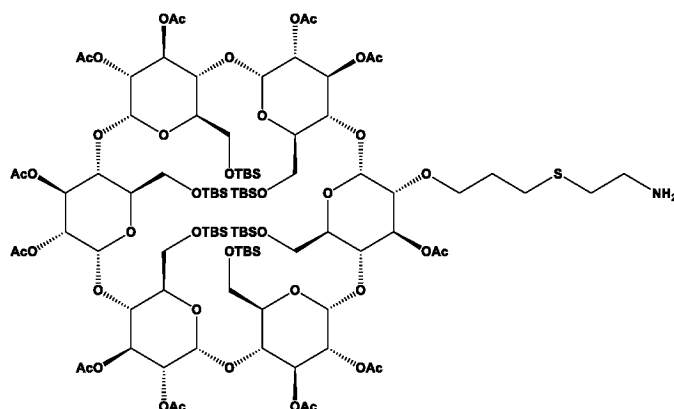
Пример 18А: (1*R*,3*R*,5*R*,6*R*,8*R*,10*R*,11*R*,13*R*,15*R*,16*R*,18*R*,20*R*,21*R*,23*R*,25*R*,26*R*,28*R*,30*R*,31*S*,32*R*,33*S*,34*R*,35*S*,36*R*,37*S*,38*R*,39*S*,40*R*,41*S*,42*R*)-33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-Декакис(ацетилокси)-5,10,15,20,25,30-гексакис( {[*трет*-бутилдиметилсилил]окси}-метил)}-32-(проп-2-ен-1-илокси)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2<sup>3,6</sup>.2<sup>8,11</sup>.2<sup>13,16</sup>.2<sup>18,21</sup>.2<sup>23,26</sup>]дотетраконтан-31-илацетат (**BL10-2**)



(BL10-2)

[0806] К раствору соединения **BL10-1** (0,38 г, 0,22 ммоль) в пиридине (3 мл) добавляли уксусный ангидрид (3 мл) и реакционную смесь перемешивали при 80°C в течение 16 часов. Реакционную смесь концентрировали *в вакууме* и коричневый остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (0-100% этилацетата в петролейном эфире) с получением соединения **BL10-2** (0,41 г, выход 85%) в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.77 (tdd,  $J = 5.7, 10.9, 16.8$  Гц, 1H), 5.57-5.34 (m, 5H), 5.24-4.92 (m, 8H), 4.78-4.60 (m, 5H), 4.30-3.53 (m, 26H), 3.16 (dd,  $J = 2.9, 9.9$  Гц, 1H), 2.15-1.91 (m, 33H), 0.93-0.79 (m, 54H), 0.10-0.03 (m, 36H) ppm.

[0807] Пример 18В: (1*R*,3*R*,5*R*,6*R*,8*R*,10*R*,11*R*,13*S*,15*S*,16*S*,18*S*,20*S*,21*S*,23*S*,25*S*,26*S*,28*R*,30*R*,31*S*,32*R*,33*R*,34*S*,35*R*,36*S*,37*R*,38*S*,39*S*,40*R*,41*S*,42*R*)-33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-Декакис(ацетилокси)-32-{3-[(2-аминоэтил)сульфанил]пропокси}-5,10,15,20,25,30-гексакис({[(*трет*-бутилдиметилсилил)окси]метил})-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2<sup>3,6</sup>.2<sup>8,11</sup>.2<sup>13,16</sup>.2<sup>18,21</sup>.2<sup>23,26</sup>]дотетраконтан-31-илацетат (**BL10-3**)



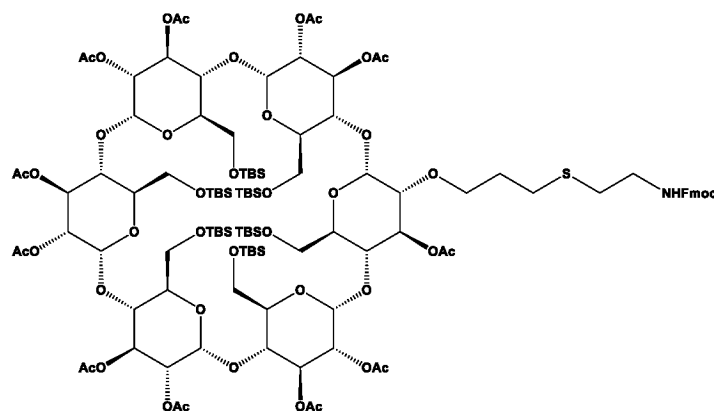
(BL10-3)

[0808] К раствору соединения **BL10-2** (8,2 г, 3,8 ммоль) в метаноле (150 мл) добавляли гидрохлорид цистеина (4,3 г, 38 ммоль), реакционную смесь дегазировали и продували азотом 3 раза и затем перемешивали при 20°C под УФ-облучением ( $\lambda = 365$  нм) в атмосфере азота в течение 24 часов. Затем реакционную смесь концентрировали *в*



*вакууме* и остаток растворяли в DCM (100 мл). Раствор последовательно промывали *насыщ. водн.* хлоридом аммония (30 мл) и водой (30 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле (0-20% метанола в DCM) с получением соединения **BL10-3** (1,5 г, выход 18%) в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{MeOD}_{d4}$ )  $\delta$  5.55-5.28 (m, 6H), 5.20-5.00 (m, 6H), 4.63-4.43 (m, 5H), 4.28-4.15 (m, 4H), 4.14-4.05 (m, 2H), 4.02-3.59 (m, 20H), 3.52-3.41 (m, 1H), 3.32-3.09 (m, 2H), 2.93-2.81 (m, 1H), 2.79-2.68 (m, 1H), 2.54 (br t,  $J=6.7$  Гц, 2H), 2.17-1.94 (m, 33H), 1.87-1.59 (m, 2H), 0.96-0.74 (m, 54H), 0.12-0.08 (m, 36H) ppm.

**[0809]** Пример 18C: (1*R*,3*R*,5*R*,6*R*,8*R*,10*R*,11*R*,13*S*,15*S*,16*S*,18*S*,20*S*,21*S*,23*S*,25*S*,26*S*,28*R*,30*R*,31*S*,32*R*,33*R*,34*S*,35*R*,36*S*,37*R*,38*S*,39*S*,40*R*,41*S*,42*R*)-32,33,34,35,36,37,38,39,40,41-Декакис(ацетилокси)-5,10,15,20,25,30-гексакис({[(*трет*-бутилдиметилсилил)-окси]метил})-42-{3-[(2-{[(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}этил)-сульфанил]пропокси}-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло-[26.2.2.2.<sup>3,6</sup>.2<sup>8,11</sup>.2<sup>13,16</sup>.2<sup>18,21</sup>.2<sup>23,26</sup>]дотетраконтан-31-илацетат (**BL10-4**)

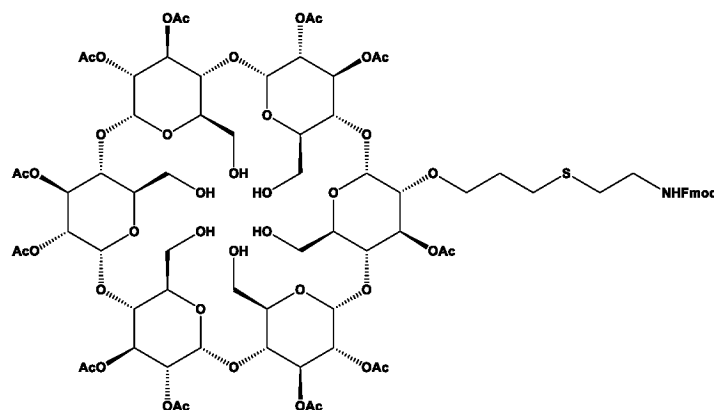


(**BL10-4**)

**[0810]** К раствору соединения **BL10-3** (1,2 г, 0,54 ммоль) в диоксане (20 мл) добавляли FmocOSu (CAS: 82911-69-1) (0,20 г, 0,59 ммоль) и триэтиламин (0,16 г, 1,6 ммоль), и реакционную смесь дегазировали и продували азотом 3 раза, а затем перемешивали при 20°C в течение 16 часов под защитой азота. Полученную смесь разбавляли DCM (100 мл) и последовательно промывали *насыщ. водн.* хлоридом аммония (20 мл) и водой (20 мл). Органический раствор сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (0-10% метанола в DCM) с получением соединения **BL10-4** (1,3 г, выход 99%) в виде белого твердого вещества.  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.72 (d,  $J = 7.6$  Гц, 2H), 7.55 (d,  $J = 7.6$  Гц, 2H), 7.38-7.31 (m, 2H), 7.30-7.23 (m, 2H), 5.52-5.29 (m, 6H), 5.21 (br d,  $J = 8.8$  Гц, 1H), 5.14-4.92 (m, 6H), 4.80-4.55 (m, 5H), 4.34 (br d,  $J = 7.1$  Гц, 2H), 4.25-3.76 (m,

19H), 3.72-3.53 (m, 7H), 3.45-3.25 (m, 3H), 3.08 (dd,  $J = 2.8, 9.9$  Гц, 1H), 2.66-2.43 (m, 4H), 2.11-1.88 (m, 33H), 1.72 (br d,  $J = 4.9$  Гц, 2H), 0.94-0.72 (m, 54H), 0.07-0.06 (m, 36H) ppm.

**[0811]** Пример 18D: (1*R*,3*R*,5*R*,6*R*,8*R*,10*R*,11*R*,13*S*,15*S*,16*S*,18*S*,20*S*,21*S*,23*S*,25*S*,26*S*,28*R*,30*R*,31*S*,32*R*,33*R*,34*S*,35*R*,36*S*,37*R*,38*S*,39*S*,40*R*,41*S*,42*R*)-32,33,34,35,36,37,38,39,40,41-декакис(ацетилокси)-42-{3-[(2-{{(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}-этил)сульфанил]пропокси}-5,10,15,20,25,30-гексакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло-[26.2.2.2<sup>3,6</sup>.2<sup>8,11</sup>.2<sup>13,16</sup>.2<sup>18,21</sup>.2<sup>23,26</sup>]дотетраконтан-31-илацетат (**BL10-5**)

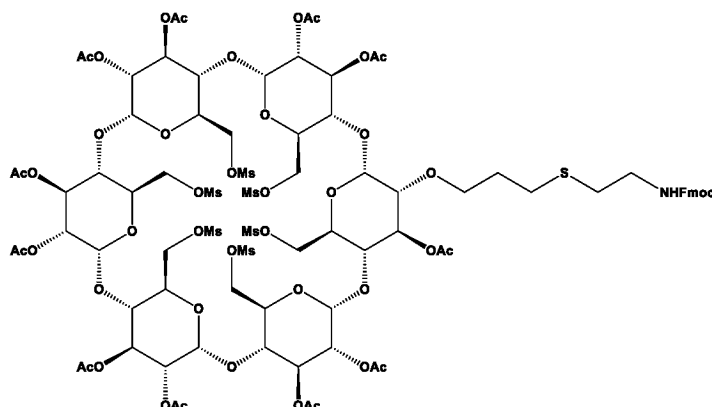


(**BL10-5**)

**[0812]** К раствору соединения **BL10-4** (1,3 г, 0,53 ммоль) в THF (15 мл) и пиридине (15 мл) добавляли гидрофторид пиридина (70%, 3,7 г, 26 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 48 часов. Полученную смесь выливали в насыщ. водн. бикарбонат натрия (100 мл) и затем экстрагировали DCM (100 мл x 2). Объединенный органический раствор сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией на силикагеле (0-15% метанола в DCM) с получением соединения **BL10-5** (0,74 г, выход 75%) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub> + D<sub>2</sub>O) δ 7.74 (d,  $J = 7.6$  Гц, 2H), 7.58 (d,  $J = 7.6$  Гц, 2H), 7.41-7.34 (m, 2H), 7.32-7.25 (m, 2H), 5.53-5.35 (m, 6H), 5.25 (br s, 1H), 5.13-4.93 (m, 6H), 4.86-4.68 (m, 5H), 4.47-4.30 (m, 2H), 4.25-4.15 (m, 1H), 4.11-3.91 (m, 12H), 3.89-3.57 (m, 13H), 3.51 (br s, 1H), 3.36 (br d,  $J = 5.9$  Гц, 2H), 3.28 (br d,  $J = 12.0$  Гц, 1H), 2.69-2.43 (m, 4H), 2.14-1.90 (m, 33H), 1.81-1.64 (m, 2H) ppm

**[0813]** Пример 18E: (1*R*,3*R*,5*R*,6*R*,8*R*,10*R*,11*R*,13*S*,15*S*,16*S*,18*S*,20*S*,21*S*,23*S*,25*S*,26*S*,28*R*,30*R*,31*S*,32*R*,33*R*,34*S*,35*R*,36*S*,37*R*,38*S*,39*S*,40*R*,41*S*,42*R*)-32,33,34,35,36,37,38,39,40,41-Декакис(ацетилокси)-42-{3-[(2-{{(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}-этил)сульфанил]пропокси}-5,10,15,20,25,30-гексакис[(метансульфонилокси)метил]-

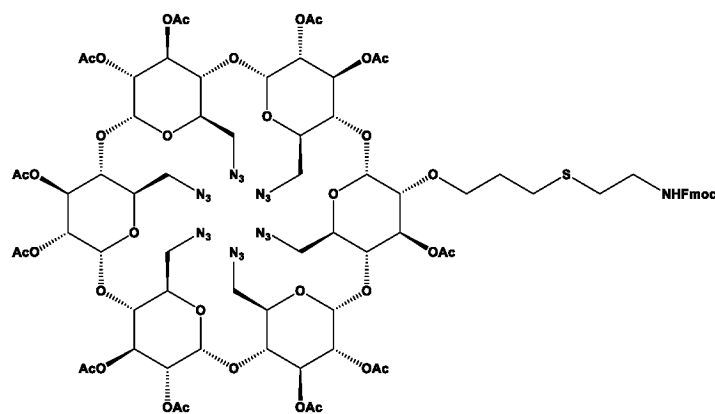
2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло-[26.2.2.2<sup>3,6</sup>.2<sup>8,11</sup>.2<sup>13,16</sup>.2<sup>18,21</sup>.2<sup>23,26</sup>]-  
дотетраконтан-31-илацетат (**BL10-6**)



(**BL10-6**)

[0814] К раствору соединения **BL10-5** (0,10 г, 56 мкмоль) в DCM (2 мл) добавляли метансульфонилхлорид (0,15 г, 1,4 ммоль) и пиридин (0,16 г, 2,0 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при 15°C в течение 3 часов. Полученную смесь выливали в *насыщ. водн.* бикарбонат натрия (10 мл) и экстрагировали DCM (10 мл x 2). Объединенный органический раствор промывали *водн.* гидрохлоридом (1,0 N, 10 мл) и водой (10 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (0-70% этилацетата в DCM) с получением соединения **BL10-6** (98 мг, выход 78%) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.74 (d, *J* = 7.6 Гц, 2H), 7.57 (br d, *J* = 7.3 Гц, 2H), 7.42-7.33 (m, 2H), 7.32-7.25 (m, 2H), 5.56-5.36 (m, 5H), 5.33-5.22 (m, 2H), 5.11-4.95 (m, 6H), 4.91-4.75 (m, 5H), 4.70-4.31 (m, 14H), 4.28-4.13 (m, 6H), 3.93-3.79 (m, 5H), 3.73 (br t, *J* = 9.0 Гц, 1H), 3.63 (br s, 1H), 3.48 (br d, *J* = 9.8 Гц, 1H), 3.36 (br d, *J* = 6.4 Гц, 2H), 3.29-3.17 (m, 2H), 3.15-2.98 (m, 18H), 2.70-2.42 (m, 4H), 2.11-1.90 (m, 33H), 1.81-1.64 (br s, 2H) ppm.

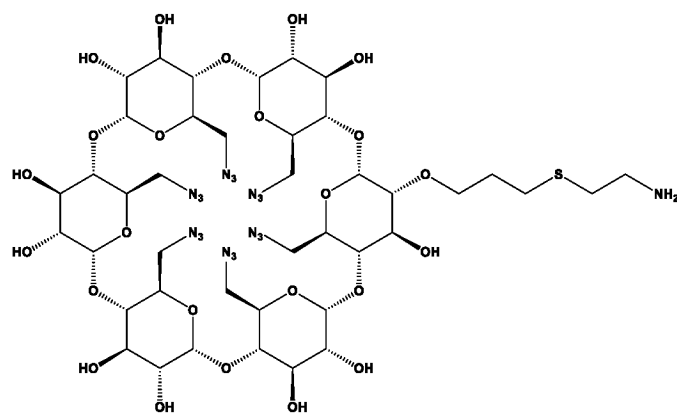
[0815] Пример 18F: (1*R*,3*R*,5*R*,6*R*,8*R*,10*R*,11*R*,13*S*,15*S*,16*S*,18*S*,20*S*,21*S*,23*S*,25*S*,26*S*,28*R*,30*R*,31*S*,32*R*,33*R*,34*S*,35*R*,36*S*,37*R*,38*S*,39*S*,40*R*,41*S*,42*R*)-32,33,34,35,36,37,38,39,40,41-Декакис(ацетилокси)-5,10,15,20,25,30-гексакис(азидометил)-42-{3-[(2-{(9*H*-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}этил)сульфанил]пропокси}-  
2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2<sup>3,6</sup>.2<sup>8,11</sup>.2<sup>13,16</sup>.2<sup>18,21</sup>.2<sup>23,26</sup>]-  
дотетраконтан-31-илацетат (**BL10-7**)



(BL10-7)

[0816] К раствору соединения **BL10-6** (0,33 г, 0,15 ммоль) в сухом DMSO (5 мл) добавляли азид натрия (0,29 г, 4,4 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при 70°C в течение 16 часов. Полученную смесь выливали в воду (20 мл) и экстрагировали DCM (20 мл x 2). Объединенный органический раствор сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали *in vacuo* с получением желтой смолы (0,31 г), которую растворяли в диоксане (3 мл). К раствору добавляли FmocOSu (73 мг, 0,22 ммоль) и триэтиламин (55 мг, 0,55 ммоль), и смесь дегазировали и продували азотом 3 раза перед перемешиванием в атмосфере азота при 15°C в течение 16 часов. Полученную смесь гасили *насыщ. водн.* хлоридом аммония (20 мл) и экстрагировали DCM (10 мл x 2). Объединенный органический раствор сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали *in vacuo*. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (0-3% метанол в DCM) с получением неочищенного продукта (0,17 г) в виде белого твердого вещества, которое дополнительно очищали препаративной TLC (SiO<sub>2</sub>, элюирование 6,25% этанолом в DCM) с получением соединения **BL10-7** (0,13 г, выход 41%) в виде белого твердого вещества. HRMS ESI  $m/z$ : 1924.6212 (M + H)<sup>+</sup> (вычислено 1924.6086), 1946.6057 (M + Na)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.78 (d,  $J = 7.6$  Гц, 2H), 7.60 (br d,  $J = 7.3$  Гц, 2H), 7.45-7.36 (m, 2H), 7.36-7.29 (m, 2H), 5.53-5.35 (m, 5H), 5.28 (br s, 1H), 5.12-4.97 (m, 5H), 4.96-4.74 (m, 6H), 4.40 (br d,  $J = 7.1$  Гц, 2H), 4.24 (br d,  $J = 6.6$  Гц, 1H), 4.12-3.91 (m, 6H), 3.88-3.48 (m, 21H), 3.40 (br d,  $J = 5.9$  Гц, 2H), 3.27 (br dd,  $J = 2.9, 10.0$  Гц, 1H), 2.71-2.47 (m, 4H), 2.11-1.95 (m, 33H), 1.78 (br s, 2H) ppm.

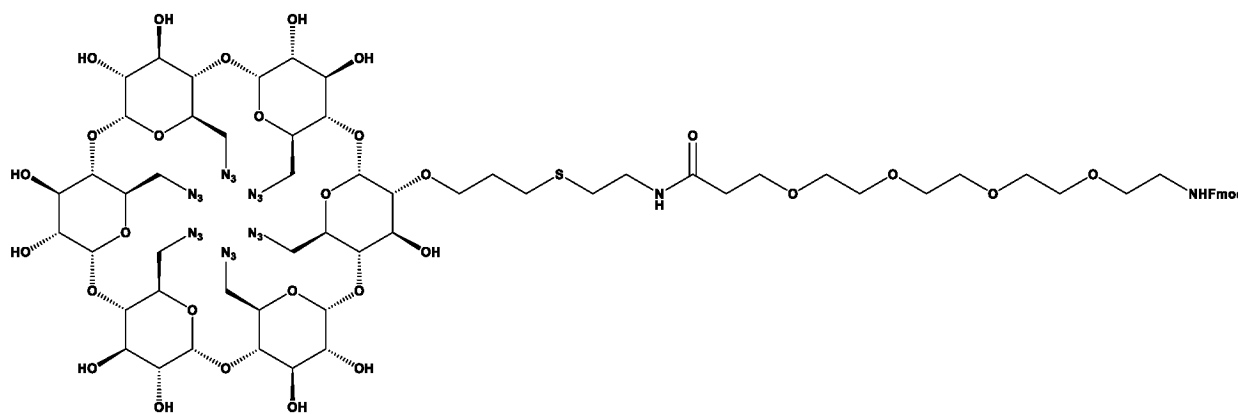
[0817] Пример 18G: (1*S*,3*R*,5*R*,6*S*,8*R*,10*R*,11*S*,13*R*,15*R*,16*S*,18*R*,20*R*,21*S*,23*R*,25*R*,26*S*,28*R*,30*R*,31*R*,32*R*,33*R*,34*R*,35*R*,36*R*,37*R*,38*R*,39*R*,40*R*,41*S*,42*R*)-42-{3-[(2-Аминоэтил)сульфанил]пропокси}-5,10,15,20,25,30-гексакис(азидометил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2<sup>3,6</sup>.2<sup>8,11</sup>.2<sup>13,16</sup>.2<sup>18,21</sup>.2<sup>23,26</sup>]-дотетраконтан-31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41-ундекол (**BL10-8**)



(BL10-8)

[0818] К раствору соединения **BL10-7** (0,11 г, 57 мкмоль) в метаноле (5 мл) добавляли метилат натрия (0,12 г, 2,3 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 16 часов. Полученную смесь нейтрализовали добавлением ионообменной смолы Amberlyst (R) 15 (водородная форма) до pH 6,0. Смесь фильтровали для удаления смолы и фильтрат концентрировали *in vacuo*. Остаток обрабатывали дистиллированной водой (40 мл) и промывали МТВЕ (20 мл x 3). Водную фазу лиофилизировали с получением белого остатка (52 мг), который суспендировали в ацетонитриле (класс AR, 4 мл). Белую суспензию растирали под действием ультразвуковой волне в течение 10 минут, центрифугировали при 5000 об/мин в течение 15 минут и декантировали для сбора белого твердого вещества. Процесс повторяли 3 раза. Полученное белое твердое вещество растворяли в дистиллированной воде (20 мл) и затем лиофилизировали с получением соединения **BL10-8** (34 мг, выход 47%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 1240.5 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>d6</sub> + D<sub>2</sub>O) δ 4.99 (br s, 1H), 4.83 (br s, 5H), 3.76 (br d, J = 10.5 Гц, 7H), 3.70-3.58 (m, 13H), 3.53-3.42 (m, 6H), 3.39-3.24 (m, 12H), 2.91 (br t, J = 6.5 Гц, 2H), 2.66-2.59 (m, 2H), 2.55-2.51 (m, 2H), 1.75-1.60 (m, 2H) ppm.

