

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490582 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.08.06

(51) Int. Cl. A61K 47/68 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.11.09

(54) КОНЬЮГАТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ФРАГМЕНТ С ФОСФОРом (V) И ФРАГМЕНТ  
КАМПТОТЕЦИНА

(31) 21207284.7

(32) 2021.11.09

(33) EP

(86) PCT/EP2022/081371

(87) WO 2023/083919 2023.05.19

(71) Заявитель:  
ТУБУЛИС ГМБХ (DE)

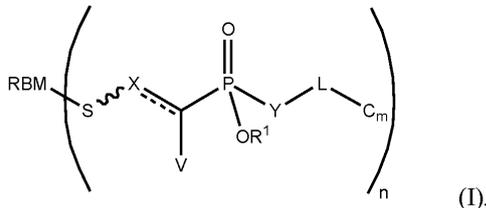
(72) Изобретатель:

Каспер Марк-Андре, Мачуи Пол, Май  
Изабелле, Фогль Аннетте, Шмитт  
Заскиа, Шумахер Доминик, Хельма-  
Сметс Йонас (DE)

(74) Представитель:

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

(57) Настоящее изобретение относится к конъюгату, имеющему формулу (I)



где рецепторсвязывающая молекула (RBM) связана с фрагментом камптотецина (C). Настоящее изобретение также относится к промежуточным соединениям для их получения, способам их получения, содержащим их фармацевтическим композициям, а также их применениям.

A1

202490582

202490582

A1

## КОНЬЮГАТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ФРАГМЕНТ С ФОСФОРОМ (V) И ФРАГМЕНТ КАМПТОТЕЦИНА

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании европейской патентной заявки № 21207284,7, поданной 9 ноября 2021 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к конъюгатам рецепторсвязывающей молекулы с фрагментом камптотецина, промежуточным соединениям для их получения, способам их получения, содержащим их фармацевтическим композициям, а также к их применениям.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) представляют собой биотерапевтические средства, которые сочетают в себе цитотоксические молекулы с нацеливающим свойством антител, направленным на специфическое уничтожение раковых клеток. Классом лекарственных средств, применение которых в ADC изучалось, являются камптотецин и его производные. Камптотецин и его производные вызвали значительный интерес, поскольку они действуют как ингибиторы топоизомеразы I. Примеры ADC камптотецина и его производных были описаны, например, в Han et al., “*The Potential of Topoisomerase Inhibitor-Based Antibody-Drug Conjugates*”, *Pharmaceutics* 2022, 14, 1701, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081707>; Conilh et al., “*Exatecan Antibody Drug Conjugates Based on a Hydrophilic Polysarcosine Drug-Linker Platform*”, *Pharmaceutics* 2021, 14, 247, <https://doi.org/10.3390/ph14030247>; WO 2020/245229; WO 2019/236954; Burke et al., “*Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Antibody-Drug Conjugates Comprised of Potent Camptothecin Analogs*”, *Bioconjugate Chem.* 2009, 20, 1242-1250, doi: 10.1021/bc9001097; и Viricel et al., “*Monodisperse polysarcosine-based highly-loaded antibody-drug conjugates*”, *Chemical Science*, 2019, 10, 4048-4053, doi: 10.1039/c9sc00285e).

ADC производного камптотецина, который привлек большое внимание, представляет собой ADC антитела к Her2 трастузумаба с дерукстеканом. Этот ADC одобрен для медицинского применения, он также известен как DS-8201a и продается под торговым наименованием Enhertu. Этот ADC описан Ogitani et al., “*DS-8201a, A Novel HER2-Targeting*

*ADC with a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor, Demonstrates a Promising Antitumor Efficacy with Differentiation from T-DMI*”, *Clinical Cancer Research* (22)20, October 15, 2016, pp. 5097-5108 (DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2822).

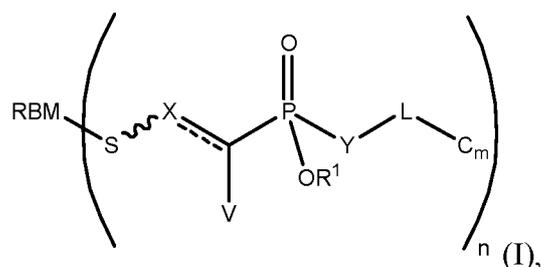
Enhertu первоначально был одобрен для лечения солидных опухолей, а именно Her2+ рака молочной железы и колоректального рака. Совсем недавно было обнаружено, что Enhertu меняет парадигму таргетного лечения Her2-позитивного рака молочной железы, поскольку он демонстрирует весьма многообещающие результаты у пациентов даже с низким уровнем экспрессии Her2, которые ранее считались неподходящими для таргетного лечения Her2 (см., например, Siddiqui et al., “*Enhertu (Fam-trastuzumab-deruxtecan-nxki) – Revolutionizing treatment paradigm for HER2-Low breast cancer*”, *Annals of Medicine and Surgery* 82 (2022) 104665; <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.104665>). Хотя Enhertu является одобренным и продаваемым ADC, у него все еще остаются определенные недостатки. В частности, оказалось, что Enhertu обладает сравнительно низкой стабильностью в сыворотке. Кроме того, нецелевая токсичность Enhertu по-прежнему является часто наблюдаемой проблемой при терапевтических применениях. Многие причины этого могут быть связаны с недостатками линкерной системы между полезной нагрузкой и антителом (Mckertish et al., “*Advances and Limitations of Antibody Drug Conjugates for Cancer*”, *Biomedicines* 2021, 9, 872; <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080872>). Например, поглощение ADC нецелевыми клетками из-за мембранного взаимодействия с гидрофобной структурой линкера-полезной нагрузки или образование агрегатов в виде частиц с более высокой молекулярной массой, вызванное гидрофобностью полезной нагрузки, вероятно, приводит к нецелевой токсичности у пациента. Более того, преждевременное высвобождение полезной нагрузки из ADC и передача ее белкам сыворотки может дополнительно привести к нецелевым побочным эффектам. Сочетание этих эффектов может привести к опасным для жизни побочным эффектам, таким как интерстициальное заболевание легких или снижение количества лейкоцитов, в частности нейтрофилов, оба из которых являются наиболее распространенными тяжелыми побочными эффектами, описанными для Enhertu.

Соответственно, все еще существует потребность в дополнительных конъюгатах, содержащих фрагмент камптотецина в качестве лекарственного средства, в частности в конъюгатах, которые демонстрируют улучшенную стабильность в сыворотке или демонстрируют другие улучшения по сравнению с Enhertu.

## **КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Эта потребность удовлетворяется предметом настоящего изобретения, определенным в формуле изобретения и в воплощениях, описанных в настоящем документе.

Соответственно, настоящее изобретение относится к конъюгату, имеющему формулу (I):



или его фармацевтически приемлемой соли, или сольвату;

где:

RBM представляет собой рецепторсвязывающую молекулу;

$\equiv$  представляет собой двойную связь; или

$\equiv$  представляет собой связь;

V отсутствует, когда  $\equiv$  представляет собой двойную связь; или

V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил, когда  $\equiv$  представляет собой связь;

X представляет собой R<sub>3</sub>-C, когда  $\equiv$  представляет собой двойную связь; или

X представляет собой  $\begin{matrix} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{matrix}$ , когда  $\equiv$  представляет собой связь;

Y представляет собой NR<sup>5</sup>, S, O или CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>;

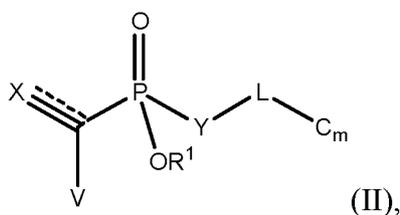
R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>3</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>4</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

- $R^5$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^6$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^7$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- L представляет собой линкер;
- C представляет собой фрагмент камптотецина;
- m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10; и
- n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20.

Настоящее изобретение также относится к соединению, имеющему формулу (II):



или его фармацевтически приемлемой соли, или сольвату;

где:

 представляет собой тройную связь; или

 представляет собой двойную связь;

V отсутствует, когда  представляет собой тройную связь; или

V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, когда  представляет собой двойную связь;

X представляет собой R<sub>3</sub>-C, когда  представляет собой тройную связь; или

X представляет собой  $\begin{matrix} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{matrix}$ , когда  представляет собой двойную связь;

Y представляет собой NR<sup>5</sup>, S, O или CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>;

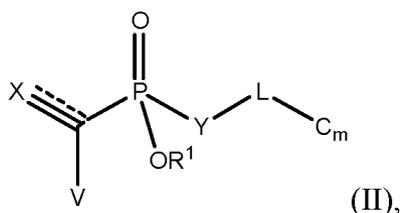
R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>3</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

- $R^4$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^5$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^6$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^7$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- L представляет собой линкер;
- C представляет собой фрагмент камптотецина; и
- m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10.

Настоящее изобретение также относится к способу получения конъюгата формулы (I), где указанный способ включает:

проведение реакции соединения формулы (II)



или его фармацевтически приемлемой соли, или сольвата;

где:

представляет собой тройную связь; или

представляет собой двойную связь;

V отсутствует, когда представляет собой тройную связь; или

V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, когда представляет собой двойную связь;

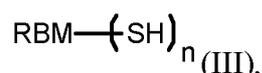
X представляет собой R<sub>3</sub>-C, когда представляет собой тройную связь; или

X представляет собой  $\begin{matrix} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{matrix}$ , когда представляет собой двойную связь;

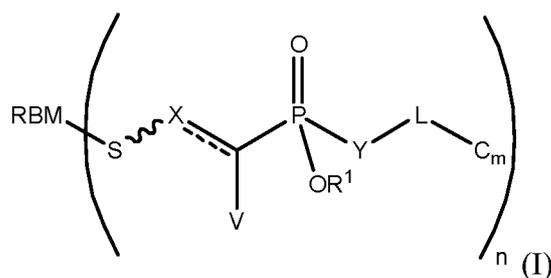
Y представляет собой NR<sup>5</sup>, S, O или CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>;

R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток;

- $R^3$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^4$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^5$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^6$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^7$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- L представляет собой линкер;
- C представляет собой фрагмент камптотецина; и
- m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10;
- с тиолсодержащей молекулой формулы (III)



- где RBM представляет собой рецепторсвязывающую молекулу; и
- n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20;
- с получением в результате соединения формулы (I)



или его фармацевтически приемлемой соли, или сольвата;

где:

представляет собой двойную связь, когда в соединении формулы (II) представляет собой тройную связь; или

представляет собой связь, когда в соединении формулы (II) представляет собой двойную связь;

V отсутствует, когда представляет собой двойную связь; или

V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, когда  представляет собой связь;

X представляет собой R<sub>3</sub>-C, когда  представляет собой двойную связь; или

X представляет собой  $\begin{array}{c} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{array}$ , когда  представляет собой связь;

Y представляет собой NR<sup>5</sup>, S, O или CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>;

R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>3</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>4</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>5</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>6</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>7</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

L представляет собой линкер;

C представляет собой фрагмент камптотецина;

m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10; и

n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20.

Настоящее изобретение также относится к конъюгату формулы (I), который может быть получен или который получают способом согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгат согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к конъюгату согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения заболевания. Заболевание может представлять собой рак. Рак может представлять собой солидную опухоль.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения заболевания. Заболевание может представлять собой рак. Рак может представлять собой солидную опухоль.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

На **фигуре 1** представлена хроматограмма аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) соединения метил-4-азидо-2-(додекаэтиленгликоль)бензоата. На горизонтальной оси представлено время удерживания в минутах.

На **фигуре 2** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения метил-4-азидо-2-(додекаэтиленгликоль)бензоата. На горизонтальной оси представлено время удерживания в минутах.

На **фигуре 3** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG12)-COOH.

На **фигуре 4** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG24)-OSu. На горизонтальной оси указано время удерживания в минутах.

На **фигуре 5** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG12,PEG24)-COOH. На горизонтальной оси указано время удерживания в минутах.

На **фигуре 6** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG24,PEG24)-COOH. На горизонтальной оси указано время удерживания в минутах.

На **фигуре 7** представлена хроматограмма аналитической HPLC соли трифторуксусной кислоты (TFA) соединения NH<sub>2</sub>-VC-PAВ-экзатекана.

На **фигуре 8** представлена хроматограмма аналитической HPLC соли TFA соединения NH<sub>2</sub>-VC-PAВ-экзатекана.

На **фигуре 9** представлена хроматограмма аналитической HPLC изомера А соединения NH<sub>2</sub>-VA-экзатекана.

На **фигуре 10** представлена хроматограмма аналитической HPLC изомера В соединения NH<sub>2</sub>-VA-экзатекана.

На **фигуре 11** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG2)-VC-PAВ-экзатекана.

На **фигуре 12** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG12)-VC-PAВ-экзатекана.

На **фигуре 13** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана.

На **фигуре 14** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG12)-VA-PAВ-экзатекана.

На **фигуре 15** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG12)-VA-экзатекана из изомера А.

На **фигуре 16** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG12)-BA-экзатекана из изомера В.

На **фигуре 17** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG12)-экзатекана.

На **фигуре 18** представлена хроматограмма аналитической SEC трастузумаба. SEC означает эксклюзионную хроматографию.

На **фигуре 19** представлена хроматограмма аналитической HIC трастузумаба. HIC означает хроматографию гидрофобного взаимодействия.

На **фигуре 20** представлена хроматограмма аналитической SEC брентуксимаба.

На **фигуре 21** представлена хроматограмма аналитической HIC брентуксимаба.

На **фигуре 22** представлена хроматограмма аналитической SEC паливизумаба.

На **фигуре 23** представлена хроматограмма аналитической HIC паливизумаба.

На **фигуре 24** представлена хроматограмма аналитической SEC трастузумаб-P5(PEG12)-VC-PAВ-экзатекана.

На **фигуре 25** представлена хроматограмма аналитической HIC трастузумаб-P5(PEG12)-VC-PAВ-экзатекана.

На **фигуре 26** представлена хроматограмма аналитической SEC трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана.

На **фигуре 27** представлена хроматограмма аналитической HIC трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана.

На **фигуре 28** представлена хроматограмма аналитической SEC трастузумаб-P5(PEG12)-VA-PAВ-экзатекана.

На **фигуре 29** представлена хроматограмма аналитической HIC трастузумаб-P5(PEG12)-VA-PAВ-экзатекана.

На **фигуре 30** представлена хроматограмма аналитической SEC трастузумаб-P5(PEG12)-VA-PAВ-экзатекана.

На **фигуре 31** представлена хроматограмма аналитической HIC трастузумаб-P5(PEG12)-VA-PAВ-экзатекана.

На **фигуре 32** представлена хроматограмма аналитической SEC трастузумаб-Р5(PEG12)-VA-экзатекана (изомер А).

На **фигуре 33** представлена хроматограмма аналитической НИС трастузумаб-Р5(PEG12)-VA-экзатекана (изомер А).

На **фигуре 34** представлена хроматограмма аналитической SEC трастузумаб-Р5(PEG12)-VA-экзатекана (изомер В).

На **фигуре 35** представлена хроматограмма аналитической НИС трастузумаб-Р5(PEG12)-VA-экзатекана (изомер В).

На **фигуре 36** представлена хроматограмма аналитической SEC брентуксимаб-Р5(PEG12)-VC-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 37** представлена хроматограмма аналитической НИС брентуксимаб-Р5(PEG12)-VC-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 38** представлена хроматограмма аналитической SEC брентуксимаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 39** представлена хроматограмма аналитической НИС брентуксимаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 40** представлена хроматограмма аналитической SEC паливизумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 41** представлена хроматограмма аналитической НИС паливизумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 42** представлены масс-спектрометрические (MS) спектры гликозилированного восстановленного трастузумаба после реакции с различными эквивалентами ТСЕР (наверху) и 15 экв. линкера-полезной нагрузки (Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекан). Расчет DAR по этим спектрам в зависимости от количества ТСЕР представлен на нижнем графике.

На **фигуре 43** представлена цитотоксичность *in vitro* ADC трастузумаба (анти-Her2), связанная с различными конструкциями линкера с полезной нагрузкой на основе экзатекана, на антиген-положительных клеточных линиях (HCC-78, наверху, и SKBR3, внизу слева) и антиген-отрицательной клеточной линии (MDA-MB-468, внизу справа).

На **фигуре 44** представлена цитотоксичность *in vitro* ADC трастузумаба (анти-Her2) (трас-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекан) и несвязывающего контрольного изотипа (пали-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекан) на антиген-положительной клеточной линии (HCC-78).

На **фигуре 45** представлена цитотоксичность *in vitro* ADC брентуксимаба (анти-CD30) (брен-Р5(PEG12)-VC-РАВ-экзатекан) на двух антиген-положительных клеточных линиях (L-540, слева и SU-DHL-1, справа).

На **фигуре 46** представлена цитотоксичность *in vitro* ADC брентуксимаба (анти-CD30) (брен-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекан) на панели антиген-положительных клеточных линий (SR-786, SU-DHL-1, НН, НBLM-2, L-540, MOTN-1) и нецелевой контрольной клеточной линии (HL-60).

На **фигуре 47** представлена оценка эффекта «свидетеля» трастузумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана в прямом сравнении с Enhertu. Цитотоксичность ADC *in vitro* на антиген-положительной клеточной линии (SKBR3, наверху слева) и антиген-отрицательной клеточной линии (MDA-MB-468, наверху справа). Перенос супернатанта после инкубирования SKBR-3 с ADC в MDA-MB-468 осуществляли для оценки уничтожения «свидетеля» (MDA-MB-468, внизу).

На **фигуре 48** представлена относительная количественная оценка фосфорилирования гистона H2A.X (наверху слева), активированной каспазы 3 (наверху справа) и активированного PARP (внизу слева) и жизнеспособности клеток (внизу справа) после обработки клеток SKBR-3 трастузумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатеканом, Enhertu, неконъюгированным экзатеканом или неконъюгированным камптотецином через 1, 2 или 3 дня, по сравнению с отсутствием обработки.

На **фигуре 49** представлено отношение лекарственного средства к антителу у Enhertu и Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана после инкубирования в сыворотке крыс при 37°C в течение 0, 1, 3 и 7 дней. Отношение лекарственного средства к антителу измеряли с помощью MS после удаления ADC из сыворотки.

На **фигуре 50** представлена цитотоксичность ADC трастузумаб-Р5(PEG12)-VC-РАВ-экзатекана (наверху), трастузумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана (в середине) и Enhertu (внизу), измеренная после 0, 1, 3 и 7 суток инкубирования с сывороткой крыс при 37°C на Her2-отрицательной клеточной линии MDA-MB-468 (слева) и Her2-положительной клеточной линии SKBR3 (справа).

На **фигуре 51** представлена цитотоксичность ADC трастузумаб-Р5(PEG12)-VC-РАВ-экзатекана (наверху), трастузумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана (в середине) и Enhertu (внизу), измеренная после 0, 1, 3 и 7 дней инкубирования с сывороткой человека при 37°C на Her2-отрицательной клеточной линии MDA-MB-468 (слева) и Her2-положительной клеточной линии SKBR3 (справа).

На **фигуре 52** представлено количественное определение общих антител в кровотоке после обработки самок крыс Спрег-Дуоли брентуксимаб-P5(PEG12)-VC-PAВ-экзатеканом-DAR8 посредством ELISA.

На **фигуре 53** представлены кривые плавления трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана и Enhertu, определенные с использованием нанодифференциальной сканирующей флуориметрии (nanoDSF).

На **фигуре 54** представлен график для определения равновесных констант связывания ( $K_D$ ) для связывания Enhertu и трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана с внеклеточным Her2, а также полученные значения равновесных констант связывания ( $K_D$ ).

На **фигуре 55** представлен процент агрегатов, образованных при инкубирования ADC антитело-лекарственное средство трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекан, имеющего отношение лекарственного средства к антителу 8 (обозначено как «DAR8») и Enhertu при 37°C и 4°C в темноте через 0, 1, 2 и 4 недели.

На **фигуре 56** представлен процент специфического уничтожения, измеренный в анализе антитело-зависимой клеточной циклотоксичности (ADCC) на основе высвобождения кальцеина с Her2-положительными клетками-мишенями SKBR-3, SKOV-3 и N87 при использовании неконъюгированного трастузумаба, трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8, Enhertu и контрольного изоформа.

На **фигуре 57** представлены результаты исследования интернализации на основе pHrodo с использованием неконъюгированного трастузумаба, трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 и Enhertu с Her2-положительными клетками SKOV-3 и Her2-отрицательными клетками MDA-MB-468.

На **фигуре 58** представлены результаты измерений цитотоксичности *in vitro*, проведенных с использованием трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 и Enhertu с Her2-положительными клетками SKBR-3, N87, HCC-1569, HCC-78, OE-19, SK-GT-2 и SKOV-3.

На **фигуре 59** представлены результаты *in vitro* количества затронутых «свидетелей», измеренного после инкубирования Her2-положительных клеток SKBR3 трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатеканом DAR8 и Enhertu и переноса супернатанта в Her2-отрицательные клетки Karpas-299 и DU-145.

На **фигуре 60** представлены результаты измерений *in vitro* количества затронутых «свидетелей» трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 и Enhertu в совместной

культуре Her2-положительных клеток SKBR-3 и Her2-отрицательных клеток MDA-MB-468.

На **фигуре 61** представлены результаты измерений цитотоксичности, проведенных на эндотелиальных клетках пупочной вены человека, бронхиальных эндотелиальных клетках человека, синусоидальных эндотелиальных клетках печени, шванновских клетках, эпителиальных клетках проксимальных канальцев почек человека, нормальных фибробластах дермы человека, эпителиальных клетках роговицы человека и THLE-3 (гепатоцитах) с использованием трас-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана DAR8, Enhertu и паливизумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана DAR8. Показана циклотоксичность трастузумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана DAR8 по сравнению с паливизумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатеканом DAR8 и Enhertu.

На **фигуре 62** представлены результаты фармакокинетических экспериментов *in vivo*, проведенных с трастузумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатеканом DAR8 у самок мышей SCID, которых обрабатывали 20 мг/кг трастузумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана DAR8 или Enhertu для сравнения.

На **фигуре 63** представлен средний объем опухоли у мышей CB17-Scid, определенный на модели солидной опухоли после обработки Н8-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатеканом DAR8.

На **фигуре 64** представлена масса тела мышей CB17-Scid после обработки Н8-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатеканом DAR8.

На **фигуре 65** представлены результаты фармакокинетических экспериментов *in vivo* (ФК-эксперименты), полученные на самках крыс SD, которых обрабатывали 10 мг/кг Н8-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана DAR8 или немодифицированным антителом Н8.

На **фигуре 66** представлены хроматограммы НИС и SEC трастузумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана DAR4, имеющего средний DAR 4.

На **фигуре 67** представлены результаты фармакокинетических экспериментов *in vivo* (ФК-эксперименты), полученные на самках крыс SD, которых обрабатывали 10 мг/кг трас-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана, имеющего средний DAR 4.

На **фигуре 68** представлены результаты оценки *in vivo* трастузумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана DAR8, имеющего отношение лекарственного средства к антителу, равное 8 (DAR8), в прямом сравнении с Enhertu. Сообщается о первоначальных результатах после нескольких дней наблюдения за ростом опухоли.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение подробно описано ниже и будет также дополнительно проиллюстрировано прилагаемыми примерами и фигурами.

### **Определения**

Если не указано иное, термин «алкил» сам по себе или как часть другого термина в целом относится к замещенному или незамещенному насыщенному углеводороду с прямой или разветвленной цепью, имеющему указанное количество атомов углерода; например, «-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил» или «-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил» относятся к алкильной группе, имеющей от 1 до 8 или от 1 до 10 атомов углерода, соответственно. Когда количество атомов углерода не указано, алкильная группа может иметь от 1 до 8 атомов углерода. Иллюстративные -(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкильные группы с прямой цепью включают, но не ограничиваются ими, -метил, -этил, -н-пропил, -н-бутил, -н-пентил, -н-гексил, -н-гептил и -н-октил; разветвленные -(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкильные группы включают, но не ограничиваются ими, -изопропил, -*втор*-бутил, -изобутил, -*трет*-бутил, -изопентил и -2-метилбутил. В некоторых аспектах алкильная группа может быть незамещенной. Возможно алкильная группа может быть замещена, например, одной или более группами.

Если не указано иное, термин «алкилен» сам по себе или как часть другого термина, как правило, относится к замещенному или незамещенному насыщенному углеводородному радикалу с разветвленной или прямой цепью с указанным числом атомов углерода, предпочтительно 1-10 атомов углерода (-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-) или предпочтительно от 1 до 8 атомов углерода (-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкилен-), и имеющему два одновалентных радикальных центра, образованных удалением двух атомов водорода от одного и того же или двух разных атомов углерода родительского алкана. Если количество атомов углерода не указано, алкиленовая группа может иметь от 1 до 8 атомов углерода. Типичные алкиленовые радикалы включают, но не ограничиваются ими: метилен (-CH<sub>2</sub>-), 1,2-этилен (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,3-н-пропилен (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) и 1,4-н-бутилен (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-). В некоторых аспектах алкиленовая группа может быть незамещенной. Возможно алкиленовая группа может быть замещена, например, одной или более группами.

Если не указано иное, термин «алкенил» сам по себе или как часть другого термина в целом относится к замещенному или незамещенному ненасыщенному углеводороду с прямой или разветвленной цепью, имеющему двойную связь и указанное количество атомов углерода; например, «-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенил» или «-(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкенил» относятся к алкенильной группе, имеющей от 2 до 8 или от 2 до 10 атомов углерода соответственно). Когда количество атомов углерода не указано, алкенильная группа может иметь от 2 до 8

атомов углерода. Иллюстративные  $-(C_2-C_8)$ алкенильные группы включают, но не ограничиваются ими, -этинил, -1-пропенил, -2-пропенил, -1-бутенил, -2-бутенил, -изобутенил, -1-пентенил, -2-пентенил, -3-метил-1-бутенил, -2-метил-2-бутенил и -2,3-диметил-2-бутенил. В некоторых аспектах алкенильная группа может быть незамещенной. Алкенильная группа возможно может быть замещена, например, одной или более группами.

Если не указано иное, термин «алкенилен» сам по себе или как часть другого термина, как правило, относится к замещенному или незамещенному ненасыщенному углеводородному радикалу с разветвленной или прямой цепью с указанным числом атомов углерода, предпочтительно 2-10 атомов углерода ( $-(C_2-C_{10})$ алкенилен-) или предпочтительно от 2 до 8 атомов углерода ( $-(C_2-C_8)$ алкенилен-), имеющему двойную связь и имеющему два одновалентных радикальных центра, полученных удалением двух атомов водорода из одного и того же или двух разных атома углерода родительского алкена. Если количество атомов углерода не указано, алкениленовая группа может иметь от 2 до 8 атомов углерода. Типичные алкениленовые радикалы включают, но не ограничиваются ими: -этилен-, -1-пропенилен-, -2-пропенилен-, -1-бутенилен-, -2-бутенилен-, -изобутенилен-, -1-пентенилен-, -2-пентенилен-, -3-метил-1-бутенилен-, -2-метил-2-бутенилен- и -2,3-диметил-2-бутенилен-. В некоторых аспектах алкениленовая группа может быть незамещенной. Возможно алкениленовая группа может быть замещена, например, одной или более группами.

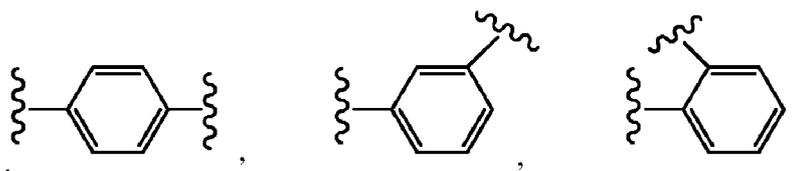
Если не указано иное, термин «алкинил» сам по себе или как часть другого термина в целом относится к замещенному или незамещенному ненасыщенному углеводороду с прямой или разветвленной цепью, имеющему тройную связь и указанное количество атомов углерода; например, « $-(C_2-C_8)$ алкинил» или « $-(C_2-C_{10})$ алкинил» относятся к алкинильной группе, имеющей от 2 до 8 или от 2 до 10 атомов углерода соответственно). Когда количество атомов углерода не указано, алкинильная группа может иметь от 2 до 8 атомов углерода. Иллюстративные  $-(C_2-C_8)$ алкинильные группы включают, но не ограничиваются ими, -ацетиленил, -1-пропинил, -2-пропинил, -1-бутинил, -2-бутинил, -1-пентинил, -2-пентинил и -3-метил-1-бутинил. В некоторых аспектах алкинильная группа может быть незамещенной. Возможно алкинильная группа может быть замещена, например, одной или более группами.

Если не указано иное, термин «алкинилен» сам по себе или как часть другого термина, как правило, относится к замещенному или незамещенному, с разветвленной или

прямой цепью, ненасыщенному углеводородному радикалу с указанным числом атомов углерода, предпочтительно 2-10 атомов углерода ( $-(C_2-C_{10})$ алкинилен-) или предпочтительно от 2 до 8 атомов углерода ( $-(C_2-C_8)$ алкинилен-), имеющему тройную связь и имеющему два одновалентных радикальных центра, образованных удалением двух атомов водорода из одного или двух разных атомов углерода родительского алкина. Если количество атомов углерода не указано, алкинильная группа может иметь от 2 до 8 атомов углерода. Типичные алкиниленовые радикалы включают, помимо прочего: -этилен-, -1-пропинилен-, -2-пропинилен-, -1-бутилен-, -2-бутинилен-, -1-пентинилен-, -2-пентинилен- и -3-метил-1-бутинилен-. В некоторых аспектах алкиниленовая группа может быть незамещенной. Возможно алкиниленовая группа может быть замещена, например, одной или более группами.

Если не указано иное, термин «арил», сам по себе или как часть другого термина, обычно означает замещенный или незамещенный одновалентный карбоциклический ароматический углеводородный радикал, имеющий от 6 до 20 атомов углерода (предпочтительно от 6 до 14 атомов углерода, более предпочтительно от 6 до 10 атомов углерода, в наиболее предпочтительных воплощениях 6 атомов углерода), полученных удалением одного атома водорода от единственного атома углерода родительской ароматической кольцевой системы. Некоторые арильные группы представлены в примерах структур как «Ar». Типичные арильные группы включают, но не ограничиваются ими, радикалы, производные от бензола, замещенного бензола, нафталина, антрацена и бифенила. Примером арильной группы является фенильная группа. В некоторых аспектах арильная группа может быть незамещенной. Возможно арильная группа может быть замещена, например, одной или более группами.

Если не указано иное, термин «арилен» сам по себе или как часть другого термина, как правило, представляет собой арильную группу, определенную выше, в которой один из атомов водорода арильной группы заменен связью (то есть является двухвалентной) и может находиться в пара-, мета- или орто-ориентации, как показано в следующих структурах, с фенилом в качестве иллюстративной группы:



В выбранных воплощениях, например, когда параллельно соединяющая единица содержит арилен, указанный арилен представляет собой арильную группу, как определено выше, в которой два или более атомов водорода арильной группы заменены связью (то есть арилен может быть трехвалентным). В некоторых аспектах ариленовая группа может быть незамещенной. Возможно алкиниленовая группа может быть замещена, например, одной или более группами.

Если не указано иное, термин «гетероцикл» или «гетероциклическое кольцо» сам по себе или как часть другого термина, как правило, относится к одновалентной замещенной или незамещенной ароматической или неароматической моноциклической или бициклической кольцевой системе, имеющей указанное число атомов углерода (например, «(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикл» или «(C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)гетероцикл» относятся к гетероциклу, имеющему от 3 до 8 или от 3 до 10 атомов углерода соответственно) и от одного до четырех кольцевых гетероатомов независимо друг от друга выбранных из N, O, P или S и полученных удалением одного атома водорода из кольцевого атома родительской кольцевой системы. Один или более атомов N, S или S в гетероцикле могут быть окислены. Кольцо, включающее гетероатом, может быть ароматическим или неароматическим. Если не указано иное, гетероцикл присоединяется к своей боковой группе по любому гетероатому или атому углерода, что приводит к стабильной структуре. Иллюстративные примеры (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикла включают, но не ограничиваются ими, пирролидинил, азетидинил, пиперидинил, морфолинил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, бензофуранил, бензотиофен, индолил, бензопиразолил, пирролил, тиофенил (тиофен), фуранил, тиазолил, имидазолил, пиразолил, пиримидинил, пиридинил, пиразинил, пиридазинил, изотиазолил и изоксазолил. В некоторых аспектах гетероциклическая группа может быть незамещенной. Возможно гетероциклическая группа может быть замещена, например, одной или более группами.

Если не указано иное, термин «гетероцикло» или «гетероциклическое кольцо» сам по себе или как часть другого термина, как правило, относится к гетероциклической группе, как определено выше, и имеющей указанное количество атомов углерода (например, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикл или (C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)гетероцикл), в которой один из атомов водорода гетероциклической группы заменен связью (то есть он двухвалентен). В выбранных воплощениях, например, когда параллельно соединяющая единица содержит «гетероцикло», указанный «гетероцикло» представляет собой гетероциклическую группу, как определено выше, в которой два или более атомов водорода гетероциклической группы

заменены связью (то есть гетероцикло может быть трехвалентным). В некоторых аспектах «гетероцикло» или гетероциклическое кольцо может быть незамещенным. Возможно гетероцикло или гетероциклическое кольцо может быть замещено, например, одной или более группами.

Если не указано иное, термин «карбоцикл» или «карбоциклическое кольцо» сам по себе или как часть другого термина, как правило, относится к одновалентной, замещенной или незамещенной ароматической или неароматической моноциклической или бициклической карбоциклической кольцевой системе, имеющей указанное число атомов углерода (например, «(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикл» или «(C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)карбоцикл» относятся к карбоциклу, имеющему от 3 до 8 или от 3 до 10 атомов углерода соответственно), полученной удалением одного атома водорода из кольцевого атома родительской кольцевой системы. В качестве иллюстративных, но не ограничивающих примеров, карбоцикл может представлять собой 3-, 4-, 5-, 6-, 7- или 8-членный карбоцикл. Типичные (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоциклы включают, но не ограничиваются ими, фенил, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентадиенил, циклогексил, циклогексенил, 1,3-циклогексадиенил, 1,4-циклогексадиенил, циклогептил, 1,3-циклогептадиенил, 1,3,5-циклогептатриенил, циклооктил и циклооктадиенил. В некоторых аспектах карбоцикл может быть незамещенным. Возможно карбоцикл может быть замещен, например, одной или более группами.

Если не указано иное, термин «карбоцикло» или «карбоциклическое кольцо», сам по себе или как часть другого термина, обычно относится к карбоциклической группе, как определено выше, имеющей указанное количество атомов углерода (например, «(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикло» или «(C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)карбоцикло» относятся к карбоциклу или карбоциклическому кольцу, имеющему от 3 до 8 или от 3 до 10 атомов углерода соответственно), в которых другой из атомов водорода карбоциклических групп заменен на связь (т. е. он двухвалентен). В выбранных воплощениях, например, когда параллельно соединяющая единица содержит «карбоцикло» или карбоциклическое кольцо, «карбоцикло» или карбоциклическое кольцо представляет собой карбоциклическую группу, как определено выше, в которой два или более атомов водорода карбоциклической группы заменены связью (то есть, «карбоцикло» или карбоциклическое кольцо может быть трехвалентным). В некоторых аспектах карбоцикло или карбоциклическое кольцо может быть незамещенным. Возможно гетероцикло или гетероциклическое кольцо может быть замещено, например, одной или более группами.

Если не указано иное, термин «гетероалкил», сам по себе или в сочетании с другим термином, может означать, если не указано иное, стабильный углеводород с прямой или разветвленной цепью или их комбинации, полностью насыщенный или содержащий от 1 до 3 ступеней ненасыщенности, состоящий из указанного числа атомов углерода (например, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)гетероалкил или (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)гетероалкил) и из от одного до десяти, предпочтительно от одного до трех, гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N, Si и S, и при этом атомы азота и серы возможно могут быть окислены, а гетероатом азота возможно может быть кватернизован. Гетероатом(ы) O, N и S могут быть помещены в любое внутреннее положение гетероалкильной группы или в положение, в котором алкильная группа присоединена к остальной части молекулы. Гетероатом Si может быть помещен в любое положение гетероалкильной группы, включая положение, в котором алкильная группа присоединена к остальной части молекулы. Примеры включают -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S(O)-CH<sub>3</sub>, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH=CH-O-CH<sub>3</sub>, -Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH=N-O-CH<sub>3</sub> и -CH=CH-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>. До двух гетероатомов могут располагаться последовательно, как, например, -CH<sub>2</sub>-NH-OCH<sub>3</sub> и -CH<sub>2</sub>-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. В предпочтительных воплощениях (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)гетероалкил или гетероалкилен имеет от 1 до 4 атомов углерода и 1 или 2 гетероатома, а (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)гетероалкил или гетероалкилен имеет от 1 до 3 атомов углерода и 1 или 2 гетероатома. В некоторых аспектах гетероалкил или гетероалкилен являются насыщенными. В некоторых аспектах гетероалкил или гетероалкилен могут быть незамещенными. Возможно гетероалкил или гетероалкилен могут быть замещены, например, одной или более группами.

Если не указано иное, термин «гетероалкилен» сам по себе или как часть другого заместителя означает двухвалентную группу, полученную из гетероалкила (как описано выше), имеющего указанное количество атомов углерода (например, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)гетероалкилен или (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)гетероалкилен), примером которого являются -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- и -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-. В случае гетероалкиленовых групп гетероатомы также могут занимать один или оба конца цепи. Кроме того, для алкиленовых и гетероалкиленовых связывающих групп не подразумевается ориентация связывающей группы. В выбранных воплощениях, например, когда параллельно соединяющая единица содержит гетероалкилен, гетероалкилен представляет собой гетероалкильную группу, определенную выше, в которой два или более атомов водорода гетероалкильной группы заменены связью (то есть гетероалкилен может быть трехвалентным). В некоторых аспектах гетероалкил или

гетероалкилен могут быть насыщенными. В некоторых аспектах гетероалкилен является незамещенным. Возможно гетероалкилен может быть замещен, например, одной или более группами.

Термин «галоген», если не указано иное, в общем относится к элементам 7-й основной группы; предпочтительно к фтору, хлору, бромю и йоду; более предпочтительно к фтору, хлору и бромю; еще более предпочтительно к фтору и хлору.

Термин «замещенный», «возможно замещенный», «возможно может быть замещен» и т. п., если не указано иное, в целом означает, что каждый из одного или более атомов водорода может быть независимо заменен заместителем. Типичные заместители включают, но не ограничиваются ими, -X, -R, -O<sup>-</sup>, -OR, -SR, -S<sup>-</sup>, -NR<sub>2</sub>, -NR<sub>3</sub>, =NR, -CX<sub>3</sub>, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO<sub>2</sub>, =N<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -NRC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -S(=O)<sub>2</sub>R, -OS(=O)<sub>2</sub>OR, -S(=O)<sub>2</sub>NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)<sub>2</sub>, -P(=O)(OR)<sub>2</sub>, -PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO<sub>2</sub>R, -CO<sub>2</sub>, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -C(=S)NR<sub>2</sub> или -C(=NR)NR<sub>2</sub>, где каждый X независимо представляет собой галоген: -F, -Cl, -Br или -I; и каждый R независимо представляет собой -H, -(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)алкил (такой как, например, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил или -(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил), -(C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>)арил, (такой как, например, -(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)арил или, предпочтительно, -C<sub>6</sub>-арил), -(C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>)гетероцикл (такой как, например, -(C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>)гетероцикл или -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикл), защитную группу или фрагмент пролекарства. Типичные заместители также включают (=O).

Термин «алифатический или ароматический остаток», используемый в настоящем документе, обычно относится к алифатическому заместителю, такому как, например, но не ограничиваясь им, алкильный остаток, который, тем не менее, может быть возможно замещен дополнительными алифатическими и/или ароматическими заместителями. В качестве неограничивающих примеров алифатический остаток может представлять собой нуклеиновую кислоту, фермент, кофермент, нуклеотид, олигонуклеотид, моносахарид, полисахарид, полимер, флуорофор, возможно замещенный бензол и т. д., при условии, что непосредственная связь такой молекулы со структурой ядра (в случае R<sup>1</sup>, например, связь с атомом кислорода, связанным с фосфором) является алифатической. Ароматический остаток представляет собой заместитель, где непосредственная связь со структурой ядра является частью ароматической системы, примерами являются возможно замещенный фенил, или триазолил, или пиридил, или нуклеотид; в качестве неограничивающего примера непосредственная связь нуклеотида со структурой ядра осуществляется, например,

через фенильный остаток. Термин «ароматический остаток», используемый в настоящем документе, также включает гетероароматический остаток.

Термин «пептид», если не указано иное, в целом относится к органическому соединению, содержащему две или более аминокислоты, ковалентно соединенные пептидными связями (амидной связью). Пептиды можно называть по количеству входящих в их состав аминокислот, т. е. дипептид содержит два аминокислотных остатка, трипептид – три и т. д. Пептиды, содержащие десять или менее аминокислот, могут называться олигопептидами, а те, которые содержат более десяти аминокислотных остатков, например содержащие до примерно 30 аминокислотных остатков, представляют собой полипептиды.

Термин «аминокислота», используемый в настоящем документе, обычно относится к органическому соединению, имеющему группу  $-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ . В одном воплощении термин «аминокислота» относится к встречающейся в природе аминокислоте. В качестве иллюстративных примеров природные аминокислоты включают аргинин, лизин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, глутамин, аспарагин, гистидин, серин, треонин, тирозин, цистеин, метионин, триптофан, аланин, изолейцин, лейцин, фенилаланин, валин, пролин и глицин. Однако этот термин в более широком смысле также охватывает аминокислоты не природного происхождения.

Аминокислоты и пептиды согласно настоящему изобретению также могут быть модифицированы по функциональным группам. Неограничивающими примерами являются сахараиды, например, N-ацетилгалактозамин (GalNAc), или защитные группы, например, флуоренилметоксикарбонильные (Fmoc)-модификации или сложные эфиры.

Термин «антитело», используемый в настоящем документе, предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, предпочтительно состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, которые обычно соединены между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи может содержать, например, три домена CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), с вкраплениями более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR).

Каждый из VH и VL обычно состоит из трех CDR и из вплоть до четырех FR, расположенных от аминоконца к карбокси-концу, например, в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

В настоящем документе термин «области, определяющие комплементарность» (CDR; например, CDR1, CDR2 и CDR3) относится к аминокислотным остаткам переменного домена антитела, присутствие которых необходимо для связывания антигена. Каждый переменный домен обычно имеет три области CDR, идентифицированные как CDR1, CDR2 и CDR3. Каждая область, определяющая комплементарность, может содержать аминокислотные остатки из «области, определяющей комплементарность», как определено по Кабат (например, приблизительно остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в переменном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в переменном домене тяжелой цепи; и/или эти остатки из «гиперпеременной петли» (например, приблизительно остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в переменном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в переменном домене тяжелой цепи). В некоторых случаях область, определяющая комплементарность, может включать аминокислоты как из области CDR, определенной по Кабату, так и из гиперпеременной петли.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей интактные антитела можно отнести к разным «классам». Существует пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них можно дополнительно разделить на «подклассы» (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Предпочтительным классом иммуноглобулинов для использования в настоящем изобретении является IgG.

Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам антител, называются [альфа], [дельта], [эпсилон], [гамма] и [мю], соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. В настоящем документе антитела представляют собой общеизвестные антитела и их функциональные фрагменты.

«Функциональный фрагмент», или «фрагмент антигенсвязывающего антитела» антитела/иммуноглобулина, или «антигенсвязывающий фрагмент антитела», или «фрагмент антитела», или «антитела фрагмент» в целом относится к фрагменту антитела/иммуноглобулина (например, переменной области IgG), который сохраняет антигенсвязывающую область. «Антигенсвязывающая область» антитела обычно

находится в одной или более гипервариабельных областях антитела, например, в областях CDR1, -2 и/или -3; однако вариабельные «каркасные» области также могут играть важную роль в связывании антигена, например, обеспечивая каркас для CDR. Предпочтительно «антигенсвязывающая область» содержит по меньшей мере аминокислотные остатки с 4 по 103 вариабельной легкой (VL) цепи и с 5 по 109 вариабельной тяжелой (VH) цепи, более предпочтительно аминокислотные остатки с 3 по 107 VL и с 4 по 111 VH, и особенно предпочтительными являются полные цепи VL и VH (положения аминокислот с 1 по 109 VL и с 1 по 113 VH; нумерация согласно WO 97/08320).

«Функциональные фрагменты», «фрагменты антигенсвязывающего антитела», «антигенсвязывающие фрагменты антитела», или «фрагменты антитела» или «антитела фрагменты» согласно настоящему изобретению могут включать, но не ограничиваются ими, фрагменты, которые содержат по меньшей мере одну дисульфидную связь, которая может вступать в реакцию с восстановителем, как описано в настоящем документе. Примеры подходящих фрагментов включают фрагменты Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub> и Fv; диатела; однодоменные антитела (DAbs), линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (scFv); и мультиспецифические, такие как би- и триспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Подразумевается, что у антитела, отличного от «мультиспецифического» или «многофункционального» антитела, все сайты связывания идентичны. F(ab')<sub>2</sub> или Fab можно сконструировать так, чтобы минимизировать или полностью устранить межмолекулярные дисульфидные взаимодействия, которые происходят между доменами CH1 и CL.

Термин «область Fc» в настоящем документе обычно используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Этот термин включает Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-областей. В одном воплощении Fc-область тяжелой цепи IgG человека располагается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако C-концевой лизин (Lys447) области Fc может присутствовать или отсутствовать. Если в настоящем документе не указано иное, нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константной области соответствует системе нумерации EU, также называемой индексом EU.

Варианты антител или фрагментов антигенсвязывающего антитела, рассматриваемых в настоящем документе, представляют собой молекулы, в которых

сохраняется связывающая активность антитела или фрагмента антигенсвязывающего антитела.

«Связывающие белки» или «белковые связывающие молекулы с антителоподобными связывающими свойствами», используемые в настоящем документе, обычно известны специалисту в данной области техники. Иллюстративные неограничивающие примеры включают аффитела, аднектин, антикалины, дарпины и авимеры.

«Человеческое» антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в целом определяют как антитело, которое не является химерным (например, не «гуманизированным») и не происходит (полностью или частично) от вида, отличного от человека. Человеческое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть получены от человека или могут представлять собой синтетическое человеческое антитело. «Синтетическое человеческое антитело» определяется в настоящем документе как антитело, имеющее последовательность, полученную полностью или частично *in silico* из синтетических последовательностей, которые основаны на анализе известных последовательностей человеческого антитела. *In silico* дизайн последовательности человеческого антитела или его фрагмента может быть обеспечен, например, путем анализа базы данных последовательностей человеческого антитела или фрагмента антитела и разработки полипептидной последовательности с использованием полученных из нее данных. Другим примером человеческого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента является антитело, которое кодируется нуклеиновой кислотой, выделенной из библиотеки последовательностей антител человеческого происхождения (например, такая библиотека основана на антителах, взятых из природного человеческого источника).

«Гуманизированное антитело» или его гуманизированный антигенсвязывающий фрагмент в целом определяется в настоящем документе как антитело, которое (i) получено из нечеловеческого источника (например, трансгенной мыши, несущей гетерологичную иммунную систему), где антитело основано на последовательности зародышевой линии человека; (ii) когда аминокислоты каркасных областей нечеловеческого антитела частично заменены на человеческие аминокислотные последовательности посредством генной инженерии или (iii) привиты CDR, где CDR переменного домена имеют нечеловеческое происхождение, при этом один или более каркасов переменного домена имеют человеческое происхождение, и константный домен (если таковой имеется) имеет человеческое происхождение.

«Химерное антитело» или его антигенсвязывающий фрагмент в целом определяется в настоящем документе как антитело, в котором переменные домены имеют нечеловеческое происхождение, а некоторые или все константные домены имеют человеческое происхождение.

Термин «моноклональное антитело», используемый в настоящем документе, в целом относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, то есть отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных мутаций, например, встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Таким образом, термин «моноклональный» указывает на то, что антитело не представляет собой смесь отдельных антител. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело препарата моноклональных антител направлено против одной детерминанты антигена. Помимо своей специфичности, препараты моноклональных антител имеют преимущество в том, что они обычно не загрязнены другими иммуноглобулинами. Термин «моноклональное» не следует истолковывать как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. Термин «моноклональное антитело», в частности, включает химерные, гуманизированные и человеческие антитела.

«Выделенное» антитело, как правило, представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено от компонентов клетки, которая его экспрессировала. Загрязняющие компоненты клетки представляют собой материалы, которые могут мешать диагностическому или терапевтическому применению антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества.

В настоящем документе указание на то, что антитело «специфично связывается», является «специфичным в отношении/для» или «специфично распознает» представляющий интерес антиген, например мишень опухолеассоциированного полипептидного антигена, как правило, означает антитело, которое связывает антиген с достаточной аффинностью, так что указанное антитело можно использовать в качестве терапевтического агента при нацеливании на клетку или ткань, экспрессирующую антиген, и не вступает в значительную перекрестную реакцию с другими белками или не имеет существенной перекрестной реакции с белками, отличными от ортологов и вариантов (например, мутантных форм, сплайсинговых вариантов или протеолитически усеченных форм) вышеупомянутого антигена-мишени. Термин «специфически распознает» или «специфично связывается с»

или «специфичен к/для» конкретного полипептида или эпитопа на конкретном полипептиде-мишени, используемый в настоящем документе, может проявляться, например, с помощью антитела или антигенсвязывающего фрагмента, при этом моновалентная  $K_D$  антигена составляет менее примерно  $10^{-4}$  М, в качестве альтернативы менее примерно  $10^{-5}$  М, в качестве альтернативы менее примерно  $10^{-6}$  М, в качестве альтернативы менее примерно  $10^{-7}$  М, в качестве альтернативы менее примерно  $10^{-8}$  М, в качестве альтернативы менее примерно  $10^{-9}$  М, в качестве альтернативы менее примерно  $10^{-10}$  М, в качестве альтернативы менее примерно  $10^{-11}$  М, в качестве альтернативы менее примерно  $10^{-12}$  М или менее. Антитело «специфично связывается», является «специфичным к/для» или «специфически распознает» антиген, если такое антитело способно различать такой антиген и один или более эталонных антигенов. В своей самой общей форме термины «специфическое связывание», «специфично связывается с», «специфичен к/для» или «специфически распознает» относятся к способности антитела различать представляющий интерес антиген и несвязанный антиген, как определяют, например, в соответствии с одним из следующих способов. Такие способы включают, помимо прочего, поверхностный плазмонный резонанс (SPR), вестерн-блоттинг, ELISA- (иммуноферментный анализ), RIA- (радиоиммунноанализ), ECL- (электрохемилюминисцентный иммуноанализ), IRMA (иммунорадиометрический анализ)-тесты и пептидное сканирование. Например, можно провести стандартный анализ ELISA. Оценку можно проводить с помощью стандартного проявления цвета (например, с помощью вторичного антитела с пероксидазой хрена и тетраметилбензидин с перекисью водорода). Реакция в определенных лунках оценивается по оптической плотности, например, при 450 нм. Типичный фон (отрицательная реакция) может составлять 0,1 единиц оптической плотности (ОП); типичная положительная реакция может составлять 1 единицу ОП. Это означает, что разница положительная/отрицательная составляет более 5, 10, 50 и предпочтительно более 100 раз. Обычно определение специфичности связывания проводят с использованием не одного сравнительного антигена, а набора примерно из трех-пяти несвязанных антигенов, таких как сухое молоко, BSA, трансферрин или тому подобное.

«Аффинность связывания» или «аффинность» в целом относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы и ее партнером по связыванию. Если не указано иное, используемый в настоящем документе термин «аффинность связывания» относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающей пары (например,

антителом и антигеном). Константа диссоциации « $K_D$ » обычно используется для описания аффинности между молекулой (например, антителом) и ее партнером по связыванию (например, антигеном), то есть описывает насколько прочно лиганд связывается с конкретным белком. На аффинность лиганд-белок влияют нековалентные межмолекулярные взаимодействия между двумя молекулами. Аффинность можно измерить обычными способами, известными в данной области техники, включая описанные в настоящем документе. В одном воплощении « $K_D$ » или «значение  $K_D$ » согласно настоящему изобретению измеряют с помощью анализов поверхностного плазмонного резонанса с использованием подходящих устройств, включая, помимо прочего, инструменты Biacore, такие как Biacore T100, Biacore T200, Biacore 2000, Biacore 4000, Biacore 3000 (GE Healthcare Biacore, Inc.) или прибор ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Термин «конъюгат антитело-лекарственное средство» или сокращенно ADC хорошо известен специалисту в данной области техники и, как он используется в настоящем документе, обычно относится к связыванию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с лекарственным средством, таким как химиотерапевтический агент, токсин, иммунотерапевтический агент, зонд для визуализации и т. п.

Настоящее изобретение также относится к «фармацевтически приемлемой соли». Можно использовать любую фармацевтически приемлемую соль. В частности, термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к соли конъюгата или соединения согласно настоящему изобретению, которая является фармацевтически приемлемой и обладает требуемой фармакологической активностью исходного соединения. В частности, такие соли обладают низкой токсичностью и могут представлять собой соли присоединения неорганических или органических кислот и соли присоединения оснований. В частности, такие соли включают, но не ограничиваются ими: (1) соли присоединения кислот, образованные неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, фосфорная кислота и т. п.; или образованные органическими кислотами, такими как уксусная кислота, пропионовая кислота, гексановая кислота, циклопентанпропионовая кислота, гликолевая кислота, пировиноградная кислота, молочная кислота, малоновая кислота, янтарная кислота, яблочная кислота, малеиновая кислота, фумаровая кислота, винная кислота, лимонная кислота, бензойная кислота, 3-(4-гидроксibenзоил)бензойная кислота, коричная кислота, миндальная кислота, метансульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, 1,2-

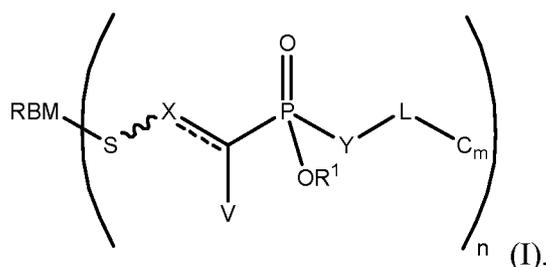
этандисульфоновая кислота, 2-гидроксиэтансульфоновая кислота, бензолсульфоновая кислота, 4-хлорбензолсульфоновая кислота, 2-нафталинсульфоновая кислота, 4-толуолсульфоновая кислота, камфорсульфоновая кислота, 4-метилбисцикло[2.2.2]-окт-2-ен-1-карбоновая кислота, глюкогептоновая кислота, 3-фенилпропионовая кислота, триметилуксусная кислота, трет-бутилуксусная кислота, лаурилсерная кислота, глюконовая кислота, глутаминовая кислота, гидроксинафтойная кислота, салициловая кислота, стеариновая кислота, муконовая кислота и т. п.; или (2) соли, образующиеся, когда кислотный протон, присутствующий в исходном соединении, заменяется ионом металла, например, ионом щелочного металла, ионом щелочноземельного металла или ионом алюминия; или координируется с органическим основанием, таким как этаноламин, диэтаноламин, триэтаноламин, N-метилглюкамин и т. п. Соли дополнительно включают, исключительно в качестве примера, соли натрия, калия, кальция, магния, аммония, тетраалкиламмония и т. п.; и когда соединение содержит основную функциональную группу, соли нетоксичных органических или неорганических кислот, такие как гидрохлорид, гидробромид, тартрат, мезилат, ацетат, малеат, оксалат и т. п. Противоион или анионный противоион можно использовать в четвертичном амине для поддержания электронной нейтральности. Примеры противоионов включают галогенид-ионы (например, F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>), NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, сульфонат-ионы (например, метансульфонат, трифторметансульфонат, *n*-толуолсульфонат, бензолсульфонат, 10-камфорсульфонат, нафталин-2-сульфонат, нафталин-1-сульфоновая кислота-5-сульфонат и т. п.) и карбоксилат-ионы (например, ацетат, этаноат, пропаноат, бензоат, глицерат, лактат, тартрат, гликолат и т. п.).

При использовании в настоящем документе термин «сольват» может относиться к агрегату, который содержит одну или более молекулу конъюгата или соединения, описанного в настоящем документе, с одной или более молекулой растворителя. Растворителем может быть вода, и в этом случае сольват может представлять собой гидрат. В качестве альтернативы растворитель может представлять собой органический растворитель. Таким образом, конъюгаты или соединения согласно настоящему изобретению могут существовать в виде гидратов, включая моногидрат, дигидрат, полугидрат, сесквигидрат, тригидрат, тетрагидрат и т. п., а также соответствующие сольватированные формы. Соединения согласно изобретению могут быть настоящими сольватами, тогда как в других случаях соединения согласно изобретению могут просто

удерживать постороннюю воду или представлять собой смесь воды и некоторого постороннего растворителя.

### Конъюгат формулы (I)

Как указано выше, настоящее изобретение относится к конъюгату, имеющему формулу (I):



или его фармацевтически приемлемой соли, или сольвату,

где:

RBM представляет собой рецепторсвязывающую молекулу;

$\text{=}$  представляет собой двойную связь; или

$\text{—}$  представляет собой связь;

V отсутствует, когда  $\text{=}$  представляет собой двойную связь; или

V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, когда  $\text{—}$  представляет собой связь;

X представляет собой R<sub>3</sub>-C, когда  $\text{=}$  представляет собой двойную связь; или

X представляет собой  $\begin{matrix} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{matrix}$ , когда  $\text{—}$  представляет собой связь;

Y представляет собой NR<sup>5</sup>, S, O или CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>;

R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>3</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>4</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>5</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

- R<sup>6</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- R<sup>7</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- L представляет собой линкер;
- C представляет собой фрагмент камптотецина;
- m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10; и
- n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20.

Конъюгаты формулы (I) содержат рецепторсвязывающую молекулу, которая соединена с фрагментом камптотецина через фрагмент фосфора (V) (фрагмент фосфора (V) иногда также обозначается как «P5») и линкер. Было обнаружено, что конъюгаты формулы (I) обладают многочисленными преимуществами, как показано ниже.

В качестве первоначального преимущества конъюгаты формулы (I) проявляют хорошую гидрофильность и демонстрируют низкую агрегацию в растворе, а также во время процесса конъюгации с антителом, примером чего являются высокие выходы ADC без образования или с лишь незначительным образованием агрегатов (**пример 2 и фигуры с 18 по 41**). Кроме того, конъюгаты формулы (I) демонстрируют хорошую цитотоксичность, которая является селективной в отношении клеточной линии, на которую нацелено антитело. Селективность превышает селективность коммерческого продукта Enhertu (**пример 4 и фигуры 43-46**). Конъюгаты формулы (I) также демонстрируют благоприятный эффект «свидетеля», который равноценен или даже лучше по сравнению с Enhertu (**пример 5 и фигура 47**, а также **пример 16 и фигура 59**, и **пример 17 и фигура 60**). Кроме того, конъюгаты формулы (I) демонстрируют хорошее повреждение ДНК в раковых клетках (**пример 6 и фигура 48**). В частности, конъюгаты формулы (I) демонстрируют превосходную стабильность в сыворотке, которая превосходит стабильность коммерческого продукта Enhertu (**пример 7 и фигура 49**). Еще одним преимуществом по сравнению с Enhertu является то, что конъюгаты формулы (I) сохраняют свою эффективность и селективность после инкубирования в течение определенного времени в сыворотках человека и грызунов *in vitro* (**пример 8 и фигуры 50 и 51**). Этот эффект в сочетании с превосходной стабильностью в присутствии сыворотки может быть полезен для уменьшения побочных эффектов во время лечения пациента конъюгатом. Конъюгаты формулы (I) также демонстрируют благоприятные фармакокинетические свойства *in vivo* (**пример 9 и фигура 52**, а также **пример 23 и фигура 67**). В частности,

фармакокинетические эксперименты *in vivo*, проведенные с конъюгатами формулы (I), продемонстрировали схожий клиренс с Enhertu. Кроме того, фармакокинетические эксперименты продемонстрировали, в качестве дополнительного преимущества, то, что конъюгаты формулы (I) проявляют значительно более высокую стабильность по сравнению с Enhertu *in vivo* (**пример 19** и **фигура 62**). Дальнейшие фармакокинетические эксперименты *in vivo* показали, что конъюгаты формулы (I) выводятся с кинетикой, очень похожей на кинетику немодифицированного антитела, даже при высокой нагрузке лекарственным средством камптотецином; также была продемонстрирована долговременная стабильность конъюгатов формулы (I) во время циркуляции в кровотоке *in vivo* (**пример 21** и **фигура 65**). Конъюгаты формулы (I) также имеют аналогичную термическую стабильность по сравнению с Enhertu (**пример 10** и **фигура 53**). Кроме того, конъюгаты формулы (I) и Enhertu проявляют сходные свойства связывания с внеклеточной мишенью (**пример 11** и **фигура 54**). В качестве дополнительного преимущества конъюгаты формулы (I) также демонстрируют пониженную агрегацию по сравнению с Enhertu в течение времени инкубирования до нескольких недель в водной среде (**пример 12** и **фигура 55**). Конъюгаты формулы (I) в качестве еще одного преимущества также демонстрируют повышенную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) по сравнению с Enhertu (**пример 13** и **фигура 56**). Авторы изобретения также обнаружили, что конъюгаты формулы (I) демонстрируют схожую с Enhertu интернализацию в мишене, представляющей собой положительные (Her2+) клетки, в то время как нежелательная интернализация в мишене, представляющей собой отрицательные клетки, снижается (**пример 14** и **фигура 57**). Конъюгаты формулы (I) также демонстрируют лучшую эффективность *in vitro* по сравнению с Enhertu для клеточных линий, которые не обладают высокой сверхэкспрессией мишени (**пример 16** и **фигура 58**). Соответственно, описанные в настоящем документе конъюгаты обладают улучшенными свойствами по сравнению с Enhertu с точки зрения эффективности, в частности, в клетках с низкой экспрессией мишени. Авторы изобретения также обнаружили, что конъюгаты формулы (I) в качестве преимущества проявляют меньшую нежелательную токсичность по отношению к различным клеткам здоровой ткани человека по сравнению с Enhertu (**пример 18** и **фигура 61**). Превосходная эффективность конъюгатов формулы (I) для лечения опухолей была продемонстрирована *in vivo* (**пример 20**, **фигура 63** и **фигура 64**). В частности, была продемонстрирована дозозависимость и превосходящая эффективность *in vivo* по сравнению с Enhertu (**пример 24** и **фигура 68**). Кроме того, конъюгаты формулы (I) могут быть получены с различными соотношениями

фрагмента камптотецина и рецепторсвязывающей молекулы (см. **примеры 2 и 3** и **фигуру 42**, а также **пример 22** и **фигуру 66**). В целом, авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что конъюгаты формулы (I) проявляют превосходные свойства, которые делают их полезными в качестве фармацевтических препаратов, включая повышенную стабильность в сыворотке и другие преимущества, такие как, например, благоприятный эффект «свидетеля», хорошие фармакокинетические свойства *in vivo*, долговременная стабильность *in vivo*, снижение агрегации, усиление ADCC, снижение нежелательной интернализации в мишене, представляющей собой отрицательные клетки, лучшая эффективность для клеточных линий с низкой экспрессией мишени, снижение нежелательной токсичности в отношении к клеткам здоровой ткани человека и превосходная эффективность при лечении опухоли *in vivo*. Следует отметить, что конъюгаты, которые содержат фрагмент фосфора (V), представляют собой, например, описанные в WO 2018/041985 A1 и WO 2019/170710, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Предпочтительно R<sup>3</sup> представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно R<sup>3</sup> представляет собой H. Предпочтительно R<sup>4</sup>, если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно R<sup>4</sup>, если он присутствует, представляет собой H. Предпочтительно R<sup>5</sup>, если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно R<sup>5</sup>, если он присутствует, представляет собой H. Предпочтительно R<sup>6</sup>, если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно R<sup>6</sup>, если он присутствует, представляет собой H. Предпочтительно R<sup>7</sup>, если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно R<sup>7</sup>, если он присутствует, представляет собой H.

Предпочтительно  представляет собой двойную связь; V отсутствует; X представляет собой R<sub>3</sub>-C; и R<sup>3</sup> представляет собой H, или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; предпочтительно R<sup>3</sup> представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно R<sup>3</sup> представляет собой H.

Более предпочтительно  представляет собой двойную связь; V отсутствует; X представляет собой R<sub>3</sub>-C, и R<sub>3</sub> представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил. Предпочтительно R<sup>3</sup> представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, более предпочтительно H или (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил, еще

более предпочтительно H или (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)алкил. В предпочтительных воплощениях R<sub>3</sub> представляет собой H.

В некоторых воплощениях  может представлять собой связь; V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, предпочтительно V представляет собой H; X представляет собой

$\begin{matrix} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{matrix}$ ; R<sub>3</sub> представляет собой H, или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; более предпочтительно R<sup>3</sup> представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, более предпочтительно R<sup>3</sup> представляет собой H; R<sup>4</sup> представляет собой H, или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; предпочтительно R<sup>4</sup> представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, предпочтительно R<sup>4</sup> представляет собой H.

В некоторых воплощениях  может представлять собой связь; V может представлять собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; X может представлять собой  $\begin{matrix} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{matrix}$ ; и R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> могут независимо представлять собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил. Предпочтительно R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> независимо представляют собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, более предпочтительно H или (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил, еще более предпочтительно H или (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)алкил. Предпочтительно R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> являются одинаковыми; еще более предпочтительно R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> и V являются одинаковыми. Более предпочтительно R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> оба представляют собой H. Предпочтительно V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, более предпочтительно H или (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил, еще более предпочтительно H или (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)алкил. Еще более предпочтительно V представляет собой H. В предпочтительных воплощениях R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> и V каждый представляет собой H.

Целое число m находится в диапазоне от 1 до 10. Соответственно, целое число m может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Предпочтительно целое число m находится в диапазоне от 1 до 4. Более предпочтительно целое число m составляет 1 или 2. Еще более предпочтительно целое число m составляет 1.

Целое число n находится в диапазоне от 1 до 20. Соответственно, целое число n может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. Предпочтительно целое число n находится в диапазоне от 1 до 10. Более предпочтительно целое число n находится в диапазоне от 2 до 10. Еще более предпочтительно целое число n находится в диапазоне от 4 до 10. Еще более предпочтительно целое число n находится в диапазоне от 6 до 10. Еще более предпочтительно целое число n составляет 6, 7, 8, 9 или 10.



собой целое число в диапазоне от 2 до 10. Еще более предпочтительно  $m$  составляет 1 и  $n$  представляет собой целое число в диапазоне от 4 до 10. Еще более предпочтительно  $m$  составляет 1 и  $n$  представляет собой целое число в диапазоне от 6 до 10. Еще более предпочтительно  $m$  составляет 1 и  $n$  составляет 6, 7, 8, 9 или 10. Еще более предпочтительно  $m$  составляет 1 и  $n$  представляет собой целое число в диапазоне от 7 до 10. Еще более предпочтительно  $m$  составляет 1 и  $n$  составляет 7, 8 или 9. Еще более предпочтительно  $m$  составляет 1 и  $n$  составляет 7 или 8. Еще более предпочтительно  $m$  составляет 1 и  $n$  составляет 8.

Предпочтительно  $m$  составляет 1; и предпочтительно  $n$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20, более предпочтительно от 1 до 10, еще более предпочтительно от 2 до 8; еще более предпочтительно  $n$  составляет 2, 3, 4, 5 или 6, еще более предпочтительно  $n$  находится в диапазоне от 3 до 6; еще более предпочтительно  $n$  составляет 3, 4 или 5; еще более предпочтительно  $n$  составляет 4 или 5, еще более предпочтительно  $n$  составляет 4. Соответственно, предпочтительно  $m$  составляет 1 и  $n$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20. Более предпочтительно  $m$  составляет 1 и  $n$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10. Еще более предпочтительно  $m$  составляет 1 и  $n$  представляет собой целое число в диапазоне от 2 до 8. Еще более предпочтительно  $m$  составляет 1 и  $n$  составляет 2, 3, 4, 5 или 6. Еще более предпочтительно  $m$  составляет 1 и  $n$  находится в диапазоне от 3 до 6. Еще более предпочтительно  $m$  составляет 1 и  $n$  составляет 3, 4 или 5. Еще более предпочтительно  $m$  составляет 1 и  $n$  составляет 4 или 5. Еще более предпочтительно  $m$  составляет 1 и  $n$  составляет 4.

В некоторых воплощениях число фрагментов  $S$  камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу может составлять от 1 до 20. Предпочтительно число фрагментов  $S$  камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу составляет от 1 до 14. Более предпочтительно число фрагментов  $S$  камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу составляет от 2 до 14. Более предпочтительно число фрагментов  $S$  камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу составляет от 4 до 14. Еще более предпочтительно число фрагментов  $S$  камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу составляет от 5 до 12. Еще более предпочтительно число фрагментов  $S$  камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу составляет от 6 до 12. Еще более предпочтительно число фрагментов  $S$  камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу составляет от 7 до 10. Еще

более предпочтительно число фрагментов С камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу составляет 8.

В некоторых воплощениях число фрагментов С камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу может составлять от 1 до 20. Предпочтительно число фрагментов С камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу составляет от 1 до 14. Более предпочтительно число фрагментов С камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу составляет от 1 до 12. Более предпочтительно число фрагментов С камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу составляет от 2 до 10. Еще более предпочтительно число фрагментов С камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу составляет от 2 до 8. Еще более предпочтительно число фрагментов С камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу составляет от 2 до 6. Еще более предпочтительно число фрагментов С камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу составляет от 3 до 5. Еще более предпочтительно число фрагментов камптотецина С на рецепторсвязывающую молекулу составляет 4.

#### **Рецепторсвязывающая молекула (RBM)**

RBM представляет собой рецепторсвязывающую молекулу. Термин «рецепторсвязывающая молекула» обычно относится к любой молекуле, которая способна связываться с рецептором. В качестве иллюстративного, но неограничивающего примера, рецептор, с которым может связываться рецепторсвязывающая молекула, может быть экспрессирован на поверхности клетки. В качестве иллюстративного, но неограничивающего примера, клетка, которая экспрессирует рецептор, может представлять собой раковую клетку. Специалист в данной области техники знает, как выбрать подходящую рецепторсвязывающую молекулу.

Рецептор может представлять собой опухолеассоциированный поверхностный антиген. Соответственно, рецепторсвязывающая молекула может быть способна специфически связываться с опухолеассоциированным поверхностным антигеном. Термин «опухолеассоциированный поверхностный антиген», используемый в настоящем документе, в целом относится к антигену, который присутствует или может быть представлен на поверхности, которая расположена на опухолевых клетках или внутри них. Эти антигены могут быть представлены на поверхности клетки внеклеточной частью, которая часто сочетается с трансмембранной и цитоплазматической частью молекулы. Эти антигены в некоторых воплощениях могут быть представлены только опухолевыми клетками, а не нормальными, то есть неопухолевыми клетками. Опухолевые антигены

могут экспрессироваться исключительно на опухолевых клетках или могут представлять собой опухолеспецифическую мутацию по сравнению с неопухолевыми клетками. В таком воплощении соответствующий антиген может называться опухолеспецифическим антигеном. Некоторые антигены представлены как опухолевыми, так и неопухолевыми клетками, которые можно назвать опухолеассоциированными антигенами. Эти опухолеассоциированные антигены могут сверхэкспрессироваться на опухолевых клетках по сравнению с неопухолевыми клетками или доступны для связывания антител в опухолевых клетках из-за менее компактной структуры опухолевой ткани по сравнению с неопухолевой тканью. В некоторых воплощениях опухолеассоциированный поверхностный антиген расположен в сосудистой сети опухоли. Иллюстративные, но неограничивающие примеры опухолеассоциированного поверхностного антигена включают CD19, CD30, Her2 или PMSA. Поверхностные опухолеассоциированные антигены известны специалисту в данной области техники. В частности, те из них, которые оказались полезными для разработки ADC, описаны, например, в обзорной статье Criscitello et al., “*Antibody-drug conjugates in solid tumors: a look into novel targets*”, *Journal of Hematology and Oncology*, (2021) 14:20 (<https://doi.org/10.1186/s13045-021-01035-z>).

Рецепторсвязывающая молекула может быть выбрана из группы, состоящей из антитела, фрагмента антитела и белковой связывающей молекулы с антителоподобными связывающими свойствами.

Предпочтительно рецепторсвязывающая молекула представляет собой антитело. Более предпочтительно антитело выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела, химерного антитела, гуманизированного антитела, человеческого антитела и однодоменного антитела, такого как однодоменное антитело верблюда или акулы. Еще более предпочтительно антитело представляет собой моноклональное антитело. Предпочтительно антитело способно специфически связываться с ассоциированным с опухолью поверхностным антигеном. В некоторых воплощениях антитело может представлять собой брентуксимаб. В некоторых воплощениях антитело может представлять собой трастузумаб.

Рецепторсвязывающая молекула может представлять собой фрагмент антитела. Предпочтительно фрагмент антитела представляет собой фрагмент двухвалентного антитела. Более предпочтительно фрагмент двухвалентного антитела выбран из группы, состоящей из (Fab)<sub>2</sub>'-фрагмента, двухвалентного одноцепочечного Fv-фрагмента, антитела с двойным аффинным перенацеливанием (DART) и антитела. В качестве альтернативы,

предпочтительно фрагмент антитела представляет собой фрагмент моновалентного антитела. Более предпочтительно фрагмент моновалентного антитела выбран из группы, состоящей из Fab-фрагмента, Fv-фрагмента и одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv). Также возможно, что фрагмент моновалентного антитела представляет собой фрагмент однодоменного антитела верблюда или акулы. Предпочтительно фрагмент антитела способен специфически связываться с опухолеассоциированным поверхностным антигеном.

Рецепторсвязывающая молекула может представлять собой белковую связывающую молекулу с антителоподобными связывающими свойствами. Примеры белковых связывающих молекул с антителоподобными связывающими свойствами, которые можно использовать в качестве рецепторсвязывающей молекулы, включают, не ограничиваясь ими, аптамер, мутеин на основе полипептида семейства липокалинов, глютело, белок на основе анкирина, каркас, белок на основе кристаллического каркаса, аднектин, авимер, EGF-подобный домен, крингл-домен, домен фибронектина I типа, домен фибронектина II типа, домен фибронектина III типа, PAN домен, домен G1a, домен SRCR, домен ингибитора трипсина Кунитца/ингибитора трипсина поджелудочной железы бычьего происхождения, тендамистат, домен ингибитора сериновой протеазы типа Казала, домен трилистника (P-типа), домен типа C фактора фон Виллебранда, анафилатоксин-подобный домен, домен CUB, повтор тиреоглобулина типа I, домен класса A рецептора LDL, домен Sushi, домен Link, домен тромбоспондина типа I, домен иммуноглобулина или иммуноглобулиноподобный домен (например, доменные антитела или верблюжьи антитела из тяжелых цепей), домен лектина C-типа, домен MAM, домен типа A фактора фон Виллебранда, домен соматомедина B, четырехдисульфидный основной домен WAP-типа, домен C типа F5/8, домен гемопексина, домен SH2, домен SH3, EGF-подобный домен ламининового типа, домен C2, «Kappabodies» (Ill. et al. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" *Protein Eng* 10:949-57 (1997)), «Minibodies» (Martin et al. "The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6" *EMBO J* 13:5303-9 (1994)), «Janusins» (Traunecker et al. "Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells" *EMBO J* 10:3655-3659 (1991) и Traunecker et al. "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" *Int J Cancer Suppl* 7:51-52 (1992)), нанотело, аднектин, тетранектин, микротело, аффилин, аффитело или анкирин, кристаллин, ноттин, убиквитин, белок цинковых пальцев, автофлуоресцентный белок, анкирин или белок с повторами

анкирина или белок с богатыми лейцином повторами, авимер (Silverman, Lu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlroth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP 2005, Nat Biotech, Dec;23(12):1556-61, E-Publication in Nat Biotech. 2005 Nov 20 edition); а также мультивалентные авимерные белки, полученные путем перетасовки экзонов семейства доменов человеческих рецепторов, как также описано у Silverman J, Lu Q, Bakker A, To W, Duguay A, Alba BM, Smith R, Rivas A, Li P, Le H, Whitehorn E, Moore KW, Swimmer C, Perlroth V, Vogt M, Kolkman J, Stemmer WP, Nat Biotech, Dec;23(12):1556-61, E-Publication in Nat. Biotechnology. 2005 Nov 20 edition. Предпочтительно белковая связывающая молекула с антителоподобными связывающими свойствами выбрана из группы, состоящей из мутеина на основе полипептида семейства липокалинов, глутела, белка на основе анкиринового каркаса, белка на основе кристаллического каркаса, аднектина, авимера, DARPin и аффитела. Предпочтительно белковая связывающая молекула с антителоподобными связывающими свойствами способна специфически связываться с опухлеассоциированным поверхностным антигеном.

### **Группа Y**

Группа Y выбрана из группы, состоящей из NR<sup>5</sup>, S, O и CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>. R<sup>5</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; предпочтительно R<sup>5</sup> представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно R<sup>5</sup> представляет собой H. R<sup>6</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; предпочтительно R<sup>6</sup> представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно R<sup>6</sup> представляет собой H. R<sup>7</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; предпочтительно R<sup>7</sup> представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, более предпочтительно R<sup>7</sup> представляет собой H.

Предпочтительно Y выбрана из группы, состоящей из NH, S, O и CH<sub>2</sub>. Более предпочтительно Y представляет собой NH, S или O. В некоторых воплощениях Y представляет собой CH<sub>2</sub>. В некоторых воплощениях Y представляет собой O. В некоторых воплощениях Y представляет собой S.

В наиболее предпочтительных воплощениях Y представляет собой NH.

### **Группа R<sup>1</sup>**

R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток.

$R^1$  может представлять собой возможно замещенный (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил.

$R^1$  может представлять собой (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, возможно замещенный по меньшей мере одним из F, Cl, Br, I, -NO<sub>2</sub>, -N((C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил)H, -NH<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -N((C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила)<sub>2</sub>, =O, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)циклоалкила, -S-S-((C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила), (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкенила или (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)алкинила.

$R^1$  может представлять собой возможно замещенный фенил.

$R^1$  может представлять собой фенил, возможно независимо замещенный по меньшей мере одним из (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила, F, Cl, I, Br, -NO<sub>2</sub>, -N((C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил)H, -NH<sub>2</sub> или -N((C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкила)<sub>2</sub>.

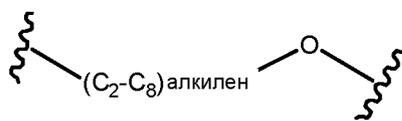
$R^1$  может представлять собой возможно замещенный 5- или 6-членное гетероароматическое кольцо, такое как, например, пиридил.

$R^1$  может представлять собой (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, замещенный -S-S-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкилом, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, замещенный возможно замещенным фенилом; или фенил; или фенил, замещенный -NO<sub>2</sub>.

$R^1$  может представлять собой метил, этил, пропил или бутил, предпочтительно метил или этил, более предпочтительно этил.

#### Первая полиалкиленгликолевая единица $R^F$

Предпочтительно  $R^1$  представляет собой первую полиалкиленгликолевую единицу  $R^F$ . Термин «первая полиалкиленгликолевая единица» в контексте настоящего описания относится к полиалкиленгликолевой единице, связанной с атомом O, которая присоединена к фосфору фрагмента с фосфором (V). Первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  содержит по меньшей мере одну алкиленгликолевую субъединицу. Предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  содержит одну или более алкиленгликолевых субъединиц, имеющих следующую структуру:



алкилен

. Более предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  содержит одну или более алкиленгликолевых субъединиц, имеющих



следующую структуру:

. Соответственно, первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  может представлять собой политетраметилгликолевую единицу, полипропиленгликолевую единицу или полиэтиленгликолевую единицу. Еще более предпочтительно первая

полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  содержит одну или более алкиленгликолевых субъединиц, имеющих следующую структуру:



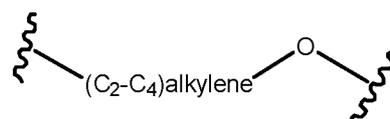
Предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  содержит от 1 до 100 алкиленгликолевых субъединиц, описанных в настоящем документе. Более предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  содержит от 2 до 50 алкиленгликолевых субъединиц, описанных в настоящем документе. Еще более предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  содержит от 3 до 45 алкиленгликолевых субъединиц, описанных в настоящем документе. Еще более предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  содержит от 4 до 40 алкиленгликолевых субъединиц, описанных в настоящем документе. Еще более предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  содержит от 6 до 35 алкиленгликолевых субъединиц, описанных в настоящем документе. Еще более предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  содержит от 8 до 30 алкиленгликолевых субъединиц, описанных в настоящем документе.

Предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  содержит от 1 до 20 алкиленгликолевых субъединиц, описанных в настоящем документе. Более предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  содержит от 2 до 12 алкиленгликолевых субъединиц, как описано в настоящем документе. Еще более предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  содержит от 3 до 11 алкиленгликолевых субъединиц, описанных в настоящем документе.

Первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  может представлять собой полиалкиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 3 до 45, еще более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более предпочтительно от 8 до 30 субъединиц, имеющих

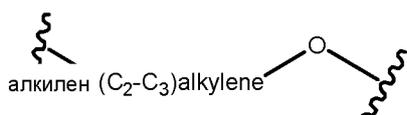


структуру: . Предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  может представлять собой полиалкиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 3 до 45, еще более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более



предпочтительно от 8 до 30 субъединиц, имеющих структуру:

. Более предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  может быть полиалкиленгликолевой единицей, содержащей от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 3 до 45, еще более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более предпочтительно от 8 до 30 субъединиц, имеющих



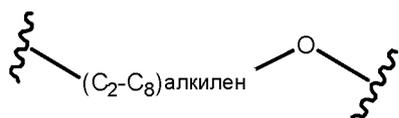
структуру:

. В наиболее предпочтительных воплощениях первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  может представлять собой полиэтиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 3 до 45, еще более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более предпочтительно от 8 до 30 субъединиц, каждая из



которых имеет структуру:

Первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  может представлять собой полиалкиленгликолевую еалкилен /, содержащую от 1 до 20, предпочтительно от 2 до 12, более предпочтительно от 3 до 11 субъединиц, имеющих структуру:

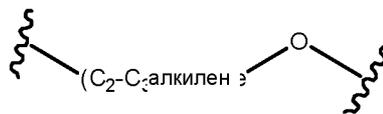


. Предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  может представлять собой полиалкиленгликолевую еалкилен содержащую от 1 до 20, предпочтительно от 2 до 12, более предпочтительно от 3 до 11 субъединиц, имеющих



структуру:

. Более предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  может представлять собой полиалкиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 20, предпочтительно от 2 до 12, более предпочтительно от 3



до 11 субъединиц, имеющих структуру:

. В наиболее предпочтительных воплощениях первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  может представлять собой полиэтиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 20,

предпочтительно от 2 до 12, более предпочтительно от 3 до 11 субъединиц, каждая из



Предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  представляет собой:



где:



обозначает положение О, присоединенного к фосфору;

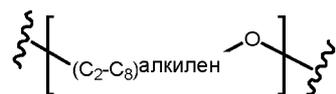
$K^F$  представляет собой Н или первую кэпирующую группу; предпочтительно  $K^F$  выбрана из группы, состоящей из -Н (водорода), - $PO_3H$ , -( $C_1$ - $C_{10}$ )алкила, -( $C_1$ - $C_{10}$ )алкил- $SO_3H$ , -( $C_2$ - $C_{10}$ )алкил- $CO_2H$ , -( $C_2$ - $C_{10}$ )алкил-ОН, -( $C_2$ - $C_{10}$ )алкил- $NH_2$ , -( $C_2$ - $C_{10}$ )алкил- $NH(C_1$ - $C_3$ )алкила и -( $C_2$ - $C_{10}$ )алкил- $N((C_1$ - $C_3$ )алкила) $_2$ ; более предпочтительно  $K^F$  представляет собой Н; и

о представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 100.

Термин «первая кэпирующая группа» при упоминании в настоящем документе может представлять собой любой фрагмент, который способен функционировать в качестве концевой группы первой полиалкиленгликолевой единицы. Примеры первых кэпирующих групп, которые могут быть применены в настоящем изобретении, включают - $PO_3H$ , -( $C_1$ - $C_{10}$ )алкил, -( $C_1$ - $C_{10}$ )алкил- $SO_3H$ , -( $C_2$ - $C_{10}$ )алкил- $CO_2H$ , -( $C_2$ - $C_{10}$ )алкил-ОН, -( $C_2$ - $C_{10}$ )алкил- $NH_2$ , -( $C_2$ - $C_{10}$ )алкил- $NH(C_1$ - $C_3$ )алкил и -( $C_2$ - $C_{10}$ )алкил- $N((C_1$ - $C_3$ )алкил) $_2$ . В некоторых воплощениях первая кэпирующая группа может представлять собой -( $C_1$ - $C_{10}$ )алкил, в частности метил.

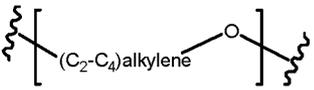
Предпочтительно  $K^F$  представляет собой Н (водород).

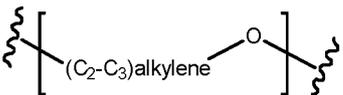
Целое число о обозначает количество повторяющихся единиц



в первой полиалкиленгликолевой единице. Целое число о может находиться в диапазоне от 1 до 100. Предпочтительно о находится в диапазоне от 2 до 50. Более предпочтительно о находится в диапазоне от 3 до 45. Еще более предпочтительно о находится в диапазоне от 4 до 40. Еще более предпочтительно о находится в диапазоне от 6 до 35. Еще более предпочтительно о находится в диапазоне от 8 до 30. В предпочтительных воплощениях о составляет 12 или примерно 12. Еще более

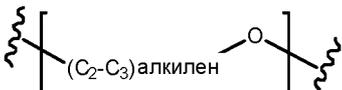
предпочтительно  $n$  находится в диапазоне от 16 до 30. Еще более предпочтительно  $n$  находится в диапазоне от 20 до 28. Еще более предпочтительно  $n$  составляет 22, 23, 24, 25 или 26. Еще более предпочтительно  $n$  составляет 23, 24 или 25. В предпочтительных воплощениях  $n$  составляет 24 или примерно 24. Предпочтительно повторяющаяся единица

представляет собой . Более предпочтительно повторяющаяся

единица представляет собой .

В первой полиалкиленгликолевой единице целое число  $n$  может находиться в диапазоне от 1 до 20. Предпочтительно  $n$  находится в диапазоне от 2 до 12. Более предпочтительно  $n$  находится в диапазоне от 3 до 11. Предпочтительно повторяющаяся

единица представляет собой . Более предпочтительно

повторяющаяся единица представляет собой .

Предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  содержит этиленгликолевые субъединицы, каждая из которых имеет следующую структуру:



, то есть эта субъединица обозначается как «этиленгликолевая субъединица». Соответственно, предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица представляет собой первую полиэтиленгликолевую единицу. Первая полиэтиленгликолевая единица содержит по меньшей мере одну этиленгликолевую субъединицу.

Предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  может представлять собой первую полиэтиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 3 до 45, еще более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более предпочтительно от 8 до 30 этиленгликолевых

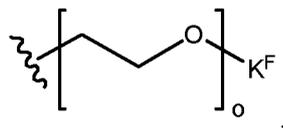
субъединиц, каждая из которых имеет структуру: .

Предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  может представлять собой первую полиэтиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 20, предпочтительно

от 2 до 12, более предпочтительно от 3 до 11 этиленгликолевых субъединиц, каждая из



Предпочтительно первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  представляет собой первую полиэтиленгликолевую единицу, имеющую структуру:

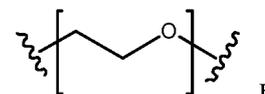


где:



обозначает положение O, присоединенного к фосфору;

$K^F$  представляет собой H (водород) или первую кэпирующую группу, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $K^F$  выбрана из группы, состоящей из -H (водорода),  $-PO_3H$ ,  $-(C_1-C_{10})$ алкила,  $-(C_1-C_{10})$ алкил- $SO_3H$ ,  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $CO_2H$ ,  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $OH$ ,  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $NH_2$ ,  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $NH(C_1-C_3)$ алкила и  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $N((C_1-C_3)$ алкила) $_2$ ; более предпочтительно  $K^F$  представляет собой H; и o представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 100.



Целое число o обозначает количество повторяющихся единиц в первой полиэтиленгликолевой единице. Целое число o может находиться в диапазоне от 1 до 100. Предпочтительно o находится в диапазоне от 2 до 50. Более предпочтительно o находится в диапазоне от 3 до 45. Еще более предпочтительно o находится в диапазоне от 4 до 40. Еще более предпочтительно o находится в диапазоне от 6 до 35. Еще более предпочтительно o находится в диапазоне от 8 до 30. В предпочтительных воплощениях o составляет 12 или примерно 12. Еще более предпочтительно o находится в диапазоне от 16 до 30. Еще более предпочтительно o находится в диапазоне от 20 до 28. Еще более предпочтительно o составляет 22, 23, 24, 25 или 26. Еще более предпочтительно o составляет 23, 24 или 25. В предпочтительных воплощениях o составляет 24 или примерно 24.

В первой полиэтиленгликолевой единице целое число o может находиться в диапазоне от 1 до 20. Предпочтительно o находится в диапазоне от 2 до 12. Более предпочтительно o находится в диапазоне от 3 до 11.

В общем, в первой полиалкиленгликолевой единице  $R^F$  (предпочтительно первой полиэтиленгликолевой единице) могут быть использованы полидисперсные

полиалкиленгликоли (предпочтительно полидисперсные полиэтиленгликоли), монодисперсные полиалкиленгликоли (предпочтительно монодисперсный полиэтиленгликоль) и дискретные полиалкиленгликоли (предпочтительно дискретные полиэтиленгликоли). Полидисперсные полиалкиленгликоли (предпочтительно полидисперсные полиэтиленгликоли) представляют собой гетерогенную смесь размеров и молекулярных масс, тогда как монодисперсные полиалкиленгликоли (предпочтительно монодисперсные полиэтиленгликоли) обычно очищены от гетерогенных смесей и, следовательно, обеспечивают одну длину цепи и молекулярную массу. Предпочтительные первые полиалкиленовые единицы представляют собой дискретные полиалкиленгликоли (предпочтительно дискретные полиэтиленгликоли), то есть соединения, которые синтезируются поэтапно, а не посредством процесса полимеризации. Дискретные полиалкиленгликоли (предпочтительно дискретные полиэтиленгликоли) представляют собой одну молекулу с определенной и заданной длиной цепи.

Первая полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно первая полиэтиленгликолевая единица), предложенная в настоящем документе, содержит одну или более полиалкиленгликолевых цепей (предпочтительно полиэтиленгликолевых цепей). Полиалкиленгликолевые цепи (предпочтительно полиэтиленгликолевые цепи) могут быть связаны друг с другом, например, в линейной, разветвленной или звездообразной конфигурации. Возможно, по меньшей мере одна из полиалкиленгликолевых цепей (предпочтительно полиэтиленгликолевых цепей) может быть модифицирована на одном конце для ковалентного присоединения к атому кислорода, связанному с фосфором.

Первая полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно первая полиэтиленгликолевая единица) будет присоединена к конъюгату (или его промежуточному соединению) по атому кислорода, который связан с фосфором. Другой конец (или концы) первой полиалкиленгликолевой единицы (предпочтительно первой полиэтиленгликолевой единицы) будет свободным и несвязанным и может принимать форму водорода, метокси, карбоновой кислоты, спирта или другой подходящей функциональной группы, такой как, например, любая первая блокирующая группа, как описано в настоящем документе. Метокси, карбоновая кислота, спирт или другая подходящая функциональная группа действует как блокирующая концевая полиалкиленгликолевая субъединица (предпочтительно полиэтиленгликолевая субъединица) первой полиалкиленгликолевой единицы (предпочтительно первой полиэтиленгликолевой единицы). Под «несвязанным» подразумевается, что первая

полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно первая полиэтиленгликолевая единица) не будет присоединена в этом несвязанном сайте к фрагменту камптотецина (С), к рецепторсвязывающей молекуле или к компоненту линкера (L), связывающему фрагмент камптотецина и/или рецепторсвязывающую молекулу. Для тех воплощений, в которых первая полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно первая полиэтиленгликолевая единица) содержит более чем одну полиалкиленгликолевую цепь (предпочтительно полиэтиленгликолевую цепь), несколько полиалкиленгликолевых цепей (предпочтительно полиэтиленгликолевых цепей) могут представлять собой одинаковые или разные химические фрагменты (например, полиалкиленгликоли, в частности полиэтиленгликоли, с разной молекулярной массой или количеством субъединиц). Множественные первые полиалкиленгликолевые цепи (предпочтительно первые полиэтиленгликолевые цепи) присоединены к атому кислорода, связанному с фосфором, в одном месте присоединения. Специалист в данной области техники поймет, что первая полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно первая полиэтиленгликолевая единица) в дополнение к содержанию повторяющихся полиалкиленгликолевых субъединиц (предпочтительно полиэтиленгликолевых субъединиц) может также содержать материал, не являющийся полиалкиленгликолем (предпочтительно материал, не являющийся полиэтиленгликолем) (например, для облегчения связывания множества полиалкиленгликолевых цепей (предпочтительно полиэтиленгликолевых цепей) друг с другом или для облегчения связывания с атомом кислорода, связанным с фосфором. Неполиалкиленгликольный материал (предпочтительно неполиэтиленгликольный материал) относится к атомам в первой полиалкиленгликолевой единице (предпочтительно первой полиэтиленгликолевой единице), которые не являются частью повторяющихся алкиленгликолевых субъединиц (предпочтительно субъединиц  $-CH_2CH_2O-$ ). В воплощениях, предложенных в настоящем документе, первая полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно первая полиэтиленгликолевая единица) может содержать две мономерные полиалкиленгликолевые цепи (предпочтительно полиэтиленгликолевые цепи), связанные друг с другом посредством неполиалкиленгликолевых (неполиэтиленгликолевых) элементов. В других воплощениях, предложенных в настоящем документе, первая полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно первая полиэтиленгликолевая единица) может содержать две линейные полиалкиленгликолевые цепи (предпочтительно полиэтиленгликолевые цепи), прикрепленные к центральному ядру, которое прикреплено

к атому кислорода, связанному с фосфором (то есть полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно полиэтиленгликолевая единица) является разветвленной).

Существует ряд способов присоединения полиалкиленгликоля (предпочтительно полиэтиленгликоля), доступных специалистам в данной области техники [см., например, EP 0401384 (связывание PEG с G-CSF); патент США № 5757078 (пегилирование пептидов EPO); патент США № 5672662 (полиэтиленгликоль) и родственные полимеры, монозамещенные пропионовой или бутановой кислотой, и их функциональные производные для биотехнического применения); патент США № 6077939 (пегилирование N-концевого альфа-углерода пептида) и Veronese (2001) *Biomaterials* 22:405-417 (обзорная статья по пегилированию пептидов и белков)].

В предпочтительных воплощениях первая полиалкиленгликолевая единица, более предпочтительно первая полиэтиленгликолевая единица, непосредственно присоединена к атому кислорода, связанному с фосфором. В этих воплощениях первая полиалкиленгликолевая единица, предпочтительно первая полиэтиленгликолевая единица, не содержит функциональной группы для присоединения к атому кислорода, связанному с фосфором, то есть атом кислорода непосредственно связан с атомом углерода первой полиалкиленгликолевой единицы, предпочтительно с  $\text{CH}_2$  первой полиэтиленгликолевой единицы.

В одной группе воплощений первая полиалкиленгликолевая единица содержит по меньшей мере 1 алкиленгликолевую субъединицу, предпочтительно по меньшей мере 2 алкиленгликолевые субъединицы, более предпочтительно по меньшей мере 3 алкиленгликолевые субъединицы, еще более предпочтительно по меньшей мере 4 алкиленгликолевые субъединицы, еще более предпочтительно по меньшей мере 6 алкиленгликолевых субъединиц, еще более предпочтительно по меньшей мере 8 алкиленгликолевых субъединиц. В некоторых подобных воплощениях первая полиалкиленгликолевая единица содержит не более чем примерно 100 алкиленгликолевых субъединиц, предпочтительно не более чем примерно 50 алкиленгликолевых единиц, более предпочтительно не более чем примерно 45 алкиленгликолевых субъединиц, более предпочтительно не более чем примерно 40 алкиленгликолевых субъединиц, более предпочтительно не более чем примерно 35 субъединиц, еще более предпочтительно не более чем примерно 30 алкиленгликолевых субъединиц. В любом из этих воплощений алкиленгликолевая субъединица может представлять собой алкиленгликолевую субъединицу, как описано в настоящем документе. Предпочтительно в любом из этих

воплощений каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой

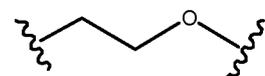
этиленгликолевую субъединицу, имеющую следующую структуру:



Предпочтительно, когда каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой этиленгликолевую субъединицу, в любом из этих воплощений первая полиалкиленгликолевая единица представляет собой первую полиэтиленгликолевую единицу.

В одной группе воплощений первая полиалкиленгликолевая единица содержит одну или более линейную полиалкиленгликолевую цепь, каждая из которых имеет по меньшей мере 1 алкиленгликолевую субъединицу, предпочтительно по меньшей мере 2 алкиленгликолевые субъединицы, более предпочтительно по меньшей мере 3 алкиленгликолевые субъединицы, еще более предпочтительно по меньшей мере 4 алкиленгликолевые субъединицы, еще более предпочтительно по меньшей мере 6 алкиленгликолевых субъединиц, еще более предпочтительно по меньшей мере 8 алкиленгликолевых субъединиц. В предпочтительных воплощениях первая полиалкиленгликолевая единица содержит в общей сложности по меньшей мере 1 алкиленгликолевую субъединицу, предпочтительно по меньшей мере 2 алкиленгликолевые субъединицы, более предпочтительно по меньшей мере 3, еще более предпочтительно по меньшей мере 4, еще более предпочтительно по меньшей мере 6 или еще более предпочтительно по меньшей мере 8 алкиленгликолевых субъединиц. В некоторых подобных воплощениях первая полиалкиленгликолевая единица содержит не более чем, в общей сложности, примерно 100 алкиленгликолевых субъединиц, предпочтительно не более чем, в общей сложности, примерно 50 алкиленгликолевых субъединиц, более предпочтительно не более чем, в общей сложности, примерно 45 субъединиц, еще более предпочтительно не более чем, в общей сложности, примерно 40 субъединиц, еще более предпочтительно не более чем, в общей сложности, примерно 35 субъединиц, еще более предпочтительно не более чем, в общей сложности, примерно 30 субъединиц. В любом из этих воплощений алкиленгликолевая субъединица может представлять собой алкиленгликолевую субъединицу, как описано в настоящем документе. Предпочтительно в любом из этих воплощений каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой

этиленгликолевую субъединицу, имеющую следующую структуру:

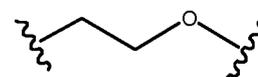


Предпочтительно, когда каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой

этиленгликолевую субъединицу, в любом из этих воплощений первая полиалкиленгликолевая единица представляет собой первую полиэтиленгликолевую единицу, содержащую одну или более линейную полиэтиленгликолевую цепь.

В другой группе воплощений первая полиалкиленгликолевая единица содержит в общей сложности всего от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 3 до 45, еще более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более предпочтительно от 8 до 30 алкиленгликолевых субъединиц. В любом из этих воплощений алкиленгликолевая субъединица может представлять собой алкиленгликолевую субъединицу, как описано в настоящем документе. Предпочтительно в любом из этих воплощений каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой

этиленгликолевую субъединицу, имеющую следующую структуру:



Предпочтительно, когда каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой этиленгликолевую субъединицу, в любом из этих воплощений первая полиалкиленгликолевая единица представляет собой первую полиэтиленгликолевую единицу.

В другой группе воплощений первая полиалкиленгликолевая единица содержит одну или более линейную полиалкиленгликолевую цепь, имеющую в общей сложности всего от 1 до 100, предпочтительно 2 до 50, более предпочтительно 3 до 45, еще более предпочтительно 4 до 40, еще более предпочтительно 6 до 35, еще более предпочтительно 8 до 30 алкиленгликолевых субъединиц. В любом из этих воплощений алкиленгликолевая субъединица может представлять собой алкиленгликолевую субъединицу, как описано в настоящем документе. Предпочтительно в любом из этих воплощений каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой этиленгликолевую субъединицу,

имеющую следующую структуру:



Предпочтительно, когда каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой этиленгликолевую субъединицу, в любом из этих воплощений первая полиалкиленгликолевая единица представляет собой первую полиэтиленгликолевую единицу, содержащую одну или более линейную полиэтиленгликолевую цепь.

В другой группе воплощений первая полиалкиленгликолевая единица представляет собой линейную одиночную полиалкиленгликолевую цепь, имеющую по меньшей мере 1 субъединицу, предпочтительно по меньшей мере 2 субъединицы, более предпочтительно

по меньшей мере 3 субъединицы, еще более предпочтительно по меньшей мере 6 субъединиц, еще более предпочтительно по меньшей мере 8 субъединиц. В любом из этих воплощений алкиленгликолевая субъединица может представлять собой алкиленгликолевую субъединицу, как описано в настоящем документе. Предпочтительно в любом из этих воплощений каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой

этиленгликолевую субъединицу, имеющую следующую структуру:



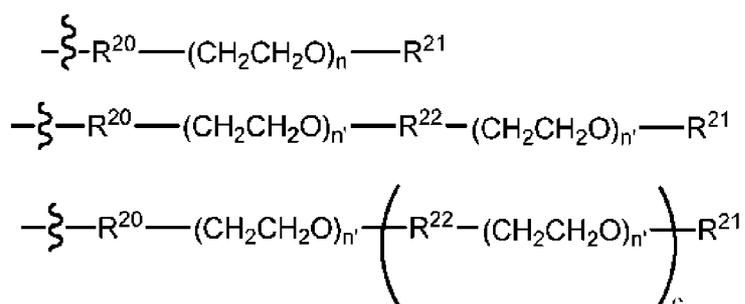
Предпочтительно, когда каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой этиленгликолевую субъединицу, в любом из этих воплощений первая полиалкиленгликолевая единица представляет собой первую полиэтиленгликолевую единицу, которая представляет собой линейную одиночную полиэтиленгликолевую цепь. Возможно в любом из этих воплощений линейная одиночная полиалкиленгликолевая цепь может быть дериватизирована.

В другой группе воплощений полиалкиленгликолевая единица представляет собой линейную одиночную полиалкиленгликолевую цепь, имеющую от 1 до 100, предпочтительно 2 до 50, более предпочтительно 3 до 45, более предпочтительно 4 до 40, более предпочтительно 6 до 35, более предпочтительно 8 до 30 алкиленгликолевых субъединиц. В любом из этих воплощений алкиленгликолевая субъединица может представлять собой алкиленгликолевую субъединицу, как описано в настоящем документе. Предпочтительно в любом из этих воплощений каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой этиленгликолевую субъединицу, имеющую следующую структуру:



Предпочтительно, когда каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой этиленгликолевую субъединицу, в любом из этих воплощений первая полиалкиленгликолевая единица представляет собой первую полиэтиленгликолевую единицу, которая представляет собой линейную одиночную полиэтиленгликолевую цепь. Возможно в любом из этих воплощений линейная одиночная полиалкиленгликолевая цепь может быть дериватизирована.

Иллюстративные линейные полиэтиленгликолевые единицы, которые можно использовать в качестве первой полиалкиленгликолевой единицы, в частности, в качестве первой полиэтиленгликолевой единицы, в любом из воплощений, предложенных в настоящем документе, являются следующими:



где волнистая линия указывает место присоединения к атому кислорода, связанному с фосфором;

$R^{20}$  представляет собой PEG-присоединяющую единицу; предпочтительно  $R^{20}$  отсутствует;  $R^{21}$  представляет собой PEG-кэпирующую единицу (в настоящем документе  $R^{21}$  также обозначается как « $K^F$ »);

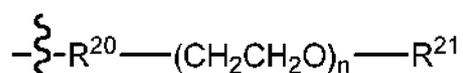
$R^{22}$  представляет собой PEG-связывающую единицу (то есть для связывания нескольких цепей субъединиц PEG вместе;

$n$  независимо выбран от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 3 до 45, более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более предпочтительно от 8 до 30;

$e$  составляет 2 до 5;

каждый  $n'$  независимо выбран от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 3 до 45, более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более предпочтительно от 8 до 30. В предпочтительных воплощениях присутствует по меньшей мере 1, предпочтительно по меньшей мере 2, более предпочтительно по меньшей мере 3, более предпочтительно по меньшей мере 4, более предпочтительно по меньшей мере 6, еще более предпочтительно по меньшей мере 8 этиленгликолевых субъединиц в полиэтиленгликолевой единице. В некоторых воплощениях присутствует не более чем 100, предпочтительно не более чем 50, более предпочтительно не более чем 45, более предпочтительно не более чем 40, более предпочтительно не более чем 35, еще более предпочтительно не более чем 30 этиленгликолевых субъединиц в полиэтиленгликолевой единице. Когда  $R^{20}$  отсутствует, субъединица  $(CH_2CH_2O)$  непосредственно связана с атомом кислорода, который присоединен к фосфору.

Предпочтительно линейная полиэтиленгликолевая единица представляет собой



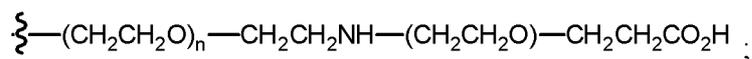
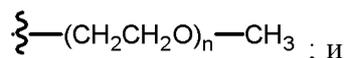
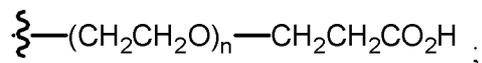
где волнистая линия указывает место присоединения к атому кислорода, связанному с фосфором;  $R^{20}$ ,  $R^{21}$  (также обозначаемые в настоящем документе « $K^F$ ») и  $n$  имеют значения, определенные в настоящем документе; более предпочтительно  $R^{20}$  отсутствует. В предпочтительных воплощениях  $n$  составляет 12 или примерно 12. В предпочтительных воплощениях  $n$  составляет 24 или примерно 24. Предпочтительно  $R^{21}$  представляет собой H.

Полиэтиленгликоль-присоединяющая единица  $R^{20}$ , если она присутствует, является частью первой полиэтиленгликолевой единицы и действует для связывания первой полиэтиленгликолевой единицы с атомом кислорода, связанным с фосфором. В связи с этим атом кислорода, связанный с фосфором, образует связь с первой полиэтиленгликолевой единицей. В иллюстративных воплощениях PEG-присоединяющая единица  $R^{20}$ , если она присутствует, выбрана из группы, состоящей из  $*(C_1-C_{10})$ алкила- $\#$ ,  $*-арилена-\#$ ,  $*(C_1-C_{10})$ алкил- $O-\#$ ,  $*(C_1-C_{10})$ алкил- $C(O)-\#$ ,  $*(C_1-C_{10})$ алкил- $C(O)O-\#$ ,  $*(C_1-C_{10})$ алкил- $NH-\#$ ,  $*(C_1-C_{10})$ алкил- $S-\#$ ,  $*(C_1-C_{10})$ алкил- $C(O)-NH-\#$ ,  $*(C_1-C_{10})$ алкил- $NH-C(O)-\#$  и  $*-CH_2-CH_2SO_2-(C_1-C_{10})$ алкила- $\#$ ; где  $*$  обозначает точку присоединения к кислороду, связанному с фосфором, и  $\#$  обозначает точку присоединения к этиленгликолевой единице.

PEG-связывающая единица  $R^{22}$ , если она присутствует, является частью полиэтиленгликолевой единицы и не является материалом, содержащим PEG, который действует для соединения двух или более цепей повторяющихся субъединиц  $-CH_2CH_2O-$ . В иллюстративных воплощениях PEG-связывающая единица  $R^{22}$ , если она присутствует, независимо выбрана из группы, состоящей из  $*(C_1-C_{10})$ алкил- $C(O)-NH-\#$ ,  $*(C_1-C_{10})$ алкил- $NH-C(O)-\#$ ,  $*(C_2-C_{10})$ алкил- $NH-\#$ ,  $*(C_2-C_{10})$ алкил- $O-\#$ ,  $*(C_1-C_{10})$ алкил- $S-\#$  или  $*(C_2-C_{10})$ алкил- $NH-\#$ ; где  $*$  обозначает точку присоединения к атому кислорода этиленгликолевой субъединицы, и  $\#$  обозначает точку присоединения к атому углерода другой этиленгликолевой субъединицы.

Группа  $R^{21}$ , также обозначаемая в настоящем документе « $K^F$ », в иллюстративных воплощениях представляет собой H (водород) или может представлять собой первую кэпирующую группу, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $R^{21}$  независимо выбрана из группы, состоящей из  $-H$ ,  $-PO_3H$ ,  $-(C_1-C_{10})$ алкила,  $-(C_1-C_{10})$ алкил- $SO_3H$ ,  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $CO_2H$ ,  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $OH$ ,  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $NH_2$ ,  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $NH(C_1-C_3)$ алкила и  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $N((C_1-C_3)$ алкила) $_2$ . В некоторых воплощениях  $R^{21}$  может представлять собой  $-(C_1-C_{10})$ алкил, в частности метил. Более предпочтительно  $R^{21}$  представляет собой H.

Иллюстративные линейные первые полиэтиленгликолевые единицы, которые можно использовать в качестве первых полиалкиленгликолевых единиц в любом из воплощений, предложенных в настоящем документе, являются следующими.



где волнистая линия указывает место присоединения к атому кислорода, связанному с фосфором; и каждый  $n$  составляет от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 3 до 45, еще более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более предпочтительно от 8 до 30. В некоторых воплощениях  $n$  составляет примерно 12. В некоторых воплощениях  $n$  составляет примерно 24.

В некоторых воплощениях первая полиалкиленгликолевая единица имеет массу от примерно 300 дальтон до примерно 5 килодальтон; от примерно 300 дальтон, до примерно 4 килодальтон; от примерно 300 дальтон, до примерно 3 килодальтон; от примерно 300 дальтон, до примерно 2 килодальтон; или от примерно 300 дальтон, до примерно 1 килодальтона. В некоторых таких аспектах первая полиалкиленгликолевая единица может содержать по меньшей мере 6 алкиленгликолевых субъединиц, или по меньшей мере 8 алкиленгликолевых субъединиц. В некоторых таких аспектах первая полиалкиленгликолевая единица может содержать по меньшей мере 6 алкиленгликолевых субъединиц, или по меньшей мере 8 алкиленгликолевых субъединиц, но не более чем 100 алкиленгликолевых субъединиц, предпочтительно не более чем 50 алкиленгликолевых субъединиц. В некоторых воплощениях первая полиалкиленгликолевая единица представляет собой первую полиэтиленгликолевую единицу, имеющую массу от примерно 300 дальтон до примерно 5 килодальтон; от примерно 300 дальтон, до примерно 4 килодальтон; от примерно 300 дальтон, до примерно 3 килодальтон; от примерно 300 дальтон, до примерно 2 килодальтон; или от примерно 300 дальтон, до примерно 1 килодальтона. В некоторых таких аспектах первая полиэтиленгликолевая единица может содержать по меньшей мере 6 этиленгликолевых субъединиц или по меньшей мере 8 этиленгликолевых субъединиц. В некоторых таких аспектах первая полиэтиленгликолевая единица содержит по меньшей мере 6 этиленгликолевых субъединиц или по меньшей мере

8 этиленгликолевых субъединиц но не более чем 100 этиленгликолевых субъединиц, предпочтительно не более чем 50 этиленгликолевых субъединиц.

В некоторых воплощениях, когда  $R^1$  представляет собой первую полиалкиленгликолевую единицу  $R^F$ , в конъюгате формулы (I) не присутствуют другие алкиленгликолевые субъединицы (то есть никакие алкиленгликолевые субъединицы не присутствуют ни в одном из других компонентов конъюгата, например, в линкере L, как предложено в настоящем документе). В других аспектах, когда  $R^1$  представляет собой первую полиалкиленгликолевую единицу, присутствует не более чем 8, не более чем 7, не более чем 6, не более чем 5, не более чем 4, не более чем 3, не более чем 2 или не более чем 1 другая алкиленгликолевая субъединица, присутствующая в конъюгате формулы (I) (то есть не более чем 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 другая алкиленгликолевая субъединица присутствует в других компонентах конъюгата, например в линкере L, как предложено в настоящем документе).

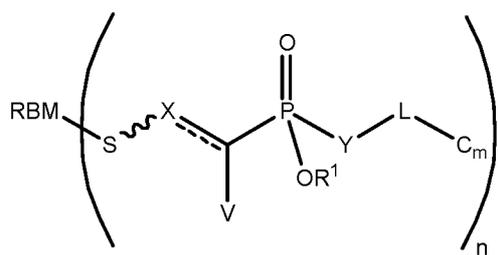
Предпочтительно в других воплощениях, когда  $R^1$  представляет собой первую полиалкиленгликолевую единицу  $R^F$ , конъюгат дополнительно содержит вторую полиалкиленгликолевую единицу  $R^S$ , как описано в настоящем документе. Предпочтительно, когда  $R^1$  представляет собой первую полиэтиленгликолевую единицу и конъюгат дополнительно содержит вторую полиалкиленгликолевую единицу  $R^S$ , вторая полиалкиленгликолевая единица представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе.

Следует понимать, что при упоминании алкиленгликолевых субъединиц, в частности этиленгликолевых субъединиц, и в зависимости от контекста количество субъединиц может представлять собой среднее число, например, когда речь идет о совокупности конъюгатов или промежуточных соединений, и использование полидисперсных полиалкиленгликолей, в частности полидисперсных полиэтиленгликолей.

#### **«L»: Линкер**

В настоящем изобретении предложены конъюгаты, в которых рецепторсвязывающая молекула, как описано в настоящем документе, связана с фрагментом камптотецина. В соответствии с настоящим изобретением рецепторсвязывающая молекула может быть связана посредством группы Y и ковалентного присоединения линкером L с фрагментом камптотецина. В настоящем документе «линкер» L представляет собой любой химический фрагмент, который способен связывать группу Y,

такую как, например, NH, с другим фрагментом, таким как фрагмент камптотецина. В этом отношении снова упоминается формула (I), описанная в настоящем документе:



(I).

Соответственно, фрагмент С камптотецина может быть связан с Y через линкер L. В

формуле (I) RBM, , V, X, Y, R<sup>1</sup>, L, C, m и n имеют значения, определенные в настоящем документе. Линкер L служит для соединения Y с фрагментом камптотецина (C). Линкер L представляет собой любой химический фрагмент, который способен связывать Y с фрагментом камптотецина C. В частности, линкер L присоединяет Y к фрагменту камптотецина C через ковалентную связь(и). Линкерный реагент представляет собой бифункциональный или многофункциональный фрагмент, который можно использовать для связывания фрагмента камптотецина C и Y с образованием конъюгатов формулы (I). Термины «линкерный реагент», «сшивающий реагент», «линкер, полученный из сшивающего реагента» и «линкер» могут использоваться взаимозаменяемо в настоящем документе.

Линкеры могут быть чувствительны к расщеплению (расщепляемый линкер), такому как ферментативное расщепление, кислотно-индуцированное расщепление, фотоиндуцированное расщепление и расщепление дисульфидной связи. Ферментативное расщепление включает, но не ограничивается ими, расщепление, индуцированное протеазой, расщепление, индуцированное пептидазой, расщепление, индуцированное эстеразой, расщепление, индуцированное гликозидазой, расщепление, индуцированное фосфатазой, и расщепление, индуцированное сульфатазой, предпочтительно в условиях, при которых фрагмент камптотецина и/или рецепторсвязывающая молекула остаются активными. В качестве альтернативы, линкеры могут быть существенно устойчивыми к расщеплению (например, стабильный линкер или нерасщепляемый линкер). В некоторых аспектах линкер может представлять собой прозаряженный линкер, гидрофильный линкер, линкер на основе PEG или линкер на основе дикарбоновой кислоты. Соответственно, в некоторых воплощениях любого из конъюгатов антитело-лекарственное средство, описанных в настоящем документе, линкер (L) выбран из группы, состоящей из

расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, гидрофильного линкера, линкера на основе PEG, прозаряженного линкера, пептидного линкера и линкера на основе дикарбоновой кислоты. Предпочтительно линкер L представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых воплощениях линкер L представляет собой нерасщепляемый линкер.

Предпочтительно, как описано в настоящем документе, линкер L является расщепляемым. В некоторых воплощениях L представляет собой линкер, чувствительный к ферментативному расщеплению. В некоторых воплощениях L представляет собой кислотолабильный линкер, фотолабильный линкер, расщепляемый пептидазой линкер, расщепляемый протеазой линкер, расщепляемый эстеразой линкер, расщепляемый гликозидазой линкер, расщепляемый фосфатазой линкер, расщепляемый сульфатазой линкер, линкер, восстанавливаемый дисульфидной связью, гидрофильный линкер, прозаряженный линкер, линкер на основе PEG или линкер на основе дикарбоновой кислоты. Предпочтительно линкер L является расщепляемым протеазой, глюкуронидазой, сульфатазой, фосфатазой, эстеразой или посредством дисульфидного восстановления. Предпочтительно линкер представляет собой расщепляемый пептидазой линкер. Другие предпочтительные линкеры расщепляются протеазой.

Нерасщепляемый линкер представляет собой любой химический фрагмент, способный связывать фрагмент камптотецина с Y стабильным, ковалентным образом и не подпадает под категории, перечисленные в настоящем документе для расщепляемых линкеров. Таким образом, нерасщепляемые линкеры в значительной степени устойчивы к кислотно-индуцированному расщеплению, фотоиндуцированному расщеплению, пептидазно-индуцированному расщеплению, протеазно-индуцированному расщеплению, гликозидазно-индуцированному расщеплению, фосфатазно-индуцированному расщеплению, эстеразно-индуцированному расщеплению и расщеплению дисульфидной связи. Кроме того, термин «нерасщепляемый» относится к способности химической связи в линкере или примыкающей к линкеру противостоять расщеплению, индуцированному кислотой, фотолабильным расщепляющим агентом, пептидазой, протеазой, гликозидазой, фосфатазой, эстеразой, или химическим или физиологическим соединением, которое расщепляет дисульфидную связь, в условиях, при которых фрагмент камптотецина или рецепторсвязывающая молекула не теряют своей активности.

Кислотолабильные линкеры представляют собой линкеры, расщепляемые при кислом pH. Например, некоторые внутриклеточные компартменты, такие как эндосомы и

лизосомы, имеют кислый рН (рН 4–5) и обеспечивают условия, подходящие для расщепления кислотолабильных линкеров.

Некоторые линкеры могут расщепляться пептидазами, то есть расщепляемые пептидазой линкеры. В этом отношении некоторые пептиды легко расщепляются внутри или снаружи клеток, см., например, Trout et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982), и Umemoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989). Пептиды состоят из  $\alpha$ -аминокислот и пептидных связей, которые химически представляют собой амидные связи между карбоксилатом одной аминокислоты и аминогруппой второй аминокислоты.

Некоторые линкеры могут расщепляться эстеразами, то есть расщепляемые эстеразой линкеры. В связи с этим некоторые сложные эфиры могут расщепляться эстеразами, присутствующими внутри или снаружи клеток. Сложные эфиры образуются при конденсации карбоновой кислоты и спирта. Простые сложные эфиры — это сложные эфиры, полученные из простых спиртов, таких как алифатические спирты, а также небольших циклических и небольших ароматических спиртов.

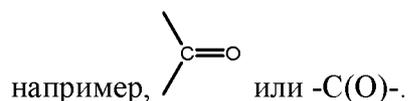
Прозаряженные линкеры получают из заряженных сшивающих реагентов, которые сохраняют свой заряд после включения в конъюгат антитело-лекарственное средство. Примеры прозаряженных линкеров можно найти в US 2009/0274713.

Предпочтительно, как описано в настоящем документе, линкер L является расщепляемым. В качестве иллюстративных примеров линкер может расщепляться протеазой, глюкуронидазой, сульфатазой, фосфатазой, эстеразой или посредством дисульфидного восстановления. Предпочтительно линкер L является расщепляемым протеазой. Более предпочтительно чтобы линкер расщеплялся катепсином, таким как, в частности, катепсин В. Линкер может содержать дипептидный фрагмент, такой как, например, фрагмент валин-цитруллин или фрагмент валин-аланин, который может расщепляться катепсином, таким как катепсин В. Соответственно, в некоторых воплощениях линкер содержит фрагмент валин-цитруллин. В некоторых воплощениях линкер содержит фрагмент валин-аланин. Линкер может содержать сайт расщепления. Термин «сайт расщепления» может относиться к химическому фрагменту, который распознается ферментом, с последующим расщеплением, например, путем гидролиза. В качестве иллюстративного примера сайт расщепления представляет собой последовательность аминокислот, которая распознается протеазой или пептидазой и гидролизуется указанной протеазой или пептидазой. В некоторых воплощениях сайт расщепления представляет собой дипептид. В некоторых воплощениях сайт расщепления

представляет собой фрагмент валин-цитруллин. В некоторых воплощениях сайт расщепления представляет собой фрагмент валин-аланин.

Вторая спейсерная единица

В предпочтительных воплощениях линкер (L) содержит вторую спейсерную единицу -A-, которая связана с -Y-. Вторая спейсерная единица служит для соединения -Y- с другой частью линкера, если он присутствует, или с фрагментом камптотецина (-C). Как легко понять специалисту в данной области техники, это зависит от того, присутствует другая часть линкера или нет. Вторая спейсерная единица (-A-) может представлять собой любую химическую группу или фрагмент, который способен соединять -Y- с другой частью линкера, если он присутствует, или с фрагментом камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет. В этом отношении -Y-, как описано в настоящем документе, связан со второй спейсерной единицей (-A-). Вторая спейсерная единица (-A-) может содержать или может представлять собой функциональную группу, которая способна образовывать связь с другой частью линкера, если он присутствует, или с фрагментом камптотецина (-C). Опять же, это зависит от того, присутствует ли другая часть линкера или нет. Предпочтительно функциональная группа, которая способна образовывать связь с другой частью линкера или с фрагментом камптотецина (-C), представляет собой карбонильную группу, которая изображена как,



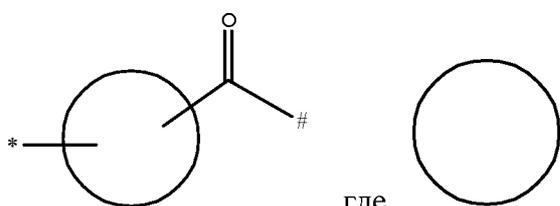
Вторая спейсерная единица может представлять собой любую спейсерную единицу, известную специалисту в данной области техники, например, неразветвленную или разветвленную фрагмент на основе углеводорода. Вторая спейсерная единица также может содержать циклические фрагменты, такие как, например, но не ограничиваясь ими, ароматические фрагменты. Если вторая спейсерная единица представляет собой фрагмент на основе углеводорода, основная цепь второго спейсерного фрагмента может содержать только атомы углерода, но также может содержать гетероатомы, такие как атомы кислорода (O), азота (N) или серы (S), и/или может содержать карбонильные группы (C=O). Вторая спейсерная единица может содержать или представлять собой, например, цепь атома углерода (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>). В типичных воплощениях вторых спейсерных единиц на углеводородной основе спейсерный фрагмент содержит от 1 до примерно 150, от 1 до примерно 100, от 1 до примерно 75, от 1 до примерно 50, или от 1 до примерно 40, или от 1 до примерно 30, или 1 примерно до 20, включая 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 и 19 атомов

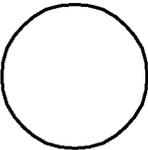
основной цепи. Специалист в данной области техники знает, как выбрать подходящие вторые спейсерные единицы.

В некоторых воплощениях вторая спейсерная единица ( $-A-$ ), если она присутствует, выбрана из группы, состоящей из  $^{*}(C_1-C_{10})$ алкилен- $C(O)-^{\#}$ ,  $^{*}(C_3-C_8)$ карбоцикло- $C(O)-^{\#}$ ,  $^{*}$ -арил- $C(O)-^{\#}$ ,  $^{*}(C_1-C_{10})$ алкилен-арил- $C(O)-^{\#}$ ,  $^{*}$ -арил- $(C_1-C_{10})$ алкилен- $C(O)-^{\#}$ ,  $^{*}(C_1-C_{10})$ алкилен- $(C_3-C_8)$ карбоцикло- $C(O)-^{\#}$ ,  $^{*}(C_3-C_8)$ карбоцикло- $(C_1-C_{10})$ алкилен- $C(O)-^{\#}$ ,  $^{*}(C_3-C_8)$ гетероцикло- $C(O)-^{\#}$ ,  $^{*}(C_1-C_{10})$ алкилен- $(C_3-C_8)$ гетероцикло- $C(O)-^{\#}$  и  $^{*}(C_3-C_8)$ гетероцикло- $(C_1-C_{10})$ алкилен- $C(O)-^{\#}$ ;  $^{*}$  обозначает точку присоединения к  $-Y-$ ; и  $\#$  обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина ( $-C$ ), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет. Предпочтительно вторая спейсерная единица ( $-A-$ ), если она присутствует, выбрана из группы, состоящей из  $^{*}(C_3-C_8)$ карбоцикло- $C(O)-^{\#}$ ,  $^{*}$ -арил- $C(O)-^{\#}$  и  $^{*}(C_3-C_8)$ гетероцикло- $C(O)-^{\#}$ ;  $^{*}$  обозначает точку присоединения к  $-Y-$ ; и  $\#$  обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина ( $-C$ ), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет.

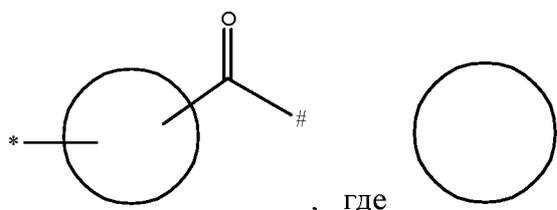
В других воплощениях вторая спейсерная единица ( $-A-$ ), если она присутствует, может быть выбрана из группы, состоящей из  $^{*}(C_1-C_{10})$ алкилен- $^{\#}$ ,  $^{*}(C_3-C_8)$ карбоцикло- $^{\#}$ ,  $^{*}$ -арил- $^{\#}$ ,  $^{*}(C_1-C_{10})$ алкилен-арил- $^{\#}$ ,  $^{*}$ -арил- $(C_1-C_{10})$ алкилен- $^{\#}$ ,  $^{*}(C_1-C_{10})$ алкилен- $(C_3-C_8)$ карбоцикло- $^{\#}$ ,  $^{*}(C_3-C_8)$ карбоцикло- $(C_1-C_{10})$ алкилен- $^{\#}$ ,  $^{*}(C_3-C_8)$ гетероцикло- $^{\#}$ ,  $^{*}(C_1-C_{10})$ алкилен- $(C_3-C_8)$ гетероцикло- $^{\#}$  и  $^{*}(C_3-C_8)$ гетероцикло- $(C_1-C_{10})$ алкилен- $^{\#}$ ;  $^{*}$  обозначает точку присоединения к  $-Y-$ ; и  $\#$  обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина ( $-C$ ), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет. Предпочтительно вторая спейсерная единица ( $-A-$ ), если она присутствует, может быть выбрана из группы, состоящей из  $^{*}(C_3-C_8)$ карбоцикло- $^{\#}$ ,  $^{*}$ -арил- $^{\#}$  и  $^{*}(C_3-C_8)$ гетероцикло- $^{\#}$ ;  $^{*}$  обозначает точку присоединения к  $-Y-$ ; и  $\#$  обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина ( $-C$ ), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет.

Предпочтительно вторая спейсерная единица  $-A-$  представляет собой

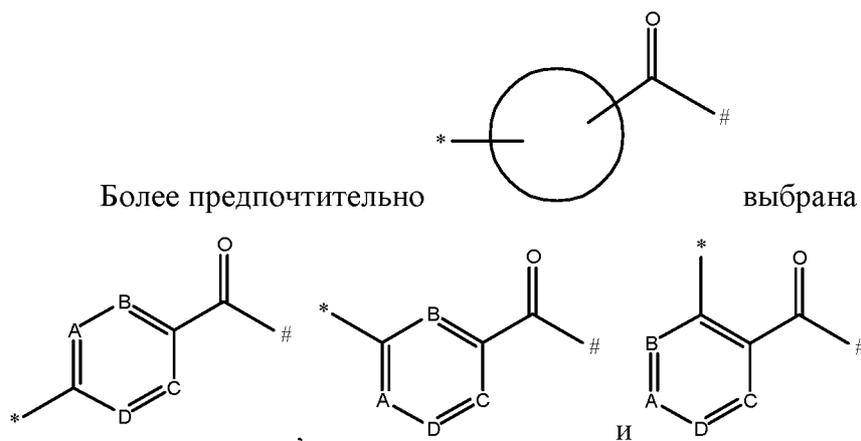


, где  представляет собой пяти- или шестичленное

карбоциклическое кольцо; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет. Карбоциклическое кольцо может быть ароматическим или неароматическим. Предпочтительно вторая спейсерная единица -A- представляет собой



, где представляет собой пяти- или шестичленное гетероциклическое кольцо, содержащее 1, 2 или 3 гетероатомов, независимо выбранных из группы, состоящей из N, O и S; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет. Гетероциклическое кольцо может быть ароматическим или неароматическим.

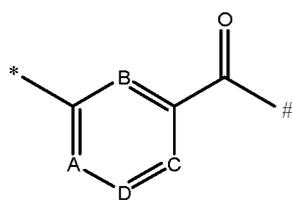


, где каждый из A, B, C и D независимо выбран из N (азота) и C-H; предпочтительно по меньшей мере один из A, B, C и D представляет собой C-H; более предпочтительно по меньшей мере два из A, B, C и D представляют собой C-H; еще более предпочтительно по меньшей мере три из A, B, C и D представляют собой C-H, еще более предпочтительно каждый из A, B, C и D представляют собой C-H; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет. Еще более

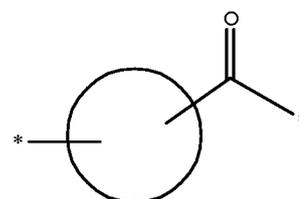
предпочтительно

представляет собой

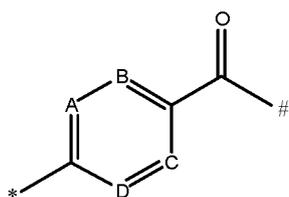
или



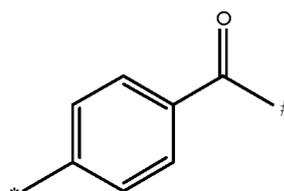
, где каждый из A, B, C и D независимо выбран из N (азота) и C-H; предпочтительно по меньшей мере одним из A, B, C и D представляет собой C-H; более предпочтительно по меньшей мере два из A, B, C и D представляют собой C-H; еще более предпочтительно по меньшей мере три из A, B, C и D представляют собой C-H, еще более предпочтительно каждый из A, B, C и D представляют собой C-H; где \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует



другая часть линкера или нет. Еще более предпочтительно

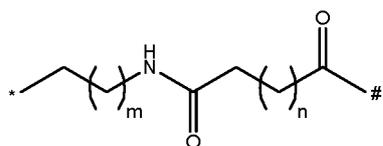


представляет собой , где каждый из A, B, C и D независимо выбран из N (азота) и C-H; предпочтительно по меньшей мере одним из A, B, C и D представляет собой C-H; более предпочтительно по меньшей мере два из A, B, C и D представляют собой C-H; еще более предпочтительно по меньшей мере три из A, B, C и D представляют собой C-H, еще более предпочтительно каждый из A, B, C и D представляют собой C-H; где \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет. В наиболее предпочтительных воплощениях



вторая спейсерная единица A представляет собой где \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет.

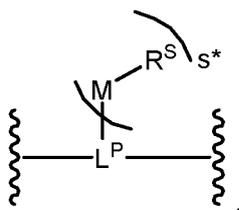
В других воплощениях вторая спейсерная единица (-A-) может представлять собой



; и  $m$  и  $n$  каждый независимо представляет собой целое число, например, от 0 до 20, 0 до 15, 1 до 10, 1 до 8, 1 до 6, 1 до 4, 1 до 3, 1 до 2 или 1, предпочтительно  $m$  составляет 1 и  $n$  составляет 1; \* обозначает положение -Y-, а # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет. Такая вторая спейсерная единица может быть возможно замещенной, например, одним или двумя ( $C_1$ - $C_8$ )алкилами, в частности, у углерода рядом со звездочкой (\*).

### Группа Z

В предпочтительных воплощениях вторая спейсерная единица -A- представляет собой группу Z, указанная группа Z имеет следующую структуру:



где:

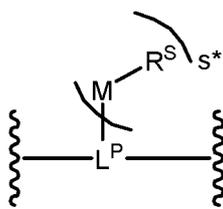
$L^P$  представляет собой параллельно соединяющую единицу;

$R^S$  каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу;

$M$  каждый независимо представляет собой связь или фрагмент, который связывает  $R^S$  с  $L^P$ ;

$s^*$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4; и

волнистые линии обозначают точку присоединения к -Y- и к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет.



Как указано в формуле  $\text{---}L^P\text{---}$ , вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  связана параллельно соединяющей единицей  $L^P$  посредством подходящего фрагмента  $M$ . В некоторых воплощениях  $M$  представляет собой связь. В некоторых воплощениях  $M$  может представлять собой фрагмент, который способен связывать полиалкиленгликолевую единицу с параллельно соединяющей единицей  $L^P$ . В качестве иллюстративных примеров

каждый М может быть независимо выбран из группы, состоящей из -NH-, -O-, S, -C(O)-O-, -C(O)-NH- и -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилена. Предпочтительно каждый М может быть независимо выбран из группы, состоящей из -NH-, -O- и -S-. Более предпочтительно каждый М представляет собой -O-.

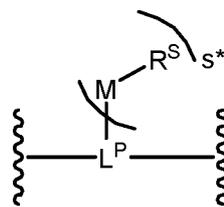
Целое число  $s^*$  может находиться в диапазоне 1 до 4. Предпочтительно целое число  $s^*$  находится в диапазоне от 1 до 3. Более предпочтительно целое число  $s^*$  составляет 1 или 2. Еще более предпочтительно целое число  $s^*$  составляет 1. Целое число  $s^*$  обозначает количество групп -M-R<sup>S</sup>, которые присоединены к параллельно соединяющей единице L<sup>P</sup>.

Параллельно соединяющая единица (L<sup>P</sup>) служит для соединения -Y- с другой частью линкера (L) и, через М, с одной или более вторых полиалкиленгликолевых единиц, как указано целым числом  $s^*$ . Соответственно, когда она присутствует, L<sup>P</sup> может представлять собой любую химическую группу или фрагмент, который способен соединять -Y- с другой частью линкера и через М со второй полиалкиленгликолевой единицей. В качестве альтернативы, параллельно соединяющая единица (L<sup>P</sup>) может связывать Y с фрагментом камптотецина (C), в случае отсутствия другой части линкера, и через М со второй полиалкиленгликолевой единицей. В этом отношении Y, как описано в настоящем документе, соединен с параллельно соединяющей единицей (L<sup>P</sup>). Параллельно соединяющая единица (L<sup>P</sup>) может содержать или может представлять собой функциональную группу, которая способна образовывать связь с другой частью линкера (L) или с фрагментом камптотецина (C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет (L). Предпочтительно функциональная группа, которая способна образовывать связь с другой частью линкера (L) или с фрагментом камптотецина (-C),

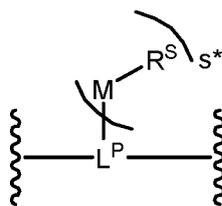
представляет собой карбонильную группу, которая изображена, например, как  или -C(O)- или -(C=O)-.

Параллельно соединяющая единица (L<sup>P</sup>) может представлять собой, например, неразветвлённый или разветвлённый фрагмент на углеводородной основе. Параллельно соединяющая единица (L<sup>P</sup>) также может содержать циклические фрагменты. Если параллельно соединяющая единица (L<sup>P</sup>) представляет собой фрагмент на углеводородной основе, основная цепь второго спейсерного фрагмента может содержать только атомы углерода, но также может содержать гетероатомы, такие как атомы кислорода (O), азота (N) или серы (S) и/или может содержать карбонильные группы (C=O). Параллельно соединяющая единица (L<sup>P</sup>) может содержать или может представлять собой, например,

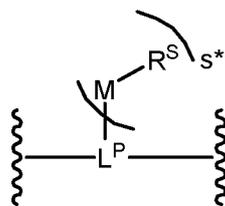
цепь атомов углерода (C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>). В типичных воплощениях параллельной соединяющей единицы на углеводородной основе (L<sup>P</sup>), связывающий фрагмент содержит от 1 до примерно 150, от 1 до примерно 100, от 1 до примерно 75, от 1 до примерно 50 или от 1 до примерно 40 или от 1 до примерно 30 или от 1 до примерно 20, включая 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 и 19 атомов основной цепи. Параллельно соединяющая единица L<sup>P</sup> способна связываться со второй полиалкиленгликолевой единицей R<sup>S</sup> через M. Специалист в данной области техники знает, как выбрать подходящие параллельно соединяющие единицы (L<sup>P</sup>).



В некоторых воплощениях группа Z, если она присутствует, выбрана из группы, состоящей из  $^{*}-(C_1-C_{10})$ алкилен-C(O)-<sup>#</sup>, замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно от 1 до 3, более предпочтительно 1 или 2, еще более предпочтительно 1 группой(ами) -M-R<sup>S</sup>;  $^{*}-(C_3-C_8)$ карбоцикло-C(O)-<sup>#</sup>, замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами) -M-R<sup>S</sup>;  $^{*}$ -арилен-C(O)-<sup>#</sup>, замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами) -M-R<sup>S</sup>;  $^{*}-(C_1-C_{10})$ алкилен-арилен-C(O)-<sup>#</sup>, замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами) -M-R<sup>S</sup>;  $^{*}$ -арилен-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-C(O)-<sup>#</sup>, замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами) -M-R<sup>S</sup>;  $^{*}-(C_1-C_{10})$ алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикло-C(O)-<sup>#</sup>, замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами) -M-R<sup>S</sup>;  $^{*}-(C_3-C_8)$ карбоцикло-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-C(O)-<sup>#</sup>, замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами) -M-R<sup>S</sup>;  $^{*}-(C_3-C_8)$ гетероцикло-C(O)-<sup>#</sup>, замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами) -M-R<sup>S</sup>;  $^{*}-(C_1-C_{10})$ алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикло-C(O)-<sup>#</sup>, замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами) -M-R<sup>S</sup>; и  $^{*}-(C_3-C_8)$ гетероцикло-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-C(O)-<sup>#</sup>, замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами) -M-R<sup>S</sup>; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера

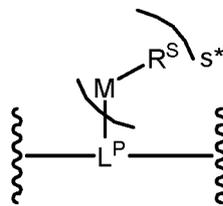


или нет. Предпочтительно группа Z, если она присутствует, выбрана из группы, состоящей из  $^{*}-(C_3-C_8)$ карбоцикло- $C(O)-^{\#}$ , замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами)  $-M-R^S$ ;  $^{*}$ -арилен- $C(O)-^{\#}$ , замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами)  $-M-R^S$ ; и  $^{*}-(C_3-C_8)$ гетероцикло- $C(O)-^{\#}$ , замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами)  $-M-R^S$ ; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет.

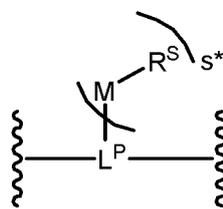


В других воплощениях группа Z, если она присутствует, может быть выбрана из группы, состоящей из  $^{*}-(C_1-C_{10})$ алкилен- $^{\#}$ , замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 до 3, более предпочтительно 1 или 2, еще более предпочтительно 1 группой(ами)  $-M-R^S$ ;  $^{*}-(C_3-C_8)$ карбоцикло- $^{\#}$ , замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами)  $-M-R^S$ ;  $^{*}$ -арилен- $^{\#}$ , замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами)  $-M-R^S$ ;  $^{*}-(C_1-C_{10})$ алкилен-арилен- $^{\#}$ , замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами)  $-M-R^S$ ;  $^{*}$ -арилен- $(C_1-C_{10})$ алкилен- $^{\#}$ , замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами)  $-M-R^S$ ;  $^{*}-(C_1-C_{10})$ алкилен- $(C_3-C_8)$ карбоцикло- $^{\#}$ , замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами)  $-M-R^S$ ;  $^{*}-(C_3-C_8)$ карбоцикло- $(C_1-C_{10})$ алкилен- $^{\#}$ , замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами)  $-M-R^S$ ;  $^{*}-(C_3-C_8)$ гетероцикло- $^{\#}$ , замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами)  $-M-R^S$ ;  $^{*}-(C_1-C_{10})$ алкилен- $(C_3-C_8)$ гетероцикло- $^{\#}$ , замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами)  $-M-R^S$ ; и  $^{*}-(C_3-C_8)$ гетероцикло- $(C_1-C_{10})$ алкилен- $^{\#}$ ,

замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами) -M-R<sup>S</sup>; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера

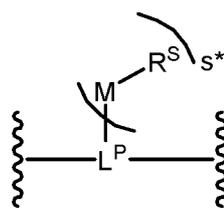


или нет. Предпочтительно группа Z, если она присутствует, может быть выбрана из группы, состоящей из \*(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикло-#, замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами) -M-R<sup>S</sup>; \*-арилен-#, замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами) -M-R<sup>S</sup>; и \*(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикло-#, замещенных, каждый независимо, от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1 группой(ами) -M-R<sup>S</sup>; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет.

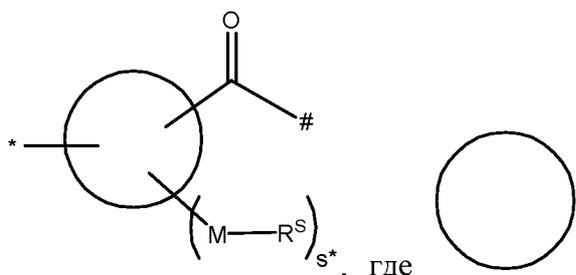


В некоторых воплощениях L<sup>P</sup> в группе Z может представлять собой одну или более чем одну аминокислоту, которая содержит подходящий фрагмент M так что может быть присоединена вторая полиалкиленгликолевая единица; предпочтительно s\* составляет 1. Аминокислота может быть природной или не природной аминокислотой. Например, аминокислота может быть выбрана из группы, состоящей из лизина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, серина, тирозина, треонина, цистеина, селеноцистеина, глицина и гомоаланина. В частности, аминокислота может быть выбрана из группы, состоящей из тирозина, серина, треонина, глутаминовой кислоты, лизина и глицина. Другие подходящие фрагменты L<sup>P</sup> могут быть выбраны из группы, состоящей из аминокислот, аминоспиртов, альдегидов и полиаминов. Подходящие аминокислоты и дополнительные группы для присоединения полиалкиленгликолевой единицы описаны, например, в WO 2015/057699.

Предпочтительно группа Z

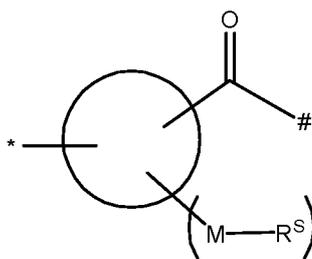


представляет собой



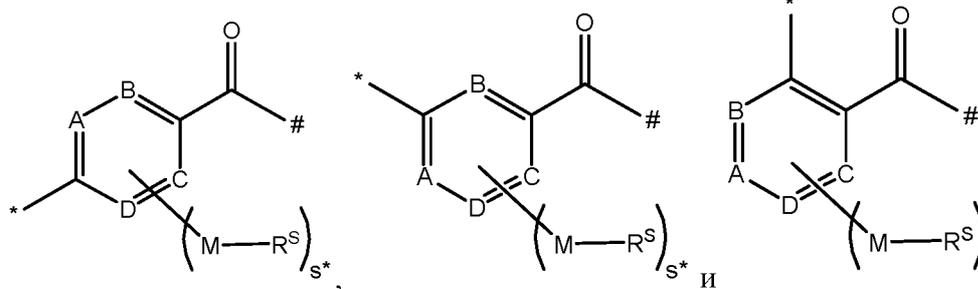
представляет собой пяти- или шестичленное

карбоциклическое кольцо; карбоциклическое кольцо может быть ароматическим или неароматическим; М каждый независимо является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый М представляет собой -O-; R<sup>S</sup> каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый R<sup>S</sup> независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; s\* представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 3, предпочтительно s\* составляет 1 или 2, более предпочтительно s\* составляет 1; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет.



Более предпочтительно

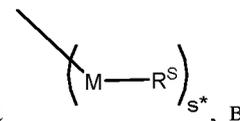
выбрана из группы, состоящей из



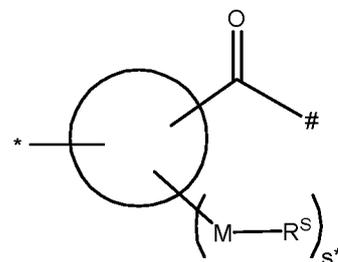
где каждый из А, В, С и D представляет собой С-Н; R<sup>S</sup> каждый независимо представляет собой вторую поли(алкилен)гликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно

каждый  $R^S$  независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе;  $M$  каждый независимо является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $M$  представляет собой  $-O-$ ; целое число  $s^*$

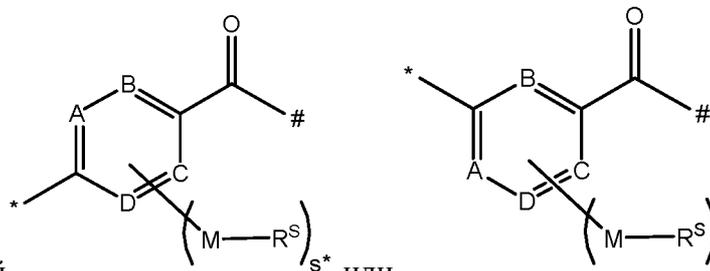
составляет 1 или 2, предпочтительно  $s^*$  составляет 1; как обозначено на



двух  $C-H$  независимо  $H$  заменен  $-M-R^S$ , когда  $s^*$  составляет 2 или в одном  $C-H$   $H$  заменен  $-M-R^S$ , когда  $s^*$  составляет 1; \* обозначает точку присоединения к  $-Y-$ ; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера (например, аминокислотной единице  $-W_w-$ ), если она присутствует, или к фрагменту камптотецина ( $-C$ ), в зависимости от того, присутствует



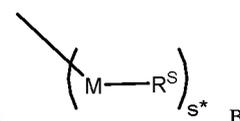
другая часть линкера или нет. Еще более предпочтительно



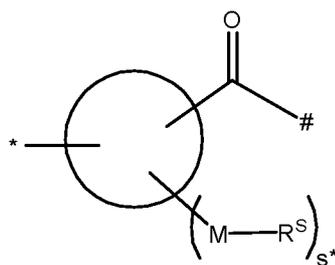
представляет собой

где каждый из  $A$ ,  $B$ ,  $C$  и  $D$  представляет собой  $C-H$ ;  $R^S$  каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $R^S$  независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе;  $M$  каждый независимо является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $M$  представляет собой  $-O-$ ; целое число  $s^*$

составляет 1 или 2, предпочтительно  $s^*$  составляет 1; как обозначено на

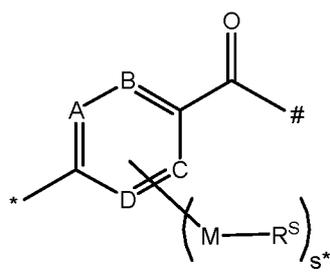


двух  $C-H$  независимо  $H$  заменен  $-M-R^S$ , когда  $s^*$  составляет 2 или в одном  $C-H$   $H$  заменен  $-M-R^S$ , когда  $s^*$  составляет 1; \* обозначает точку присоединения к  $-Y-$ ; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина ( $-C$ ), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет. Еще



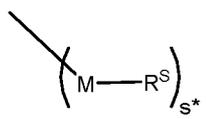
более предпочтительно

представляет собой



, где каждый из A, B, C и D представляет собой C-H;  $R^S$  каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $R^S$  независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; M каждый независимо является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый M представляет собой -O-; целое число  $s^*$  составляет 1 или 2, предпочтительно  $s^*$

составляет 1; как обозначено на

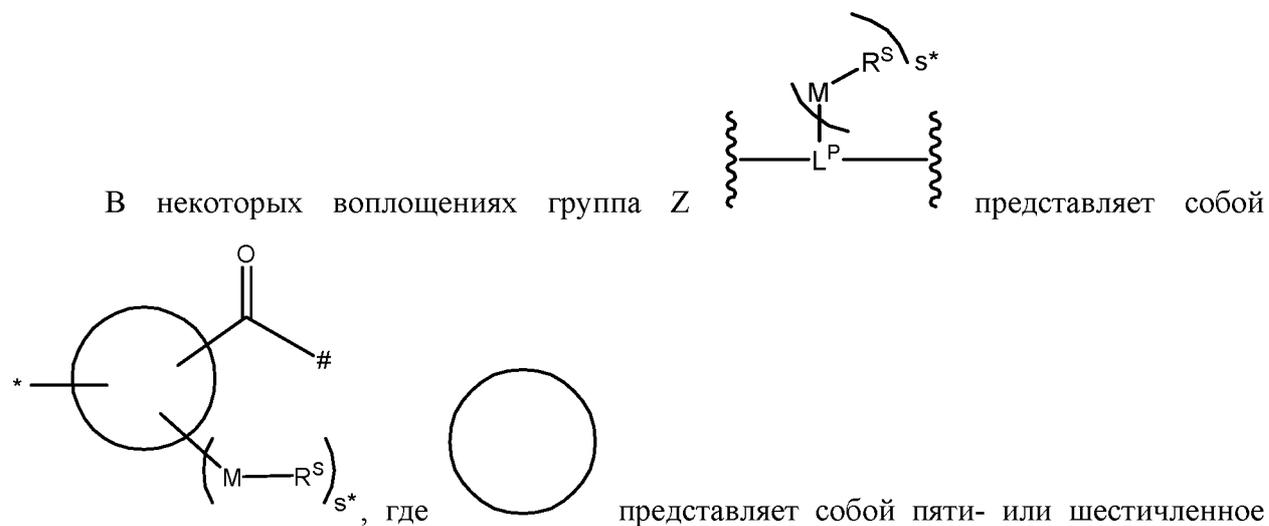


составляет 1; как обозначено на  $(M-R^S)_{s^*}$ , в двух C-H независимо H заменен -M-R<sup>S</sup>, когда  $s^*$  составляет 2 или в одном C-H H заменен -M-R<sup>S</sup>, когда  $s^*$  составляет 1; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет. В наиболее предпочтительных воплощениях

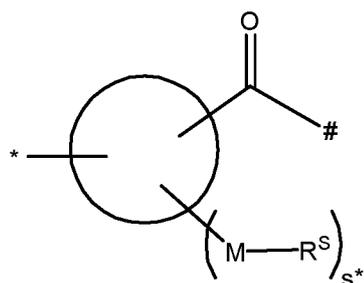


представляет собой \* где  $R^S$  представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $R^S$  представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; M является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно M представляет собой -O-; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к

фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет.

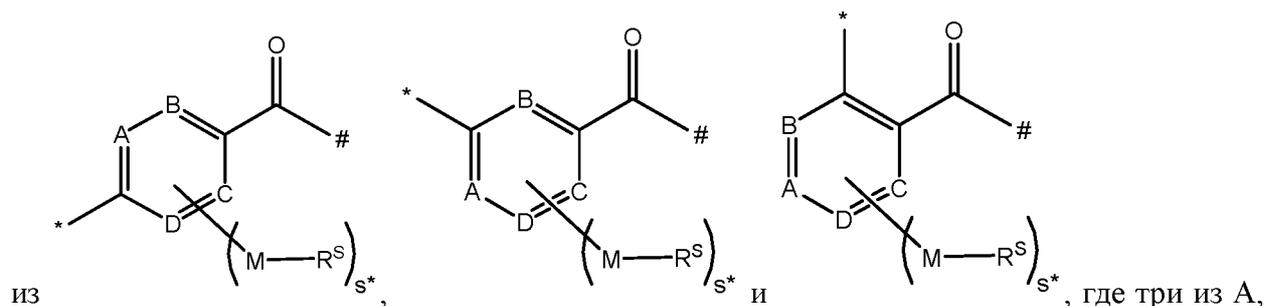


гетероциклическое кольцо, содержащие 1 или 2 гетероатома, независимо выбранных из группы, состоящей из N, O или S; гетероциклическое кольцо может быть ароматическим или неароматическим; M каждый независимо является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый M представляет собой -O-; R<sup>S</sup> каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый R<sup>S</sup> независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; s\* составляет 1 или 2 (в частности, в случае шестичленного гетероциклического кольца), предпочтительно s\* составляет 1 (в частности, в случае пятичленного или шестичленного гетероциклического кольца); \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет.

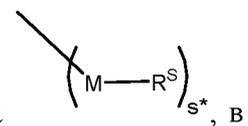


В некоторых воплощениях

выбрана из группы, состоящей

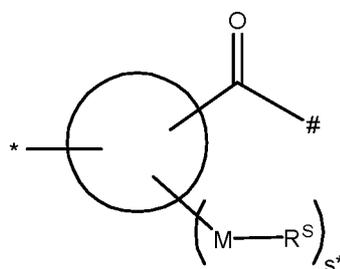


двух C-H независимо H заменен -M-R<sup>S</sup>, когда s\* составляет 2 или в одном C-H H заменен -M-R<sup>S</sup>, когда s\* составляет 1; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет. В

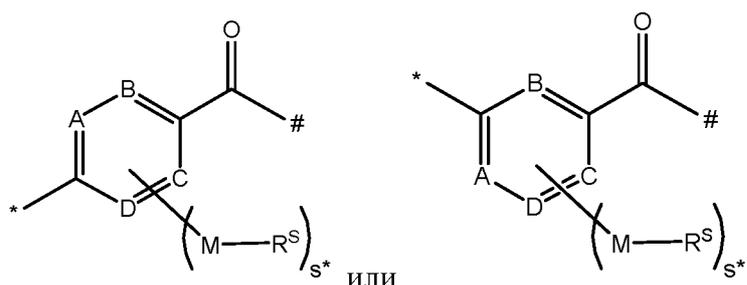


представляет собой

некоторых воплощениях

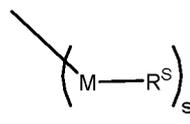


представляет собой

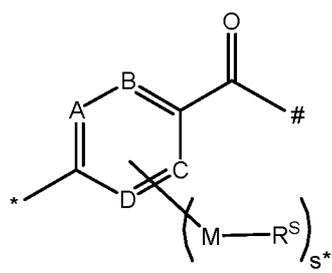
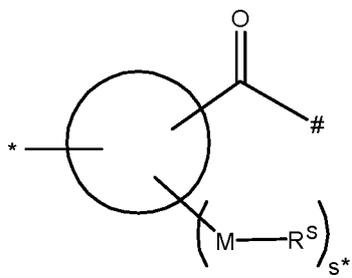


или  $\text{C}^*$ , где три из A, B, C и D независимо представляют собой C-H и один из A, B, C и D независимо представляет собой N;  $\text{R}^{\text{S}}$  каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $\text{R}^{\text{S}}$  независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; M каждый независимо является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый M представляет собой -O-; целое число  $s^*$  составляет 1 или 2, предпочтительно  $s^*$

составляет 1; как обозначено на

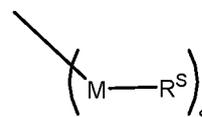


составляет 1; как обозначено на  $\text{C}^*$ , в двух C-H независимо H заменен  $-\text{M}-\text{R}^{\text{S}}$ , когда  $s^*$  составляет 2 или в одном C-H H заменен  $-\text{M}-\text{R}^{\text{S}}$ , когда  $s^*$  составляет 1; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет. В некоторых воплощениях



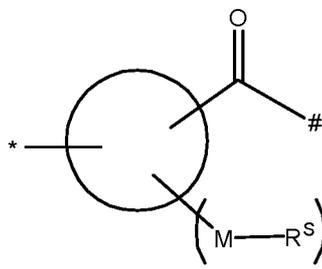
представляет собой  $\text{C}^*$ , где три из A, B, C и D независимо представляют собой C-H и один из A, B, C и D независимо представляет собой N;  $\text{R}^{\text{S}}$  каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $\text{R}^{\text{S}}$  независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; M каждый независимо является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый M представляет собой -O-; целое число  $s^*$  составляет 1 или 2,

предпочтительно  $s^*$  составляет 1; как обозначено на



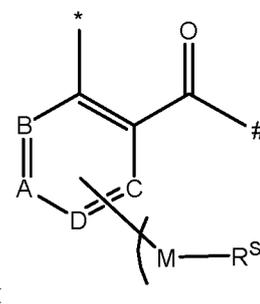
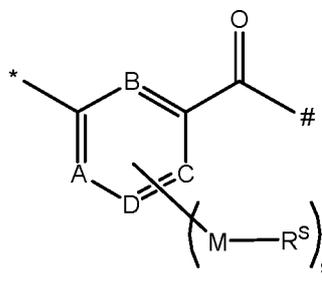
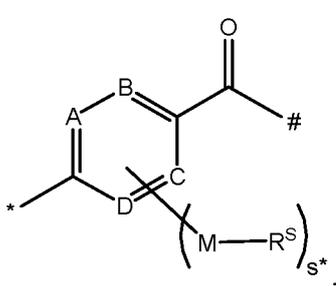
предпочтительно  $s^*$  составляет 1; как обозначено на  $\text{C}^*$ , в двух C-H независимо H заменен  $-\text{M}-\text{R}^{\text{S}}$ , когда  $s^*$  составляет 2 или в одном C-H H заменен  $-\text{M}-\text{R}^{\text{S}}$ , когда  $s^*$

составляет 1; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет.



В некоторых воплощениях

выбрана из группы, состоящей

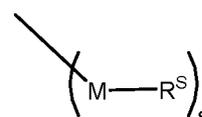


из

и

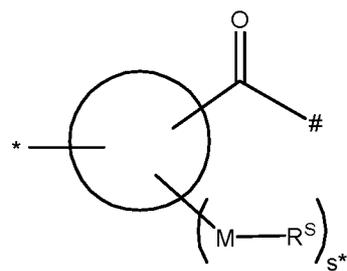
, где два из A, B, C и D независимо представляют собой C-H и два из A, B, C и D независимо представляют собой N; R<sup>S</sup> каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый R<sup>S</sup> независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; M каждый независимо является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый M представляет собой -O-; целое число s\* составляет 1 или 2,

предпочтительно s\* составляет 1; как обозначено на



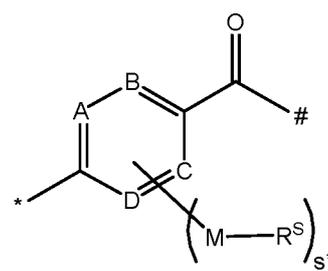
предпочтительно s\* составляет 1; как обозначено на

N заменен -M-R<sup>S</sup>, когда s\* составляет 2 или в одном C-H N заменен R<sup>S</sup>, когда s\* составляет 1; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет. В некоторых воплощениях

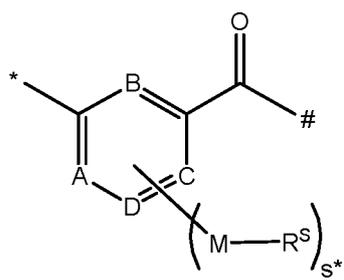


представляет

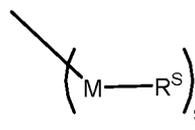
собой



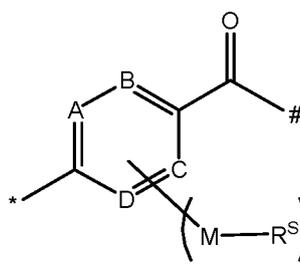
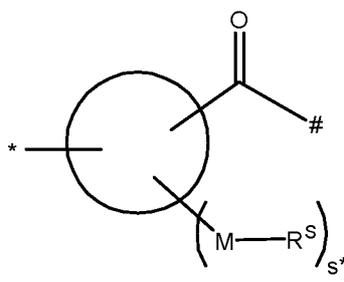
или



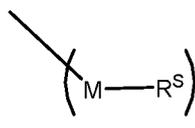
, где два из A, B, C и D независимо представляют собой C-H и два из A, B, C и D независимо представляют собой N;  $R^S$  каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $R^S$  независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; M каждый независимо является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый M представляет собой -O-; целое число  $s^*$  составляет 1 или 2, предпочтительно  $s^*$



составляет 1; как обозначено на  $(M-R^S)_{s^*}$ , в двух C-H независимо H заменен -M-R<sup>S</sup>, когда  $s^*$  составляет 2 или в одном C-H H заменен -M-R<sup>S</sup>, когда  $s^*$  составляет 1; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет. В некоторых воплощениях



представляет собой  $(M-R^S)_{s^*}$ , где два из A, B, C и D независимо представляют собой C-H и два из A, B, C и D независимо представляют собой N;  $R^S$  каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $R^S$  независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; M каждый независимо является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый M представляет собой -O-; целое число  $s^*$  составляет 1 или 2, предпочтительно  $s^*$

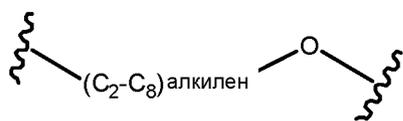


составляет 1; как обозначено на  $(M-R^S)_{s^*}$ , в двух C-H независимо H заменен -M-R<sup>S</sup>, когда  $s^*$  составляет 2 или в одном C-H H заменен -M-R<sup>S</sup>, когда  $s^*$  составляет 1; \* обозначает

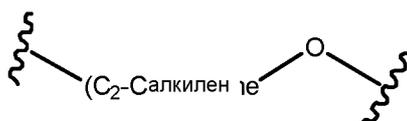
точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C), в зависимости от того, присутствует другая часть линкера или нет.

Вторая полиалкиленгликолевая единица R<sup>S</sup>

Термин «вторая полиалкиленгликолевая единица», в контексте настоящего описания относится к связи полиалкиленгликолевой единицы с параллельно соединяющей единицей (L<sup>P</sup>), которая присутствует в группе Z, через M. Вторая полиалкиленгликолевая единица содержит по меньшей мере одну алкиленгликолевую субъединицу. Предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица R<sup>S</sup> содержит одну или более алкиленгликолевую субъединицу, имеющую следующую структуру:

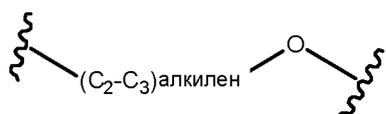


Более предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица R<sup>S</sup> содержит одну или более алкиленгликолевую субъединицу, имеющую



следующую структуру:

Соответственно, вторая полиалкиленгликолевая единица R<sup>S</sup> может быть поли(тетраметилгликолевой) единицей, поли(пропилгликолевой) единицей или поли(этиленгликолевой) единицей. Еще более предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица содержит одну или более алкиленгликолевую субъединицу, имеющую следующую структуру:

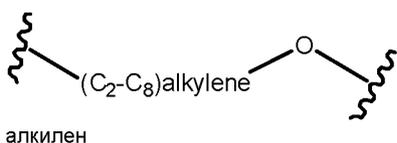


Предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица R<sup>S</sup> каждая независимо содержит от 1 до 100 алкиленгликолевых субъединиц, описанных в настоящем документе. Более предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица R<sup>S</sup> каждая независимо содержит от 2 до 50 алкиленгликолевых субъединиц. Еще более предпочтительно каждая вторая полиалкиленгликолевая единица содержит независимо от 3 до 45 алкиленгликолевых субъединиц, описанных в настоящем документе. Еще более предпочтительно каждая вторая полиалкиленгликолевая единица независимо содержит от 4 до 40 алкиленгликолевых субъединиц, описанных в настоящем документе. Еще более предпочтительно каждая вторая полиалкиленгликолевая единица независимо содержит от 6 до 35 алкиленгликолевых субъединиц, описанных в настоящем документе. Еще более

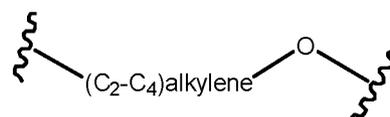
предпочтительно каждая вторая полиалкиленгликолевая единица независимо содержит от 8 до 30 алкиленгликолевых субъединиц, описанных в настоящем документе.

Предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  каждая независимо содержит от 1 до 20 алкиленгликолевых субъединиц, описанных в настоящем документе. Более предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  каждая независимо содержит от 2 до 12 алкиленгликолевых субъединиц. Еще более предпочтительно каждая вторая полиалкиленгликолевая единица содержит независимо от 3 до 11 алкиленгликолевых субъединиц, описанных в настоящем документе.

Вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  каждая может независимо представлять собой полиалкиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 3 до 45, еще более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более предпочтительно от 8 до 30 субъединиц, имеющих

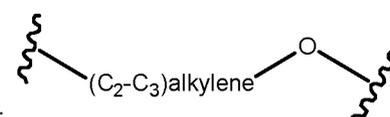


структуру: . Предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  каждая может независимо представлять собой полиалкиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 3 до 45, более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более



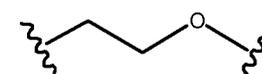
предпочтительно от 8 до 30 субъединиц, имеющих структуру:

. Более предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  каждая может независимо представлять собой полиалкиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 100, более предпочтительно от 2 до 50, еще более предпочтительно от 3 до 45, еще более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более



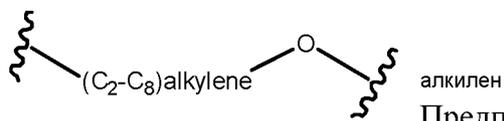
предпочтительно от 8 до 30 субъединиц, имеющих структуру:

. В наиболее предпочтительных воплощениях вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  каждая может независимо представлять собой полиэтиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно 3 до 45, еще более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более

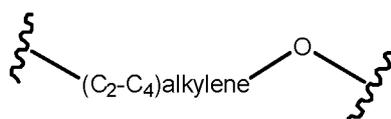


предпочтительно от 8 до 30 субъединиц, имеющих структуру:

Вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  каждая может независимо представлять собой полиалкиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 20, предпочтительно от 2 до 12, более предпочтительно от 3 до 11 субъединиц, имеющих структуру:



Предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  каждая может независимо представлять собой полиалкиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 20, предпочтительно от 2 до 12, более предпочтительно от 3 до 11



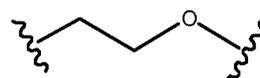
субъединиц, имеющих структуру:

Более предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  каждая может независимо представлять собой полиалкиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 20, более предпочтительно от 2 до 12, еще более предпочтительно от 3 до 11 субъединиц, имеющих структуру:

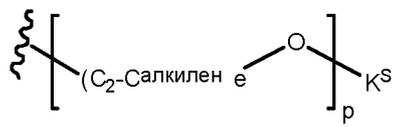


В наиболее предпочтительных воплощениях вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  каждая может независимо представлять собой полиэтиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 20, предпочтительно от 2 до 12, более

предпочтительно 3 до 11 субъединиц, имеющих структуру:



Предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  каждая независимо представляет собой



где:



обозначает положение M в группе Z;

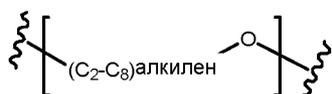
$K^S$  представляет собой H или вторую кэпирующую группу; предпочтительно  $K^S$  выбрана из группы, состоящей из -H (водорода), -PO<sub>3</sub>H, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкила, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-SO<sub>3</sub>H, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-CO<sub>2</sub>H, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-OH, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH<sub>2</sub>, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкила и -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-N((C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкила)<sub>2</sub>; более предпочтительно  $K^S$  представляет собой H; и

$p$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 100.

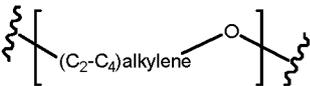
Термин «вторая кэпирующая группа», когда она упоминается в настоящем документе, может представлять собой фрагмент, который способен функционировать в качестве концевой группы второй полиалкиленгликолевой единицы. Примеры второй кэпирующей группы, которые могут быть применены в настоящем изобретении, включают  $-PO_3H$ ,  $-(C_1-C_{10})$ алкил,  $-(C_1-C_{10})$ алкил- $SO_3H$ ,  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $CO_2H$ ,  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $OH$ ,  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $NH_2$ ,  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $NH(C_1-C_3)$ алкил и  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $N((C_1-C_3)$ алкил) $_2$ . В некоторых воплощениях первая кэпирующая группа может представлять собой  $-(C_1-C_{10})$ алкил, в частности метил.

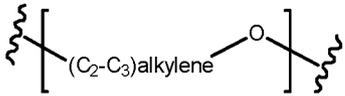
Предпочтительно  $K^S$  представляет собой H (водород).

Целое число  $p$  обозначает количество повторяющихся единиц

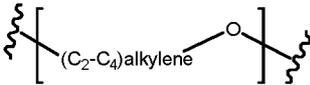


во второй полиалкиленгликолевой единице. Целое число  $p$  может находиться в диапазоне от 1 до 100. Предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 2 до 50. Более предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 3 до 45. Более предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 4 до 40. Еще более предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 6 до 35. Еще более предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 8 до 30. В предпочтительных воплощениях  $p$  составляет 12 или примерно 12. Еще более предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 16 до <sup>алкилен</sup>20. Еще более предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 20 до 28. Еще более предпочтительно  $p$  составляет 22, 23, 24, 25 или 26. Еще более предпочтительно  $p$  составляет 23, 24 или 25. В предпочтительных воплощениях  $p$  составляет 24 или примерно 24. Предпочтительно повторяющаяся единица

представляет собой . Более предпочтительно повторяющаяся

единица представляет собой .

Во второй полиалкиленгликолевой единице целое число  $p$  может находиться в диапазоне от 1 до 20. Предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 2 до 12. Более предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 3 до 11. Предпочтительно повторяющаяся

единица представляет собой . Более предпочтительно

повторяющаяся единица представляет собой .

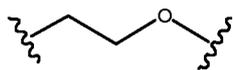
Предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  содержит этиленгликолевые субъединицы, каждая из которых имеет следующую структуру:



, то есть эта субъединица обозначается как «этиленгликолевая субъединица». Соответственно, предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу. Вторая полиэтиленгликолевая единица содержит по меньшей мере одну этиленгликолевую единицу.

Предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  каждая независимо может представлять собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 3 до 45, более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более предпочтительно от 8 до 30

субъединиц, имеющих структуру:

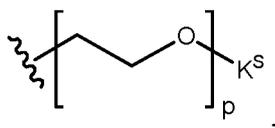


Предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  каждая независимо может представлять собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, содержащую от 1 до 20, предпочтительно от 2 до 12, более предпочтительно от 3 до 11 субъединиц, имеющих

структуру:



Предпочтительно вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  каждая независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу имеющую структуру:



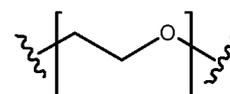
где:



обозначает положение M в группе Z;

$K^S$  представляет собой H (водород) или вторую кэпирующую группу, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $K^S$  выбрана из группы, состоящей из -H (водорода), -PO<sub>3</sub>H, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкила, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-SO<sub>3</sub>H, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-CO<sub>2</sub>H, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-OH, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH<sub>2</sub>, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкила и -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-N((C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкила)<sub>2</sub>; более предпочтительно  $K^S$  представляет собой H; и

p представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 100.



Целое число  $p$  обозначает количество повторяющихся единиц во второй полиэтиленгликолевой единице. Целое число  $p$  может находиться в диапазоне от 1 до 100. Предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 2 до 50. Более предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 3 до 45. Еще более предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 4 до 40. Еще более предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 6 до 35. Еще более предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 8 до 30. В предпочтительных воплощениях  $p$  составляет 12 или примерно 12. Еще более предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 16 до 30. Еще более предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 20 до 28. Еще более предпочтительно  $p$  составляет 22, 23, 24, 25 или 26. Еще более предпочтительно  $p$  составляет 23, 24 или 25. В предпочтительных воплощениях  $p$  составляет 24 или примерно 24.

Во второй полиэтиленгликолевой единице целое число  $p$  может находиться в диапазоне от 1 до 20. Предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 2 до 12. Более предпочтительно  $p$  находится в диапазоне от 3 до 11.

В общем, во второй полиалкиленгликолевой единице  $R^F$ , (предпочтительно второй полиэтиленгликолевой единице) можно использовать полидисперсные полиалкиленгликоли (предпочтительно полидисперсные полиэтиленгликоли), монодисперсные полиалкиленгликоли (предпочтительно монодисперсный полиэтиленгликоль) и дискретные полиалкиленгликоли (предпочтительно дискретные полиэтиленгликоли). Полидисперсные полиалкиленгликоли (предпочтительно полидисперсные полиэтиленгликоли) представляют собой гетерогенную смесь размеров и молекулярных масс, тогда как монодисперсные полиалкиленгликоли (предпочтительно монодисперсные полиэтиленгликоли) обычно очищены от гетерогенных смесей и, следовательно, обеспечивают одну длину цепи и молекулярную массу. Предпочтительные первые полиалкиленовые единицы представляют собой дискретные полиалкиленгликоли (предпочтительно дискретные полиэтиленгликоли), то есть соединения, которые синтезируются поэтапно, а не посредством процесса полимеризации. Дискретные полиалкиленгликоли (предпочтительно дискретные полиэтиленгликоли) представляют собой одну молекулу с определенной и заданной длиной цепи.

Вторая полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно вторая полиэтиленгликолевая единица), предложенная в настоящем документе, содержит одну или более полиалкиленгликолевых цепей (предпочтительно полиэтиленгликолевых цепей).

Полиалкиленгликолевые цепи (предпочтительно полиэтиленгликолевые цепи) могут быть связаны друг с другом, например, в линейной, разветвленной или звездообразной конфигурации. Возможно, по меньшей мере одна из полиалкиленгликолевых цепей (предпочтительно политиленгликолевых цепей) может быть модифицирована на одном конце для ковалентного присоединения к М в группе Z.

Вторая полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно вторая полиэтиленгликолевая единица) будет присоединена к конъюгату (или его промежуточному соединению) по М в группе Z. Другой конец (или концы) второй полиалкиленгликолевой единицы (предпочтительно второй полиэтиленгликолевой единицы) будет свободным и несвязанным и может принимать форму водорода, метокси, карбоновой кислоты, спирта или другой подходящей функциональной группы, такой как, например, любая вторая кэпирующая группа как описано в настоящем документе. Метокси, карбоновая кислота, спирт или другая подходящая функциональная группа действует как блокирующая концевая полиалкиленгликолевая субъединица (предпочтительно полиэтиленгликолевая субъединица) второй полиалкиленгликолевой единицы (предпочтительно второй полиэтиленгликолевой единицы). Под «несвязанным» подразумевается, что вторая полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно вторая полиэтиленгликолевая единица) не будет присоединена в этом несвязанном сайте к фрагменту камптотецина (С), к рецепторсвязывающей молекуле или к компоненту линкера (L), связывающему фрагмент камптотецина и/или рецепторсвязывающую молекулу. Для тех воплощений, в которых вторая полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно вторая полиэтиленгликолевая единица) содержит более чем одну полиалкиленгликолевую цепь (предпочтительно полиэтиленгликолевую цепь), множество полиалкиленгликолевых цепей (предпочтительно полиэтиленгликолевых цепей) могут быть одинаковыми или разными химическими фрагментами (например, полиалкиленгликоли, в частности, полиэтиленгликоли, с разной молекулярной массой или количеством субъединиц). Множество вторых полиалкиленгликолевых цепей (предпочтительно вторых полиэтиленгликолевых цепей) присоединены к М в группе Z в одном месте присоединения. Специалист в данной области техники поймет, что вторая полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно вторая полиэтиленгликолевая единица) в дополнение к содержанию повторяющихся полиалкиленгликолевых субъединиц, (предпочтительно полиэтиленгликолевых субъединиц) также может содержать материал, не являющийся полиалкиленгликолем (предпочтительно материал, не являющийся полиэтиленгликолем)

(например, например, для облегчения связывания множества полиалкиленгликолевых цепей (предпочтительно полиэтиленгликолевых цепей) друг с другом или для облегчения связывания с М в группе Z. Материал, не являющийся полиалкиленгликолем (предпочтительно материал, не являющийся полиэтиленгликолем), относится к атомам во второй полиалкиленгликолевой единице (предпочтительно второй полиэтиленгликолевой единице), которые не являются частью повторяющихся алкиленгликолевых субъединиц (предпочтительно  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$  субъединиц). В воплощениях, предложенных в настоящем документе, вторая полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно вторая полиэтиленгликолевая единица) может содержать две мономерные полиалкиленгликолевые цепи (предпочтительно полиэтиленгликолевые цепи), связанные друг с другом посредством неполиалкиленгликолевых (предпочтительно неполиэтиленгликолевых) элементов. В других воплощениях, предложенных в настоящем документе, вторая полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно вторая полиэтиленгликолевая единица) может содержать две линейные полиалкиленгликолевые цепи (предпочтительно полиэтиленгликолевые цепи), присоединенные к центральному ядру, которое присоединено к М в группе Z (то есть, полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно полиэтиленгликолевая единица) является разветвленной).

Существует ряд способов присоединения полиалкиленгликоля (предпочтительно полиэтиленгликоля), доступных специалистам в данной области техники [см., например, EP 0401384 (связывание PEG с G-CSF); патент США № 5757078 (пегилирование пептидов EPO); патент США № 5672662 (полиэтиленгликоль) и родственные полимеры, монозамещенные пропионовой или бутановой кислотой, и их функциональные производные для биотехнического применения); патент США № 6077939 (пегилирование N-концевого альфа-углерода пептида) и Veronese (2001) *Biomaterials* 22:405-417 (обзорная статья по пегилированию пептидов и белков)].

Например, полиалкиленгликоль (предпочтительно полиэтиленгликоль) может быть ковалентно связан с аминокислотными остатками через реакционноспособную группу. Реакционноспособными группами являются те, с которыми может быть связана активированная молекула полиалкиленгликоля (предпочтительно молекула полиэтиленгликоля) (например, свободная амино- или карбоксильная группа). Например, N-концевые аминокислотные остатки и остатки лизина (K) имеют свободную аминогруппу; а C-концевые аминокислотные остатки имеют свободную карбоксильную группу. Сульфгидрильные группы (например, обнаруженные на остатках цистеина) также можно

использовать в качестве реакционноспособной группы для присоединения полиалкиленгликоля (предпочтительно полиэтиленгликоля). Кроме того, были описаны ферментативные методы введения активированных групп (например, гидразидных, альдегидных и ароматических аминогрупп) конкретно на С-конец полипептида (см. Schwarz, et al. (1990) *Methods Enzymol.* 184:160; Rose, et al. (1991) *Bioconjugate Chem.* 2: 154 и Gaertner Rose, et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:7224].

В некоторых воплощениях по меньшей мере одна из полиалкиленгликолевых цепей (предпочтительно полиэтиленгликолевых цепей), которые составляют вторую полиалкиленгликолевую единицу (предпочтительно вторую полиэтиленгликолевую единицу) может быть функционализована так, что она может присоединяться к М в группе Z или к параллельно соединяющей единице L<sup>P</sup> в группе Z, когда М представляет собой связь. Функционализация может осуществляться, например, через аминную, тиоловую, NHS-эфирную, алкиновую, азидную, карбонильную или другую функциональную группу. Полиалкиленгликолевая единица (предпочтительно полиэтиленгликолевая единица) может дополнительно содержать неполиалкиленгликолевой материал (предпочтительно неполиэтиленгликолевой материал, то есть материал, не содержащий -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) для облегчения связывания с М в группе Z или с параллельно соединяющей единицей, когда М представляет собой связь или для облегчения соединения двух или более полиалкиленгликолевых цепей (предпочтительно полиэтиленгликолевых цепей).

В предпочтительных воплощениях вторая полиалкиленгликолевая единица, более предпочтительно вторая полиэтиленгликолевая единица, непосредственно присоединена к М в группе Z. В этих воплощениях вторая полиалкиленгликолевая единица, предпочтительно вторая полиэтиленгликолевая единица, не содержит функциональную группу для присоединения к М в группе Z, то есть М непосредственно связана с атомом углерода второй полиалкиленгликолевой единицы, более предпочтительно с CH<sub>2</sub> второй полиэтиленгликолевой единицы. Предпочтительно в любом из этих воплощений М не представляет собой связь.

В одной группе воплощений вторая полиалкиленгликолевая единица содержит по меньшей мере 1 алкиленгликолевую субъединицу, предпочтительно по меньшей мере 2 алкиленгликолевые субъединицы, более предпочтительно по меньшей мере 3 алкиленгликолевые субъединицы, еще более предпочтительно по меньшей мере 4 алкиленгликолевые субъединицы, еще более предпочтительно по меньшей мере 6

алкиленгликолевых субъединиц, еще более предпочтительно по меньшей мере 8 алкиленгликолевых субъединиц. В некоторых подобных воплощениях вторая полиалкиленовая единица содержит не более чем примерно 100 алкиленгликолевых субъединиц, предпочтительно не более чем примерно 50 алкиленгликолевых единиц, более предпочтительно не более чем примерно 45 алкиленгликолевых субъединиц, более предпочтительно не более чем примерно 40 алкиленгликолевых субъединиц, более предпочтительно не более чем примерно 35 субъединиц, еще более предпочтительно не более чем примерно 30 алкиленгликолевых субъединиц. В любом из этих воплощений алкиленгликолевая субъединица может представлять собой алкиленгликолевую субъединицу, как описано в настоящем документе. Предпочтительно в любом из этих воплощений каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой

этиленгликолевую субъединицу, имеющую следующую структуру:

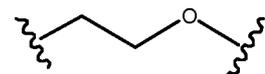


Предпочтительно, когда каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой этиленгликолевую субъединицу, в любом из этих воплощений вторая полиалкиленгликолевая единица представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу.

В одной группе воплощений вторая полиалкиленгликолевая единица содержит одну или более линейную полиалкиленгликолевую цепь, каждая из которых имеет по меньшей мере 1 алкиленгликолевую субъединицу, предпочтительно по меньшей мере 2 алкиленгликолевые субъединицы, более предпочтительно по меньшей мере 3 алкиленгликолевые субъединицы, еще более предпочтительно по меньшей мере 4 алкиленгликолевые субъединицы, еще более предпочтительно по меньшей мере 6 алкиленгликолевых субъединиц, еще более предпочтительно по меньшей мере 8 алкиленгликолевых субъединиц. В предпочтительных воплощениях вторая полиалкиленгликолевая единица содержит, в общей сложности, по меньшей мере 1 алкиленгликолевую субъединицу, предпочтительно по меньшей мере 2 алкиленгликолевые субъединицы, более предпочтительно по меньшей мере 3, еще более предпочтительно по меньшей мере 4, еще более предпочтительно по меньшей мере 6 или еще более предпочтительно по меньшей мере 8 алкиленгликолевых субъединиц. В некоторых подобных воплощениях вторая полиалкиленгликолевая единица содержит не более чем в, общей сложности, примерно 100 алкиленгликолевых субъединиц, предпочтительно не более чем, в общей сложности, примерно 50 алкиленгликолевых субъединиц, более

предпочтительно не более чем, в общей сложности, примерно 45 субъединиц, еще более предпочтительно не более чем, в общей сложности, примерно 40 субъединиц, еще более предпочтительно не более чем, в общей сложности, примерно 35 субъединиц, еще более предпочтительно не более чем, в общей сложности, примерно 30 субъединиц. В любом из этих воплощений алкиленгликолевая субъединица может представлять собой алкиленгликолевую субъединицу, как описано в настоящем документе. Предпочтительно в любом из этих воплощений каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой

этиленгликолевую субъединицу, имеющую следующую структуру:



Предпочтительно, когда каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой этиленгликолевую субъединицу, в любом из этих воплощений вторая полиалкиленгликолевая единица представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, содержащую одну или более линейную полиэтиленгликолевую цепь.

В другой группе воплощений вторая полиалкиленгликолевая единица содержит в общей сложности всего от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 3 до 45, еще более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более предпочтительно от 8 до 30 алкиленгликолевых субъединиц. В любом из этих воплощений алкиленгликолевая субъединица может представлять собой алкиленгликолевую субъединицу, как описано в настоящем документе. Предпочтительно в любом из этих воплощений каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой

этиленгликолевую субъединицу, имеющую следующую структуру:



Предпочтительно, когда каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой этиленгликолевую субъединицу, в любом из этих воплощений вторая полиалкиленгликолевая единица представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу.

В другой группе воплощений вторая полиалкиленгликолевая единица содержит одну или более линейную полиалкиленгликолевую цепь, имеющую, в общей сложности, всего от 1 до 100, предпочтительно 2 до 50, более предпочтительно 3 до 45, еще более предпочтительно 4 до 40, еще более предпочтительно 6 до 35, еще более предпочтительно 8 до 30 алкиленгликолевых субъединиц. В любом из этих воплощений алкиленгликолевая субъединица может представлять собой алкиленгликолевую субъединицу, как описано в настоящем документе. Предпочтительно в любом из этих воплощений каждая

алкиленгликолевая субъединица представляет собой этиленгликолевую субъединицу,



имеющую следующую структуру:

. Предпочтительно, когда каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой этиленгликолевую субъединицу, в любом из этих воплощений вторая полиалкиленгликолевая единица представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, содержащую одну или более линейную полиэтиленгликолевую цепь.

В другой группе воплощений вторая полиалкиленгликолевая единица представляет собой линейную одиночную полиалкиленгликолевую цепь, имеющую по меньшей мере 1 субъединицу, предпочтительно по меньшей мере 2 субъединицы, более предпочтительно по меньшей мере 3 субъединицы, еще более предпочтительно по меньшей мере 6 субъединиц, еще более предпочтительно по меньшей мере 8 субъединиц. В любом из этих воплощений алкиленгликолевая субъединица может представлять собой алкиленгликолевую субъединицу, как описано в настоящем документе. Предпочтительно в любом из этих воплощений каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой



этиленгликолевую субъединицу, имеющую следующую структуру:

. Предпочтительно, когда каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой этиленгликолевую субъединицу, в любом из этих воплощений вторая полиалкиленгликолевая единица представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, которая представляет собой линейную одиночную полиэтиленгликолевую цепь. Возможно в любом из этих воплощений линейная одиночная полиалкиленгликолевая цепь может быть дериватизирована.

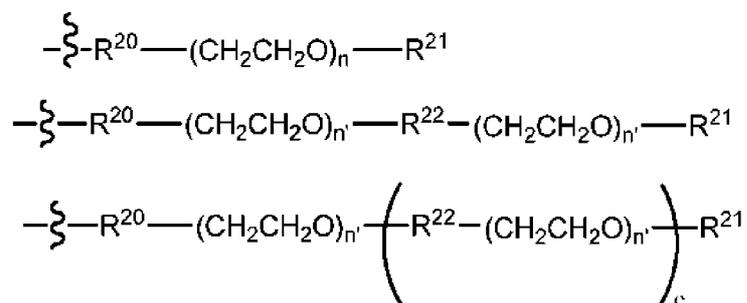
В другой группе воплощений вторая полиалкиленгликолевая единица представляет собой линейную одиночную полиалкиленгликолевую цепь, имеющую от 1 до 100, предпочтительно 2 до 50, более предпочтительно 3 до 45, более предпочтительно 4 до 40, более предпочтительно 6 до 35, более предпочтительно 8 до 30 алкиленгликолевых субъединиц. В любом из этих воплощений алкиленгликолевая субъединица может представлять собой алкиленгликолевую субъединицу, как описано в настоящем документе. Предпочтительно в любом из этих воплощений каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой этиленгликолевую субъединицу, имеющую следующую структуру:



. Предпочтительно, когда каждая алкиленгликолевая субъединица представляет собой этиленгликолевую субъединицу, в любом из этих воплощений вторая

полиалкиленгликолевая единица представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, которая представляет собой линейную одиночную полиэтиленгликолевую цепь. Возможно в любом из этих воплощений линейная одиночная полиалкиленгликолевая цепь может быть дериватизирована.

Типичные линейные полиэтиленгликолевые единицы, которые могут быть использованы в качестве второй полиалкиленгликолевой единицы, в частности, в качестве второй полиэтиленгликолевой единицы, в любом из воплощений, предложенных в настоящем документе, являются следующими:



где волнистая линия указывает место присоединения к М в группе Z;

$R^{20}$  представляет собой PEG-присоединяющую единицу; предпочтительно  $R^{20}$  отсутствует; более предпочтительно М не представляет собой связь;

$R^{21}$  представляет собой PEG-кэпирующую единицу (в настоящем документе,  $R^{21}$  также обозначается как «K<sup>S</sup>»);

$R^{22}$  представляет собой PEG-связывающую единицу (то есть для связывания нескольких цепей субъединиц PEG вместе;

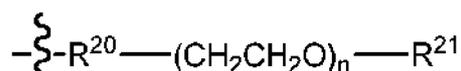
n независимо выбран от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 3 до 45, более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более предпочтительно от 8 до 30;

e составляет 2 до 5;

каждый n' независимо выбран от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 3 до 45, более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более предпочтительно от 8 до 30. В предпочтительных воплощениях присутствует по меньшей мере 1, предпочтительно по меньшей мере 2, более предпочтительно по меньшей мере 3, более предпочтительно по меньшей мере 4, более предпочтительно по меньшей мере 6, еще более предпочтительно по меньшей мере 8 этиленгликолевых субъединиц в полиэтиленгликолевой единице. В некоторых воплощениях присутствует не более чем 100, предпочтительно не более чем 50, более

предпочтительно не более чем 45, более предпочтительно не более чем 40, более предпочтительно не более чем 35, еще более предпочтительно не более чем 30 этиленгликолевых субъединиц в полиэтиленгликолевой единице. Когда R<sup>20</sup> отсутствует, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) субъединица непосредственно связана с M в группе Z; более предпочтительно в таких воплощениях M не представляет собой связь.

Предпочтительно линейная полиэтиленгликолевая единица представляет собой



где волнистая линия указывает место присоединения к M в группе Z; R<sup>20</sup>, R<sup>21</sup> (также обозначаемая в настоящем документе как «K<sup>S</sup>») и n имеют значения, определенные в настоящем документе; более предпочтительно R<sup>20</sup> отсутствует; еще более предпочтительно M не представляет собой связь. В предпочтительных воплощениях n составляет 12 или примерно 12. В предпочтительных воплощениях n составляет 24 или примерно 24. Предпочтительно R<sup>21</sup> представляет собой H.

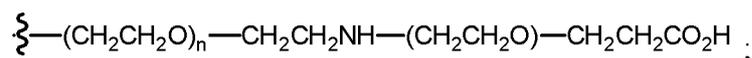
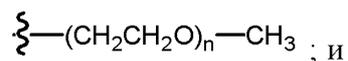
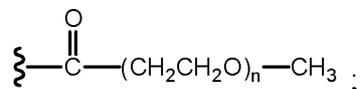
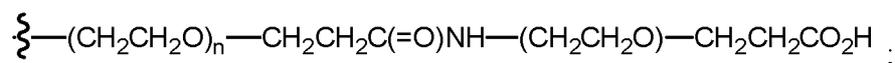
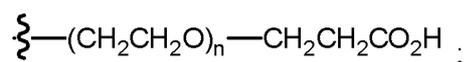
Полиэтиленгликоль-присоединяющая единица R<sup>20</sup>, если она присутствует, является частью второй полиэтиленгликолевой единицы и действует для связывания второй полиэтиленгликолевой единицы с M. В этих воплощениях предпочтительно M не представляет собой связь и образует связь со второй полиэтиленгликолевой единицей. В иллюстративных воплощениях PEG-присоединяющая единица R<sup>20</sup>, если она присутствует, выбрана из группы, состоящей из \*-C(O)-<sup>#</sup>, \*-S(O)-<sup>#</sup>, \*-C(O)O-<sup>#</sup>, \*-C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-<sup>#</sup>, \*-C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-O-<sup>#</sup>, \*-C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-CO<sub>2</sub>-<sup>#</sup>, \*-C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH-<sup>#</sup>, \*-C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-S-<sup>#</sup>; \*-C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-C(O)-NH-<sup>#</sup>; \*-C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH-C(O)-<sup>#</sup>; -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-<sup>#</sup>, \*(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-O-<sup>#</sup>, \*(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-C(O)-<sup>#</sup>, \*(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-C(O)O-<sup>#</sup>, \*(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH-<sup>#</sup>, \*(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-S-<sup>#</sup>, \*(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-C(O)-NH-<sup>#</sup>, \*(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH-C(O)-<sup>#</sup> и \*-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-<sup>#</sup>, \*-CH<sub>2</sub>-C(O)-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-<sup>#</sup>, где \* обозначает точку присоединения к M в группе Z и # обозначает точку присоединения к этиленгликолевой единицей.

PEG-связывающая единица R<sup>22</sup>, если она присутствует, является частью второй полиэтиленгликолевой единицы и не является PEG-материалом, который действует для соединения двух или более цепей повторяющихся субъединиц -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-. В иллюстративных воплощениях PEG-связывающая единица R<sup>22</sup>, если она присутствует, независимо выбрана из группы, состоящей из \*(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-C(O)-NH-<sup>#</sup>, \*(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH-C(O)-<sup>#</sup>, \*(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH-<sup>#</sup>, \*(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-O-<sup>#</sup>, \*(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-S-<sup>#</sup> или \*(C<sub>2</sub>-

$C_{10}$ )алкил-NH-#; где \* обозначает точку присоединения к атому кислорода этиленгликолевой субъединицы и # обозначает точку присоединения к атому углерода другой этиленгликолевой единицы.

Группа  $R^{21}$ , также обозначаемая в настоящем документе как « $K^S$ », в иллюстративных воплощениях представляет собой H (водород) или может представлять собой кэпирующую группу, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $R^{21}$  независимо выбран из группы, состоящей из -H, -PO<sub>3</sub>H, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкила, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-SO<sub>3</sub>H, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-CO<sub>2</sub>H, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-OH, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH<sub>2</sub>, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкила и -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-N((C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкила)<sub>2</sub>. В некоторых воплощениях  $R^{21}$  может представлять собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил, в частности метил. Более предпочтительно  $R^{21}$  представляет собой H.

Иллюстративные линейные вторые полиэтиленгликолевые единицы, которые могут быть использованы в качестве вторых полиалкиленгликолевых единиц в любом из воплощений, предложенных в настоящем документе, являются следующими.



где волнистая линия указывает место присоединения к M в группе Z; предпочтительно M не представляет собой связь; и каждый n составляет от 1 до 100, предпочтительно от 2 до 50, более предпочтительно от 3 до 45, еще более предпочтительно от 4 до 40, еще более предпочтительно от 6 до 35, еще более предпочтительно от 8 до 30. В некоторых воплощениях n составляет примерно 12. В некоторых воплощениях n составляет примерно 24.

В некоторых воплощениях вторая полиалкиленгликолевая единица составляет от примерно 300 дальтон до примерно 5 килодальтон; от примерно 300 дальтон, до примерно 4 килодальтон; от примерно 300 дальтон, до примерно 3 килодальтон; от примерно 300 дальтон, до примерно 2 килодальтон; или от примерно 300 дальтон, до примерно 1 килодальтон. В некоторых таких аспектах вторая полиалкиленгликолевая единица содержит по меньшей мере 6 алкиленгликолевых субъединиц, или по меньшей мере 8 алкиленгликолевых субъединиц. В некоторых таких аспектах вторая

полиалкиленгликолевая единица может содержать по меньшей мере 6 алкиленгликолевых субъединиц, или по меньшей мере 8 алкиленгликолевых субъединиц, но не более чем 100 алкиленгликолевых субъединиц, предпочтительно не более чем 50 алкиленгликолевых субъединиц. В некоторых воплощениях вторая полиалкиленгликолевая единица представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, имеющую массу от примерно 300 дальтон до примерно 5 килодальтон; от примерно 300 дальтон, до примерно 4 килодальтон; от примерно 300 дальтон, до примерно 3 килодальтон; от примерно 300 дальтон, до примерно 2 килодальтон; или от примерно 300 дальтон, до примерно 1 килодальтон. В некоторых таких аспектах вторая полиэтиленгликолевая единица могут содержать по меньшей мере 6 этиленгликолевых субъединиц или по меньшей мере 8 этиленгликолевых субъединиц. В некоторых таких аспектах вторая полиэтиленгликолевая единица может содержать по меньшей мере 6 этиленгликолевых субъединиц или по меньшей мере 8 этиленгликолевых субъединиц но не более чем 100 этиленгликолевых субъединиц, предпочтительно не более чем 50 этиленгликолевых субъединиц.

В некоторых воплощениях, когда вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  присутствует, не присутствуют другие алкиленгликолевые субъединицы в конъюгате формулы (I) (то есть, никакие алкиленгликолевые субъединицы не присутствуют ни в одном из других компонентов конъюгата, такие как, например, в группе  $R^1$  или в другой части линкера L, как предложено в настоящем документе). В других аспектах, когда вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  присутствует, присутствует не более чем 8, не более чем 7, не более чем 6, не более чем 5, не более чем 4, не более чем 3, не более чем 2 или не более чем 1 другая алкиленгликолевая субъединица, присутствующая в конъюгате формулы (I) (то есть, не более чем 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 другая алкиленгликолевая субъединица, присутствует в других компонентах конъюгата, таких как, например, в группе  $R^1$  или в другой части линкера L, как предложено в настоящем документе).

Предпочтительно в других воплощениях, когда вторая полиалкиленгликолевая единица  $R^S$  присутствует, конъюгат дополнительно содержит первую полиалкиленгликолевую единицу  $R^F$  в качестве  $R^1$ , как описано в настоящем документе. Предпочтительно, когда  $R^S$  представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу и конъюгат дополнительно содержит первую полиалкиленгликолевую единицу  $R^F$ , первая полиалкиленгликолевая единица представляет собой первую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе.

Следует понимать, что при упоминании алкиленгликолевых субъединиц, в частности этиленгликолевых субъединиц, и в зависимости от контекста количество субъединиц может представлять собой среднее число, например, когда речь идет о совокупности конъюгатов или промежуточных соединений, и использование полидисперсных полиалкиленгликолей, в частности полидисперсных полиэтиленгликолей.

Линкер  $*-A_a-W_w-B_b-##$

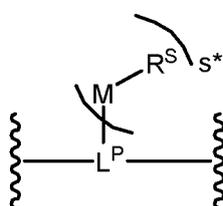
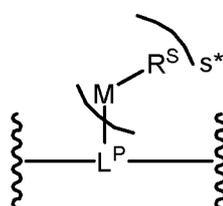
В некоторых воплощениях линкер L имеет формулу:  $*-A_a-W_w-B_b-##$ , где:  $-A-$  представляет собой вторую спейсерную единицу, как описано в настоящем документе;  $a$  составляет 0 или 1; каждый  $-W-$  независимо представляет собой аминокислоту;  $w$  независимо представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 12;  $-B-$  представляет собой первую спейсерную единицу; и  $b$  составляет 0 или 1; \* обозначает точку присоединения к  $-Y-$ ; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина. В настоящем документе обозначение « $W_w$ » или « $-W_w-$ » или тому подобное, то есть комбинация  $W$  и соответствующего целого числа  $w$  также обозначается как «аминокислотная единица». Примеры подходящих вторых спейсерных единиц, аминокислотных единиц и первых спейсерных единиц описаны, например, в WO 2004/010957 A2.

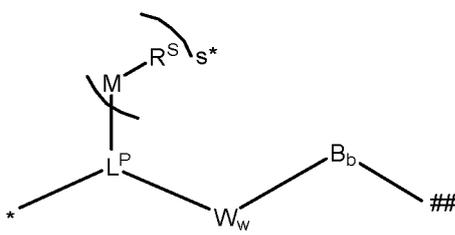
В линкере, имеющем структуру  $*-A_a-W_w-B_b-##$ , вторая спейсерная единица служит для соединения  $-Y-$  с аминокислотной единицей  $-W_w-$ . Вторая спейсерная единица ( $-A-$ ) может представлять собой вторую спейсерную единицу, как описано в настоящем документе. Если она присутствует, вторая спейсерная единица ( $-A-$ ) может представлять собой химическую группу или фрагмент, который способен связывать  $-Y-$  с аминокислотной единицей. В качестве альтернативы, вторая спейсерная единица может связывать  $-Y-$  с первой спейсерной единицей, в случае, если аминокислотная единица отсутствует. В качестве альтернативы, вторая спейсерная единица может связывать  $-Y-$  с фрагментом камптотецина ( $-C$ ), в случае отсутствия первой спейсерной единицы и аминокислотной единицы. В этом отношении  $-Y-$ , как описано в настоящем документе, связан со второй спейсерной единицей ( $-A-$ ). Вторая спейсерная единица ( $-A-$ ) может содержать или может представлять собой функциональную группу, которая способна образовывать связь с аминокислотной единицей ( $-W_w-$ ) или с первой спейсерной единицей ( $-B-$ ) или с фрагментом камптотецина ( $-C$ ), в зависимости от того, присутствует или нет аминокислотная единица ( $-W_w-$ ) и/или первая спейсерная единица ( $-B-$ ). Предпочтительно функциональная группа, которая способна образовывать связь с аминокислотной единицей ( $-W_w-$ ), в частности, с N-концом аминокислотной единицы или

с первой спейсерной единицей (-B-) или с фрагментом камптотецина (-C), представляет

собой карбонильную группу, которая обозначена, например,  или -C(O)-. Целое число a, связанное со второй спейсерной единицей, может составлять 0 или 1. Предпочтительно целое число a составляет 1. В качестве альтернативы, в других воплощениях вторая спейсерная единица отсутствует (a = 0).

В линкере \*-A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>-B<sub>b</sub>-## вторая спейсерная единица -A-, если она присутствует, может представлять собой вторую спейсерную единицу, как описано в настоящем документе. В предпочтительных воплощениях линкера \*-A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>-B<sub>b</sub>-##, вторая спейсерная единица -A-, если она присутствует, (a = 1), может представлять собой группу Z, имеющую

структуру , где  является такой, как описано в настоящем документе. Соответственно, в предпочтительных воплощениях, линкер (L) может иметь

структуру , где L<sup>P</sup>, R<sup>S</sup>, s\*, M, W, w, B и b имеют значения, определенные в настоящем документе; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C).

Аминокислотная единица (-W<sub>w</sub>-), если она присутствует, может связывать вторую спейсерную единицу A с первой спейсерной единицей B в случае, если первая спейсерная единица присутствует. В качестве альтернативы, аминокислотная единица может связывать вторую спейсерную единицу с фрагментом камптотецина (C) в случае, если первая спейсерная единица отсутствует. В качестве альтернативы, аминокислотная единица может связывать Y с первой спейсерной единицей в случае, если вторая спейсерная единица отсутствует. В качестве альтернативы, аминокислотная единица может связывать Y с фрагментом камптотецина в случае, если первая спейсерная единица и вторая спейсерная единица отсутствуют.

Аминокислотная единица -W<sub>w</sub>- может представлять собой дипептид (w = 2), трипептид (w = 3), тетрапептид (w = 4), пентапептид (w = 5), гексапептид (w = 6),

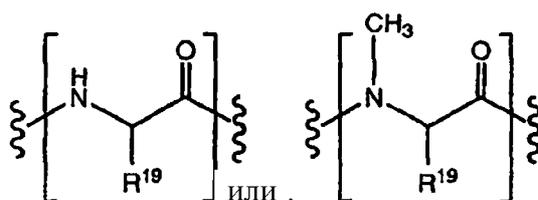
гептапептид ( $w = 7$ ), октапептид ( $w = 8$ ), нонапептид ( $w = 9$ ), декапептид ( $w = 10$ ), ундекапептид ( $w = 11$ ) или додекапептид ( $w = 12$ ).

В некоторых воплощениях аминокислотная единица может содержать природные аминокислоты. В некоторых воплощениях аминокислотная единица может содержать неприродные аминокислоты.

В любом из воплощений, описанных в настоящем документе, каждая аминокислота аминокислотной единицы, за исключением аминокислот, которые не являются хиральными, такие как, например, глицин, может независимо находиться в L-конфигурации или в D-конфигурации. Предпочтительно в любом из воплощений, описанных в настоящем документе, каждая аминокислота аминокислотной единицы, за исключением аминокислот, которые не являются хиральными, такие как, например, глицин, находится в L-конфигурации (то есть, во встречающейся в природе конфигурации).

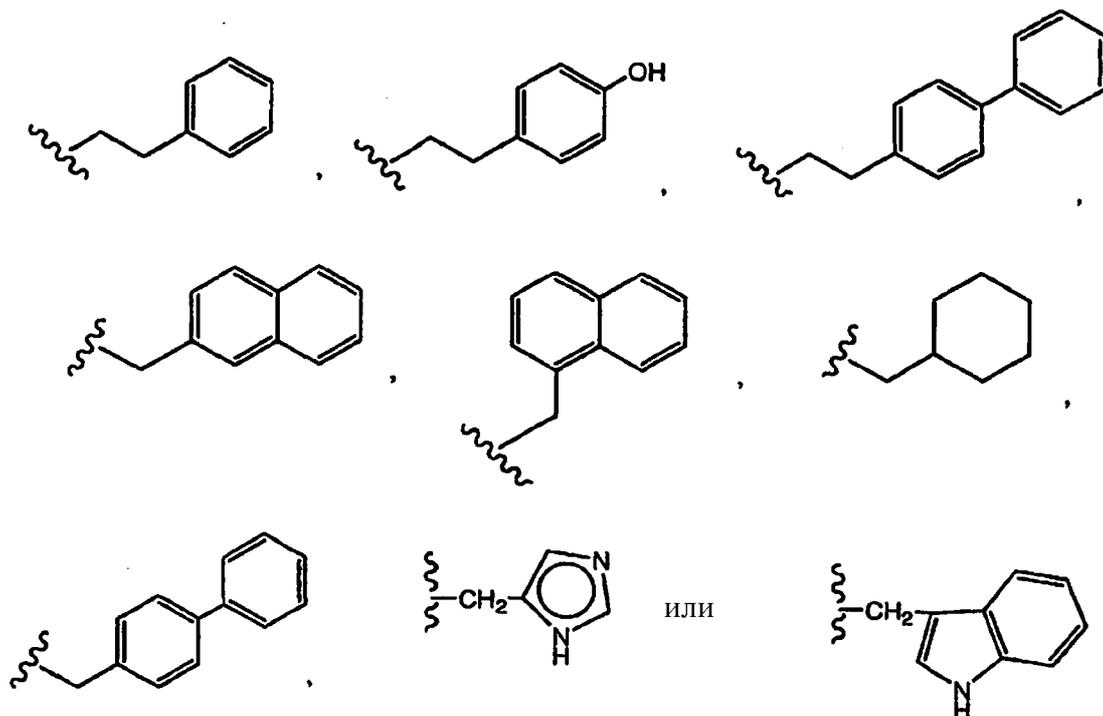
Предпочтительно, когда вторая спейсерная единица (-A-) присутствует, в любом из воплощений, описанных в настоящем документе, N-конец аминокислотной единицы  $-W_w-$  связан со второй спейсерной единицей (A), более предпочтительно через карбонильную группу второй спейсерной единицы. Предпочтительно в любом из воплощений, описанных в настоящем документе, C-конец аминокислотной единицы  $-W_w-$  связан с первой спейсерной единицей (B) в случае, если первая спейсерная единица присутствует. В качестве альтернативы, в любом из воплощений, описанных в настоящем документе, C-конец аминокислотной единицы  $-W_w-$  может быть связан с фрагментом камптотецина (-C) в случае, если первая спейсерная единица отсутствует. В других воплощениях N-конец аминокислотной единицы  $-W_w-$  может быть связан с первой спейсерной единицей (B), если она присутствует, и C-конец может быть связан со второй спейсерной единицей A, если она присутствует.

В некоторых воплощениях  $w$  может быть 1 или 2. Предпочтительно аминокислотная единица  $W_w$  представляет собой дипептид ( $w = 2$ ). В дипептиде каждая аминокислота независимо может иметь формулу, обозначенную ниже в квадратных скобках:



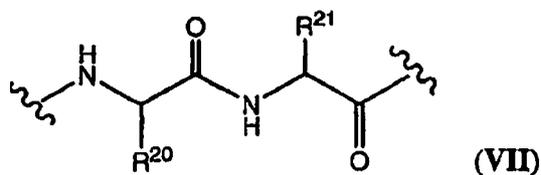
где  $R^{19}$  представляет собой водород, метил, изопропил, изобутил, *втор*-бутил, бензил, *n*-гидроксibenзил,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ , -

CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 2-пиридилметил-, 3-пиридилметил-, 4-пиридилметил-, фенил, циклогексил,

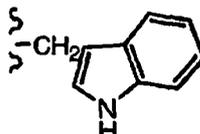


Аминокислотная единица может быть ферментативно расщеплена одним или более ферментами, включая, но не ограничиваясь ими, опухолеассоциированную протеазу, предпочтительно катепсин, более предпочтительно катепсин В, с высвобождением фрагмента камптотецина (-С), который в одном воплощении протонируется *in vivo* после высвобождения с образованием свободного фрагмента камптотецина (С). Иллюстративные единицы -W<sub>w</sub>- представлены формулой (VII).

Соответственно, -W<sub>w</sub>- единица может представлять собой дипептид формулы (VII):



где R<sup>20</sup> и R<sup>21</sup> являются следующими:

R <sup>20</sup>	R <sup>21</sup>
бензил $\gamma$	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;
метил $\gamma$	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;
изопропил	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;
изопропил	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
бензил $\gamma$	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
изобутил	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
втор-бутил	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ;
бензил $\gamma$	метил; и
бензил $\gamma$	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHC(=NH)NH <sub>2</sub> ;

Иллюстративные аминокислотные единицы включают, но не ограничиваются ими, единицы формулы (VII) где: R<sup>20</sup> представляет собой бензил и R<sup>21</sup> представляет собой - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub> (Phe-Lys); R<sup>20</sup> представляет собой изопропил и R<sup>21</sup> представляет собой - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub> (Val-Lys); R<sup>20</sup> представляет собой изопропил и R<sup>21</sup> представляет собой -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub> (Val-Cit).

Подходящие для применения -Ww-единицы могут быть сконструированы и оптимизированы по их селективности в отношении ферментативного расщепления конкретным ферментом, например, опухолеассоциированной протеазой. В одном воплощении единица -Ww- представляет собой единицу, расщепление которой катализируется катепсином В, С и/или D или плазминовой протеазой («опухолеассоциированные протеазы»). Предпочтительно единица -Ww- расщепляется катепсином В. Подходящие линкеры, которые могут расщепляться протеазой, описаны, например, в G.M. Dubowchik et al., “Cathepsin B-Labile Dipeptide Linkers for Lysosomal Release of Doxorubicin from Internalizing Immunoconjugates; Model Studies of Enzymatic Drug Release and Antigen-Specific In Vitro Anticancer Activity”, *Bioconjugate Chem.*, Vol. 13, No. 4, 2002, 855-869; S.C. Jeffrey et al., “Dipeptide-based highly potent doxorubicin antibody conjugate”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006), 358-362; и M.S. Kung Sutherland et al., “SGN-CD33A: a novel CD33-targeting antibody-drug conjugate using a pyrrolobenzodiazepine dimer is active in models of drug-resistant AML”, *Blood*, 22 August 2013, volume 122, number 8, 1455-1463.

Когда R<sup>19</sup>, R<sup>20</sup> или R<sup>21</sup> не является водородом, атом углерода, к которому присоединен R<sup>19</sup>, R<sup>20</sup> или R<sup>21</sup>, является хиральным. Каждый атом углерода, к которому присоединен R<sup>19</sup>, R<sup>20</sup> или R<sup>21</sup>, может независимо находиться в конфигурации (S) или (R).

Предпочтительно каждый атом углерода, к которому присоединен  $R^{19}$ ,  $R^{20}$  или  $R^{21}$ , когда он хиральный, находится в конфигурации (S).

В одном предпочтительном воплощении аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC). В другом предпочтительном воплощении аминокислотная единица представляет собой валин-аланин (то есть Val-Ala или VA). В другом предпочтительном воплощении аминокислотная единица представляет собой аланин-аланин (то есть Ala-Ala или AA). В другом предпочтительном воплощении аминокислотная единица представляет собой фенилаланин-лизин (то есть Phe-Lys или FK). Такие линкеры являются иллюстративными примерами линкера, который может расщепляться протеазой, например, катепсином В.

Обозначения пептидов, используемые в настоящем документе, соответствуют общепринятой номенклатуре. Соответственно, N-конец пептида пишется слева, а С-конец пептида — справа. В качестве иллюстративного, но неограничивающего примера, в дипептиде валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC) валин имеет N-конец, а цитруллин имеет С-конец. Предпочтительно в любом из воплощений, описанных в настоящем документе, когда присутствует вторая спейсерная единица (-A-), N-конец пептида, такого как, например, дипептид (в качестве иллюстративного неограничивающего примера: Val-Cit) связан со второй спейсерной единицей (-A-), более предпочтительно через карбонильную группу второй спейсерной единицы, и С-конец пептида связан с первой спейсерной единицей (-B-), в случае присутствия первой спейсерной единицы (-B-), или с фрагментом камптотецина (-C) в случае отсутствия первой спейсерной единицы (-B-).

В еще одном воплощении аминокислотная единица представляет собой N-метилвалин-цитруллин. В еще одном воплощении аминокислотная единица выбрана из группы, состоящей из 5-аминовалериновой кислоты, гомофенилаланина-лизина, тетраизохинолинкарбоксилата-лизина, циклогексилаланина-лизина, изонепекотиновой кислоты-лизина, бета-аланина-лизина и изонепекотиновой кислоты.

Предпочтительно аминокислотная единица представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA), аланина-аланина (то есть Ala-Ala или AA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Более предпочтительно аминокислотная единица представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или VA). Еще более предпочтительно

аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC) или валин-аланин (то есть Val-Ala или VA). Еще более предпочтительно аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC).

В некоторых воплощениях аминокислотная единица выбрана из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ), фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ) и треонина-треонина (то есть Thr-Thr или TT). Предпочтительно аминокислотная единица выбрана из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ) и фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ). Более предпочтительно аминокислотная единица представляет собой валин-глутамин (то есть Val-Gln или VQ) или лейцин-глутамин (то есть Leu-Gln или LQ). Линкеры, которые содержат аминокислотные единицы согласно этим воплощениям, могут быть иллюстративными примерами линкера, который расщепляется, в частности, протеазой, такой как, например, катепсин (например, катепсин В). Аминокислотные единицы для этих воплощений и дополнительные подходящие аминокислотные единицы описаны, например, в Salomon et al., “*Optimizing Lysosomal Activation of Antibody-Drug Conjugates (ADCs) by Incorporation of Novel Cleavable Dipeptide Linkers*”, *Mol. Pharmaceutics* 2019, 16, 12, 4817–4825.

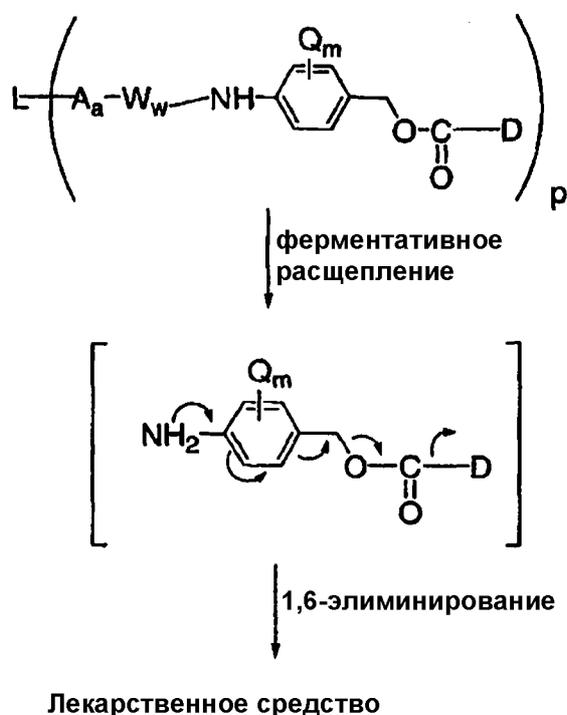
Первая спейсерная единица (B), если она присутствует, может связывать аминокислотную единицу ( $W_w$ ) с фрагментом камптотецина, когда аминокислотная единица присутствует. В качестве альтернативы, первая спейсерная единица (B) может связывать вторую спейсерную единицу (A) с фрагментом камптотецина (C), когда аминокислотная единица отсутствует. Первая спейсерная единица может связывать фрагмент камптотецина с Y, когда как аминокислотная единица, так и вторая спейсерная единица отсутствуют.

Целое число  $b$  может составлять 0 или 1. В предпочтительных воплощениях целое число  $b$  составляет 1. В качестве альтернативы, в других воплощениях целое число  $b$  составляет 0 и первая спейсерная единица отсутствует.

Первая спейсерная единица (-B-) может быть двух основных типов: саморазрушающаяся и несаморазрушающаяся. Несаморазрушающаяся первая спейсерная единица представляет собой единицу, в которой часть или вся первая спейсерная единица остается связанной с фрагментом камптотецина (C) после расщепления, в частности ферментативного, аминокислотной единицы ( $-W_w-$ ) линкера (L). В качестве альтернативы, иллюстративное соединение, содержащее саморазрушающуюся первую спейсерную

единицу, может высвобождать фрагмент лекарственного средства -D без необходимости проведения отдельной стадии гидролиза. В иллюстративном воплощении саморазрушающаяся первая спейсерная единица представляет собой группу PAB, которая связана с -W<sub>w</sub>- через аминный атом азота группы PAB и соединена непосредственно с -D через карбонатную, карбаматную или эфирную группу. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией или механизмом, схема 2 изображает возможный механизм высвобождения лекарственного средства группы PAB, которая присоединена непосредственно к -D через карбаматную или карбонатную группу, поддержанную Toki et al. (2002) J Org. Chem. 67:1866-1872.

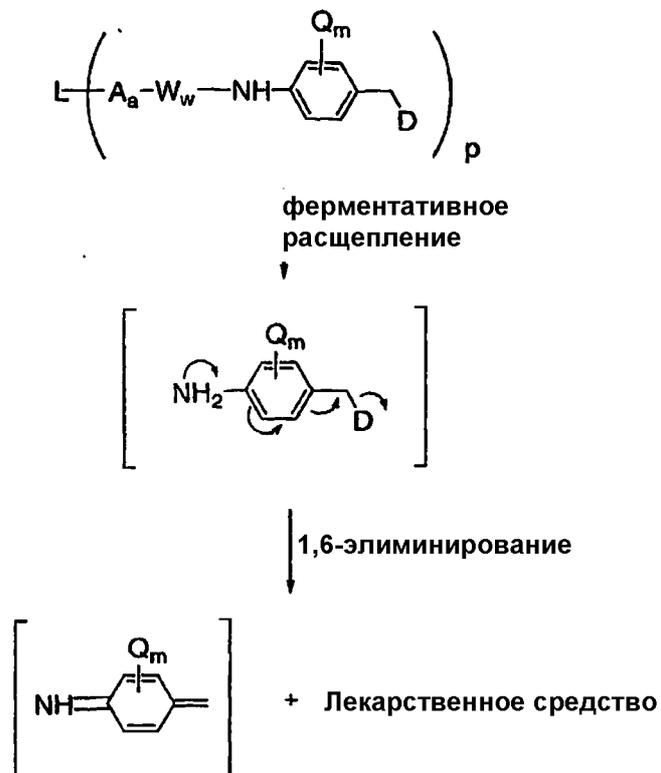
Схема 2



где Q представляет собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, -галоген, -нитро или -циано; m представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 4, предпочтительно m составляет 0, 1 или 2, более предпочтительно m составляет 0 или 1, еще более предпочтительно m составляет 0; и p находится в диапазоне от 1 до 20.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией или механизмом, Схема 3 отображает возможный механизм высвобождения лекарственного средства группы PAB, которая присоединена непосредственно к фрагменту лекарственного средства -D через эфирную или аминную связь.

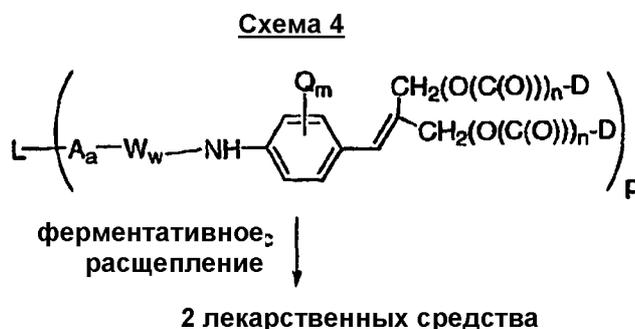
Схема 3



где Q представляет собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, -галоген,- нитро или -циано; m представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 4, предпочтительно m составляет 0, 1 или 2, более предпочтительно m составляет 0 или 1, еще более предпочтительно m составляет 0; и p находится в диапазоне от 1 до 20.

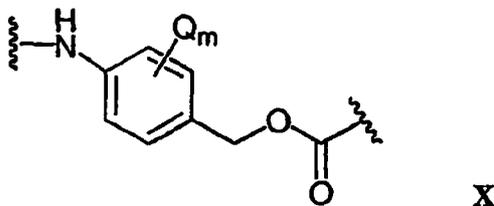
Другие примеры саморазрушающихся спейсеров включают, но не ограничиваются ими, ароматические соединения, которые электронно аналогичны группе PAB, такие как производные 2-аминоимдазол-5-метанола (Hay et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) и орто- или пара-аминобензилацетали. Могут быть использованы спейсеры, которые подвергаются циклизации при гидролизе амидной связи, такие как замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты (Rodrigues et al., *Chemistry Biology*, 1995, 2, 223), соответствующим образом замещенные бицикло[2.2.1] и бицикло[2.2.2] кольцевые системы (Storm, et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, 94, 5815) и амиды 2-аминофенилпропионовой кислоты (Amsberry, et al., *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 5867). Удаление аминоксодержащих лекарственных средств, которые замещены в альфа-положении глицина (Kingsbury, et al., *J. Med. Chem.*, 1984, 27, 1447), также является примером саморазрушающегося спейсера, пригодного для применения в иллюстративных соединениях.

В одном воплощении первая спейсерная единица представляет собой разветвленную бис(гидроксиметил)стирольную единицу (BHMS), как показано на Схеме 4, которую можно использовать для включения и высвобождения множества лекарственных средств (D).



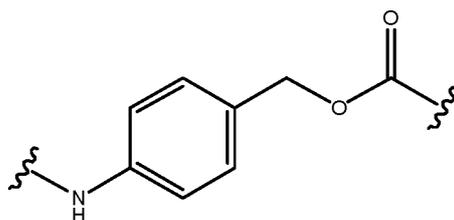
где Q представляет собой  $-(C_1-C_8)$ алкил,  $-O-(C_1-C_8)$ алкил, -галоген, -нитро или -циано; m представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 4; предпочтительно m составляет 0, 1 или 2; более предпочтительно m составляет 0 или 1; еще более предпочтительно m составляет 0; и p находится в диапазоне от 1 до 10; n составляет 0 или 1; и r находится в диапазоне от 1 до 20.

В предпочтительных воплощениях первая спейсерная единица представлена формулой (X):



где Q представляет собой  $-(C_1-C_8)$ алкил,  $-O-(C_1-C_8)$ алкил, -галоген, -нитро или -циано; и m представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 4; предпочтительно m составляет 0, 1 или 2; более предпочтительно m составляет 0 или 1; в наиболее предпочтительных воплощениях m составляет 0. Предпочтительно, когда в формуле (X) присутствует аминокислотная единица, NH группа связана с C-концом аминокислотной единицы. Предпочтительно в формуле (X) C(O) группа связана с фрагментом камптотецина (C).

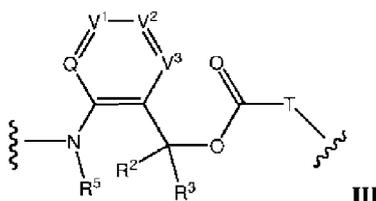
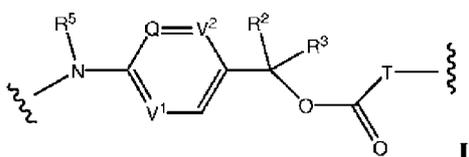
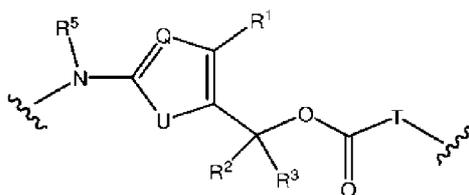
В наиболее предпочтительных воплощениях первая спейсерная единица представляет собой PAB группу, имеющую следующую структуру:



Предпочтительно, когда аминокислотная единица присутствует, группа NH связана с аминокислотной единицей (-W<sub>w</sub>-), более предпочтительно с C-концом аминокислотной единицы. Предпочтительно группа C(O) связана с фрагментом камптотецина (C).

В некоторых воплощениях первая спейсерная группа (-B-) представляет собой гетероциклический «саморазрушающийся фрагмент» формул I, II или III, связанный с фрагментом камптотецина, и включает амидную группу, которая при гидролизе внутриклеточной протеазой инициирует реакцию, которая в конечном итоге отщепляет первую спейсерную единицу (-B-) от фрагмента камптотецина, так что лекарственное средство высвобождается из конъюгата в активной форме. Линкерный фрагмент дополнительно содержит аминокислотную единицу (-W<sub>w</sub>-), примыкающую к первой спейсерной группе (-B-), которая является субстратом для внутриклеточного фермента, например, внутриклеточной протеазы, такой как катепсин (например, катепсин В), который расщепляет пептид по амидной связи, общей с первой спейсерной группой (-B-). Гетероциклические саморазрушающиеся фрагменты описаны, например, в WO 2019/236954.

В некоторых воплощениях первая спейсерная единица (-B-) представляет собой гетероциклическую саморазрушающуюся группу, выбранную из формул I, II и III:



где волнистые линии указывают места ковалентного присоединения к аминокислотной единице  $-W_w-$  и фрагменту камптотецина, и где U представляет собой O, S или  $NR^6$ ; Q представляет собой  $CR^4$  или N;  $V^1$ ,  $V^2$  и  $V^3$  независимо представляют собой  $CR^4$  или N при условии, что для формул II и III по меньшей мере один из Q,  $V^1$  и  $V^2$  представляет собой N; T представляет собой O, отстоящий от фрагмента камптотецина (-C);  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  и  $R^4$  независимо выбраны из группы, состоящей из H, F, Cl, Br, I, OH,  $-N(R^5)_2$ ,  $-N(R^5)_3^+$ ,  $-(C_1-C_8)$ алкилгалогенида, карбоксилата, сульфата, сульфамата, сульфоната,  $-SO_2R^5$ ,  $-S(=O)R^5$ ,  $-SR^5$ ,  $-SO_2N(R^5)_2$ ,  $-C(=O)R^5$ ,  $-CO_2R^5$ ,  $-C(=O)N(R^5)_2$ ,  $-CN$ ,  $-N_3$ ,  $-NO_2$ ,  $-(C_1-C_8)$ алкокси,  $-(C_1-C_8)$ галогензамещенного алкила, полиэтиленокси, фосфоната, фосфата,  $-(C_1-C_8)$ алкила,  $-(C_1-C_8)$ замещенного алкила,  $-(C_2-C_8)$ алкенила,  $-(C_2-C_8)$ замещенного алкенила,  $-(C_2-C_8)$ алкинила,  $-(C_2-C_8)$ замещенного алкинила,  $-(C_6-C_{20})$ арила,  $-(C_6-C_{20})$ замещенного арила,  $-(C_3-C_{20})$ гетероцикла и  $-(C_3-C_{20})$ замещенного гетероцикла; или, взятые вместе,  $R^2$  и  $R^3$  образуют карбонильное (=O) или спирокарбоциклическое кольцо, содержащее 3 до 7 атомов углерода; и  $R^5$  и  $R^6$  независимо выбраны из H,  $-(C_1-C_8)$ алкила,  $-(C_1-C_8)$ замещенного алкила,  $-(C_2-C_8)$ алкенила,  $-(C_2-C_8)$ замещенного алкенила,  $-(C_2-C_8)$ алкинила,  $-(C_2-C_8)$ замещенного алкинила,  $-(C_6-C_{20})$ арила,  $-(C_6-C_{20})$ замещенного арила,  $-(C_3-C_{20})$ гетероцикла и  $-(C_3-C_{20})$ замещенного гетероцикла; где  $-(C_1-C_8)$ замещенный алкил,  $-(C_2-C_8)$  замещенный алкенил,  $-(C_2-C_8)$ замещенный алкинил,  $-(C_6-C_{20})$ замещенный арил и  $-(C_3-C_{20})$ замещенный гетероцикл независимо замещены одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из F, Cl, Br, I, OH,  $-N(R^5)_2$ ,  $-N(R^5)_3^+$ ,  $-(C_1-C_8)$ алкилгалогенида, карбоксилата, сульфата, сульфамата, сульфоната,  $-(C_1-C_8)$ алкилсульфоната,  $-(C_1-C_8)$ алкиламино, 4-диалкиламинопиридиния,  $-(C_1-C_8)$ алкилгидроксила,  $-(C_1-C_8)$ алкилтиола,  $-SO_2R^5$ ,  $-S(=O)R^5$ ,  $-SR^5$ ,  $-SO_2N(R^5)_2$ ,  $-C(=O)R^5$ ,  $-CO_2R^5$ ,  $-C(=O)N(R^5)_2$ ,  $-CN$ ,  $-N_3$ ,  $-NO_2$ ,  $-(C_1-C_8)$ алкокси,  $-(C_1-C_8)$ трифторалкила,  $-(C_1-C_8)$ алкила,  $-(C_3-C_{12})$ карбоцикла,  $-(C_6-C_{20})$ арила,  $-(C_3-C_{20})$ гетероцикла, полиэтиленокси, фосфоната и фосфата.

Конъюгат, содержащий гетероциклический саморазрушающийся фрагмент, стабилен внеклеточно или в отсутствие фермента, способного расщеплять амидную связь саморазрушающегося фрагмента. Однако при проникновении в клетку или при воздействии подходящего фермента амидная связь расщепляется, инициируя спонтанную реакцию саморазрушения, приводящую к разрыву связи, ковалентно связывающей саморазрушающуюся часть с фрагментом камптотецина, тем самым вызывая

высвобождение лекарственного средства в его дериватизированной или фармакологически активной форме.

Саморазрушающийся фрагмент в конъюгатах либо включает один или более гетероатомов и, таким образом, может обеспечивать улучшенную растворимость, может улучшать скорость расщепления и/или может снижать склонность к агрегации конъюгата. Таким образом, гетероциклические саморазрушающиеся линкерные конструкции в некоторых случаях могут приводить к повышенной эффективности, снижению токсичности и/или требуемым фармакокинетическим и/или фармакодинамическим свойствам.

Понятно, что T в формулах I-III представляет собой O, поскольку он получен из третичного гидроксила (-OH) в части лактонного кольца фрагмента камптотецина.

Не ограничиваясь теорией или каким-либо конкретным механизмом, присутствие электроноакцепторных групп в гетероциклическом кольце формулы I, II или III может снижать скорость расщепления.

В одном воплощении саморазрушающийся фрагмент представляет собой группу формулы I, в которой Q представляет собой N, а U представляет собой O или S. Такая группа имеет структурную особенность нелинейности, которая улучшает растворимость конъюгатов. В этом контексте R иногда представляет собой H, метил, нитро или CF<sub>3</sub>. В одном воплощении Q представляет собой N, а U представляет собой O, образуя тем самым оксазольное кольцо, а R представляет собой H. В другом воплощении Q представляет собой N, а U представляет собой S, тем самым образуя тиазольное кольцо, возможно замещенное в R группой Me или CF<sub>3</sub>.

В другом иллюстративном воплощении саморазрушающийся фрагмент представляет собой группу формулы II, в которой Q представляет собой N, а V<sup>1</sup> и V<sup>2</sup> независимо представляют собой N или CH. В другом воплощении Q, V<sup>1</sup> и V<sup>2</sup> каждый представляет собой N. В другом воплощении Q и V<sup>1</sup> представляют собой N, тогда как V<sup>2</sup> представляет собой CH. В другом воплощении Q и V<sup>2</sup> представляют собой N, тогда как V<sup>1</sup> представляет собой CH. В другом воплощении Q и V<sup>1</sup> оба представляют собой CH, и V<sup>2</sup> представляет собой N. В другом воплощении q представляет собой N, тогда как V<sup>1</sup> и V<sup>2</sup> оба представляют собой CH.

В другом воплощении саморазрушающийся фрагмент представляет собой группу формулы III, в которой Q, V<sup>1</sup>, V<sup>2</sup> и V<sup>3</sup> каждый независимо представляет собой N или CH. В другом воплощении q представляет собой N, тогда как V<sup>1</sup>, V<sup>2</sup> и V<sup>3</sup> каждый представляет

собой N. В другом воплощении Q, V<sup>1</sup> и V<sup>2</sup> каждый представляет собой СН, тогда как V<sup>3</sup> представляет собой N. В другом воплощении Q, V<sup>2</sup> и V<sup>3</sup> каждый представляет собой СН, тогда как V<sup>1</sup> представляет собой N. В другом воплощении Q, V<sup>1</sup> и V<sup>3</sup> каждый представляет собой СН, тогда как V<sup>2</sup> представляет собой N. В другом воплощении Q и V<sup>2</sup> оба представляют собой N, тогда как V<sup>1</sup> и V<sup>3</sup> оба представляют собой СН. В другом воплощении Q и V<sup>2</sup> оба представляют собой СН, тогда как V<sup>1</sup> и V<sup>3</sup> оба представляют собой N. В другом воплощении Q и V<sup>3</sup> оба представляют собой N, тогда как V<sup>1</sup> и V<sup>2</sup> оба представляют собой СН.

Предпочтительно линкер (L) имеет формулу: \*-A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>-B<sub>b</sub>-##, где указанное целое число a составляет 1, целое число b составляет 1 и целое число w составляет 2, 3 или 4, более предпочтительно целое число w составляет 2 или 3; в самых предпочтительных воплощениях целое число w составляет 2; и -A-, каждый -W- и -B- имеют значения, определенные в настоящем документе; \* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (C).

Предпочтительно линкер (L) имеет следующую структуру:



где -A- представляет собой вторую спейсерную единицу, как описано в настоящем документе; a представляет собой целое число, как описано в настоящем документе; предпочтительно a составляет 1;

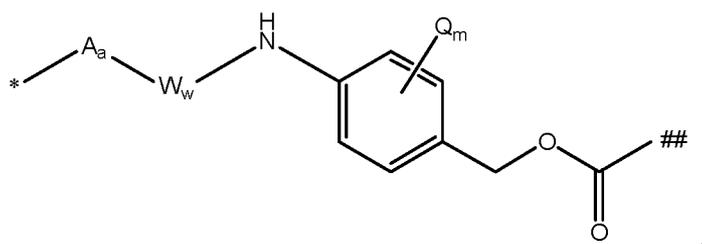
-B- представляет собой первую спейсерную единицу, как описано в настоящем документе; b представляет собой целое число, как описано в настоящем документе; предпочтительно b составляет 1;

\* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C);

-W<sub>w</sub>- представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA), аланина-аланина (то есть Ala-Ala или AA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC) или валин-аланин (то есть Val-Ala или VA). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет

собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC). В качестве альтернативы, в этих воплощениях аминокислотная единица  $-W_w-$  может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ), фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ) и треонина-треонина (то есть Thr-Thr или TT). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ) и фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой валин-глутамин (то есть Val-Gln или VQ) или лейцин-глутамин (то есть Leu-Gln или LQ). Линкеры согласно этим воплощениям могут быть иллюстративными примерами линкера, который расщепляется, в частности, протеазой, такой как, например, катепсин (например, катепсин В).

Предпочтительно линкер L имеет следующую структуру:



где  $-A-$  представляет собой вторую спейсерную единицу, как описано в настоящем документе;  $a$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $a$  составляет 1;

$-W_w-$  представляет собой аминокислотную единицу, как описано в настоящем документе;  $w$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $w$  составляет 2, 3 или 4 (то есть предпочтительно  $-W_w-$  представляет собой дипептид, трипептид или тетрапептид), более предпочтительно  $w$  составляет 2 или 3 (то есть более предпочтительно  $-W_w-$  представляет собой дипептид или трипептид), например,  $w$  может быть 1 или 2; в самых предпочтительных воплощениях  $w$  составляет 2 (то есть еще более предпочтительно  $-W_w-$  представляет собой дипептид);

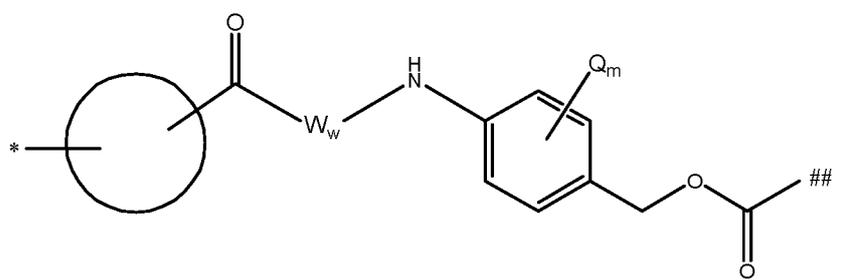
$Q$  является таким, как описано в настоящем документе;

$m$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе, предпочтительно  $m$  составляет 0;

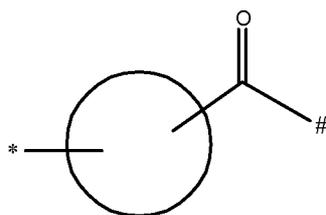
\* обозначает точку присоединения к  $Y$ ; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина ( $-C$ ). Предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица  $-W_w-$

представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA), аланина-аланина (то есть Ala-Ala или AA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC) или валин-аланин (то есть Val-Ala или VA). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC). В качестве альтернативы, в этих воплощениях аминокислотная единица  $-W_w-$  может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ), фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ) и треонина-треонина (то есть Thr-Thr или TT). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ) и фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой валин-глутамин (то есть Val-Gln или VQ) или лейцин-глутамин (то есть Leu-Gln или LQ). Линкеры согласно этим воплощениям могут быть иллюстративными примерами линкера, который расщепляется, в частности, протеазой, такой как, например, катепсин (например, катепсин В).

Более предпочтительно линкер L имеет следующую структуру:



где:



является такой, как описано в настоящем документе; \* обозначает точку присоединения к Y; и # обозначает точку присоединения к аминокислотной единице  $-W_w-$ , если она присутствует, или к NH группе;

$-W_w-$  представляет собой аминокислотную единицу, как описано в настоящем документе; w представляет собой целое число, как описано в настоящем документе, предпочтительно w составляет 2, 3 или 4 (то есть предпочтительно  $-W_w-$  представляет собой дипептид, трипептид или тетрапептид), более предпочтительно w составляет 2 или 3 (то есть более предпочтительно  $-W_w-$  представляет собой дипептид или трипептид), в самых предпочтительных воплощениях w составляет 2 (то есть еще более предпочтительно  $-W_w-$  представляет собой дипептид);

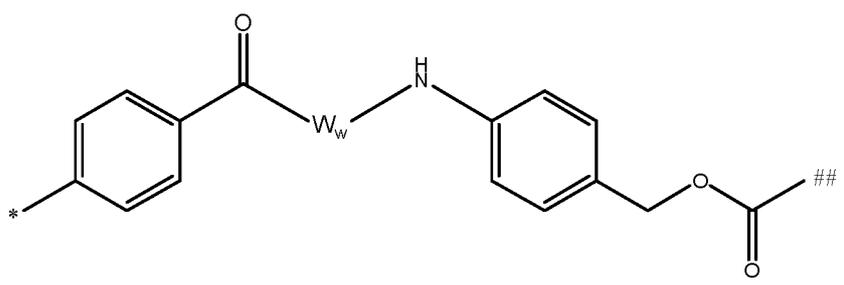
Q является таким, как описано в настоящем документе;

m представляет собой целое число, как описано в настоящем документе, предпочтительно m составляет 0;

\* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C). Предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица  $-W_w-$  представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA), аланина-аланина (то есть Ala-Ala или AA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC) или валин-аланин (то есть Val-Ala или VA). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC). В качестве альтернативы, в этих воплощениях аминокислотная единица  $-W_w-$  может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ), фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ) и треонина-треонина (то есть Thr-Thr или TT). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln

или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ) и фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой валин-глутамин (то есть Val-Gln или VQ) или лейцин-глутамин (то есть Leu-Gln или LQ). Линкеры согласно этим воплощениям могут быть иллюстративными примерами линкера, который расщепляется, в частности, протеазой, такой как, например, катепсин (например, катепсин В).