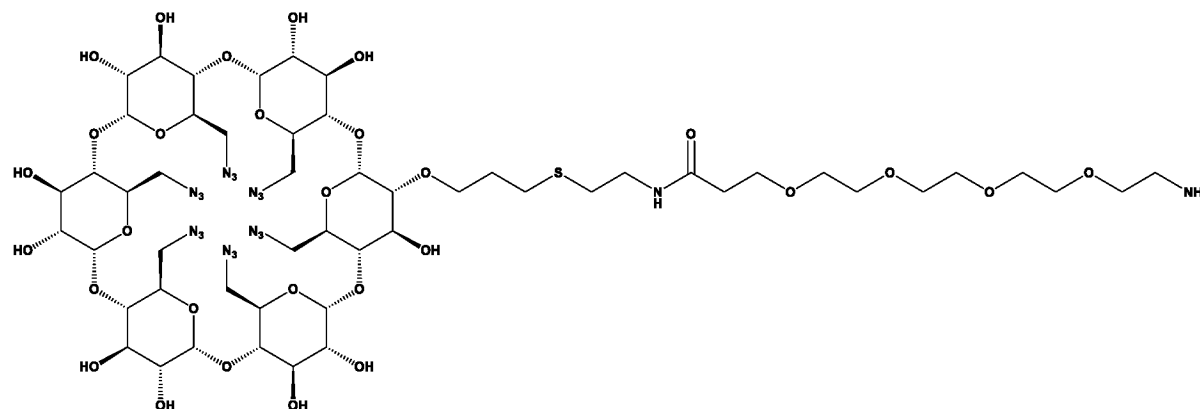
[0819] Пример 18H: 9H-Флуорен-9-илметил *N*-[14-({2-[(3-[(1S,3R,5R,6S,8R,10R,11S,13R,15R,16S,18R,20R,21S,23R,25R,26S,28R,30R,31S,32R,33R,34R,35R,36R,37R,38R,39R,40R,41R,42R)-5,10,15,20,25,30-гексакис(азидометил)-31,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-ундекагидрокси-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2<sup>3</sup>.6.2<sup>8</sup>.11.2<sup>13</sup>.16.2<sup>18</sup>.21.2<sup>23</sup>.26]дотетраконтан-32-ил]окси}-пропил)сульфанил]этил} карбамоил)-3,6,9,12-тетраоксаттрадекан-1-ил]карбамат (**BL10-10**)



(BL10-10)

[0820] К раствору активного сложного эфира **BL10-9** (9,0 мг, 15 мкмоль) и соединения **BL10-8** (19 мг, 15 мкмоль) в DMF (0,3 мл) добавляли DIPEA (6,0 мг, 46 мкмоль), и реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение часа. Полученную смесь дважды очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-70% ацетонитрила в водн. растворе уксусной кислоты (0,5%)) с получением соединения **BL10-10** (6,7 мг, выход 24%) в виде белого твердого вещества. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO<sub>д6</sub> + D<sub>2</sub>O) δ 7.89-7.83 (m, 2H), 7.69-7.60 (m, 2H), 7.44-7.37 (m, 2H), 7.35-7.27 (m, 2H), 5.04 (br s, 1H), 4.86 (br s, 5H), 4.30-4.18 (m, 3H), 3.77-3.76 (m, 20H), 3.61-3.51 (m, 10H), 3.50-3.42 (m, 12H), 3.36 (br d, *J* = 5.8 Гц, 14H), 3.28-3.08 (m, 6H), 2.29 (br t, *J* = 6.4 Гц, 2H), 1.77-1.63 (m, 2H) ppm.

[0821] Пример 18I: 1-Амино- *N*-{2-[(3-{[(1*S*,3*R*,5*R*,6*S*,8*R*,10*R*,11*S*,13*R*,15*R*,16*S*,18*R*,20*R*,21*S*,23*R*,25*R*,26*S*,28*R*,30*R*,31*S*,32*R*,33*R*,34*R*,35*R*,36*R*,37*R*,38*R*,39*R*,40*R*,41*R*,42*R*)-5,10,15,20,25,30-гексакис(азидометил)-31,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-ундекагидрокси-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло-[26.2.2.2<sup>3</sup>,6.2<sup>8</sup>,11.2<sup>13</sup>,16.2<sup>18</sup>,21.2<sup>23</sup>,26]дотетраконтан-32-ил]окси}пропил)сульфанил]этил}-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (**BL10**)



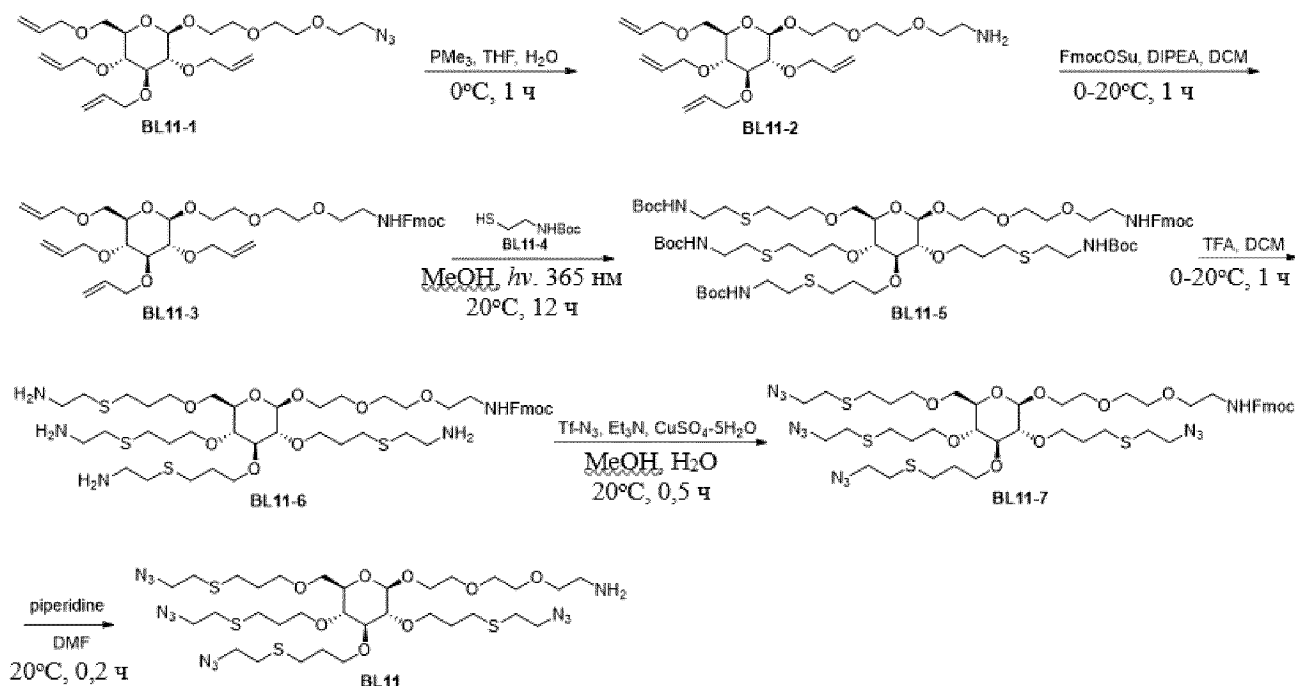
(BL10)

**[0822]** К раствору соединения **BL10-10** (6,7 мг, 3,9 мкмоль) в DMF (0,2 мл) добавляли пиперидин (3,3 мг, 39 мкмоль), и реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение часа до полного удаления Fmoc, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь разбавляли дистиллированной водой (10 мл) и лиофилизировали. Остаточное грязно-белое твердое вещество очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-70% ацетонитрила в водн. уксусной кислоте (0,5%)) с получением циклодекстрин-линкера **BL10** (2,1 мг, выход 36%) в виде белого твердого вещества. ESI m/z: 1488.2 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, MeOD<sub>d4</sub>) δ 5.06 (d, J = 3.2 Гц, 1H), 4.94 (br d, J = 2.4 Гц, 5H), 4.02-3.84 (m, 1H), 4.03-3.72 (m, 21H), 3.71-3.49 (m, 24H), 3.47-3.34 (m, 9H), 3.48 (br s, 1H), 2.99 (t, J = 5.1 Гц, 2H), 2.69-2.61 (m, 4H), 2.47 (t, J = 6.0 Гц, 2H), 1.91-1.84 (m, 2H) ppm.

**[0823]** ПРИМЕР 19: Синтез глюкозного линкера **BL11**

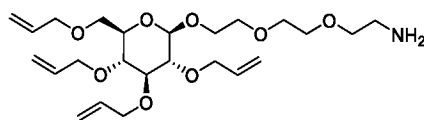
**[0824]** Глюкозный линкер BL11 синтезировали, как описано на схеме 23 и в примерах 19A-19F ниже.

**Схема 23: Синтез глюкозного линкера BL11**



**[0825]** Соединение **BL11-1** синтезировали в соответствии с Org. Biomol. Chem., 2007, 5(21), 3477-3485.

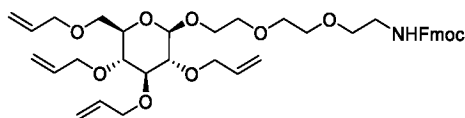
**[0826]** Пример 19A: 2-[2-(2-{\{(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-Трис(проп-2-ен-1-илокси)-6-[(проп-2-ен-1-илокси)метил]оксан-2-ил]окси\}этокси)этокси]этан-1-амин (**BL11-2**)



(BL11-2)

[0827] К раствору соединения **BL11-1** (0,60 г, 1,2 ммоль) в THF (10 мл) и воде (1,5 мл) добавляли триметилфосфин (1М в THF, 1,8 мл, 1,8 ммоль) при 0°C и реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение часа, что контролировали с помощью TLC (элюировали 25% этилацетата в петролейном эфире). Полученную смесь затем выливали в воду со льдом (20 мл) и перемешивали в течение 2 минут. Водную смесь экстрагировали этилацетатом (30 мл x 3). Объединенный органический раствор промывали рассолом (20 мл x 3), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме* с получением неочищенного продукта **BL11-2** (0,55 г, выход 87%) в виде желтого масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ESI  $m/z$ : 472.3 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  6.11-5.82 (m, 4H), 5.34-5.22 (m, 4H), 5.22-5.06 (m, 4H), 4.42-3.96 (m, 10H), 3.76-3.58 (m, 9H), 3.55-3.47 (m, 2H), 3.44-3.29 (m, 3H), 3.27-3.16 (m, 1H), 2.96-2.76 (m, 2H) ppm.

[0828] Пример 19В: 9H-Флуорен-9-илметил *N*-{2-[2-(2-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-трис(проп-2-ен-1-илокси)-6-[(проп-2-ен-1-илокси)метил]оксан-2-ил]окси)этокси)-этокси]этил}карбамат (**BL11-3**)

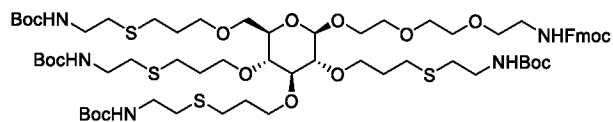


(BL11-3)

[0829] К раствору соединения **BL11-2** (0,50 г, 1,1 ммоль) и DIPEA (0,41 г, 3,2 ммоль) в DCM (5 мл) добавляли порциями FmocOSu (0,43 г, 1,3 ммоль) в атмосфере азота в течение 15 минут при 0°C. Смесь перемешивали при 20°C в течение часа, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь выливали в воду (20 мл) и перемешивали в течение 2 минут. Водную смесь экстрагировали этилацетатом (30 мл x 3). Объединенный органический раствор промывали рассолом (20 мл x 3), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (0-50% этилацетата в петролейном эфире) с получением соединения **BL11-3** (0,55 г, выход 71%) в виде светло-желтого масла. ESI  $m/z$ : 716.3 (M + Na)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.77 (d,  $J = 7.5$  Гц, 2H), 7.61 (d,  $J = 7.5$  Гц, 2H), 7.44-7.37 (m, 2H), 7.35-7.28 (m, 2H), 6.02-5.83 (m, 4H), 5.42 (br s, 1H), 5.31-5.20 (m, 4H), 5.19-5.09 (m, 4H), 4.40-4.01 (m, 12H), 3.75-3.54 (m, 11H), 3.43-3.30 (m, 5H), 3.25-3.15 (m, 1H) ppm.

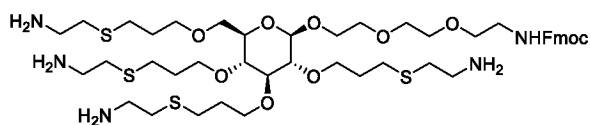


**[0830]** Пример 19C: 9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-{2-[2-(2-{(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-трис({3-[(2-[(*tert*-бутоксикарбонил)амино]этил)сульфанил]пропокси))-6-({3-[(2-[(*tert*-бутоксикарбонил)амино]этил)сульфанил]пропокси}метил)оксан-2-ил)окси}-этокси)этокси]этил}карбамат (**BL11-5**)

**(BL11-5)**

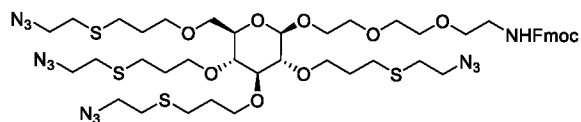
**[0831]** К раствору соединения **BL11-3** (0,20 г, 0,29 ммоль) в метаноле (8 мл), помещенному в кварцевую колбу, добавляли Вос-цистеамин **BL11-4** (1,0 г, 5,8 ммоль). Реакционную смесь дегазировали и продували аргоном в течение 30 минут, а затем перемешивали при 20°C под действием УФ-излучения ( $\lambda = 254$  нм) в атмосфере азота в течение 12 часов, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь концентрировали *in vacuo* и остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (0-80% этилацетата в петролейном эфире) с получением соединения **BL11-5** (0,30 г, выход 67%) в виде желтого масла. ESI *m/z*: 1425,9 ( $M + Na$ )<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.77 (d, *J* = 7.5 Гц, 2H), 7.62 (d, *J* = 7.5 Гц, 2H), 7.44-7.38 (m, 2H), 7.35-7.29 (m, 2H), 5.04 (br s, 3H), 4.40 (br d, *J* = 6.8 Гц, 2H), 4.28-4.20 (m, 2H), 4.02-3.47 (m, 20H), 3.41 (br d, *J* = 4.8 Гц, 2H), 3.35-3.15 (m, 11H), 3.13-3.00 (m, 1H), 2.70-2.54 (m, 15H), 1.94-1.75 (m, 7H), 1.45 (s, 36H) ppm.

**[0832]** Пример 19D: 9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-{2-[2-(2-{(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-трис({3-[(2-аминоэтил)сульфанил]пропокси))-6-({3-[(2-аминоэтил)сульфанил]пропокси}метил)оксан-2-ил)окси}этокси)этокси]этил}карбамат (**BL11-6**)

**(BL11-6)**

**[0833]** К раствору соединения **BL11-5** (0,11 г, 78 мкмоль) в DCM (1,5 мл) добавляли TFA (1,7 г, 15 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение часа до полного удаления Вос, что контролировали с помощью LCMS. Летучие вещества удаляли *in vacuo* с получением неочищенного продукта **BL11-6** (90 мг, выход 93%, соль TFA) в виде масла светло-желтого цвета. ESI *m/z*: 1002,4 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

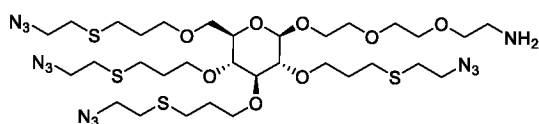
**[0834]** Пример 19E: 9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-{2-[2-(2-{(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-трис({3-[(2-азидоэтил)сульфанил]пропокси))-6-({3-[(2-азидоэтил)сульфанил]пропокси}метил)оксан-2-ил)окси}этокси)этокси]этил}карбамат (**BL11-7**)



(BL11-7)

**[0835]** К раствору соединения **BL11-6** (60 мг, 48 мкмоль, соль TFA) в метаноле (1 мл) и воде (0,5 мл) последовательно добавляли при 20°C пентагидрат сульфата меди (0,48 г, 1,9 мкмоль), триэтиламин (39 мг, 0,39 ммоль) и раствор трифторметансульфонилида (42 мг, 0,24 ммоль) в DCM (5 мл). Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение получаса. За завершением реакции следили с помощью LCMS. Полученную смесь гасили глицином (0,5 г) и перемешивали при 20°C в течение получаса. Смесь фильтровали и фильтрат распределяли между DCM (30 мл) и рассолом (15 мл). Органический раствор сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали *in vacuo* с получением соединения **BL11-7** (50 мг, выход 84%) в виде желтого масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ESI  $m/z$ : 1128.4 (M + Na)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.78 (d,  $J = 7.5$  Гц, 2H), 7.62 (d,  $J = 7.2$  Гц, 2H), 7.44-7.38 (m, 2H), 7.36-7.30 (m, 2H), 5.46-5.40 (m, 1H), 5.38-5.32 (m, 1H), 4.40 (br d,  $J = 6.8$  Гц, 2H), 4.27-4.18 (m, 2H), 4.01-3.35 (m, 31H), 3.23-3.18 (m, 2H), 3.09 (q,  $J = 7.3$  Гц, 5H), 2.68-2.59 (m, 8H), 2.26-2.19 (m, 1H), 2.06-1.97 (m, 2H), 1.92-1.81 (m, 8H) ppm.

**[0836]** Пример 19F: 2-[2-(2-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-трис({3-[(2-азидоэтил)сульфанил]пропокси)})-6-({3-[(2-азидоэтил)сульфанил]пропокси}метил)оксан-2-ил)-окси)этокси)этокси]этан-1-амин (**BL11**)



(BL11)

**[0837]** К раствору соединения **BL11-7** (45 мг, 41 мкмоль) в DMF (0,2 мл) добавляли пиперидин (35 мг, 0,41 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 0,2 часа, что контролировали с помощью LCMS. Полученную смесь концентрировали *in vacuo* и остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (40-60% ацетонитрила в *водн.* муравьиной кислоте (0,225%)) с получением глюкозного линкера **BL11** (18 мг, выход 45%, соль муравьиной кислоты) в виде желтого масла. ESI  $m/z$ : 884.5 (M + H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.52 (s, 1H), 4.26 (d,  $J = 7.8$  Гц, 1H), 4.06-3.97 (m, 1H), 3.95-3.58 (m, 19H), 3.52-3.44 (m, 8H), 3.31-3.17 (m, 3H), 3.12-3.06 (m, 1H), 3.01 (t,  $J = 4.9$  Гц, 2H), 2.78-2.64 (m, 18H), 1.96-1.75 (m, 8H) ppm.

**[0838]** ПРИМЕР 20: Конъюгация ADC

**[0839]** В этом примере продемонстрирован способ сайт-специфической конъюгации в соответствии с вариантом осуществления изобретения, как правило, полезной нагрузки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Этот способ предусматривает двухстадийный процесс, показанный на **фигуре 2**. Первая стадия представляет собой опосредованное микробной трансглутаминазой (MTG) присоединение линкера 1 (L1-V'), такого как бис-азидо-алкиламещенный амин (**BL7**) или азид-PEG<sub>3</sub>-амин (**AL1**), к антителу, при этом использовали избыток аминного реагента, чтобы избежать потенциального перекрестного связывания цепей антитела. На второй стадии соединение алкин-связанный линкер-полезная нагрузка (**L2P**) присоединяли к N<sub>3</sub>-меченому конъюгату посредством азид-алкинового циклоприсоединения, стимулируемого напряжением (SPAAC). Количество молекул **L2P**, добавляемых к антителу, зависит от числа сайтов конъюгации и количества азидных функциональных групп (n) в пределах L<sub>1</sub> (**AL**, n=1; **BL**, n ≥ 2). Для антител с доменом Fc дикого типа (WT), которые были ферментативно дегликозилированы или имеют мутацию N297D в Fc, и затем азидо-функционализированы линкерами AL или BL, ожидаемое значение DAR = 2 × n × m, где n представляет собой количество азидных функциональных групп V' на каждом линкере L<sub>1</sub>, и m представляет собой количество полезных нагрузок **L2P**, соответственно. Для антител с мутацией N297Q в Fc, затем азидо-функционализированных линкерами AL или BL, ожидаемое значение DAR = 4 × (n) × (m).

**[0840]** В **таблице 16** в обобщенном виде представлены все исходные антитела (Ab), азидо-функционализированные антитела, содержащие 2, 4 или 8 азидогрупп (Ab-(N<sub>3</sub>)<sub>n</sub>), конечные ADC, созданные в качестве конкретных примеров, и соответствующие соединения линкер-полезная нагрузка (L<sub>2P</sub>), а также результаты их ES-MS и значения DAR для ADC.

**Таблица 16: Антитела, соединения антитело-линкеры и ADC в соответствии с вариантом осуществления изобретения**

Тест. соед.	Описание антитела	Сайт конъюгации	Модификация		DAR по данным ESI-MS	ESI-MS (m/z)
			AL, BL, LP #	MW (г/моль)		
<b>1</b>	Анти-HER2		Нет	NA	NA	145122 (degly)
<b>2</b>	Анти-HER2	Q295	[AL1] <sub>2</sub>	218,3	2	145519
<b>3</b>	Анти-HER2	Q295	[AL1-LP1] <sub>2</sub>	1614,8	2	148330
<b>4</b>	Изотип		Нет	NA	NA	145443
<b>5</b>	Изотип	Q295	[AL1] <sub>2</sub>	218,3	2	145823

6	Изотип	Q295	[AL1-LP1] <sub>2</sub>	1614,8	2	148619
7	Анти-HER2		Нет	NA	NA	145139
8	Анти-HER2	Q295, Q297	[AL1] <sub>4</sub>	218,3	4	145943
9	Анти-HER2	Q295, Q297	[BL7] <sub>4</sub>	325,4	4	146372
10	Анти-HER2	Q295, Q297	[AL1-LP1] <sub>4</sub>	1614,8	4	151544
11	Анти-HER2	Q295, Q297	[BL7-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	3118,4	8	157557
12	Анти-STEAP2		Нет	NA	NA	144006
13	Анти-STEAP2	Q295, Q297	[AL1] <sub>4</sub>	218,3	4	144787
14	Анти-STEAP2	Q295, Q297	[BL7] <sub>4</sub>	325,4	4	145208
15	Анти-STEAP2	Q295, Q297	[AL1-LP1] <sub>4</sub>	1614,8	4	150364
16	Анти-STEAP2	Q295, Q297	[BL7-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	3118,4	8	156381
17	Изотипический контроль		Нет	NA	NA	145451
18	Изотипический контроль	Q295, Q297	[AL1] <sub>4</sub>	218,3	4	146245
19	Изотипический контроль	Q295, Q297	[BL7] <sub>4</sub>	325,4	4	146678
20	Изотипический контроль	Q295, Q297	[AL1-LP1] <sub>4</sub>	1614,8	4	151849
21	Изотипический контроль	Q295, Q297	[BL7-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	3118,4	8	157863

ESI-MS следует аппроксимировать в соответствии со следующим:

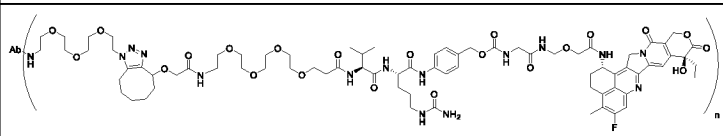
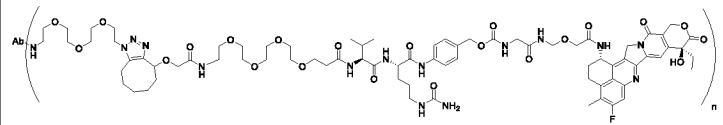
для азидо-функционализированных антител (т.е. без LP1);  $MW = MW_{Ab} + (\#Сайтов конъюгации)(MW_{L1} - 18)$ ;

для ADC;  $MW = MW_{Ab} + (\#Сайтов конъюгации)(MW_{L1} - 18) + (DAR)(MW_{LP1})$

$MW_{AL1} = 218,3$  г/моль,  $MW_{BL7} = 325,4$  г/моль,  $MW_{LP1} = 1396,5$  г/моль

**[0841]** В таблице 17 ниже представлены структуры ADC, образованных с использованием двухстадийных способов в соответствии с настоящим изобретением.

**Таблица 17: Структуры ADC в соответствии с настоящим изобретением**

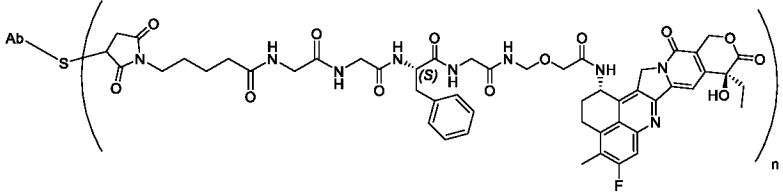
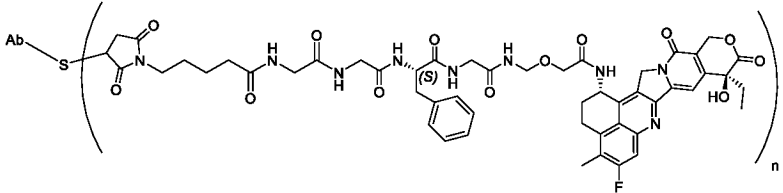
Тест. преп	Ab	Сайт конъюгации	Мод./Опис.	Структура модификации	DAR
3	Анти-HER2	Q295	[AL1-LP1] <sub>2</sub> (Азидо)		2
6	Изотип	Q295	[AL1-LP1] <sub>2</sub> (Азидо)		2

10	Анти-HER2	Q295 Q297	[AL1-LP1] <sub>4</sub> (Азидо)		4
11	Анти-HER2	Q295 Q297	[BL7-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub> (Разветвл. азидо)		8
BIS1 BIS2	Анти-HER2/ HER2 биспецифич	Q295	[BL7-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub> (Разветвл. азидо)		
15	Анти-STEAP2	Q295 Q297	[AL7-LP1] <sub>4</sub> (Азидо)		4
16	Анти-STEAP2	Q295 Q297	[BL7-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub> (Разветвл. азидо)		8
20	Изотип. контр.	Q295 Q297	[AL1-LP1] <sub>4</sub> (Азидо)		4
21	Изотип. контр.	Q295 Q297	[BL7-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub> (Разветвл. азидо)		8

[0842] В таблице 18 ниже представлены структуры ADC, образованных с использованием способов конъюгации цистеина, для целей сравнения.

Таблица 18: Структуры ADC сравнения

Ab	Мод./опис.	Сайт конъюг.	Структура модификации	DAR
----	------------	--------------	-----------------------	-----

22	Анти-HER2	GGFG-DxD	Cys		7,4-8,4
23	Изотип. контр.	GGFG-DxD	Cys		6,9-7,5

**[0843]** Пример 20А: Стадия 1: изготовление сайт-специфического конъюгата азидо-функционализированное антитело-лекарственное средство, содержащего 2, 4 или 8 азидогрупп (см. **таблицу 19**).

**[0844]** Анти-HER2 антитело IgG человека, содержащее мутацию N297Q, или изотипическое контрольное антитело смешивали со 150 молярными эквивалентами азидо-PEG3-амин (AL1, MW 218,26 г/моль) или бис-азидо-алкилзамещенного амина (BL7, MW 325,38 г/мол). Полученный раствор смешивали с трансклутаминазой (25 Ед/мл; 1 Ед mTG на мг антитела, Zedira, Darmstadt, Germany), в результате чего конечная концентрация антитела составила 1-20 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали при 25-37°C в течение 4-24 часов при осторожном встряхивании под контролем ESI-MS. По завершении избыток амина и mTG удаляли эксклюзионной хроматографией (SEC) или колоночной хроматографией с белком А. Конъюгат характеризовали с помощью UV-Vis, SEC и ESI-MS. Антитело с присоединенными азидо линкерами привело к увеличению массы на 804 Да или 1232 Да для конъюгата с DAR=4 с AL1 и BL7, соответственно. Чистота мономеров конъюгатов составила >99% по данным SEC.

**[0845]** Пример 20В: Стадия 2: изготовление сайт-специфических конъюгатов из **таблицы 19** с помощью реакций 1,3-циклоприсоединения («click») между азидо-функционализированными антителами и соединениями алкин-содержащий линкер-полезные нагрузки.

**[0846]** Сайт-специфический конъюгат антитело-лекарственное средство получали путем инкубации азидо-функционализированного антитела (1-20 мг/мл) в PBS (pH 7,4) с  $\geq 6$  молярными эквивалентами соединения линкер-полезная нагрузка, растворенного в органическом растворителе, таком как DMSO или DMA (10 мг/мл), с получением реакционной смеси, содержащей 5-15% органического растворителя (об./об.), при 25-

37°C в течение 1-48 часов при осторожном встряхивании. Реакцию контролировали с помощью ESI-MS. По завершении избыточное количество соединения линкер-полезная нагрузка и белковых агрегатов удаляли эксклюзионной хроматографией (SEC). Очищенный конъюгат концентрировали, стерильно фильтровали и характеризовали с помощью UV-Vis, SEC и ESI-MS. Чистота мономеров конъюгатов составила >99% по данным SEC.

**[0847]** Пример 20C: Получение анти-HER2 Ab-[AL1-LP1]<sub>4</sub> и анти-HER2 Ab-[(BL7)-(LP1)<sub>2</sub>]<sub>4</sub>

**[0848]** В конкретном примере, показанном на **фигуре 4A**, агликозилированное анти-HER2 антитело IgG человека, содержащее мутацию N297Q, смешивали со 150 молярными эквивалентами бис-азидо-алкилзамещенного амина (**BL7**, MW 325,38 г/моль). Полученный раствор смешивали с микробной трансглутаминазой (25 Ед/мл; 1 Ед мTG на мг антитела, Zedira, Darmstadt, Germany), в результате чего конечная концентрация антитела составила 8,6 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 22 часов при осторожном встряхивании под контролем ESI-MS. По завершении избыток амина и мTG удаляли эксклюзионной хроматографией (SEC). Конъюгат характеризовали с помощью UV-Vis, SEC и ESI-MS. Антитело с присоединенными азидо линкерами привело к увеличению массы на 1232 Да для конъюгата с DAR=4. Сайт-специфический конъюгат антитело-азидо (8,6 мг/мл) в PBS (pH 7,4) смешивали с 20 молярными эквивалентами соединения линкер-полезная нагрузка (**LP1**) в 10 мг/мл DMA с получением реакционной смеси, содержащей 12% органического растворителя (v/v), и раствор выдерживали при 32°C в течение 36 часов при осторожном встряхивании. Реакцию контролировали с помощью ESI-MS. По завершении избыточное количество соединения линкер-полезная нагрузка и белковых агрегатов удаляли эксклюзионной хроматографией (SEC). Очищенный конъюгат концентрировали, стерильно фильтровали и характеризовали с помощью UV-Vis, SEC и ESI-MS. Чистота мономеров конъюгатов составила 99,8% по данным SEC. Антитело с присоединенным лекарственным средством привело к увеличению массы на 11185 Да для конъюгата с DAR=8.

**[0849]** ПРИМЕР 20D: Получение конъюгатов анти-HER2/HER2 биспецифическое антитело-лекарственное средство BIS1 и BIS2 - Ab-[(BL7)-(LP1)<sub>2</sub>]<sub>4</sub>

**[0850]** Два конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащие анти-HER2 биспецифическое антитело, где антитело связывается с двумя различными эпитопами HER2, синтезировали в условиях, сходных условиями, описанными выше в примерах

18A-18C, с образованием BIS1 и BIS2 (**таблица 20**). Каждое из двух биспецифических антител (анти-HER2/HER2 Ab1 и анти-HER2/HER2 Ab2) имеет два связывающих домена, связывающих отдельные эпитопы HER2. В этом примере антитела подвергали ферментативному дегликозилированию для осуществления сайт-специфической азидо-функционализации у двух остатков глутамина Q295 в области Fc тяжелой цепи линкером BL7 в соответствии с методикой, описанной выше. Наблюдаемое значение DAR (на основе цитотоксического агента) для двух конъюгатов биспецифическое антитело-лекарственное средство BIS1 и BIS2 представлено в **таблице 20**.

**Таблица 20. Значения DAR для конъюгатов антитело-лекарственное средство**

	ADC	DAR (по данным ESI-MS)
BIS1	Анти-HER2/HER2 Ab1-[(BL7)-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	5,2
BIS2	Анти-HER2/HER2 Ab2-[(BL7)-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	3,8

**[0851]** ПРИМЕР 21: Конъюгация ADC: Три подхода

**[0852]** Сайт-специфические конъюгации ADC на сайтах Q295/297 антител с образованием ADC с DAR4-DAR24 показаны на **фигуре 5**, и на сайтах Q295 антител с образованием ADC с DAR2-DAR12 показаны на **фигуре 6**. В настоящем изобретении представлены три иллюстративных подхода к присоединению соединений разветвленный линкер-полезные нагрузки к сайтам Q295/297 антител.

**[0853]** Подходы I и II включают двухстадийный процесс конъюгаций антитело-лекарственное средство. Первой стадией является опосредованное микробной трансглутаминазой (MTG) присоединение низкомолекулярного амина, например, **AL1** или **BL2**, к сайтам mAb-Q, при этом избыток аминного реагента используется для того, чтобы избежать потенциального перекрестного связывания цепей антител (WO2017/147542, полностью включенный в настоящий документ посредством ссылки). Второй стадией является присоединение соединения алкин-связанный линкер-полезная нагрузка (**L<sub>2</sub>P**) к N<sub>3</sub>-меченому конъюгату посредством, например, азид-алкинового циклоприсоединения, промотируемого напряжением (SPAAC, также известного как безмедная клик-химия). Когда реакционноспособная группа (RG) представляет собой фрагмент DIBAC или COT, конъюгацию осуществляют с азидо-функционализированным антителом посредством [2+3]-циклоприсоединения. Этот процесс обеспечивает образование сайт-специфических и стехиометрических конъюгатов. Количество молекул **L<sub>2</sub>P**, добавляемых к антителу, зависит от числа



сайтов конъюгации и количества азидных функциональных групп ( $n$ ) в пределах  $L_1$  (например, для  $AL$   $n=1$ ; для  $BL$   $n \geq 2$ ).

**[0854]** Подход I заключается в конъюгации низкомолекулярного аминного линкера  $L_1$  (например,  $AL_1$ ) с сайтами Q295/297 антител с образованием конъюгата антитело-азидо метка ( $Ab-N_3$ ), который затем ковалентно реагирует (например, посредством «клик» циклоприсоединения) с соединением алкин-связанный линейный линкер-полезная нагрузка ( $LL_2P$ ) с образованием ADC с 4DAR (способ A на **фигуре 5**) и с соединением алкин-связанный разветвленный линкер-полезная нагрузка ( $BL_2P$ ) с образованием ADC с 8DAR (способ B на **фигуре 5**).

**[0855]** Подход II заключается в конъюгации низкомолекулярного разветвленного азидо-амин (например,  $BL_2$ ) с сайтами Q295/297 антител с образованием соединения антитело-разветвленный линкер-азидо метка ( $Ab$ -ветвь- $2N_3$ ), которое затем ковалентно реагирует (например, путем «клик» циклоприсоединения) с соединением линейный линкер-полезная нагрузка с образованием ADC с 8DAR (способ C на **фигуре 5**), и с соединением алкин-связанный разветвленный линкер2-полезная нагрузка с образованием ADC с 16DAR, или с соединением разветвленный связанный линкер3-полезная нагрузка с образованием ADC с 24DAR (способ D на **фигуре 5**). Аналогично, сайт-специфические конъюгации ADC на сайтах Q295 антител с соединением линейный или разветвленный линкер-полезная нагрузка могут приводить к образованию ADC с DAR2-DAR12 (**фигура 6**).

**[0856]** В конъюгациях подхода III опосредованное MTG присоединение соединения амин-разветвленный линкер-полезная нагрузка к сайтам Q295/297 антител было достигнуто с использованием  $\geq 20$  молярных эквивалентов аминовых реагентов в одностадийной MTG-опосредованной реакции.

**[0857]** Для антител с доменом Fc дикого типа (WT), которые были ферментативно дегликозилированы или имеют мутацию N297D в Fc, и затем азидо-функционализованы линкерами AL или BL, ожидаемое значение DAR на азидо-метку на  $2 Fc = 2n$ . Для антител с мутацией N297Q в Fc, которые были азидо-функционализованы линкерами AL или BL, ожидаемое значение DAR на азидо-метку на  $2 Fc = 4n$ . Для антител, конъюгированных с каждым соединением линкер-полезная нагрузка, имеющим  $m$  х полезная нагрузка ( $P_m$ ), ожидаемое значение ADC-DAR =  $(2n \times m)$  для N297D мутантных антител (**фигура 6**) и  $(4n \times m)$  для N297Q мутантных антител (**фигура 5**).

**[0858]** Все ADC, конъюгированные путем двухстадийных конъюгаций (способы А, В, С, D на **фигуре 5**), приведены в обобщенном виде в **таблице 21**, и ADC, конъюгированные путем одностадийных конъюгаций (способы Е на **фигуре 5**), приведены в обобщенном виде в **таблице 22**.

**[0859]** Общие методики изготовления сайт-специфических конъюгатов в две стадии

**[0860]** Пример 21А: Стадия 1: изготовление сайт-специфического конъюгата азидо-функционализированное антитело-лекарственное средство, содержащего 2, 4 или 8 азидогрупп.

**[0861]** Агликозилированное человеческое антитело IgG (IgG1, IgG4 и т.д.), содержащее мутацию N297Q или мутацию N297D, в буфере ВурН (рН 7,4) смешивали с  $\geq 150$  молярными эквивалентами азидо-PEG3-амин (AL1) или бис-азидо-алкилзамещенного амина (BL2). Полученный раствор смешивали с трансклутаминазой (25 Ед/мл; 1 Ед mTG на мг антитела, Zedira, Darmstadt, Germany; или 10 Ед/мл; 5,5 Ед MTG на мг антитела, Modernist Pantry-ACTIVA TI содержит мальтодекстрин от Ajinomoto, Japan) с получением конечной концентрации антитела 0,5-20 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали при 25-37°C в течение 24 часов при осторожном встряхивании под контролем ESI-MS. По завершении избыток амина и mTG удаляли эксклюзионной хроматографией (SEC) или колоночной хроматографией с белком А. Конъюгат характеризовали с помощью UV-Vis, SEC и ESI-MS. Азидо линкеры, присоединенные к антителу, привели к увеличению массы на 804 Да или 1232 Да для конъюгатов с 4DAR с AL1 и BL2, соответственно, и к увеличению на 2768 Да для конъюгата с 8DAR антитело-BL2-(азид)<sub>8</sub>. Чистота мономеров конъюгатов составила >99% по данным SEC.

**[0862]** Пример 21В: Стадия 2: изготовление сайт-специфических конъюгатов посредством [2+3] клик-реакций между азидо-функционализированными антителами и соединением алкин-содержащий линкер-полезная нагрузка.

**[0863]** Сайт-специфический конъюгат антитело-лекарственное средство с человеческим IgG (IgG1, IgG4 и т.д.) получали с помощью [2+3] азид-алкин «клик» реакции между азидо-функционализированным антителом и соединением алкин-функционализированный линкер-полезная нагрузка. Азидо-функционализированное антитело (1-20 мг/мл) в PBS (рН 7,4) инкубировали с  $\geq 6$  молярными эквивалентами соединения линкер-полезная нагрузка (LP), растворенного в органическом растворителе, таком как DMSO или DMA (10 мг/мл), с получением реакционной смеси, содержащей 5-15% органического растворителя (об./об.), при 25-37°C в течение 1-48 часов при осторожном встряхивании. Реакцию контролировали с помощью ESI-MS. По

завершении избыточное количество LP и органического растворителя удаляли на обессоливающей колонке с ВирН (рН 7,4), и белковые агрегаты (при их наличии) удаляли эксклюзионной хроматографией (SEC). Очищенный конъюгат концентрировали, стерильно фильтровали и характеризовали с помощью UV-Vis, SEC и ESI-MS. Чистота мономеров конъюгатов составила >99% по данным SEC.

**[0864]** Пример 21C: Репрезентативный ADC с 8DAR из подхода I проиллюстрирован на примере ADC Ab-LP39 (**фигура 7A**).

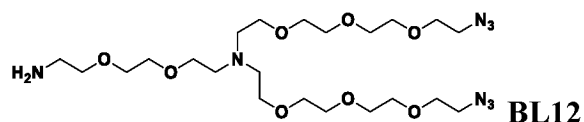
**[0865]** Агликозилированное анти-Her2 антитело IgG человека, содержащее мутацию N297Q, смешивали с >200 молярными эквивалентами азидо-dPEG3-амин (AL1, молекулярная масса 218,26 г/моль). Полученный раствор смешивали с микробной трансглутаминой (10 Ед/мл; 5,5 Ед mTG на мг антитела, Modernist Pantry-ACTIVA TI содержит мальтодекстрин производства Ajinomoto, Japan) с получением конечной концентрации антитела 5 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 24 часов при осторожном встряхивании под контролем ESI-MS. По завершении избыток амина и mTG удаляли эксклюзионной хроматографией (SEC). Конъюгат характеризовали с помощью UV-Vis, SEC и ESI-MS. Азидо линкеры, присоединенные к антителу, привели к увеличению массы на 808 Да, что указывает на то, что 4 AL1 с 4 азидо-метками были конъюгированы с антителом (Ab-4AL1). Этот сайт-специфический конъюгат антитело-азидо (2,1 мг/мл) в PBS (рН 7,4) смешивали с 15 молярными эквивалентами соединения линкер-полезная нагрузка (LP39) в 2 мМ DMSO с получением реакционной смеси, содержащей 5% органического растворителя (об./об.), и раствор выдерживали при 32°C в течение 36 часов при осторожном встряхивании. Реакцию контролировали с помощью ESI-MS. По завершении избыточное количество соединения линкер-полезная нагрузка и белковых агрегатов удаляли эксклюзионной хроматографией (SEC). Очищенный конъюгат концентрировали, стерильно фильтровали и характеризовали с помощью UV-Vis, SEC и ESI-MS. Чистота мономеров конъюгата составила 99,8% по данным SEC. Лекарственное средство, присоединенное к антителу, привело к увеличению массы на 11003 Да для конъюгата с DAR8, что указывает на то, что 8 LP были конъюгированы с антителом.

**[0866]** Пример 21D: Репрезентативный ADC с 8DAR из подхода I проиллюстрирован на примере ADC Ab-LP22 (**фигура 7B**).

**[0867]** Агликозилированное анти-Her2 антитело IgG человека, содержащее мутацию N297Q, смешивали с >200 молярными эквивалентами BL2 (ММ=708,8 г/моль).

Полученный раствор смешивали с микробной трансглутаминазой (10 Ед/мл; 5,5 Ед mTG на мг антитела, Modernist Pantry-АСТИВА ТI содержит мальтодекстрин производства Ajinomoto, Japan) с получением конечной концентрации антитела 5 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 24 часов при осторожном встряхивании. По завершении избыток амина и MTGase удаляли эксклюзионной хроматографией (SEC). Конъюгат характеризовали с помощью UV-Vis, SDS-PAGE, SEC и ESI-MS. Чистота мономеров конъюгата составила 96,11% по данным SEC. Азидо линкеры, присоединенные к антителу, привели к увеличению массы на 2768 Да, что указывает на то, что 4 **BL2** были конъюгированы с антителом (**Ab-2BL2**) с 8 азидо-метками. Сайт-специфический конъюгат антитело-азидо (1,492 мг/мл) в ВурН (рН 7,4) смешивали с 15 молярными эквивалентами соединения линкер-полезная нагрузка (**LP22**) в 2 мМ DMSO с получением реакционной смеси, содержащей 5% органического растворителя (об./об), и раствор выдерживали при 25°C в течение 72 часов при осторожном встряхивании. Реакцию контролировали с помощью SDS-PAGE. По завершении избыточное количество соединения линкер-полезная нагрузка удаляли с помощью обессоливающей колонки с ВурН (рН 7,4). Лекарственное средство, присоединенное к конъюгату антитела, показало увеличение массы на 12200 Да для конъюгата с DAR8, что указывает на то, что 8 LP были конъюгированы с антителом.

**[0868]** Иллюстративный разветвленный азидный реагент **BL12**, используемый в конъюгации в подходе II, изображен ниже.



**[0869]** Пример 21E: Общие методики изготовления сайт-специфических конъюгатов в одну стадию

**[0870]** Агликозилированное человеческое антитело IgG (IgG1, IgG4 и т.д.) в буфере ВурН (рН 7,4) смешивали с 15-30 молярными эквивалентами соединения аминоклинкер-полезная нагрузка. Полученный раствор смешивали с MTG (Modernist Pantry-АСТИВА ТI содержит мальтодекстрин производства Ajinomoto, Japan) (10 Ед/мл; 5,5 Ед MTG на мг антитела) с получением конечной концентрации антитела 0,5-5 мг/мл, и затем раствор инкубировали при 37°C в течение 24 часов при осторожном встряхивании. По завершении реакции избыток амина и MTG удаляли эксклюзионной хроматографией (SEC) с получением непосредственно конъюгированного ADC линкер-

полезная нагрузка. Этот продукт концентрировали ультрацентрифугированием и характеризовали с помощью SDS-PAGE, SEC и LC-MS. Результаты MS ADC показали дополнительное увеличение массы 4 x LP конъюгата, что указывает на ADC с 4DAR, или дополнительное увеличение массы 8 x LP конъюгата, что указывает на ADC с 8DAR.

**[0871]** Пример 21F: Репрезентативный ADC с 4DAR из подхода III, проиллюстрированный на примере ADC Ab-LP21, который был конъюгирован в результате одностадийной конъюгации антитела с соединением линейный линкер-полезная нагрузка (**фигура 7C**).

**[0872]** В конкретном примере агликозилированное антитело (1 мг) в 0,5 мл БуpH (pH 7,4) обрабатывали 30 молярными эквивалентами LP08 (конц. 20 mM в DMSO). Полученный раствор смешивали с MTG (Modernist Pantry-ACTIVA TI содержит мальтодекстрин производства Ajinomoto, Japan) (10 Ед/мл; 5,5 Ед MTG на мг антитела) с получением конечной концентрации антитела 5 мг/мл, и раствор затем инкубировали в течение 24 часов при 37°C при осторожном встряхивании. По завершении реакции избыток соединения линкер-полезная нагрузка (LP) удаляли эксклюзионной хроматографией (SEC, Superdex® 200 Increase 10/300 GL). Этот продукт концентрировали ультрацентрифугированием и характеризовали с помощью SDS-PAGE, SEC и LC-MS. Чистота мономеров конъюгата составила 98,8% по данным SEC. Соединение amino-линкер-полезная нагрузка добавляли к четырем сайтам антитела, что привело к увеличению на 5380 Да для конъюгата антитело-LP с 4DAR.