Еще более предпочтительно линкер L имеет следующую структуру:



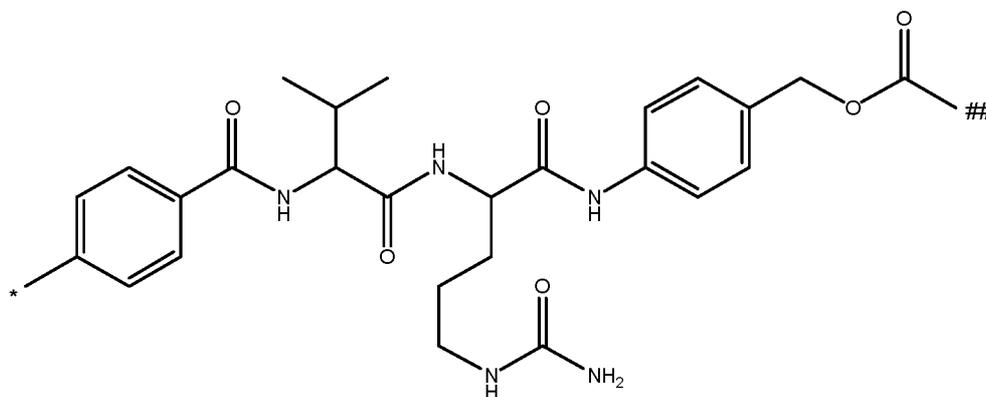
где:

-W<sub>w</sub>- представляет собой аминокислотную единицу, как описано в настоящем документе; w представляет собой целое число, как описано в настоящем документе, предпочтительно w составляет 2, 3 или 4 (то есть предпочтительно -W<sub>w</sub>- представляет собой дипептид, трипептид или тетрапептид), более предпочтительно w составляет 2 или 3 (то есть более предпочтительно -W<sub>w</sub>- представляет собой дипептид или трипептид), в самых предпочтительных воплощениях w составляет 2 (то есть еще более предпочтительно -W<sub>w</sub>- представляет собой дипептид);

\* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C). Предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица -W<sub>w</sub>- представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA), аланина-аланина (то есть Ala-Ala или AA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC) или валин-аланин (то есть Val-Ala или VA). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC). В качестве альтернативы, в этих воплощениях аминокислотная единица -W<sub>w</sub>- может представлять собой дипептид, выбранный из группы,

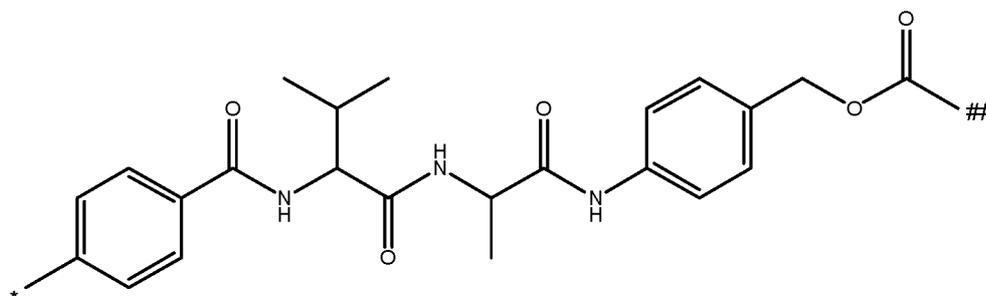
состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ), фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ) и треонина-треонина (то есть Thr-Thr или TT). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ) и фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой валин-глутамин (то есть Val-Gln или VQ) или лейцин-глутамин (то есть Leu-Gln или LQ). Линкеры согласно этим воплощениям могут быть иллюстративными примерами линкера, который расщепляется, в частности, протеазой, такой как, например, катепсин (например, катепсин В).

В предпочтительном воплощении линкер L имеет следующую структуру:



которая содержит дипептид валин-цитруллин в качестве аминокислотной единицы  $-W_w-$ ; и где \* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C). Такой линкер представляет собой иллюстративный пример линкера, который расщепляется, в частности, протеазой, такой как, например, катепсин (например, катепсин В).

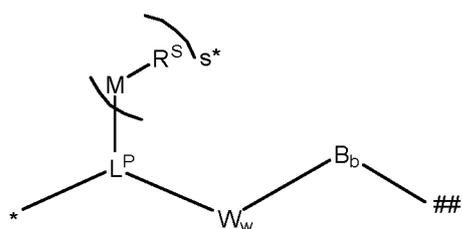
В другом предпочтительном воплощении линкер L имеет следующую структуру:



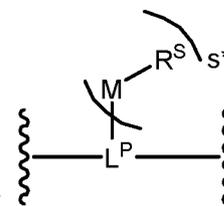
которая содержит дипептид валин-аланин в качестве аминокислотной единицы  $-W_w-$ ; и

где \* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C). Такой линкер представляет собой иллюстративный пример линкера, который расщепляется, в частности, протеазой, такой как, например, катепсин (например, катепсин В).

Предпочтительно линкер (L) имеет формулу:



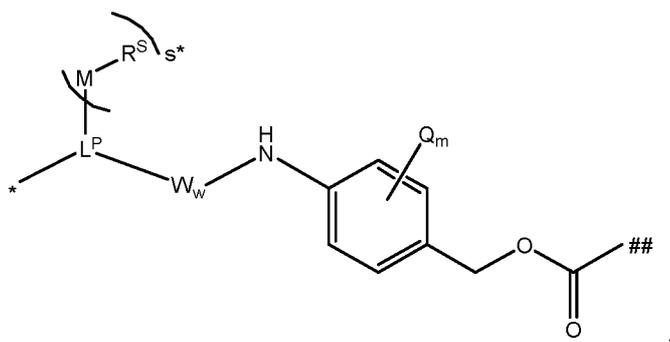
, где указанное целое число b составляет 1 и целое число w составляет 2, 3 или 4, более предпочтительно целое число w составляет 2 или 3, в самых

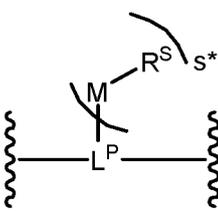


предпочтительных воплощениях целое число w составляет 2; и является таким, как описано в настоящем документе;  $R^S$  каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $R^S$  независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; M каждый независимо является таким, как описано в настоящем документе, предпочтительно каждый M представляет собой -O-;  $s^*$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $s^*$  составляет 1; каждый -W- и -B- имеют значения, определенные в настоящем документе; \* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C). Предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица -W\_w- представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA), аланина-аланина (то есть Ala-Ala или AA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC) или валин-аланин (то есть Val-Ala или VA). Более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC). В качестве

альтернативы, в этих воплощениях аминокислотная единица  $-W_w-$  может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ), фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ) и треонина-треонина (то есть Thr-Thr или TT). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ) и фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой валин-глутамин (то есть Val-Gln или VQ) или лейцин-глутамин (то есть Leu-Gln или LQ). Линкеры согласно этим воплощениям могут быть иллюстративными примерами линкера, который расщепляется, в частности, протеазой, такой как, например, катепсин (например, катепсин В).

Предпочтительно линкер L имеет следующую структуру:



где  является таким, как описано в настоящем документе;  $R^S$  каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $R^S$  независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе;  $M$  каждый независимо является таким как описано в настоящем документе, предпочтительно каждый  $M$  представляет собой  $-O-$ ;  $s^*$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $s^*$  составляет 1;

$-W_w-$  представляет собой аминокислотную единицу, как описано в настоящем документе;  $w$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $w$  составляет 2, 3 или 4 (то есть предпочтительно  $-W_w-$  представляет собой дипептид, трипептид или тетрапептид), более предпочтительно  $w$  составляет 2 или 3 (то есть более предпочтительно  $-W_w-$  представляет собой дипептид или трипептид), в самых

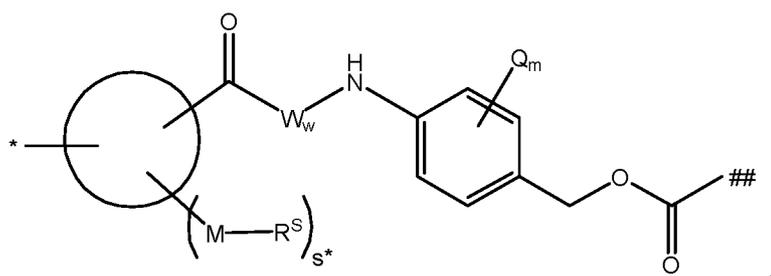
предпочтительных воплощениях  $w$  составляет 2 (то есть еще более предпочтительно - $W_w$ - представляет собой дипептид);

$Q$  является таким, как описано в настоящем документе;

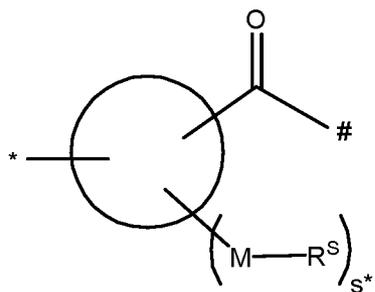
$m$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе, предпочтительно  $m$  составляет 0;

\* обозначает точку присоединения к  $Y$ ; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C). Предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица - $W_w$ - представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA), аланина-аланина (то есть Ala-Ala или AA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC) или валин-аланин (то есть Val-Ala или VA). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC). В качестве альтернативы, в этих воплощениях аминокислотная единица - $W_w$ - может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ), фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ) и треонина-треонина (то есть Thr-Thr или TT). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ) и фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой валин-глутамин (то есть Val-Gln или VQ) или лейцин-глутамин (то есть Leu-Gln или LQ). Линкеры согласно этим воплощениям могут быть иллюстративными примерами линкера, который расщепляется, в частности, протеазой, такой как, например, катепсин (например, катепсин B).

Более предпочтительно линкер L имеет следующую структуру:



где:



$s^*$  является такой, как описано в настоящем документе;  $R^S$  каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $R^S$  независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе;  $M$  каждый независимо является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $M$  представляет собой  $-O-$ ;  $s^*$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $s^*$  составляет 1; \* обозначает точку присоединения к  $Y$ ; и # обозначает точку присоединения к аминокислотной единице  $-W_w-$ , если он присутствует, или к  $NH$  группе;

$-W_w-$  представляет собой аминокислотную единицу, как описано в настоящем документе;  $w$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе, предпочтительно  $w$  составляет 2, 3 или 4 (то есть предпочтительно  $-W_w-$  представляет собой дипептид, трипептид или тетрапептид), более предпочтительно  $w$  составляет 2 или 3 (то есть более предпочтительно  $-W_w-$  представляет собой дипептид или трипептид), в самых предпочтительных воплощениях  $w$  составляет 2 (то есть еще более предпочтительно  $-W_w-$  представляет собой дипептид);

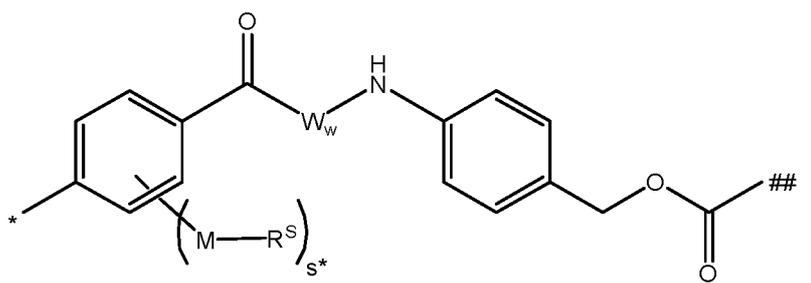
$Q$  является таким, как описано в настоящем документе;

$m$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе, предпочтительно  $m$  составляет 0;

\* обозначает точку присоединения к  $Y$ ; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина ( $-C$ ). Предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица  $-W_w-$  представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то

есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA), аланина-аланина (то есть Ala-Ala или AA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC) или валин-аланин (то есть Val-Ala или VA). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC). В качестве альтернативы, в этих воплощениях аминокислотная единица  $-W_w-$  может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ), фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ) и треонина-треонина (то есть Thr-Thr или TT). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ) и фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой валин-глутамин (то есть Val-Gln или VQ) или лейцин-глутамин (то есть Leu-Gln или LQ). Линкеры согласно этим воплощениям могут быть иллюстративными примерами линкера, который расщепляется, в частности, протеазой, такой как, например, катепсин (например, катепсин В).

Еще более предпочтительно линкер L имеет следующую структуру:



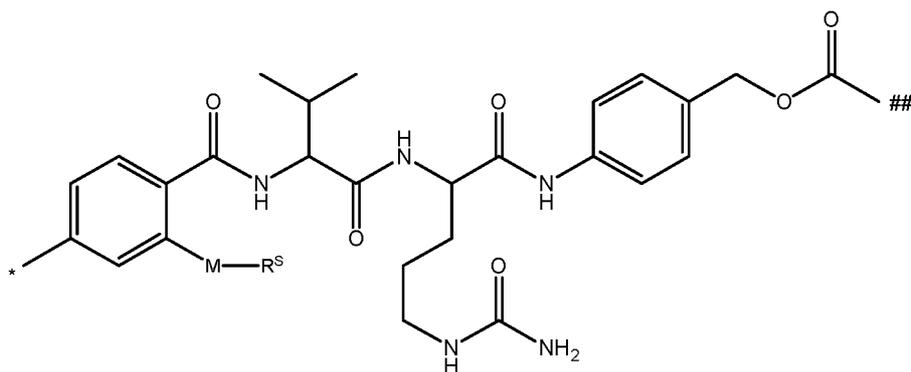
где:

$R^S$  каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $R^S$  независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе;  $M$  каждый независимо является таким, как описано в настоящем документе, предпочтительно каждый  $M$  представляет собой  $-O-$ ;  $s^*$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $s^*$  составляет 1;

$-W_w$ - представляет собой аминокислотную единицу, как описано в настоящем документе;  $w$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе, предпочтительно  $w$  составляет 2, 3 или 4 (то есть предпочтительно  $-W_w$ - представляет собой дипептид, трипептид или тетрапептид), более предпочтительно  $w$  составляет 2 или 3 (то есть более предпочтительно  $-W_w$ - представляет собой дипептид или трипептид), еще более предпочтительно  $w$  составляет 2 (то есть еще более предпочтительно  $-W_w$ - представляет собой дипептид);

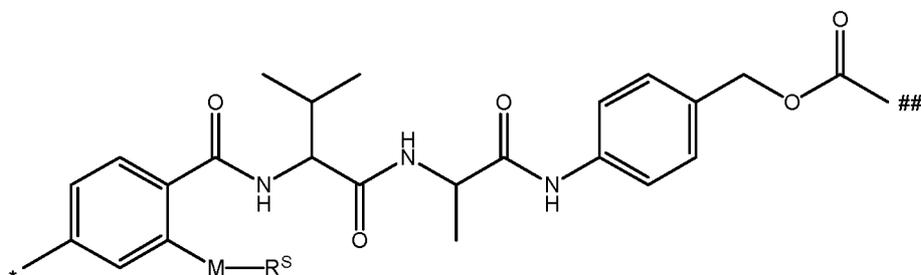
\* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C). Предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица  $-W_w$ - представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA), аланина-аланина (то есть Ala-Ala или AA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC) или валин-аланин (то есть Val-Ala или VA). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC). В качестве альтернативы, в этих воплощениях аминокислотная единица  $-W_w$ - может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ), фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ) и треонина-треонина (то есть Thr-Thr или TT). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ) и фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой валин-глутамин (то есть Val-Gln или VQ) или лейцин-глутамин (то есть Leu-Gln или LQ). Линкеры согласно этим воплощениям могут быть иллюстративными примерами линкера, который расщепляется, в частности, протеазой, такой как, например, катепсин (например, катепсин В).

В предпочтительном воплощении линкер L имеет следующую структуру:



которая содержит дипептид валин-цитруллин в качестве аминокислотной единицы  $-W_w$ ; где  $R^S$  представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $R^S$  представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе;  $M$  является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $M$  представляет собой  $-O-$ ; и \* обозначает точку присоединения к  $Y$ ; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина ( $-C$ ). Линкеры согласно этим воплощениям могут быть иллюстративными примерами линкера, который расщепляется, в частности, протеазой, такой как, например, катепсин (например, катепсин В).

В другом предпочтительном воплощении линкер L имеет следующую структуру:



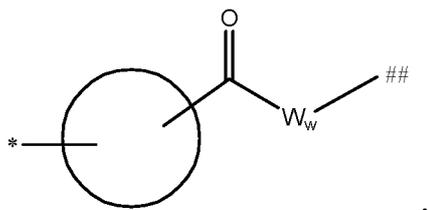
которая содержит дипептид валин-аланин в качестве аминокислотной единицы  $-W_w$ ; и где  $R^S$  представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $R^S$  представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе;  $M$  является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $M$  представляет собой  $-O-$ ; и \* обозначает точку присоединения к  $Y$ ; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина ( $-C$ ). Линкеры согласно этим воплощениям могут быть иллюстративными примерами линкера, который расщепляется, в частности, протеазой, такой как, например, катепсин (например, катепсин В).

В некоторых воплощениях линкер L имеет формулу:  $*-A_a-W_w-^{\#\#}$ , где -A- представляет собой вторую спейсерную единицу, как описано в настоящем документе; целое число a, связанное со второй спейсерной единицей такое, как описано в настоящем документе;  $-W_w-$  представляет собой аминокислотную единицу, как описано в настоящем документе; целое число w, связанное с аминокислотной единицей W, определено в настоящем документе; первая спейсерная единица (-Вь-) отсутствует; \* обозначает точку присоединения к Y; и # обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-С). Предпочтительно целое число a составляет 1. Предпочтительно целое число w составляет 2, 3 или 4, более предпочтительно целое число w составляет 2 или 3, еще более предпочтительно целое число w составляет 2. Предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица  $-W_w-$  представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA), аланина-аланина (то есть Ala-Ala или AA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC) или валин-аланин (то есть Val-Ala или VA). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC). В качестве альтернативы, в этих воплощениях аминокислотная единица  $-W_w-$  может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ), фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ) и треонина-треонина (то есть Thr-Thr или TT). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ) и фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой валин-глутамин (то есть Val-Gln или VQ) или лейцин-глутамин (то есть Leu-Gln или LQ). В любом из этих воплощений вторая

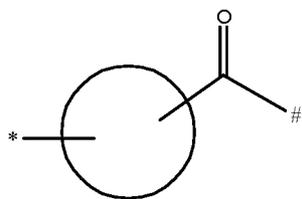
спейсерная единица -A- может представлять собой группу Z, имеющую структуру



Линкер L может иметь следующую структуру:



где:



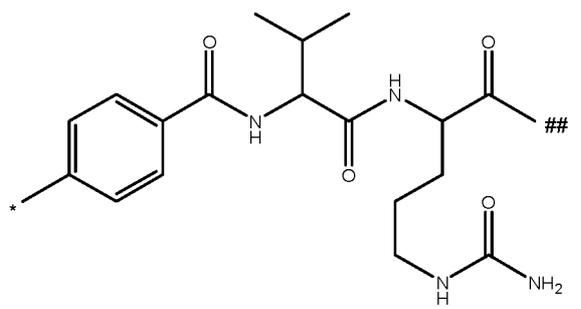
является такой, как описано в настоящем документе; \* обозначает точку присоединения к Y; и # обозначает точку присоединения к аминокислотной единице  $-\text{W}_w-$ ;

$-\text{W}_w-$  представляет собой аминокислотную единицу, как описано в настоящем документе; w представляет собой целое число, как описано в настоящем документе, предпочтительно w составляет 2, 3 или 4 (то есть предпочтительно  $-\text{W}_w-$  представляет собой дипептид, трипептид или тетрапептид), более предпочтительно целое число w составляет 2 или 3 (то есть более предпочтительно  $-\text{W}_w-$  представляет собой дипептид или трипептид), еще более предпочтительно w составляет 2 (то есть еще более предпочтительно  $-\text{W}_w-$  представляет собой дипептид);

\* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C). Предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица  $-\text{W}_w-$  представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA), аланина-аланина (то есть Ala-Ala или AA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-цитруллина (то есть Val-Cit или VC), валина-аланина (то есть Val-Ala или VA) и фенилаланина-лизина (то есть Phe-Lys или FK). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-

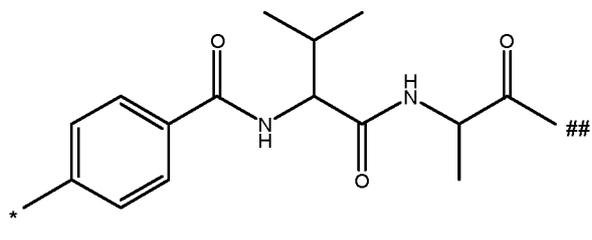
цитруллин (то есть Val-Cit или VC) или валин-аланин (то есть Val-Ala или VA). Еще более предпочтительно в этих воплощениях аминокислотная единица представляет собой валин-цитруллин (то есть Val-Cit или VC). В качестве альтернативы, в этих воплощениях аминокислотная единица  $-W_w-$  может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ), фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ) и треонина-треонина (то есть Thr-Thr или TT). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой дипептид, выбранный из группы, состоящей из валина-глутамина (то есть Val-Gln или VQ), лейцина-глутамина (то есть Leu-Gln или LQ) и фенилаланина-глутамина (то есть Phe-Gln или FQ). В этих воплощениях аминокислотная единица может представлять собой валин-глутамин (то есть Val-Gln или VQ) или лейцин-глутамин (то есть Leu-Gln или LQ).

В некоторых воплощениях линкер L может иметь следующую структуру:



которая содержит дипептид валин-цитруллин в качестве аминокислотной единицы  $-W_w-$ ; и где \* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C).

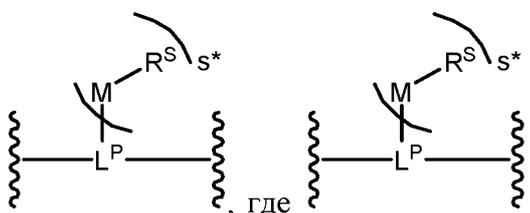
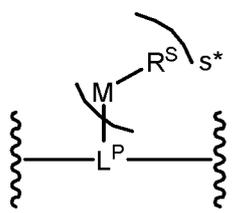
В некоторых воплощениях линкер L может иметь следующую структуру:



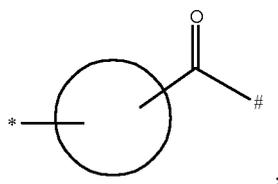
которая содержит дипептид валин-аланин в качестве аминокислотной единицы  $-W_w-$ ; и где \* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C).

В некоторых воплощениях линкер (-L-) имеет формулу:  $*-A_a-##$ , где -A- представляет собой вторую спейсерную единицу, как описано в настоящем документе; целое число a, связанное со второй спейсерной единицей, составляет 1; аминокислотная единица  $-W_w-$  отсутствует; первая спейсерная единица (-B-) отсутствует; \* обозначает точку

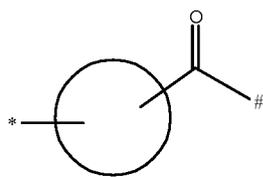
присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C). В любом из этих воплощений вторая спейсерная единица -A- может представлять собой

группу Z, имеющую структуру , где  является такой, как описано в настоящем документе.

Линкер (-L-) может иметь следующую структуру:

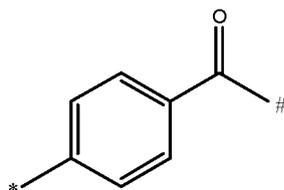


где:



является такой, как описано в настоящем документе; \* обозначает точку присоединения к Y; и # обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C).

В некоторых воплощениях линкер L может иметь следующую структуру:



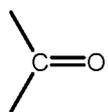
где \* обозначает точку присоединения к Y; и # обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C).

Линкер \*-A<sub>q</sub>-Q<sup>CO</sup><sub>q</sub>-G-##

В некоторых воплощениях линкер L имеет следующую структуру: \*-A<sub>q</sub>-Q<sup>CO</sup><sub>q</sub>-G-##, где: -A- представляет собой вторую спейсерную единицу, как описано в настоящем документе; а составляет 0 или 1, как описано в настоящем документе; каждый -Q<sup>CO</sup>- независимо представляет собой соединяющую единицу; q составляет 0 или 1; и -G- представляет собой первую спейсерную единицу, содержащую сахарный фрагмент; \* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C). Линкеры, содержащие сахарный фрагмент, такие как, например, фрагмент глюкуроновой кислоты, описаны, например, в Jeffrey et al., "Development and

*Properties of beta-Glucuronide Linkers for Monoclonal Antibody-Drug Conjugates*”, Bioconjugate Chem. 2006, 17, 831-840, doi: 10.1021/bc0600214; WO 2019/236954 и WO 2015/057699.

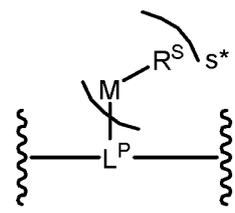
В линкере  $*-A_a-Q^{CO}_q-G^{##}$  вторая спейсерная единица -A-, если она присутствует, может представлять собой вторую спейсерную единицу, как описано в настоящем документе. В линкере, имеющем структуру  $*-A_a-Q^{CO}_q-G^{##}$ , вторая спейсерная единица A служит для соединения Y с соединяющей единицей  $Q^{CO}$ , если она присутствует, или с первой спейсерной единицей, содержащей сахарный фрагмент. Вторая спейсерная единица (-A-), если она присутствует, может представлять собой химическую группу или фрагмент, который способен связывать Y с соединяющей единицей ( $Q^{CO}$ ). В качестве альтернативы, вторая спейсерная единица (-A-) может связывать Y с первой спейсерной единицей, содержащей сахарный фрагмент (-G-), в случае, если соединяющая единица  $Q^{CO}$  не присутствует. В этом отношении Y, как описано в настоящем документе, связан со второй спейсерной единицей (-A-). Вторая спейсерная единица (-A-) содержит или представляет собой функциональную группу, которая способна образовывать связь с соединяющей единицей ( $-Q^{CO}-$ ) или с первой спейсерной единицей, имеющей сахарный фрагмент (-G-), в зависимости от того присутствует соединяющая единица ( $-Q^{CO}-$ ) или нет. Предпочтительно функциональная группа, которая способна образовывать связь с соединяющей единицей ( $-Q^{CO}-$ ) или с первой спейсерной единицей, содержащей сахарный фрагмент (-G-), представляет собой карбонильную группу, которая обозначена, например,

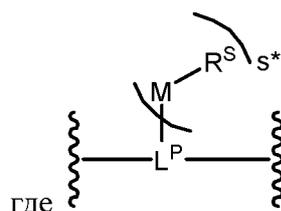


или  $-C(O)-$ . Целое число a, связанное со второй спейсерной единицей, может составлять 0 или 1. Предпочтительно целое число a составляет 1. В качестве альтернативы, в других воплощениях вторая спейсерная единица отсутствует ( $a = 0$ ).

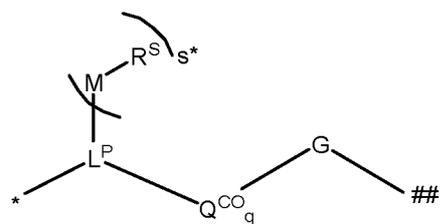
В линкере  $*-A_a-Q^{CO}_q-G^{##}$  вторая спейсерная единица -A-, если она присутствует, может представлять собой вторую спейсерную единицу, как описано в настоящем документе. В некоторых воплощениях вторая спейсерная единица -A-, если она

присутствует, может представлять собой группу Z, имеющую структуру





где является такой, как описано в настоящем документе. Соответственно, в некоторых воплощениях линкер (L) может иметь структуру



, где  $L^P$ ,  $R^S$ ,  $s^*$ ,  $M$ ,  $Q^{CO}$ ,  $q$  и  $G$  имеют значения, определенные в настоящем документе; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C).

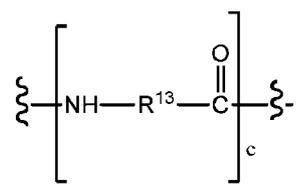
Соединяющая единица ( $-Q^{CO}-$ ) может быть включена в случаях, когда желательно добавить дополнительное расстояние между -Y- или, если она присутствует, между второй спейсерной единицей (-A-) и первой спейсерной единицей, содержащей сахарный фрагмент (-G-). В некоторых воплощениях дополнительное расстояние может способствовать активации первой спейсерной единицы, содержащей сахарный фрагмент (-G-). Соответственно, соединяющая единица ( $-Q^{CO}-$ ), если она присутствует, расширяет каркас линкера (-L-). В этом отношении соединяющая единица ( $-Q^{CO}-$ ) ковалентно связана с -Y- или, когда вторая спейсерная единица -A- присутствует, со второй спейсерной единицей (-A-) на одном конце, и соединяющая единица ( $-Q^{CO}-$ ) ковалентно связана с первой спейсерной единицей, содержащей сахарный фрагмент (-G-) на другом конце. Целое число  $q$  связанное с соединяющей единицей  $Q^{CO}$ , может составлять 0 или 1. Предпочтительно целое число  $q$  составляет 1. В качестве альтернативы, в других воплощениях соединяющая единица  $Q^{CO}$  отсутствует ( $q = 0$ ).

Соединяющая единица ( $-Q^{CO}-$ ), если она присутствует, служит для связывания первой спейсерной единицы, содержащей сахарный фрагмент (-G-) со второй спейсерной единицей (-A-), если она присутствует, или с -Y-. Соединяющая единица  $Q^{CO}$  может представлять собой любую химическую группу или фрагмент, который служит для обеспечения присоединения первой спейсерной единицы, содержащей сахарный фрагмент (-G-) со второй спейсерной единицей (-A-), если она присутствует, или с -Y-. Соединяющая единица может содержать, например, одну или более (например, 1-10, предпочтительно 1, 2, 3 или 4) природную или не природную аминокислоту, аминокислотный спирт, аминокислотный альдегид и диаминоостаток. В некоторых воплощениях соединяющая единица



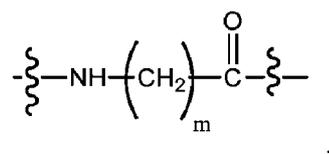
и каждый  $R^{100}$  независимо выбран из водорода или  $-(C_1-C_3)$ алкила, предпочтительно водорода или  $CH_3$ ; и индекс  $s$  представляет собой независимо выбранное целое число от 1 до 10, предпочтительно от 1 до 3.

В предпочтительных воплощениях соединяющая единица имеет следующую структуру  $(-Q^{CO-})$ , имеющую карбонильную группу для соединения с первой спейсерной единицей, содержащей сахарный фрагмент  $(-G-)$ , и NH группу для соединения со второй спейсерной единицей  $(-A-)$ , если она присутствует, и представляет собой следующее:



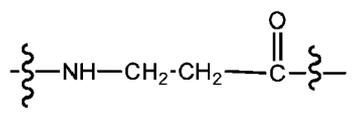
где в каждом случае  $R^{13}$  независимо выбран из группы, состоящей из  $-(C_1-C_6)$ алкилен-,  $-(C_3-C_8)$ карбоцикло-, -арилен-,  $-(C_1-C_{10})$ гетероалкилен-,  $-(C_3-C_8)$ гетероцикло-,  $-(C_1-C_{10})$ алкилен-арилен-, -арилен- $-(C_1-C_{10})$ алкилен-,  $-(C_1-C_{10})$ алкилен- $-(C_3-C_8)$ карбоцикло-,  $-(C_3-C_8)$ карбоцикло- $-(C_1-C_{10})$ алкилен-,  $-(C_1-C_{10})$ алкилен- $-(C_3-C_8)$ гетероцикло- и  $-(C_3-C_8)$ гетероцикло- $-(C_1-C_{10})$ алкилен-, и индекс  $s$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4. В некоторых воплощениях  $R^{13}$  представляет собой  $-(C_1-C_6)$ алкилен, и  $c$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4. В предпочтительных воплощениях  $R^{13}$  представляет собой  $-(C_1-C_6)$ алкилен, и  $c$  составляет 1.

Более предпочтительно соединяющая единица  $(-Q^{CO-})$  имеет следующую структуру:



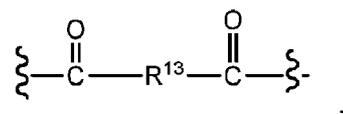
где волнистая линия рядом с азотом указывает на ковалентное присоединение ко второй спейсерной единице  $(-A-)$ , если она присутствует, и волнистая линия рядом с карбонилем указывает на ковалентное присоединение к первой спейсерной группе, содержащей сахарный фрагмент  $(-G-)$ ; и  $m$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 6, предпочтительно от 2 до 6, более предпочтительно от 2 до 4.

Еще более предпочтительно соединяющая единица  $(-Q^{CO-})$  имеет следующую структуру:



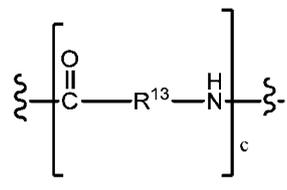
где волнистая линия рядом с азотом указывает на ковалентное присоединение ко второй спейсерной единице (-A-), если она присутствует, и волнистая линия рядом с карбонилем указывает на ковалентное присоединение к первой спейсерной группе, содержащей сахарный фрагмент (-G-).

Другая иллюстративная соединяющая единица (-Q<sup>CO</sup>-), имеющая карбонильную группу для соединения с первой спейсерной единицей, содержащей сахарный фрагмент (-G-), выглядит следующим образом:



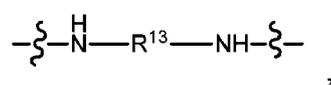
где R<sup>13</sup> представляет собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилен-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикло-, -арилен-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)гетероалкилен-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикло-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-арилен-, -арилен-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикло-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикло-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикло- или -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикло-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-. В некоторых воплощениях R<sup>13</sup> представляет собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилен.

Другая иллюстративная соединяющая единица, имеющая NH фрагмент, который присоединяется к первой спейсерной единице, содержащей сахарный фрагмент (-G-), выглядит следующим образом:



где в каждом случае R<sup>13</sup> независимо выбран из группы, состоящей из -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилен-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикло-, -арилен-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)гетероалкилен-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикло-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-арилен-, -арилен-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикло-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикло-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикло- и -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикло-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-, и индекс с составляет от 1 до 14. В некоторых воплощениях R<sup>13</sup> представляет собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилен, и индекс с составляет 1.

Другая иллюстративная соединяющая единица (-Q<sup>CO</sup>-), имеющая NH фрагмент, который присоединяется к первой спейсерной единице, содержащей сахарный фрагмент (-G-), выглядит следующим образом:



где  $R^{13}$  представляет собой  $-(C_1-C_6)$ алкилен-,  $-(C_3-C_8)$ карбоцикло-, -арилен-,  $-(C_1-C_{10})$ гетероалкилен-,  $-(C_3-C_8)$ гетероцикло-,  $-(C_1-C_{10})$ алкилен-арилен-, -арилен- $(C_1-C_{10})$ алкилен-,  $-(C_1-C_{10})$ алкилен- $(C_3-C_8)$ карбоцикло-,  $-(C_3-C_8)$ карбоцикло- $(C_1-C_{10})$ алкилен-,  $-(C_1-C_{10})$ алкилен- $(C_3-C_8)$ гетероцикло-,  $-(C_3-C_8)$ гетероцикло- $(C_1-C_{10})$ алкилен-,  $-C(=O)(C_1-C_{10})$ алкилен- или  $-(C_1-C_6)$ алкилен- $C(=O)-(C_1-C_6)$ алкилен.

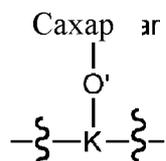
Первая спейсерная единица, имеющая сахарный фрагмент (-G-), является единственным компонентом линкера, имеющего структуру  $*-A_a-Q^{CO}_q-G^{##}$ , который должен присутствовать. В некоторых воплощениях первая спейсерная единица, содержащая сахарный фрагмент (-G-), образует расщепляющую связь с фрагментом камптотецина (-C). В некоторых воплощениях первую спейсерную единицу, содержащую сахарный фрагмент (-G-), образует расщепляющую связь с соединяющей единицей ( $-Q^{CO}-$ ), если она присутствует. В некоторых воплощениях расщепляющая связь находится внутри первой спейсерной единицы, содержащей сахарный фрагмент (-G-), но обеспечивает высвобождение свободного лекарственного средства (например, посредством реакции 1,6-элиминирования после расщепления). Функциональные группы для образования расщепляемых связей могут включать, например, сахара для образования гликозидных связей.

Структура и последовательность первой спейсерной единицы, содержащей сахарный фрагмент (-G-), могут быть такими, что эта единица расщепляется под действием ферментов, присутствующих в целевом сайте. В других воплощениях первая спейсерная единица, содержащая сахарный фрагмент (-G-), может расщепляться по другим механизмам. Первая спейсерная единица, содержащая сахарный фрагмент (-G-), может содержать один или более сайтов расщепления.

Предпочтительно первая спейсерная единица, содержащая сахарный фрагмент (-G-), содержит сайт расщепления сахара. В некоторых таких воплощениях первая спейсерная единица, содержащая сахарный фрагмент (-G-), содержит сахарный фрагмент (Su), связанный посредством кислородной гликозидной связи с саморазрушающейся группой. В таких аспектах саморазрушающуюся группу считают частью первой спейсерной единицы, содержащей сахарный фрагмент (-G-). В этом отношении «саморазрушающаяся группа» может представлять собой трехфункциональную химическую группу, которая способна ковалентно связывать вместе три разнесенных друг от друга химических фрагмента (то есть сахарный фрагмент (посредством гликозидной связи), фрагмент камптотецина (-C) и соединяющую единицу  $-QCO-$ , вторую спейсерную единицу -A- или -

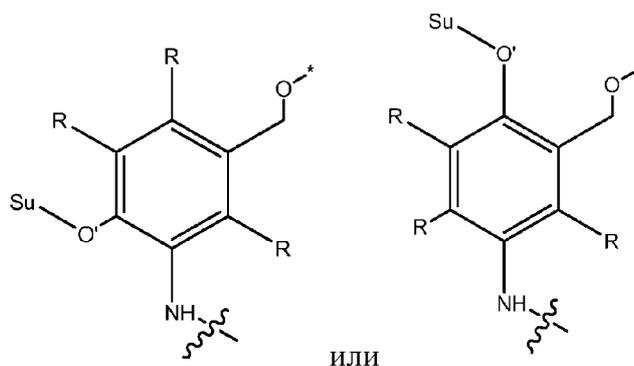
Y-, в зависимости от того, присутствуют или нет единица -QCO- и/или единица -A-. Гликозидная связь может быть такой, которая может быть расщеплена в целевом сайте, чтобы инициировать последовательность реакций саморазрушения, которая приводит к высвобождению лекарственного средства. Отдельные сахарные фрагменты могут быть выбраны, например, из группы, состоящей из глюкуроновой кислоты, галактозы, глюкозы, арабинозы, маннозы-6-фосфата, фукозы, рамнозы, гулозы, аллозы, 6-дезоксиглюкозы, лактозы, мальтозы, целлобиозы, гентиобиозы, мальтотриозы, GlcNAc, GalNAc и мальтогексаозы.

Соответственно, первая спейсерная единица, содержащая сахарный фрагмент (-G-), может содержать сахарный фрагмент (Su), связанный гликозидной связью (-O'-) с саморазрушающейся группой (K) формулы:



где указанная саморазрушающаяся группа K образует ковалентную связь с фрагментом камптотецина и ковалентную связь с -Q<sup>CO</sup>-, -A- или -Y- в зависимости от обстоятельств.

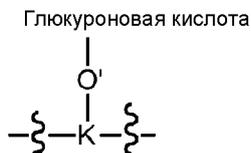
Первая спейсерная единица, содержащая сахарный фрагмент (-G-), может быть, например, представлена формулой:



где Su представляет собой сахарный фрагмент, -O'- представляет собой кислородную гликозидную связь; каждый R независимо представляет собой водород, галоген, -CN или -NO<sub>2</sub>; и где волнистая линия указывает присоединение к -Q<sup>CO</sup>-, -A- или -Y- в зависимости от обстоятельств и звездочка указывает на присоединение к фрагменту камптотецина (прямо или опосредованно через спейсерную единицу; спейсерная единица, если она присутствует, может представлять собой, например, -(C=O)-).

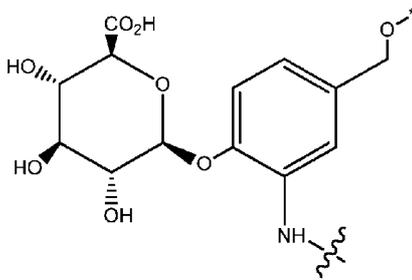
В некоторых подобных воплощениях сайт расщепления сахара распознается бета-глюкуронидазой и первая спейсерная единица, содержащая сахарный фрагмент (-G-),

содержит глюкуроnidную единицу. Глюкуроnidная единица может содержать глюкуроновую кислоту, связанную гликозидной связью (-O'-) с саморазрушающейся группой (K) формулы:



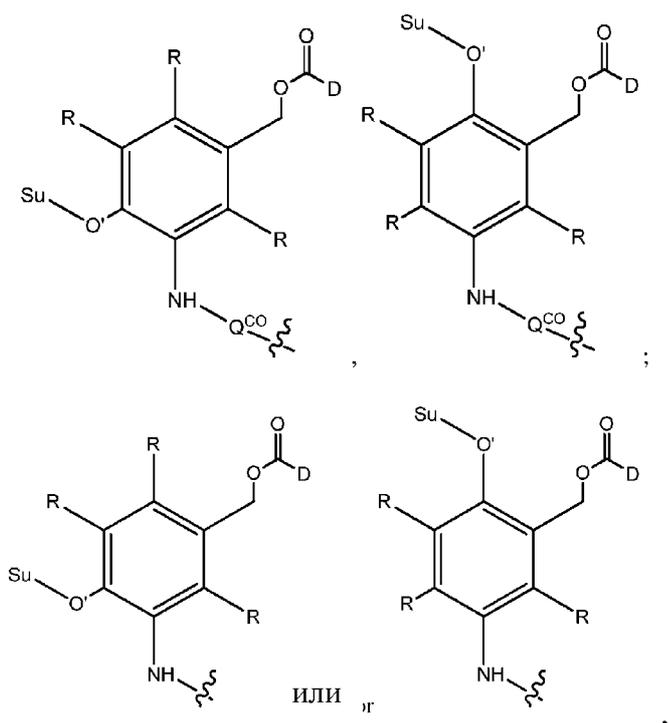
где указанная саморазрушающаяся группа K образует ковалентную связь с фрагментом камптотецина (прямо или опосредованно через спейсерную единицу; спейсерная единица, если она присутствует, может представлять собой, например, -(C=O)-) и ковалентную связь с -Q<sup>CO</sup>-, -A- или -Y- в зависимости от обстоятельств.

Глюкуроnidная единица может быть, например, представлена формулой:



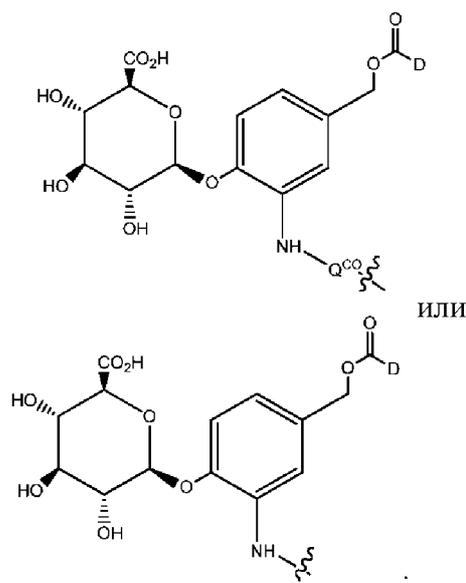
где волнистая линия указывает на ковалентное присоединение к -Q<sup>CO</sup>-, -A- или -Y- в зависимости от обстоятельств и звездочка указывает на ковалентное присоединение к фрагменту камптотецина -C (прямо или опосредованно через спейсерную единицу; спейсерная единица, если она присутствует, может представлять собой, например, -(C=O)-).

В некоторых воплощениях первая спейсерная единица, содержащая сахарный фрагмент (-G-), содержит сайт расщепления сахара и -S-C, то есть комбинация первой спейсерной единицы, содержащей сахарный фрагмент (-G-), и фрагмента камптотецина (в следующих формулах фрагмент камптотецина в исключительных случаях обозначается как «D») представлена следующими формулами:



где Su представляет собой сахарный фрагмент, D представляет собой фрагмент камптотецина, -O'- представляет собой кислородную гликозидную связь; каждый R независимо представляет собой водород или галоген, -CN, -NO<sub>2</sub> или другую электроноакцепторную группу, -Q<sup>CO</sup>- представляет собой соединяющую единицу, как описано в настоящем документе; где волнистая связь указывает на ковалентное присоединение к -A- или -Y- в зависимости от обстоятельств.

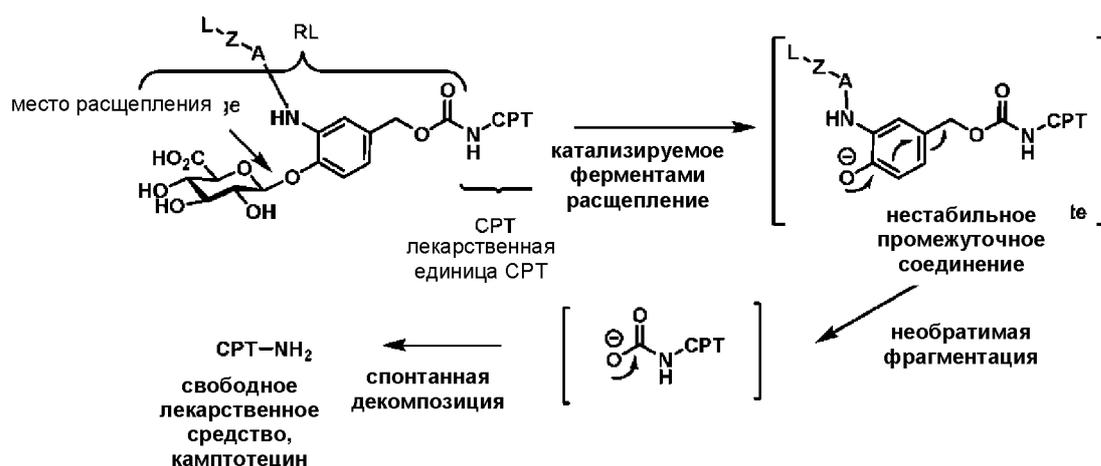
Когда первая спейсерная единица, содержащая сахарный фрагмент (-G-), содержит глюкуронидную единицу, тогда -S-C, то есть комбинация первой спейсерной единицы, содержащую сахарный фрагмент (-G-), и фрагмента камптотецина (в следующих формулах фрагмент камптотецина в исключительных случаях обозначается как «D») может быть, например, может быть представлена следующими формулами:



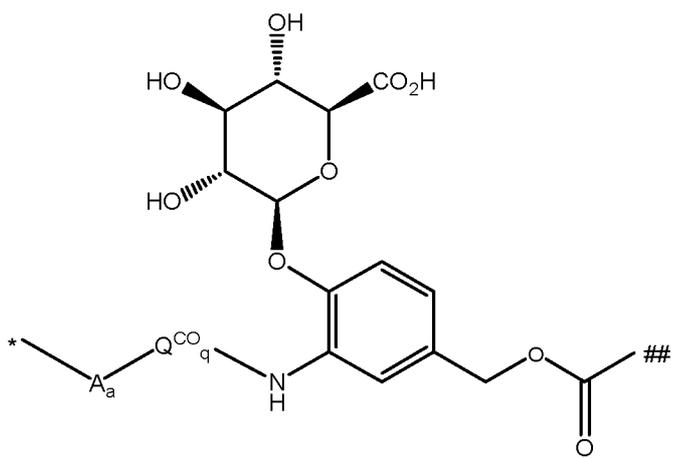
где волнистая связь указывает на ковалентное присоединение к -А- или -У- в зависимости от обстоятельств; D представляет собой фрагмент камптотецина; и -Q<sup>CO</sup>- представляет собой соединяющую единицу, как описано в настоящем документе.

Не ограничиваясь теорией, на схеме 1а показан механизм свободного высвобождения лекарственного средства из лекарственного звена камптотецина, присоединенного через атом азота аминного заместителя от свободного лекарственного средства к высвобождаемому линкеру, который содержит глюкуроnidную единицу.

Схема 1а



В предпочтительных воплощениях линкер (L) имеет следующую структуру:

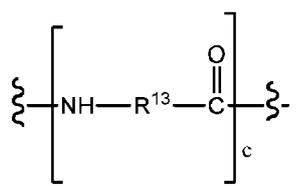


где:

-A- представляет собой вторую спейсерную единицу, как описано в настоящем документе; а представляет собой целое число, как описано в настоящем документе, предпочтительно а составляет 1;

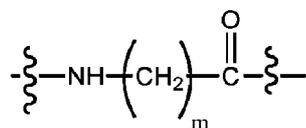
-Q<sup>CO</sup>- представляет собой соединяющую единицу как описано в настоящем документе; q представляет собой целое число, как описано в настоящем документе, предпочтительно q составляет 1;

\* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C). В этих воплощениях соединяющая единица (Q<sup>CO</sup>), если она присутствует, могут иметь карбонильную группу для соединения с первой спейсерной единицей, содержащей сахарный фрагмент (-G-), и NH группу для соединения со второй спейсерной единицей (-A-), если она присутствует, и может быть следующей:

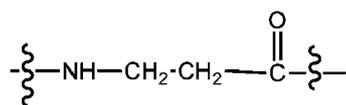


где в каждом случае R<sup>13</sup> независимо выбран из группы, состоящей из -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилен-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикло-, -арилен-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)гетероалкилен-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикло-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-арилен-, -арилен-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикло-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикло-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикло- и -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикло-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-, и индекс с представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4. В некоторых воплощениях R<sup>13</sup> представляет собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилен, и с представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4. В предпочтительных воплощениях R<sup>13</sup> представляет собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилен, и с составляет 1; Предпочтительно в этих

воплощениях соединяющая единица ( $-Q^{CO-}$ ), если она присутствует, может иметь следующую структуру:

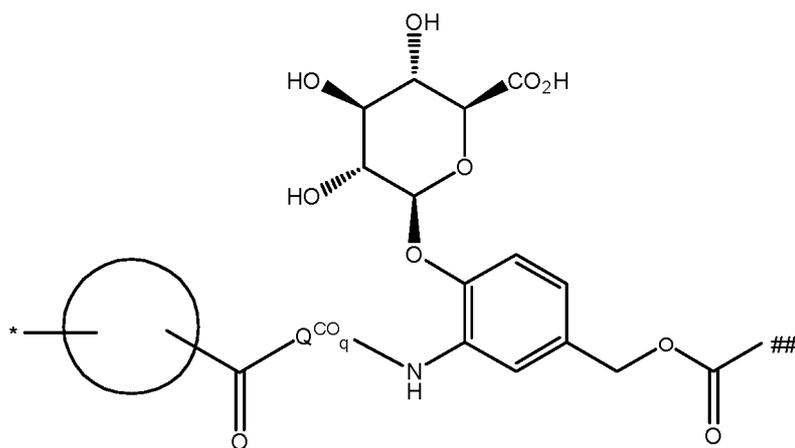


где волнистая линия рядом с азотом указывает на ковалентное присоединение ко второй спейсерной единице ( $-A-$ ), если она присутствует, и волнистая линия рядом с карбонилем указывает на ковалентное присоединение к первой спейсерной группе, содержащей сахарный фрагмент ( $-G-$ ); и  $m$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 6, предпочтительно от 2 до 6, более предпочтительно от 2 до 4; более предпочтительно в этих воплощениях соединяющая единица ( $-Q^{CO-}$ ), если она присутствует, имеет следующую структуру:

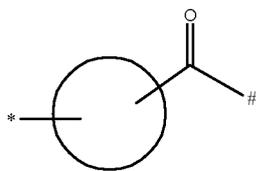


где волнистая линия рядом с азотом указывает на ковалентное присоединение ко второй спейсерной единице ( $-A-$ ), если она присутствует, и волнистая линия рядом с карбонилем указывает на ковалентное присоединение к первой спейсерной группе, содержащей сахарный фрагмент ( $-G-$ ).

Более предпочтительно линкер (L) имеет следующую структуру:



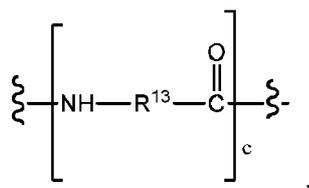
где:



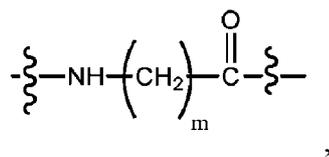
является такой, как описано в настоящем документе; \* обозначает точку присоединения к -Y-; и # обозначает точку присоединения к соединяющей единице (-Q<sup>CO</sup>-), если она присутствует, или к NH группе;

-Q<sup>CO</sup>- представляет собой соединяющую единицу, как описано в настоящем документе; q представляет собой целое число, как описано в настоящем документе, предпочтительно q составляет 1;

\* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C). В этих воплощениях соединяющая единица (Q<sup>CO</sup>), если она присутствует, может содержать карбонильную группу для соединения с первой спейсерной единицей, содержащей сахарный фрагмент (-G-), и NH группу для соединения со второй спейсерной единицей (-A-) и может быть следующей:

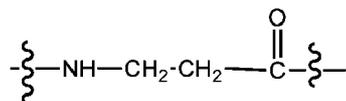


где в каждом случае R<sup>13</sup> независимо выбран из группы, состоящей из -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилен-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикло-, -арилен-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)гетероалкилен-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикло-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-арилен-, -арилен-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикло-, -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикло-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикло- и -(C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикло-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-, и индекс c представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4. В некоторых воплощениях R<sup>13</sup> представляет собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилен, и c представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4. В предпочтительных воплощениях R<sup>13</sup> представляет собой -(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкилен, и c составляет 1. Предпочтительно в этих воплощениях соединяющая единица (-Q<sup>CO</sup>-), если она присутствует, может иметь следующую структуру:



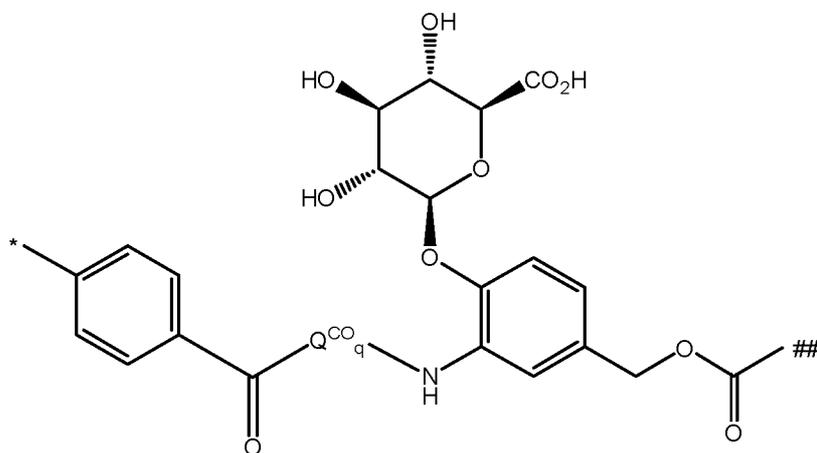
где волнистая линия рядом с азотом указывает на ковалентное присоединение ко второй спейсерной единице (-A-) и волнистая линия рядом с карбонилем указывает на ковалентное присоединение к первой спейсерной группе, содержащей сахарный фрагмент (-G-); и m

представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 6, предпочтительно от 2 до 6, более предпочтительно от 2 до 4. Более предпочтительно в этих воплощениях соединяющая единица ( $-Q^{CO}$ ), если она присутствует, имеет следующую структуру:



где волнистая линия рядом с азотом указывает на ковалентное присоединение ко второй спейсерной единице (-A-), если она присутствует, и волнистая линия рядом с карбонилем указывает на ковалентное присоединение к первой спейсерной группе, содержащей сахарный фрагмент (-G-).

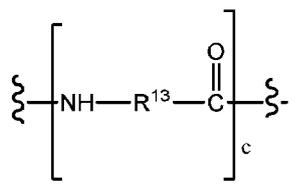
Еще более предпочтительно линкер (L) имеет следующую структуру:



где:

$Q^{CO}$  представляет собой соединяющую единицу, как описано в настоящем документе;  $q$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе, предпочтительно  $q$  составляет 1;

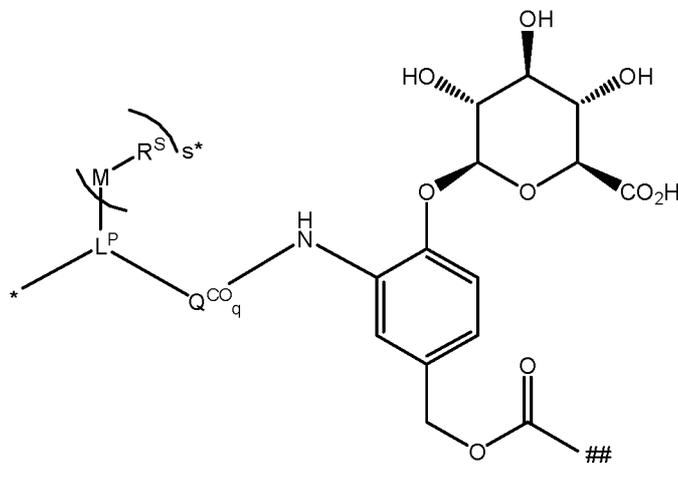
\* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C). В этих воплощениях соединяющая единица ( $Q^{CO}$ ), если она присутствует, может содержать карбонильную группу для соединения с первой спейсерной единицей, содержащей сахарный фрагмент (-G-), и NH группу для соединения со второй спейсерной единицей (-A-) и может быть следующей:



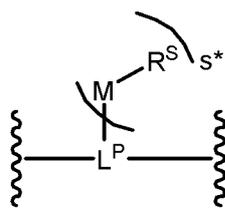


где \* обозначает точку присоединения к -Y-; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C).

В предпочтительных воплощениях линкер L имеет следующую структуру:



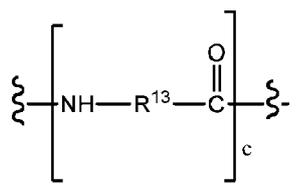
где:



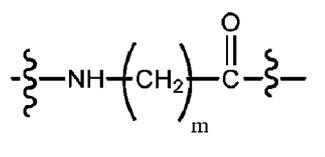
является таким, как описано в настоящем документе;  $R^S$  каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $R^S$  независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе;  $M$  каждый независимо является таким как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $M$  представляет собой -O-;  $s^*$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $s^*$  составляет 1;

- $Q^{CO}$ - представляет собой соединяющую единицу как описано в настоящем документе;  $q$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе, предпочтительно  $q$  составляет 1;

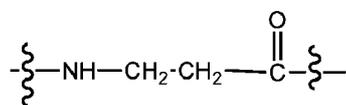
\* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C). В этих воплощениях соединяющая единица ( $Q^{CO}$ ), если она присутствует, может содержать карбонильную группу для соединения с первой спейсерной единицей, содержащей сахарный фрагмент (-G-), и NH группу для соединения со второй спейсерной единицей (-A-) и может быть следующей:



где в каждом случае  $\text{R}^{13}$  независимо выбран из группы, состоящей из  $-(\text{C}_1\text{-C}_6)$ алкилен-,  $-(\text{C}_3\text{-C}_8)$ карбоцикло-, -арилен-,  $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ гетероалкилен-,  $-(\text{C}_3\text{-C}_8)$ гетероцикло-,  $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ алкилен-арилен-, -арилен- $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ алкилен-,  $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ алкилен- $-(\text{C}_3\text{-C}_8)$ карбоцикло)-,  $-(\text{C}_3\text{-C}_8)$ карбоцикло- $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ алкилен-,  $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ алкилен- $-(\text{C}_3\text{-C}_8)$ гетероцикло- и  $-(\text{C}_3\text{-C}_8)$ гетероцикло- $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ алкилен-, и индекс  $c$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4. В некоторых воплощениях  $\text{R}^{13}$  представляет собой  $-(\text{C}_1\text{-C}_6)$ алкилен, и  $c$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4. В предпочтительных воплощениях  $\text{R}^{13}$  представляет собой  $-(\text{C}_1\text{-C}_6)$ алкилен, и  $c$  составляет 1. Предпочтительно в этих воплощениях соединяющая единица ( $-\text{Q}^{\text{CO}-}$ ), если она присутствует, может иметь следующую структуру:

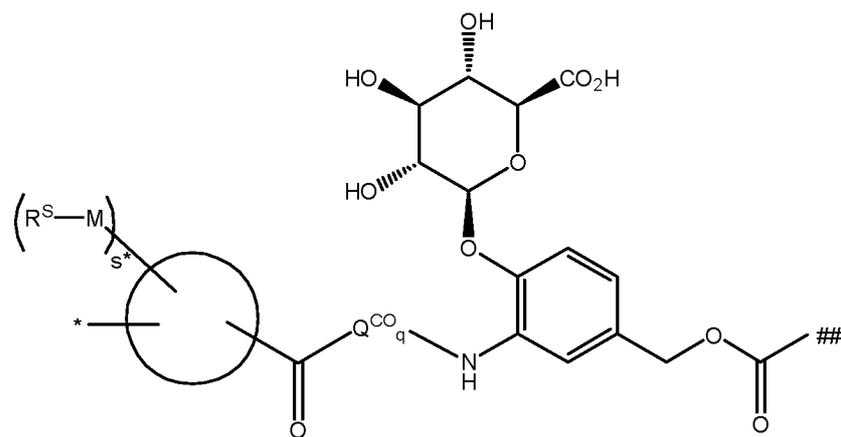


где волнистая линия рядом с азотом указывает на ковалентное присоединение ко второй спейсерной единице ( $-\text{A}-$ ) и волнистая линия рядом с карбонилем указывает на ковалентное присоединение к первой спейсерной группе, содержащей сахарный фрагмент ( $-\text{G}-$ ); и  $m$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 6, предпочтительно от 2 до 6, более предпочтительно от 2 до 4. Более предпочтительно в этих воплощениях соединяющая единица ( $-\text{Q}^{\text{CO}-}$ ), если она присутствует, имеет следующую структуру:

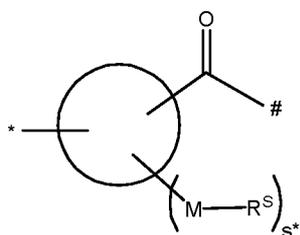


где волнистая линия рядом с азотом указывает на ковалентное присоединение ко второй спейсерной единице ( $-\text{A}-$ ) и волнистая линия рядом с карбонилем указывает на ковалентное присоединение к первой спейсерной группе, содержащей сахарный фрагмент ( $-\text{G}-$ ).

Более предпочтительно линкер (L) имеет следующую структуру:



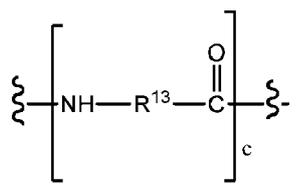
где:



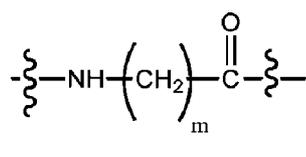
является такой, как описано в настоящем документе;  $R^S$  каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $R^S$  независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе;  $M$  каждый независимо является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $M$  представляет собой  $-O-$ ;  $s^*$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $s^*$  составляет 1;  $*$  обозначает точку присоединения к  $Y$ ;  $*$  обозначает точку присоединения к  $-Y-$ ; и  $\#$  обозначает точку присоединения к соединяющей единице ( $-Q^{CO}$ ), если она присутствует, или к  $NH$  группе;

$-Q^{CO}$  представляет собой соединяющую единицу, как описано в настоящем документе;  $q$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе, предпочтительно  $q$  составляет 1;

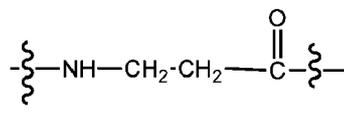
$*$  обозначает точку присоединения к  $Y$ ; и  $\#\#$  обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина ( $-C$ ). В этих воплощениях соединяющая единица ( $Q^{CO}$ ), если она присутствует, может содержать карбонильную группу для соединения с первой спейсерной единицей, содержащей сахарный фрагмент ( $-G-$ ), и  $NH$  группу для соединения со второй спейсерной единицей ( $-A-$ ) и может быть следующей:



где в каждом случае  $\text{R}^{13}$  независимо выбран из группы, состоящей из  $-(\text{C}_1\text{-C}_6)$ алкилен-,  $-(\text{C}_3\text{-C}_8)$ карбоцикло-, -арилен-,  $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ гетероалкилен-,  $-(\text{C}_3\text{-C}_8)$ гетероцикло-,  $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ алкилен-арилен-, -арилен- $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ алкилен-,  $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ алкилен- $-(\text{C}_3\text{-C}_8)$ карбоцикло)-,  $-(\text{C}_3\text{-C}_8)$ карбоцикло- $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ алкилен-,  $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ алкилен- $-(\text{C}_3\text{-C}_8)$ гетероцикло- и  $-(\text{C}_3\text{-C}_8)$ гетероцикло- $-(\text{C}_1\text{-C}_{10})$ алкилен-, и индекс  $c$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4. В некоторых воплощениях  $\text{R}^{13}$  представляет собой  $-(\text{C}_1\text{-C}_6)$ алкилен, и  $c$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4. В предпочтительных воплощениях  $\text{R}^{13}$  представляет собой  $-(\text{C}_1\text{-C}_6)$ алкилен, и  $c$  составляет 1. Предпочтительно в этих воплощениях соединяющая единица ( $-\text{Q}^{\text{CO}-}$ ), если она присутствует, может иметь следующую структуру:

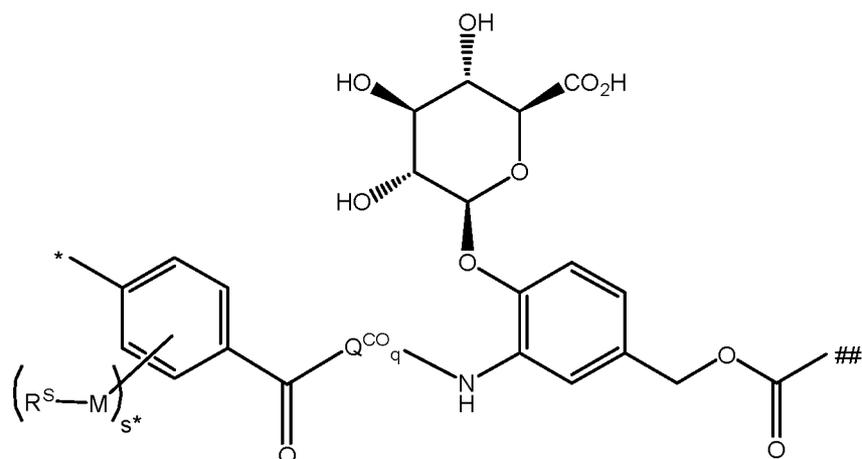


где волнистая линия рядом с азотом указывает на ковалентное присоединение ко второй спейсерной единице ( $-\text{A}-$ ) и волнистая линия рядом с карбонилем указывает на ковалентное присоединение к первой спейсерной группе, содержащей сахарный фрагмент ( $-\text{G}-$ ); и  $m$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 6, предпочтительно от 2 до 6, более предпочтительно от 2 до 4. Более предпочтительно в этих воплощениях соединяющая единица ( $-\text{Q}^{\text{CO}-}$ ), если она присутствует, имеет следующую структуру:



где волнистая линия рядом с азотом указывает на ковалентное присоединение ко второй спейсерной единице ( $-\text{A}-$ ) и волнистая линия рядом с карбонилем указывает на ковалентное присоединение к первой спейсерной группе, содержащей сахарный фрагмент ( $-\text{G}-$ ).

Более предпочтительно линкер (L) имеет следующую структуру:

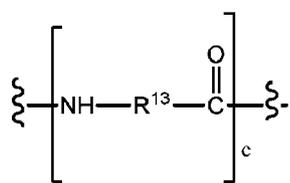


где:

$R^S$  каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $R^S$  независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе;  $M$  каждый независимо является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $M$  представляет собой  $-O-$ ;  $s^*$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе; предпочтительно  $s^*$  составляет 1.

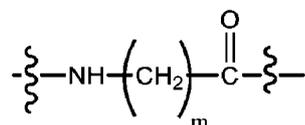
$Q^{CO}$  представляет собой соединяющую единицу, как описано в настоящем документе;  $q$  представляет собой целое число, как описано в настоящем документе, предпочтительно  $q$  составляет 1;

\* обозначает точку присоединения к  $Y$ ; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина ( $-C$ ). В этих воплощениях соединяющая единица ( $Q^{CO}$ ), если она присутствует, может содержать карбонильную группу для соединения с первой спейсерной единицей, содержащей сахарный фрагмент ( $-G-$ ), и  $NH$  группу для соединения со второй спейсерной единицей ( $-A-$ ) и может быть следующей:

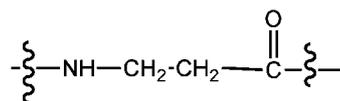


где в каждом случае  $R^{13}$  независимо выбран из группы, состоящей из  $-(C_1-C_6)$ алкилен-,  $-(C_3-C_8)$ карбоцикло-, -арилен-,  $-(C_1-C_{10})$ гетероалкилен-,  $-(C_3-C_8)$ гетероцикло-,  $-(C_1-C_{10})$ алкилен-арилен-, -арилен- $-(C_1-C_{10})$ алкилен-,  $-(C_1-C_{10})$ алкилен- $-(C_3-C_8)$ карбоцикло-,  $-(C_3-C_8)$ карбоцикло- $-(C_1-C_{10})$ алкилен-,  $-(C_1-C_{10})$ алкилен- $-(C_3-C_8)$ гетероцикло- и  $-(C_3-C_8)$ гетероцикло- $-(C_1-C_{10})$ алкилен-, и индекс  $c$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4. В некоторых воплощениях  $R^{13}$  представляет собой  $-(C_1-C_6)$ алкилен, и  $c$

представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4. В предпочтительных воплощениях  $R^{13}$  представляет собой  $-(C_1-C_6)$ алкилен, и  $s$  составляет 1. Предпочтительно в этих воплощениях соединяющая единица  $(-Q^{CO-})$ , если она присутствует, может иметь следующую структуру:

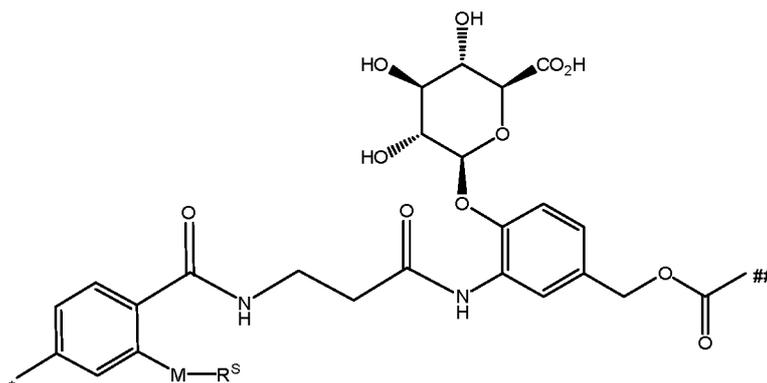


где волнистая линия рядом с азотом указывает на ковалентное присоединение ко второй спейсерной единице  $(-A-)$  и волнистая линия рядом с карбонилем указывает на ковалентное присоединение к первой спейсерной группе, содержащей сахарный фрагмент  $(-G-)$ ; и  $m$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 6, предпочтительно от 2 до 6, более предпочтительно от 2 до 4. Более предпочтительно в этих воплощениях соединяющая единица  $(-Q^{CO-})$ , если она присутствует, имеет следующую структуру:



где волнистая линия рядом с азотом указывает на ковалентное присоединение ко второй спейсерной единице  $(-A-)$  и волнистая линия рядом с карбонилем указывает на ковалентное присоединение к первой спейсерной группе, содержащей сахарный фрагмент  $(-G-)$ .

Еще более предпочтительно линкер L имеет следующую структуру:



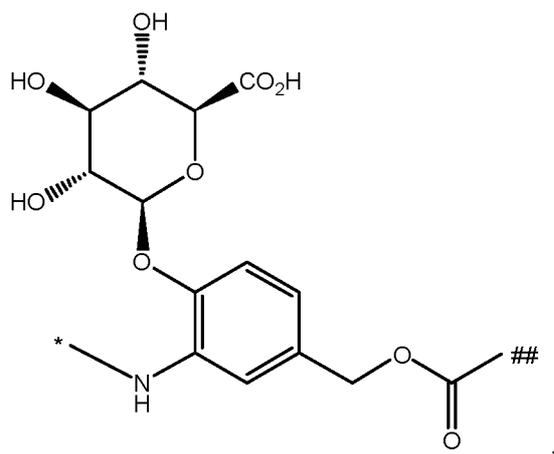
где:

$R^S$  каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно каждый  $R^S$  независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе;  $M$  каждый независимо является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно

каждый М представляет собой -O-; s\* представляет собой целое число, как описано в настоящем документе; предпочтительно s\* составляет 1.

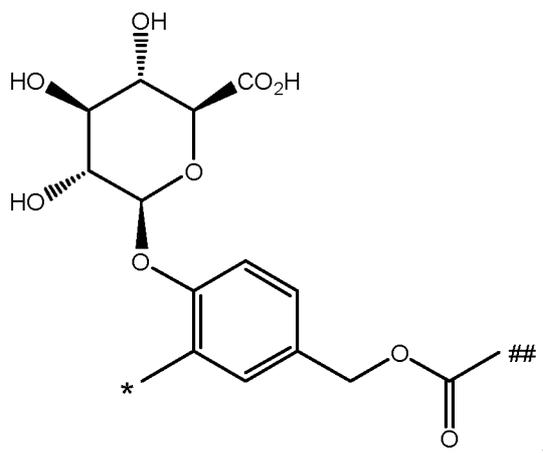
\* обозначает точку присоединения к -Y-; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C).

Также предпочтительно линкер L имеет следующую структуру:



где \* обозначает точку присоединения к -Y-; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C).

В одном воплощении линкер L имеет следующую структуру:



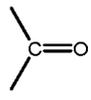
где \* обозначает точку присоединения к -Y-; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C). В этом воплощении Y может быть таким, как определено в настоящем документе; предпочтительно Y может представлять собой NH.

Линкер \*-A<sub>α</sub>-U<sup>AT</sup><sub>u</sub>-Sulf-##

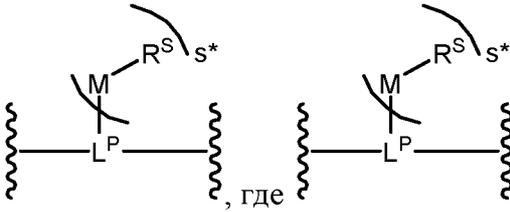
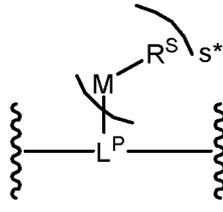
В некоторых воплощениях линкер L имеет следующую структуру: \*-A<sub>α</sub>-U<sup>AT</sup><sub>u</sub>-Sulf-##, где: -A- представляет собой вторую спейсерную единицу; α составляет 0 или 1; каждый -U<sup>AT</sup><sub>u</sub>- независимо представляет собой присоединяющую единицу; u составляет 0 или 1; и -Sulf- представляет собой первую спейсерную единицу, содержащую расщепляемый

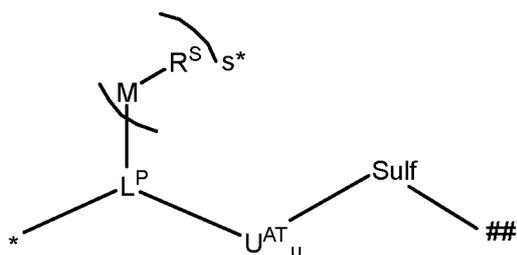
сульфатазой фрагмент; \* обозначает точку присоединения к Y; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C). Относительно расщепляемых сульфатазой линкеров, см., например, Bargh et al., “*Sulfatase-cleavable linkers for antibody-drug conjugates*”, Chemical Science, 2020, 11, 2375-2380, doi: 10,1039/c9sc06410a.

В линкере, имеющем структуру  $*-A_a-U^{AT}_u-Sulf-##$ , вторая спейсерная единица (-A-), если она присутствует, служит для соединения Y с присоединяющей единицей ( $U^{AT}$ ), если она присутствует, или с первой спейсерной единицей, содержащей расщепляемый сульфатазой фрагмент. Вторая спейсерная единица (-A-) может представлять собой химическую группу или фрагмент, который способен связывать Y с присоединяющей единицей ( $U^{AT}$ ). В качестве альтернативы, вторая спейсерная единица (-A-) может связывать Y с первой спейсерной единицей, содержащей расщепляемый сульфатазой фрагмент (-Sulf-), в случае, если присоединяющая единица ( $U^{AT}$ ) отсутствует. В этом отношении Y, как описано в настоящем документе, связан со второй спейсерной единицей (-A-). Вторая спейсерная единица (-A-) содержит или представляет собой функциональную группу, которая способна образовывать связь с присоединяющей единицей ( $-U^{AT}-$ ) или с первой спейсерной единицей, содержащей расщепляемый сульфатазой фрагмент (-Sulf-), в зависимости от того, присутствует присоединяющая единица ( $-U^{AT}-$ ) или нет. Предпочтительно функциональная группа, которая способна образовывать связь с присоединяющей единицей ( $-U^{AT}-$ ) или с первой спейсерной единицей, содержащей расщепляемый сульфатазой фрагмент (-Sulf-), представляет собой

карбонильную группу, которая обозначена, например,  или  $-C(O)-$ . Целое число a, связанное со второй спейсерной единицей, может составлять 0 или 1. Предпочтительно целое число a составляет 1. В качестве альтернативы, в других воплощениях вторая спейсерная единица отсутствует (a = 0).

В линкере  $*-A_a-U^{AT}_u-Sulf-##$ , вторая спейсерная единица -A- может представлять собой вторую спейсерную единицу, как описано в настоящем документе. В некоторых воплощениях вторая спейсерная единица -A-, если она присутствует, может представлять

собой группу Z, имеющую структуру , где  является такой, как описано в настоящем документе. Соответственно, в некоторых воплощениях линкер (L)

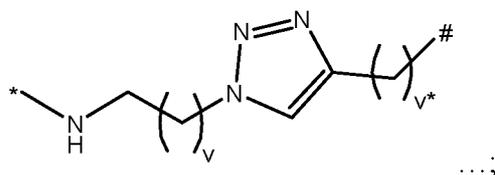


может иметь структуру  $*$ , где  $L^P$ ,  $R^S$ ,  $s^*$ ,  $M$ ,  $U^{AT}$ ,  $u$  и  $Sulf$  имеют значения, определенные в настоящем документе;  $*$  обозначает точку присоединения к  $-Y-$ ; и  $##$  обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина ( $-C$ ).

Присоединяющая единица ( $-U^{AT}-$ ) может быть включена в случаях, когда желательно добавить дополнительное расстояние между  $-Y-$  или, если она присутствует, второй спейсерной единицей ( $-A-$ ) и первой спейсерной единицей, содержащей расщепляемый сульфатазой фрагмент ( $-Sulf-$ ). Соответственно, присоединяющая единица ( $-U^{AT}-$ ), если она присутствует, расширяет структуру линкера ( $-L-$ ). В этом отношении присоединяющая единица ( $-U^{AT}-$ ) может быть ковалентно связана с  $-Y-$  или, когда вторая спейсерная единица  $-A-$  присутствует, со второй спейсерной единицей ( $-A-$ ) на одном конце, и присоединяющая единица ( $-U^{AT}-$ ) ковалентно связана с первой спейсерной единицей, содержащей расщепляемую сульфатазой группу ( $-Sulf-$ ) на другом конце.

Присоединяющая единица ( $-U^{AT}-$ ) может представлять собой химическую группу или фрагмент, который служит для обеспечения присоединения первой спейсерной единицы, содержащей расщепляемый сульфатазой фрагмент, ( $-Sulf-$ ) со второй спейсерной единицей ( $-A-$ ), если она присутствует, или с  $-Y-$ .