**[0873]** Пример 21G: Репрезентативный ADC с 8DAR из подхода III, проиллюстрированный на примере ADC Ab-LP27 (**фигура 7C**), который был образован в результате одностадийной конъюгации антитела с соединением разветвленный линейный линкер-полезная нагрузка

**[0874]** Используя тот же способ, который описан для одностадийной конъюгации для изготовления ADC с 4DAR (пример 21F), соединение amino-разветвленный линкер-полезная нагрузка (LP27) конъюгировали с четырьмя сайтами антитела, что привело к увеличению на 10187,2 Да для конъюгата с 8DAR.

**Таблица 21. ADC, конъюгированные за две стадии (способы A, B, C, D на фигуре 5) для нацеливания на Her2, FGFR2 и несвязывающийся контроль**

Линкер-полезная нагрузка		ADC		
LP#	Название	# кода ADC	DAR	SKBR3 EC <sub>50</sub> (nM)
	Нет	Анти-Her2		NA

	Her	Анти-Her2-AL1		NA
	Her	Анти-Her2-BL2		NA
LP9	COT-GGFG-NHCH2-Dxd	Анти-Her2-AL1-LP9	4,00	0,61
LP4	DIBAC-GGFG-NHCH2-Dxd	Анти-Her2-AL1-LP4	3,68	0,60
LP3	COT-GGGG-NHCH2-Dxd	Анти-Her2-AL1-LP3	-	-
LP1	COT-PEG4-vcPAB-G-NHCH2-Dxd	Анти-Her2-AL1-LP1	4,00	0,38
LP1	COT-PEG4-vcPAB-G-NHCH2-Dxd	Контроль-AL1-LP1	4,00	285,97
LP1	COT-PEG4-vcPAB-G-NHCH2-Dxd	Анти-Her2-BL2-LP1	8,00	0,38
LP2	DIBAC-PEG4-vcPAB-G-NHCH2-Dxd	Анти-Her2-AL1-LP2	4,00	0,40
LP2	DIBAC-PEG4-vcPAB-G-NHCH2-Dxd	Контроль -AL1-LP2	4,00	>500,00
LP20	COT-PEG4- <sup>D</sup> EvcPAB-G-NHCH2-Dxd	Анти-Her2-AL1-LP20	4,00	0,36
LP20	COT-PEG4- <sup>D</sup> EvcPAB-G-NHCH2-Dxd	Контроль -AL1-LP20	4,00	182,57
LP22	COT-PEG4- <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH2-Dxd	Анти-Her2-AL1-LP22	3,97	0,05
LP22	COT-PEG4- <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH2-Dxd	Контроль -AL1-LP22	4,00	>266,00
LP22	COT-PEG4- <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH2-Dxd	Анти-Her2-BL2-LP22	8,00	0,42
LP10	COT-PAB(GLCA)-G-NHCH2-Dxd	Анти-Her2-AL1-LP10	4,00	0,35
LP11	COT-PAB(GLC)-G-NHCH2-Dxd	Анти-Her2-AL1-LP11	4,00	0,61
LP12	COT-PAB(GLCA)-GG-NHCH2-Dxd	Анти-Her2-AL1-LP12	4,00	0,30
LP23	COT-PEG4-CO-B1-(LP1)(LP2)	Анти-Her2-AL1-LP23	7,22	0,90
LP23	COT-PEG4-CO-B1-(LP1)(LP2)	Контроль -AL1-LP23	6,74	>500,00
LP24	COT-B2-[NH-PEG2-vcPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Анти-Her2-AL1-LP24	4,24	0,36
LP24	COT-B2-[NH-PEG2-vcPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Контроль -AL1-LP24	5,86	739,11
LP25	COT-B2-[NH-PEG2- <sup>D</sup> EvcPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Анти-Her2-AL1-LP25	8,00	0,25
LP26	DIBAC-suc-B2-[NH-PEG4-vcPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Анти-Her2-AL1-LP26	8,00	0,44
LP28	COT-B3-[NH-PEG2- <sup>D</sup> EvcPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Анти-Her2-AL1-LP28	8,00	0,36
LP28	COT-B3-[NH-PEG2- <sup>D</sup> EvcPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Контроль -AL1-LP28	7,18	504,39
LP28	COT-B3-[NH-PEG2- <sup>D</sup> EvcPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Анти-Her2-BL2-LP28	11,21	0,26
LP30	DIBAC-suc-B3-[NH-PEG2- <sup>D</sup> EvcPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Анти-Her2-AL1-LP30	8,00	0,50
LP32	COT-B3-[NH-PEG2- <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Анти-Her2-AL1-LP32	6,95	0,19
LP32	COT-B3-[NH-PEG2- <sup>L</sup> EvcPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Анти-Her2-BL2-LP32	11,55	0,51
LP34	DIBAC-suc-B3-[NH-PEG2- <sup>L</sup> EvcPAB-G-	Анти-Her2-AL1-	8,00	0,40

	NHCH2-Dxd]2	LP34		
LP35	COT-B3-[NH-PEG2-GGFG-NHCH2-Dxd]2	Анти-Her2-AL1-LP35		
LP36	COT-B4-[NH-PEG2- <sup>D</sup> EVCPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Анти-Her2-AL1-LP36	8,00	0,19
LP37	COT-B4-[NH-PEG2- <sup>L</sup> EVCPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Анти-Her2-AL1-LP37		
LP38	COT-PEG2-B4-[NH-PEG2- <sup>L</sup> EVCPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Анти-Her2-AL1-LP38	7,23	0,46
LP38	COT-PEG2-B4-[NH-PEG2- <sup>L</sup> EVCPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Анти-Her2-BL2-LP38	14,16	0,36
LP39	COT-PEG2-B4-[NH-LEVCPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Анти-Her2-AL1-LP39	8,00	0,72
LP39	COT-PEG2-B4-[NH-LEVCPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Анти-Her2-BL2-LP39	15,80	0,39
LP41	COT-PEG2-B5-[NH-PEG2-LEVCPAB-G-NHCH2-Dxd]3	Анти-Her2-AL1-LP41		
LP41	COT-PEG2-B5-[NH-PEG2-LEVCPAB-G-NHCH2-Dxd]3	Анти-Her2-BL2-LP41		
	None	FGFR2b-1-BL12		
LP1		FGFR2b-1-BL12-LP1	7,8	
LP1		FGFR2b-1-AL1-LP1	4	
LP35		FGFR2b-1-AL1-LP35	7,8	
LP32		FGFR2b-1-AL1-LP32	7,4	
LP39		FGFR2b-1-AL1-LP39	7,5	
LP38		FGFR2b-1-AL1-LP38	7,2	
LP2		FGFR2b-1-BL12-LP2		
LP1		Контроль-AL1-LP1	4	
LP35		Контроль-AL1-LP35	7,7	
LP32		Контроль-AL1-LP32	7,3	
LP39		Контроль-AL1-LP39	7,6	
LP38		Контроль-AL1-LP38	7,2	

**Таблица 22. ADC, конъюгированные за 1 стадию (способ Е на фигуре 5)**

Линкер-полезная нагрузка		ADC		
LP#	Название	# Кода ADC	DAR	SKBR3 EC <sub>50</sub> (нМ)
LP16	NH2-PEG4-vcPAB-G-NHCH2-Dxd	Анти-HER2-LP16		
LP21	NH2-PEG4- <sup>L</sup> EvCPAB-G-NHCH2-Dxd	Анти-HER2-LP21	3,83	0,26
LP27	NH2-B3-[NH-PEG2-vcPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Анти-HER2-LP27		
LP31	NH2-B3-[NH-PEG2- <sup>L</sup> EvCPAB-G-NHCH2-Dxd]2	Анти-HER2-LP31		

qLP18	NH <sub>2</sub> -PEG3-TCOT-PEG4-vcPAB-Gly-NHCH <sub>2</sub> -Dxd	Анти-HER2-qLP18		
-------	--	-----------------	--	--

**[0875]** Пример 21H: Репрезентативная методика для стадии 1: изготовление сайт-специфического конъюгата азидо-функционализированное антитело-лекарственное средство, содержащего 8 азидо-групп, с использованием разветвленных (BL) линкеров (таблица 23).

**[0876]** Анти-HER2 антитело IgG человека, содержащее мутацию N297Q, или изотипическое контрольное антитело смешивали с 20-100 молярными эквивалентами бис-азидо-алкилзамещенного амина (**BL2**, MW 708,82 г/мл или **BL12**, MW 550,66). Полученный раствор смешивали с трансклутаминазой (1 Ед mTG на мг антитела, Millipore-Sigma) с получением конечной концентрации антитела 1-20 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали при 25-37°C в течение 4-24 часов при осторожном встряхивании под контролем ESI-MS. По завершении избыток амина и mTG удаляли эксклюзионной хроматографией (SEC) или колоночной хроматографией с белком А. Конъюгат характеризовали с помощью UV-Vis, SEC и ESI-MS. Азидо-линкеры, присоединенные к антителу, привели к увеличению массы на 2777 Да или 2145 Да для конъюгата с DAR4 с **BL2** и **BL12**, соответственно. Чистота мономеров конъюгатов составила >99% по данным SEC.

**[0877]** Пример 21I: Репрезентативная методика для стадии 2: изготовление сайт-специфического конъюгата азидо-функционализированное антитело-лекарственное средство, содержащего 8 азидо-групп, с использованием разветвленных (BL) линкеров посредством [2+3] клик-реакций между азидо-функционализированными антителами и соединением алкин-содержащий линкер-полезная нагрузка (таблица 23).

**[0878]** Сайт-специфический конъюгат антитело-лекарственное средство получали путем инкубации азидо-функционализированного антитела (1-20 мг/мл) в PBS (pH 7,4) с 10-20 молярными эквивалентами соединения линкер-полезная нагрузка, растворенного в органическом растворителе, таком как как DMSO или DMA (10 мг/мл), с получением реакционной смеси, содержащей 5-15% органического растворителя (об./об.), при 25-37°C в течение 1-48 часов при осторожном встряхивании. Реакцию контролировали с помощью ESI-MS. По завершении избыток соединения линкер-полезная нагрузка и белковых агрегатов удаляли эксклюзионной хроматографией (SEC). Очищенный конъюгат концентрировали, стерильно



фильтровали и характеризовали с помощью UV-Vis, SEC и ESI-MS. Чистота мономеров конъюгата составила >99% по данным SEC.

**[0879]** Пример 21J: Синтез анти-HER2 ADC

**[0880]** В конкретном примере агликозилированное анти-Her2 антитело IgG человека, содержащее мутацию N297Q, смешивали с 82 молярными эквивалентами бис-азидо-алкилзамещенного амина (**BL2**, молекулярная масса 708,82 г/мл). Полученный раствор смешивали с микробной трансклутаминазой (1 Ед mTG на мг антитела, Millipore-Sigma) с получением конечной концентрации антитела 7,9 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 30 часов при осторожном встряхивании под контролем ESI-MS. По завершении избыток амина и mTG удаляли эксклюзионной хроматографией (SEC). Конъюгат характеризовали с помощью UV-Vis, SEC и ESI-MS. Азидо линкеры, присоединенные к антителу, привели к увеличению массы на 2777 Да для конъюгата с DAR4.

**[0881]** Сайт-специфический конъюгат антитело-азидо (2,3 мг/мл) в PBS (pH 7,4) смешивали с 13 молярными эквивалентами соединения линкер-полезная нагрузка (**LP1**) в 10 мг/мл DMA с получением реакционной смеси, содержащей 12% органического растворителя (об./об.), и раствор выдерживали при 26°C в течение 27 часов при осторожном встряхивании. Реакцию контролировали с помощью ESI-MS. По завершении избыток соединения линкер-полезная нагрузка и белковых агрегатов удаляли эксклюзионной хроматографией (SEC). Очищенный конъюгат концентрировали, стерильно фильтровали и характеризовали с помощью UV-Vis, SEC и ESI-MS. Чистота мономеров конъюгатов составила 99,9% по данным SEC. Лекарственное средство, присоединенное к антителу, привело к увеличению массы на 11175 Да для конъюгата с DAR8.

**Таблица 23. Перечень mAb, конъюгат азидо-Ab и ADC**

	Описание антитела	Сайт конъюгации	Модификация		DAR по данным ESI-MS	ESI-MS (m/z)
			AL, BL, LP #	MW (г/моль)		
1	Анти-HER2	Q295	Нет	NA	NA	145122 (degly)
2	Анти-HER2	Q295	[AL1] <sub>2</sub>	218,3	2	145519
3	Анти-HER2	Q295	[AL1-LP1] <sub>2</sub>	1614,8	1,8	148330
4	Изотип	Q295	Нет	NA	NA	145443
5	Изотип	Q295	[AL1] <sub>2</sub>	218,3	2	145823
6	Изотип	Q295	[AL1-LP1] <sub>2</sub>	1614,8	2	148619
7	Анти-HER2	Q295	Нет	NA	NA	145139
8	Анти-HER2	Q295, Q297	[AL1] <sub>4</sub>	218,3	4	145943
9	Анти-HER2	Q295,	[BL7] <sub>4</sub>	325,4	4	146372

		Q297				
10	Анти-HER2	Q295, Q297	[AL1-LP1] <sub>4</sub>	1614,8	4	151544
11	Анти-HER2	Q295, Q297	[BL7-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	3118,4	8	157557
12	Анти-STEAP2	Q295, Q297	Нет	NA	NA	144006
13	Анти-STEAP2	Q295, Q297	[AL1] <sub>4</sub>	218,3	4	144787
14	Анти-STEAP2	Q295, Q297	[BL7] <sub>4</sub>	325,4	4	145208
15	Анти-STEAP2	Q295, Q297	[AL1-LP1] <sub>4</sub>	1614,8	4	150364
16	Анти-STEAP2	Q295, Q297	[BL7-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	3118,4	8	156381
17	Изотипический контроль	Q295, Q297	Нет	NA	NA	145451
18	Изотипический контроль	Q295, Q297	[AL1] <sub>4</sub>	218,3	4	146245
19	Изотипический контроль	Q295, Q297	[BL7] <sub>4</sub>	325,4	4	146678
20	Изотипический контроль	Q295, Q297	[AL1-LP1] <sub>4</sub>	1614,8	4	151849
21	Изотипический контроль	Q295, Q297	[BL7-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	3118,4	8	157863
22	Анти-HER2	Q295, Q297	[BL2] <sub>4</sub>	708,8	3,8	147915
23	Анти-HER2	Q295, Q297	[BL2-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	3488,8	7,5	147918
24	Анти-HER2	Q295, Q297	[BL12] <sub>4</sub>	550,7	4	147282
25	Анти-HER2	Q295, Q297	[BL12-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	3329	8	158453
26	Изотипический контроль	Q295, Q297	[BL2] <sub>4</sub>	708,8	3,8	148235
27	Изотипический контроль	Q295, Q297	[BL2-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	3483,5	7,1	159398
28	Изотипический контроль	Q295, Q297	[BL12] <sub>4</sub>	550,7	4	147593
29	Изотипический контроль	Q295, Q297	[BL12-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	3324,5	8	158762

**[0882]** ПРИМЕР 22: Характеристика ADC

**[0883]** Пример 22A: SDS-PAGE для анализа целостности и чистоты ADC

**[0884]** В одном способе условия проведения SDS-PAGE включали невосстановленные и восстановленные образцы (1-2 мкг), а также белковые стандарты Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-rad, 500 мкл, номер по каталогу 1610374), которые загружали на дорожку (1,0 мм × 10 лунок) в гель Novex 4-20% No Tris-Glycine Gel и анализировали при 180 В, 300 мА, в течение 80 минут. Невосстановленный образец

готовили с использованием буфера для образцов NuPAGE® LDS (4X) (Thermo Fisher Scientific, номер по каталогу 1887691), и восстановленный образец готовили с использованием буфера для образцов с SDS (4X), содержащего 10% восстанавливающего агента для образца (10X) (Thermo Fisher Scientific, номер по каталогу 1769410).

**[0885]** Молекулярные массы антител и ADC в SDS-PAGE определяли в невосстановительных и восстановительных условиях. Массовые сдвиги могут быть неочевидными в невосстановительных условиях из-за относительно небольших процентов изменений массы. Однако массы тяжелых цепей увеличиваются от голых антител к азидо-функционализированным антителам и далее к конъюгатам ADC.

**[0886]** Пример 22B: Эксклюзионная хроматография (SEC) для анализа и очистки ADC

**[0887]** Для определения чистоты конъюгатов антитело-лекарственное средство проводили эксклюзионную хроматографию. Аналитические эксперименты SEC проводили с использованием прибора Thermo UltiMate™ 3000 на колонке XBridge Protein BEH SEC (Waters, 200 Å, 3,5 мкм, 7,8 мм X 300 мм), и каждый образец (30–40 мкг, 20 мкл) обрабатывали при скорости потока 0,5 мл/мин, используя PBS pH 7,4 с 15% 2-пропанола, и контролировали при длине волны 280 нм с помощью детектора Thermo DAD-3000 RS с быстрым разделением на диодной матрице.

**[0888]** ADC очищали эксклюзионной хроматографией (SEC) и концентрировали с использованием ультрацентрифугирования. Чтобы отделить конъюгаты антитело-лекарственное средство от реакционной смеси, проводили очистки методом препаративной SEC с использованием системы ÄKTA от GE Healthcare на колонке Superdex® 200 Increase 10/300 GL (1,0×30 см) при скорости потока 0,6 мл/мин, элюируя BuPH при pH 7,4, и наблюдали при  $\lambda$ 280 нм. Для концентрирования продукта Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filters (Ultracel-10K) использовали в центрифуге Allegra x-12r, и раствор перемешивали после каждого концентрирования, чтобы избежать высокой агрегации.

**[0889]** Пример 22C: RP-HPLC для анализа ADC

**[0890]** Анализ интактной массы образцов ADC проводили с помощью RP-HPLC для определения полноты конъюгации LP, а также использовали для расчета среднего значения DAR.

**[0891]** Каждый образец обрабатывали дитиотреитолом (DTT, 0,5 M) и затем инкубировали при 37°C в течение 30 минут перед анализом RP-HPLC. RP-HPLC выполняли с использованием прибора Thermo UltiMate™ 3000 на колонке XBridge

Protein BEH C4 (300 Å, 2,5 мкм, 4,6×100 мм; номер по каталогу 186009137), и термостат колонки нагревали до 65°C. Каждый тестируемый образец (10-20 мкг, 10 мкл) загружали и анализировали со скоростью потока 1 мл/мин, используя различные градиенты подвижной фазы А (100% ddH<sub>2</sub>O с 0,1% TFA) и подвижной фазы В (80% ACN, 20% IPA с 0,1% TFA), показанные в **таблице 24** ниже, и наблюдали при длине волны 280 нм с использованием матричного детектора с быстрым разделением диодов Thermo DAD-3000 RS.

**Таблица 24. Градиенты RP-HPLC для анализа ADC**

Время (мин)	Скорость потока (мл/мин)	А%	В%
0,00	1,00	80	20
15,00	1,00	50	50
16,00	1,00	5	95
18,00	1,00	5	95
18,10	1,00	80	20
24,00	1,00	80	20

**[0892]** Пример 22D: LC-ESI-MS для анализа интактной массы антитела и ADC

**[0893]** Измерение интактной массы для образцов ADC с помощью LC-ESI-MS выполняли для определения профиля распределения полезной нагрузки и расчета среднего значения DAR. Каждый тестируемый образец (0,5-1 мкг) наносили на колонку Waters Protein BEH C4 (300Å, 1,7 мкм, 2,1 мм X 50 мм; номер по каталогу 186004495) с использованием различных градиентов подвижной фазы А (ddH<sub>2</sub>O с 0,1% FA) и подвижной фазы В (ACN с 0,1% FA) (как показано в **таблице 25** ниже) при скорости потока 0,25 мкл/мин, и измеряли при длине волны 280 нм. Затем продукт элюировали и масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре Thermo Q EXACTIVE HF-X.

**Таблица 25. Градиенты LC-ESI-MS для анализа интактной массы антитела и ADC**

№.	Время (мин)	Скорость потока (мкл/мин)	%В	Кривая
1	0,000	Уравновешивание		
2	0,000	0,250	10,0	5
3	Новый ряд			
4	0,000	Анализ		
5	0,000	0,250	10,0	5
6	3,000	0,250	10,0	5
7	7,000	0,250	90,0	5
8	8,000	0,250	90,0	5

9	8,100	0,250	10,0	5
10	10,000	0,250	10,0	5
11	Новый ряд			
12	10,000	Остановка анализа		

**[0894]** ПРИМЕР 23: Анализ цитотоксичности *in vitro* в опухолевых линиях

**[0895]** Для тестирования способности конъюгатов анти-HER2 или анти-STEAP2 антитело-лекарственное средство (ADC) по настоящему изобретению уничтожать клеточные линии человека, проводили анализ цитотоксичности *in vitro*. Цитотоксичность *in vitro* ADC, изотипических контрольных ADC и эталонных свободных полезных нагрузок оценивали с использованием набора для анализа CellTiter-Glo 2.0 Assay Kit (Promega, номер по каталогу g9243), в котором количество присутствующей АТФ использовали для определения количества жизнеспособных клеток в культуре.

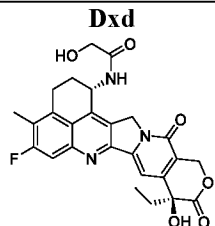
**[0896]** Для анализа клетки Calu-3, SK-BR-3, NCI-H1975, C42 или C42/STEAP2 КО (нокаутные) высевали с плотностью 1000 клеток на лунку в покрытые поли-D-лизином белые 96-луночные планшеты Biocoat (Corning # 356693) в полной питательной среде и выращивали в течение ночи при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Трехкратные серийные разведения анти-HER2 ADC или изотипических контрольных ADC готовили в среде для разведения (Optimem + 0,1% BSA) и добавляли к клеткам в конечных концентрациях в диапазоне от 100 нМ до 0,015 нМ (концентрации скорректировали на DAR (соотношение лекарственного средства к антителу) и дозировали исходя из эффективной концентрации полезной нагрузки). Готовили трехкратные серийные разведения свободных полезных нагрузок в 100% DMSO, переносили в свежую среду для разведения, а затем добавляли к клеткам в конечной постоянной концентрации DMSO 0,2% и конечных концентрациях полезных нагрузок в диапазоне от 100 нМ до 0,015 нМ. Последняя лунка в каждой из серий разведения (необработанные лунки) служила в качестве бланковых контролей, содержащих только среду (ADC) или среду плюс 0,2% DMSO (полезные нагрузки), и была нанесена на график как продолжение 3-кратного серийного разведения. Через шесть дней в каждую лунку добавляли по 100 мкл CellTiter glo 2.0, планшеты перемешивали в течение 2 минут на орбитальном шейкере и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Относительные световые единицы (RLU) измеряли на люцинометре Envision (PerkinElmer), а жизнеспособность клеток выражали в виде процента от

необработанных (100% жизнеспособных) клеток. Значения  $IC_{50}$  определяли с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по 10-точечной кривой доза-ответ (GraphPad Prism). Максимальный % гибели также определяли для каждого тестируемого продукта следующим образом: 100 – минимальная процентная жизнеспособность. Были проведены два независимых эксперимента (таблицы 26 и 27, соответственно, показанные ниже) и представлены значения  $IC_{50}$  и максимальный % уничтожения для каждого тестируемого продукта.

**[0897]** Как показано в **таблицах 26 и 27**, анти-HER2 ADC, конъюгированные через глутамины, уничтожали клетки SK-BR-3 с высоким уровнем экспрессии HER2 со значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от 68,5 пМ до 86,1 пМ и максимальными % значениями уничтожения в диапазоне от 82,2% до 93,3%. Анти-HER2 ADC, конъюгированный через цистеины, уничтожал клетки SK-BR-3 со значением  $IC_{50}$  147 пМ и максимальным % значением уничтожения 90,9%. Во втором эксперименте анти-HER2 ADC, конъюгированные через глутамины, уничтожали клетки Calu-3 и SK-BR-3 с высокой экспрессией HER2 со значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от 183 пМ до 431 пМ и максимальными % значениями уничтожения в диапазоне от 89,6% до 95,3%. Анти-HER2 ADC, конъюгированный через цистеины, уничтожал клетки SK-BR-3 и Calu-3 со значениями  $IC_{50}$  1,16 нМ и 1,38 нМ, соответственно, и максимальными % значениями уничтожения 85,9% и 94,2%, соответственно. Все анти-HER2 ADC были слабо цитотоксическими в клетках NCI-H1975 с низким уровнем экспрессии HER со значениями  $IC_{50} > 100$  нМ, и все несвязывающиеся контрольные ADC были слабо цитотоксическими во всех тестируемых клетках со значениями  $IC_{50} \geq 40,1$  нМ. Неконъюгированные анти-HER2 антитела также были слабо цитотоксическими во всех тестируемых линиях со значениями  $IC_{50} \geq 12,8$  нМ и максимальными процентными значениями, равными 48,5% или менее. Свободная полезная нагрузка Dxd, высвобождаемая из ADC, уничтожала клетки со значениями  $IC_{50}$  в диапазоне от 787 пМ до 11,8 нМ и максимальными % значениями уничтожения в диапазоне от 96,1% до 98,2%.

**Таблица 26: Цитотоксичность анти-HER2 ADC в клетках SK-BR-3 и NCI-H1975**

Тестируемый препарат	Описание	Мишень	Сайт конъюгации	DAR	SK-BR-3		NCI-H1975	
					$IC_{50}$ (M)	Max % уничтож	$IC_{50}$ (M)	Max % уничтож
11	Анти HER2 Ab-[(BL7)-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	HER2	Q295, Q297	8	8,61E-11	93,3	>1,0E-07	7,0
10	Анти HER2 Ab-	HER2	Q295,	4	6,85E-11	89,3	>1,0E-07	10,8

	(AL1-LP1) <sub>4</sub>		Q297						
<b>3</b>	Анти HER2 Ab-(AL1-LP1) <sub>2</sub>	HER2	Q295	1,8	7,06E-11	82,2	>1,0E-07	2,9	
<b>22</b> (Сравнение ADC)	Анти HER2 cys-GGFG-DxD	HER2	Cys	8,4	1,47E-10	90,9	>1,0E-07	8,4	
<b>21</b>	Изотипическое Ab [(BL7)-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	Нецелевой контроль	Q295, Q297	8	>1,0E-07	10,5	>1,0E-07	8,1	
<b>20</b>	Изотипическое Ab (AL1-LP1) <sub>4</sub>	Нецелевой контроль	Q295, Q297	4	2,28E-08	83	>1,0E-07	4,2	
<b>6</b>	Изотипическое Ab (AL1-LP1) <sub>2</sub>	Нецелевой контроль	Q295	2	>1,0E-07	0	>1,0E-07	4,3	
<b>23</b> (Сравнение ADC)	Изотипическое Ab cys-GGFG-DxD	Нецелевой контроль	Cys	6,9	>1,0E-07	41,9	>1,0E-07	2,8	
<b>Dxd</b> 	Свободная нагрузка	NA	NA	NA	7,87E-10	97,1	8,91E-09	95,9	

**Таблица 27. Цитотоксичность анти-HER2 ADC в клетках SK-BR-3, Calu-3 и NCI-H1975**

Тестируемый препарат	Описание	Мишень	Сайт конъюгации	DAR	SK-BR-3		Calu-3		NCI-H1975	
					IC50 (M)	Max % уничтож	IC50 (M)	Max % уничтож	IC50 (M)	Max % уничтож
<b>11</b>	Анти HER2 Ab-[(BL7)-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	HER2	Q295, Q297	8	1,86E-10	95,3	4,31E-10	94,2	>1,0E-07	13,6
<b>10</b>	Анти HER2 Ab-(AL1-LP1) <sub>4</sub>	HER2	Q295, Q297	4	1,83E-10	89,7	4,14E-10	89,6	>1,0E-07	15,5
<b>22</b> (Сравнение ADC)	Анти HER2 cys-GGFG-DxD	HER2	Cys	7,4	1,16E-09	85,9	1,38E-09	94,2	>1,0E-07	20,4
<b>Dxd</b>	Свободная нагрузка	NA	NA	NA	1,56E-09	98,2	2,14E-09	96,3	1,18E-08	96,1
<b>7</b>	Анти HER2 Ab с N297Q Fc, неконъюгированное антитело	HER2	NA	NA	1,28E-08	48,5	>1,0E-07	23,3	>1,0E-07	21,1
<b>21</b>	Изотипическое Ab [(BL7)-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	Нецелевой контроль	Q295, Q297	8	>1,0E-07	21,7	>1,0E-07	0,6	>1,0E-07	6,4
<b>1</b>	Анти HER2 Ab, Неконъюгированное антитело	HER2	NA	NA	2,64E-08	43,0	>1,0E-07	24,3	>1,0E-07	15,7
<b>20</b>	Изотипическое Ab (AL1-LP1) <sub>4</sub>	Нецелевой контроль	Q295, Q297	4	4,01E-08	78,9	7,96E-08	53,9	>1,0E-07	12,5

**[0898]** В приведенной ниже **таблице 28** обобщены данные по цитотоксичности анти-STEAP2 ADC, полученных в соответствии с настоящим изобретением, в клетках C4-2 и C4-2/STEAP2 KO.

**Таблица 28: Цитотоксичность анти-STEAP2 ADC в клетках C4-2 и C4-2/STEAP2 KO**

Тестируемый продукт	Описание	Мишень	Сайт конъюгации	DAR	C4-2		C4-2/STEAP2 KO	
					IC50 (M)	Max % уничтож	IC50 (M)	Max % уничтож
15	Анти STEAP2 Ab-(AL1-LP1) <sub>4</sub>	STEAP2	Q295, Q297	4	3,15E-08	54,8	>1,0E-07	4,2
16	Анти STEAP2 Ab-[(BL7)-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	STEAP2	Q295, Q297	8	3,22E-08	58,4	>1,0E-07	0,0
Dxd	(Свободная нагрузка)	NA	NA	NA	2,54E-09	81,7	3,43E-09	88,9
21	Изотипическое Ab [(BL7)-(LP1) <sub>2</sub> ] <sub>4</sub>	Нецелевой контроль	Q295, Q297	8	>1,0E-07	7,8	>1,0E-07	5,8
12	Анти STEAP2 mAb, неконъюгированное антитело	STEAP2	NA	NA	>1,0E-07	10,6	>1,0E-07	9,4

**[0899]** Как показано в **таблице 28**, анти-STEAP2 ADC, конъюгированные через N297Q, уничтожали клетки C4-2 со значениями IC<sub>50</sub> 31,5 нМ и 32,2 нМ, и максимальными % значениями уничтожения 54,8% и 58,4%; тогда как эти же ADC были слабо цитотоксическими в клетках C4-2/STEAP2 KO со значениями IC<sub>50</sub> > 100 нМ. Несвязывающиеся контрольные ADC и неконъюгированные анти-STEAP2 антитела также были слабо цитотоксическими в обеих тестируемых клеточных линиях со значениями IC<sub>50</sub> > 100 нМ. Свободная полезная нагрузка Dxd, высвобождаемая из ADC, уничтожала как клетки C4-2, так и C4-2/STEAP2 KO со значениями IC<sub>50</sub> 2,54 нМ и 3,43 нМ, соответственно, и максимальными % значениями уничтожения 81,7% и 98,9%, соответственно.

**[0900]** ПРИМЕР 24: Анализ на основе клеток SKBR3

**[0901]** Антипролиферативные анализы выполняли с использованием клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека (плевральный выпот) SK-BR-3. Клетки выращивали в среде McCoy's 5a с добавлением 10% FBS, пенициллина/стрептомицина и L-глутамин. Клетки высевали с плотностью 1000 клеток на лунку в 96-луночный планшет в 80 мкл полной ростовой среды за день до добавления ADC и инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. ADC разбавляли 1:3 10 раз в питательной среде (Opti-MEM + 0,1% BSA). Концентрации тестируемых ADC охватывают диапазон от 1 нМ до ~ 1000 нМ, а также начиная с различных концентраций исходя из способности



уничтожать клетки, чтобы обеспечить EC50, оставляя последнюю лунку (10-ю) в качестве контроля (без ADC или соединения). Соединения сначала 1:3 серийно разбавляли 10 раз в DMSO, начиная с 50 мкМ (начальная концентрация каждого из соединений различается в зависимости от значений EC50), оставляя последнюю лунку в качестве контроля (содержит только DMSO). 10 мкл разбавленного DMSO соединения переносили в 990 мкл питательной среды (Opti-MEM + 0,1% BSA) в 96-луночный планшет для разведения с глубокими лунками. К клеткам добавляли 20 мкл разбавленного питательной средой ADC и соединения. Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 6 дней (144 часа). Планшеты проявляли добавлением 100 мкл реагента CTG/лунку к клеткам CellTiter-Glo® от Promega, номер по каталогу G7573), встряхивали при комнатной температуре в течение 10 минут, запечатывали с помощью White Adhesive Bottom Seal и люминесценцию считывали на спектрофотометре Envision. %Уничтожения= $[1-(T144_{\text{образец}}-T144_{\text{контроль}})/(T144_{\text{DMSO}}-T144_{\text{контроль}})] \times 100\%$ . В настоящем документе T144 представляет собой данные, полученные в момент времени 144 часа. Раствор соединений полезных нагрузок готовили следующим образом: сначала соединения 1:3 серийно разбавляли десять раз в DMSO, начиная с рабочей концентрации (начальная концентрация каждого из соединений различается в зависимости от значений EC50), оставляя последнюю лунку в качестве контроля (содержит только DMSO). 10 мкл разбавленного DMSO соединения переносили в 990 мкл питательной среды (Opti-MEM + 0,1% BSA) в 96-луночный планшет для разведения с глубокими лунками. К клеткам добавляли 20 мкл разбавленного питательной средой ADC и соединения.

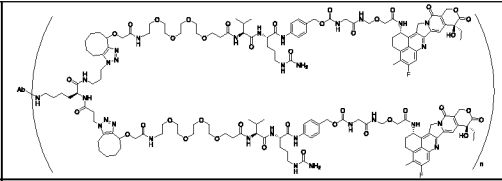
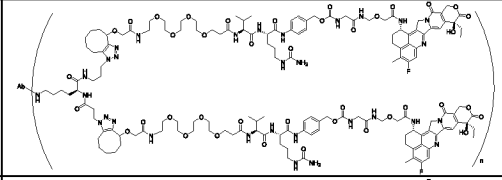
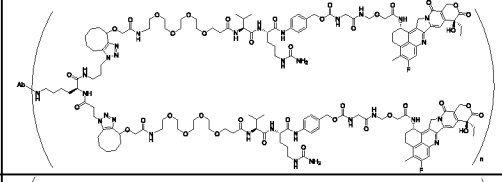
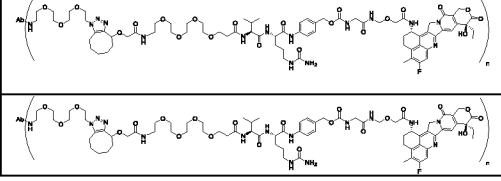
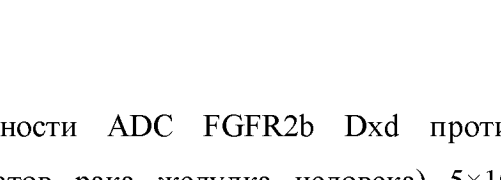
**[0902]** Значения EC50 для ADC и контрольных ADC, а также свободной полезной нагрузки (DXD и P3) приведены в обобщенном виде в **таблице 21** и **таблице 23**.

**[0903]** ПРИМЕР 25: Исследование эффективности ADC FGFR2 in vivo

**[0904]** В этом эксперименте измеряли эффект конъюгатов антитело FGFR2b-лекарственное средство (ADC) в соответствии с изобретением на рост ксенотрансплантатов рака желудка SNU-16.

**Таблица 29: FGFR2 ADC:**

Описание ADC	Мишень/ mAb	Fc-модификация	Сайт конъюгации	Азидолинкер	Линкер-нагрузка	Полезная нагрузка	Структура модификации	DAR	Доза
--------------	-------------	----------------	-----------------	-------------	-----------------	-------------------	-----------------------	-----	------

Контрольный Dxd ADC	Ненацеливающий контроль	N297Q	Q295, Q297	BL7	LP1	P2 (Dxd)		7.9	10 мг/кг
FGFR2b -2 Dxd ADC	FGFR2b	N297Q	Q295, Q297	BL7	LP1	P2 (Dxd)		7.5	1, 3 или 10 мг/кг
FGFR2b -1 Dxd ADC	FGFR2b	N297Q	Q295, Q297	BL7	LP1	P2 (Dxd)		7.9	1, 3 или 10 мг/кг
Контрольный Dxd ADC	Ненацеливающий контроль	N297Q	Q295, Q297	AL1	LP1	P2 (Dxd)		3.7	3 мг/кг
FGFR2b -1 Dxd ADC	FGFR2b	N297Q	Q295, Q297	AL1	LP1	P2 (Dxd)		3.7	0,3, 1 или 3 мг/кг

#### [0905] Методика эксперимента

[0906] Для оценки противоопухолевой активности ADC FGFR2b Dxd против ксенотрансплантатов SNU16 (ксенотрансплантатов рака желудка человека)  $5 \times 10^6$  клеток SNU-16 (ATCC), смешанных с Matrigel (BD Biosciences), имплантировали подкожно в бок мышинным самцам BALB/c SCID (возраст 6-8 недель, Jackson Laboratory). После достижения среднего объема опухолей 200-250 мм<sup>3</sup> мышей рандомизировали на группы для лечения (n = 6 мышей в группе). Все ADC вводили путем подкожной инъекции. Объемы опухолей измеряли два раза в неделю на протяжении всего эксперимента. Средние значения (среднее значение +/- стандартное отклонение) роста опухоли (изменение объема опухоли от начала лечения до окончания эксперимента) рассчитывали для каждой группы лечения. Процент уменьшения роста опухолей рассчитывали по сравнению с изотипической контрольной группой, и процент регрессии опухолей в конце эксперимента рассчитывали по сравнению с объемом опухоли в начале лечения. Результаты двух отдельных экспериментов с использованием ADC с разными DAR показаны в таблице 30.

**Таблица 30: Ингибирование роста ксенотрансплантата SNU-16 у мышей BALB/c SCID**

Антитело (мг/кг)	Общая доза полезной нагрузки (мкг/кг)	Рост опухоли в мм <sup>3</sup> после начала лечения (среднее ± SD)	Среднее % уменьшение роста опухоли	Средняя % регрессия опухоли
------------------	---------------------------------------	--	------------------------------------	-----------------------------

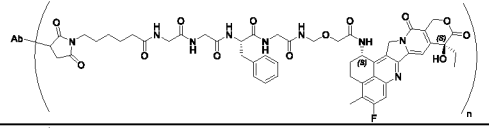
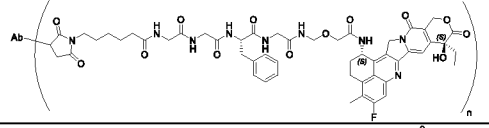
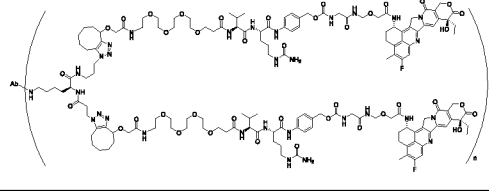
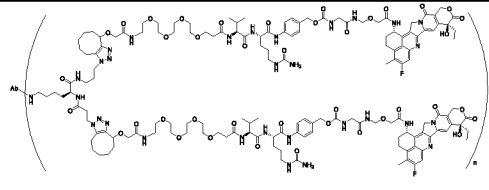
<b>Эксперимент 1 (ADC с DAR 8)</b>				
FGFR2b-2 Dxd ADC (1 мг/кг)	25	-27,2 ± 89,2	103,3	11,0
FGFR2b-2 Dxd ADC (3 мг/кг)	76	-254,4 ± 34,1	131,4	99,1
FGFR2b-2 Dxd ADC (10 мг/кг)	254	-259,0 ± 25,8	131,9	100
FGFR2b-1 Dxd ADC (1 мг/кг)	26	4,7 ± 181,9	99,4	6,7
FGFR2b-1 Dxd ADC (3 мг/кг)	79	-259,8 ± 40,1	132,0	99,8
FGFR2b-1 Dxd ADC (10 мг/кг)	264	-260,8 ± 25,0	132,1	100
Контрольный Dxd ADC (10 мг/кг)	264	579,5 ± 229,3	28,6	-192,9
Контроль носителем		811,5 ± 556,1		-291,8
<b>Эксперимент 2 (ADC с DAR 4)</b>				
FGFR2b-1 Dxd ADC (0.3 мг/кг)	4	187,0 ± 117,1	72,5	-74,8
FGFR2b-1 Dxd ADC (1 мг/кг)	13	-43,5 ± 91,6	106,4	16,3
FGFR2b-1 Dxd ADC (3 мг/кг)	38	-254,2 ± 30,2	137,4	99,7
Контрольный Dxd ADC (3 мг/кг)	38	679,0 ± 253,1		-259,1

**[0907]** Как показано в **таблице 30** и на **фигурах 8А** и **8В**, результаты демонстрируют, что ADC FGFR2b Dxd индуцируют полную регрессию ксенотрансплантатов опухоли SNU-16 дозозависимым образом.

**[0908]** ПРИМЕР 26: Исследование эффективности ADC HER2 in vivo

**[0909]** В этом эксперименте сравнивали трастузумаб-GGFG-DxD (контрольный анти-HER2 ADC сравнения) и трастузумаб-vcPAB-G-DxD (анти-HER2 ADC по изобретению) в ксенотрансплантатах N87

Таблица 30: HER2 ADC

Описание	Мишень/ mAb	Fc- модифи- кация	Сайт конъюгации	Азидо линкер	Линкер-полезная нагрузка	Структура модификации	Полезная нагрузка	DAR	Доза
Контроль	Ненацелив ающий контроль	WT							5 мг/кг Q1Wx1
COMP mAb	HER2 (Трастузумаб)	WT							5 мг/кг Q1Wx1
Контроль- Dxd ADC	Ненацелив ающий контроль	WT	Цистеин	NA	COMP LP mc-GGFG-Dxd		P2 (Dxd)	7.5	5 мг/кг Q1Wx1
COMP- Dxd-ADC Контроль	HER2 (Трастузумаб)	WT	Цистеин	NA	COMP LP mc-GGFG-Dxd		P2 (Dxd)	8	5 мг/кг Q1Wx1
Контроль- Dxd-ADC	Ненацелив ающий контроль N297Q	N297Q	Q295 и Q297	BL7 (разветвленный)	LP1 (vcPAB-G-Dxd)		P2 (Dxd)	7.8	5 мг/кг Q1Wx1
COMP- Dxd-ADC	HER2 (Трастузумаб)	N297Q	Q295 и Q297	BL7 (разветвленный)	LP1 (vcPAB-G-Dxd)		P2 (Dxd)	7.7	5 мг/кг Q1Wx1

**[0910] Методика эксперимента:**

**[0911]** Противоопухолевую эффективность антитела сравнения трастузумаба оценивали на моделях ксенотрансплантата клеточной линии HER2 IHC 3+ N87. Опухоли устанавливали путем подкожной имплантации  $5 \times 10^6$  клеток, смешанных 1:1 с Matrigel, в правый

бок самок мышей SCID. Опухоли выросли до ~250 мм<sup>3</sup> перед началом лечения, примерно через 7 дней после имплантации. Мышей рандомизировали в группы по 6 штук и обрабатывали однократной дозой тестируемых или контрольных ADC. Рост опухоли контролировали в течение 70 дней после лечения.

**[0912] Результаты эксперимента:**

**[0913]** В этом исследовании, проведенном на мышах SCID, несущих ксенотрансплантат клеточной линии HER2 IHC 3+ N87, оценивали активность антитела сравнения трастузумаба, конъюгированного с компаратором DxD LP или LP1 в соответствии с изобретением, конъюгированным посредством химии трансклутаминазы и разветвленного азидо-линкера BL7. Однократная доза 5 мг/кг была разработана для сведения к минимуму эффекта «голового» трастузумаба в ксенотрансплантатах N87, зависящих от передачи сигналов HER2. Рост ксенотрансплантатов, обработанных ADC контроль-компаратор-DxD LP или контроль-LP1, существенно не задерживался по сравнению с опухолями, обработанными голым контрольным антителом. Однако полная регрессия опухоли наблюдалась в опухолях, обработанных трастузумаб-компаратор-DxD LP и трастузумаб-LP1 в соответствии с изобретением в дозе ADC 5 мг/кг в ходе исследования. Эффект двух тестовых ADC в этом исследовании был неразличим.

**[0914] Таблица 31: Опосредованная трастузумаб-GGFG-DxD и трастузумаб-TG-LP1 регрессия опухоли ксенотрансплантатов N87.**

Дни после имплантации	Голый контроль		HER2 mAb		Контроль-DxD		HER2-DxD		Контроль-LP1		HER2-LP1	
	Среднее	Ст. ошибка	Среднее	Ст. ошибка	Среднее	Ст. ошибка	Среднее	Ст. ошибка	Среднее	Ст. ошибка	Среднее	Ст. ошибка
7	160	13	159	8	161	6	159	10	146	13	154	10
10 (Дозирование)	245	18	243	16	247	15	247	15	247	15	247	15
13	424	36	366	20	399	48	273	19	432	50	307	40
15	530	55	410	29	534	59	158	23	497	43	143	18
17	686	84	506	35	587	67	75	6	670	89	82	12

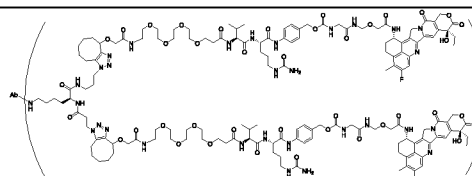
20	870	106	602	34	838	74	44	8	776	81	40	3
22	1030	102	735	53	963	117	35	9	926	83	29	5
24	1226	200	788	60	1109	88	31	7	1023	76	26	4
27	1439	237	957	94	1269	129	11	2	1242	141	15	4
30	1678	247	1190	103	1507	180	10	2	1507	190	14	4
33			1310	36			11	2			14	2
37			1579	61			8	2			10	2
41			1998	198			8	2			15	2
44							5	1			12	5
50							5	0			12	6
58							7	2			12	6
65							7	2			12	6

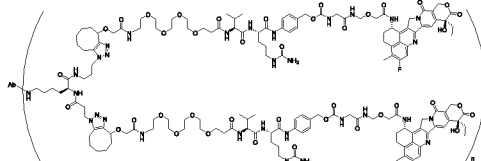
[0915] Это исследование демонстрирует, что соединение LP1 Dxd линкер-полезная нагрузка в соответствии с изобретением, конъюгированное с антителом трастузумабом, является по меньшей мере таким же эффективным, как соединение ведущий компаратор DxD линкер-полезная нагрузка, конъюгированное с тем же антителом.

[0916] ПРИМЕР 27: Исследование *in vivo* эффективности STEAP2 ADC

[0917] В этом эксперименте оценивали эффективность STEAP2 ADC в модели ксенотрансплантата клеточной линии STEAP2.