В некоторых воплощениях присоединяющая единица ( $U^{AT}$ ) имеет формулу, представленную ниже:

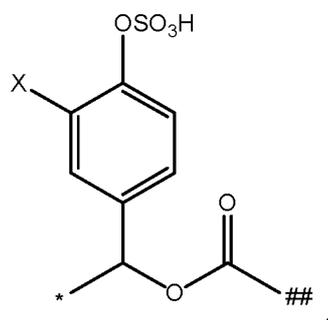


где  $v$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 6; предпочтительно  $v$  составляет 1 или 2; более предпочтительно  $v$  составляет 2; и

$v^*$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 6; предпочтительно  $v^*$  составляет 1 или 2; более предпочтительно  $v^*$  составляет 1;

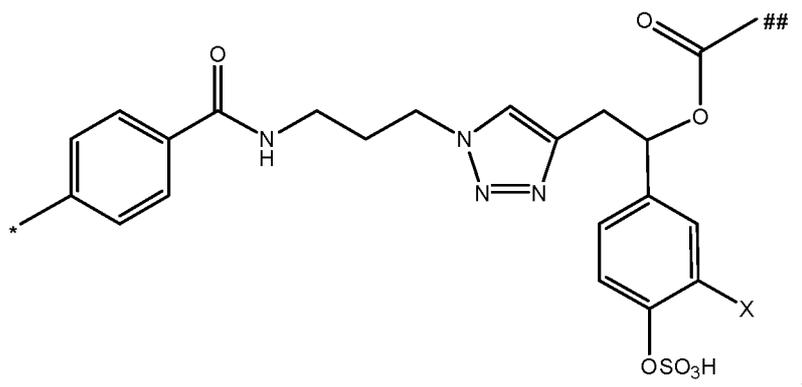
где  $*$  обозначает точку присоединения ко второй спейсерной единице ( $-A-$ ), если она присутствует, и  $\#$  обозначает точку присоединения к расщепляемому сульфатазой фрагменту ( $Sulf$ ).

Предпочтительно первая спейсерная единица, содержащая расщепляемый сульфатазой фрагмент (Sulf), имеет формулы, представленные ниже:



где X представляет собой водород (H) или электроноакцепторную группу, такую как, например, NO<sub>2</sub>; \* обозначает точку присоединения к присоединяющей единице (U<sup>AT</sup>), если она присутствует, или (-A-), если она присутствует, и # обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C).

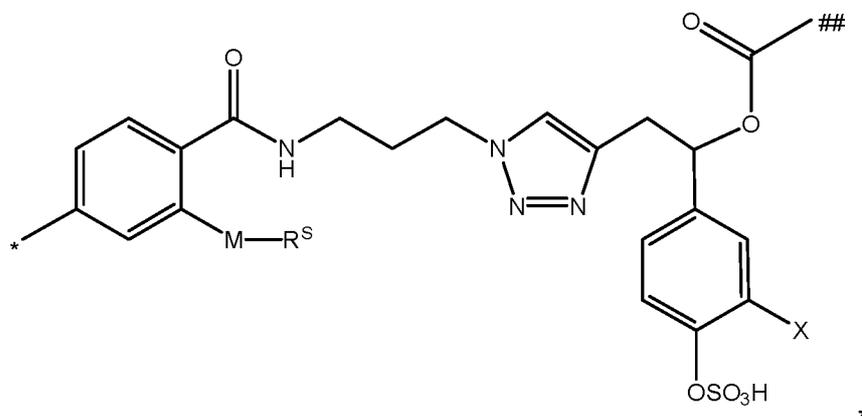
В некоторых воплощениях линкер L может иметь следующую структуру:



где X представляет собой H или NO<sub>2</sub>;

\* обозначает точку присоединения к -Y-; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C).

В некоторых воплощениях линкер L может иметь следующую структуру:



где:

X представляет собой H или NO<sub>2</sub>;

R<sup>S</sup> представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе; предпочтительно R<sup>S</sup> представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу, как описано в настоящем документе;

M является таким, как описано в настоящем документе; предпочтительно M представляет собой -O-;

\* обозначает точку присоединения к -Y-; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C).

### Третья спейсерная единица

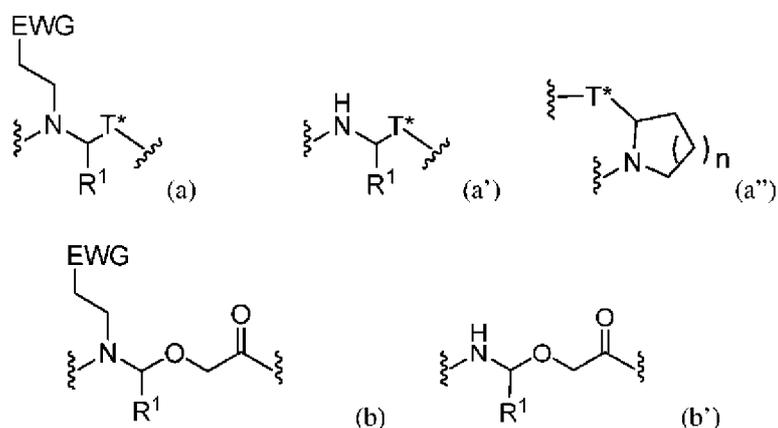
В некоторых воплощениях, когда первая спейсерная единица (-B-) или первая спейсерная единица, содержащая сахарный фрагмент (-G-), или первая спейсерная единица, содержащая расщепляемый сульфатазой фрагмент (Sulf), присутствует, линкер (L) может содержать необязательную третью спейсерную единицу (-E-), которая расположена между первой спейсерной единицей (-B-) или первой спейсерной единицей, содержащей сахарный фрагмент (-G-), или первой спейсерной единицей, содержащей расщепляемый сульфатазой фрагмент (Sulf), и фрагментом камптотецина (-C). Третья спейсерная единица может представлять собой функциональную группу, которая может облегчать присоединение первой спейсерной единицы (-B-) или первой спейсерной единицы, содержащей сахарный фрагмент (-G-), или первой спейсерной единицы, содержащей расщепляемый сульфатазой фрагмент (Sulf), к фрагменту камптотецина (-C), или она может обеспечивать дополнительные структурные компоненты, которые могут способствовать высвобождению фрагмента камптотецина (-C) из оставшейся части конъюгата. Подходящие третьи спейсерные единицы описаны, например, в WO 2019/236954.

В некоторых воплощениях третья спейсерная единица (-E-) связана с первой спейсерной единицей (-B-) и с фрагментом камптотецина (-C). Соответственно, линкер (-L-) может иметь структуру \*-A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>-B<sub>b</sub>-E-##, где -E- представляет собой третью спейсерную единицу, как описано в настоящем документе; где -A-, a, -W-, w и -B- являются такими, как описано в настоящем документе, в частности, что касается линкера (L), имеющего структуру \*-A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>-B<sub>b</sub>-##; b составляет 1; где, в каждом случае, \* обозначает точку присоединения к -Y-; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C).

В других воплощениях третья спейсерная единица (-E-) связана с первой спейсерной единицей, содержащей сахарный фрагмент (-G-) и с фрагментом камптотецина (-C-). Соответственно, линкер (-L-) может иметь структуру  $*-A_a-Q^{CO}_q-G-E-##$ ; где -E- представляет собой третью спейсерную единицу, как описано в настоящем документе; где -A-, а,  $-Q^{CO}$ -, q и G являются такими, как описано в настоящем документе, в частности, что касается линкера (-L-), имеющего структуру  $*-A_a-Q^{CO}_q-G-##$ ; где, в каждом случае, \* обозначает точку присоединения к -Y-; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C).

В других воплощениях третья спейсерная единица (-E-) связана с первой спейсерной единицей, содержащей расщепляемый сульфатазой фрагмент (-Sulf-) и с фрагментом камптотецина (-C-). Соответственно, линкер (-L-) может иметь структуру  $*-A_a-U^{AT}_u-Sulf-E-##$ ; где -E- представляет собой третью спейсерную единицу как описано в настоящем документе; где -A-, а,  $-U^{AT}$ -, u и Sulf являются такими, как описано в настоящем документе, в частности, что касается линкера (-L-), имеющего структуру  $*-A_a-U^{AT}_u-Sulf-##$ ; где, в каждом случае, \* обозначает точку присоединения к -Y-; и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (-C).

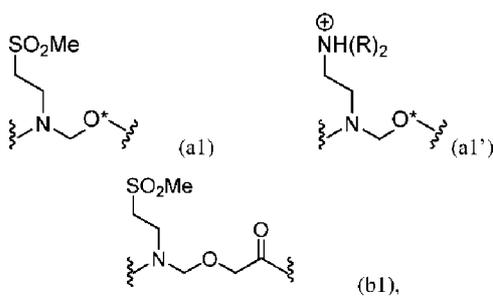
В некоторых воплощениях типичные третьи спейсерные единицы -E- представлены формулами:



где EWG представляет собой электроноакцепторную группу,  $R^1$  представляет собой -H или (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил, и индекс n составляет 1 или 2. В некоторых воплощениях EWG выбрана из группы, состоящей из -CN, -NO<sub>2</sub>, -CX<sub>3</sub>, -X, C(=O)OR', -C(=O)N(R')<sub>2</sub>, -C(=O)R', -C(=O)X, -S(=O)<sub>2</sub>R', -S(=O)<sub>2</sub>OR', -S(=O)<sub>2</sub>NHR', -S(=O)<sub>2</sub>N(R')<sub>2</sub>, -P(=O)(OR')<sub>2</sub>, -P(=O)(CH<sub>3</sub>)NHR', -NO, -N(R')<sub>3</sub><sup>+</sup>, где X представляет собой -F, -Br, -Cl или -I и R' независимо выбран из группы, состоящей из водорода и (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкила, и где волнистая линия рядом с атомом азота в каждой формуле (a), (a'), (a''), (b) и (b') представляет собой точку ковалентного

присоединения к первой спейсерной единице (-B-) и волнистая линия рядом с карбонильным атомом углерода формулы (b) и формулы (b') представляет собой точку ковалентного присоединения к гетероатому гидроксила или первичному или вторичному амину фрагмента камптотецина (-C); и где формула (a), формула (a') и формула (a») представляет собой типичные единицы, в которых T\* представляет собой гетероатом гидроксильной или первичной или вторичной аминной функциональной группы фрагмента камптотецина (-C); и где волнистая линия рядом с T\* представляет собой точку ковалентного присоединения к остатку фрагмента камптотецина. В этих воплощениях третья спейсерная единица -E- может способствовать высвобождению фрагмента камптотецина в виде свободного лекарственного средства.

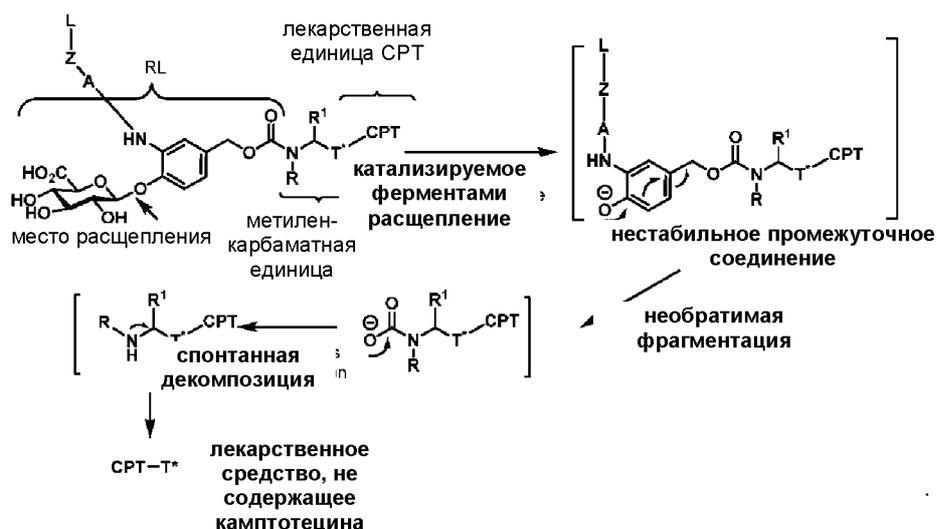
В других воплощениях третьей спейсерные единицы представлены формулами:



где формула (a1) и формула (a1'), в которых каждый R независимо представляет собой -H или (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил, представляют собой единицы, в которых O\* представляет собой атом кислорода из гидроксильного заместителя фрагмента камптотецина (-C); и волнистые линии формулы (a1), формулы (a1') и формулы (b1) сохраняют свои предыдущие значения из формул (a), (a') и (b) соответственно. В формуле (a1') -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(R)<sub>2</sub> фрагмент представляет собой типичные основные единицы в протонированной форме.

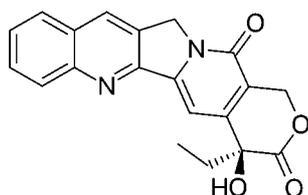
Не ограничиваясь теорией, на схеме 1b показан механизм свободного высвобождения лекарственного средства из фрагмента камптотецина, присоединенного к метилкарбаматной единице, в конъюгате, имеющем саморазрушающийся фрагмент. В этой схеме T\* представляет собой гетероатом от гидроксила или первичного либо вторичного амина фрагмента камптотецина, который включен в метилкарбаматную единицу.

### Схема 1b

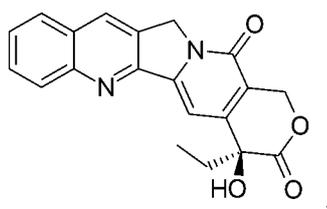


### Фрагмент камптотецина (-С)

Термин «фрагмент камптотецина» включает сам камптотецин и аналоги камптотецина. Камптотецин представляет собой яд топоизомеразы, который был открыт в 1966 году М. Э. Уоллом и М. К. Вани при систематическом скрининге натуральных продуктов на наличие противораковых лекарственных средств. Камптотецин был выделен из коры и стебля *Camptotheca acuminata* (*Camptotheca*, Happy Tree), дерева, произрастающего в Китае и используемого для лечения рака в традиционной китайской медицине. Камптотецин имеет следующую структуру:



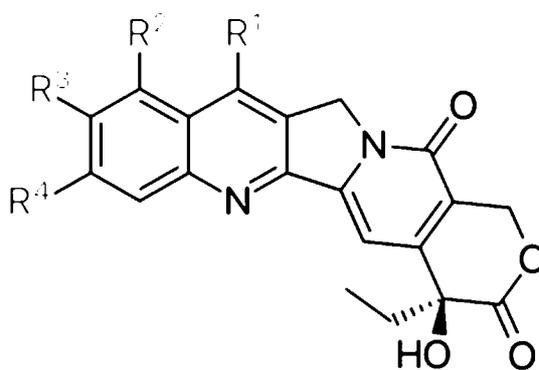
Термин «фрагмент камптотецина» также включает аналоги камптотецина. В этом отношении термин «фрагмент камптотецина» обозначает любой фрагмент, который содержит структуру камптотецина:



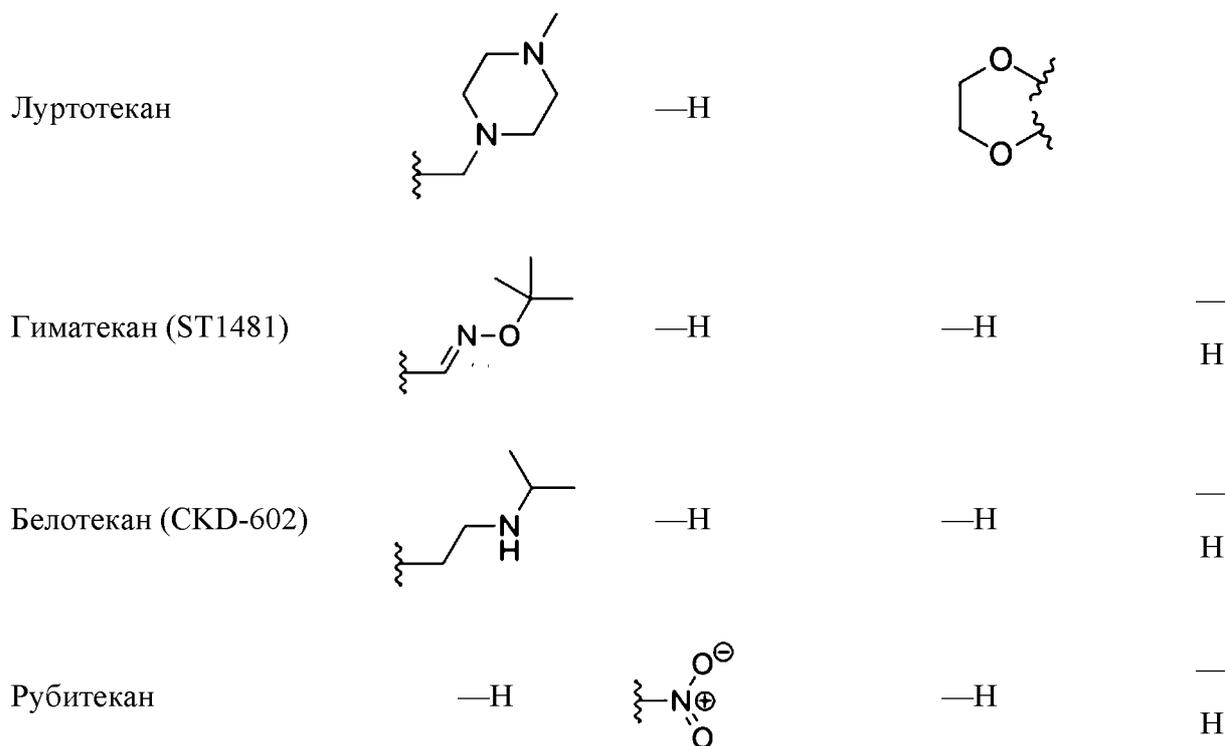
и который может быть возможно замещенным. Возможные заместители могут включать, в качестве иллюстративных неограничивающих примеров, (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)карбоцикло, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)гетероцикло, арил, аминогруппу, гидроксигруппу, карбонильную группу, амидную группу, сложноэфирную группу, карбаматную группу, карбонатную группу и/или

силильную группу. Фрагмент камптотецина может иметь одну или более функциональных групп, которые способны образовывать связь с линкером L. Специалист в данной области техники легко выберет подходящий фрагмент камптотецина, обладающий требуемой биологической активностью. Аналоги камптотецина были одобрены и в настоящее время применяются в химиотерапии рака, среди них, например, топотекан, иринотекан или белотекан.

Следующие аналоги камптотецина также обозначаются термином фрагмент камптотецина:

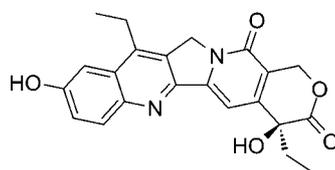


Аналог	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
Топотекан	—H		—OH	— H
Иринотекан (CPT-11)		—H		— H
Силатекан (DB-67, AR-67)		—H	—OH	— H
Коситекан (BNP-1350)		—H	—H	— H
Экзатекан			—CH <sub>3</sub>	—F



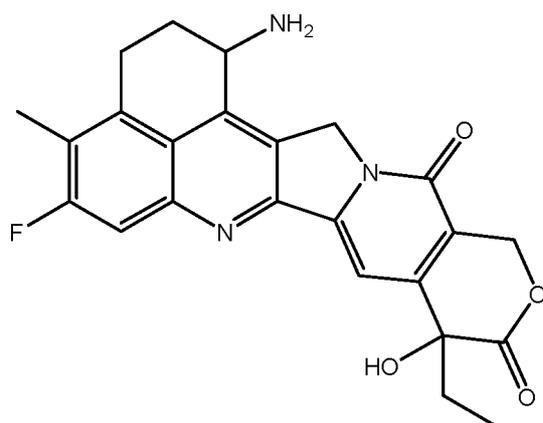
Дополнительные аналоги камптотецина, которые можно применять в качестве фрагмента камптотецина, описаны в WO 2019/236954 и EP 0495432.

В некоторых воплощениях фрагмент камптотецина (С) выбран из группы, состоящей из экзатекана, SN38, камптотецина, топотекана, иринотекана, белокотекана, луртотекана, рубитекана, силатекана, коситекана и гиматекана. Предпочтительно фрагмент камптотецина выбран из группы, состоящей из экзатекана, SN38, камптотецина, топотекана, иринотекана и белотекана. SN38 имеет следующую структуру:

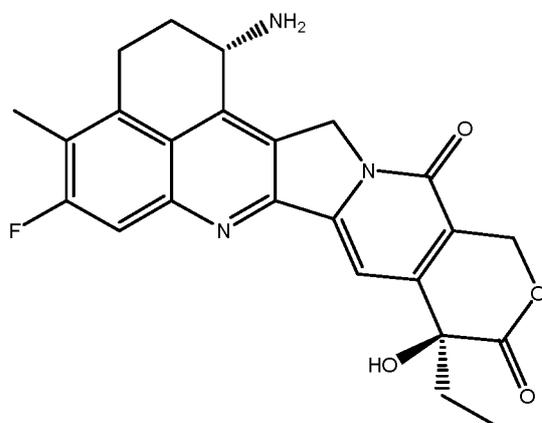


и структуры экзатекана, камптотецина, топотекана, иринотекана и белотекана являются такими, как описано в настоящем документе.

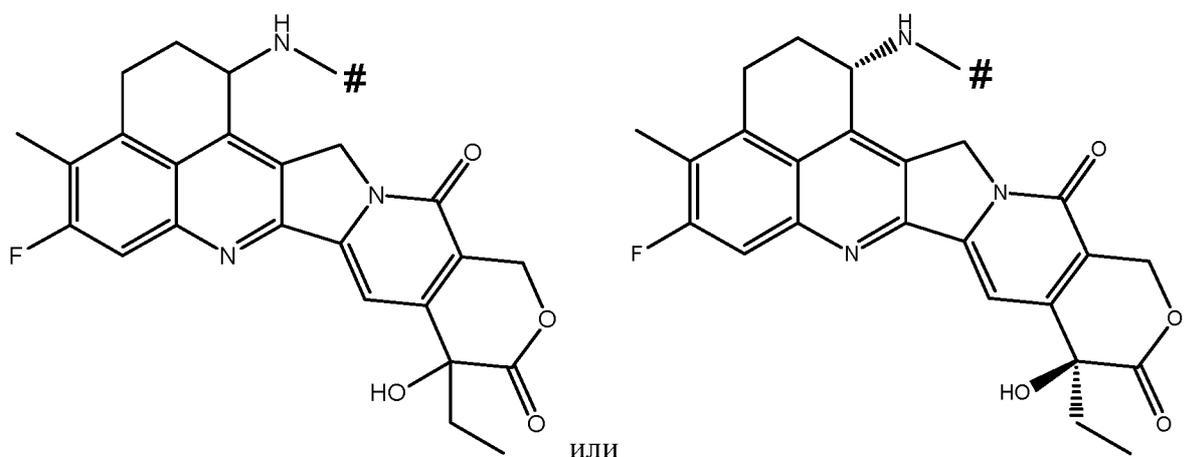
Более предпочтительно в любом из воплощений, описанных в настоящем документе, фрагмент камптотецина С представляет собой экзатекан, имеющий следующую структуру:



Еще более предпочтительно фрагмент камптотецина представляет собой экзатекан, имеющий следующую структуру:

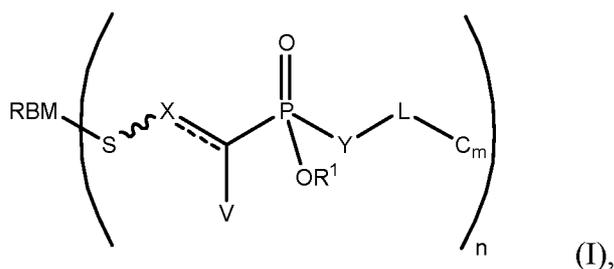


Предпочтительно в любом из этих воплощений экзатекан связан с линкером L через аминогруппу (то есть, через NH<sub>2</sub> группу экзатекана). Экзатекан, связанный с линкером L через аминогруппу, можно изобразить, например, следующим образом:.



где # обозначает точку присоединения к линкеру L.

Настоящее изобретение также относится к конъюгату, имеющему формулу (I):



или его фармацевтически приемлемой соли, или сольвату;

где:

RBM представляет собой антителио;

представляет собой двойную связь; или

представляет собой связь;

V отсутствует, когда представляет собой двойную связь; или

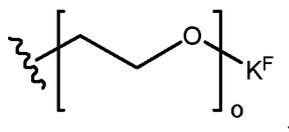
V представляет собой H, когда представляет собой связь;

X представляет собой  $R_3-C$ , когда представляет собой двойную связь; или

X представляет собой  $R_3-\overset{R_4}{\underset{|}{C}}$ , когда представляет собой связь;

Y представляет собой NH;

R<sup>1</sup> представляет собой полиэтиленгликолевую единицу, имеющую структуру:



где:

обозначает положение O;

K<sup>F</sup> является такой, как описано в настоящем документе; предпочтительно K<sup>F</sup> представляет собой H; и

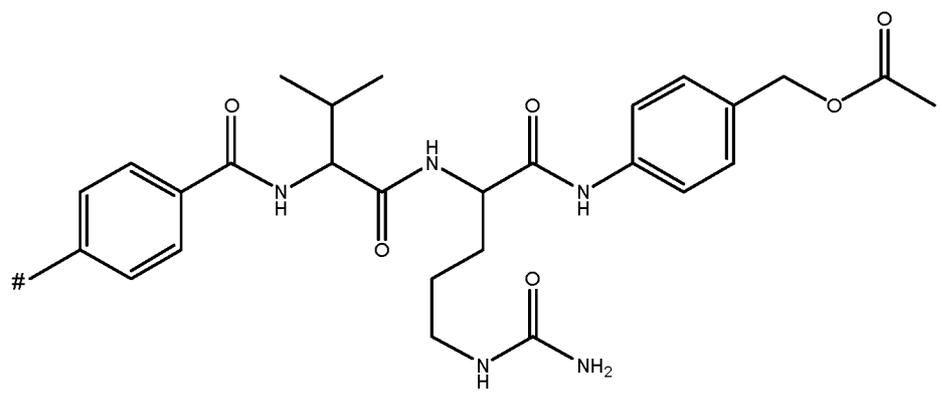
o представляет собой целое число, как описано в настоящем документе; предпочтительно o представляет собой целое число в диапазоне от 8 до 30; более предпочтительно от 16 до 30; еще более предпочтительно от 20 до 28; еще более предпочтительно o составляет 22, 23, 24, 25 или 26; еще более

предпочтительно о составляет 23, 24 или 25; еще более предпочтительно о составляет 24;

R<sup>3</sup> представляет собой H;

R<sup>4</sup> представляет собой H;

L представляет собой линкер, имеющий следующую структуру:



где # обозначает точку присоединения к Y, и \* обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (C);

C представляет собой фрагмент камптотецина;

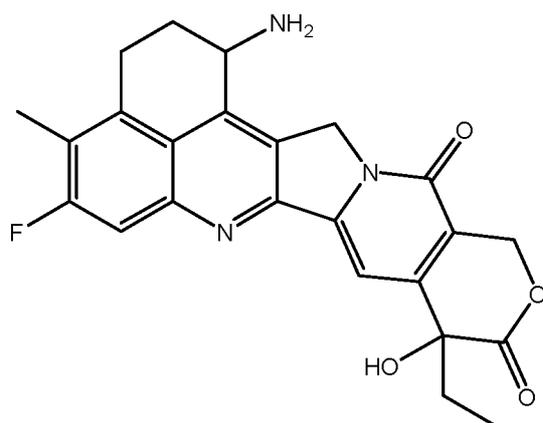
m составляет 1; и

n представляет собой целое число, как описано в настоящем документе;

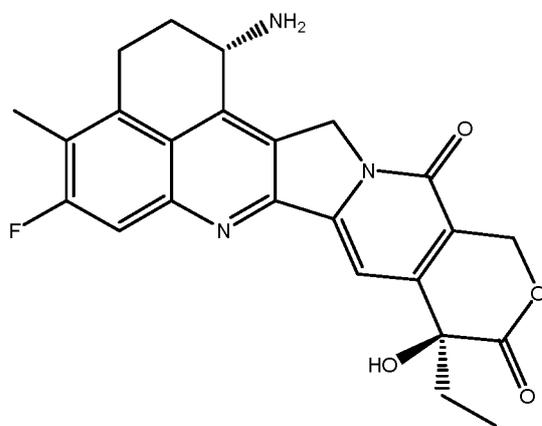
предпочтительно n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10; более предпочтительно от 2 до 10; еще более предпочтительно от 4 до 10; еще более предпочтительно от 6 до 10, еще более предпочтительно от 7 до 10, еще более предпочтительно n составляет 8; или

предпочтительно n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10, более предпочтительно от 2 до 8, еще более предпочтительно от 3 до 6, еще более предпочтительно n составляет 4 или 5, еще более предпочтительно n составляет 4.

Предпочтительно фрагмент камптотецина C представляет собой экзатекан, имеющий следующую структуру:

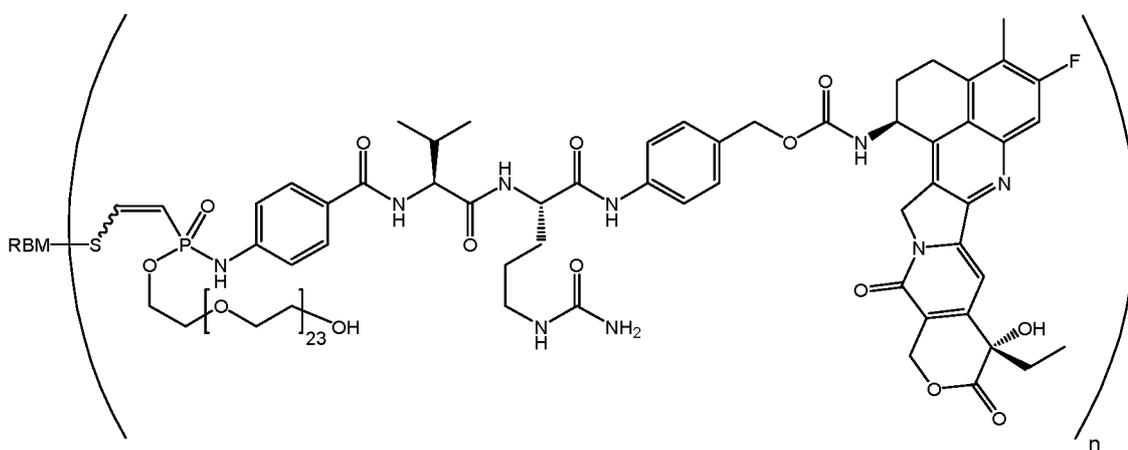


Более предпочтительно фрагмент камптотецина представляет собой экзатекан, имеющий следующую структуру:



Предпочтительно в любом из этих воплощений экзатекан связан с линкером L через аминогруппу.

Настоящее изобретение также относится к конъюгату, имеющему следующую формулу (Ia):



(Ia)

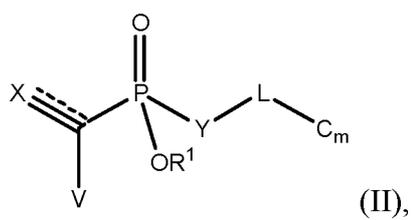
где:

RBM представляет собой антитело; и

n представляет собой целое число, определенное в настоящем документе;  
предпочтительно n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10;  
более предпочтительно от 2 до 10; еще более предпочтительно от 4 до 10; еще  
более предпочтительно от 6 до 10, еще более предпочтительно от 7 до 10, еще  
более предпочтительно n составляет 8; или  
предпочтительно n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10,  
более предпочтительно от 2 до 8, еще более предпочтительно от 3 до 6, еще  
более предпочтительно n составляет 4 или 5, еще более предпочтительно n  
составляет 4.

### Соединение формулы (II)

Настоящее изобретение также относится к соединению, имеющему формулу (II):



или его фармацевтически приемлемой соли, или сольвату,

где:

 представляет собой тройную связь; или

 представляет собой двойную связь;

V отсутствует, когда  представляет собой тройную связь; или

V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, когда  представляет собой двойную связь;

X представляет собой R<sub>3</sub>-C, когда  представляет собой тройную связь; или

X представляет собой  $\begin{matrix} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{matrix}$ , когда  представляет собой двойную связь;

Y представляет собой NR<sup>5</sup>, S, O или CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>;

R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>3</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический или возможно замещенный ароматический остаток;

- $R^4$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^5$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^6$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^7$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический или возможно замещенный ароматический остаток
- L представляет собой линкер;
- C представляет собой фрагмент камптотецина; и
- m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10; и

Предпочтительно  $R^3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно  $R^3$  представляет собой H. Предпочтительно  $R^4$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно  $R^4$ , если он присутствует, представляет собой H. Предпочтительно  $R^5$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно  $R^5$ , если он присутствует, представляет собой H. Предпочтительно  $R^6$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно  $R^6$ , если он присутствует, представляет собой H. Предпочтительно  $R^7$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно  $R^7$ , если он присутствует, представляет собой H.

Предпочтительно  представляет собой тройную связь; V отсутствует; X представляет собой R<sub>3</sub>-C; и  $R^3$  представляет собой H, или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; предпочтительно  $R^3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно  $R^3$  представляет собой H.

Более предпочтительно  представляет собой тройную связь; V отсутствует; X представляет собой R<sub>3</sub>-C и  $R_3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил. Предпочтительно  $R_3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, более предпочтительно H или (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил, еще более предпочтительно H или (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)алкил. Еще более предпочтительно  $R_3$  представляет собой H.

В некоторых воплощениях  может представлять собой двойную связь; V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, предпочтительно V представляет собой H; X

представляет собой  $R_3-\overset{R_4}{\underset{|}{C}}$ ;  $R_3$  представляет собой H, или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; более предпочтительно  $R^3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, более предпочтительно  $R^3$  представляет собой H;  $R^4$  представляет собой H или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; предпочтительно  $R^4$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, предпочтительно  $R^4$  представляет собой H.

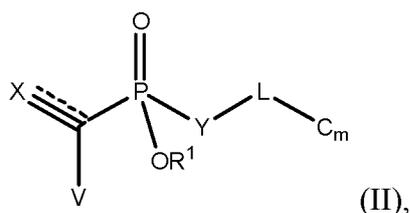
В некоторых воплощениях  может представлять собой двойную связь; V может представлять собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; X может представлять собой  $R_3-\overset{R_4}{\underset{|}{C}}$ ; и  $R_3$  и  $R_4$  могут независимо представлять собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил. Предпочтительно  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляют собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, более предпочтительно H или (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил, еще более предпочтительно H или (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)алкил. Предпочтительно  $R_3$  и  $R_4$  являются одинаковыми; еще более предпочтительно  $R_3$ ,  $R_4$  и V являются одинаковыми. Более предпочтительно  $R_3$  и  $R_4$  оба представляют собой H. Предпочтительно V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, более предпочтительно H или (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил, еще более предпочтительно H или (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)алкил. Еще более предпочтительно V представляет собой H. В предпочтительных воплощениях  $R_3$ ,  $R_4$  и V каждый представляет собой H.

В любом из соединений формулы (II), любая переменная может быть определена, как описано в настоящем документе, в частности, в отношении конъюгатов формулы (I) и/или тиолсодержащей молекулы формулы (III). Соответственно, RBM, , V, X, Y, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, L, C, m и n могут быть такими, как определено в настоящем документе. Предпочтительно Y представляет собой NH.

### Способ получения конъюгата формулы (I)

Настоящее изобретение также относится к способу получения конъюгата формулы (I), где указанный способ включает:

проведение реакции соединения формулы (II)



или его фармацевтически приемлемой соли, или сольвата,

где:

$\equiv$  представляет собой тройную связь; или

$\equiv$  представляет собой двойную связь;

V отсутствует, когда  $\equiv$  представляет собой тройную связь; или

V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, когда  $\equiv$  представляет собой двойную связь;

X представляет собой R<sub>3</sub>-C, когда  $\equiv$  представляет собой тройную связь; или

X представляет собой  $\begin{matrix} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{matrix}$ , когда  $\equiv$  представляет собой двойную связь;

Y представляет собой NR<sup>5</sup>, S, O или CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>;

R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>3</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>4</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>5</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>6</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический, или возможно замещенный ароматический остаток;

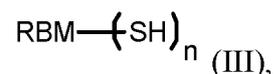
R<sup>7</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический, или возможно замещенный ароматический остаток;

L представляет собой линкер;

C представляет собой фрагмент камптотецина; и

m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10;

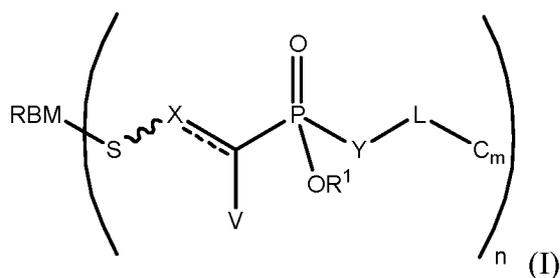
с тиолсодержащей молекулой формулы (III)



где RBM представляет собой рецепторсвязывающую молекулу; и

n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20;

с получением в результате соединения формулы (I)



где:

$\equiv$  представляет собой двойную связь, когда  $\equiv$  в соединении формулы (II) представляет собой тройную связь; или

$\equiv$  представляет собой связь, когда  $\equiv$  в соединении формулы (II) представляет собой двойную связь;

V отсутствует, когда  $\equiv$  представляет собой двойную связь; или

V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, когда  $\equiv$  представляет собой связь;

X представляет собой R<sub>3</sub>-C, когда  $\equiv$  представляет собой двойную связь; или

X представляет собой  $\begin{matrix} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{matrix}$ , когда  $\equiv$  представляет собой связь;

Y представляет собой NH, S, O или CH<sub>2</sub>;

R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>3</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>4</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>5</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>6</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>7</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический или возможно замещенный ароматический остаток;

L представляет собой линкер;

- С представляет собой фрагмент камптотецина;  
 m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10; и  
 n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20.

Предпочтительно  $R^3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно  $R^3$  представляет собой H. Предпочтительно  $R^4$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно  $R^4$ , если он присутствует, представляет собой H. Предпочтительно  $R^5$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно  $R^5$ , если он присутствует, представляет собой H. Предпочтительно  $R^6$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно  $R^6$ , если он присутствует, представляет собой H. Предпочтительно  $R^7$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно  $R^7$ , если он присутствует, представляет собой H.

Предпочтительно  представляет собой тройную связь; V отсутствует; X представляет собой  $R_3-C$ ; и  $R^3$  представляет собой H, или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; предпочтительно  $R^3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно  $R^3$  представляет собой H; и  представляет собой двойную связь.

Более предпочтительно  представляет собой тройную связь; V отсутствует; X представляет собой  $R_3-C$ ,  $R_3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; и  представляет собой двойную связь. Предпочтительно  $R_3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)алкил, более предпочтительно H или (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)алкил, еще более предпочтительно H или (C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)алкил. Еще более предпочтительно  $R_3$  представляет собой H.

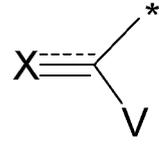
В некоторых воплощениях  может представлять собой двойную связь; V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, предпочтительно V представляет собой H; X

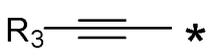
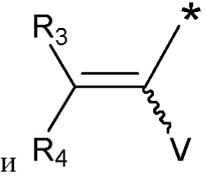
представляет собой  $R_3-\overset{R_4}{C}$ ;  $R_3$  представляет собой H, или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; и  может представлять собой связь; более предпочтительно  $R^3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, более предпочтительно  $R^3$  представляет собой H;  $R^4$  представляет собой H, или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический

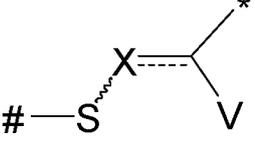
остаток; предпочтительно  $R^4$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил, предпочтительно  $R^4$  представляет собой H.

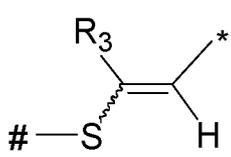
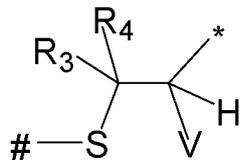
В некоторых воплощениях  может представлять собой двойную связь; V может представлять собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил; X может представлять собой  $R_3-\overset{R_4}{\underset{|}{C}}$ ; R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> могут независимо представлять собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил; и  может представлять собой связь. Предпочтительно R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> независимо представляют собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, более предпочтительно H или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил, еще более предпочтительно H или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-алкил. Предпочтительно R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> являются одинаковыми; еще более предпочтительно R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> и V являются одинаковыми. Более предпочтительно R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> оба представляют собой H. Предпочтительно V представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил, более предпочтительно H или C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкил, еще более предпочтительно H или C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-алкил. Еще более предпочтительно V представляет собой H. В предпочтительных воплощениях R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> и V каждый представляет собой H.

Что касается представлений  и  в контексте настоящего описания, следует отметить, что как общеизвестно специалистам в данной области техники, каждый атом

углерода является четырехвалентным. Соответственно, структура , где X и V имеют значения, определенные в настоящем документе и звездочка (\*) указывает

присоединение к фосфору, включает структуры  и , где R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>

и V имеют значения, определенные в настоящем документе. Структура , где X и V имеют значения, определенные в настоящем документе, звездочка (\*) указывает присоединение к фосфору и # указывает присоединение к рецепторсвязывающей молекуле

(RBM), включает структуры  и , где R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> и V имеют значения, определенные в настоящем документе и H представляет собой водород. Волнистая связь указывает на то, что конфигурация двойной связи может быть E или Z. Также возможно, что соединение присутствует в виде смеси изомеров E и Z.

Когда рецепторсвязывающая молекула содержит один или более дисульфидных мостиков, как например представляет собой антитело, способ может дополнительно включать восстановление по меньшей мере одного дисульфидного мостика рецепторсвязывающей молекулы в присутствии восстанавливающего агента с образованием тиоловой группы (SH). Полученное соединение формулы (III) затем можно подвергнуть взаимодействию с соединением формулы (II) с получением конъюгата формулы (I). Восстанавливающий агент может быть выбран из группы, состоящей из трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР), дитиотреитола (ДТТ), дитионита натрия, тиосульфата натрия и сульфита натрия. Соответственно, восстанавливающим агентом может быть дитиотреитол (ДТТ). Восстанавливающим агентом может быть дитионит натрия. Восстанавливающим агентом может быть сульфит натрия. Предпочтительно восстанавливающим агентом является трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР).

Предпочтительно восстановление по меньшей мере одного дисульфидного мостика включает использование от примерно 1 до примерно 3 эквивалентов, предпочтительно от примерно 1 до примерно 2 эквивалентов, более предпочтительно примерно 1 эквивалент восстанавливающего агента на 1 восстанавливаемый дисульфидный мостик. В этом контексте отмечается, что теоретически 1 эквивалент восстанавливающего агента, в частности, восстанавливающего агента, описанного в настоящем документе, необходимо для восстановления 1 дисульфидного мостика с образованием 2 тиоловых групп (SH).

Предпочтительно тиолсодержащую молекулу формулы (III) подвергают реакции с от примерно 1 до примерно 4 эквивалентами, предпочтительно от примерно 1 до примерно 3 эквивалентами, более предпочтительно от примерно 1 до примерно 2 эквивалентами, еще более предпочтительно примерно 1,5 эквивалентами соединения формулы (II) на тиоловую группу (SH).

Предпочтительно реакцию соединения формулы (II) с тиолсодержащей молекулой формулы (III) проводят в водной среде.

Предпочтительно реакцию соединения формулы (II) с тиолсодержащей молекулой формулы (III) проводят при нейтральном pH или в слабощелочных условиях. Еще более предпочтительно реакцию проводят при pH от 6 до 10. Еще более предпочтительно реакцию проводят при pH от 7 до 9.

В любом из способов любая переменная может быть определена, как описано в настоящем документе, в частности, в отношении конъюгатов формулы (I) и/или соединения

формулы (II). Соответственно, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, L, C, m и n могут быть такими, как определено в настоящем документе. Предпочтительно Y представляет собой NH.

Способы получения соединений формулы (II) известны в данной области техники. В качестве иллюстративных примеров соединения формулы (II), в которых группа Y представляет собой NH, могут быть получены с использованием таких методик и условий, как например фосфонитная реакция Штаудингера, как, например, описано в WO 2018/041985 A1, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. Соединения формулы (II), где Y представляет собой S или O, могут быть получены с использованием таких методик и условий, как, например, описано в WO 2019/170710, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. Аналогично соединениям формулы (I), где Y представляет собой S или O, как описано в WO 2019/170710, соединения формулы (II), где Y представляет собой CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>, могут быть получены, в качестве иллюстративных примеров, путем замещения у атома фосфора, используя, например, подходящее металлоорганическое соединение, такое как, например, соединение Гриньяра или литийорганическое соединение. Специалист в данной области техники легко выберет подходящие способы и условия для получения соединений формулы (II). Раздел «Примеры» настоящего изобретения также содержит указания о том, как получить соединения формулы (II) и/или конъюгаты формулы (I).

Настоящее изобретение также относится к конъюгату формулы (I), который можно получить любым способом получения конъюгата формулы (I), как описано в настоящем документе.

#### **Фармацевтическая композиция**

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгат формулы (I).

Фармацевтическая композиция может содержать популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу в композиции составляет от более чем 0 до примерно 14, предпочтительно от примерно 1 до примерно 14, более предпочтительно от примерно 2 до примерно 14, еще более предпочтительно от примерно 4 до примерно 14, еще более предпочтительно от примерно 5 до примерно 12, еще более предпочтительно от примерно 6 до примерно 12, еще более предпочтительно от примерно 6 до примерно 10, даже более предпочтительно примерно 8. Соответственно, фармацевтическая композиция может содержать популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу в композиции составляет от более чем 0 до примерно 14. Предпочтительно фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу в композиции составляет от примерно 1 до примерно 14. Более предпочтительно фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу в композиции составляет от примерно 2 до примерно 14. Еще более предпочтительно фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу в композиции составляет от примерно 4 до примерно 14. Еще более предпочтительно фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу в композиции составляет от примерно 5 до примерно 12. Еще более предпочтительно фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу в композиции составляет от примерно 6 до примерно 12. Еще более предпочтительно фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу в композиции составляет от примерно 6 до примерно 10. Еще более предпочтительно фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу в композиции составляет примерно 8. Когда в некоторых предпочтительных воплощениях рецепторсвязывающая молекула представляет собой антитело или фрагмент антитела, такое среднее число также обозначается как «среднее отношение лекарственного средства к антителу (DARav)». В этом контексте специалист в

данной области техники понимает, что композиция может содержать популяцию конъюгатов, которые могут различаться по количеству фрагментов камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу, и которые возможно также могут содержать неконъюгированную рецепторсвязывающую молекулу, так что результат представляет собой среднее число фрагментов камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу.

Фармацевтическая композиция может содержать популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина  $C$  на рецепторсвязывающую молекулу составляет от более чем 0 до примерно 14, предпочтительно от примерно 1 до примерно 14, более предпочтительно от примерно 1 до примерно 12, еще более предпочтительно от примерно 2 до примерно 10, еще более предпочтительно от примерно 2 до примерно 8, еще более предпочтительно от примерно 2 до примерно 6, еще более предпочтительно от примерно 3 до примерно 5, еще более предпочтительно примерно 4. Соответственно, фармацевтическая композиция может содержать популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина  $C$  на рецепторсвязывающую молекулу составляет от более чем 0 до примерно 14. Предпочтительно фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина  $C$  на рецепторсвязывающую молекулу составляет от примерно 1 до примерно 14. Более предпочтительно фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина  $C$  на рецепторсвязывающую молекулу составляет от примерно 1 до примерно 12. Еще более предпочтительно фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина  $C$  на рецепторсвязывающую молекулу составляет от примерно 2 до примерно 10. Еще более предпочтительно фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина  $C$  на рецепторсвязывающую молекулу составляет от примерно 2 до примерно 8. Еще более предпочтительно фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина  $C$  на рецепторсвязывающую молекулу составляет от примерно 2 до примерно 6. Еще более предпочтительно фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина  $C$  на рецепторсвязывающую молекулу составляет от примерно 3 до примерно 5. Еще более предпочтительно фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата формулы (I), где среднее число фрагментов камптотецина  $C$  на рецепторсвязывающую молекулу составляет примерно 4. Когда в некоторых

предпочтительных воплощениях рецепторсвязывающая молекула представляет собой антитело или фрагмент антитела, такое среднее число также обозначается как «среднее отношение лекарственного средства к антителу (DARav)».

Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать один или более фармацевтически приемлемых носителей. В конкретном воплощении термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим органом или другой общепризнанной фармакопеей для применения у животных и, более конкретно, у людей. Фармацевтически приемлемые носители хорошо известны в данной области техники и включают, например, водные растворы, такие как вода, 5% декстроза или физиологический буферный раствор, или другие растворители или носители, такие как гликоли, глицерин, масла, такие как оливковое масло, или органические сложные эфиры для инъекций, которые подходят для введения человеку или субъекту, не являющемуся человеком. Конкретные примеры фармацевтически приемлемых носителей включают (биоразлагаемые) липосомы; микросферы, изготовленные из биоразлагаемого полимера поли(D,L-молочной-со-гликолевой кислоты) (PLGA), микросферы альбумина; синтетические полимеры (растворимые); нановолокна, комплексы белок-ДНК; белковые конъюгаты; эритроциты; или виросомы. Различные лекарственные формы на основе носителя включают твердые липидные наночастицы (SLN), полимерные наночастицы, керамические наночастицы, наночастицы гидрогеля, сополимеризованные пептидные наночастицы, нанокристаллы и наносuspензии, нанокристаллы, нанотрубки и нанопроволоки, функционализированные наноносители, наносферы, нанокапсулы, липосомы, липидные эмульсии, липидные микротрубочки/микроцилиндры, липидные микропузырьки, липосферы, липополиплексы, обратные липидные мицеллы, дендримеры, этосомы, мультикомпонитные ультратонкие капсулы, аквакомы, фармакомы, коллоидосомы, ниосомы, дискомы, прониосомы, микросферы, микроэмульсии и полимерные мицеллы. Другие подходящие фармацевтически приемлемые носители и наполнители описаны, среди прочего, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 15<sup>th</sup> Ed., Mack Publishing Co., New Jersey (1991) и Bauer et al., Pharmazeutische Technologie, 5<sup>th</sup> Ed., Govi-Verlag Frankfurt (1997). См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> edition; Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемый носитель или композиция являются стерильными. Фармацевтическая композиция может содержать, помимо активного агента, физиологически приемлемые соединения, которые действуют, например,

как агенты-наполнители, наполнители, солюбилизаторы, стабилизаторы, осмотические агенты, усилители поглощения и т. д. Физиологически приемлемые соединения включают, например, углеводы, такие как глюкоза, сахароза, лактоза; декстраны; полиолы, такие как маннит; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион; консерванты; хелатирующие агенты; буферы; или другие стабилизаторы или эксципиенты.

Выбор фармацевтически приемлемого носителя(ей) и/или физиологически приемлемого соединения(й) может зависеть, например, от природы активного агента, например, растворимости, совместимости (это означает, что вещества могут присутствовать вместе в композиции без взаимодействия таким образом, который существенно снизил бы фармацевтическую эффективность фармацевтической композиции в ситуациях обычного применения) и/или путей введения композиции.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут содержать терапевтически эффективное количество конъюгата формулы (I), описанного в настоящем документе, и могут быть в различной форме, например в твердой, жидкой, газообразной или лиофилизированной форме и могут быть, среди прочего, в форме мази, крема, трансдермальных пластырей, геля, порошка, таблетки, раствора, аэрозоля, гранул, пилюль, суспензий, эмульсий, капсул, сиропов, жидкостей, эликсиров, экстрактов, настоек или жидких экстрактов или в форме, которая особенно подходит для местного или перорального применения. Для введения конъюгата формулы (I) применимы различные пути, включая, помимо прочего, пероральный, местный, чрескожный, подкожный, внутривенный, внутривнутрибрюшинный, внутримышечный или внутриглазной пути. Однако при желании специалист в данной области техники может легко выбрать любой другой путь.

#### **Применение в способах лечения**

Как показано в примерах, конъюгаты формулы (I) согласно настоящему изобретению можно использовать для лечения, в частности, лечения рака. Соответственно, настоящее изобретение дополнительно относится к конъюгату формулы (I) согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения заболевания, возможно включающему введение эффективного количества конъюгата согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению субъекту или пациенту, нуждающемуся в этом. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения заболевания, возможно включающему введение эффективного количества конъюгата согласно настоящему изобретению или

фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению субъекту или пациенту, нуждающемуся в этом. Заболевание может быть связано со сверхэкспрессией CD30. Заболевание может быть связано со сверхэкспрессией Her2. Заболевание может представлять собой рак. Рак может представлять собой солидную опухоль. Заболевание может представлять собой рак, связанный со сверхэкспрессией CD30. Заболевание может представлять собой рак, связанный со сверхэкспрессией Her2.

Настоящее изобретение также относится к применению конъюгата формулы (I) согласно настоящему изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания. Настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания. Заболевание может быть связано со сверхэкспрессией CD30. Заболевание может быть связано со сверхэкспрессией Her2. Заболевание может представлять собой рак. Рак может представлять собой солидную опухоль. Заболевание может представлять собой рак, связанный со сверхэкспрессией CD30. Заболевание может представлять собой рак, связанный со сверхэкспрессией Her2.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения заболевания, включающему введение эффективного количества конъюгата формулы (I) согласно настоящему изобретению субъекту или пациенту, нуждающемуся в этом. Настоящее изобретение также относится к способу лечения заболевания, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению субъекту или пациенту, нуждающемуся в этом. Заболевание может быть связано со сверхэкспрессией CD30. Заболевание может быть связано со сверхэкспрессией Her2. Заболевание может представлять собой рак. Рак может представлять собой солидную опухоль. Заболевание может представлять собой рак, связанный со сверхэкспрессией CD30. Заболевание может представлять собой рак, связанный со сверхэкспрессией Her2.

Фраза «эффективное количество» в целом относится к количеству терапевтического агента (например, конъюгата согласно настоящему изобретению), которое при использовании отдельно или в комбинации с другим терапевтическим агентом защищает субъекта от возникновения заболевания или способствует регрессии заболевания, о чем свидетельствует уменьшение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или предупреждение нарушений или инвалидности вследствие заболевания. Способность терапевтического агента способствовать регрессу заболевания можно оценить с помощью различных способов,

известных практикующему врачу, например, на людях во время клинических испытаний, на животных модельных системах, прогнозирующих эффективность у людей, или путем анализа активности терапевтического агента в анализах *in vitro*. Точное количество будет зависеть от цели лечения и может быть установлено специалистом в данной области техники с использованием известных методов (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Кроме того, настоящее изобретение относится к конъюгату формулы (I), как описано в настоящем документе, для применения в способе лечения рака у пациента. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, для применения в способе лечения рака у пациента. Термин «пациент» означает согласно настоящему изобретению человека, примата, отличного от человека, или другое животное, в частности млекопитающее, такое как корова, лошадь, свинья, овца, коза, собака, кошка или грызун, такой как мышь и крыса. В особенно предпочтительном воплощении пациентом является человек. Если не указано иное, термины «пациент» или «субъект» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Термин «лечение» во всех его грамматических формах включает терапевтическое или профилактическое лечение. «Терапевтическое или профилактическое лечение» включает профилактическое лечение, направленное на полное предотвращение клинических и/или патологических проявлений, или терапевтическое лечение, направленное на улучшение или ремиссию клинических и/или патологических проявлений. Таким образом, термин «лечение» также включает облегчение или предупреждение заболеваний.

Конъюгат формулы (I) согласно настоящему изобретению можно вводить в любой дозе, которая является терапевтически эффективной. Верхний предел обычно представляет собой дозу, которую еще можно безопасно вводить с точки зрения побочных эффектов. В качестве иллюстративных примеров конъюгат согласно настоящему изобретению можно вводить в (эффективной) дозе 20 мг/кг, 18 мг/кг, 16 мг/кг, 14 мг/кг, 12 мг/кг, 10 мг/кг, 9 мг/кг, 8 мг/кг, 7 мг/кг, 6 мг/кг, 5 мг/кг, 4 мг/кг, 3 мг/кг, 2 мг/кг, 1 мг/кг, 0,5 мг/кг или 0,25 мг/кг. Эту дозу можно вводить в течение определенного периода времени, например, в течение трех-четырех недель (от 21 дня до 28 дней), периода, который также называется «циклом лечения». Такой цикл лечения может повторяться в зависимости от прогрессирования или регресса заболевания, то есть результата лечения. В качестве одного из показательных примеров конъюгат формулы (I) можно вводить в количествах, которые, например, рекомендуются для Enhertu для лечения взрослых пациентов с неоперабельным

или метастатическим HER2-положительным раком молочной железы. При этом показании рекомендуемая доза Enhertu составляет 5,4 мг/кг в виде внутривенной инфузии один раз каждые 3 недели (21-дневный цикл) до прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности. В таком цикле лечения конъюгат можно вводить аналогично или таким же способом, как Enhertu, то есть при первой инфузии, при которой конъюгат инфузируют в течение 90 минут, и при последующей инфузии, при которой конъюгат вводят в течение 30 минут, если предшествующие инфузии были хорошо переносимы. В соответствии с этим конъюгат согласно настоящему изобретению можно вводить пациенту любым подходящим способом, например, путем инъекции или инфузии, такой как внутривенная инфузия. В частности, конъюгат согласно настоящему изобретению можно вводить в (эффективной) дозе 5 мг/кг в виде внутривенной инфузии, например, один раз в три недели.

Термин «рак», используемый в настоящем документе, может обозначать любой рак, например, предпочтительно указанный рак выбран из группы, состоящей из: рака молочной железы, рака головы и шеи, рака яичников, рака эндометрия, рака шейки матки, рака прямой кишки, рака толстой кишки, рака пищевода, рака желудка, рака легкого, рака почки, рака надпочечников, рака мочевого пузыря, рака печени, саркомы, рака головного мозга, рака невусов и меланомы, рака мочеполовой системы, рака предстательной железы, плоскоклеточной карциномы вульвы, рака ротоглотки, рака эндокринной железы, рака грудной клетки, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, холангиокарциномы, рака крови, ретинобластомы, рака щитовидной железы, рака фаллопиевых труб; более предпочтительно чтобы указанный рак представлял собой солидный рак, например, выбранный из группы, состоящей из: рака молочной железы, рака головы и шеи, рака яичников, рака эндометрия, рака матки (например, включая рак мышечных пластинок), рака шейки матки, рака прямой кишки, рака толстой кишки, анального рака, рака пищевода, рака желудка, рака легкого, рака почки, рака надпочечников, рака мочевого пузыря, рака печени, саркомы (например, включая остеосаркому и саркому Капоши), рака головного мозга (например, включая опухоль(и) гипофиза), рака невусов и меланомы, рака кожи (например, включая плоскоклеточную карциному и меланому), рака мочеполовой системы (например, рака мочеочника и мочевого пузыря, рак яичка, рак предстательной железы, рак полового члена), рака предстательной железы, плоскоклеточной карциномы вульвы, рака ротоглотки, рака эндокринной железы, рака грудной клетки, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, холангиокарциномы, рака крови (например, включая лимфому, лейкоз, миелому, миелодиспластические синдромы, миелофиброз), рака глаза (например,

включая ретинобластому), нейроэндокринных опухолей, рака неизвестного первичного происхождения (CUP). Предпочтительно указанный рак представляет собой солидный и/или метастатический рак, дополнительно более предпочтительно указанный рак выбран из группы, состоящей из: рака легкого, рака яичников, рака щитовидной железы, неплоскоклеточной немелкоклеточной карциномы легкого, немущинозной карциномы яичников, папиллярного рака щитовидной железы, рака почки, рака эндометрия, рака матки, рака мочеочника, рака мочевого пузыря и рака фаллопиевых труб. Указанный рак также может быть выбран из группы, состоящей из рака у подростков, аденокортикальной карциномы, анального рака, астроцитом, атипичной тератоидной/рабдоидной опухоли, базальноклеточной карциномы, рака желчных протоков, рака мочевого пузыря, рака кости, опухолей головного мозга, рака молочной железы, бронхиальных опухолей, рака шейки матки, хордомы, хронических миелопролиферативных новообразований, колоректального рака, краниофарингиомы, эмбриональных опухолей, медуллобластомы и других, относящихся к центральной нервной системе, детского рака (рака головного мозга), рака эндометрия (рака матки), эпендимомы, детского рака (рака головного мозга), рака пищевода, эстезионеробластомы (рака головы и шеи), саркомы Юинга (рака кости), экстракраниальной герминогенной опухоли, детского рака, внегонадной герминогенной опухоли, рака фаллопиевых труб, рака желчного пузыря, рака желудочно-кишечного тракта (рака желудка), карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта, стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта (GIST), гестационной трофобластической болезни, рака головы и шеи, опухолей сердца, гепатоцеллюлярного рака (рака печени), гистиоцитоза, клеток Лангерганса, рака гортаноглотки (рака головы и шеи), внутриглазной меланомы, опухолей островковых клеток, нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы, саркомы Капоши (саркомы мягких тканей), рака почки (почечноклеточного рака), гистиоцитоза из клеток Лангерганса, рака гортани (рака головы и шеи), рака губы и полости рта (рака головы и шеи), рака печени, рака легкого, рака молочной железы у мужчин, меланомы, меланомы, внутриглазного рака (рака глаз), карциномы клеток Меркеля (рака кожи), мезотелиомы, злокачественной опухоли, рака ротовой полости (рака головы и шеи), синдромов множественной эндокринной неоплазии, рака полости носа и околоносовых пазух (рака головы и шеи), рака носоглотки (рака головы и шеи), нейробластомы, немелкоклеточного рака легкого, рака полости рта, рака губы и рака полости рта и рака ротоглотки (рака головы и шеи), остеосаркомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, папилломатоза (рака гортани у детей), параганглиомы, рака околоносовых пазух и

рака полости носа (рака головы и шеи), рака паращитовидной железы, рака полового члена, рака глотки (рака головы и шеи), феохромоцитомы, опухоли гипофиза, плевропульмональной бластомы (рака легкого), первичной лимфомы центральной нервной системы (ЦНС), первичного рака брюшины, рака предстательной железы, воспалительной миофибробластной опухоли легкого (рака легкого), рака прямой кишки, почечно-клеточного рака (рака почки), ретинобластомы, рабдомиосаркомы, детского рака (саркомы мягких тканей), рака слюнной железы (рака головы и шеи), рака кожи, мелкоклеточного рака легкого, рака тонкого кишечника, саркомы мягких тканей, плоскоклеточной карциномы кожи – см. рак кожи, плоскоклеточного рака шеи со скрытым первичным раком, метастатического рака (рака головы и шеи), рака желудка (желудочно-кишечного тракта), рака яичка, тимомы и карциномы вилочковой железы, рака щитовидной железы, трахеобронхиальных опухолей (рака легкого), переходно-клеточного рака почечной лоханки и мочеточника (рака почки (почечно-клеточного рака)), рака мочеточника и почечной лоханки, переходно-клеточного рака (почечно-клеточного рака), рака уретры, рака матки, рака эндометрия, саркомы матки, рака влагалища, сосудистых опухолей (саркомы мягких тканей), рака вульвы, опухоли Вильмса и других детских опухолей почек.

Под «опухолью» подразумевают группу клеток или тканей, которая образуется в результате неправильно регулируемой клеточной пролиферации, в частности рака. Опухоли могут демонстрировать частичное или полное отсутствие структурной организации и функциональной координации с нормальной тканью и обычно образуют отчетливую массу ткани, которая может быть как доброкачественной, так и злокачественной. В частности, термин «опухоль» относится к злокачественной опухоли. Термин «опухоль» может относиться к солидной опухоли. Согласно одному воплощению термин «опухоль» или «опухолевая клетка» также относится к несолидным ракам и клеткам несолидных раков, таким как клетки лейкоза. Согласно другому воплощению соответствующие несолидные раковые опухоли или их клетки не охватываются терминами «опухоль» и «опухолевая клетка».

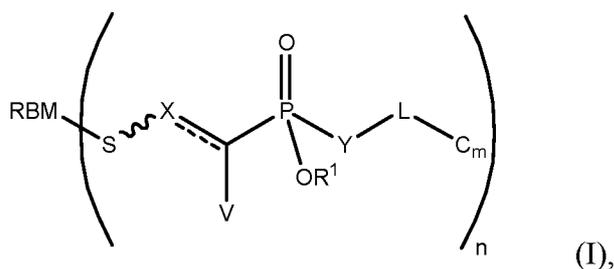
Под «метастазом» подразумевают распространение раковых клеток из их исходного участка в другую часть тела. Формирование метастазов представляет собой очень сложный процесс и обычно включает в себя отделение раковых клеток от первичной опухоли, их попадание в кровоток и дальнейшее развитие в нормальных тканях в других частях тела. Когда опухолевые клетки метастазируют, новая опухоль называется вторичной или метастатической опухолью, и ее клетки обычно напоминают клетки исходной опухоли. Это

означает, например, что, если рак молочной железы метастазирует в легкие, вторичная опухоль состоит из аномальных клеток молочной железы, а не из аномальных клеток легких. Опухоль в легком тогда называется метастатическим раком молочной железы, а не раком легкого.

### Притязания настоящего изобретения

Настоящее изобретение дополнительно относится к следующим пунктам притязаний:

1. Конъюгат, имеющий формулу (I):



или его фармацевтически приемлемая соль, или сольват;

где:

RBM представляет собой рецепторсвязывающую молекулу;

$\text{=}$  представляет собой двойную связь; или

$\text{—}$  представляет собой связь;

V отсутствует, когда  $\text{=}$  представляет собой двойную связь; или

V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил, когда  $\text{=}$  представляет собой связь;

X представляет собой R<sub>3</sub>-C, когда  $\text{=}$  представляет собой двойную связь; или

X представляет собой  $\begin{matrix} \text{R}_4 \\ | \\ \text{R}_3-\text{C} \end{matrix}$ , когда  $\text{—}$  представляет собой связь;

Y представляет собой NR<sup>5</sup>, S, O или CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>;

R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток;

- $R^3$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^4$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^5$  представляет собой H; возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^6$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^7$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- L представляет собой линкер;
- C представляет собой фрагмент камптотецина;
- m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10; и
- n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20.

2. Конъюгат по п. 1, где:

$R^3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; предпочтительно  $R^3$  представляет собой H;

$R^4$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; предпочтительно  $R^4$ , если он присутствует, представляет собой H;

$R^5$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; предпочтительно  $R^5$ , если он присутствует, представляет собой H;

$R^6$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; предпочтительно  $R^6$ , если он присутствует, представляет собой H; и

$R^7$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; предпочтительно  $R^7$ , если он присутствует, представляет собой H.

3. Конъюгат по п. 1 или 2, где  представляет собой двойную связь; V отсутствует; X представляет собой R<sub>3</sub>C; и  $R^3$  представляет собой H, или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; предпочтительно  $R^3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; более предпочтительно  $R^3$  представляет собой H.

4. Конъюгат по п. 1 или 2, где  представляет собой связь; V представляет собой

H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, предпочтительно V представляет собой H; X представляет собой  $\begin{matrix} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{matrix}$ ; R<sub>3</sub> представляет собой H, или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; более предпочтительно R<sup>3</sup> представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, более предпочтительно R<sup>3</sup> представляет собой H; R<sup>4</sup> представляет собой H, или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; предпочтительно R<sup>4</sup> представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, предпочтительно R<sup>4</sup> представляет собой H.

5. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, где указанная рецепторсвязывающая молекула выбрана из группы, состоящей из антитела, фрагмента антитела и белковой связывающей молекулы с антителоподобными связывающими свойствами.

6. Конъюгат по п. 5, где указанная рецепторсвязывающая молекула представляет собой антитело, предпочтительно где указанное антитело выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела, химерного антитела, гуманизированного антитела, человеческого антитела и однодоменного антитела, такого как однодоменное антитело верблюда или акулы.

7. Конъюгат по п. 5, где указанная рецепторсвязывающая молекула представляет собой фрагмент антитела,

предпочтительно где указанный фрагмент антитела представляет собой двухвалентный фрагмент антитела,

более предпочтительно где указанный двухвалентный фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из (Fab)<sub>2</sub>'-фрагмента, двухвалентного одноцепочечного фрагмента Fv, антитела с двойным аффинным перенацеливанием (DART) и диантитела; или

предпочтительно, когда фрагмент антитела представляет собой фрагмент моновалентного антитела,

более предпочтительно, когда фрагмент моновалентного антитела выбран из группы, состоящей из Fab-фрагмента, Fv-фрагмента и одноцепочечного Fv-фрагмента (scFv).

8. Конъюгат по п. 5, где указанная рецепторсвязывающая молекула представляет собой белковую связывающую молекулу со свойствами связывания, подобными антителам,

предпочтительно где белковая связывающая молекула с антителоподобными связывающими свойствами выбрана из группы, состоящей из мутеина на основе полипептида семейства липокалинов, глютела, белка на основе анкиринового каркаса, белка на основе кристаллического каркаса, аднектина, авимера, дарпина и аффитела.

9. Конъюгат по любому из предшествующих пунктов, где Y представляет собой NH.

9a. Конъюгат по п. 9, где указанная рецепторсвязывающая молекула представляет собой антитело.

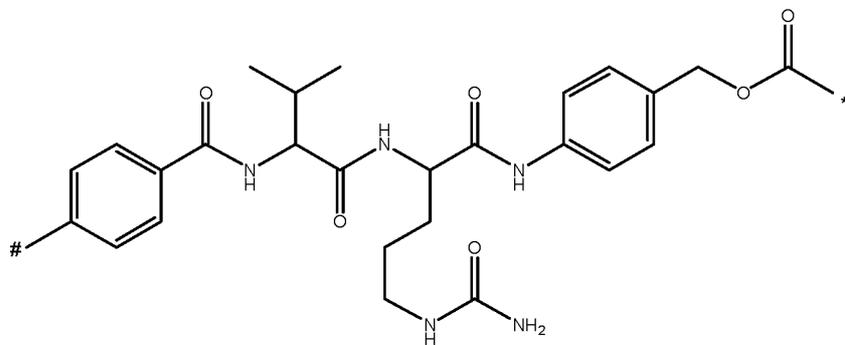
10. Конъюгат по любому из предшествующих пунктов, где указанный линкер L является расщепляемым.

11. Конъюгат по п. 10, где указанный линкер является расщепляемым протеазой, глюкуронидазой, сульфатазой, фосфатазой, эстеразой или посредством дисульфидного восстановления.

12. Конъюгат по п. 11, где указанный линкер L является расщепляемым протеазой, предпочтительно катепсином, таким как катепсин В.

13. Конъюгат по любому из предшествующих пунктов, где указанный линкер L содержит валин-цитруллиновый фрагмент.

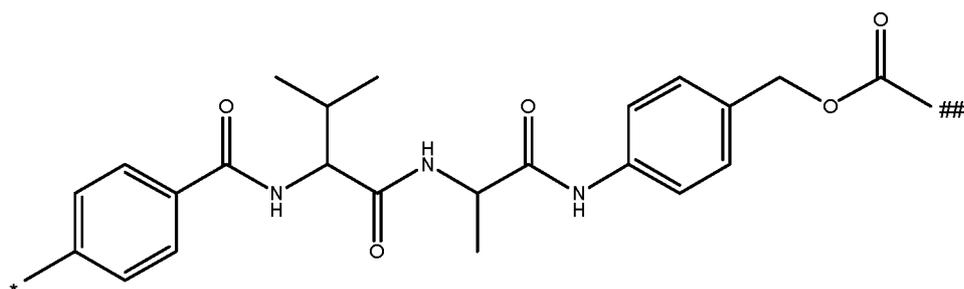
14. Конъюгат по п. 13, где указанный линкер L представляет собой:



где # обозначает точку присоединения к Y, и \* обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина.

15. Конъюгат по любому из пп. 1–12, где указанный линкер L содержит валин-аланиновый фрагмент.

16. Конъюгат по п. 15, где указанный линкер L представляет собой:



где \* обозначает точку присоединения к Y, и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина.

17. Конъюгат по любому из пп. 1-9, где указанный линкер является нерасщепляемым.

18. Конъюгат по любому из предшествующих пунктов, где  $R^1$  представляет собой первую полиалкиленгликолевую единицу  $R^F$ .

19. Конъюгат по п. 18, где указанная первая полиалкиленгликолевая единица  $R^F$  содержит от 1 до 100 субъединиц, имеющих структуру:



предпочтительно где  $R^F$  представляет собой



где:

 обозначает положение O;

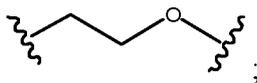
$K^F$  выбран из группы, состоящей из -H, -PO<sub>3</sub>H, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкила, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-SO<sub>3</sub>H, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-CO<sub>2</sub>H, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-OH, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH<sub>2</sub>, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкила и -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-N((C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкила)<sub>2</sub>;

предпочтительно  $K^F$  представляет собой H; и

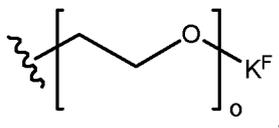
o представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 100.

20. Конъюгат по п. 18 или 19, где  $R^1$  представляет собой первую полиэтиленгликолевую единицу.

21. Конъюгат по п. 17, где указанная первая полиэтиленгликолевая единица  $R^F$  содержит от 1 до 100 субъединиц, имеющих структуру:



предпочтительно где  $R^F$  представляет собой:



где



обозначает положение O;

$K^F$  выбран из группы, состоящей из -H, -PO<sub>3</sub>H, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкила, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-SO<sub>3</sub>H, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-CO<sub>2</sub>H, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-OH, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH<sub>2</sub>, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкила и -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-N((C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкила)<sub>2</sub>;

предпочтительно  $K^F$  представляет собой H; и

o представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 100.

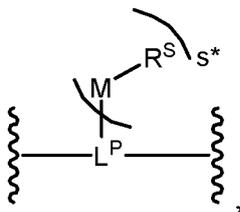
21a. Конъюгат по п. 21, где  $K^F$  представляет собой H.

21b. Конъюгат по п. 21 или 21a, где o находится в диапазоне от 8 до 30.

21c. Конъюгат по п. 21b, где o находится в диапазоне от 20 до 28.

21d. Конъюгат по п. 21c, где o составляет 22, 23, 24, 25 или 26.

22. Конъюгат по любому из пп. 1- 13, 15 и 17 до 21d, в частности, по любому из пп. 18 до 21d, где указанный линкер содержит вторую спейсерную единицу A, где указанная вторая спейсерная единица A представляет собой группу Z, где указанная группа Z имеет следующую структуру:



где:

$L^P$  представляет собой параллельно соединяющую единицу;

$R^S$  каждый независимо представляет собой вторую полиалкиленгликолевую единицу;

M каждый независимо представляет собой связь или фрагмент, который связывает  $R^S$  с  $L^P$ ;

$s^*$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4; предпочтительно  $s^*$  составляет 1; и

волнистые линии обозначают точку присоединения к -Y- и к другой части линкера, если она присутствует, или к фрагменту камптотецина (-C).

23. Конъюгат по п. 22, где M каждый независимо выбран из группы, состоящей из -NH-, -O-, -S-, -C(O)-O-, -C(O)-NH- и -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкилен-; предпочтительно каждый M представляет собой -O-.

24. Конъюгат по любому из пп. 22-23, где указанная вторая полиалкиленгликолевая единица R<sup>S</sup> каждая независимо содержит от 1 до 100 субъединиц, имеющих структуру:



предпочтительно где R<sup>S</sup> каждый независимо представляет собой



где:

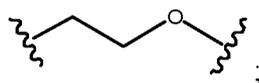
 обозначает положение M в группе Z;

R<sup>S</sup> выбран из группы, состоящей из -H, -PO<sub>3</sub>H, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкила, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-SO<sub>3</sub>H, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-CO<sub>2</sub>H, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-OH, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH<sub>2</sub>, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкила и -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-N((C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкила)<sub>2</sub>; предпочтительно R<sup>S</sup> представляет собой H; и

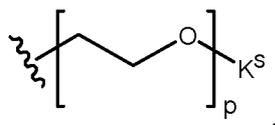
p представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 100.

25. Конъюгат по любому из пп. 22-24, где R<sup>S</sup> каждый независимо представляет собой вторую полиэтиленгликолевую единицу.

26. Конъюгат по п. 25, где указанная вторая полиэтиленгликолевая единица R<sup>S</sup> каждая независимо содержит от 1 до 100 субъединиц, имеющих структуру:



предпочтительно где R<sup>S</sup> представляет собой, каждый независимо:



где

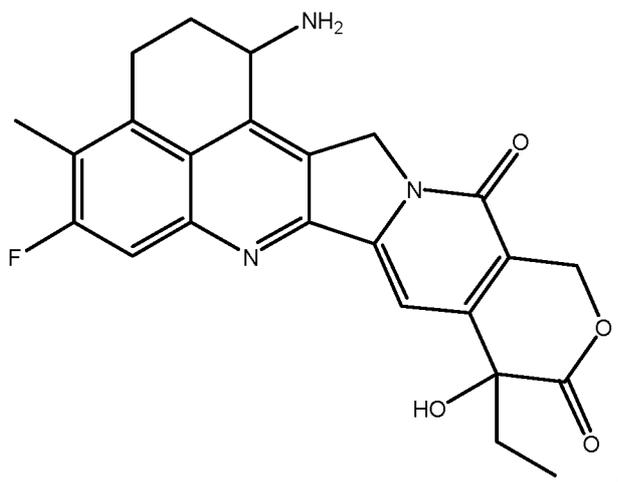
 обозначает положение M в группе Z;

$K^S$  выбран из группы, состоящей из  $-H$ ,  $-PO_3H$ ,  $-(C_1-C_{10})$ алкила,  $-(C_1-C_{10})$ алкил- $SO_3H$ ,  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $CO_2H$ ,  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $OH$ ,  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $NH_2$ ,  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $NH(C_1-C_3)$ алкила и  $-(C_2-C_{10})$ алкил- $N((C_1-C_3)$ алкила) $_2$ ; предпочтительно  $K^S$  представляет собой  $H$ ; и

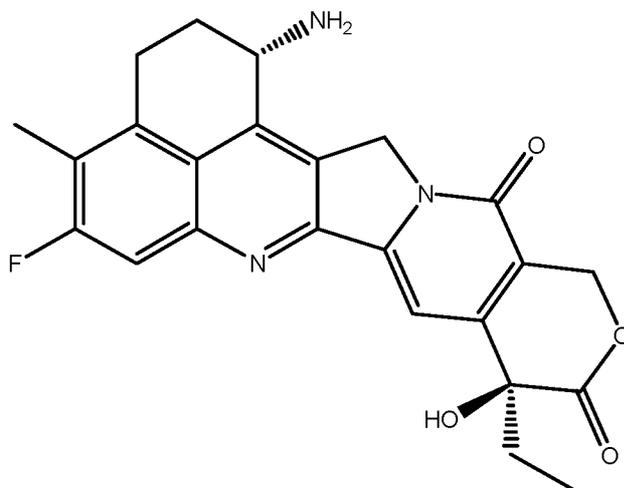
$p$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 100.

27. Конъюгат по любому из предшествующих пунктов, где указанный фрагмент камптотецина  $C$  выбран из группы, состоящей из экзатекана, SN38, камптотецина, топотекана, иринотекана, белотекана, луртотекана, рубитекана, силатекана, коситекана и гиматекана.

28. Конъюгат по п. 27, где указанный фрагмент камптотецина  $C$  представляет собой экзатекан, имеющий формулу:



предпочтительно имеющий формулу:



29. Конъюгат по п. 28, где указанный экзатекан связан с линкером  $L$  через аминогруппу.

30. Конъюгат по любому из предшествующих пунктов, где число фрагментов камптотецина  $C$  на рецепторсвязывающую молекулу составляет от 1 до 14, предпочтительно от 2 до 14, более предпочтительно от 4 до 14, еще более предпочтительно от 5 до 12, еще более предпочтительно от 6 до 12, еще более предпочтительно от 7 до 10, еще более предпочтительно 8.

31. Конъюгат по любому из пп. 1- 29, где число фрагментов камптотецина  $C$  на рецепторсвязывающую молекулу составляет от 1 до 14, предпочтительно от 1 до 12, более предпочтительно от 2 до 10, еще более предпочтительно от 2 до 8, еще более предпочтительно от 2 до 6, еще более предпочтительно от 3 до 5, еще более предпочтительно 4.