**Таблица 32: STEAP2 ADC**

Описание	Мишень/ mAb	Fc- модификация	Сайт конъюгации	Азидо линкер	Линкер-полезная нагрузка	Полезная нагрузка	Структура модификации	DAR	Доза
Контрольный Dxd ADC	Ненацеливающий контроль	N297Q	Q295, Q297	BL7	LP1 (vcPAB-G-Dxd)	P2 (Dxd)		7,8	10 мг/кг

STEAP2 Dxd ADC	STEAP2	N297Q	Q295, Q297	BL7	LP1 (vcPAB-G-Dxd)	P2 (Dxd)		8,0	3 или 10 мг/кг
-------------------	--------	-------	------------	-----	-------------------	----------	---	-----	-------------------

**[0918] Методика эксперимента:**

**[0919]** Для оценки активности STEAP2 Dxd ADC против ксенотрансплантатов C4-2 опухоли устанавливали путем подкожной имплантации  $7,5 \times 10^6$  клеток C4-2, смешанных 1:1 с Matrigel, в правый бок самцов мышей SCID. Опухоли вырастали примерно до 200 мм<sup>3</sup> до начала лечения, через 15 дней после имплантации. Мышей рандомизировали в группы по 8 штук в зависимости от объема опухоли и обрабатывали однократной дозой тестируемого или контрольного ADC. Рост опухоли контролировали в течение 50 дней после лечения.

**[0920] Результаты эксперимента:**

**[0921]** Эффективность STEAP2 Dxd ADC *in vivo* оценивали по сравнению с контрольными агентами (таблица 33). Контрольный Dxd ADC частично замедлял рост опухоли по сравнению с опухолями, обработанными носителем. Однократная доза 3 мг/кг STEAP2 Dxd ADC вызывала стойкое ингибирование роста опухоли. STEAP2 Dxd ADC в дозе 10 мг/кг вызывал полную регрессию опухоли, и повторный рост опухоли не наблюдался на протяжении всего исследования. Опухоли C4-2 вызывали потерю массы у мышей по мере роста опухоли. STEAP2 Dxd ADC в дозе 3 или 10 мг/кг вызывал частичное и полное восстановление потери массы, соответственно, в ходе исследования.

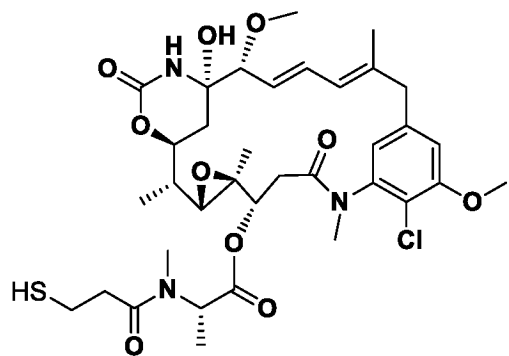
**Таблица 33: Анти-STEAP2 ADC опосредовали регрессию ксенотрансплантатов C4-2 по сравнению с контролями (30-й день после лечения).**

Препарат	Доза ADC	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) при прекращении в группе, получавшей носитель (среднее ± SD)	Рост опухоли (мм <sup>3</sup> ) после начала лечения (среднее ± SD)
Носитель	n/a	1343 ± 362	1127 ± 363
Контрольный Dxd ADC	10 мг/кг	611 ± 436	392 ± 433
STEAP2 Dxd ADC	3 мг/кг	131 ± 106	-83 ± 110
STEAP2 Dxd ADC	10 мг/кг	0 ± 0	-203 ± 26

**[0922]** Как показано выше, анти-STEAP2 ADC в соответствии с изобретением продемонстрировали значительную противоопухолевую эффективность против ксенотрансплантатов STEAP2-положительных клеточных линий C4-2.

**[0923] ПРИМЕР 28:** Исследование *in vivo* эффективности PRLR ADC

**[0924]** В этом эксперименте оценивали эффективность ADC против PRLR в модели ксенотрансплантата клеточной линии T47D. Структура полезной нагрузки DM1 представлена ниже:

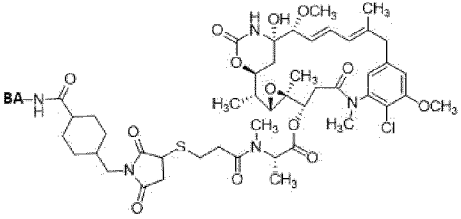
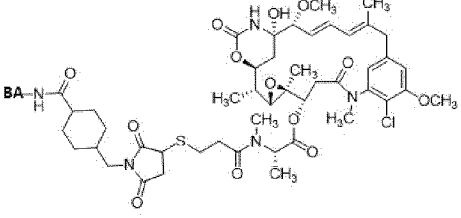
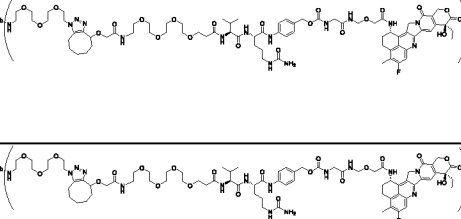
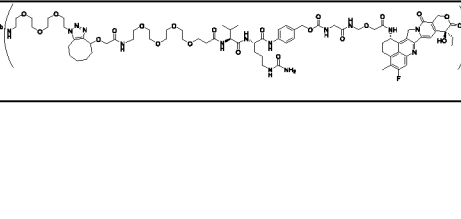


**(DM1)**



[0925] Соединение линкер-полезная нагрузка M1 (mcc-DM1) получали в соответствии с WO 2015/031396 (PCT/US14/52757), который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Соединение линкер-полезная нагрузка M1 конъюгировали с остатком лизина либо ненацеливающего контрольного антитела, либо анти-PRLR антитела, как описано в WO 2015/031396.

**Таблица 34: PRLR ADC**

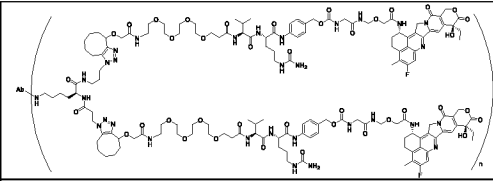
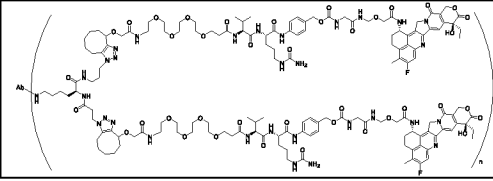
Описание	Мишень/ mAb	Fc- модификация	Сайт конъюгации	Азидо- линкер	Линкер- полезная нагрузка	Полезная нагрузка	Структура модификации	Доза
Контроль DM1 ADC1	Ненацеливающий контроль	WT	Lys	NA	M1 (mcc-DM1)	DM1		10 мг/кг SD
PRLR DM1 ADC	PRLR	WT	Lys	NA	M1 (mcc-DM1)	DM1		10 мг/кг SD
Контроль Dxd ADC	Ненацеливающий контроль	N297 Q	Q295 и Q297	AL1	LP1 (vcPAB-G-Dxd)	P2 (Dxd)		10 мг/кг SD
PRLR Dxd ADC	PRLR	N297 Q	Q295 и Q297	AL1	LP1 (vcPAB-G-Dxd)	P2 (Dxd)		5 или 10 мг/кг, SD

SD=однократная доза

**[0926] Методика эксперимента:**

[0927] Опухолегенные клетки T47D, названные T47DvII, предварительно получали путем пассирования *in vivo*. Опухоли T47D устанавливали путем подкожной имплантации  $10 \times 10^6$  клеток T47DvII, смешанных 1:1 с Matrigel, в правый бок самок мышей SCID, ранее имплантированных пеллетами с 90-дневным медленным высвобождением эстрогена (Innovative Research of America). Опухоли выросли до  $100-200 \text{ мм}^3$  до начала лечения, примерно через 20 дней после имплантации. Мышей рандомизировали в группы по 7 штук и обрабатывали однократной дозой тестируемого или контрольного ADC. Рост опухоли контролировали в течение 45 дней после лечения.



Контрольный Dxd ADC	Ненацеливающий контроль	WT	Q295	BL7	LP1 (vcPA B-G-Dxd)	P2 (Dxd)		5 мг/кг
Биспецифическое MET/MET Dxd ADC	MET/MET	N297Q	Q295 и Q297	AL1	LP1 (vcPA B-G-Dxd)	P2 (Dxd)		1, 2,5 или 5 мг/кг

**[0933] Методика эксперимента:**

**[0934]** Противоопухолевую эффективность анти-MET биспецифического MET/MET Dxd ADC оценивали в ксенотрансплантате EBC1 NSCLC. Опухоли устанавливали путем подкожной имплантации  $5 \times 10^6$  клеток в правый бок самцов мышей SCID. Опухоли выросли до  $\sim 130 \text{ мм}^3$  до начала лечения. Мышей рандомизировали в группы по 6 штук и обрабатывали однократной дозой тестируемого или контрольного ADC. Рост опухоли контролировали в течение 21 дня после лечения.

**[0935] Результаты эксперимента:**

**[0936]** Активность MET/MET Dxd ADC оценивали в модели ксенотрансплантата опухоли EBC1 (таблица 37). В данном случае сравнивали однократное введение MET/MET Dxd ADC в дозах 1, 2,5 и 5 мг/кг. Введение 1 мг/кг MET/MET Dxd ADC показало задержку роста опухоли по сравнению с соответствующим контрольным ADC. Лечение MET/MET Dxd ADC в дозах 2,5 и 5 мг/кг опосредовало значительную и стойкую регрессию ксенотрансплантатов опухолей.

**Таблица 37. Опосредованная MET/MET Dxd ADC регрессия ксенотрансплантатов EBC1 по сравнению с контролями (21-й день после лечения)**

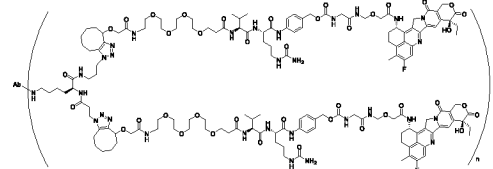
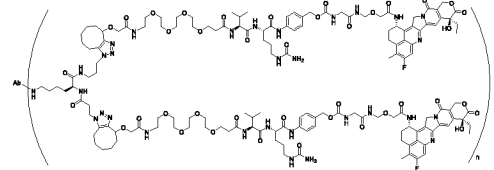
Препарат	Доза ADC	Рост опухоли ( $\text{мм}^3$ ) после начала лечения (среднее $\pm$ SD)
Контроль Dxd ADC	5 мг/кг	901 $\pm$ 90
MET/MET Dxd ADC	1 мг/кг	408 $\pm$ 164
MET/MET Dxd ADC	2,5 мг/кг	-120 $\pm$ 0
MET/MET Dxd ADC	5 мг/кг	-122 $\pm$ 0

**[0937]** Как показано выше, MET ADC продемонстрировали значительную противоопухолевую эффективность против *MET*-амплифицированных ксенотрансплантатов клеточной линии NSCLC.

**[0938] ПРИМЕР 30:** Исследование *in vivo* эффективности ADC против EGFRvIII

**[0939]** В этом эксперименте оценивали эффективность ADC против EGFRvIII в моделях ксенотрансплантатов U251/EGFRvIII.

**Таблица 38: EGFRvIII ADC**

Описание	Мишень/мАб	Fc-модификация	Сайт конъюгации	Азидолинкер	Липкер-полезная нагрузка	Полезная нагрузка	Структура модификации	DAR	Доза
Контрольный Dxd ADC	Ненацеливающий контроль	N297Q	Q295, Q297	BL7	LP1 (vcPAB-G-Dxd)	P2 (Dxd)		7,8	3 мг/кг
EGFRvIII Dxd ADC	EGFRvIII	N297Q	Q295, Q297	BL7	LP1 (vcPAB-G-Dxd)	P2 (Dxd)		7,7	0,5, 1 или 3 мг/кг

**[0940] Методика эксперимента:**

**[0941]** Противоопухолевую эффективность EGFRvIII Dxd ADC оценивали на моделях ксенотрансплантатов линии клеток глиобластомы U251, трансфицированных для экспрессии EGFRvIII, поскольку эндогенная экспрессия мишени теряется после культивирования *in vitro*. U251/EGFRvIII устанавливали путем подкожной имплантации  $10 \times 10^6$  клеток, смешанных 1:1 с Matrigel, в правый бок самцов мышей SCID. Опухоли вырастали до  $\sim 150 \text{ мм}^3$  до начала лечения, примерно через 30 дней после имплантации. Мышей рандомизировали в группы по 8 штук и обрабатывали однократной дозой тестируемого или контрольного ADC. Рост опухоли контролировали в течение 70 дней после лечения.

**[0942] Результаты эксперимента:** В исследовании на мышах, несущих ксенотрансплантат U251/EGFRvIII, оценивали активность EGFRvIII Dxd ADC после однократной дозы 0,5, 1 или 3 мг/кг ADC (**таблица 39**). Рост ксенотрансплантатов, обработанных контрольным Dxd ADC, был лишь немного задержан по сравнению с опухолями, обработанными контрольным носителем. Однако в опухолях, обработанных EGFRvIII Dxd ADC, наблюдалась значительная задержка роста опухоли. Более высокие дозы ADC привели к более стойкой противоопухолевой активности. Все анти-EGFRvIII группы лечения выжили до завершения исследования примерно через 70 дней после введения дозы. Во всех группах наблюдалось увеличение массы тела приблизительно на 10-15% за период исследования.

**Таблица 39. EGFRvIII Dxd ADC опосредовали регрессию ксенотрансплантатов U251/EGFRvIII по сравнению с контролями (27-й день после лечения)**

Препарат	Доза ADC	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) при прекращении введения в группе носителя (среднее ± SD)	Объем опухоли (мм <sup>3</sup> ) после начала лечения (среднее ± SD)
Носитель	n/a	1311 ± 453	1159 ± 452
Контрольный Dxd ADC	3 мг/кг	805 ± 169	657 ± 168
EGFRvIII Dxd ADC	0,5 мг/кг	232 ± 34	85 ± 41
EGFRvIII Dxd ADC	1 мг/кг	138 ± 18	-11 ± 23
EGFRvIII Dxd ADC	3 мг/кг	106 ± 15	-44 ± 20

**[0944]** EGFRvIII Dxd ADC продемонстрировал значительную противоопухолевую эффективность против трансфицированных EGFRvIII ксенотрансплантатов клеточной линии мультиформной глиобластомы.

**[0945]** Поскольку в вышеописанный предмет изобретения могут быть внесены различные изменения без отклонения от объема и сущности настоящего изобретения, подразумевается, что весь предмет, содержащийся в приведенном выше описании или определенный в прилагаемой формуле изобретения, интерпретируется в качестве описания и иллюстрации настоящего изобретения. Многие модификации и вариации настоящего изобретения возможны в свете вышеизложенного. Соответственно, настоящее описание предназначено для охвата всех таких альтернатив, модификаций и отклонений, которые входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

**[0946]** Все патенты, заявки, публикации, методы испытаний, литература и другие материалы, цитируемые в настоящем документе, настоящим включены посредством ссылки во всей их полноте, как если бы они физически присутствовали в данном описании.

## Формула изобретения

1. Соединение, имеющее структуру в соответствии с формулой (A):



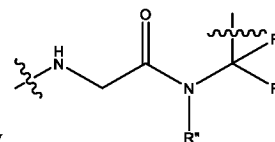
L1 отсутствует или представляет собой первый линкер, связанный с указанным ВА через боковую цепь остатка глутамина (Gln);

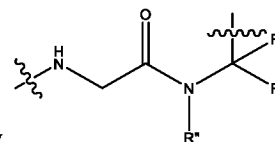
B представляет собой разветвленную единицу, содержащую по меньшей мере один аддукт группы B' и группы B'', где одна из групп B' и B'' выбрана из -N<sub>3</sub> и



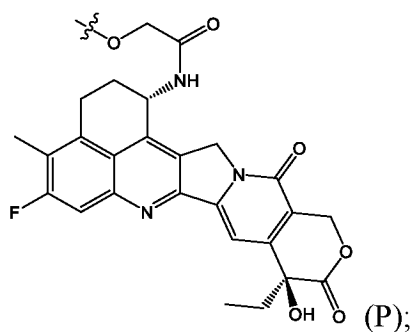
где Q представляет собой CH или N;

L2 представляет собой второй линкер, ковалентно присоединенный к разветвленному звену B через по меньшей мере одну группу B'';



M представляет собой фрагмент, имеющий структуру , где R, R' и R'' в каждом случае независимо представляют собой водород или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо;

Dxd представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):



k представляет собой целое число от 1 до 12;

m представляет собой целое число от 1 до 30;

n представляет собой целое число от 1 до 30;

где VA представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее первый антигенсвязывающий домен (D1) и второй антигенсвязывающий домен (D2);

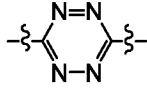
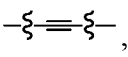
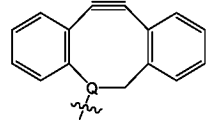
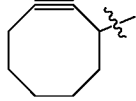
где D1 специфически связывается с первым эпитопом MET человека; и

где D2 специфически связывается со вторым эпитопом MET человека.

2. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что D1 содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в пределах варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2012, и три определяющие комплементарность области легкой цепи ((LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в пределах варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2092; и

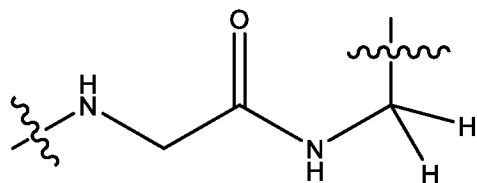
при этом D2 содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в пределах варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2036, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в пределах варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2092.

3. Соединение по п.1, в котором L1 отсутствует; В представляет собой разветвленное звено, содержащее по меньшей мере один аддукт группы В' и группы В'',

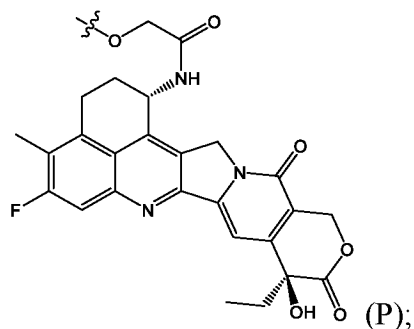
где один из групп В' и В'' выбран из  $-N_3$  и ; а другой из групп В' и В'' выбран из , ; и , где Q представляет собой СН или N;

L2 представляет собой второй линкер, содержащий саморазрушающийся фрагмент и/или ферментативно-лабильный фрагмент;

М представляет фрагмент, имеющий структуру



Dxd представляет собой противоопухолевый агент, имеющий структуру в соответствии с формулой (P):

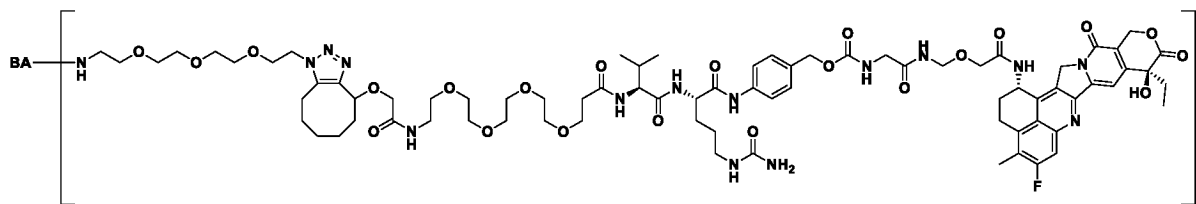


n представляет собой целое число от 1 до 10.

4. Соединение п. 1, в котором остаток глутамина Gln естественным образом присутствует в домене CH2 или CH3 ВА.

5. Соединение по п. 4, в котором Gln представляет собой Q295 или N297Q.

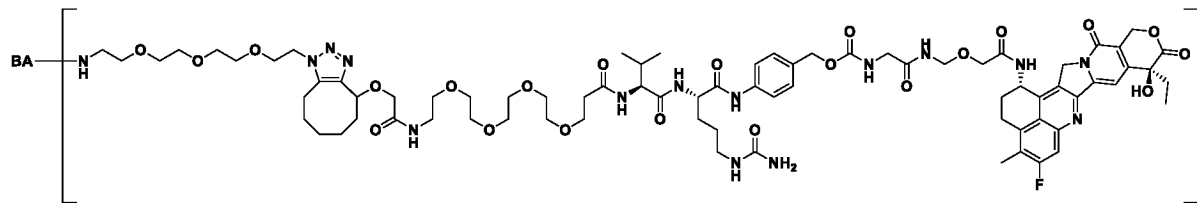
6. Соединение по п.3, где указанное соединение имеет структуру



, где n представляет собой целое число от одного до восьми.

7. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п. 1, и фармацевтически приемлемый носитель.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение, имеющее структуру



где n представляет собой целое число от одного до восьми; и где ВА представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее первый антигенсвязывающий домен (D1) и второй антигенсвязывающий домен (D2);

где D1 специфически связывается с первым эпитопом МЕТ человека; и

где D2 специфически связывается со вторым эпитопом МЕТ человека.



9. Фармацевтическая композиция по п.8, где первый антигенсвязывающий домен D1 биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2014; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2016; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2018; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2094; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2096; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2098; и

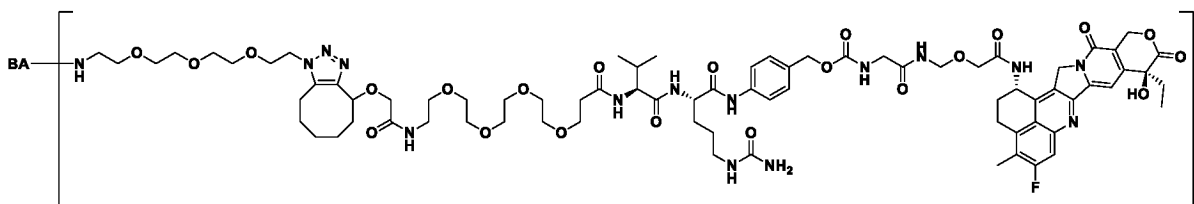
второй антигенсвязывающий домен D2 биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2038; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2040; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2042; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2094; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2096; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2098.

10. Применение соединения по любому из пп. 1-6 в лечении рака у субъекта, страдающего от опухоли связанной или опосредованной экспрессией или активностью MET или пролиферацией клеток MET+.

11. Применение по п.10, где рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака почки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака матки и рака яичников.

12. Применение по п.11, где рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

13. Применение по п.10, где указанное соединение имеет структуру



где n представляет собой целое число от одного до восьми; и где ВА представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее первый антигенсвязывающий домен (D1) и второй антигенсвязывающий домен (D2);

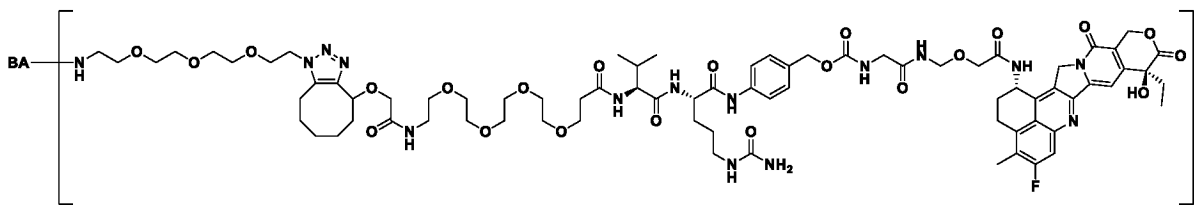
где D1 специфически связывается с первым эпитопом МЕТ человека; и

где D2 специфически связывается со вторым эпитопом МЕТ человека.

14. Применение по п.13, где первый антигенсвязывающий домен D1 биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2014; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2016; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2018; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2094; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2096; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2098; и

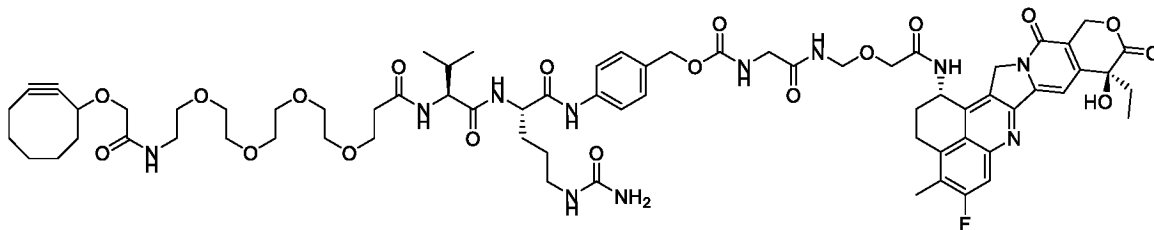
второй антигенсвязывающий домен D2 биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2038; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2040; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2042; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2094; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2096; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2098.

15. Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство, имеющего формулу

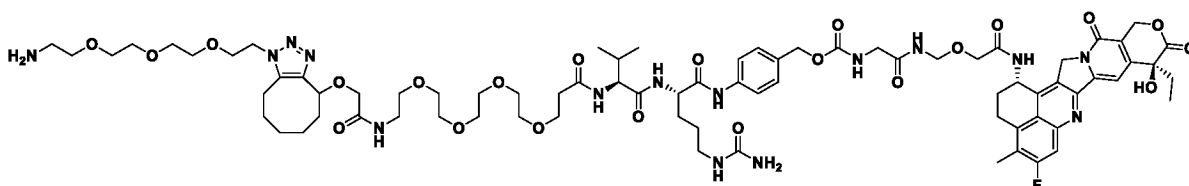


включающий стадии

а). приведение в контакт соединения, имеющего структуру



(M2980), с соединением  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3\text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{N}_3$  с получением промежуточного соединения



; а затем

b). воздействие на указанное промежуточное соединение ВА в присутствии микробной транскламиназы с получением указанного конъюгата антитело-лекарственное средство,

где ВА представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее первый антигенсвязывающий домен (D1) и второй антигенсвязывающий домен (D2);

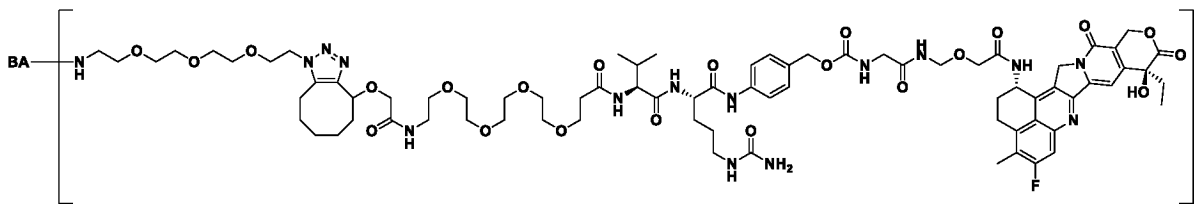
где D1 специфически связывается с первым эпитопом MET человека; и

где D2 специфически связывается со вторым эпитопом MET человека.

16. Способ по п.15, где D1 содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в пределах переменной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2012, и три определяющие комплементарность области легкой цепи ((LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в пределах переменной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2092; и

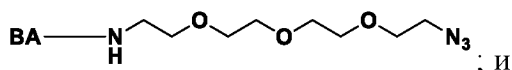
при этом D2 содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в пределах переменной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2036, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в пределах переменной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2092.

17. Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство, имеющего формулу

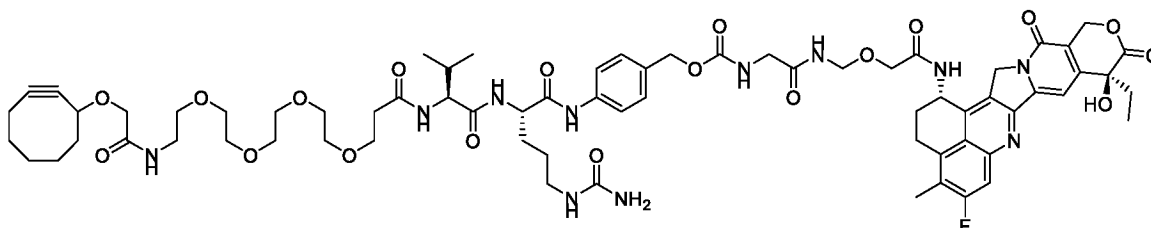


включающий стадии

а). воздействие  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{N}_3$  (M404) на ВА в присутствии микробной трансглутаминазы с получением промежуточного антитела, имеющего структуру



б) приведение в контакт указанного промежуточного соединения с соединением, имеющим структуру



(M2980) с получением указанного конъюгата антитело-лекарственное средство, где ВА представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее первый антигенсвязывающий домен (D1) и второй антигенсвязывающий домен (D2);

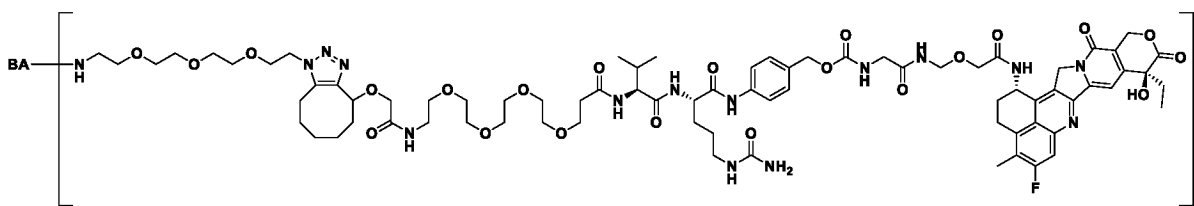
где D1 специфически связывается с первым эпитопом MET человека; и

где D2 специфически связывается со вторым эпитопом MET человека.

18. Способ по п.17, где D1 содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в пределах варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2012, и три определяющие комплементарность области легкой цепи ((LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в пределах варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2092; и

при этом D2 содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в пределах варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2036, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в пределах варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2092.

19. Соединение, имеющее структуру согласно формуле



где n представляет собой целое число от одного до восьми; где BA представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее первый антигенсвязывающий домен (D1) и второй антигенсвязывающий домен (D2);

где D1 специфически связывается с первым эпитопом MET человека; и

где D2 специфически связывается со вторым эпитопом MET человека,

где D1 содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в пределах варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2012, и три определяющие комплементарность области легкой цепи ((LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в пределах варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2092; и

при этом D2 содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в пределах варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2036, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в пределах варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2092.

20. Соединение по п.19, где D1 содержит: HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2012 или аминокислотную последовательность,

которая по меньшей мере на 95% идентична ей; и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2092 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична ей.

21. Соединение по п.20, где D1 содержит: HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2012; и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2092.

22. Соединение по п.19, где D2 содержит: HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2036 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична ей; и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2092 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична ей.

23. Соединение по п.22, где D2 содержит: HCVR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2036; и LCVR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2092.

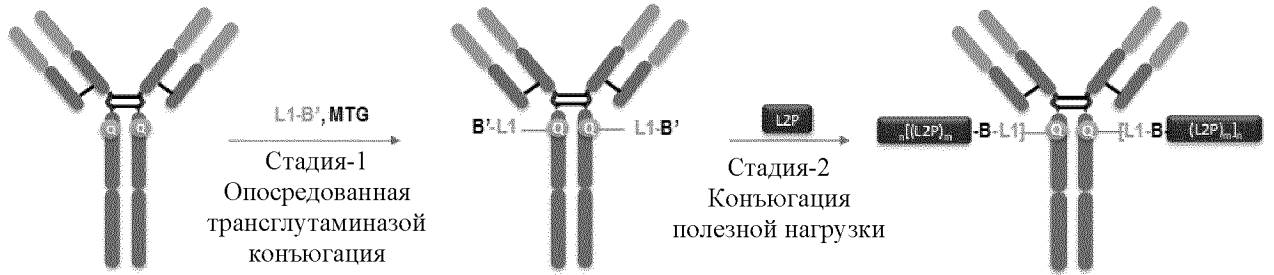
24. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по п.19 и фармацевтически приемлемый носитель.

25. Применение соединения по любому из пп. 19-23 в лечении рака у субъекта, страдающего от опухоли связанной или опосредованной экспрессией или активностью MET или пролиферацией клеток MET+.

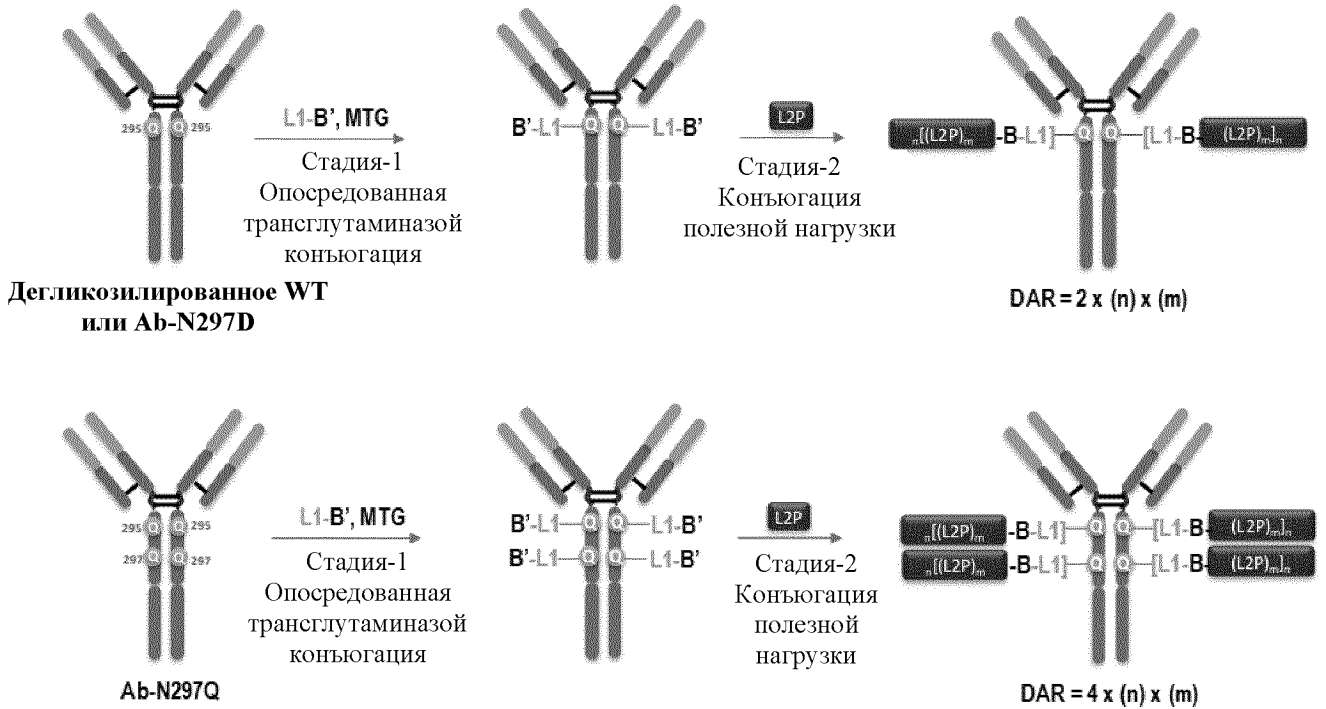
26. Применение по п.25, где рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака почки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака матки и рака яичников.

27. Применение по п.26, где рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

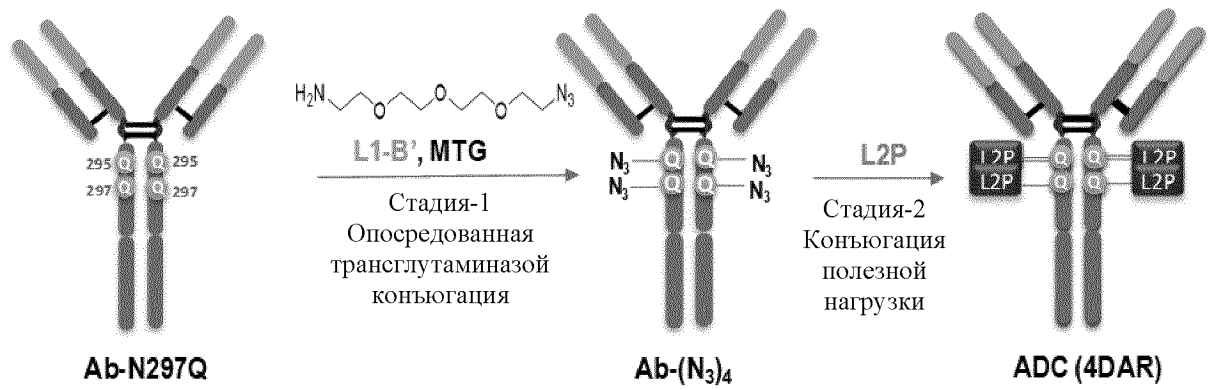
**ФИГУРА 1**




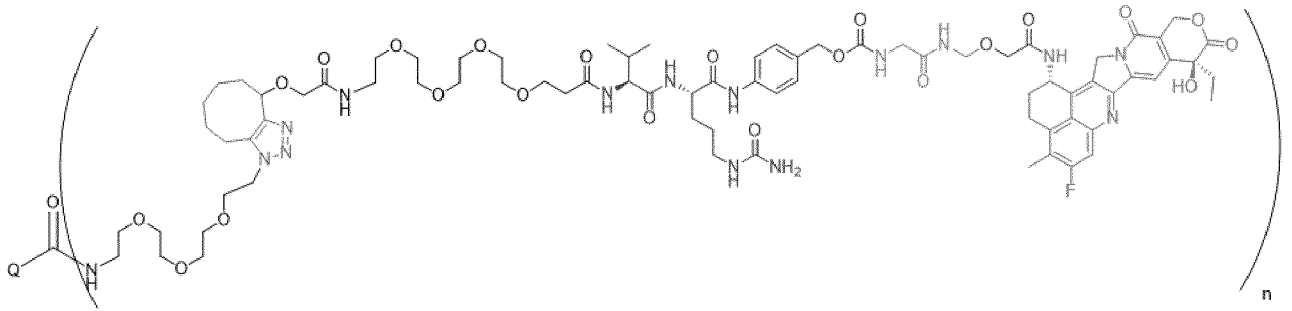
**ФИГУРА 2**



ФИГУРА 3А

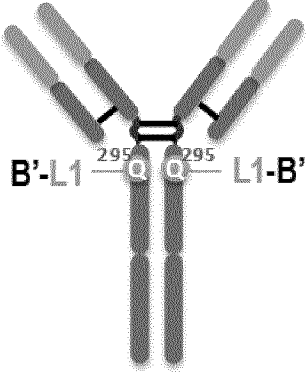
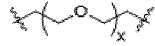
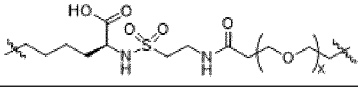
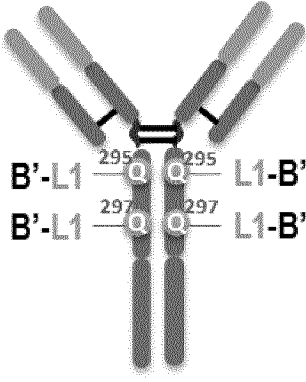
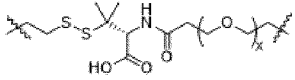
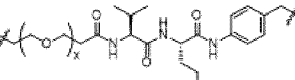
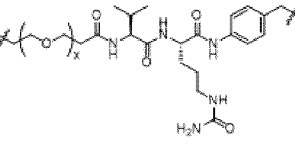


Каждый Q —  =

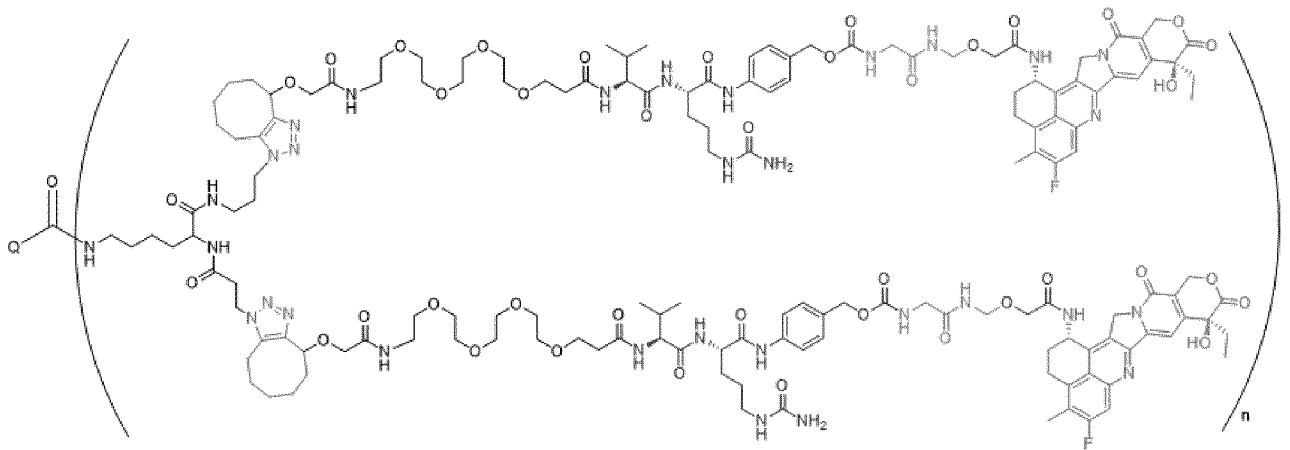
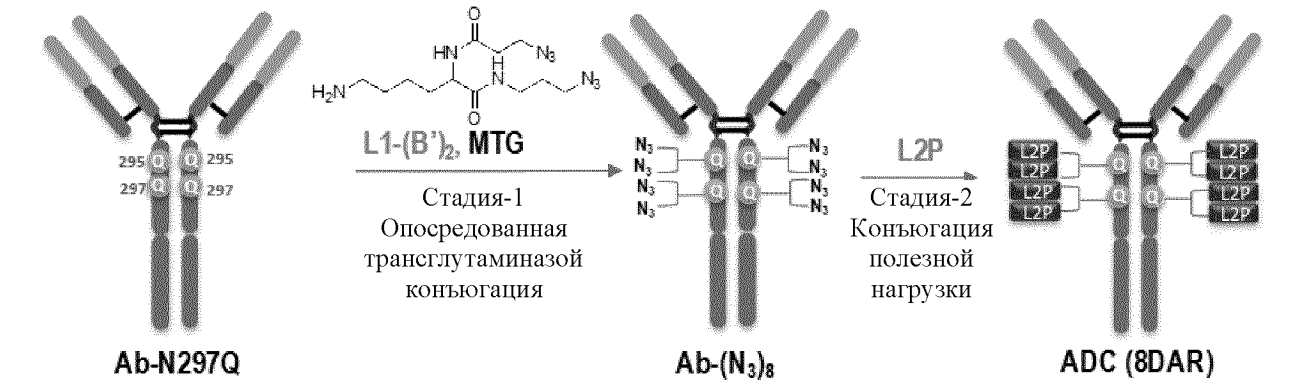




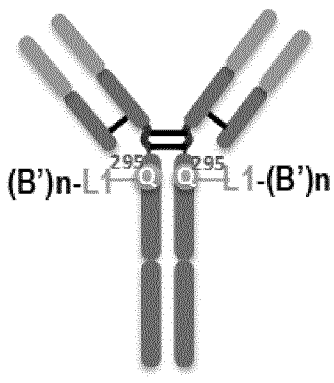
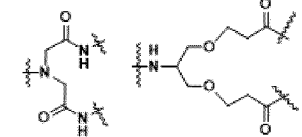
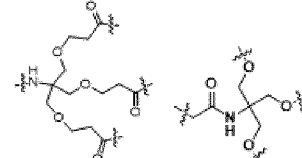
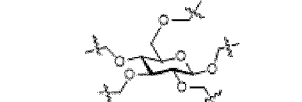
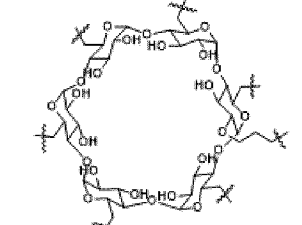
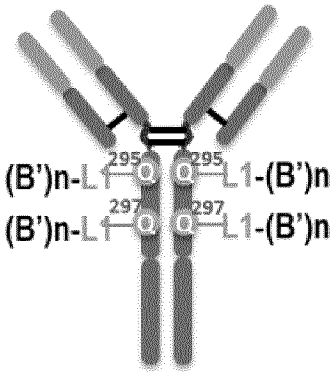
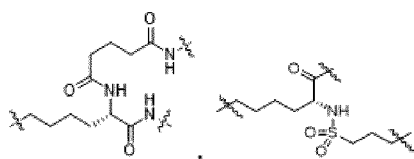
ФИГУРА 3В

Общая структура	DAR	L1-B'	
		L1	B'
 <p>B'-L1 — Q<sup>295</sup> — L1-B'</p> <p>Q<sup>295</sup> — L1-B'</p>	2	Пептиды 	-N <sub>3</sub>
			
 <p>B'-L1 — Q<sup>295</sup> — L1-B'</p> <p>Q<sup>297</sup> — L1-B'</p>	4		
			
			