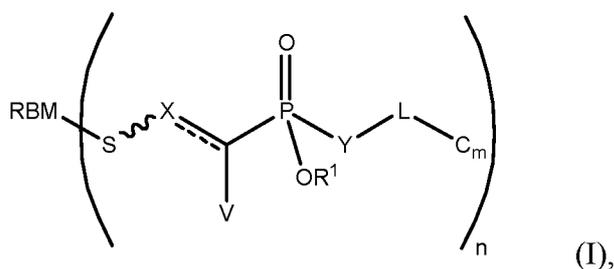
32. Конъюгат по любому из пп. 1- 29, где  $m$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1; и

$n$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20, предпочтительно от 1 до 10, более предпочтительно от 2 до 10, еще более предпочтительно от 4 до 10, еще более предпочтительно от 6 до 10, еще более предпочтительно от 7 до 10, еще более предпочтительно 8.

33. Конъюгат по любому из пп. 1- 29, где  $m$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4, предпочтительно 1 или 2, более предпочтительно 1; и

$n$  представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20, предпочтительно от 1 до 10, более предпочтительно от 2 до 8, еще более предпочтительно от 3 до 6, еще более предпочтительно 4 или 5, еще более предпочтительно 4.

33а. Конъюгат, имеющий формулу (I):



или его фармацевтически приемлемая соль, или сольват;

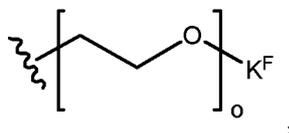
где:

RBM представляет собой антитело;

 представляет собой двойную связь; или

 представляет собой связь;

- V отсутствует, когда  представляет собой двойную связь; или
- V представляет собой H, когда  представляет собой связь;
- X представляет собой  $R_3-C$ , когда  представляет собой двойную связь; или
- X представляет собой  $R_3-C$ , когда  представляет собой связь;
- Y представляет собой NH;
- R<sup>1</sup> представляет собой полиэтиленгликолевую единицу, имеющую структуру:



где:



обозначает положение O;

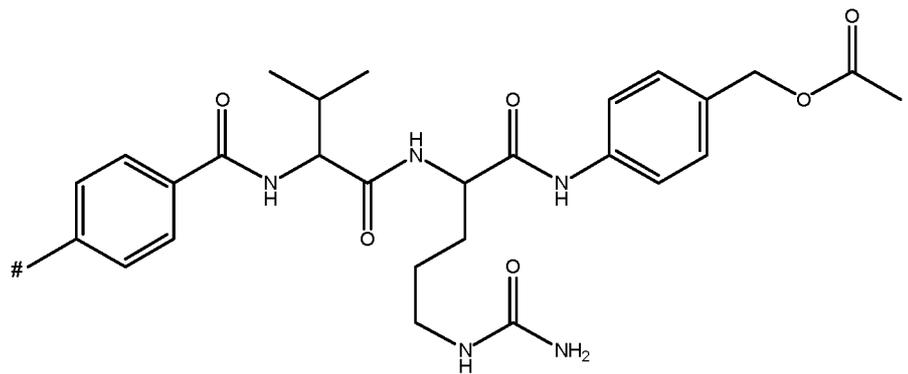
K<sup>F</sup> представляет собой H; и

o представляет собой целое число в диапазоне от 8 до 30;

R<sup>3</sup> представляет собой H;

R<sup>4</sup> представляет собой H;

L представляет собой линкер, имеющий следующую структуру:



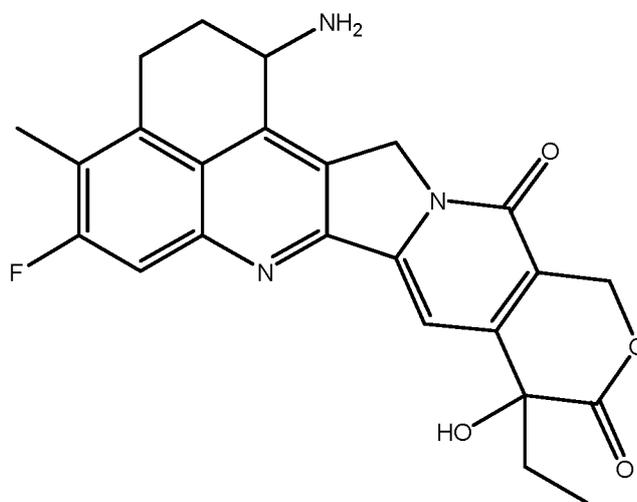
где # обозначает точку присоединения к Y, и \* обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (C);

C представляет собой фрагмент камптотецина;

m составляет 1; и

n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10.

33b. Конъюгат по п. 33a, где указанный фрагмент камптотецина С представляет собой экзатекан, имеющий формулу:



33c. Конъюгат по п. 33a или 33b, где указанный экзатекан связан с линкером L через аминогруппу.

33d. Конъюгат по любому из пп. 33a-33c, где o находится в диапазоне от 20 до 28.

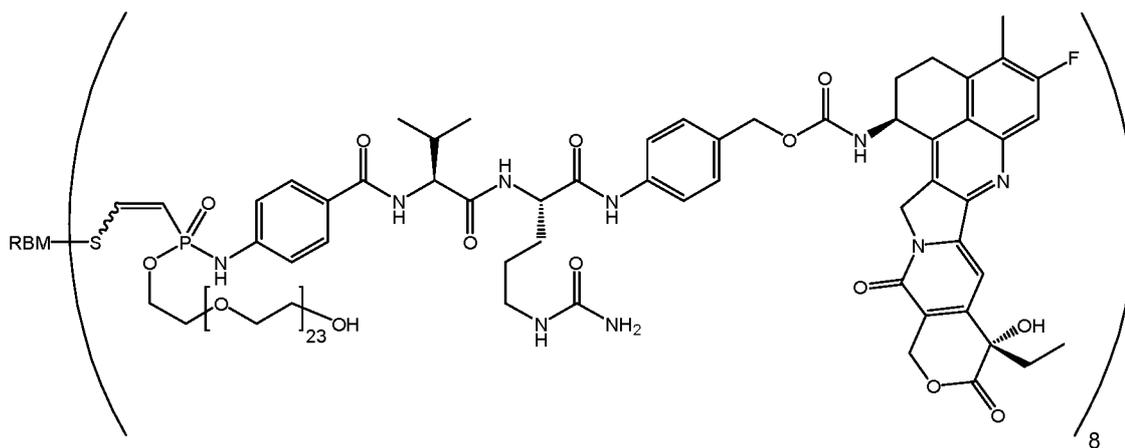
33e. Конъюгат по п. 33d, где o составляет 22, 23, 24, 25 или 26.

33f. Конъюгат по любому из пп. 33a-33e, где n находится в диапазоне от 2 до 10.

33g. Конъюгат по п. 33f, где n составляет 4.

33h. Конъюгат по п. 33f, где n составляет 8.

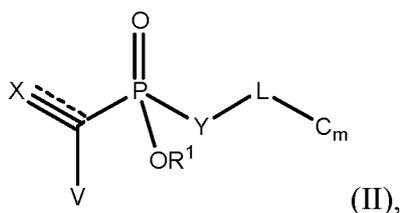
33i. Конъюгат, имеющий следующую формулу (Ia):



(Ia),

где RBM представляет собой антитело.

34. Соединение, имеющее формулу (II):



или его фармацевтически приемлемая соль, или сольват;

где:

представляет собой тройную связь; или

представляет собой двойную связь;

V отсутствует, когда представляет собой тройную связь; или

V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, когда представляет собой двойную связь;

X представляет собой R<sub>3</sub>-C, когда представляет собой тройную связь; или

X представляет собой  $\begin{matrix} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{matrix}$ , когда представляет собой двойную связь;

Y представляет собой NR<sup>5</sup>, S, O или CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>;

R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>3</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>4</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>5</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>6</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>7</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

L представляет собой линкер;

C представляет собой фрагмент камптотецина; и

m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10.

35. Соединение по п. 34, где:

$R^3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; предпочтительно  $R^3$  представляет собой H;

$R^4$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; предпочтительно  $R^4$ , если он присутствует, представляет собой H;

$R^5$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; предпочтительно  $R^5$ , если он присутствует, представляет собой H;

$R^6$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; предпочтительно  $R^6$ , если он присутствует, представляет собой H; и

$R^7$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; предпочтительно  $R^7$ , если он присутствует, представляет собой H.

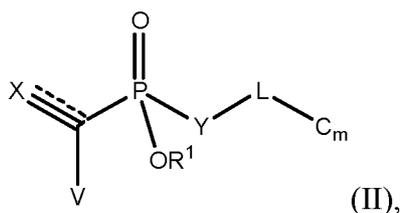
36. Соединение по п. 34 или 35, где  представляет собой тройную связь; V отсутствует; X представляет собой  $R_3-C$ ; и  $R^3$  представляет собой H, или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; предпочтительно  $R^3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, более предпочтительно  $R^3$  представляет собой H.

37. Соединение по п. 34 или 35, где  представляет собой двойную связь; V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, предпочтительно V представляет собой H; X

представляет собой  $R_3-\overset{R_4}{C}$ ;  $R^3$  представляет собой H, или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; предпочтительно  $R^3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, более предпочтительно  $R^3$  представляет собой H;  $R^4$  представляет собой H, или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; предпочтительно  $R^4$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, более предпочтительно  $R^4$  представляет собой H.

38. Соединение по любому из пп. 34-37, где R<sup>m</sup>, V, X, Y, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, L, C, m и n имеют такие значения, как определено в любом из пп. 1-33i.; предпочтительно Y представляет собой NH.

39. Способ получения конъюгата формулы (I), где указанный способ включает:  
проведение реакции соединения формулы (II)



или его фармацевтически приемлемой соли, или сольвата;

где:

 представляет собой тройную связь; или

 представляет собой двойную связь;

V отсутствует, когда  представляет собой тройную связь; или

V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, когда  представляет собой двойную связь;

X представляет собой R<sub>3</sub>-C, когда  представляет собой тройную связь; или

X представляет собой  $\begin{matrix} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{matrix}$ , когда  представляет собой двойную связь;

Y представляет собой NR<sup>5</sup>, S, O или CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>;

R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>3</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>4</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>5</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

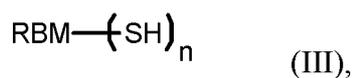
R<sup>6</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>7</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

L представляет собой линкер;

C представляет собой фрагмент камптотецина; и

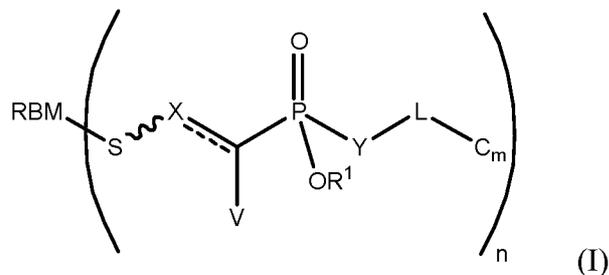
m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10; и с тиолсодержащей молекулой формулы (III)



где RBM представляет собой рецепторсвязывающую молекулу; и

n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20;

с получением в результате соединения формулы (I)



или его фармацевтически приемлемой соли, или сольвата;

где:

$\text{---} \text{X} \text{---}$  представляет собой двойную связь, когда  $\text{---} \text{C} \text{---}$  в соединении формулы (II) представляет собой тройную связь; или

$\text{---} \text{C} \text{---}$  представляет собой связь, когда  $\text{---} \text{X} \text{---}$  в соединении формулы (II) представляет собой двойную связь;

V отсутствует, когда  $\text{---} \text{C} \text{---}$  представляет собой двойную связь; или

V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил, когда  $\text{---} \text{C} \text{---}$  представляет собой связь;

X представляет собой R<sub>3</sub>-C, когда  $\text{---} \text{C} \text{---}$  представляет собой двойную связь; или

X представляет собой  $\begin{matrix} \text{R}_4 \\ | \\ \text{R}_3-\text{C} \end{matrix}$ , когда  $\text{---} \text{C} \text{---}$  представляет собой связь;

Y представляет собой NR<sup>5</sup>, S, O или CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>;

R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>3</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

- $R^4$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^5$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^6$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^7$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- L представляет собой линкер;
- C представляет собой фрагмент камптотецина;
- m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10; и
- n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20.

40. Способ по п. 39, где:

$R^3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; предпочтительно  $R^3$  представляет собой H;

$R^4$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; предпочтительно  $R^4$ , если он присутствует, представляет собой H;

$R^5$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; предпочтительно  $R^5$ , если он присутствует, представляет собой H;

$R^6$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; предпочтительно  $R^6$ , если он присутствует, представляет собой H; и

$R^7$ , если он присутствует, представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил; предпочтительно  $R^7$ , если он присутствует, представляет собой H.

41. Способ по п. 39 или 40, где  представляет собой тройную связь; V отсутствует; X представляет собой R<sub>3</sub>-C;  $R^3$  представляет собой H, или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток, предпочтительно  $R^3$  представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, более предпочтительно  $R^3$  представляет собой H и  представляет собой двойную связь.

42. Способ по п. 39 или 40, где  представляет собой двойную связь; V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, предпочтительно V представляет собой H; X

представляет собой  $R_3-\overset{R_4}{\underset{|}{C}}$ ,  $R^3$  представляет собой H, или возможно замещенный

алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток, предпочтительно  $R^3$  представляет собой H или  $(C_1-C_8)$ алкил, более предпочтительно  $R^3$  представляет собой H;  $R^4$  представляет собой H или  $(C_1-C_8)$ алкил, предпочтительно  $R^4$  представляет собой H; и  представляет собой связь.

43. Способ по любому из пп. 39 до 42, где реакцию проводят при нейтральном pH или слабощелочных условиях, предпочтительно при pH от 6 до 10.

44. Способ по любому из пп. 39–43, дополнительно включающий восстановление по меньшей мере одного дисульфидного мостика рецепторсвязывающей молекулы в присутствии восстанавливающего агента с образованием тиоловой группы (SH).

45. Способ по п. 44, где указанный восстанавливающий агент выбран из группы, состоящей из трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР), дитиотреитола (ДТТ), дитионита натрия, тиосульфата натрия и сульфита натрия;

предпочтительно где указанный восстанавливающий агент представляет собой трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР).

46. Способ по п. 44 или 45, где восстановление по меньшей мере одного дисульфидного мостика включает использование от примерно 1 до примерно 3 эквивалентов, предпочтительно от примерно 1 до примерно 2 эквивалентов, более предпочтительно примерно 1 эквивалент восстанавливающего агента на каждый восстанавливаемый дисульфидный мостик.

47. Способ по любому из пп. 39-46, где указанная тиолсодержащая молекула формулы (III) подвергают реакции с от примерно 1 до примерно 4 эквивалентами, предпочтительно от примерно 1 до примерно 3 эквивалентами, более предпочтительно от примерно 1 до примерно 2 эквивалентами, еще более предпочтительно примерно 1,5 эквивалентами соединения формулы (II) на тиольную группу (SH).

48. Способ по любому из пп. 39 до 47, где указанную реакцию соединения формулы (II) с тиолсодержащей молекулой формулы (III) проводят в водной среде.

49. Способ по любому из пп. 39 до 48, где RBM, V, X, Y,  $R^1$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ , L, C, m и n имеют такие значения, как определено в любом из пп. 1-33i; предпочтительно Y представляет собой  $NH_2$ .

50. Конъюгат формулы (I), получаемый или полученный способом по любому из пп. 39-49.

51. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп. 1- 33i или 50.

52. Фармацевтическая композиция по п. 51, где указанная фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата по любому из пп. 1- 33 и где среднее число фрагментов камптотецина на рецепторсвязывающую молекулу в композиции составляет от более чем 0 до примерно 14, предпочтительно от примерно 1 до примерно 14, более предпочтительно от примерно 2 до примерно 14, еще более предпочтительно от примерно 4 до примерно 14, еще более предпочтительно от примерно 5 до примерно 12, еще более предпочтительно от примерно 6 до примерно 12, еще более предпочтительно от примерно 6 до примерно 10, еще более предпочтительно примерно 8.

53. Фармацевтическая композиция по п. 51, где указанная фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата по любому из пп. 1- 33 и где среднее число фрагментов камптотецина С на рецепторсвязывающую молекулу составляет от более чем 0 до примерно 14, предпочтительно от примерно 1 до примерно 14, более предпочтительно от примерно 1 до примерно 12, еще более предпочтительно от примерно 2 до примерно 10, еще более предпочтительно от примерно 2 до примерно 8, еще более предпочтительно от примерно 2 до примерно 6, еще более предпочтительно от примерно 3 до примерно 5, еще более предпочтительно примерно 4.

54. Конъюгат по любому из пп. 1- 33i или 50 для применения в способе лечения заболевания.

55. Конъюгат для применения по п. 54, где указанное заболевание представляет собой рак.

55а. Конъюгат для применения по п. 55, где указанный рак представляет собой солидную опухоль.

56. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 51 до 53 для применения в способе лечения заболевания.

57. Фармацевтическая композиция для применения по п. 56, где указанное заболевание представляет собой рак.

58. Фармацевтическая композиция для применения по п. 57, где указанный рак представляет собой солидную опухоль.

59. Применение конъюгата по любому из пп. 1- 33i или 50 для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания.

60. Применение по п. 59, где указанное заболевание представляет собой рак.

61. Применение по п. 60, где указанный рак представляет собой солидную опухоль.
62. Применение фармацевтической композиции по любому из пп. 51-53 для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания.
63. Применение по п. 62, где указанное заболевание представляет собой рак.
64. Применение по п. 63, где указанный рак представляет собой солидную опухоль.
65. Способ лечения заболевания, включающий введение эффективного количества конъюгата по любому из пп. 1- 33f или 50 субъекту или пациенту, нуждающемуся в этом.
66. Способ по п. 65, где указанное заболевание представляет собой рак.
67. Способ по п. 66, где указанный рак представляет собой солидную опухоль.
68. Способ лечения заболевания, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 51-53 субъекту или пациенту, нуждающемуся в этом.
69. Способ по п. 68, где указанное заболевание представляет собой рак.
70. Способ по п. 69, где указанный рак представляет собой солидную опухоль.

\*\*\*\*\*

Следует отметить, что используемые в настоящем документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если в контексте явно не указано иное. Таким образом, например, ссылка на «реагент» включает один или более таких различных реагентов, а ссылка на «способ» включает ссылку на эквивалентные стадии и способы, известные специалистам в данной области техники, которые могут быть модифицированы или которые могут заменить способы, описанные в настоящем документе.

Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий серии элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в серии. Специалисты в данной области техники поймут или смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многие эквиваленты конкретных воплощений настоящего изобретения, описанных в настоящем документе. Предполагается, что такие эквиваленты включены в настоящее изобретение.

Термин «и/или», где бы он ни использовался в настоящем документе, включает в себя значения «и», «или» и «все или любая другая комбинация элементов, связанных указанным термином».

Термин «менее чем» или, в свою очередь, «более чем» не включает в себя конкретное число. Например, менее чем 20 означает меньше указанного числа. Аналогично, более чем

или больше означает более чем или больше указанного числа, например, более чем 80 % означает более чем или больше указанного числа в 80 %.

В данном описании и формуле изобретения, которая следует за ним, если контекст не требует иного, слово «содержит» и его варианты, такие как «содержит» и «содержащий», следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа или шага или группа целых чисел или шагов, но не исключение любого другого целого числа или шага или группы целых чисел или шага. При использовании в настоящем документе термин «содержащий» может быть заменен термином «содержащий» или «включающий» или иногда при использовании в настоящем документе термином «имеющий». При использовании в настоящем документе термин «состоящий из» исключает любой неуказанный элемент, стадию или ингредиент.

Термин «включая» означает «включая, но не ограничиваясь ими». «Включая» и «включая, но не ограничиваясь ими» используются взаимозаменяемо.

Используемые в настоящем документе термины «примерно», «приблизительно» или «по существу» означают в пределах 20%, предпочтительно в пределах 15%, предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона. Оно также включает в себя конкретное число, то есть «примерно 20» включает в себя число 20.

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами, материалами, реагентами, веществами и т. д., описанными в настоящем документе, и по существу может варьироваться. Используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных воплощений и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который определяется исключительно формулой изобретения.

Все публикации, цитируемые в тексте данного описания (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, инструкции и т. д.), как выше, так и ниже, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Ничто в настоящем документе не должно быть истолковано как признание того, что настоящее изобретение не имеет права предшествовать такому раскрытию в силу предшествующего изобретения. В той степени, в которой материал, включенный посредством ссылки, противоречит или несовместим с настоящим описанием, настоящее описание заменяет любой такой материал.

Содержание всех документов и патентных документов, цитируемых в настоящем документе, полностью включено в него посредством ссылки.

## ПРИМЕРЫ

Еще лучшее понимание настоящего изобретения и его преимуществ станет очевидным из следующих примеров, представленных исключительно в иллюстративных целях. Примеры не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения каким-либо образом.

### **Общая информация, материалы и способы**

#### Химические вещества, растворители и антитела

Химические вещества и растворители были приобретены в компаниях Merck (группа Merck, Германия), TCI (Tokyo Chemical Industry CO., LTD., Япония), Iris Biotech (Iris Biotech GmbH, Германия), MCE (MedChemExpress, США) и Carl Roth. (Carl Roth GmbH + Co. KG, Германия) и использованы без дополнительной очистки. Все аминокислоты имели свою природную конфигурацию (то есть L-конфигурацию), если не указано иное. Сухие растворители были приобретены в компании Merck (группа Merck, Германия). Трастузумаб был приобретен в компании Roche (Hoffmann-La Roche AG, Швейцария). Enhertu был приобретен в компании Daichi-Sankyo (Daiichi Sankyo K.K, Япония), а брентуксимаб был произведен компанией Evitria (evitria AG, Швейцария). PEG24 был приобретен в BiochemPEG (Pure Chemistry Scientific Inc., США).

#### Препаративная HPLC

Препаративную HPLC проводили на системе BÜCHI Pure C-850 Flash-Prep (BÜCHI Labortechnik AG, Швейцария) с использованием колонки VP 250/10 Macherey-Nagel Nucleodur C18 HTec Spum (Macherey-Nagel GmbH & Co. Kg, Германия) для меньших масштабов. Использовали следующие градиенты: Способ C: (A = H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA (трифторуксусная кислота), B = MeCN (ацетонитрил) + 0,1% TFA, скорость потока 6 мл/мин, 30% B 0-5 мин, 30-70% B 5-35 мин, 99% B 35-45 мин. Для больших масштабов использовали колонку VP 250/21 Macherey-Nagel Nucleodur C18 HTec Spum (Macherey-Nagel GmbH & Co. Kg, Германия) со следующими градиентами: Способ D: (A = H<sub>2</sub>O + 0,1% TFA (трифторуксусная кислота), B = MeCN (ацетонитрил) + 0,1% TFA, скорость потока 14 мл/мин, 30% B 0-5 мин, 30-70% B 5-35 мин, 99% B 35-45 мин.

#### LC/MS

Малые молекулы, линкер-полезные нагрузки, антитела и ADC анализировали с использованием прибора Waters H-класса, оснащенного менеджером четвертичных растворителей, менеджером образцов Waters-FTN, детектором Waters PDA и менеджером колонок Waters с белком Acquity UPLC. Колонка BEH C4 (300 Å, 1,7 мкм, 2,1 x 50 мм) для

антител и ADC. Здесь образцы элюировали при температуре колонки 80°C. Использовали следующий градиент: А: 0,1% муравьиной кислоты в H<sub>2</sub>O; В: 0,1% муравьиной кислоты в MeCN. 25% В 0–1 мин, 0,4 мл/мин, 25–95% В 1–3,5 мин 0,2 мл/мин, 95% В 3,5–4,5 мин 0,2 мл/мин, 95–25% В 4,5–5 мин 0,4 мл/мин, 25–95% В 5–5,5 мин 0,4 мл/мин, 95–25% В 5,5–7,5 мин 0,4 мл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили с помощью анализатора Waters XEVO G2-XS QToF. Белки ионизировали в режиме положительных ионов, применяя напряжение на конусе 40 кВ. Необработанные данные анализировали с помощью MaxEnt 1. Малые молекулы и линкер-полезные нагрузки анализировали с помощью колонки Acquity UPLC-ВЕН C18 (300 Å, 1,7 мкм, 2,1 мм x 50 мм). Здесь образцы элюировали при температуре колонки 45°C и скорости потока 0,4 мл/мин. Использовали следующий градиент: А: 0,1% муравьиной кислоты в H<sub>2</sub>O; В: 0,1% муравьиной кислоты в MeCN. 2% В 0-1 мин, 2-98% В 1-5 мин, 98% В 5-5,5 мин, 98-2% В 5,5-6 мин, 2% В 6-7 мин.

#### Препаративная эксклюзионная хроматография (SEC)

Очистку белка с помощью эксклюзионной хроматографии проводили с использованием системы ÄKTA Pure FPLC (GE Healthcare, США), оснащенной коллектором F9-С-фракций.

#### Определение концентрации ADC

Концентрации ADC определяли в 96-луночном планшете с использованием набора для анализа белка Pierce™ Rapid Gold BCA (Thermo Fisher Scientific, США) и реагента Брэдфорда В6916 (Merck, Германия) с предварительно разведенными стандартами для анализа белка бычьего гамма-глобулина (Thermo Fisher Scientific, США). Результаты обоих анализов были усреднены арифметически.

#### Подготовка проб ADC и антител для MS

0,5 мкл раствора PNGase-F (Pomoga, Германия, рекомбинантный, клонированный из *Elizabethkingia miricola*, 10 ед/мкл) и 5 мкл 100 мМ раствора DTT в воде добавляли к 50 мкл 0,2 мг/мл антитела или ADC в PBS, и раствор инкубировали при 37°C в течение по меньшей мере 2 часов. Образцы подвергали LC/MS, вводя по 2 мкл каждого образца.

#### Аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC)

Аналитическую эксклюзионную хроматографию (A-SEC) ADC проводили на системе Vanquish Flex UHPLC с детектором DAD, Split Sampler FT (4°C), колоночным отделением H (25°C) и бинарным насосом F. (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием колонки MAbPac SEC-1 300 Å, 4 x 300 мм (Thermo Fisher Scientific, США) со скоростью потока 0,15 мл/мин. Разделение различных популяций ADC/mAb было

достигнуто в течение 30-минутного изократического градиента с использованием фосфатного буфера с pH 7 (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 5% об./об. изопропилового спирта в качестве подвижной фазы. 8 мкг ADC/mAb наносили на колонку для анализа А-SEC. УФ-хроматограммы регистрировали при 220 и 280 нм.

*Аналитическая хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC)*

Измерения проводили на системе Vanquish Flex UHPLC (2,9) с колонкой MabPac HIC Butyl 4,6×100 мм (Thermo Fischer Scientific, США). Разделение различных ADC/антител было достигнуто со следующим градиентом: А: 1 М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 В: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20% (об./об.) изопропиловый спирт, pH 7,4. 0% В: 0-1 мин, 0-95% В: 1-15 мин, 95% В: 15-20 мин, 95-0% В: 20-23 мин, 0% В: 23-25 мин, с потоком 700 мкл/мин. Для каждого анализа в колонку вносили по 15 мкг образца. УФ-хроматограммы регистрировали при 220 и 280 нм.

*Общий способ конъюгации конструкций линкер-полезная нагрузка на основе P5 и экзатекана с антителами для достижения DAR8*

50 мкл раствора антитела с концентрацией 10,0 мг/мл в буфере для конъюгации (свежеприготовленный 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-буфер, pH 8,0) смешивали с 3,33 мкл 10 mM раствора ТСЕР в P5-буфере для конъюгации. Сразу после этого добавляли 1,67 мкл 40 mM раствора конструкции P5-Exatecan, растворенной в DMSO. Смесь встряхивали при 350 об/мин и 25°C в течение 16 часов. Реакционные смеси очищали с помощью препаративной эксклюзионной хроматографией с использованием 25 мл Superdex™ 200 Increase 10/300GL (Cytiva, Швеция) и потоком 0,8 мл/мин, элюируя стерильным PBS (Merck, Германия). Фракции, содержащие антитела, объединяли и концентрировали путем центрифугирования (Amicon® Ultra- 2 мл MWCO: 30 кДа, Merck, Германия).

*Цитотоксичность in vitro*

Для исследования прямой цитотоксичности ADC соответствующие клетки инкубировали в течение 4 дней для ADC брентуксимаба и 7 дней для ADC трастузумаба с возрастающими концентрациями ADC (0-3 мкг/мл) для создания кривой зависимости ответа от дозы. Уничтожение клеток анализировали с использованием красителя жизнеспособности клеток резазурина в конечной концентрации 55 мкМ (Sigma-Aldrich) путем деления флуоресценции контрольных клеток в среде на флуоресценцию клеток, обработанных ADC. Эмиссию флуоресценции при 590 нМ измеряли на считывателе микропланшетов Infinite M1000 Pro (Tecan).

*Количество затронутых свидетелей in vitro*

Для анализа активности ADC по эффекту «свидетеля» в отношении мишень-отрицательных клеток 20000 мишень-положительных клеток (SKBR-3 для ADC трастузумаба) инкубировали с увеличивающимися концентрациями ADC (0-3 мкг/мл). Через 5 дней половину объема супернатанта клеточной культуры переносили в 5000 мишень-отрицательных клеток (MDA-MB-468 для ADC трастузумаба) и инкубировали еще 5 дней. Уничтожение клеток анализировали путем измерения жизнеспособности на основе резазурина, как описано выше.

#### Повреждение ДНК

Повышающую регуляцию маркеров повреждения ДНК в ответ на ADC или малые молекулы (экзатекан и камптотецин) анализировали с помощью считывания на основе проточной цитометрии. Для этого 50000 Her2-положительных клеток SKBR-3 инкубировали в течение от 24 до 72 часов с 5 мкг/мл ADC или 5 нМ малых молекул. По истечении времени инкубирования клетки окрашивали LIVE/DEAD™ Fixable Aqua (Thermo Fisher Scientific) с последующей фиксацией и пермеабиллизацией с использованием набора BD Cytofix/Cytoperm Kit (BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Внутриклеточное окрашивание маркеров повреждения ДНК проводили с использованием анти-расщепленного PARP (Asp214) PE, анти-H2AX (pSer139) AF647 и анти-активной каспазы 3 FITC (все BD Biosciences). Клетки получали на проточном цитометре Cytotflex LX (Beckmann Coulter).

#### Стабильность конструкций в сыворотке

40 мкл нормальной крысиной сыворотки (содержащей соответствующие ADC в концентрации 0,4 мг/мл по меньшей мере в 80% крысиной сыворотке (Thermo Fisher Scientific, США) стерильно фильтровали с помощью центробежных фильтрующих блоков UFC30GV0S (Merck, Германия) и инкубировали при 37°C в течение 1, 3 и 7 дней. Образцы для дня 0 подвергали дальнейшей непосредственной обработке.

Супернатант 50 мкл агарозной суспензии антитела к IgG человека (Fc-специфического) (Sigma Aldrich, США) удаляли центрифугированием, а оставшуюся смолу трижды промывали 300 мкл PBS. Смолу инкубировали с 40 мкл смеси сыворотка-ADC в течение 1 часа при комнатной температуре. После этого надосадочную жидкость удаляли и смолу 3 раза промывали 300 мкл PBS. После этого инкубировали в течение 5 минут с 60 мкл 100 мМ глицинового буфера, pH 2,3, при комнатной температуре. Этот раствор повторно забуферивали в PBS с использованием 0,5 мл центрифугирующих колонок Zeba™ с 7K MWCO (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы подвергались дальнейшей обработке

для MS-измерений, как описано выше. Образец 0-го дня анализировали таким же образом, сразу после смешивания сыворотки и ADC.

Стабильность в сыворотке с последующим измерением токсичности *in vitro*.

50 мкл нормальной крысиной сыворотки (Thermo Fisher Scientific, США) или человеческой сыворотки, содержащей соответствующие ADC (трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекан или Enhertu в концентрации 0,4 мг/мл по меньшей мере в 80% крысиной сыворотке (Thermo Fisher Scientific, США) стерильно фильтровали с помощью центробежных фильтров UFC30GV0S (Merck, Германия) и инкубировали при 37°C в течение 0, 1, 3 и 7 дней. Образцы для 0-го дня подвергали дальнейшей обработке. В течение соответствующего времени инкубирования образцы глубоко замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до измерения цитотоксичности. Образцы сыворотки, содержащие ADC в предполагаемой начальной концентрации 0,4 мг/мл, разбавляли без какой-либо дальнейшей обработки для достижения градиента концентрации с возрастающими концентрациями ADC (0-3 мкг/мл) для создания кривой зависимости ответа от дозы. Цитотоксичность *in vitro* в отношении клеток SKBR3 и MDA-MB-468 измеряли впоследствии точно так же, как описано ранее.

Исследование фармакокинетики (ФК) *in vivo*

Самкам крыс Спрег-Дуоли вводили внутривенно через хвостовую вену 5 мг ADC на килограмм массы тела (болюс) с соответствующим ADC. Примерно 1 мл крови собирали через 0,5 часа, 1 час, 4 часа, 24 часа, 48 часов, 96 часов, 168 часов, 336 часов и 504 часа. Образцам крови давали постоять при комнатной температуре для свертывания в течение 30 минут. Сыворотку крови выделяли из образцов после центрифугирования и сбора супернатанта. Образцы сыворотки анализировали с помощью иммуноферментного анализа (ELISA) следующим образом.

Анализ образцов *in vivo* с помощью ELISA

**Способ 1:** Для оценки фармакокинетики (ФК) ADC *in vivo* концентрацию общих антител измеряли в различные моменты времени в сыворотке крыс SD, получавших ADC. Общее количество гуманизированных антител к CD30 анализировали в сыворотке крыс в диапазоне 2000 – 15,6 нг/мл. 96-луночный планшет Nunc (100 мкл/лунку) покрывали рекомбинантным человеческим CD30/TNFRSF8, разведенным в PBS (необходимая концентрация: 0,25 мкг/мл), и закрывали фольгой для ПЦР. Планшеты инкубировали в холодильнике для поддержания температуры 2-8°C в течение ночи. Планшеты с покрытием промывали 3 раза 300 мкл PBST. Добавляли 200 мкл/лунку блокирующего раствора (2%

альбумина в PBST), планшет герметизировали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшеты с покрытием промывали 3 раза 300 мкл PBST. Добавляли 100 мкл/лунку приготовленных стандартов (2000 – 15,6 нг/мл соответствующих ADC, QC и исследуемых образцов), планшет герметизировали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшеты промывали 3 раза 300 мкл PBST. Добавляли 100 мкл/лунку антитела к IgG человека (специфического  $\gamma$ -цепи)-пероксидазы (разведение 1:60000 в PBS) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза 300 мкл PBST, добавляли 50 мкл/лунку TMB. Планшеты герметизировали и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Добавляли 50 мкл/лунку 1 М серной кислоты. Используя устройство для считывания планшетов Тесап, измеряли поглощение при длине волны 450 нм.

**Способ 2:** Для оценки фармакокинетики (ФК) ADC *in vivo* общую концентрацию антител измеряли в различные моменты времени в сыворотке обработанных ADC крыс SD или мышей SCID. Количество общих антител анализировали в сыворотке в диапазоне 2000 – 15,6 нг/мл. 96-луночный планшет Nunc (100 мкл/лунку) покрывали целевым антителом в PBS (Her2 для ADC на основе трастузумаба; необходимая концентрация: 0,25 мкг/мл) и герметизировали фольгой для ПЦР. Планшеты инкубировали в холодильнике для поддержания температуры 2-8°C в течение ночи. Планшеты с покрытием промывали 3 раза 300 мкл PBST. Добавляли 200 мкл/лунку блокирующего раствора (2% альбумина в PBST), планшет герметизировали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшеты с покрытием промывали 3 раза 300 мкл PBST. Добавляли 100 мкл/лунку приготовленных стандартов (2000 – 15,6 нг/мл соответствующих ADC, QC и исследуемых образцов), планшет герметизировали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшеты промывали 3 раза 300 мкл PBST. Добавляли 100 мкл/лунку антитела к IgG человека (специфического  $\gamma$ -цепи)-пероксидазы (разведение 1:60000 в PBS) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза 300 мкл PBST. Добавляли 50 мкл/лунку TMB, планшет герметизировали и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Добавляли 50 мкл/лунку 1 М серной кислоты. Используя устройство для считывания планшетов Тесап, измеряли поглощение при длине волны 450 нм.

Чтобы оценить стабильность ADC *in vivo*, концентрацию интактного ADC измеряли в различные моменты времени в сыворотке крыс SD, обработанных ADC. Интактный ADC анализировали в сыворотке крыс в диапазоне 2000 – 15,6 нг/мл. 96-луночный планшет Nunc

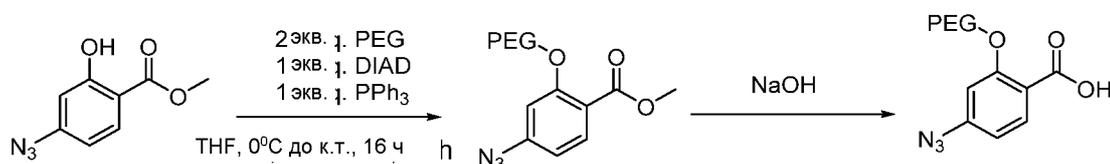
(100 мкл/лунку) покрывали кроличьими моноклональными антителами к экзатекану, разведенными в PBS (необходимая концентрация: 1 мкг/мл), и закрывали фольгой для ПЦР. Планшеты инкубировали в холодильнике для поддержания температуры 2-8°C в течение ночи. Планшеты с покрытием промывали 3 раза 300 мкл PBST. Добавляли 200 мкл/лунку блокирующего раствора (2% альбумина в PBST), планшет герметизировали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшеты с покрытием промывали 3 раза 300 мкл PBST. Добавляли 100 мкл/лунку приготовленных стандартов (2000 – 15,6 нг/мл соответствующих ADC, QC и исследуемых образцов), планшет герметизировали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшеты промывали 3 раза 300 мкл PBST. Добавляли 100 мкл/лунку предварительно абсорбированного антитела козы к IgG человека (H+L) (разведение 1:25000 в PBS) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали 3 раза 300 мкл PBST. Добавляли 100 мкл/лунку TMB. Планшеты герметизировали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Добавляли 100 мкл/лунку 1 М серной кислоты. С помощью устройства для считывания планшетов Тесап измеряли поглощение при длине волны 450 нм.

#### Анализ образцов сыворотки с помощью MS

Супернатант 50 мкл агарозной суспензии антитела к igG человека (Fc-специфического) (Sigma Aldrich, США) удаляли центрифугированием, а оставшуюся смолу трижды промывали 300 мкл PBS. Смолу инкубировали со 100 мкл сыворотки, собранной у грызунов, обработанных соответствующим ADC после определенного времени циркуляции, в течение 1 часа при комнатной температуре. После этого надосадочную жидкость удаляли и смолу 3 раза промывали 300 мкл PBS. После этого инкубировали в течение 5 минут с 60 мкл 100 мМ глицинового буфера, pH 2,3, при комнатной температуре. Этот раствор повторно забуферивали в PBS с использованием 0,5 мл центрифугирующих колонок Zeba™ с 7K MWCO (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы подвергались дальнейшей обработке для MS-измерений, как описано выше.

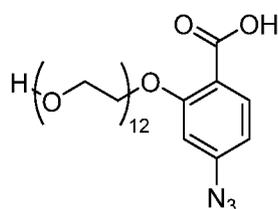
#### **Пример 1: Синтез линкер-полезной нагрузки**

##### Общий способ 1 синтеза негилированных фенилазидов



В круглодонную колбу вместимостью 25 мл вносили 50 мг метил-4-азидо-2-гидроксibenзоата (0,259 ммоль, 1,0 экв.), 0,518 ммоль требуемого PEG-спирта (2,0 экв.) и 82 мг трифенилфосфина (0,311 ммоль, 1,2 экв.) растворяли в 5 мл сухого тетрагидрофурана (THF), и реакционную смесь охлаждали до 0°C. По каплям добавляли 54 мг диизопропилазодикарбоксилата (0,311 ммоль, 1,2 экв.), и раствору давали нагреться до комнатной температуры в течение ночи при перемешивании. Все летучие вещества удаляли в потоке N<sub>2</sub>, а твердые вещества растворяли в 1 мл 2 н. NaOH. Смесь перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре, нейтрализовали 2 н. HCl, и неочищенный продукт очищали с помощью препаративной HPLC.

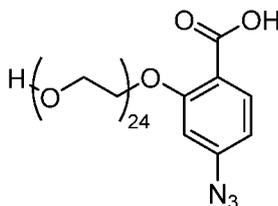
Метил-4-азидо-2-(додекаэтиленгликоль)бензоат



Указанное в заголовке соединение синтезировали в соответствии с общим способом 1 из 18 мг метил-4-азидо-2-гидроксibenзоата (91 мкмоль, 1,00 экв.), 100 мг додекаэтиленгликоля (183 мкмоль, 2,0 экв.), 29 мг трифенилфосфина (110 мкмоль, 1,2 экв.), 19 мг диизопропилазодикарбоксилата (110 мкмоль, 1,2 экв.). Продукт получали в виде бесцветного масла после препаративной HPLC (способ D) и лиофилизации (6,2 мг, 8,8 мкмоль, 10%). HR для C<sub>31</sub>H<sub>54</sub>N<sub>3</sub>O<sub>15</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> рассчитанное значение: 708,3550, экспериментальное значение 708,74.

На **фигуре 1** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения метил-4-азидо-2-(додекаэтиленгликоль)бензоата. На горизонтальной оси представлено время удерживания в минутах.

Метил-4-азидо-2-(тетракозаэтиленгликоль)бензоат

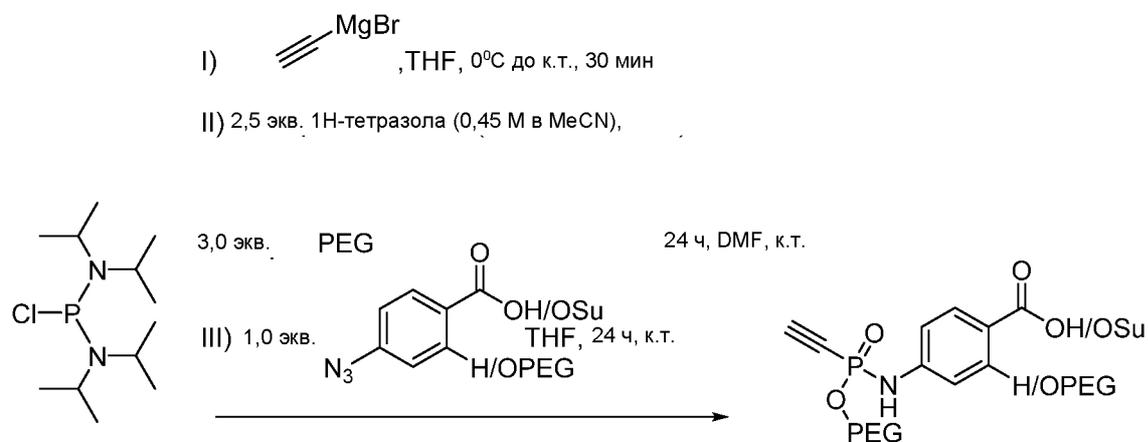


Указанное в заголовке соединение синтезировали в соответствии с общим способом 1 из 36 мг метил-4-азидо-2-гидроксibenзоата (186 мкмоль, 1,00 экв.), 400 мг PEG24 (372 мкмоль, 2,0 экв.), 59 мг трифенилфосфина (223 мкмоль, 1,2 экв.), 39 мг диизопропилазодикарбоксилата (223 мкмоль, 1,2 экв.). Продукт получали в виде

бесцветного масла после препаративной HPLC (способ D) и лиофилизации (58 мг, 46,9 мкмоль, 10%). MS для  $C_{55}H_{102}N_3O_{27}^+$   $[M+H]^+$ : рассчитанное значение: 1236,6696, экспериментальное значение 1237,05.

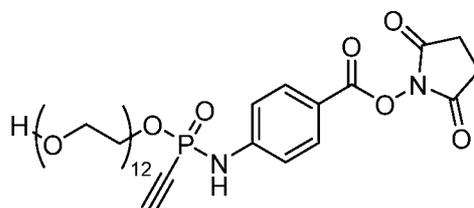
На **фигуре 2** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения метил-4-азидо-2-(тетракозаэтиленгликоль)бензоата. На горизонтальной оси представлено время удерживания в минутах.

Общий способ 2 синтеза пегилированных строительных блоков P5 посредством фосфонитной реакции Штаудингера



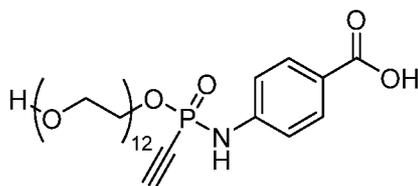
В колбу Шленка вместимостью 25 мл загружали 267 мг бис(диизопропиламино)хлорфосфина (1,00 ммоль, 1,00 экв.) в атмосфере аргона, охлажденного до 0°C, и добавляли по каплям 2,20 мл раствора этинилмагния бромида (0,5 М в THF, 1,10 ммоль, 1,10 экв.). Полученному желтоватому раствору давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали еще 30 минут. Добавляли 3,00 ммоль (3,0 экв.) требуемого PEG-спирта, растворенного в 5,56 мл раствора 1H-тетразола (0,45 М в MeCN, 2,50 ммоль, 2,50 экв.), и полученную белую суспензию перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. За образованием требуемого фосфонита следили с помощью  $^{31}P$ -ЯМР. Добавляли 1,0 ммоль (1,0 экв.) требуемого азида, растворенного в 2 мл DMF, THF или MeCN, и полученную суспензию дополнительно перемешивали в течение 24 часов при комнатной температуре. Неочищенную реакционную смесь очищали с помощью препаративной HPLC.

P5(PEG12)-OSu



Указанное в заголовке соединение синтезировали в соответствии с общим способом 2 из 19,5 мг бис(диизопропиламино)хлорфосфина (73 мкмоль, 1,00 экв.), 146 мкл раствора этинилмагния бромида (0,5 М в THF, 73 мкмоль, 1,00 экв.), 100 мг додекаэтиленгликоля (183 мкмоль, 2,50 экв.), 400 мкл раствора 1Н-тетразола (0,45 М в MeCN, 183 мкмоль) и 19 мг N-гидроксисукцинимидного эфира 4-азидобензойной кислоты (73 мкмоль, 1,00 экв.). Продукт получали в виде бесцветного масла после препаративной HPLC (способ D) и лиофилизации (42,5 мг, 50 мкмоль, 68%). <sup>1</sup>H ЯМР (300 МГц, ацетонитрил-d<sub>3</sub>) δ 8,06 (d, J = 8,7 Гц, 2H), 7,32 (d, J = 8,8 Гц, 2H), 4,40 – 4,14 (m, 2H), 3,79 – 3,69 (m, 2H), 3,66 – 3,47 (m, 40H), 3,21 (d, J = 13,1 Гц, 1H), 2,86 (s, 4H), 1,30 (m, 2H), 1,13 – 0,79 (m, 2H). <sup>13</sup>C ЯМР (151 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 169,77, 169,46, 161,66, 161,47, 152,75, 146,09, 132,90, 132,24, 117,82, 113,97, 113,29, 89,25, 88,92, 77,27, 77,06, 76,85, 74,69, 72,57, 71,19, 70,62, 70,54, 70,51, 70,47, 70,44, 70,36, 70,27, 70,20, 69,74, 69,70, 68,14, 65,77, 65,73, 61,63, 61,60, 40,72, 30,34, 25,68. <sup>31</sup>P ЯМР (122 МГц, ацетонитрил-d<sub>3</sub>) δ -10,87. HRMS C<sub>37</sub>H<sub>60</sub>N<sub>2</sub>O<sub>19</sub>P<sup>+</sup> рассчитанное значение: 851,3573 [M+H]<sup>+</sup>, 851,3571.

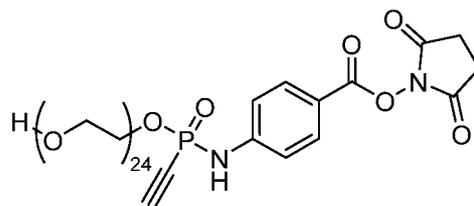
P5(PEG12)-COOH



Указанное в заголовке соединение синтезировали в соответствии с общим способом 2 из 40 мг бис(диизопропиламино)хлорфосфина (150 мкмоль, 1,00 экв.), 360 мкл раствора этинилмагния бромида (0,5 М в THF, 180 мкмоль, 1,2 экв.), 245 мг PEG12 (450 мкмоль, 3,0 экв.), 0,83 мл раствора 1Н-тетразола (0,45 М в MeCN, 450 мкмоль, 2,5 экв.) и 39 мг 4-азидобензойной кислоты (150 мкмоль, 1,00 экв.). Продукт получали в виде бесцветного масла после препаративной HPLC (способ D) и лиофилизации (25 мг, 34 мкмоль, 23%). HR-MS для C<sub>33</sub>H<sub>57</sub>NO<sub>16</sub>P<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> рассчитанное значение: 754,3410, экспериментальное значение 754,3398

На **фигуре 3** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG12)-COOH.

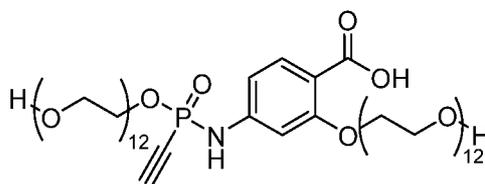
P5(PEG24)-OSu



Указанное в заголовке соединение синтезировали в соответствии с общим способом 2 из 41 мг бис(диизопропиламино)хлорфосфина (159 мкмоль, 1,00 экв.), 370 мкл раствора этинилмагния бромида (0,5 М в THF, 185 мкмоль, 1,2 экв.), 450 мг PEG24 (388 мкмоль, 2,50 экв.), 1,02 мл раствора 1Н-тетразола (0,45 М в MeCN, 466 мкмоль, 3,0 экв.) и 40 мг N-гидроксисукцинимидного эфира 4-азидобензойной кислоты (155 мкмоль, 1,00 экв.). Продукт получали в виде бесцветного масла после препаративной HPLC (способ D) и лиофилизации (79 мг, 57 мкмоль, 37%). MS для  $C_{61}H_{109}N_2O_{30}P^{2+}$   $[M+2H]^{2+}$  рассчитанное значение: 690,3396, экспериментальное значение 690,81.

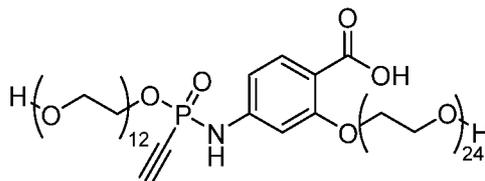
На **фигуре 4** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG24)-OSu. На горизонтальной оси представлено время удерживания в минутах.

P5(PEG12, PEG12)-COOH



Указанное в заголовке соединение синтезировали в соответствии с общим способом 2 из 6,8 мг бис(диизопропиламино)хлорфосфина (25 мкмоль, 1,00 экв.), 61 мкл раствора этинилмагния бромида (0,5 М в THF, 31 мкмоль, 1,2 экв.), 42 мг додекаэтиленгликоля (76 мкмоль, 3,0 экв.), 164 мкл раствора 1Н-тетразола (0,45 М в MeCN, 64 мкмоль, 2,5 экв.) и 18,4 мг метил-4-азидо-2-(додекаэтиленгликоль)бензоата (25 мкмоль, 1,00 экв.). Продукт получали в виде бесцветного масла после препаративной HPLC (способ D) и лиофилизации (4,8 мг, 3,4 мкмоль, 13%). MS для  $C_{57}H_{106}NO_{29}P^{2+}$   $[M+2H]^{2+}$  рассчитанное значение: 649,8289, экспериментальное значение 650,22.

P5(PEG12, PEG24)-COOH

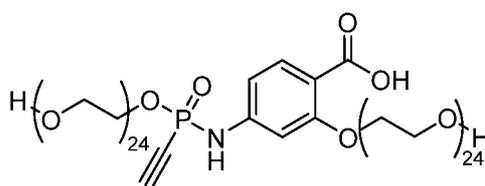


Указанное в заголовке соединение синтезировали в соответствии с общим способом 2 из 5,4 мг бис(диизопропиламино)хлорфосфина (20 мкмоль, 1,00 экв.), 50 мкл раствора

этинилмагния бромида (0,5 М в THF, 24 мкмоль, 1,2 экв.), 33 мг додекаэтиленгликоля (61 мкмоль, 3,0 экв.), 115 мкл раствора 1Н-тетразола (0,45 М в MeCN, 51 мкмоль, 3,0 экв.) и 25 мг метил-4-азидо-2-(тетракозаэтиленгликоль)бензоата (20 мкмоль, 1,00 экв.). Продукт получали в виде бесцветного масла после препаративной HPLC (способ D) и лиофилизации (6,6 мг, 3,6 мкмоль, 18%). MS для  $C_{81}H_{154}NO_{41}P^{2+}$   $[M+2H]^{2+}$  рассчитанное значение: 913,9862, экспериментальное значение 914,45.

На **фигуре 5** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG12,PEG24)-COOH. На горизонтальной оси представлено время удерживания в минутах.

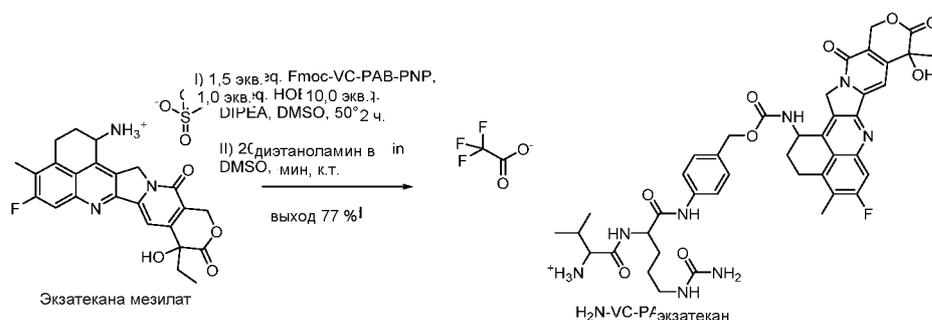
P5(PEG24,PEG24)-COOH



Указанное в заголовке соединение синтезировали в соответствии с общим способом 2 из 5,4 мг бис(диизопропиламино)хлорфосфина (20 мкмоль, 1,00 экв.), 50 мкл раствора этинилмагния бромида (0,5 М в THF, 24 мкмоль, 1,2 экв.), 65 мг PEG24 (61 мкмоль, 3,0 экв.), 115 мкл раствора 1Н-тетразола (0,45 М в MeCN, 51 мкмоль, 3,0 экв.) и 25 мг метил-4-азидо-2-(тетракозаэтиленгликоль)бензоата (20 мкмоль, 1,00 экв.). Продукт получали в виде бесцветного масла после препаративной HPLC (способ D) и лиофилизации (18,4 мг, 7,5 мкмоль, 37%). MS для  $C_{105}H_{202}NO_{53}P^{2+}$   $[M+2H]^{2+}$  рассчитанное значение: 1178,6451, экспериментальное значение 1178,69.

На **фигуре 6** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG24,PEG24)-COOH. На горизонтальной оси представлено время удерживания в минутах.

Соль TFA  $NH_2$ -VC-PAВ-экзатекана

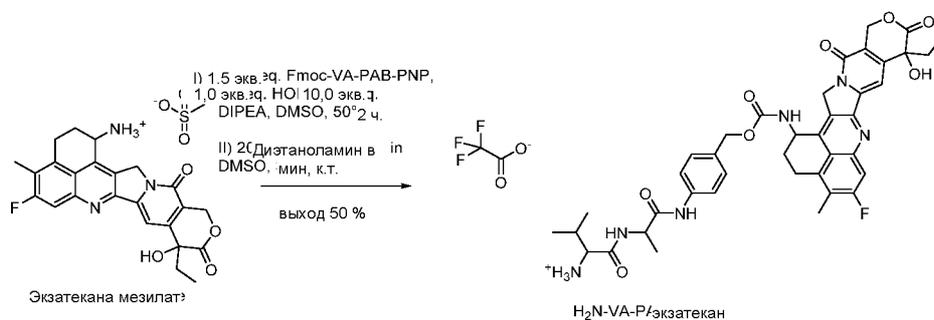


Во флакон с завинчивающейся крышкой вносили 34,3 мг экзатекана мезилата (0,0645 ммоль, 1,0 экв.) и суспендировали в 645 мкл сухого DMSO. Добавляли 241 мкл раствора 0,4 моль/л раствора Fmoc-VC-PAB-PNP в безводном DMSO (0,0967 ммоль, 1,5 экв.), 64,5 мкл 1 моль/л раствора гидрата HOBt в безводном DMSO (0,0645 ммоль, 1,0 экв.) и 113 мкл DIPEA (0,645 ммоль, 10,0 экв.). Полученный желтый раствор перемешивали в течение 2 часов при 50°C. После этого добавляли 425 мкл раствора 50% диэтанолamina в безводном DMSO (мас./мас.), и реакционной смеси давали перемешиваться при комнатной температуре в течение еще 30 минут. Добавляли 1,5 мл MeCN и 2,5 мл H<sub>2</sub>O, и полученный желтый раствор непосредственно очищали с помощью препаративной HPLC, используя способ D. После лиофилизации получали 47,3 мг (76,7%, 0,0495 ммоль) желтоватого твердого вещества в виде соли TFA.

HR-MS для C<sub>43</sub>H<sub>50</sub>FN<sub>8</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> рассчитанное значение: 841,3680, экспериментальное значение 841,3696

На **фигуре 7** представлена хроматограмма аналитической HPLC соли TFA соединения NH<sub>2</sub>-VC-PAB-экзатекана.

Соль TFA NH<sub>2</sub>-VA-PAB-экзатекана

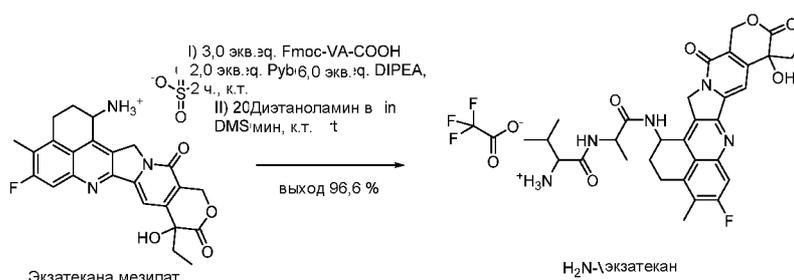


Во флакон с завинчивающейся крышкой вносили 1,23 мг экзатекана мезилата (0,00232 ммоль, 1,0 экв.) и суспендировали в 23 мкл сухого DMSO. Добавляли 8,7 мкл раствора 0,4 моль/л раствора Fmoc-VA-PAB-PNP в безводном DMSO (0,00348 ммоль, 1,5 экв.), 2,3 мкл 1 моль/л раствора гидрата HOBt в безводном DMSO (0,00232 ммоль, 1,0 экв.) и 4 мкл DIPEA (0,0232 ммоль, 10,0 экв.). Полученный желтый раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. После этого добавляли 15 мкл раствора 50% диэтанолamina в безводном DMSO (мас./мас.) и реакционной смеси давали перемешиваться при комнатной температуре в течение еще 30 минут. Добавляли 1,5 мл MeCN и 2,5 мл H<sub>2</sub>O, и полученный желтый раствор непосредственно очищали с помощью препаративной HPLC, используя способ C. После лиофилизации получали 1,01 мг (50,0%, 0,00116 ммоль) желтоватого твердого вещества в виде соли TFA.

HR-MS для  $C_{40}H_{44}FN_6O_8^+$   $[M+H]^+$  рассчитанное значение: 755,3200, экспериментальное значение 755,3201.

На **фигуре 8** представлена хроматограмма аналитической HPLC соли TFA соединения NH<sub>2</sub>-VA-ПАВ-экзатекана.

NH<sub>2</sub>-VA-экзатекан



Во флакон с завинчивающейся крышкой вносили 5,12 мг экзатекана мезилата (0,00964 ммоль, 1,0 экв.) и суспендировали в 96 мкл сухого DMSO. Добавляли 96 мкл раствора 300 мМ Fmoc-VA-COOH (0,02892, 3,0 экв.) в безводном DMSO, 96 мкл раствора 200 мМ Rubor (0,01928 ммоль, 2,0 экв.) в безводном DMSO и 33,4 мкл DIPEA (0,0289 ммоль, 6,0 экв.) и раствор перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. Добавляли 1,5 мл MeCN и 2,5 мл H<sub>2</sub>O, и полученный желтый раствор непосредственно очищали с помощью препаративной HPLC, используя способ С. Два диастереоизомера разделяли (изомер А, элюируемый сначала, и изомер В, элюируемый во второй раз). После лиофилизации получали 5,04 мг изомера А (72,6 %, 0,0070 ммоль), желтоватое твердое вещество, и 1,68 мг изомера В (24,0 %, 0,00232 ммоль), желтоватое твердое вещество получали в виде солей TFA.

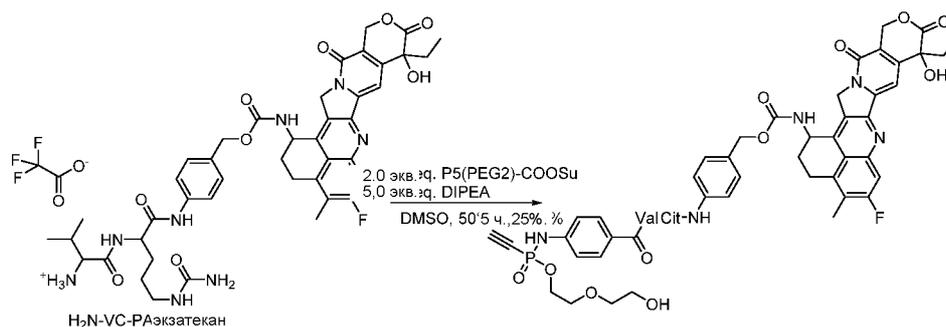
HR-MS для изомера А  $C_{32}H_{37}FN_5O_6^+$   $[M+H]^+$  рассчитанное значение: 606,2723, экспериментальное значение 606,2744.

HR-MS для изомера В  $C_{32}H_{37}FN_5O_6^+$   $[M+H]^+$  рассчитанное значение: 606,2723, экспериментальное значение 606,2744).

На **фигуре 9** представлена хроматограмма аналитической HPLC изомера А соединения NH<sub>2</sub>-VA-экзатекан.

На **фигуре 10** представлена хроматограмма аналитической HPLC изомера В соединения NH<sub>2</sub>-VA-экзатекан.

P5(PEG2)-VC-ПАВ-экзатекан

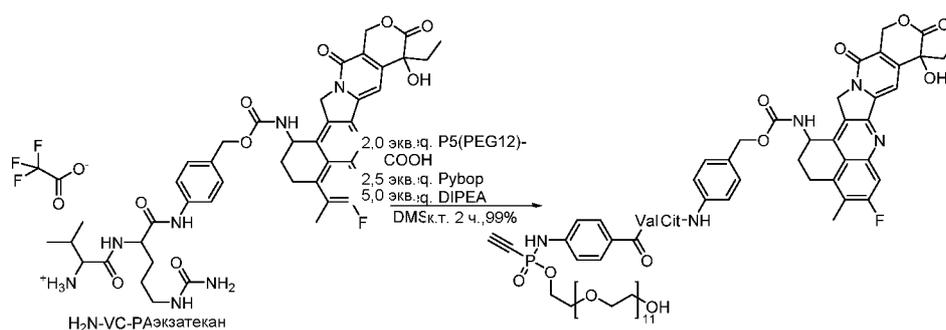


Во флакон с завинчивающейся крышкой вносили 23,4 мкл 200 мМ раствора соли TFA  $\text{NH}_2\text{-VC-PAB-экзатекан}$  в безводном DMSO (0,00468 ммоль, 1,0 экв.), 46,8 мкл 200 мМ раствор 2-(2-гидроксиэтокси)этил-N-(4-бензойной кислоты-N-гидроксисукцинимидэфир)-P-этинилфосфоамидата (P5(PEG2)-COOSu, 0,00936 ммоль, 2,0 экв.) и 4,08 мкл DIPEA (0,0234 ммоль, 5,0 экв.). Раствор встряхивали в течение 5 часов при 50°C, охлаждали до комнатной температуры, добавляли 1,5 мл MeCN и 2,5 мл H<sub>2</sub>O, и полученный раствор непосредственно очищали с помощью препаративной HPLC, используя способ С. После лиофилизации получали 1,33 мг (25,0 %, 0,00117 ммоль) желтоватого твердого вещества.

HR-MS для  $\text{C}_{56}\text{H}_{64}\text{FN}_9\text{O}_{14}\text{P}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  рассчитанное значение: 1136,4289, экспериментальное значение 1136,4306.

На **фигуре 11** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG2)-VC-PAB-экзатекан.

#### P5(PEG12)-VC-PAB-экзатекан



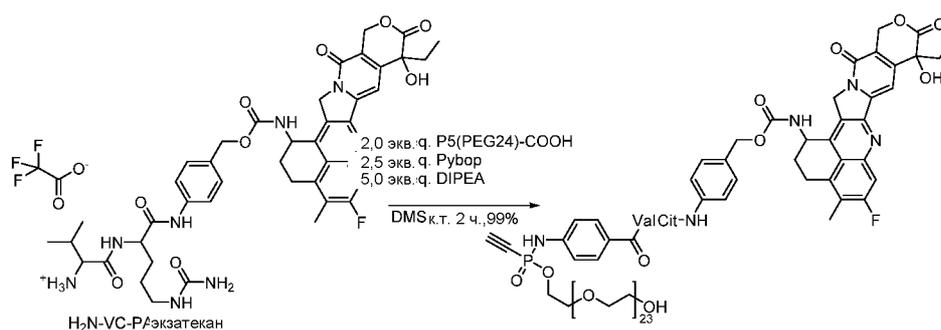
Во флакон с завинчивающейся крышкой вносили 51 мкл 200 мМ раствора соли TFA  $\text{NH}_2\text{-VC-PAB-экзатекан}$  в безводном DMSO (0,0102 ммоль, 1,0 экв.), 102 мкл 200 мМ раствора PEG12-N-(4-бензойной кислоты)-P-этинилфосфоамидата (P5(PEG12)-COOH, 0,0204 ммоль, 2,0 экв.) в безводном DMSO, 102 мкл 250 мМ раствора Pyбор (0,0255 ммоль, 2,5 экв.) в безводном DMSO и 8,89 мкл DIPEA (0,051 ммоль, 5,0 экв.). Раствор встряхивали в течение 2 часов при комнатной температуре, добавляли 1,5 мл MeCN и 2,5 мл H<sub>2</sub>O, и полученный раствор непосредственно очищали с помощью препаративной HPLC,

используя способ D. После лиофилизации получали 15,91 мг (99,0 %, 0,0101 ммоль) желтоватого твердого вещества.

HR-MS для  $C_{76}H_{105}FN_9O_{24}P^{2+}$   $[M+H]^{2+}$  рассчитанное значение: 788,8492, экспериментальное значение 788,8485.

На **фигуре 12** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG12)-VC-PAB-экзатекан.

P5(PEG24)-VC-PAB-экзатекан

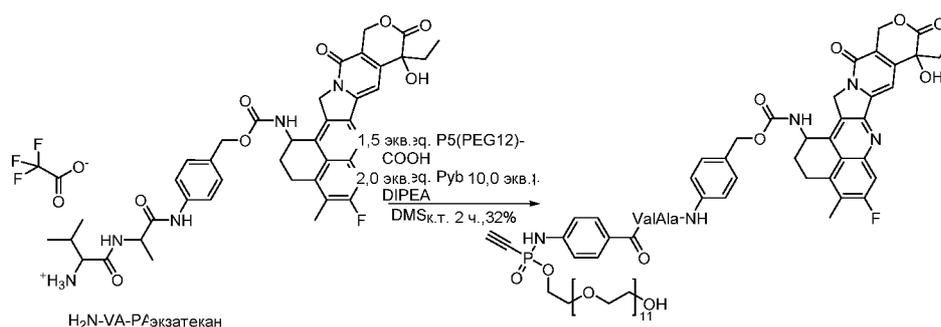


Во флакон с завинчивающейся крышкой вносили 102 мкл 200 мМ раствора соли TFA  $NH_2$ -VC-PAB-экзатекана в безводном DMSO (0,0204 ммоль, 1,0 экв.), 204 мкл 200 мМ раствора PEG24-N-(4-бензойной кислоты)-P-этинилфосфоамида (P5(PEG24)-COOH, 0,0408 ммоль, 2,0 экв.) в безводном DMSO, 204 мкл 250 мМ раствора Pybop (0,051 ммоль, 2,5 экв.) в безводном DMSO и 17,78 мкл DIPEA (0,102 ммоль, 5,0 экв.). Раствор встряхивали в течение 2 часов при комнатной температуре, добавляли 1,5 мл MeCN и 2,5 мл  $H_2O$ , и полученный раствор непосредственно очищали с помощью препаративной HPLC, используя способ D. После лиофилизации получали 25,76 мг (60,0%, 0,01224 ммоль) желтоватого твердого вещества.

HR-MS для  $C_{100}H_{153}FN_9O_{36}P^{2+}$   $[M+H]^{2+}$  рассчитанное значение: 1053,5081, экспериментальное значение 1053,50833.

На **фигуре 13** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG12)-VA-PAB-экзатекан.

P5(PEG12)-VA-PAB-экзатекан

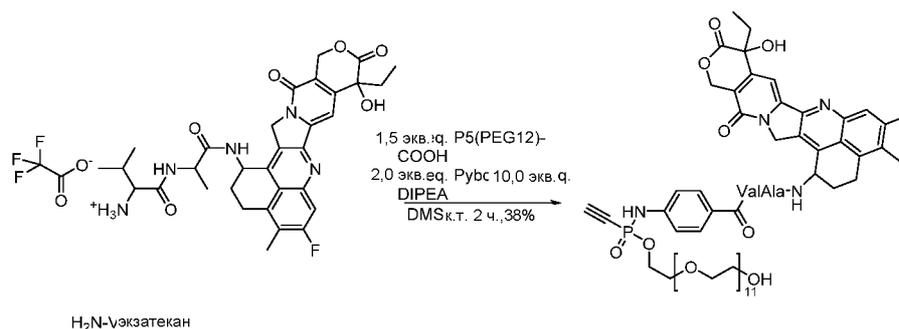


Во флакон с завинчивающейся крышкой вносили 11,6 мкл 100 мМ раствора соли TFA NH<sub>2</sub>-VA-PAВ-экзатекана в безводном DMSO (0,00116 ммоль, 1,0 экв.), 8,7 мкл 200 мМ раствора PEG12-N-(4-бензойной кислоты)-P-этинилфосфоамидата (P5(PEG12)-COOH, 0,00174 ммоль, 1,5 экв.) в безводном DMSO, 11,6 мкл 200 мМ раствора Рубор (0,00232 ммоль, 2,0 экв.) в безводном DMSO и 2,02 мкл DIPEA (0,0116 ммоль, 10,0 экв.). Раствор встряхивали в течение 2 часов при комнатной температуре, добавляли 1,5 мл MeCN и 2,5 мл H<sub>2</sub>O, и полученный раствор непосредственно очищали с помощью препаративной HPLC, используя способ С. После лиофилизации получали 0,56 мг (32,2%, 0,000375 ммоль) желтоватого твердого вещества.

HR-MS для C<sub>73</sub>H<sub>99</sub>FN<sub>7</sub>O<sub>23</sub>P<sup>2+</sup> [M+H]<sup>2+</sup> рассчитанное значение: 745,8252, экспериментальное значение 745,8255.

На **фигуре 14** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG12)-BA-PAВ-экзатекан.

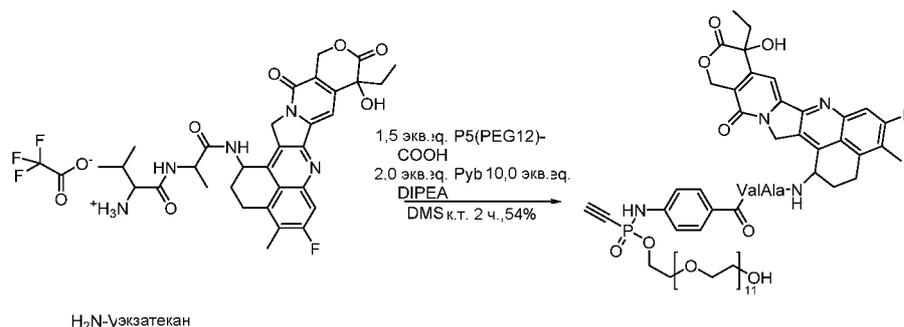
P5(PEG12)-VA-экзатекан из изомера А



Во флакон с завинчивающейся крышкой вносили 35 мкл 200 мМ раствора соли TFA NH<sub>2</sub>-VA-экзатекана (изомер А) в безводном DMSO (0,0070 ммоль, 1,0 экв.), 52,5 мкл 200 мМ раствора PEG12-N-(4-бензойной кислоты)-P-этинилфосфоамидата (P5(PEG12)-COOH, 0,0104 ммоль, 1,5 экв.) в безводном DMSO, 70 мкл 200 мМ раствора Рубор (0,0140 ммоль, 2,0 экв.) в безводном DMSO и 12,2 мкл DIPEA (0,07 ммоль, 10,0 экв.). Раствор встряхивали в течение 2 часов при комнатной температуре, добавляли 1,5 мл MeCN и 2,5 мл H<sub>2</sub>O, и полученный раствор непосредственно очищали с помощью препаративной HPLC, используя способ С. После лиофилизации получали 3,6 мг (38,4%, 0,0026 ммоль) желтоватого твердого вещества.

HR-MS для C<sub>65</sub>H<sub>92</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>21</sub>P<sup>2+</sup> [M+H]<sup>2+</sup> рассчитанное значение: 671,3013, экспериментальное значение 671,3004.

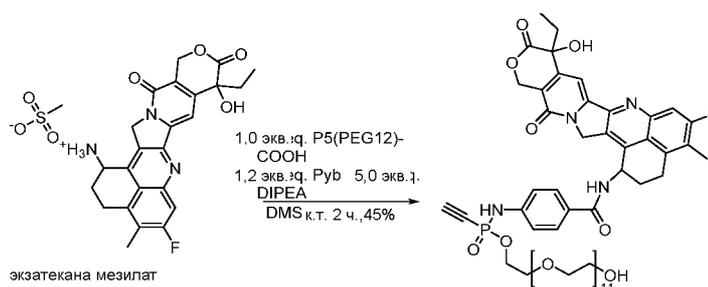
На **фигуре 15** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG12)-VA-экзатекан из изомера А.

*P5(PEG12)-VA-экзатекан из изомера В*

Во флакон с завинчивающейся крышкой вносили 11,6 мкл 200 мМ раствора соли TFA NH<sub>2</sub>-VA-экзатекана (изомер А) в безводном DMSO (0,0023 ммоль, 1,0 экв.), 17,4 мкл 200 мМ раствора PEG12-N-(4-бензойной кислоты)-P-этинилфосфоамидата (P5(PEG12)-COOH, 0,00345 ммоль, 1,5 экв.) в безводном DMSO, 23,3 мкл 200 мМ раствора Pyбор (0,0046 ммоль, 2,0 экв.) в безводном DMSO и 4,04 мкл DIPEA (0,023 ммоль, 10,0 экв.). Раствор встряхивали в течение 2 часов при комнатной температуре, добавляли 1,5 мл MeCN и 2,5 мл H<sub>2</sub>O, и полученный раствор непосредственно очищали с помощью препаративной HPLC, используя способ С. После лиофилизации получали 1,68 мг (54,0 %, 0,0012 ммоль) желтоватого твердого вещества.

HR-MS для C<sub>65</sub>H<sub>92</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>21</sub>P<sup>2+</sup> [M+H]<sup>2+</sup> рассчитанное значение: 671,3013, экспериментальное значение 671,3004.

На **фигуре 16** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG12)-VA-экзатекан из изомера В.

*P5(PEG12)-экзатекан*

Во флакон с завинчивающейся крышкой вносили 50 мкл 100 мМ суспензии экзатекана мезилата в безводном DMSO (0,005 ммоль, 1,0 экв.), 20 мкл 250 мМ раствора PEG12-N-(4-бензойной кислоты)-P-этинилфосфоамидата (P5(PEG12)-COOH, 0,005 ммоль, 1,0 экв.) в безводном DMSO, 20 мкл 300 мМ раствора Pyбор (0,006 ммоль, 1,2 экв.) в безводном DMSO и 4,33 мкл DIPEA (0,025 ммоль, 5,0 экв.). Раствор встряхивали в течение 2 часов при комнатной температуре, добавляли 1,5 мл MeCN и 2,5 мл H<sub>2</sub>O, и полученный раствор непосредственно очищали с помощью препаративной HPLC, используя способ С.

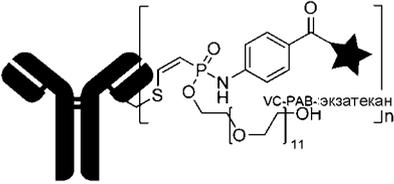
После лиофилизации получали 2,63 мг (45,0 %, 0,0023 ммоль) желтоватого твердого вещества.

HR-MS для  $C_{57}H_{77}FN_4O_{19}P^+$   $[M+H]^+$  рассчитанное значение: 1171,4899, экспериментальное значение 1171,4852.

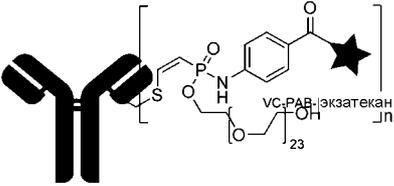
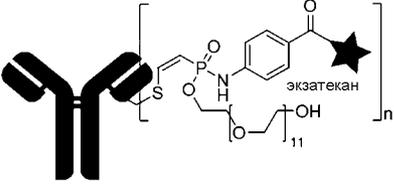
На **фигуре 17** представлена хроматограмма аналитической HPLC соединения P5(PEG12)-экзатекан.

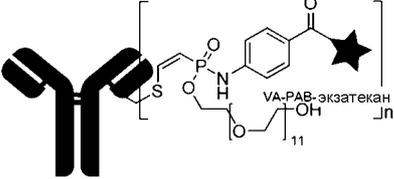
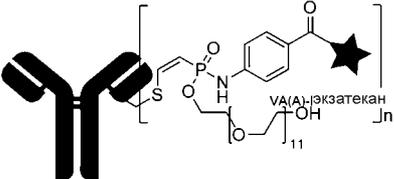
**Пример 2: Аналитика синтезированных ADC и исходных веществ антител**

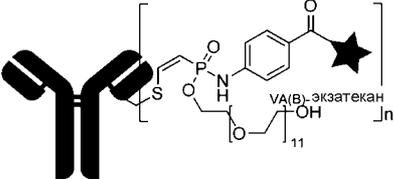
Антитело/ADC	Аналитическая SEC	Аналитическая HIC	MS-анализ полностью конъюгированных видов DAR8, DAR	Выход ADC (концентрация белка) после конъюгации и очистки
 Трастузумаб	См. <b>фигуру 18</b>	См. <b>фигуру 19</b>	LC: рассчитанное значение: 23439 экспериментальное значение: 23438  HC: рассчитанное значение: 49146 экспериментальное значение: 49149	-/-
 Брентуксимаб	См. <b>фигуру 20</b>	См. <b>фигуру 21</b>	LC: рассчитанное значение: 23724 экспериментальное значение: 23724	-/-

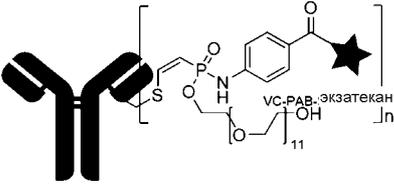
			ьное значение: 23724  НС: рассчитанное значение: 48878 экспериментал ьное значение: 48877	
 Паливизумаб	См. <b>фигуру</b> <b>22</b>	См. <b>фигуру</b> <b>23</b>	LC: рассчитанное значение: 23296 экспериментал ьное значение: 23294  НС: рассчитанное значение: 49200 экспериментал ьное значение: 49202	-/-
 Трастузумаб-Р5(РЕG12)- VC-РАВ-экзатекан	См. <b>фигуру</b> <b>24</b>	См. <b>фигуру</b> <b>25</b>	DARav: 4,91  LC: рассчитанное значение: 25015	80%

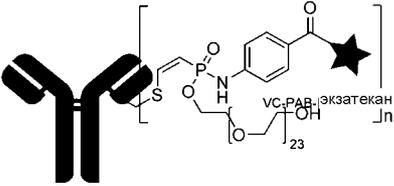
			экспериментальное значение: 25014  НС: рассчитанное значение: 53873 экспериментальное значение: 53878	
--	--	--	--	--

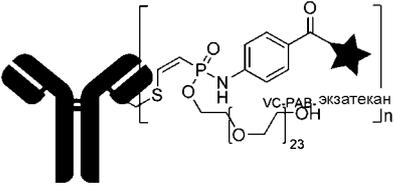
 <p>Трастузумаб-Р5(РЕG24)- VC-РАВ-экзатекан</p>	<p>См. <b>фигуру</b> <b>26</b></p>	<p>См. <b>фигуру</b> <b>27</b></p>	<p>DARav: 7,91</p> <p>LC: рассчитанное значение: 25544 экспериментал ьное значение: 25543</p> <p>НС: рассчитанное значение: 55461 экспериментал ьное значение: 55464</p>	<p>99%</p>
 <p>Трастузумаб-Р5(РЕG12)- экзатекан</p>	<p>См. <b>фигуру</b> <b>28</b></p>	<p>См. <b>фигуру</b> <b>29</b></p>	<p>DARav: 7,19</p> <p>LC: рассчитанное значение: 24609 экспериментал ьное значение: 24609</p> <p>НС: рассчитанное значение: 52658</p>	<p>97%</p>

			экспериментальное значение: 52661	
 <p>Трастузумаб-Р5(РЕG12)- VA-PAB-экзатекан</p>	См. <b>фигуру 30</b>	См. <b>фигуру 31</b>	<p>DARav: 4,39</p> <p>LC: рассчитанное значение: 24929 экспериментальное значение: 24928</p> <p>НС: рассчитанное значение: 53615 экспериментальное значение: 53620</p>	84%
 <p>Трастузумаб-Р5(РЕG12)- VA-экзатекан (Изомер А)</p>	См. <b>фигуру 32</b>	См. <b>фигуру 33</b>	<p>DARav: 7,89</p> <p>LC: рассчитанное значение: 24780 экспериментальное значение: 24779</p> <p>НС:</p>	77%

			<p>рассчитанное значение: 53168</p> <p>экспериментальное значение:53173</p>	
 <p>Трастузумаб-Р5(РЕG12)- VA-экзатекан (Изомер В)</p>	<p>См. <b>фигуру</b> <b>34</b></p>	<p>См. <b>фигуру</b> <b>35</b></p>	<p>DARav: 7,71</p> <p>LC: рассчитанное значение: 24780</p> <p>экспериментальное значение: 24779</p> <p>НС: рассчитанное значение: 53168</p> <p>экспериментальное значение:53173</p>	86%

 <p>Брентуксимаб-Р5(РЕG12)- VC-РАВ-экзатекан</p>	<p>См. <b>фигуру</b> <b>36</b></p>	<p>См. <b>фигуру</b> <b>37</b></p>	<p>DARav: 7,6</p> <p>LC: рассчитанное значение: 25300 экспериментал ьное значение: 25299</p> <p>НС: рассчитанное значение: 53605 экспериментал ьное значение: 53605</p>	<p>60%</p>
---	--	--	---	------------

 <p>Брентуксимаб-Р5(РЕG24)- VC-PAV-экзатекан</p>	<p>См. <b>фигуру</b> <b>38</b></p>	<p>См. <b>фигуру</b> <b>39</b></p>	<p>DARav: 8,0</p> <p>LC: рассчитанное значение: 25829 экспериментал ьное значение: 25828</p> <p>НС: рассчитанное значение: 55192 экспериментал ьное значение: 55191</p>	<p>71%</p>
---	--	--	---	------------

 <p>Паливизумаб-Р5(РЕG24)- VC-РАВ-экзатекан</p>	<p>См. <b>фигуру</b> <b>40</b></p>	<p>См. <b>фигуру</b> <b>41</b></p>	<p>DARav: 8,0</p> <p>LC: рассчитанное значение: 25401 экспериментальное значение: 25400</p> <p>НС: рассчитанное значение: 55512 экспериментальное значение: 55517</p>	<p>81%</p>
--	--	--	---	------------

DARav означает среднее отношение лекарственного средства к антителу. LC: масса легкой цепи; НС: масса тяжелой цепи.

На **фигуре 18** представлена хроматограмма аналитической SEC трастузумаба. SEC означает эксклюзионную хроматографию.

На **фигуре 19** представлена хроматограмма аналитической НС трастузумаба. НС означает хроматографию гидрофобного взаимодействия.

На **фигуре 20** представлена хроматограмма аналитической SEC брентуксимаба.

На **фигуре 21** представлена хроматограмма аналитической НС брентуксимаба.

На **фигуре 22** представлена хроматограмма аналитической SEC паливизумаба.

На **фигуре 23** представлена хроматограмма аналитической НС паливизумаба.

На **фигуре 24** представлена хроматограмма аналитической SEC трастузумаб-Р5(РЕG12)-VC-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 25** представлена хроматограмма аналитической НС трастузумаб-Р5(РЕG12)-VC-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 26** представлена хроматограмма аналитической SEC трастузумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 27** представлена хроматограмма аналитической НИС трастузумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 28** представлена хроматограмма аналитической SEC трастузумаб-Р5(PEG12)-VA-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 29** представлена хроматограмма аналитической НИС трастузумаб-Р5(PEG12)-VA-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 30** представлена хроматограмма аналитической SEC трастузумаб-Р5(PEG12)-VA-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 31** представлена хроматограмма аналитической НИС трастузумаб-Р5(PEG12)-VA-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 32** представлена хроматограмма аналитической SEC трастузумаб-Р5(PEG12)-VA-экзатекана (изомер А).

На **фигуре 33** представлена хроматограмма аналитической НИС трастузумаб-Р5(PEG12)-VA-экзатекана (изомер А).

На **фигуре 34** представлена хроматограмма аналитической SEC трастузумаб-Р5(PEG12)-VA-экзатекана (изомер В).

На **фигуре 35** представлена хроматограмма аналитической НИС трастузумаб-Р5(PEG12)-VA-экзатекана (изомер В).

На **фигуре 36** представлена хроматограмма аналитической SEC брентуксимаб-Р5(PEG12)-VC-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 37** представлена хроматограмма аналитической НИС брентуксимаб-Р5(PEG12)-VC-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 38** представлена хроматограмма аналитической SEC брентуксимаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 39** представлена хроматограмма аналитической НИС брентуксимаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 40** представлена хроматограмма аналитической SEC паливизумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 41** представлена хроматограмма аналитической НИС паливизумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана.

Хроматограммы SEC (SEC = эксклюзионная хроматография) показывают, что конъюгаты демонстрируют низкую агрегацию или практически ее отсутствие в водном растворе. Было показано, что конъюгаты ADC на основе камптотецина проявляют сильную тенденцию к агрегации уже во время процесса конъюгации с антителом. Эта проблема, в частности, возникает, когда фрагмент камптотецина конъюгируется через VC-PAВ-линкер и малеимидную единицу для конъюгации антитела (Burke et al., “*Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Antibody-Drug Conjugates Comprised of Potent Camptothecin Analogs*”, *Bioconjugate Chem.* 2009, 20, 1242-1250, <https://doi.org/10.1021/bc9001097>). В этом случае сообщалось о агрегированном ADC до 80%.

В противоположность этому, данные SEC, описанные в настоящем документе, демонстрируют высокомономерные ADC на основе камптотецина, включая те, которые несут линкер VC-PAВ, с менее чем 5% агрегатов после очистки во всех исследованных вариантах. В комбинации с описанными в настоящих документах высокими выходами конъюгации, обычно в диапазоне 80-90% на основе определения концентрации антител до и после процесса конъюгации, это ясно показывает, что при использовании описанной в настоящем документе технологии P5-конъюгации образуется лишь незначительный процент агрегатов.

Хроматограммы HIC (HIC = хроматография гидрофобного взаимодействия) показывают, что конъюгаты демонстрируют хорошую гидрофильность в сочетании с превосходной гомогенностью только одного основного вида ADC DAR8, образующегося в процессе конъюгации.

### **Пример 3: Исследование, посвященное синтезу ADC с меньшим DAR**

ADC с более низким DAR (DAR означает «отношение лекарственного средства к антителу») можно синтезировать из P5(PEG24)-VC путем восстановления эквивалентов TCEP в процессе конъюгации антитела. Зависимость эквивалентов TCEP от DAR представлена на **фигуре 42**.

На **фигуре 42** представлены MS-спектры гликозилированного восстановленного трастузумаба после реакции с различными эквивалентами TCEP (наверху) и 15 экв. линкера-полезной нагрузки (P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекан). Расчет DAR по этим спектрам в зависимости от количества TCEP показан на нижнем графике.

### **Пример 4: Оценка цитотоксичности конструкций *in vitro***

Описанные в настоящем документе ADC оценивали на эффективность *in vitro* на антигенположительных (целевых) и антигенотрицательных (нецелевых) линиях клеток. Результаты изображены на **фигуре 43**.

- Селективность в отношении целевой (антиген-положительной) клеточной линии наблюдалась для всех исследованных конструкций.

На **фигуре 43** представлена цитотоксичность *in vitro* ADC трастузумаба (анти-Her2), связанного с различными конструкциями линкерной полезной нагрузки на основе экзатекана, на антиген-положительных клеточных линиях (HCC-78, наверху и SKBR3, внизу слева) и на антиген-отрицательных клеточных линиях (MDA-MB-468, внизу справа).

- Сторона расщепления VC-PAВ обеспечивает высокую активность конструкций *in vitro*. Нерасщепляемый контрольный (P5(PEG12)-экзатекан) и нерасщепляемый VA-изомер P5(PEG12)-VA-экзатекан (изомер В) приводят к снижению активности на целевой клеточной линии.
- Enhertu использовали для сравнения с описанными в настоящем документе ADC, и его можно рассматривать как важный стандарт для ADC на основе камптотецина, поскольку он одобрен и продается для лечения неоперабельного или метастатического HER2-положительного рака молочной железы, перенесшего две или более предыдущие схемы лечения на основе анти-HER2 при метастазах.
- Новые конструкции, описанные в настоящем документе, демонстрируют аналогичные значения IC50 при уничтожении клеток (**фигура 43**), а конструкции на основе P5-VC-PAВ-экзатекана демонстрируют лучшее абсолютное уничтожение клеток HCC-7 по сравнению с Enhertu (**фигура 44**).

На **фигуре 44** представлена цитотоксичность *in vitro* ADC трастузумаба (анти-Her2) (трас-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекан) и несвязывающий контрольный изотип с паливизумабом (пали-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекан) на антиген-положительной клеточной линии (HCC-78).

- Эффект ADC на основе экратекана не только селективен в отношении целевой клеточной линии, как показано на **фигуре 43**, но также специфичен для нацеливающего антитела в целевой клеточной линии, как показано на **фигуре 44**.

На **фигуре 45** представлена цитотоксичность *in vitro* ADC брентуксимаба (анти-CD30) (брен-P5(PEG12)-VC-PAВ-экзатекан) на двух антиген-положительных клеточных линиях (L-540, слева и SU-DHL-1, справа).

На **фигуре 46** представлена цитотоксичность *in vitro* ADC брентуксимаба (анти-CD30) (брен-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекан) на панели антиген-положительных клеточных линий (SR-786, SU-DHL-1, НН, НBLM-2, L-540, MOTN-1) и нецелевой контрольной клеточной линии (HL-60).

- Брен-Р5(PEG12)-VC-РАВ-экзатекан (**фигура 45**) и брен-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекан (**фигура 46**) демонстрируют селективное воздействие на всю панель различных CD30-положительных клеточных линий. HL-60 использовали для демонстрации селективности к мишеням, поскольку на этой клеточной линии не наблюдалось никакого эффекта.

#### **Пример 5: Эффект «свидетеля» *in vitro***

- Эффект «свидетеля» предпочтителен для активности ADC *in vivo*, особенно в контексте солидных опухолей, поскольку он позволяет уничтожать опухолевые клетки с гетерогенными целевыми уровнями экспрессии.
- Поэтому авторы настоящего изобретения разработали эксперимент, в котором являющиеся мишенями клетки (SKBR3, Her2+) инкубировали с конструкциями трас-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана на основе трастузумаба и Enhertu и обрабатывали не являющиеся мишенями клетки (MDA-MB-468) супернатантом культуры SKBR3. Клетки MDA-MB-468 могут быть уничтожены только в результате эффективного уничтожения в рамках эффекта «свидетеля» в этих условиях, поскольку ADC не вызывают уничтожение в одиночку в этой клеточной линии.
- Эффект «свидетеля» был одинаково высоким для Enhertu и для Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана.

На **фигуре 47** представлена оценка эффекта «свидетеля» трастузумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана в непосредственном сравнении с Enhertu. Цитотоксичность ADC *in vitro* на антиген-положительной клеточной линии (SKBR3, наверху слева) и антиген-отрицательной клеточной линии (MDA-MB-468, наверху справа). Перенос супернатанта после инкубирования SKBR-3 с ADC в MDA-MB-468 осуществляли для оценки уничтожения свидетелей (MDA-MB-468, внизу).

#### **Пример 6: Повреждение ДНК**

- Механизм действия ADC на основе камтотецина заключается в одноцепочечных разрывах ДНК после ингибирования ядерной топоизомеразы-I, за которыми следуют двухцепочечные разрывы после репликации в S-фазе.

- Индикатором повреждения ДНК является фосфорилирование гистона H2A.X по Ser139, активированная каспаза 3 и активированный PARP.
- Авторы настоящего изобретения исследовали все три маркера с помощью FACS после обработки трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатеканом и Enhertu.

На **фигуре 48** представлена относительная количественная оценка фосфорилирования гистона H2A.X (наверху слева), активированной каспазы 3 (наверху справа) и активированного PARP (внизу слева) и жизнеспособности клеток (внизу справа) после обработки клеток SKBR-3 трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатеканом, Enhertu, неконъюгированным экзатеканом или неконъюгированным камптотецином через 1, 2 или 3 дня по сравнению с отсутствием обработки.

- Этот набор данных ясно демонстрирует, что уничтожение клеток, описанное в предыдущих примерах, опосредовано способом действия полезных нагрузок, которые доставляются посредством ADC.
- Существенных различий при обработке клеток трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатеканом или Enhertu не наблюдалось.

#### **Пример 7: Стабильность сыворотки**

- Стабильная конъюгация является ключевым фактором для стабильной эффективности во время циркуляции в кровотоке ADC и снижения нецелевой токсичности.
- Для оценки стабильности описанных в настоящем документе конструкций в прямом сравнении с Enhertu авторы настоящего изобретения инкубировали P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекан и Enhertu с крысиной сывороткой в течение разного времени при 37°C с последующим измерением отношения лекарственного средства к антителу по данным LC/MS.

На **фигуре 49** представлено отношение лекарственного средства к антителу для Enhertu и P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана после инкубирования в сыворотке крыс при 37°C в течение 0, 1, 3 и 7 дней. Отношение лекарственного средства к антителу измеряли с помощью MS после удаления ADC из сыворотки.

- Enhertu значительно теряет линкер-полезную нагрузку в сыворотке (потеря полезной нагрузки 63%), что приводит к резкому снижению DAR до 3 уже через 3 дня.
- Напротив, P5 стабилен с DAR до 7,6 через 7 дней (потеря полезной нагрузки 5%).

**Пример 8: Стабильность сыворотки с последующим измерением токсичности *in vitro***

Результаты этих экспериментов представлены на **фигурах 50 и 51**.

На **фигуре 50** представлена цитотоксичность ADC трастузумаб-P5(PEG12)-VC-PAВ-экзатекана (наверху), трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана (в середине) и Enhertu (внизу), измеренная после 0, 1, 3 и 7 дней инкубирования с сывороткой крыс при 37°C на Her2-отрицательной клеточной линии MDA-MB-468 (слева) и Her2-положительной клеточной линии SKBR3 (справа).

На **фигуре 51** представлена цитотоксичность ADC трастузумаб-P5(PEG12)-VC-PAВ-экзатекана (наверху), трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана (в середине) и Enhertu (внизу), измеренная после 0, 1, 3 и 7 дней инкубирования с сывороткой человека при 37°C на Her2-отрицательной клеточной линии MDA-MB-468 (слева) и Her2-положительной клеточной линии SKBR3 (справа).

На **фигурах 50 и 51** представлено снижение эффективности *in vitro* в отношении целевой клеточной линии SKBR3 с увеличением времени инкубирования Enhertu в сыворотке крысы, а также в сыворотке человека. Этот эффект гораздо менее выражен или отсутствует для обеих конструкций трастузумаб-P5-VC-PAВ-экзатекана в сыворотке крови человека и крысы. Таким образом, в отличие от Enhertu, ADC в соответствии с воплощением настоящего изобретения сохраняет свою эффективность в течение времени инкубирования.

Более того, Enhertu демонстрирует возрастающее неспецифическое воздействие на целевую негативную клеточную линию MDA-MB-468 с увеличением времени инкубирования в сыворотке крысы, а также человека. Эта возрастающая неспецифичность отсутствует для обеих конструкций трастузумаб-P5-VC-PAВ-экзатекана в сыворотке крови человека и крысы. Соответственно, в отличие от Enhertu, ADC в соответствии с воплощением настоящего изобретения сохраняет свою селективность в отношении целевой клеточной линии в течение времени инкубирования.

**Пример 9: Оценка конструкций *in vivo***

- Эксперименты по фармакокинетике (ФК) *in vivo* были проведены с брентуксимаб-P5(PEG12)-VC-PAВ-экзатеканом
- Самок крыс Спрег-Дуоли обрабатывали 5 мг/кг брентуксимаб-P5(PEG12)-VC-PAВ-экзатекана

- Отбор проб крови проводили через разные моменты времени, и количество ADC определяли с помощью анализа общего количества антитела брентуксимаба с помощью ELISA в соответствии со способом 1, как описано выше в разделе «Общая информация, материалы и способы».

На **фигуре 52** представлено количественное определение общих антител в кровотоке после обработки самок крыс Спрег-Доули брентуксимаб-Р5(PEG12)-VC-РАВ-экзатеканом-DAR8 с помощью ELISA.

- Данный эксперимент ясно показывает хорошее ФК-поведение с разумной скоростью клиренса.

#### **Пример10: Кривые плавления, оцененные с помощью NanoDSF**

Термическую стабильность белков определяли с помощью нанодифференциальной сканирующей флуориметрии (nanoDSF), которая измеряет зависящие от температуры изменения собственной флуоресценции остатков триптофана и тирозина (Tycho NT.6, NanoTemper Technologies). Для этого 1 мкМ антитела или ADC в PBS поглощали капилляром, который затем помещали в считыватель. После этого измеряли собственную флуоресценцию белка при 330 нМ и 350 нМ при инкубировании при повышенных температурах. Изменения сигнала флуоресценции указывают на переходы в состоянии сворачивания белков, а температуры, при которых происходит переход, называются температурами перегиба (Ti) или также температурами плавления (Tm) (Haffke, M. et al., Label-free Thermal Unfolding Assay of G Protein-Coupled Receptors for Compound Screening and Buffer Composition Optimization. 2016.).

На **фигуре 53** представлены кривые плавления трастузумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана и Enhertu, определенные с использованием нанодифференциальной сканирующей флуориметрии (nanoDSF). Кривые плавления Enhertu и трастузумаб-Р5(PEG24)-VC-РАВ-экзатекана перекрываются, показывая, что биофизическая стабильность белков двух ADC аналогична с почти одинаковыми температурами плавления.

#### **Пример 11: Связывание с внеклеточным Her2, оцененное с помощью проточной цитометрии**

Для определения констант равновесного связывания ( $K_D$ ), SKBR3, Her2<sup>+</sup>-клетки инкубировали с антителами и ADC в концентрациях в диапазоне от 0,0001 до 200 нМ и окрашивали вторичным антителом к IgG человека H+L, меченным красителем Alexa (Thermo Fisher Scientific) и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Коэффициенты средней интенсивности флуоресценции (MFI) нормализовали по контролю неспецифического связывания. Анализ проводили в двух повторах, а точки данных анализировали с помощью нелинейной регрессии с использованием модели специфического связывания с одним сайтом для получения значений  $K_D$  с использованием программного обеспечения Prism 9. График на **фигуре 54** показывает средние значения  $n = 2 \pm \text{SEM}$ .

На **фигуре 54** представлен график для определения равновесных констант связывания ( $K_D$ ) для связывания Enhertu и трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAB-экзатекана с внеклеточным Her2, а также полученные значения равновесных констант связывания ( $K_D$ ). Результаты показывают, что связывание Enhertu и трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAB-экзатекана с внеклеточным Her2 существенно не отличается, что указывает на то, что биофизическая способность двух ADC связывать целевой рецептор Her2 аналогична с почти идентичным  $K_D$ .

#### **Пример 12: Стресс-тест агрегации**

Трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAB-экзатекан, имеющий отношение лекарственного средства к антителу 8 (обозначенное в настоящем документе «DAR8»), и Enhertu были приготовлены в буфере, содержащем 20 mM фосфата, 20 mM трегалозы и 0,009% полисорбата 20 в концентрации 1 мг/мл. Образцы были стерильно отфильтрованы с использованием центробежных фильтров UFC30GV0S (Merck, Германия) и инкубированы при 4°C или при 37°C в темноте. Образцы по 50 мкл отбирали через 1, 2, 3 и 4 недели и анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии, как описано выше.

Известно, что агрегация ADC, происходящая во время циркуляции в кровотоке у пациента, вызывает нецелевую токсичность. На **фигуре 55** представлен процент агрегатов, образовавшихся при инкубировании трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAB-экзатекана DAR8 и Enhertu при 37°C и 4°C в темноте через 0, 1, 2 и 4 недели. Результаты ясно показывают снижение агрегации ADC трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAB-экзатекана DAR8 в условиях инкубирования по сравнению с Enhertu, что является преимуществом описанной в настоящем документе технологии.

#### **Пример 13: ADCC конъюгированных антител**

Для анализа антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) на основе высвобождения кальцеина замороженные первичные естественные клетки-киллеры (NK), полученные от здорового донора, выделенные из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMCs) путем отрицательной селекции, приобретали в качестве эффекторных

клеток (Lonza). Her2-положительные клетки-мишени окрашивали 16 мкМ кальцеина АМ (Thermo Fisher Scientific). Затем NK-клетки и клетки-мишени инкубировали при отношении эффектор-мишень 3:1 в течение 4 часов при 37°C в присутствии 50 нМ трастузумаба, трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана, Enhertu и коммерческого изотипа IgG1 человека (BioLegend). Положительным контролем служили клетки, пермеабиллизированные 2,5% тритоном X (Sigma-Aldrich). Супернатанты переносили на плоский черный несвязывающий 96-луночный планшет (Greiner Bio-One) и измеряли флуоресценцию при 485/535 нм с использованием считывателя Infinite M1000 Pro (Tecan).

Процент специфического уничтожения рассчитывали путем деления кальцеина, высвобожденного в результате антитело-опосредованного уничтожения, за вычетом фонового высвобождения кальцеина (NK + мишени) из кальцеина, высвобожденного клетками, проницаемыми для тритона X (максимальное уничтожение), за вычетом фонового высвобождения кальцеина (только мишени). Авторы изобретения определяли либо максимальное ADCC/специфическое уничтожение при 15 мкг/мл, либо строили кривую уничтожения, зависящую от концентрации, которую анализировали с помощью нелинейной регрессии с использованием модели специфического связывания с одним сайтом.

На **фигуре 56** представлен процент специфического уничтожения, измеренный в анализе антитело-зависимой клеточной циклотоксичности (ADCC) на основе высвобождения кальцеина с Her2-положительными клетками-мишенями SKBR-3, SKOV-3 и N87 при использовании неконъюгированного трастузумаба, ADC трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана, имеющего отношение лекарственного средства к антителу 8 (DAR8), Enhertu и контрольного изотипа. Результаты показывают лучший ADCC-эффект для трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 по сравнению с Enhertu. Эффекторные функции подвергаются меньшему влиянию при использовании трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8, имеющего P5-линкер, по сравнению с Enhertu.

#### **Пример 14: Интернализация конъюгированных антител**

Для исследования интернализации на основе pHrodo антитела и ADC метили с помощью набора для маркировки антител pHrodo™ Deep Red (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Her2-положительные клетки солидной опухоли и отрицательные клетки инкубировали с 5 мкг/мл меченных pHrodo антител или ADC в течение 1 часа, 5 часов и 24 часов при 37°C. Увеличение MFI указывает на наличие антител в поздних эндосомальных и лизосомальных компартментах. Отношение MFI

определяли путем деления MFI клеток, инкубированных с pHrodo, на MFI неокрашенных клеток.

На **фигуре 57** представлены результаты исследования интернализации на основе pHrodo с использованием неконъюгированного трастузумаба, трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 и Enhertu с Her2-положительными клетками SKOV-3 и Her2-отрицательными MDA-MB-468 клетками. Интернализация в целевые клетки Her2 аналогична для трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 по сравнению с Enhertu, тогда как нежелательная интернализация в целевые негативные клетки ниже. Это наблюдение может снизить нецелевую токсичность, вызванную интернализацией ADC в нецелевые клетки.

**Пример 15: Дополнительные данные об эффективности *in vitro* в прямом сравнении с Enhertu**

Цитотоксичность *in vitro* измеряли, как описано выше в разделе «Общая информация, материалы и способы».

На **фигуре 58** представлены результаты измерений цитотоксичности *in vitro*, проведенных с использованием трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 и Enhertu с Her2-положительными клетками SKBR-3 (Her2++), N87 (Her2++), HCC-1569 (Her2++), HCC-78 (Her2+), OE-19 (Her2+), SK-GT-2 (Her2+) и SKOV-3 (Her2++). Лучшая эффективность *in vitro* для трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 по сравнению с Enhertu наблюдалась *in vitro*, в частности, в клеточных линиях, которые не обладают высокой сверхэкспрессией Her2 (обозначены на фигуре 58 как «Her2+»).

**Пример 16: Способность «свидетеля» *in vitro*, оцененная путем переноса супернатанта**

Способность «свидетеля» *in vitro* измеряли, как описано выше в разделе «Общая информация, материалы и способы». В дополнение к вышеупомянутым наборам данных для исследования перенесенного материала использовали другие клеточные линии (Karpas 299 (Her2-) и DU-145 (Her2-)).

На **фигуре 59** представлены результаты *in vitro* способности «свидетеля», измеренной после инкубирования Her2-положительных клеток SKBR3 с трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатеканом DAR8 и Enhertu, и переноса супернатанта в Her2-отрицательные клетки Karpas-299 и DU-145. Наблюдался лучший эффект «свидетеля» для трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 по сравнению с Enhertu.

**Пример 17: Количество свидетелей *in vitro*, оцененное с помощью FACS**

Для анализа «свидетеля» на основе совместной культуры Her2-положительные клетки SKBR-3 и Her2-отрицательные клетки MDA-MB-468 инкубировали в отношении 5:1 с возрастающими концентрациями трастузумаб- P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана и Enhertu до максимальной концентрации 3 мкг/мл. Через 5 дней инкубирования совместные культуры окрашивали с помощью  $\alpha$ Her2-FITC (BioLegend) и набора для окрашивания мертвых клеток Fixable Aqua (Thermo Fisher Scientific). Для определения эффекта «свидетеля» с помощью проточной цитометрии определяли процент мертвых Her2-положительных и -отрицательных клеток.

На **фигуре 60** представлены результаты измерений *in vitro* количества «свидетеля» трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 и Enhertu в совместной культуре Her2-положительных клеток SKBR-3 и Her2-отрицательных клеток MDA-MB-468. Несколько лучший эффект «свидетеля» для трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 по сравнению с Enhertu наблюдался также при совместном культивировании клеток.

#### **Пример 18: Цитотоксичность в отношении первичных клеток человека**

Цитотоксичность *in vitro* в отношении эндотелиальных клеток пупочной вены человека, эндотелиальных клеток бронхов человека, синусоидальных эндотелиальных клеток печени, шванновских клеток, эпителиальных клеток проксимальных канальцев почек человека, нормальных фибробластов дермы человека, эпителиальных клеток роговицы человека и THLE-3 (гепатоцитов) измеряли, как описано выше в разделе «Общая информация, материалы и способы».

На **фигуре 61** представлены результаты измерений цитотоксичности, проведенных на эндотелиальных клетках пупочной вены человека, эндотелиальных клетках бронхов человека, синусоидальных эндотелиальных клетках печени, шванновских клетках, эпителиальных клетках проксимальных канальцев почек человека, нормальных фибробластах дермы человека, эпителиальных клетках роговицы человека и THLE-3 (гепатоциты) с использованием транс-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8, Enhertu и паливизумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8. Показана циклотоксичность трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 по сравнению с паливизумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатеканом DAR8 и Enhertu. В модели используются культивированные клетки здоровых тканей человека, и поэтому она является мерой *in vitro* для выявления нежелательной токсичности. Набор данных показывает, что для всех исследованных типов тканей нежелательный эффект нецелевой токсичности в этом случае менее выражен для трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 по сравнению с

Enhertu. Набор данных указывает на более широкое терапевтическое окно, обусловленное технологией, описанной в текущем патенте, поскольку панель **фигуры 61** показывает меньший нежелательный эффект на нецелевые клеточные линии, тогда как панель **фигуры 58** показывает лучший требуемый эффект на целевые клеточные линии.

**Пример 19: Оценка ФК *in vivo* трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 по сравнению с Enhertu у мышей SCID**

Эксперименты по фармакокинетике *in vivo* (ФК-эксперименты) проводили с трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатеканом DAR8 на самках мышей SCID, которых обрабатывали 20 мг/кг трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 или Enhertu. Отбор проб крови осуществляли через разные моменты времени, и количество ADC определяли количественно с помощью анализа с помощью ELISA на общие антитела в соответствии со способом 2, как описано выше в разделе «Общая информация, материалы и способы». Отношение лекарственного средства к антителу (DAR) ADC (целостность линкера) анализировали с помощью интактной MS, как описано выше в разделе «Общая информация, материалы и способы».

На **фигуре 62** представлены результаты экспериментов по фармакокинетике *in vivo*, проведенных с трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатеканом DAR8 на самках мышей SCID, которых обрабатывали 20 мг/кг с трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 или Enhertu для сравнения. Набор данных, полученный с помощью анализа ELISA, показывает аналогичный клиренс из организма во время циркуляции для трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 и Enhertu. Более того, анализ DAR подтверждает стабильность трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 *in vivo* с резким улучшением стабильности по сравнению с Enhertu.

**Пример 20: Эффективность лечения опухолей *in vivo***

Все эксперименты на животных проводились в соответствии с законом Германии о защите животных и одобрены местными властями. Вкратце, мышам CB17-Scid подкожно инъецировали  $1 \times 10^7$  клеток MDA-MB-468. Лечение начинали, когда опухоли достигали среднего объема  $0,188 \text{ см}^3$  через 28 дней после имплантации. По 5 животных в группе однократно вводили 1 мг/кг, 3 мг/кг или 10 мг/кг H8-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR 8 или носителя в виде внутривенной инъекции после рандомизации в группу лечения и контрольную группу. Объемы опухолей, массы тела и общее состояние здоровья регистрировали на протяжении всего исследования.

Последовательность гуманизированного антитела Н8 взята из международной патентной заявки WO 2006/031653, которая касается антител 5Т4. Антитела временно экспрессировали в клетках Expi-CHO-S (Thermo Fisher) путем совместной трансфекции клеток экспрессирующими плазмидами pcDNA3.4 (Thermo Fisher), кодирующими тяжелую и легкую цепи соответствующих последовательностей в отношении 1:1, с использованием система трансфекции Expi-CHO (Thermo Fisher). Клетки собирали центрифугированием при 300 g в течение 5 минут при 4°C. Для очистки микрочастиц от надосадочной жидкости надосадочную жидкость центрифугировали при 4000–5000 g в течение 30 мин при 4 °C. Для дальнейшего осветления надосадочные жидкости пропускали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Антитела очищали из очищенных и отфильтрованных супернатантов с помощью хроматографии на белке А и анализировали с помощью HPLC-SEC, HPLC-НМС, LC-MS и SDS-PAGE. После этого осуществляли конъюгацию P5(PEG24)-VC-PAВ-эксзатекана для создания ADC DAR8, как описано выше в разделе «Общая информация, материалы и способы». Антитело 5Т4 Н8 было выбрано для создания образцового набора данных *in vivo* в модели солидной опухоли, отличной от Her2.

На **фигуре 63** представлен средний объем опухоли у мышей CB17-Scid, определенный на модели солидной опухоли после обработки Н8-P5(PEG24)-VC-PAВ-эксзатеканом DAR8. На **фигуре 64** представлена масса тела мышей CB17-Scid после обработки Н8-P5(PEG24)-VC-PAВ-эксзатеканом DAR8. В модели солидной опухоли не наблюдалось потери массы тела. Соответственно, измеренные *in vitro* эффекты также приводят к высокой эффективности *in vivo* для ADC на основе P5(PEG24)-VC-PAВ-эксзатекана DAR 8. Дозозависимая эффективность была продемонстрирована *in vivo*, когда эффективные дозы от 1 до 3 мг/кг вводили в сложной модели солидной опухоли. 5/5 полных ответов при однократной дозе 1 и 3 мг/кг.

Аналогичные результаты эффективности были получены на другой модели солидной опухоли, а именно на модели ксенотрансплантата *in vivo* на основе OVCAR-3, с ADC, полученным из анти-NaPі2В-антитела, последовательность которого взята из патентной заявки США US 2017/0266311A1. Получение ADC и эксперимент проводили, как описано выше для антитела Н8.

Более того, в настоящее время продолжается исследование модели ксенотрансплантата *in vivo* на основе N87 с трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-эксзатеканом DAR8, и ожидается, что оно даст такой же/сопоставимый результат с точки зрения эффективности *in vivo*.

**Пример 21: Фармакокинетическая оценка *in vivo* антимишени-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекан DAR8 у SD-крыс**

Эксперименты по фармакокинетике *in vivo* (ФК-эксперименты) проводили на самках крыс SD, которых обрабатывали 10 мг/кг Н8-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатеканом DAR8 или немодифицированным антителом Н8. Антитело и ADC получали, как описано выше.

Отбор проб крови осуществляли через разные моменты времени, и количество ADC определяли количественно с помощью ELISA-анализа общего количества антител в соответствии со способом 2, как описано выше в разделе «Общая информация, материалы и способы». Целостность ADC была подтверждена с помощью ELISA неповрежденного ADC. Отношение лекарственного средства к антителу (DAR) ADC (целостность линкера) анализировали с помощью интактной MS.

На **фигуре 65** представлены результаты фармакокинетических экспериментов *in vivo* (ФК-эксперименты), полученные на самках крыс SD, которых обрабатывали 10 мг/кг Н8-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатеканом DAR8 или немодифицированным антителом Н8. Хорошее перекрытие между немодифицированными моноклональными антителами и ADC в общем анализе моноклональных антител ELISA показывает, что конъюгация восьми молекул линкер-полезная нагрузка не оказывает отрицательного влияния на выведение всего ADC из кровотока. ADC DAR8 очищается с кинетикой, подобной моноклональному антителу. Высокое перекрытие между общим  $tab$  и интактным ADC подтверждает хорошую стабильность *in vivo*, что подчеркивается DAR, оцененным с помощью MS. Измерения MS подтверждают, что DAR8, то есть полная конъюгация линкер-полезной нагрузки с антителом сохраняется после 3 недель циркуляции *in vivo*.

**Пример 22: Синтез трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR4 и характеристика**

Для достижения статистической конъюгации восьми цистеиновых остатков P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана с трастузумабом IgG1, вышеупомянутый протокол конъюгации в разделе «Общая информация, материалы и способы» был немного скорректирован, следующим образом: концентрация моноклонального антитела снижена до 1 мг/мл, эквиваленты P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана для реакции конъюгации снижены до 10, а эквиваленты TCEP снижены до 3. ADC был охарактеризован MS, и было рассчитано среднее отношение лекарственного средства к антителу, равное 4 (DAR4), как описано выше. Более того, продукт характеризовался НИС, демонстрируя распределение видов от DAR0 до DAR8. Продукт также был охарактеризован SEC, показавшим однородность.

На **фигуре 66** представлены хроматограммы HIC и SEC трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR4, имеющего средний DAR 4.

Следует отметить, что термин «трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекан DAR4» или «трас-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекан DAR4» относится к ADC, имеющему среднее отношение лекарственного средства к антителу 4 (DAR4), которое используется в **примерах 22** и **23**. С другой стороны, термин «трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекан DAR8», «трас-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекан DAR8», «трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекан», «трас-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекан» или тому подобное, то есть также без указания DAR, при использовании в настоящем документе всегда относится к ADC, имеющему отношение лекарственного средства к антителу 8 (DAR8); см., например, также таблицу к **примеру 2** выше для структуры и DAR «трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекан».

#### **Пример 23: Оценка ФК *in vivo* трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR4**

Эксперименты по фармакокинетике *in vivo* (ФК-эксперименты) проводили на самках крыс SD, которых обрабатывали 10 мг/кг трас-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатеканом DAR4, имеющих среднее отношение лекарственного средства к антителу 4 (DAR4). Отбор проб крови осуществляли через различные моменты времени, и количество ADC определяли в анализе общего количества антител с помощью ELISA. Целостность ADC подтверждали с помощью ELISA неповрежденного ADC.

На **фигуре 67** представлены результаты фармакокинетических экспериментов *in vivo* (ФК-эксперименты), полученные на самках крыс SD, которых обрабатывали 10 мг/кг трас-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатеканом DAR4. Хороший фармакокинетический профиль, в значительной степени сравнимый с немодифицированным H8, исследованным в **примере 21** выше и изображенным на **фигуре 65**, верхняя панель слева, показывает, что статистическое конъюгирование четырех молекул P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана с восемью цистеиновыми остатками линкер-полезной нагрузки не оказывают негативного влияния на выведение всего ADC из кровотока. ADC, имеющий среднее DAR 4, очищается с кинетикой, подобной моноклональному антителу. Высокое перекрытие между общим mAb и интактным ADC подтверждает хорошую стабильность *in vivo*.

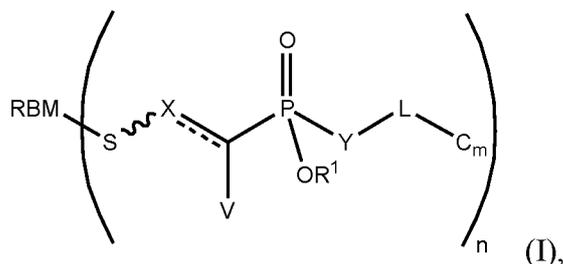
#### **Пример 24: Оценка *in vivo* трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAВ-экзатекана DAR8 по сравнению с Enhertu**

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с законом Германии о защите животных и одобрены местными властями. Вкратце,  $2 \times 10^6$  клеток NCI-N87 (линия солидных клеток рака желудка человека) вводили подкожно мышам CB17-Scid. Лечение начинали, когда опухоли достигали среднего объема опухоли  $0,1-0,15 \text{ см}^3$ . По 10 животных в группе однократно вводили либо 0,25, 0,5, 1 или 2 мг/кг трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAB-экзатекана DAR 8 или Enhertu. Животным в количестве по 5 в группе вводили носитель или 2 мг/кг паливизумаб-P5(PEG24)-VC-PAB-экзатекана в качестве контрольного изотипа. Все ADC вводили внутривенно после рандомизации животных в экспериментальную и контрольную группы. Объемы опухолей, массы тела и общее состояние здоровья регистрировали на протяжении всего исследования.

На **фигуре 68** показаны результаты оценки *in vivo* трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAB-экзатекана, имеющего отношение лекарственного средства к антителу 8 (DAR8). Сообщается о первоначальных результатах после нескольких дней наблюдения за ростом опухоли. Уже после этого начального периода в 7 дней наблюдается, что конструкция трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAB-экзатекан DAR8 приводит к большему уменьшению опухоли по сравнению с Enhertu во всех группах лечения. Наиболее выражен этот эффект при дозе 0,5 мг/кг, где трастузумаб-P5(PEG24)-VC-PAB-экзатекан DAR8 приводит к регрессии опухоли, а Enhertu – к прогрессированию. Ожидается, что по мере дальнейшего исследования этот эффект будет более выраженным. Эффективность всех таргетных ADC на основе трастузумаба зависит от дозы. Следует отметить, что несвязывающий контрольный изотип ADC паливизумаб-P5(PEG24)-VC-PAB-экзатекан в максимальной дозе не приводил к какому-либо эффекту, поскольку опухоли вели себя так же, как и в контроле-носителе, демонстрируя специфический эффект доставки лекарственного средства, опосредованной антителом к линкерной системе P5(PEG24)-VC-PAB-экзатекана.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, имеющий формулу (I):



или его фармацевтически приемлемая соль, или сольват;

где:

RBM представляет собой рецепторсвязывающую молекулу;

$\text{=}$  представляет собой двойную связь; или

$\text{—}$  представляет собой связь;

V отсутствует, когда  $\text{=}$  представляет собой двойную связь; или

V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, когда  $\text{—}$  представляет собой связь;

X представляет собой R<sub>3</sub>-C, когда  $\text{=}$  представляет собой двойную связь; или

X представляет собой  $\begin{matrix} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{matrix}$ , когда  $\text{—}$  представляет собой связь;

Y представляет собой NR<sup>5</sup>, S, O или CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>;

R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>3</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>4</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>5</sup> представляет собой H; возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

- $R^6$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- $R^7$  представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- L представляет собой линкер;
- C представляет собой фрагмент камптотецина;
- m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10; и
- n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20.

2. Конъюгат по п. 1, где  представляет собой двойную связь; V отсутствует; X представляет собой  $R_3-C$ ; и  $R^3$  представляет собой H, или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток; предпочтительно  $R^3$  представляет собой H или  $(C_1-C_8)$ алкил; более предпочтительно  $R^3$  представляет собой H.

3. Конъюгат по п. 1 или 2, где указанная рецепторсвязывающая молекула выбрана из группы, состоящей из антитела, фрагмента антитела и белковой связывающей молекулы с антителоподобными связывающими свойствами.

4. Конъюгат по п. 3, где указанная рецепторсвязывающая молекула представляет собой антитело.

5. Конъюгат по п. 4, где указанное антитело выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела, химерного антитела, гуманизированного антитела, человеческого антитела и однодоменного антитела, такого как однодоменное антитело верблюда или акулы.

6. Конъюгат по любому из предшествующих пунктов, где Y представляет собой NH.

7. Конъюгат по п. 6, где указанная рецепторсвязывающая молекула представляет собой антитело.

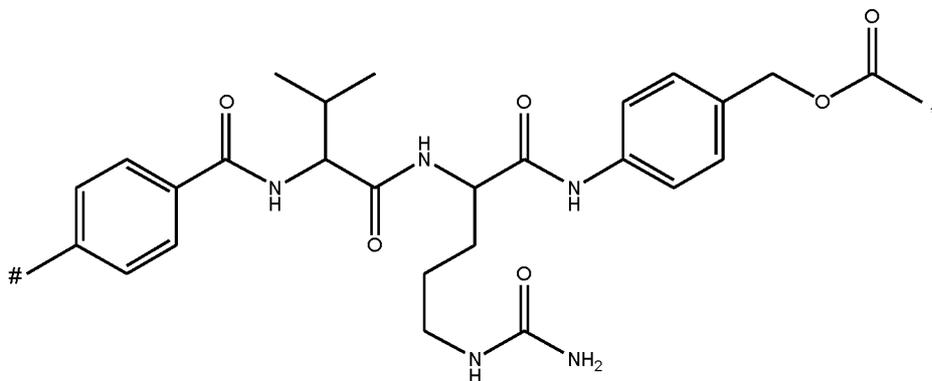
8. Конъюгат по любому из предшествующих пунктов, где указанный линкер L является расщепляемым.

9. Конъюгат по п. 8, где указанный линкер L является расщепляемым протеазой, глюкуронидазой, сульфатазой, фосфатазой, эстеразой или посредством дисульфидного восстановления.

10. Конъюгат по п. 9, где указанный линкер L является расщепляемым протеазой, предпочтительно катепсином, таким как катепсин В.

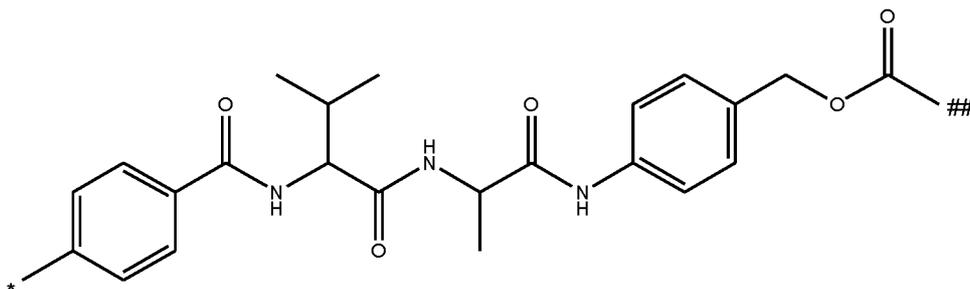
11. Конъюгат по любому из предшествующих пунктов, где указанный линкер L содержит фрагмент валин-цитруллин или фрагмент валин-аланин.

12. Конъюгат по п. 11, где указанный линкер L представляет собой:



где # обозначает точку присоединения к Y, и \* обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина.

13. Конъюгат по п. 11, где указанный линкер L представляет собой:



где \* обозначает точку присоединения к Y, и ## обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина.

14. Конъюгат по любому из предшествующих пунктов, где R<sup>F</sup> представляет собой первую полиалкиленгликолевую единицу R<sup>F</sup>.

15. Конъюгат по п. 14, где указанная первая полиалкиленгликолевая единица R<sup>F</sup> содержит от 1 до 100 субъединиц, имеющих структуру:



16. Конъюгат по п. 15, где R<sup>F</sup> представляет собой



где:



обозначает положение O;

$K^F$  выбрана из группы, состоящей из -H, -PO<sub>3</sub>H, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкила, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-SO<sub>3</sub>H, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-CO<sub>2</sub>H, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-OH, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH<sub>2</sub>, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкила и -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-N((C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкила)<sub>2</sub>; и

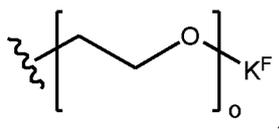
o представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 100.

17. Конъюгат по любому из пп. 14 до 16, где R<sup>1</sup> представляет собой первую полиэтиленгликолевую единицу.

18. Конъюгат по п. 17, где указанная первая полиэтиленгликолевая единица R<sup>F</sup> содержит от 1 до 100 субъединиц, имеющих структуру:



19. Конъюгат по п. 18, где R<sup>F</sup> представляет собой:



где



обозначает положение O;

$K^F$  выбрана из группы, состоящей из -H, -PO<sub>3</sub>H, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкила, -(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-SO<sub>3</sub>H, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-CO<sub>2</sub>H, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-OH, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH<sub>2</sub>, -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-NH(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкила и -(C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)алкил-N((C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкила)<sub>2</sub>; и

o представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 100.

20. Конъюгат по п. 19, где K<sup>F</sup> представляет собой H.

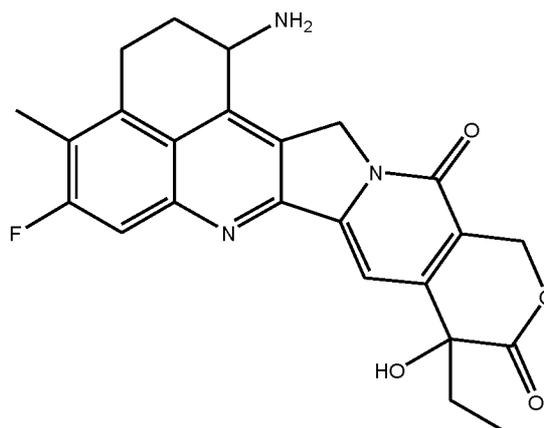
21. Конъюгат по п. 20, где o находится в диапазоне от 8 до 30.

22. Конъюгат по п. 21, где o находится в диапазоне от 20 до 28.

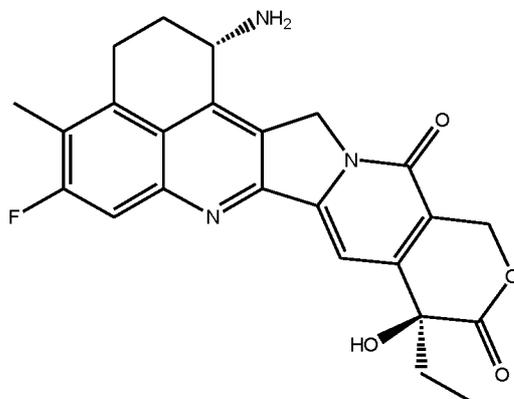
23. Конъюгат по п. 22, где o составляет 22, 23, 24, 25 или 26.

24. Конъюгат по любому из пп. 1-23, где указанный фрагмент камптотецина С выбран из группы, состоящей из экзатекана, SN38, камптотецина, топотекана, иринотекана, белотекана, луртотекана, рубитекана, силатекана, коситекана и гиматекана.

25. Конъюгат по п. 24, где указанный фрагмент камптотецина С представляет собой экзатекан, имеющий формулу:



26. Конъюгат по п. 25, где указанный фрагмент камптотецина С представляет собой экзатекан, имеющий формулу:



27. Конъюгат по п. 25 или 26, где указанный экзатекан связан с линкером L через аминогруппу.

28. Конъюгат по п. 1,

где:

RBM представляет собой антитело;

 представляет собой двойную связь; или

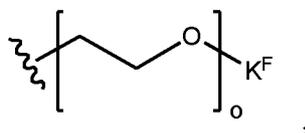
 представляет собой связь;

V отсутствует, когда  представляет собой двойную связь; или

V представляет собой H, когда  представляет собой связь;

X представляет собой  $R_3-C$ , когда  представляет собой двойную связь; или

- X представляет собой  $R_3-C \begin{matrix} R_4 \\ | \\ \text{---} \end{matrix}$ , когда  представляет собой связь;  
 Y представляет собой NH;  
 R<sup>1</sup> представляет собой полиэтиленгликолевую единицу, имеющую структуру:



где:



обозначает положение O;

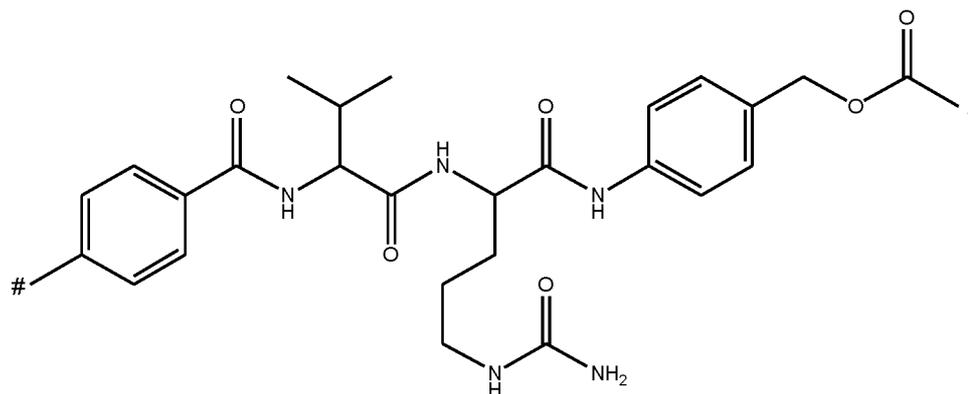
K<sup>F</sup> представляет собой H; и

o представляет собой целое число в диапазоне от 8 до 30;

R<sup>3</sup> представляет собой H;

R<sup>4</sup> представляет собой H;

L представляет собой линкер, имеющий следующую структуру:



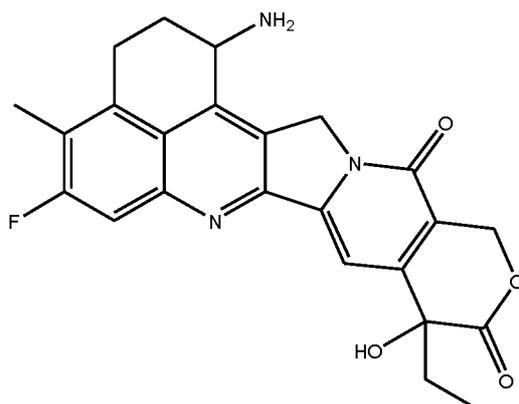
где # обозначает точку присоединения к Y, и \* обозначает точку присоединения к фрагменту камптотецина (C);

C представляет собой фрагмент камптотецина;

m составляет 1; и

n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10.

**29.** Конъюгат по п. 28, где указанный фрагмент камптотецина C представляет собой экзатекан, имеющий формулу:



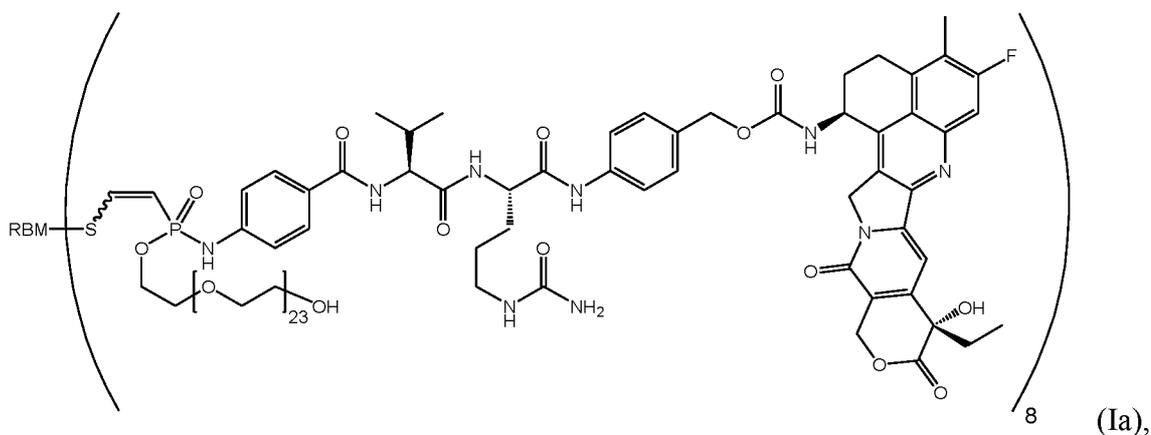
**30.** Конъюгат по п. 29, где указанный экзатекан связан с линкером L через аминогруппу.

**31.** Конъюгат по п. 30, где o находится в диапазоне от 20 до 28.

**32.** Конъюгат по п. 31, где o составляет 22, 23, 24, 25 или 26.

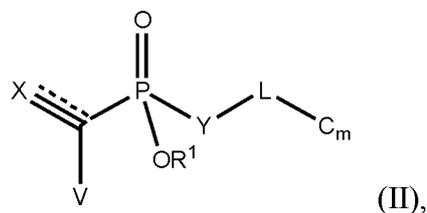
**33.** Конъюгат по любому из пп. 28 до 32, где n находится в диапазоне от 2 до 10, предпочтительно где n составляет 4 или 8.

**34.** Конъюгат по п. 33, имеющий следующую формулу (Ia):



где RBM представляет собой антитело.

**35.** Соединение, имеющее формулу (II):



или его фармацевтически приемлемая соль, или сольват;

где:



представляет собой тройную связь; или



представляет собой двойную связь;

V отсутствует, когда  $\equiv$  представляет собой тройную связь; или  
 V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, когда  $\equiv$  представляет собой двойную связь;

X представляет собой R<sub>3</sub>-C, когда  $\equiv$  представляет собой тройную связь; или

X представляет собой  $\begin{matrix} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{matrix}$ , когда  $\equiv$  представляет собой двойную связь;  
 Y представляет собой NR<sup>5</sup>, S, O или CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>;

R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>3</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>4</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>5</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>6</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

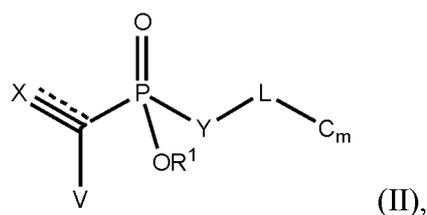
R<sup>7</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

L представляет собой линкер;

C представляет собой фрагмент камптотецина; и

m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10.

**36.** Способ получения конъюгата формулы (I), где указанный способ включает: проведение реакции соединения формулы (II)



или его фармацевтически приемлемой соли, или сольвата;

где:

$\equiv$  представляет собой тройную связь; или

$\equiv$  представляет собой двойную связь;

V отсутствует, когда  $\equiv$  представляет собой тройную связь; или

V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)алкил, когда  $\equiv$  представляет собой двойную связь;

X представляет собой R<sub>3</sub>-C, когда  $\equiv$  представляет собой тройную связь; или

X представляет собой  $\begin{matrix} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{matrix}$ , когда  $\equiv$  представляет собой двойную связь;

Y представляет собой NR<sup>5</sup>, S, O или CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>;

R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>3</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>4</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>5</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>6</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

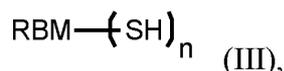
R<sup>7</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

L представляет собой линкер;

C представляет собой фрагмент камптотецина; и

m представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10; и

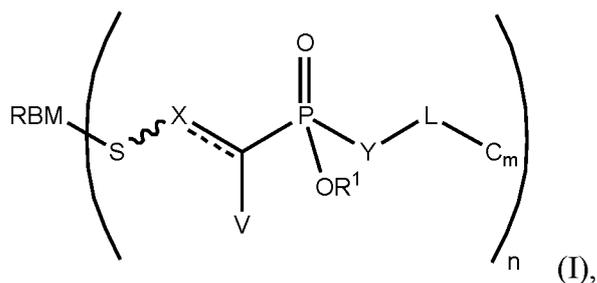
с тиолсодержащей молекулой формулы (III)



где RBM представляет собой рецепторсвязывающую молекулу; и

n представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20;

с получением в результате соединения формулы (I)



или его фармацевтически приемлемой соли, или его сольвата;

где:

$\text{=}$  представляет собой двойную связь, когда  $\text{=}$  в соединении формулы (II) представляет собой тройную связь; или

$\text{=}$  представляет собой связь, когда  $\text{=}$  в соединении формулы (II) представляет собой двойную связь;

V отсутствует, когда  $\text{=}$  представляет собой двойную связь; или

V представляет собой H или (C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)алкил, когда  $\text{=}$  представляет собой связь;

X представляет собой R<sub>3</sub>-C, когда  $\text{=}$  представляет собой двойную связь; или

X представляет собой  $\begin{matrix} R_4 \\ | \\ R_3-C \end{matrix}$ , когда  $\text{=}$  представляет собой связь;

Y представляет собой NR<sup>5</sup>, S, O или CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>;

R<sup>1</sup> представляет собой возможно замещенный алифатический остаток или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>3</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>4</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>5</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

R<sup>6</sup> представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;

- R<sup>7</sup>** представляет собой H; или возможно замещенный алифатический остаток, или возможно замещенный ароматический остаток;
- L** представляет собой линкер;
- C** представляет собой фрагмент камптотецина;
- m** представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 10; и
- n** представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 20.

**37.** Способ по п. 36, дополнительно включающий восстановление по меньшей мере одного дисульфидного мостика рецепторсвязывающей молекулы в присутствии восстанавливающего агента с образованием тиоловой группы (SH).

**38.** Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп. 1-34.

**39.** Фармацевтическая композиция по п. 38, где указанная фармацевтическая композиция содержит популяцию конъюгата по любому из пп. 1-27 и где среднее количество фрагментов камптотецина C на рецепторсвязывающую молекулу составляет от более чем 0 до примерно 14.

**40.** Конъюгат по любому из пп. 1-34 или фармацевтическая композиция по п. 38 или 39 для применения в способе лечения заболевания.

**41.** Конъюгат или фармацевтическая композиция для применения по п. 40, где указанное заболевание представляет собой рак.

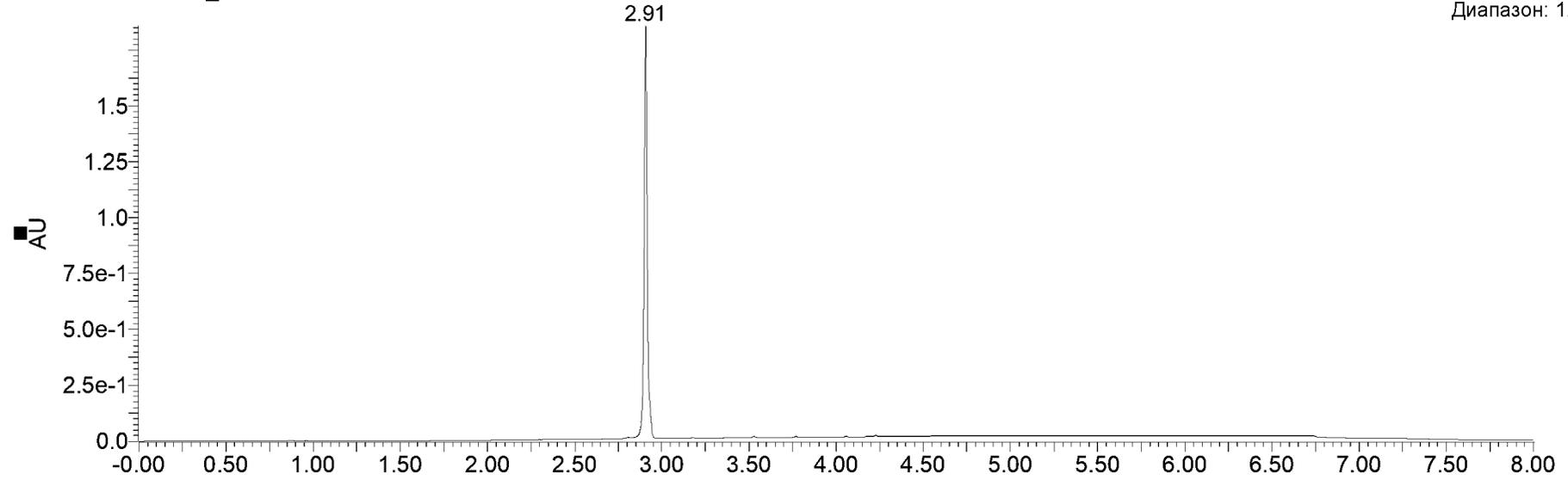
**42.** Конъюгат или фармацевтическая композиция для применения по п. 41, где указанный рак представляет собой солидную опухоль.