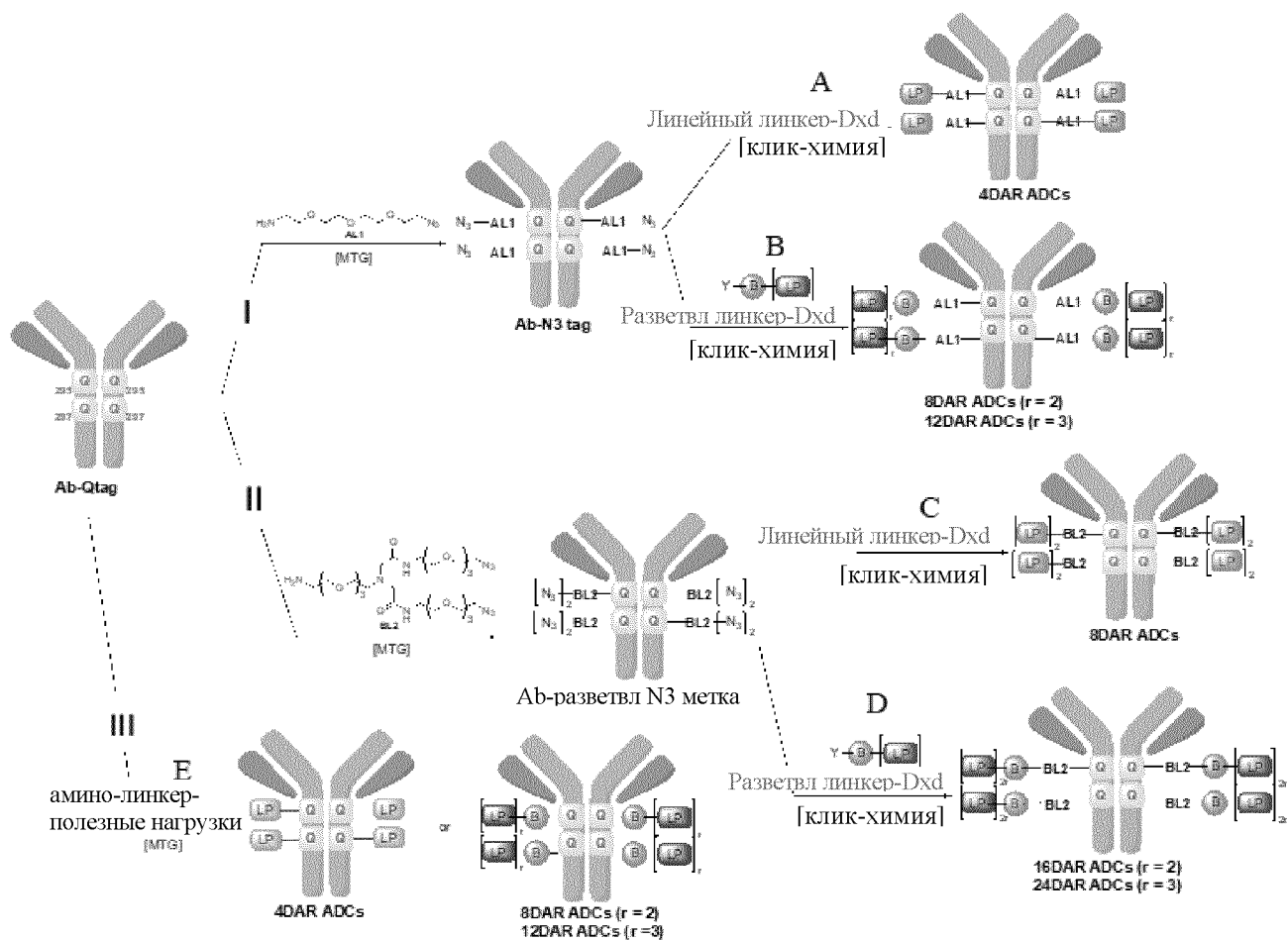
ФИГУРА 4А



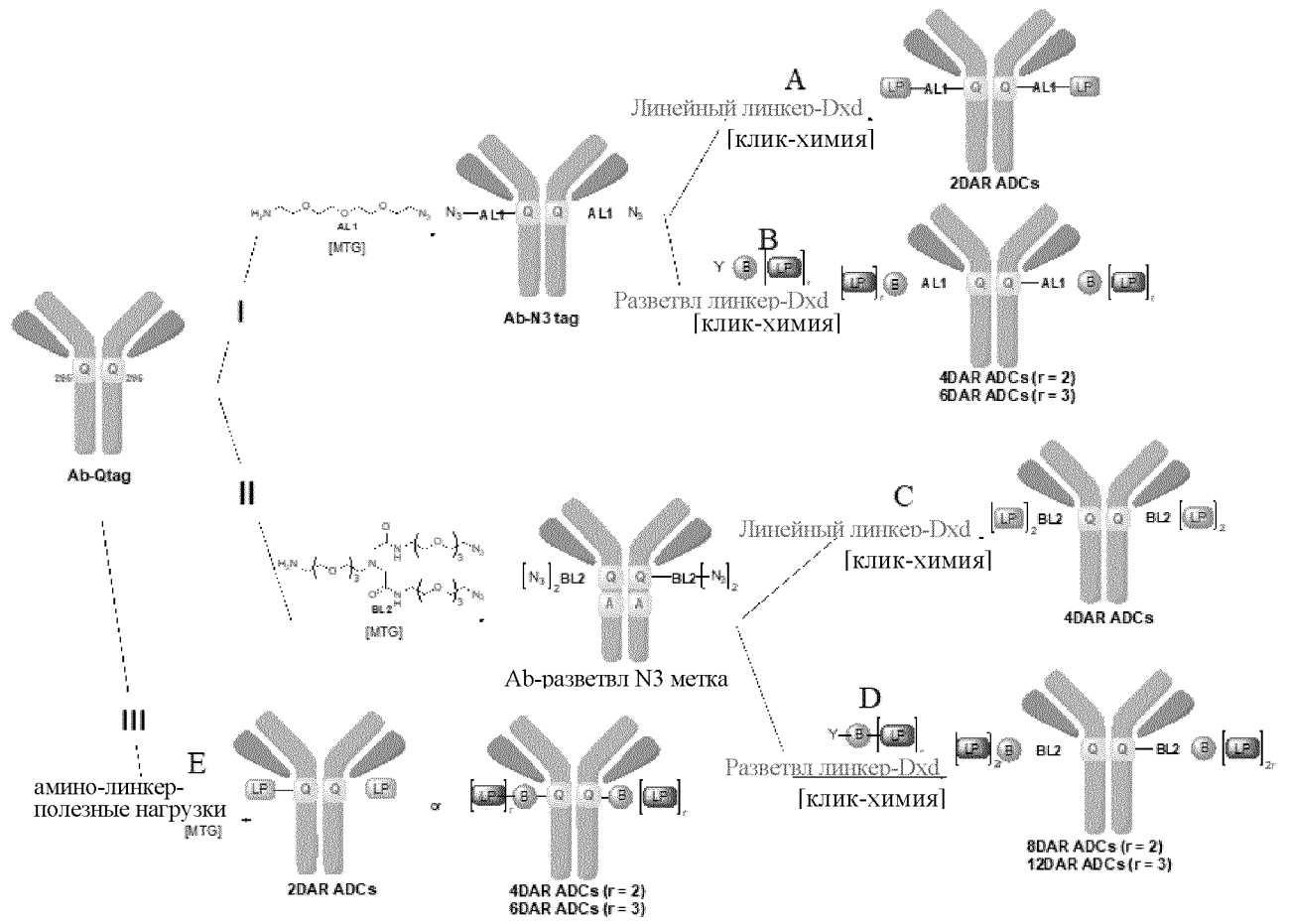
ФИГУРА 4В

Общая структура	группа	n	L1
 <p>(B')n-L1<sup>295</sup>—O—O<sup>295</sup>—L1-(B')n</p>	A	2	
	B	3	
	C	4	
	D	6	
 <p>(B')n-L1<sup>295</sup>—O—O<sup>295</sup>—L1-(B')n (B')n-L1<sup>297</sup>—O—O<sup>297</sup>—L1-(B')n</p>	E		

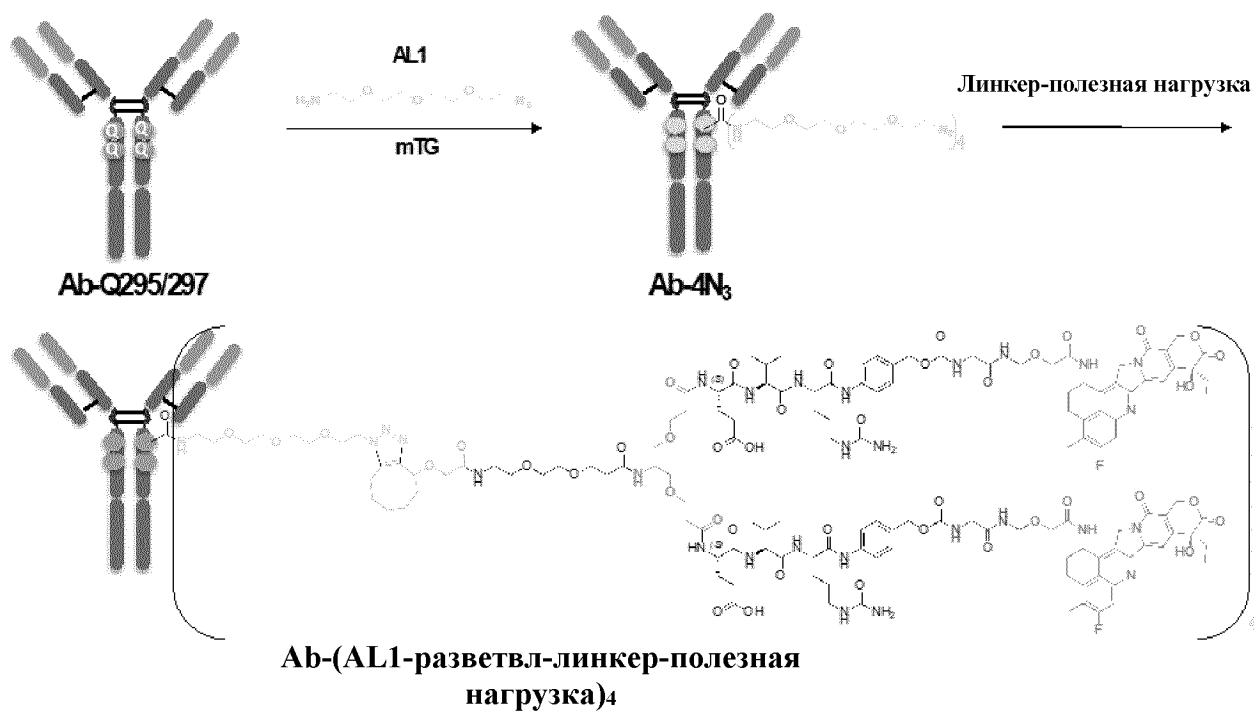
ФИГУРА 5



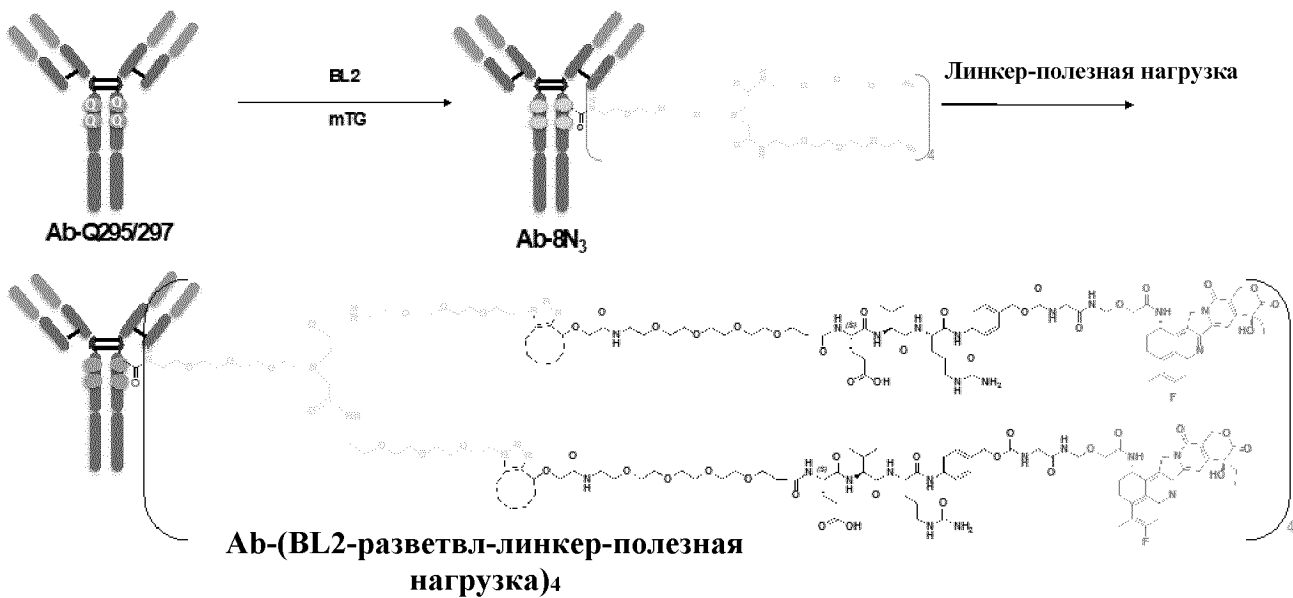
ФИГУРА 6



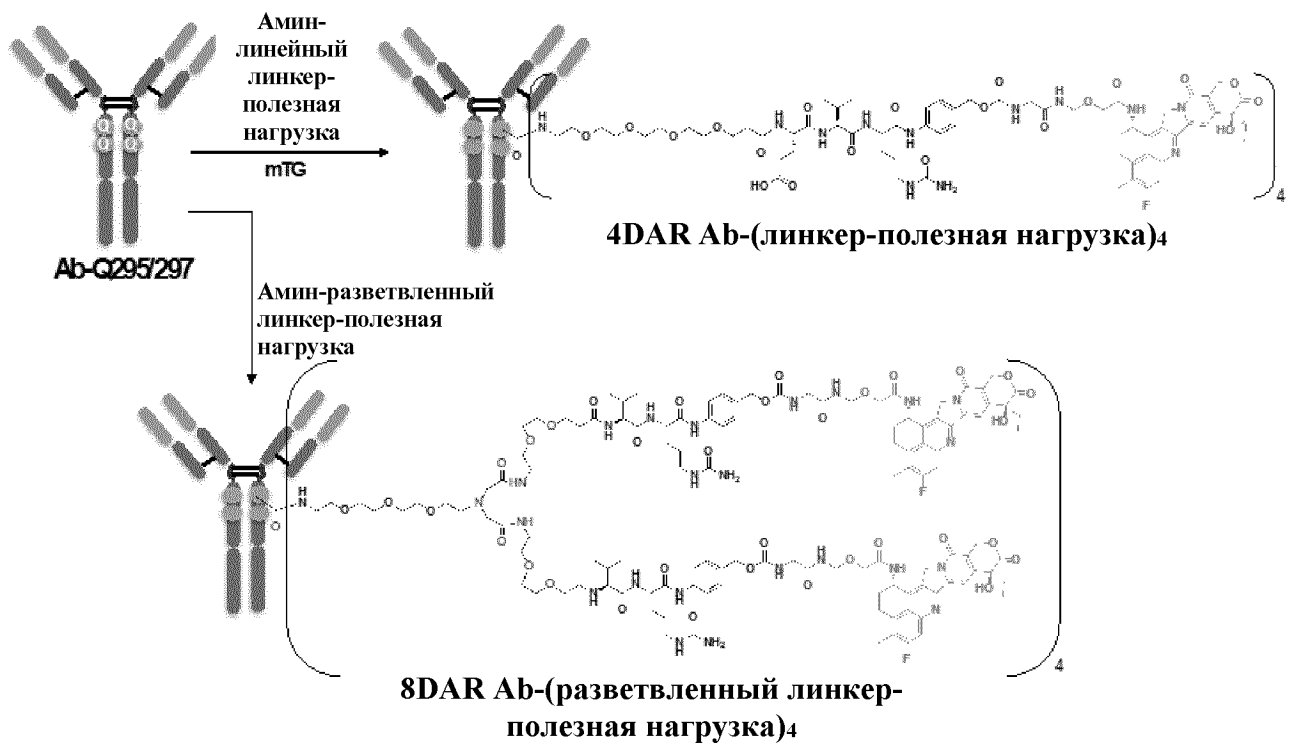
ФИГУРА 7А



ФИГУРА 7В

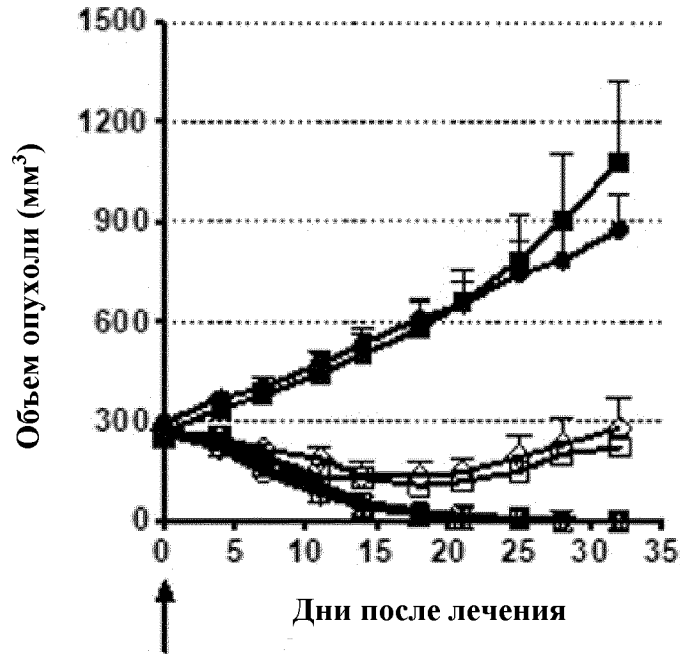


ФИГУРА 7С



## ФИГУРА 8А

SNU-16, FGFR2-амплифицированный рак желудка

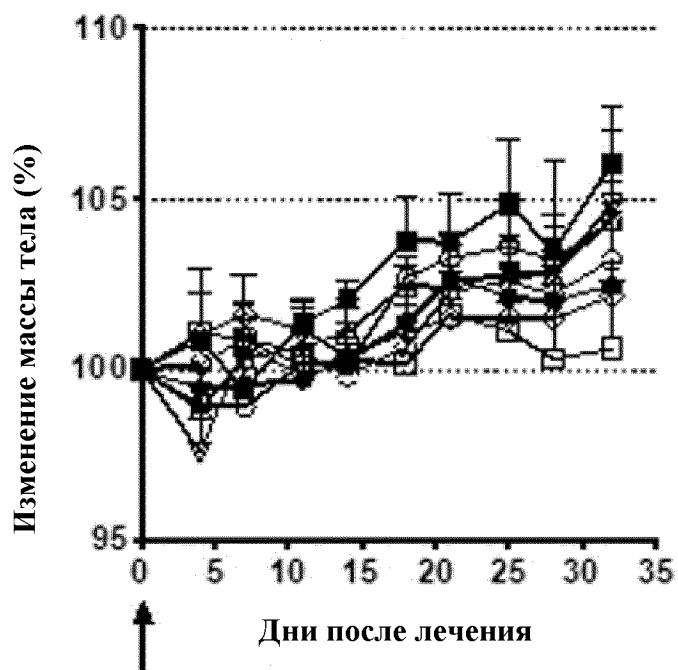


- ⊞ FGFR2b-2-BL7-LP1 (1 мг/кг)
- ⊟ FGFR2b-2-BL7-LP1 (3 мг/кг)
- ⊠ FGFR2b-2-BL7-LP1 (10 мг/кг)
- ⊡ FGFR2b-1-BL7-LP1 (1 мг/кг)
- ⊣ FGFR2b-1-BL7-LP1 (3 мг/кг)
- ⊥ FGFR2b-1-BL7-LP1 (10 мг/кг)
- ◆ Контроль -BL7-LP1 (10 мг/кг)
- Контроль носителем



## ФИГУРА 8В

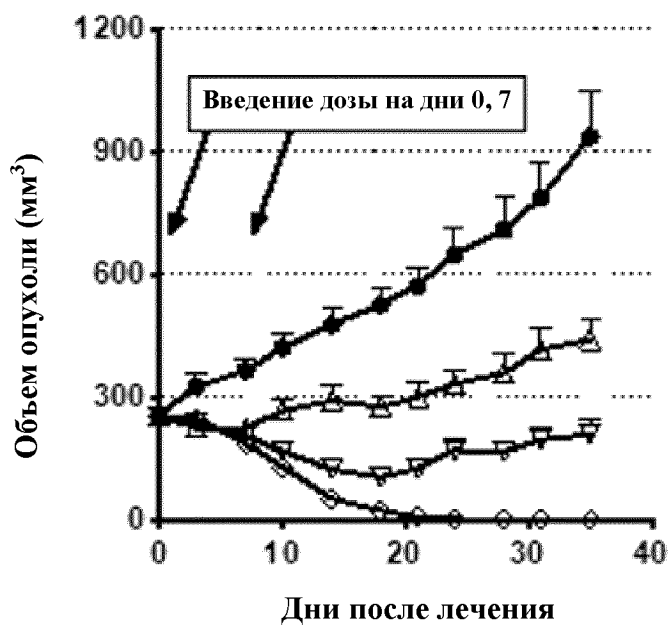
Мыши, несущие опухоль SNU-16



- ⊖ FGFR2b-2-BL7-LP1 (1 мг/кг)
- ⊕ FGFR2b-2-BL7-LP1 (3 мг/кг)
- ⊖ FGFR2b-2-BL7-LP1 (10 мг/кг)
- ⊕ FGFR2b-1-BL7-LP1 (1 мг/кг)
- ⊖ FGFR2b-1-BL7-LP1 (3 мг/кг)
- ⊕ FGFR2b-1-BL7-LP1 (10 мг/кг)
- Контроль -BL7-LP1 (10 мг/кг)
- Контроль носителем

## ФИГУРА 9А

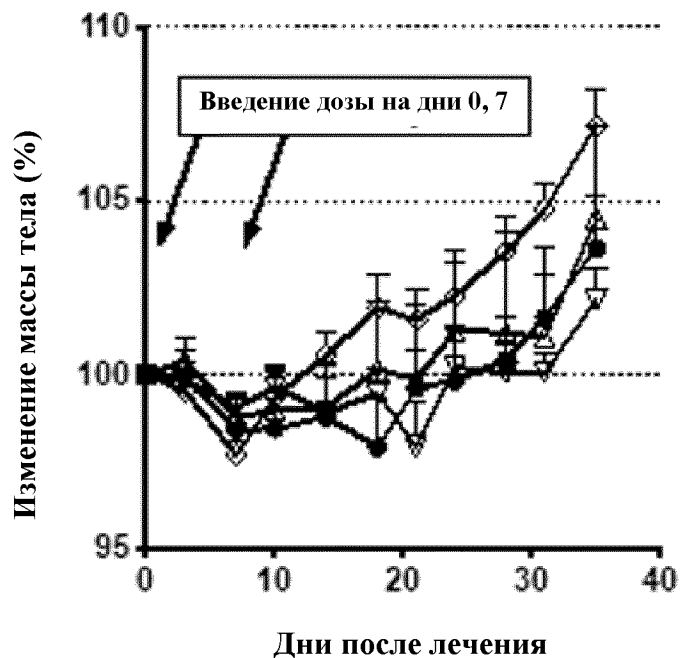
SNU-16, FGFR2-амплифицированный рак желудка



- ▣ FGFR2b-1-AL1-LP1 (0,3 мг/кг)
- ▾ FGFR2b-1-AL1-LP1 (1 мг/кг)
- ◇ FGFR2b-1-AL1-LP1 (3 мг/кг)
- Control-AL1-LP1 (3 мг/кг)

## ФИГУРА 9В

Мыши, несущие опухоль SNU-16



- △ FGFR2b-1-AL1-LP1 (0,3 мг/кг)
- FGFR2b-1-AL1-LP1 (1 мг/кг)
- FGFR2b-1-AL1-LP1 (3 мг/кг)
- Control-AL1-LP1 (3 мг/кг)

D1

	D2																
	H4H13290P2	H4H13291P2	H4H13295P2	H4H13300P2	H4H13299P2	H4H13301P2	H4H13302P2	H4H13306P2	H4H13309P2	H4H13311P2	H4H13312P2	H4H13313P2	H4H13316P2	H4H13318P2	H4H13319P2	H4H13325P2	H4H13331P2
H4H13290P2		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
H4H13291P2	17		18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
H4H13295P2	33	34		35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
H4H13300P2	49	50	51		52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
H4H13299P2	65	66	67	68		69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
H4H13301P2	81	82	83	84	85		86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
H4H13302P2	97	98	99	100	101	102		103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
H4H13306P2	113	114	115	116	117	118	119		120	121	122	123	124	125	126	127	128
H4H13309P2	129	130	131	132	133	134	135	136		137	138	139	140	141	142	143	144
H4H13311P2	145	146	147	148	149	150	151	152	153		154	155	156	157	158	159	160
H4H13312P2	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170		171	172	173	174	175	176
H4H13313P2	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187		188	189	190	191	192
H4H13316P2	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204		205	206	207	208
H4H13318P2	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221		222	223	224
H4H13319P2	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238		239	240
H4H13325P2	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255		256
H4H13331P2	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	