Фигура 1

Glas7

20201106PMC008\_6

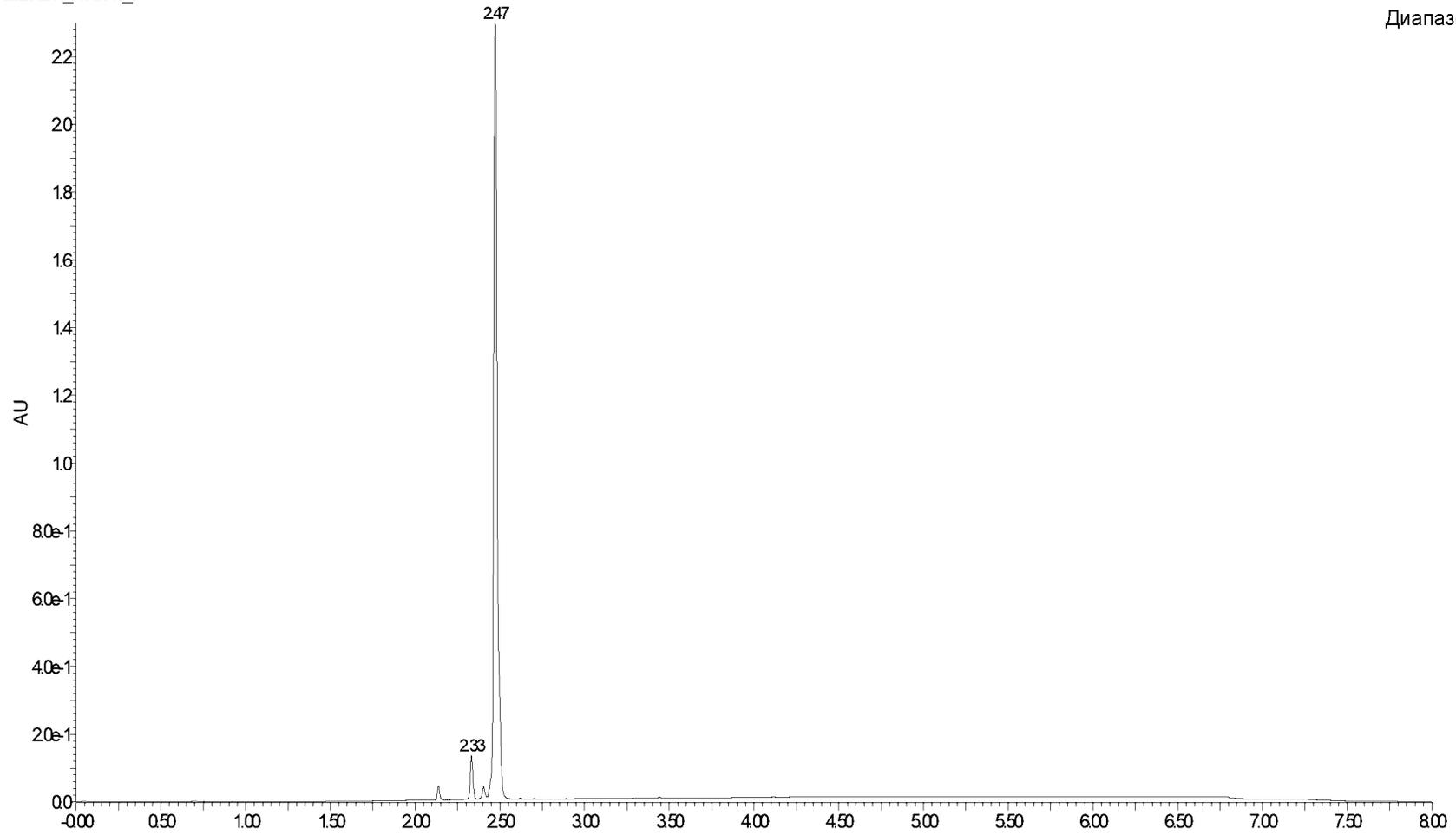
2. Диодная матрица  
Диапазон: 1.858



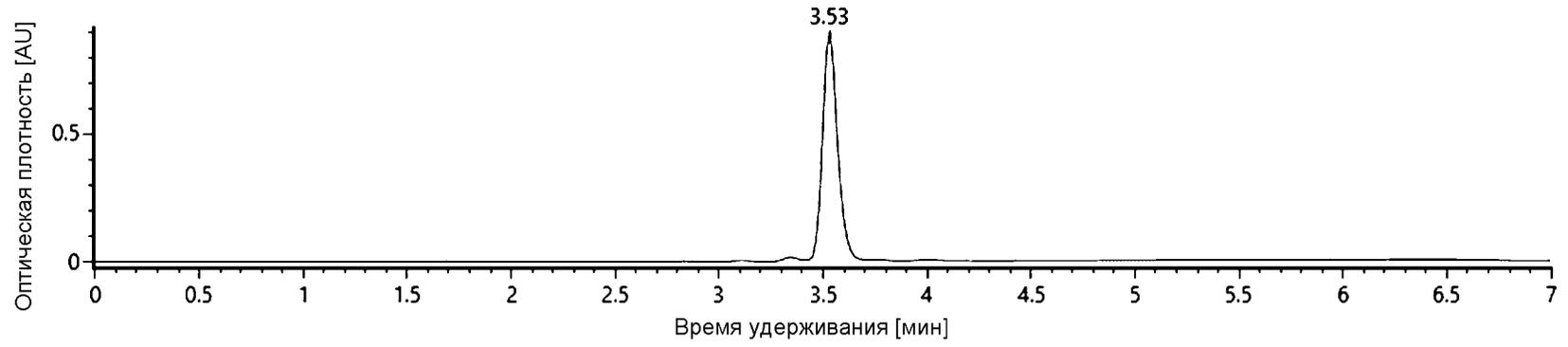
Фигура 2

Glas 5  
20201211\_FMO013\_3

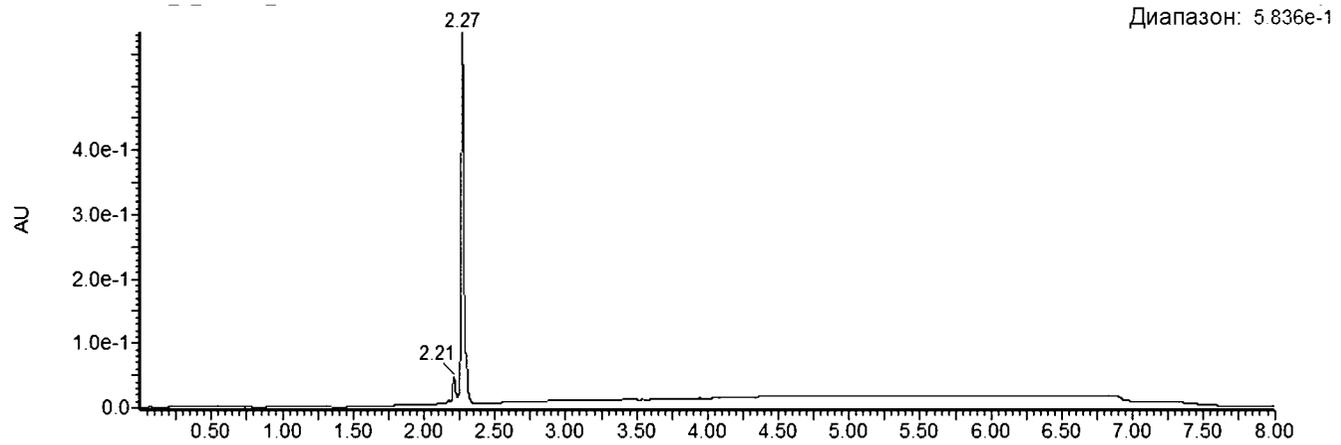
2: Диодная матрица  
Диапазон: 2.298



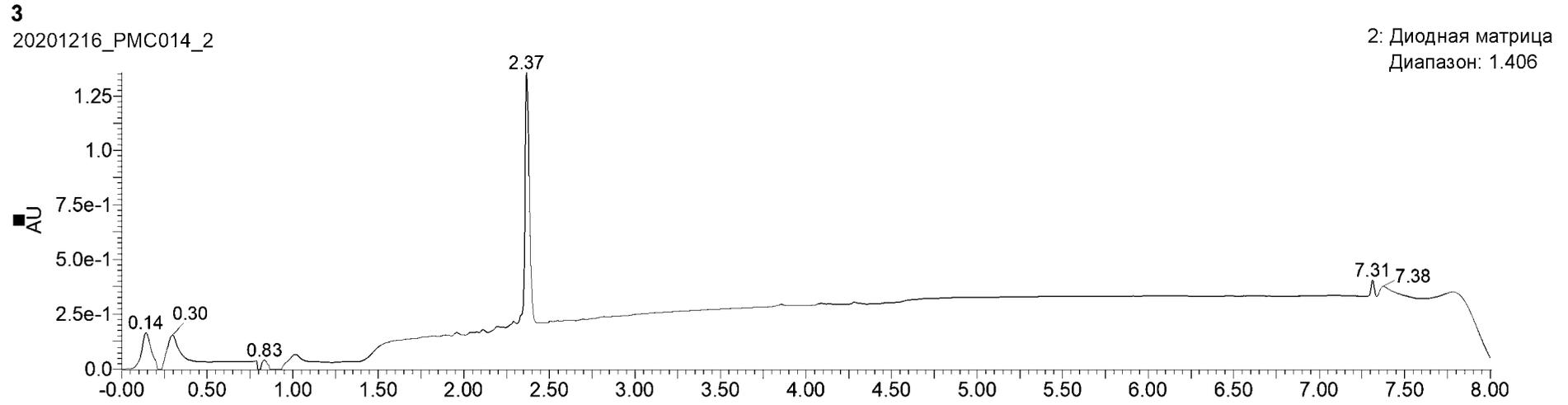
Фигура 3



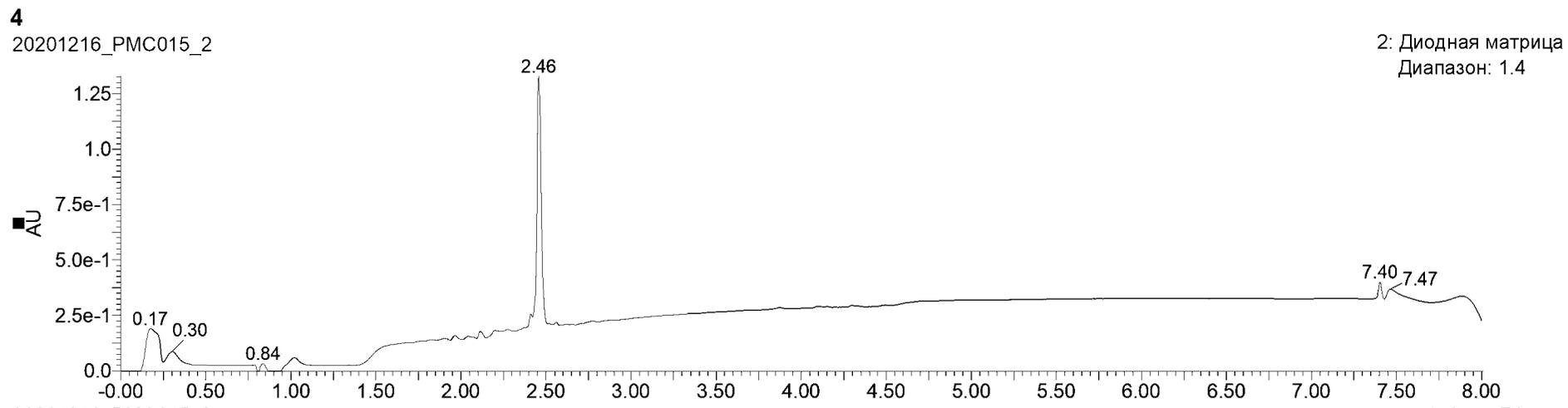
Фигура 4



Фигура 5



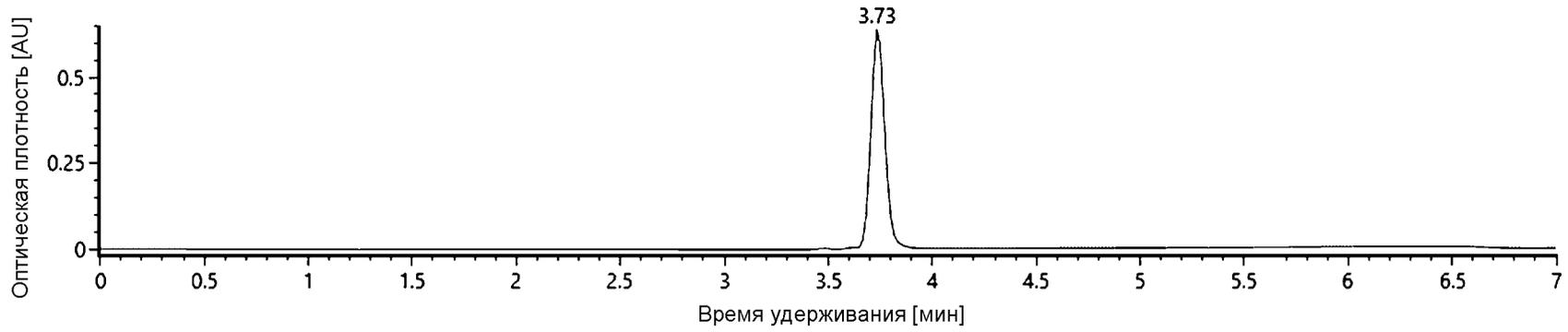
Фигура 6



Фигура 7



Фигура 8



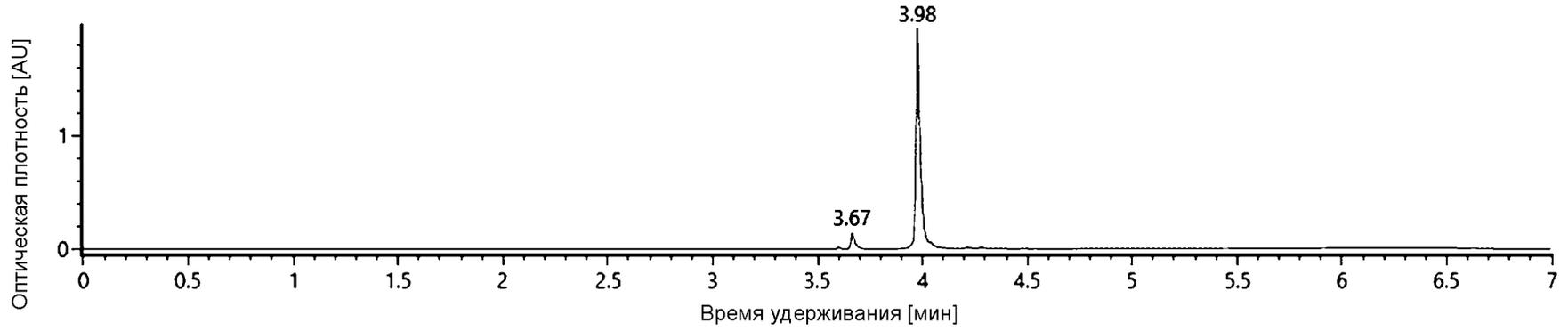
Фигура 9



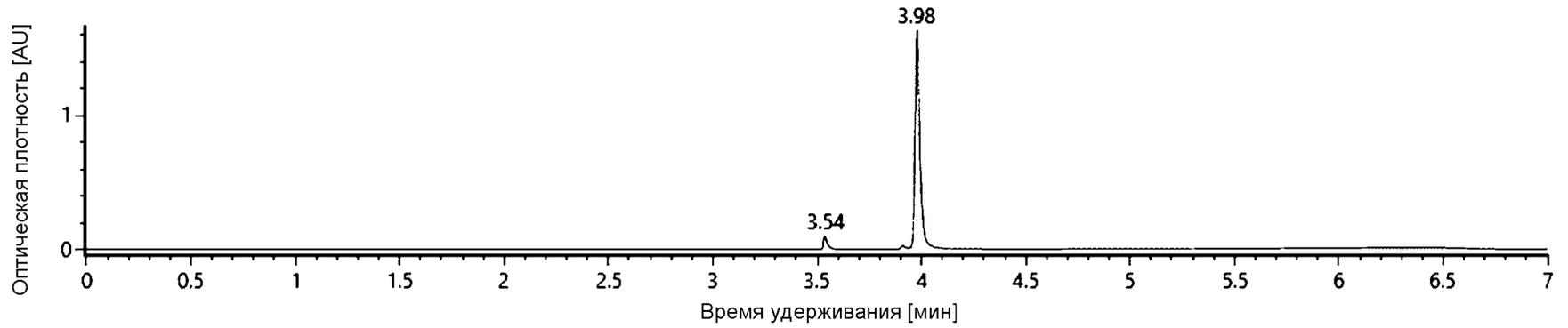
Фигура 10



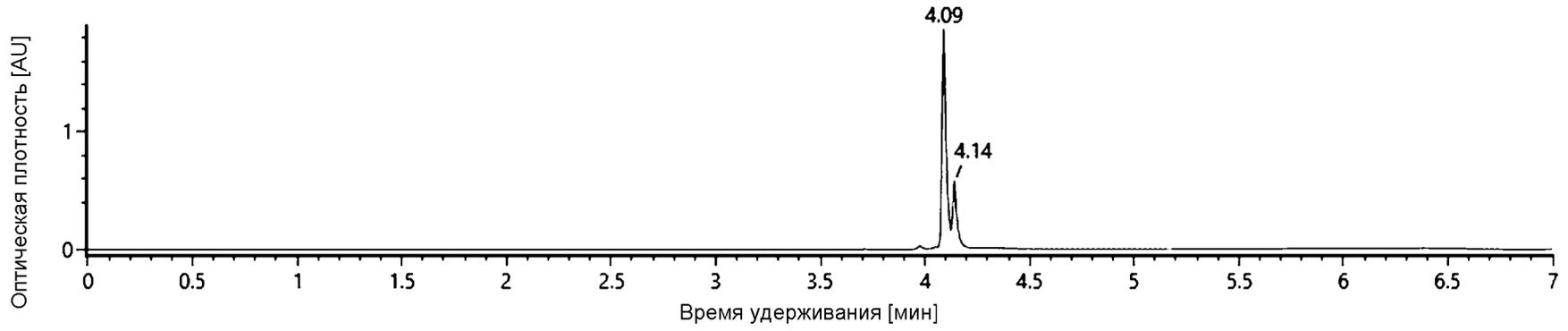
Фигура 11



Фигура 12



Фигура 13



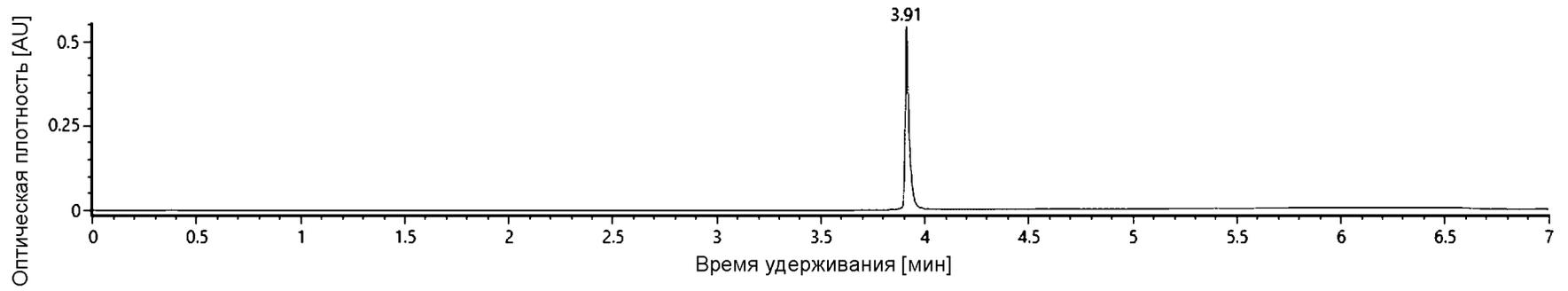
Фигура 14



Фигура 15



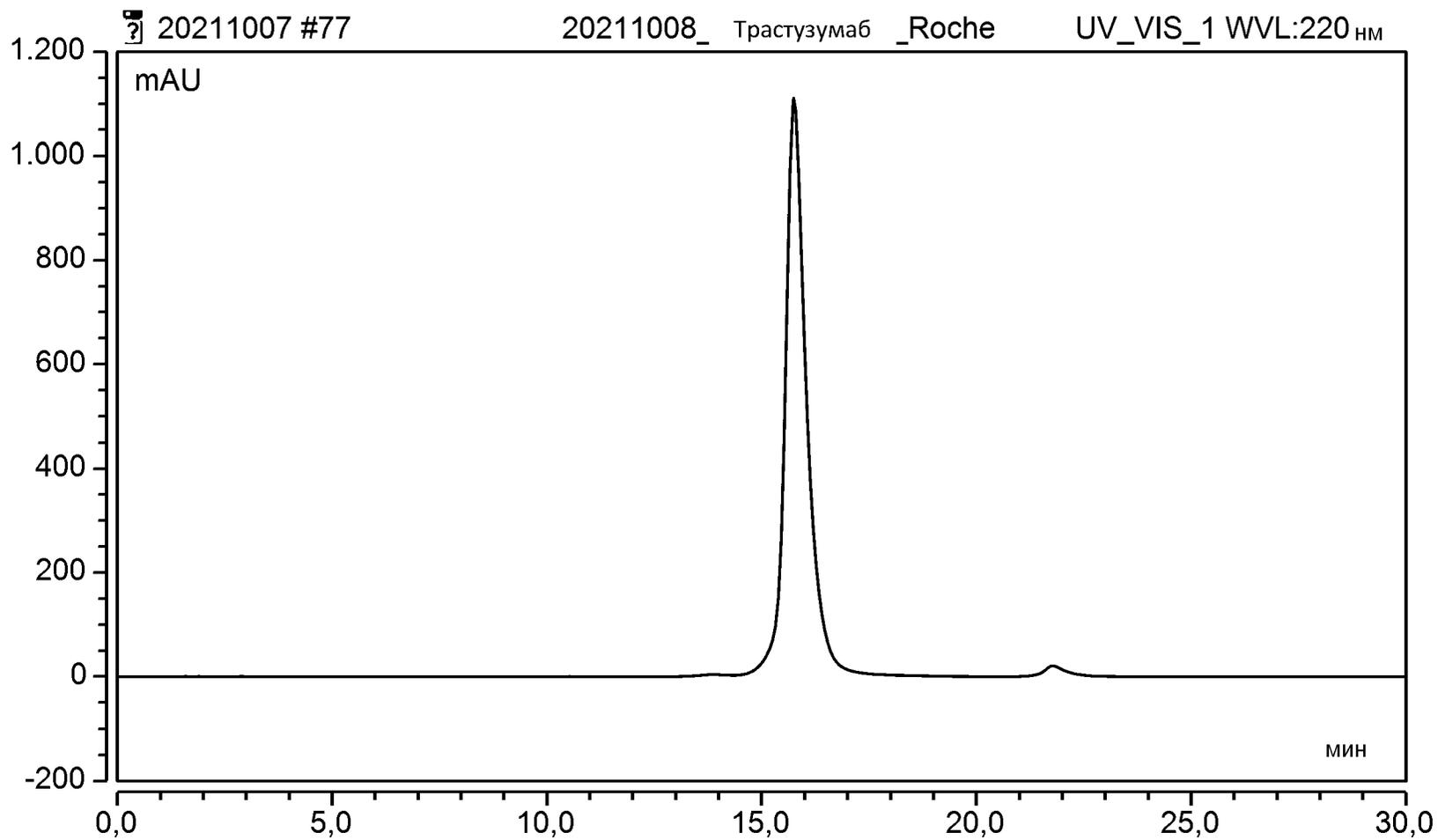
Фигура 16



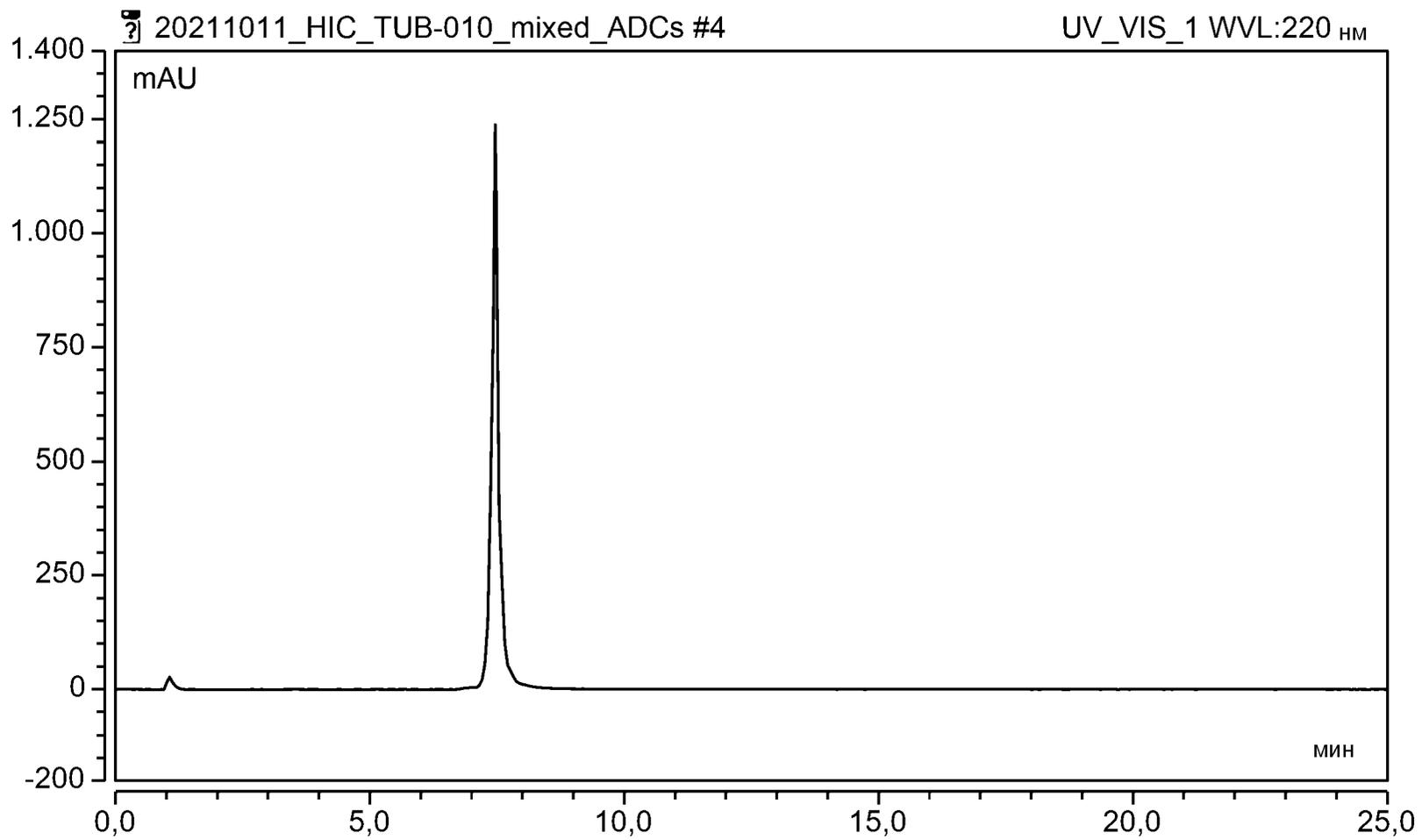
Фигура 17



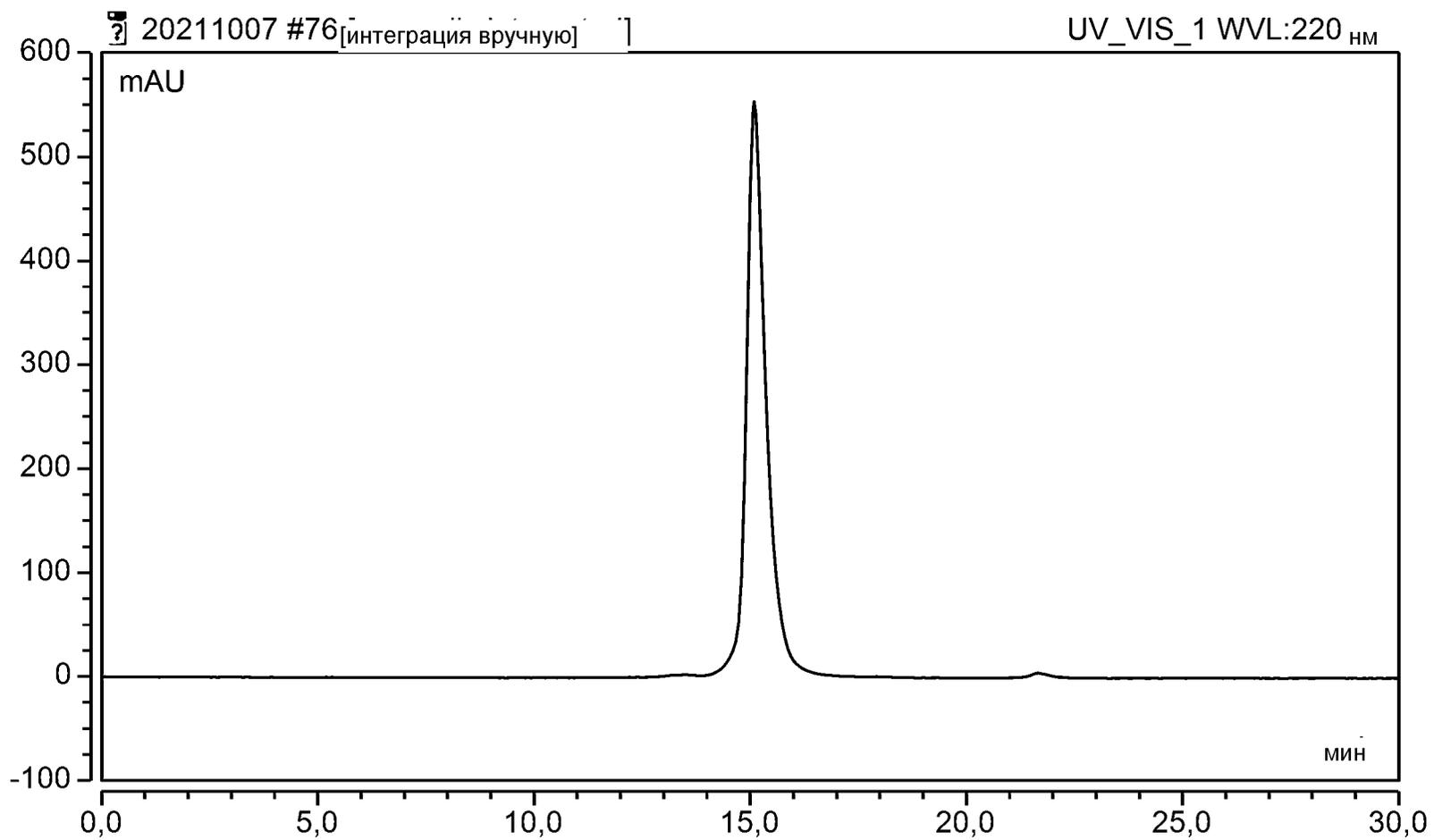
Фигура 18



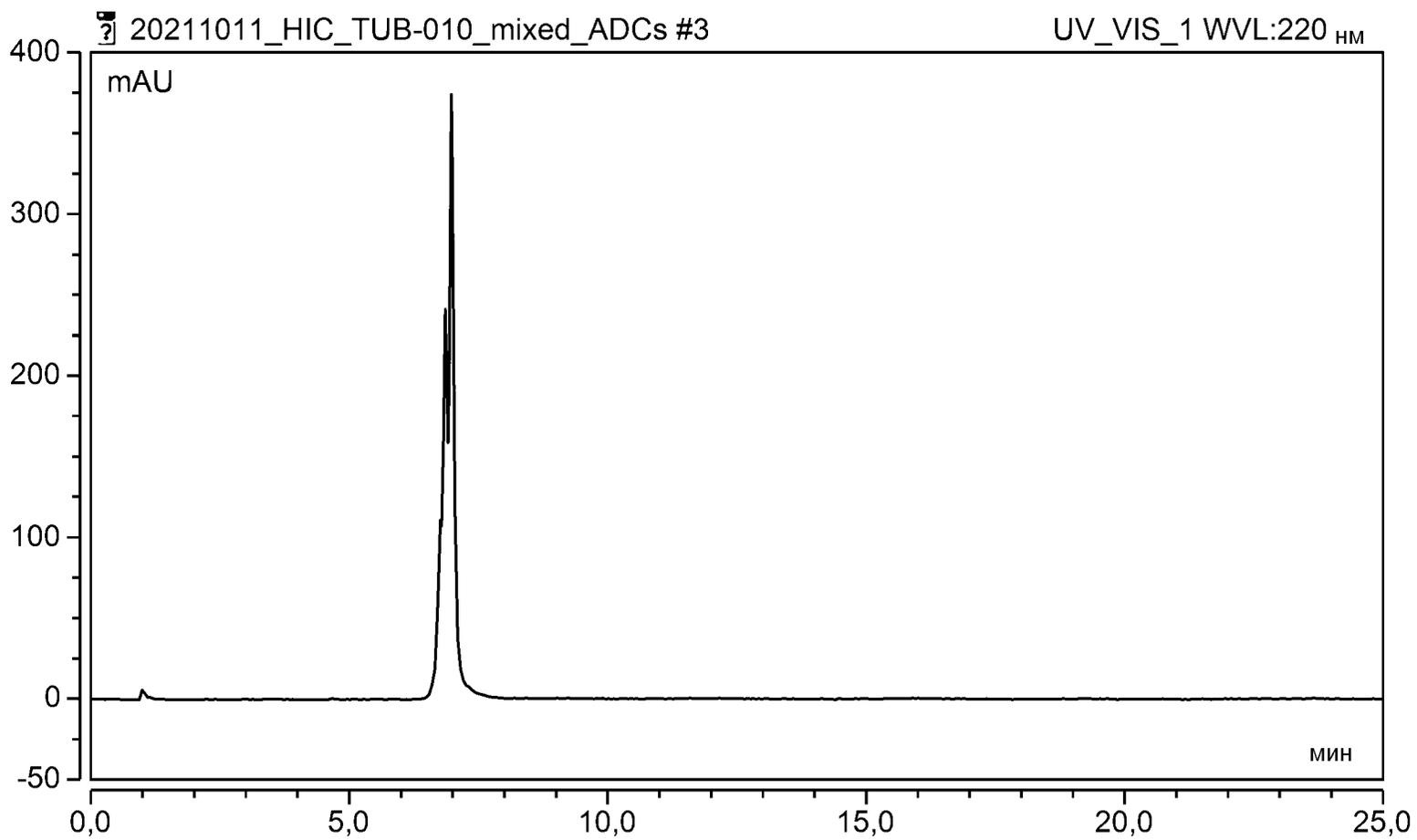
Фигура 19



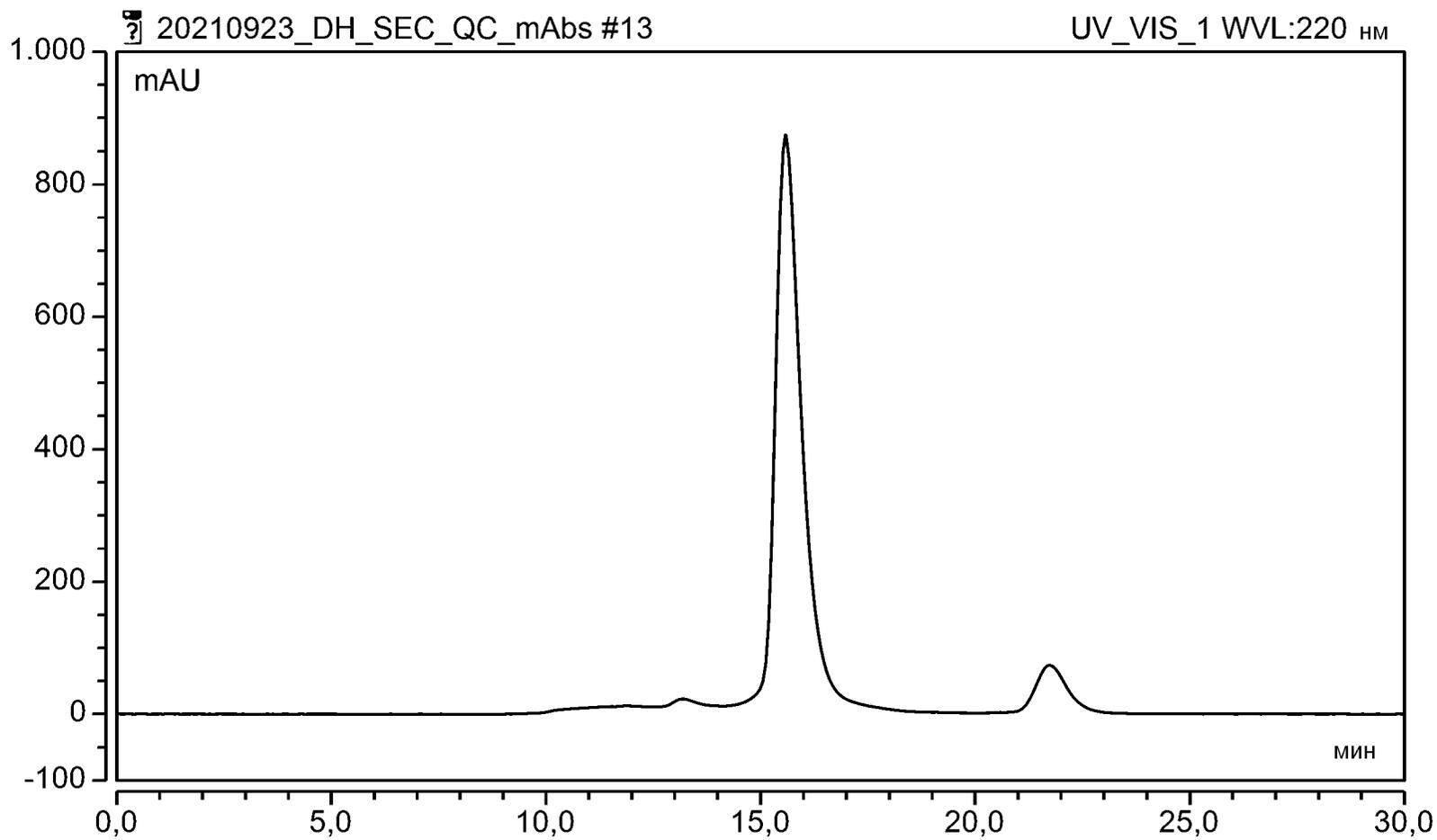
Фигура 20



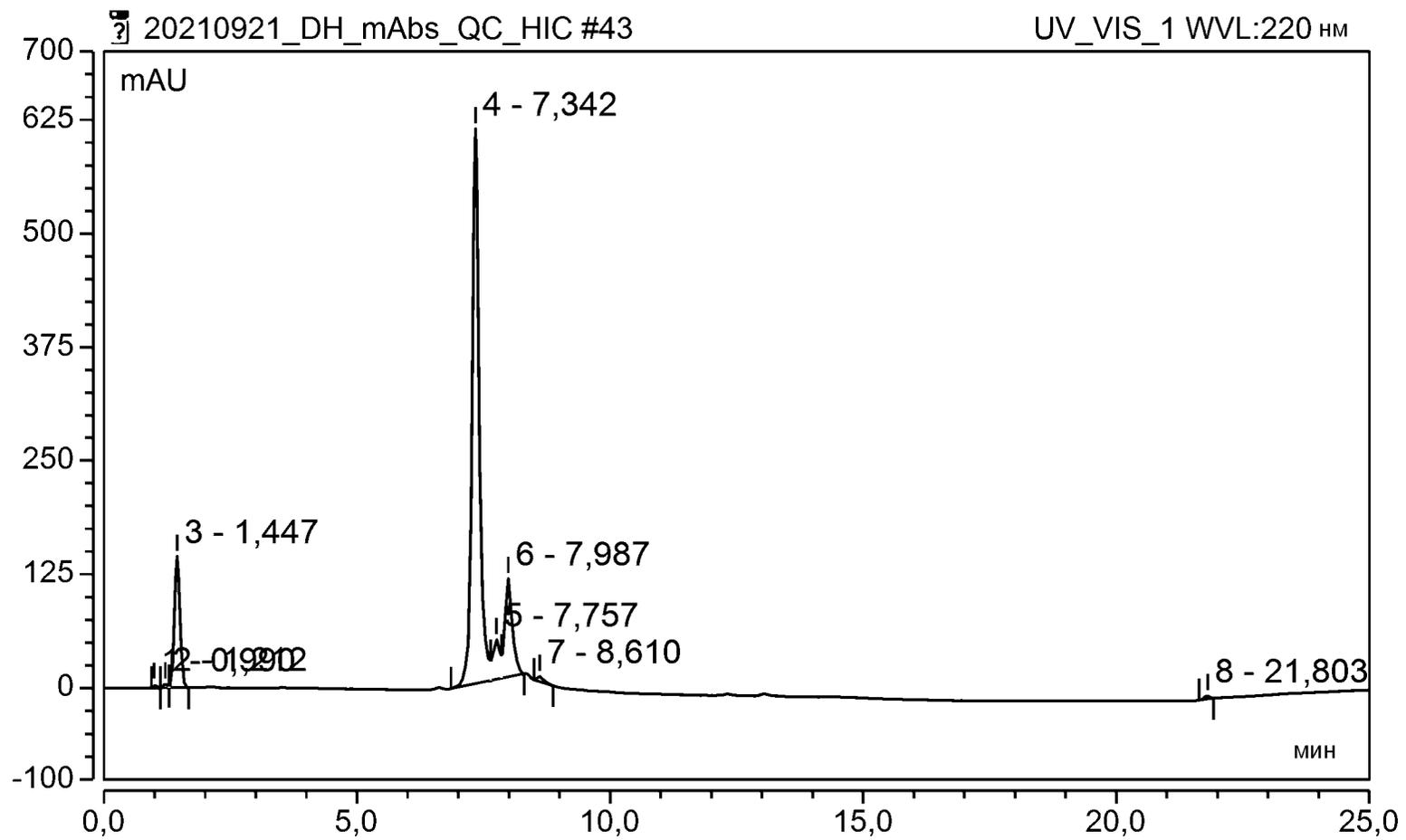
Фигура 21



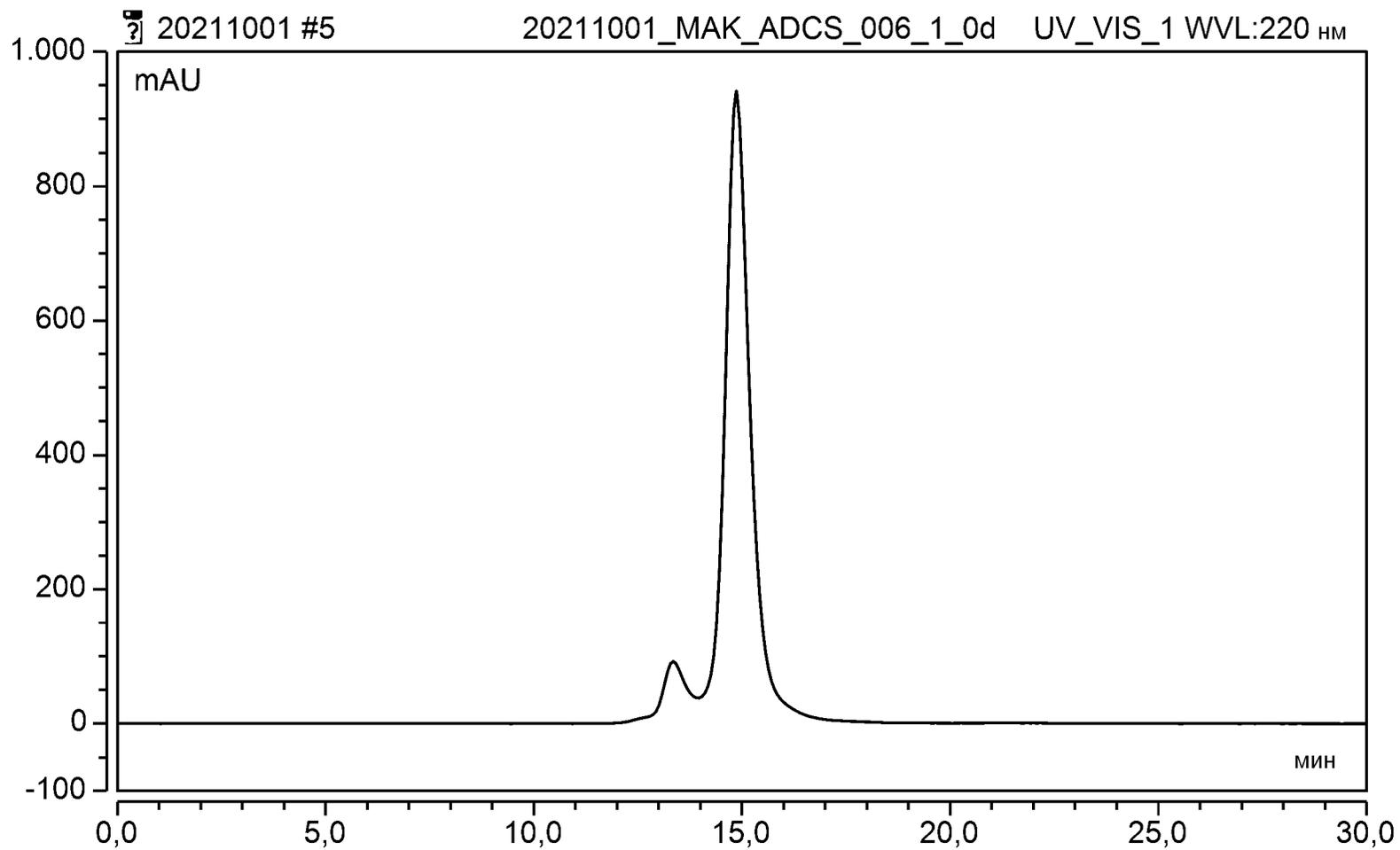
Фигура 22



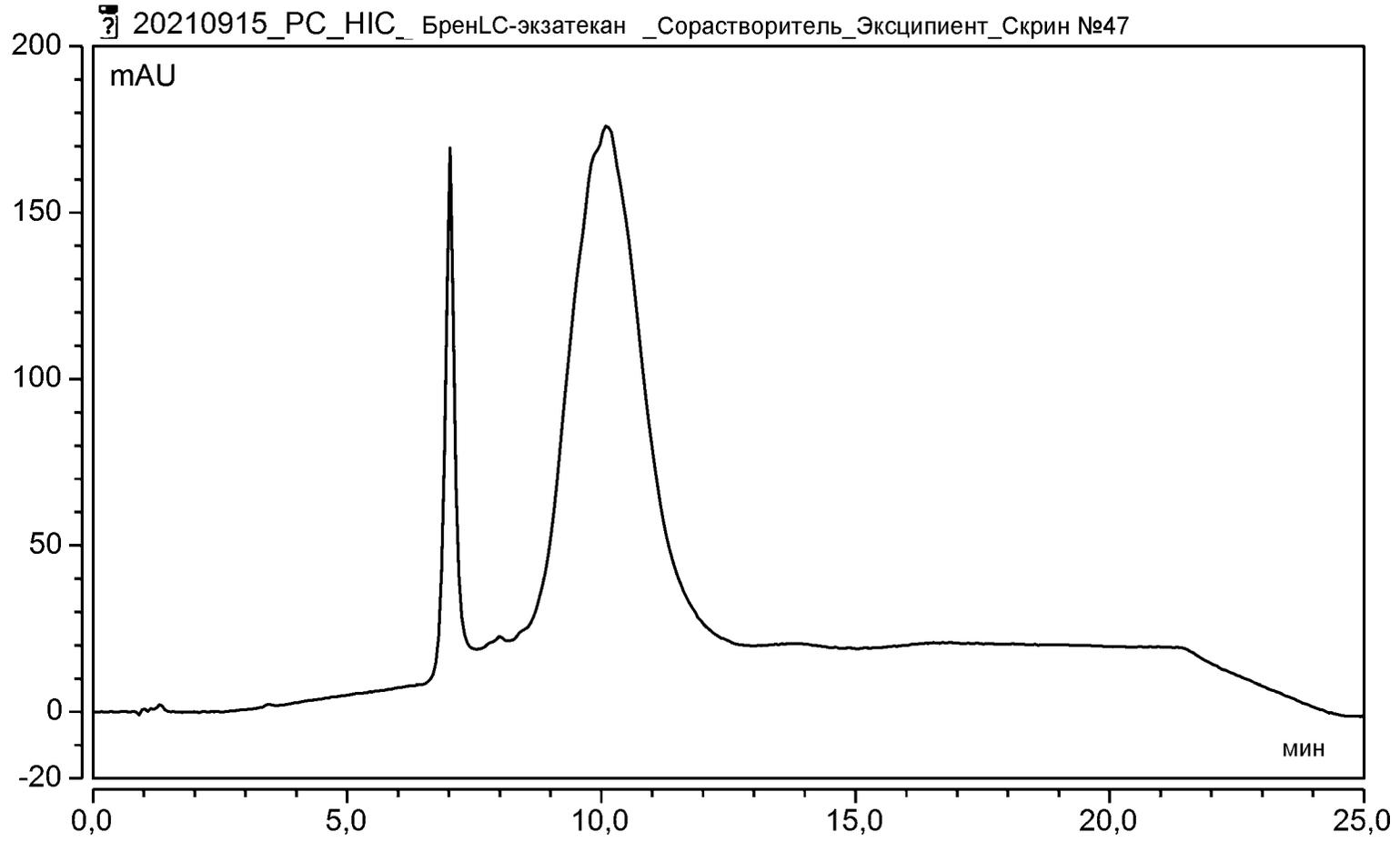
Фигура 23



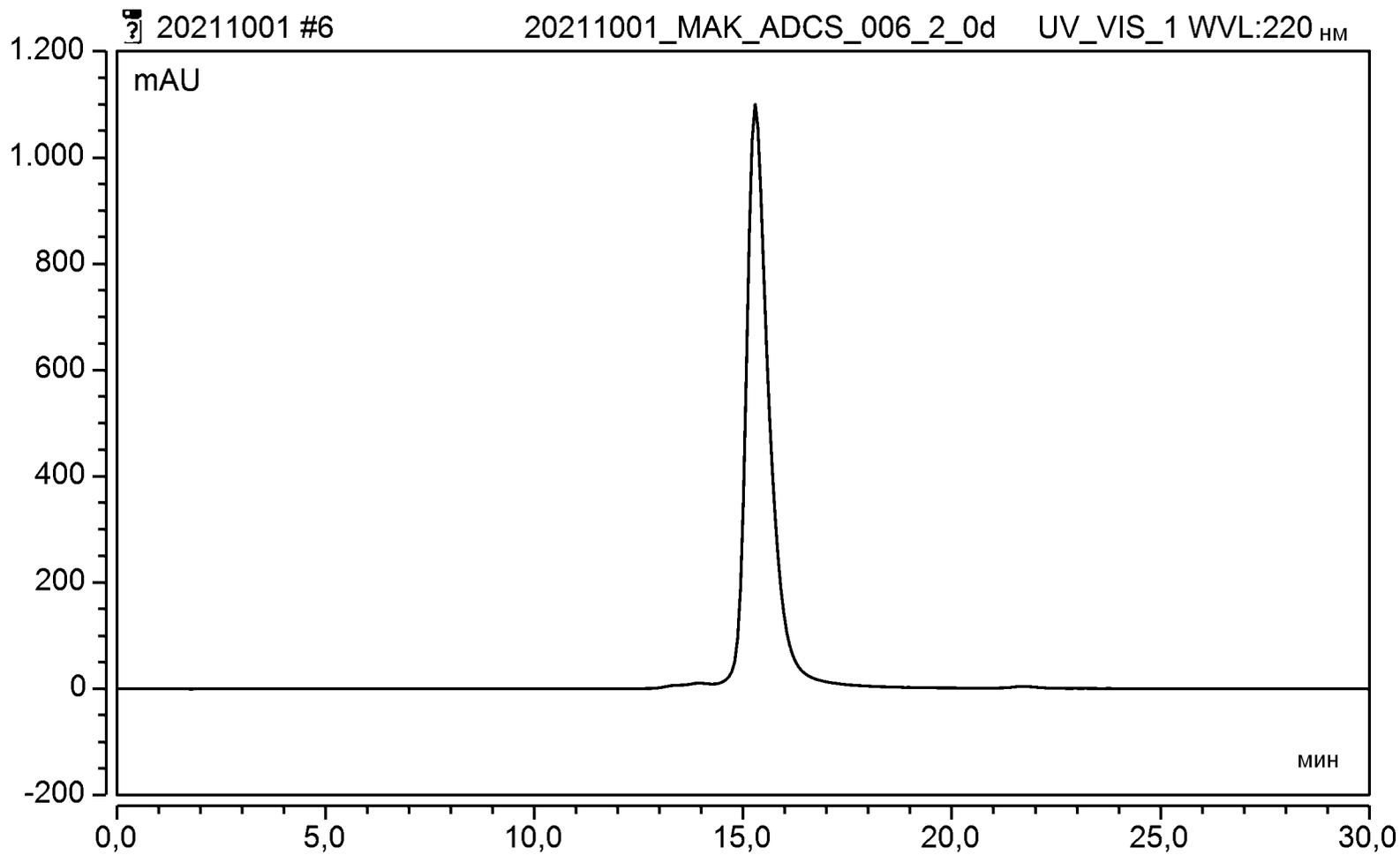
Фигура 24



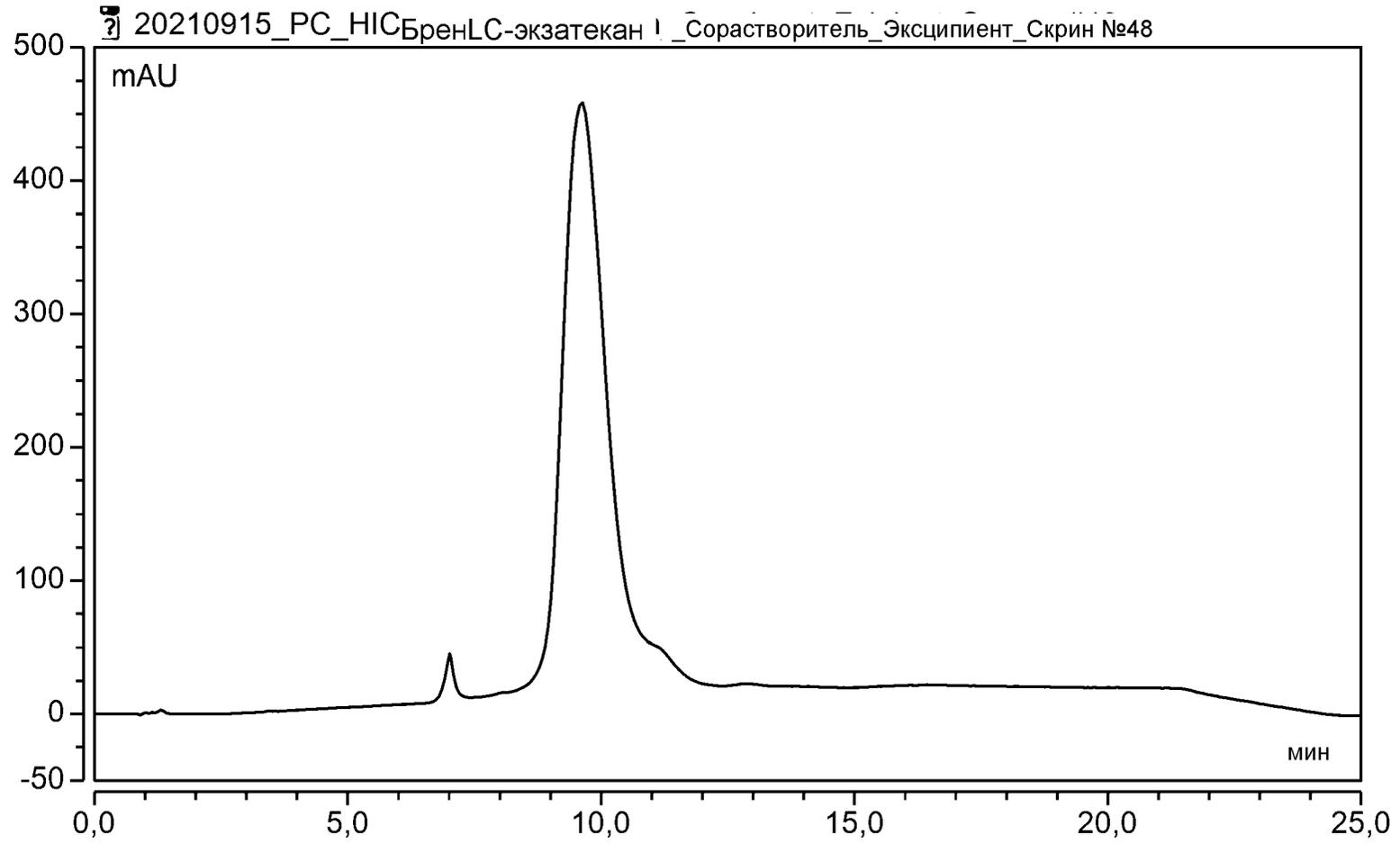
Фигура 25



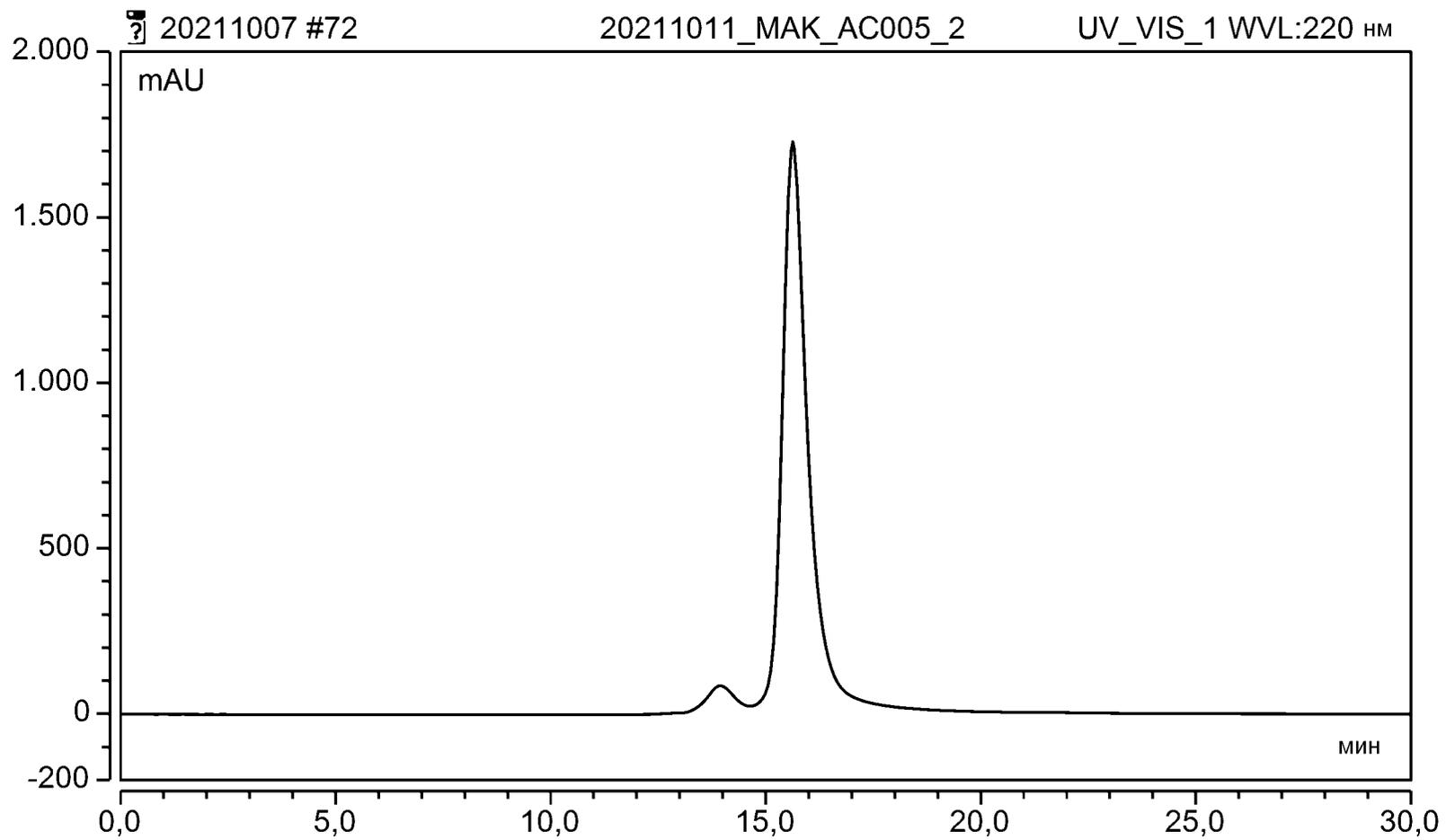
Фигура 26



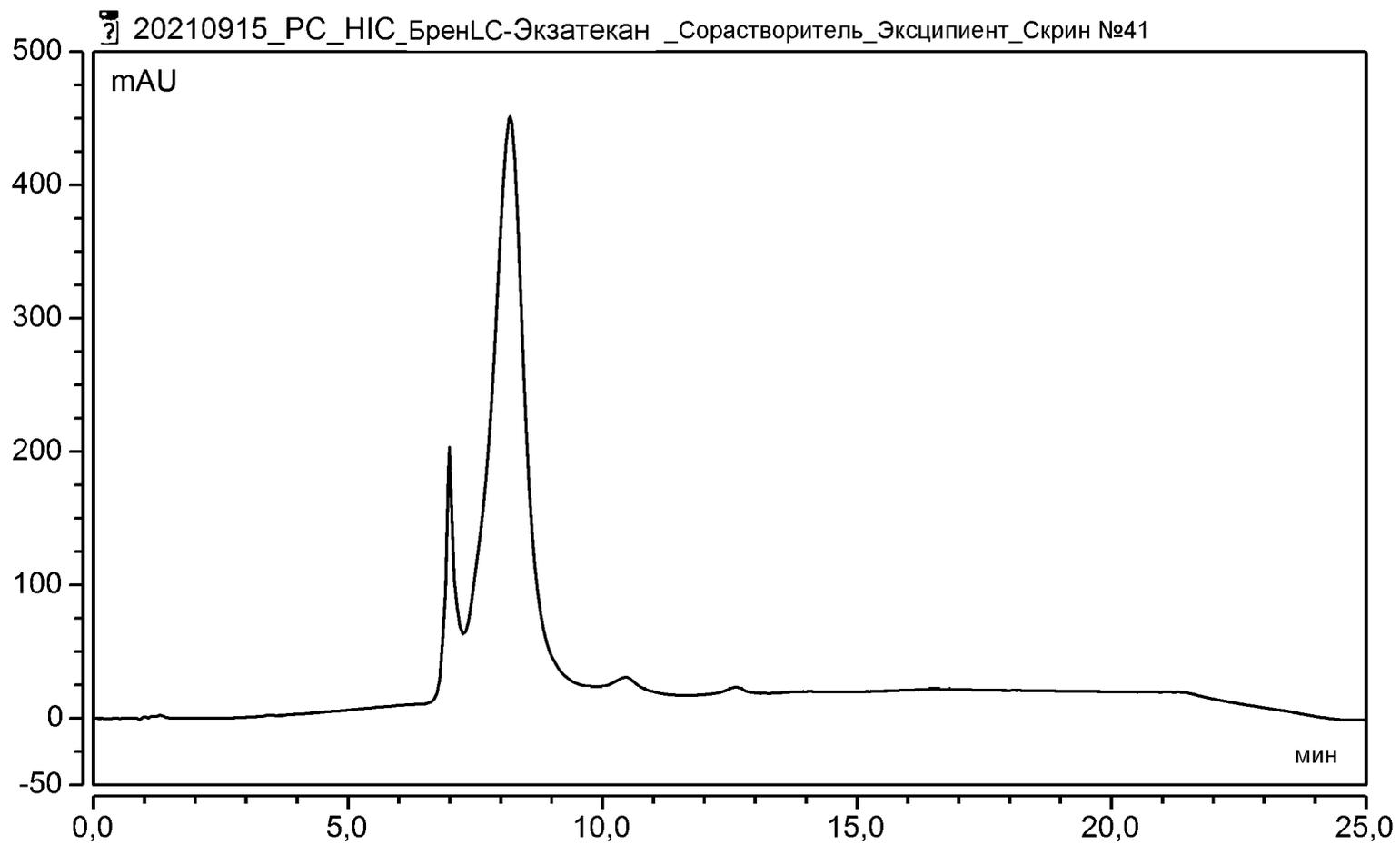
Фигура 27



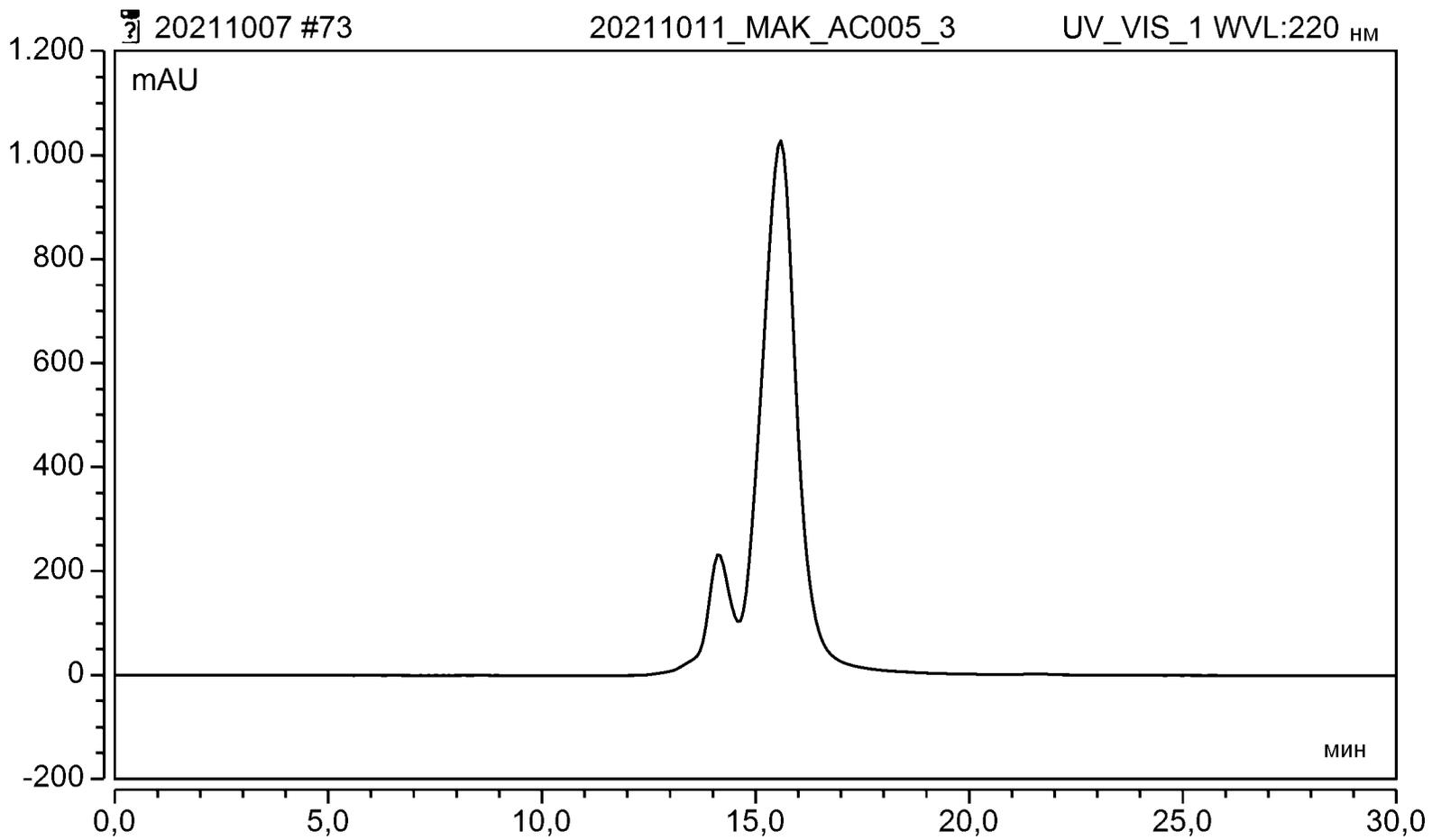
Фигура 28



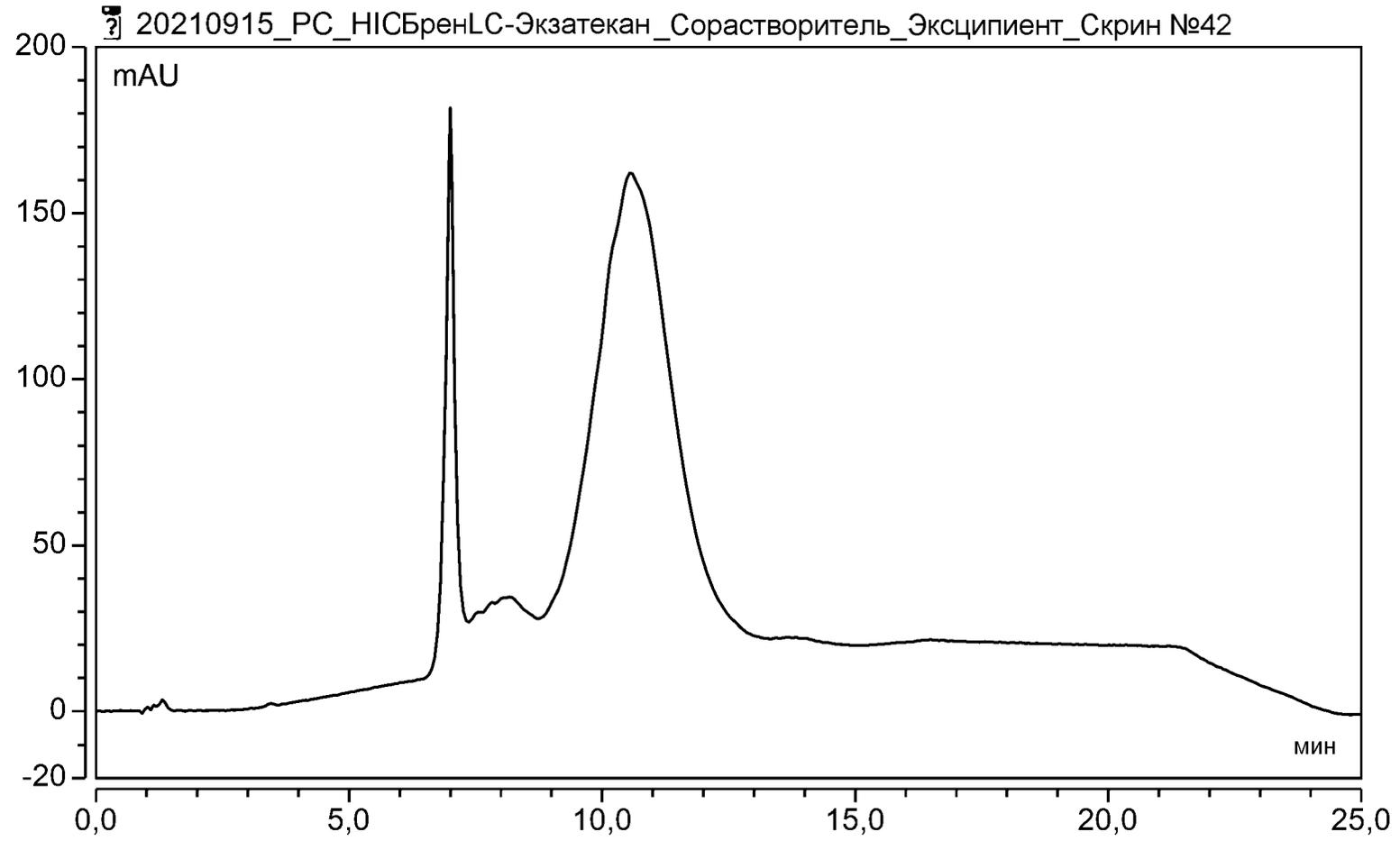
Фигура 29



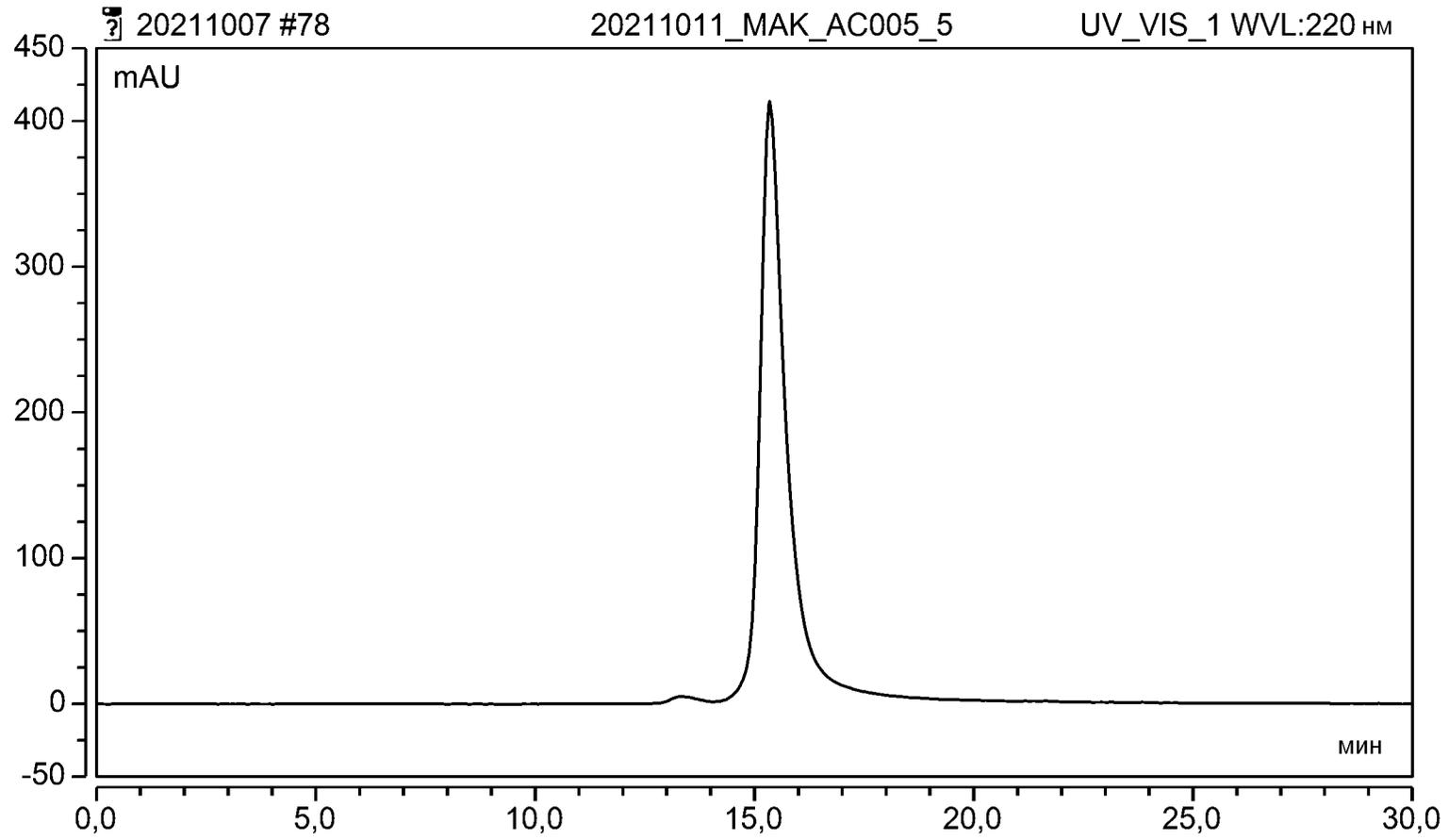
Фигура 30



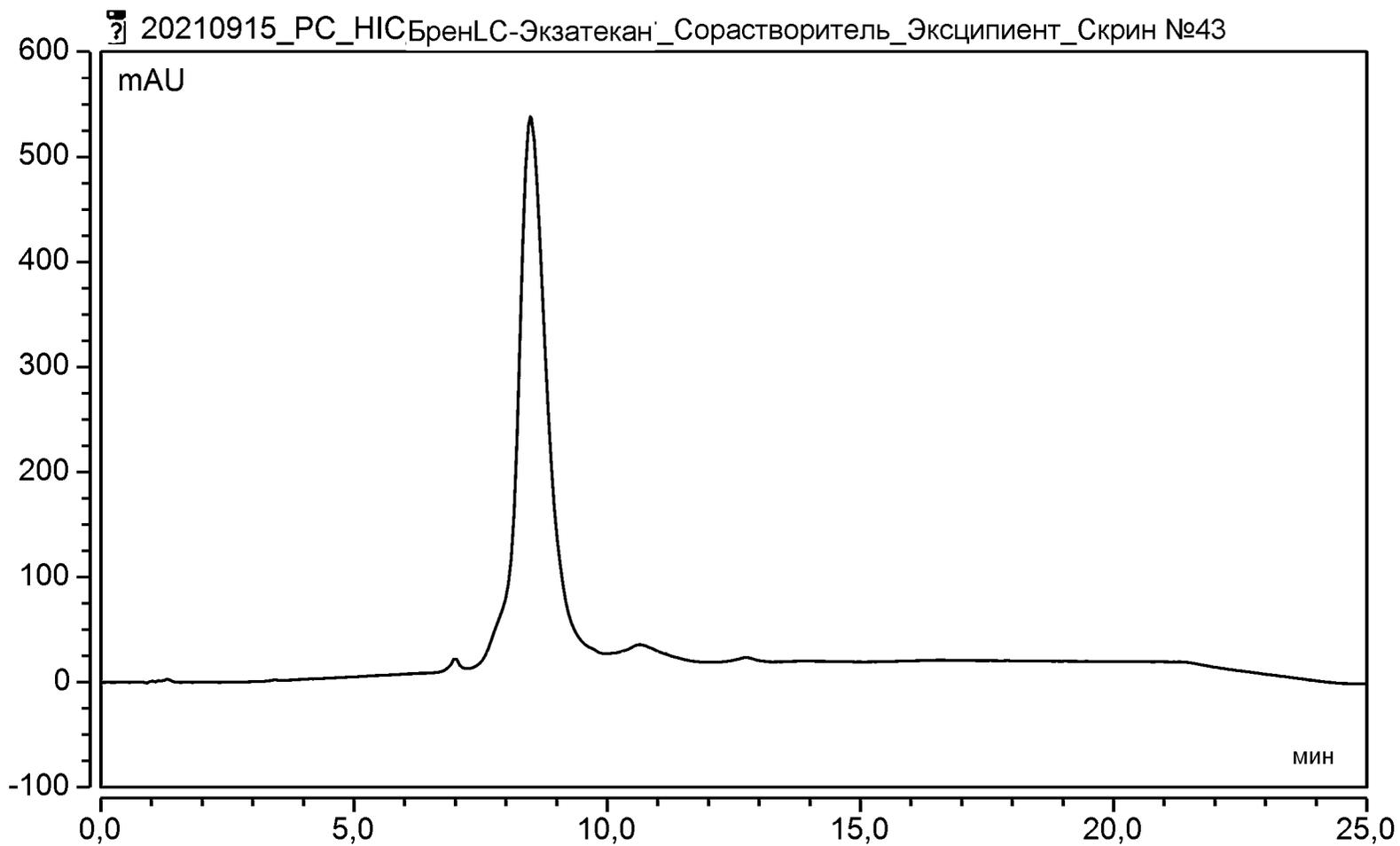
Фигура 31



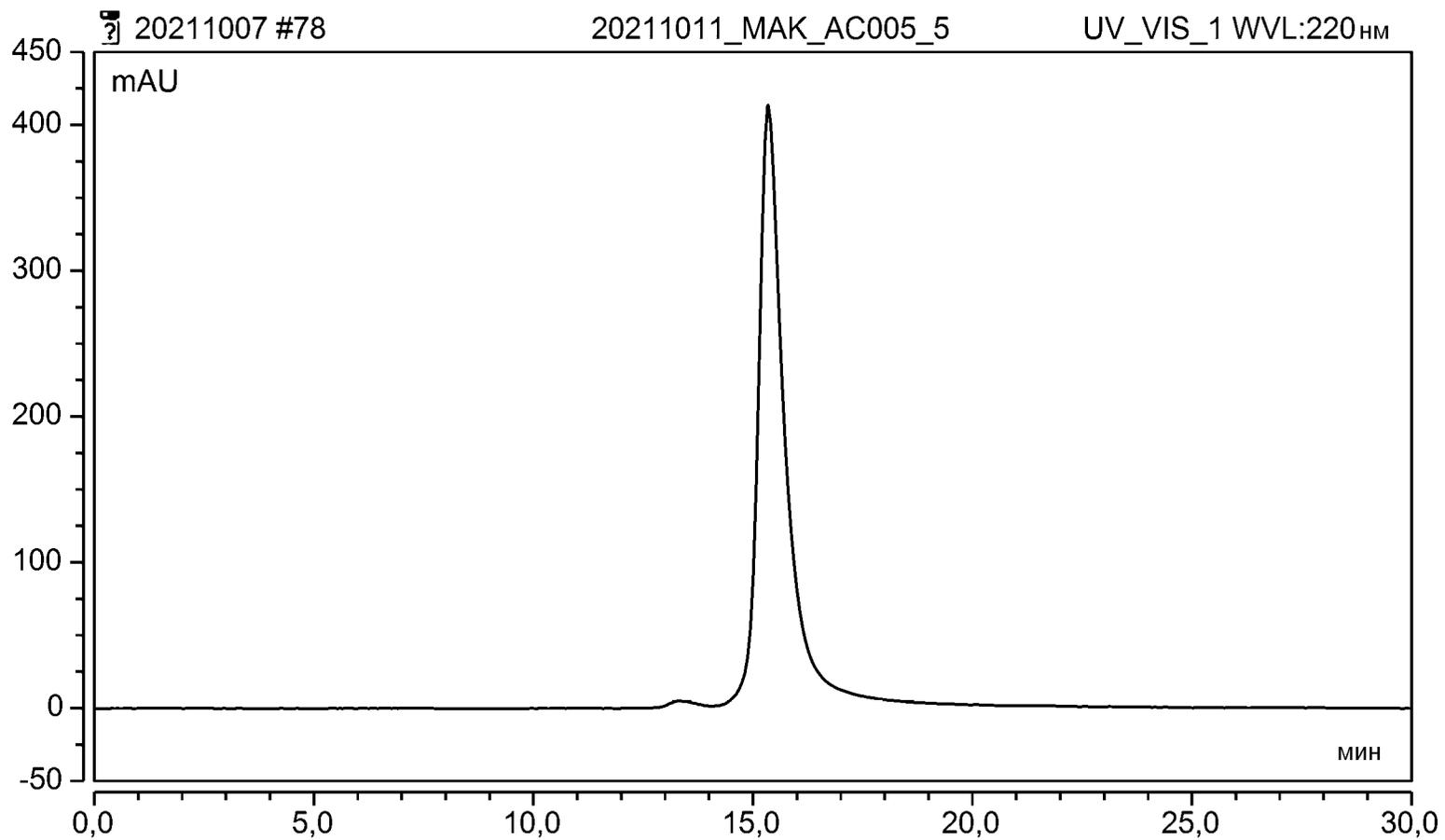
Фигура 32



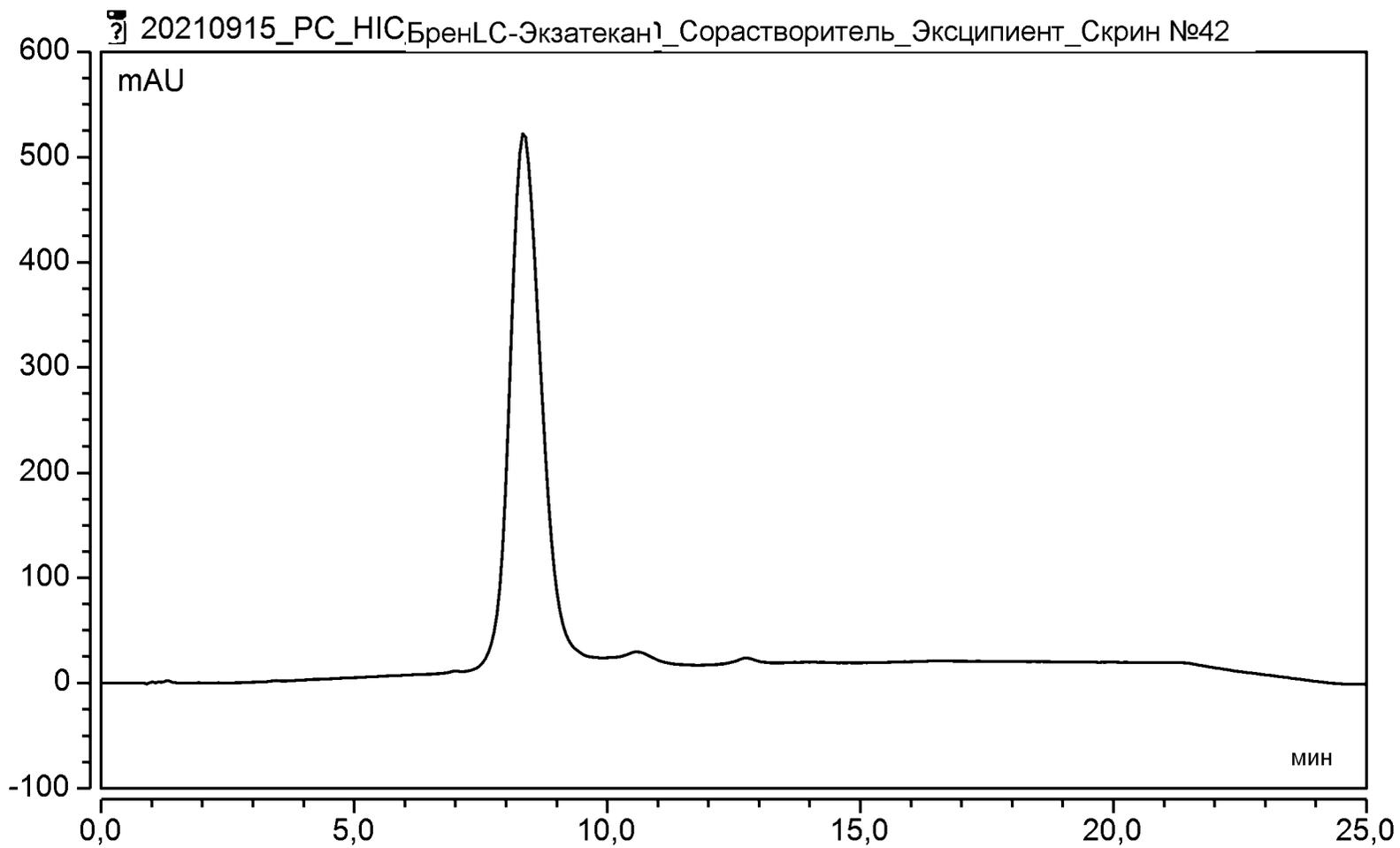
Фигура 33



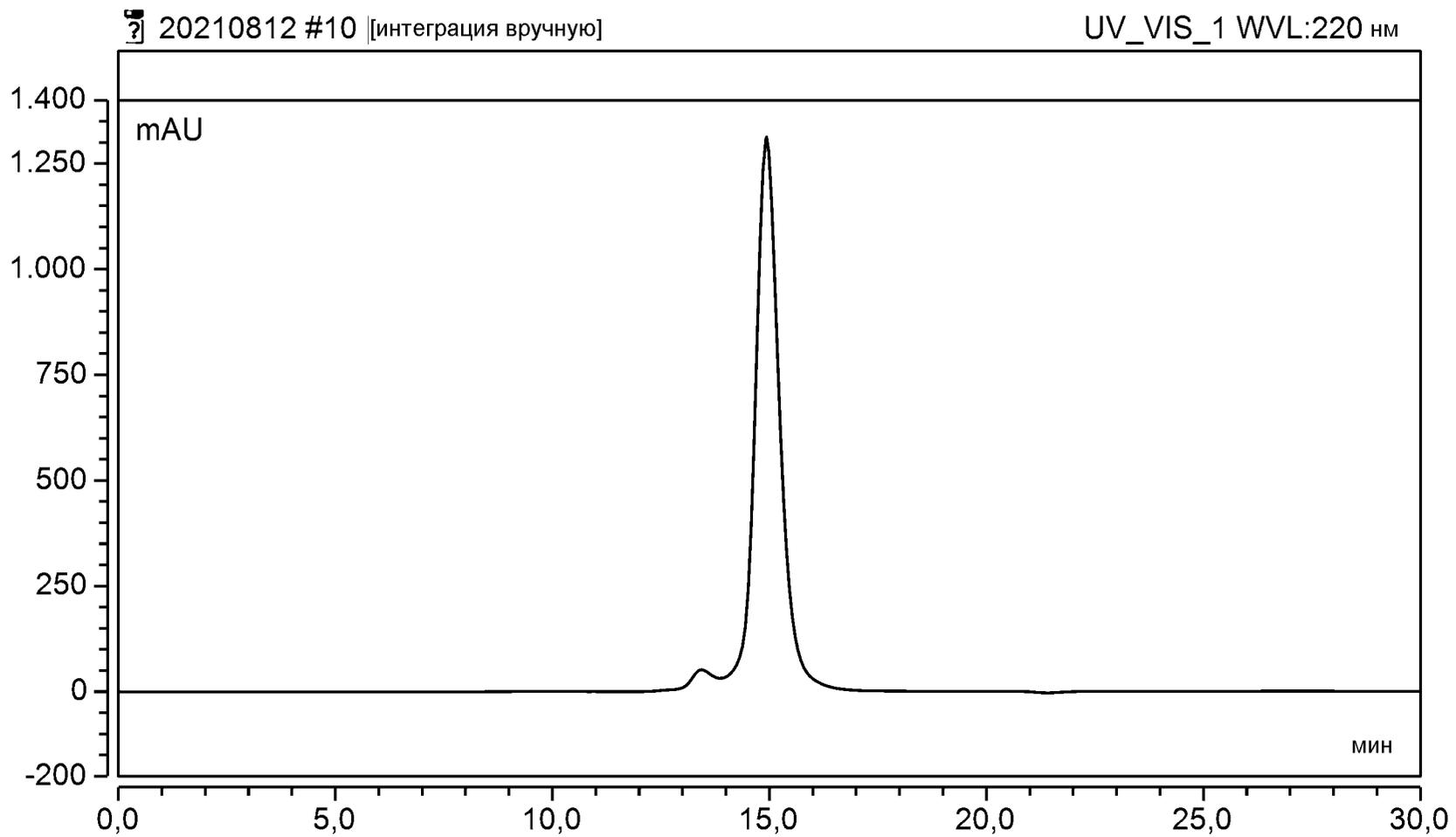
Фигура 34



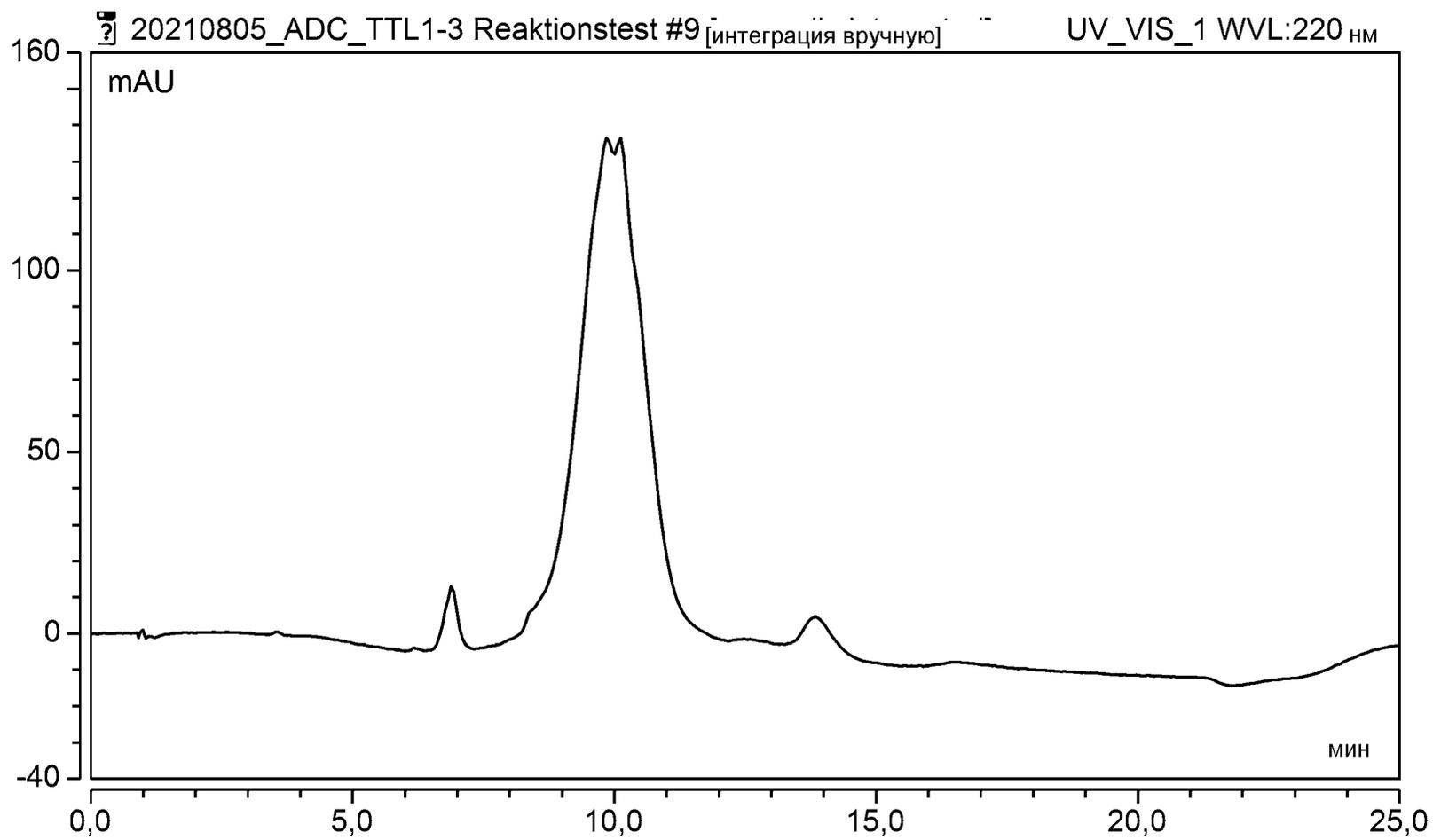
Фигура 35



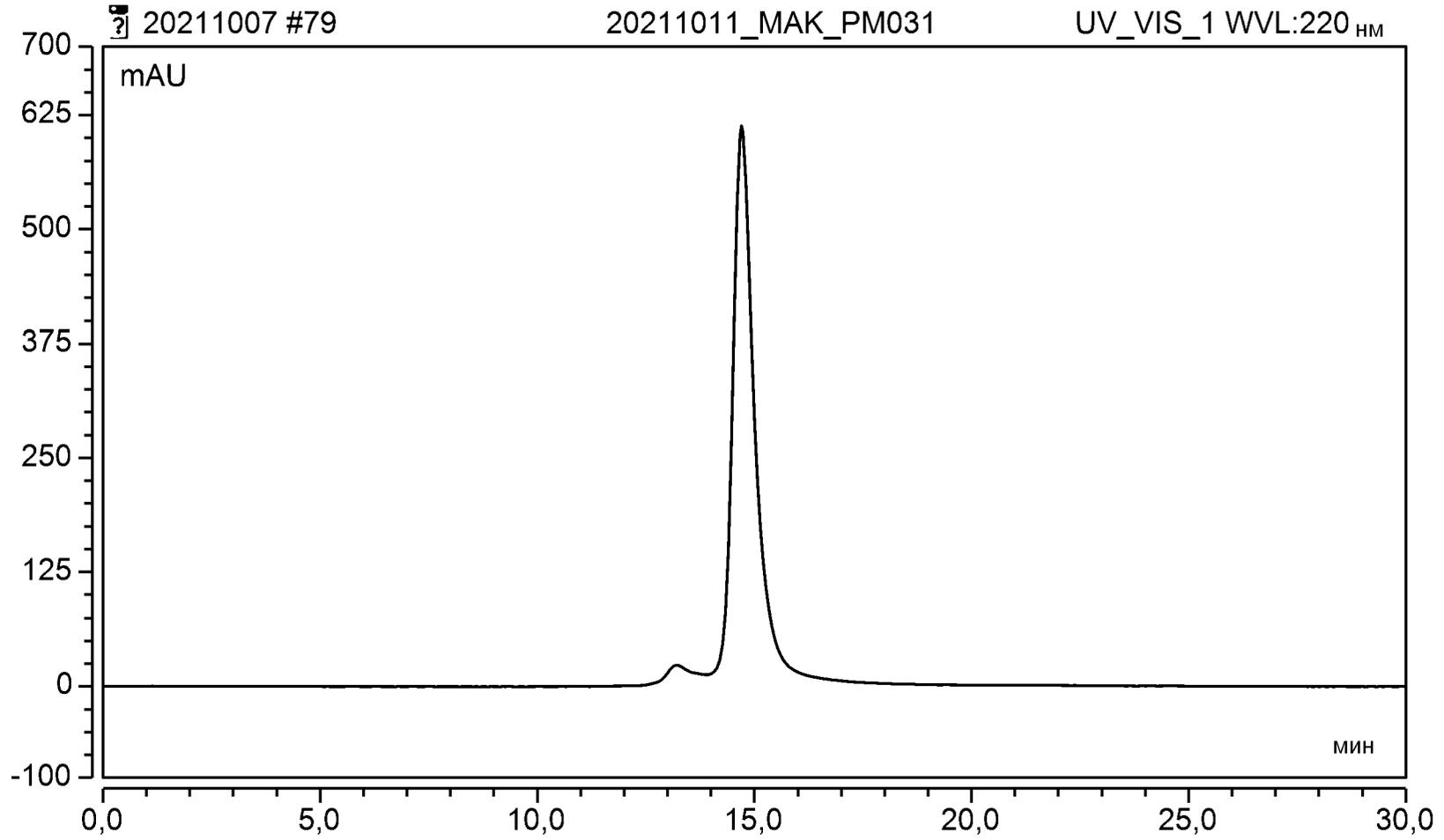
Фигура 36



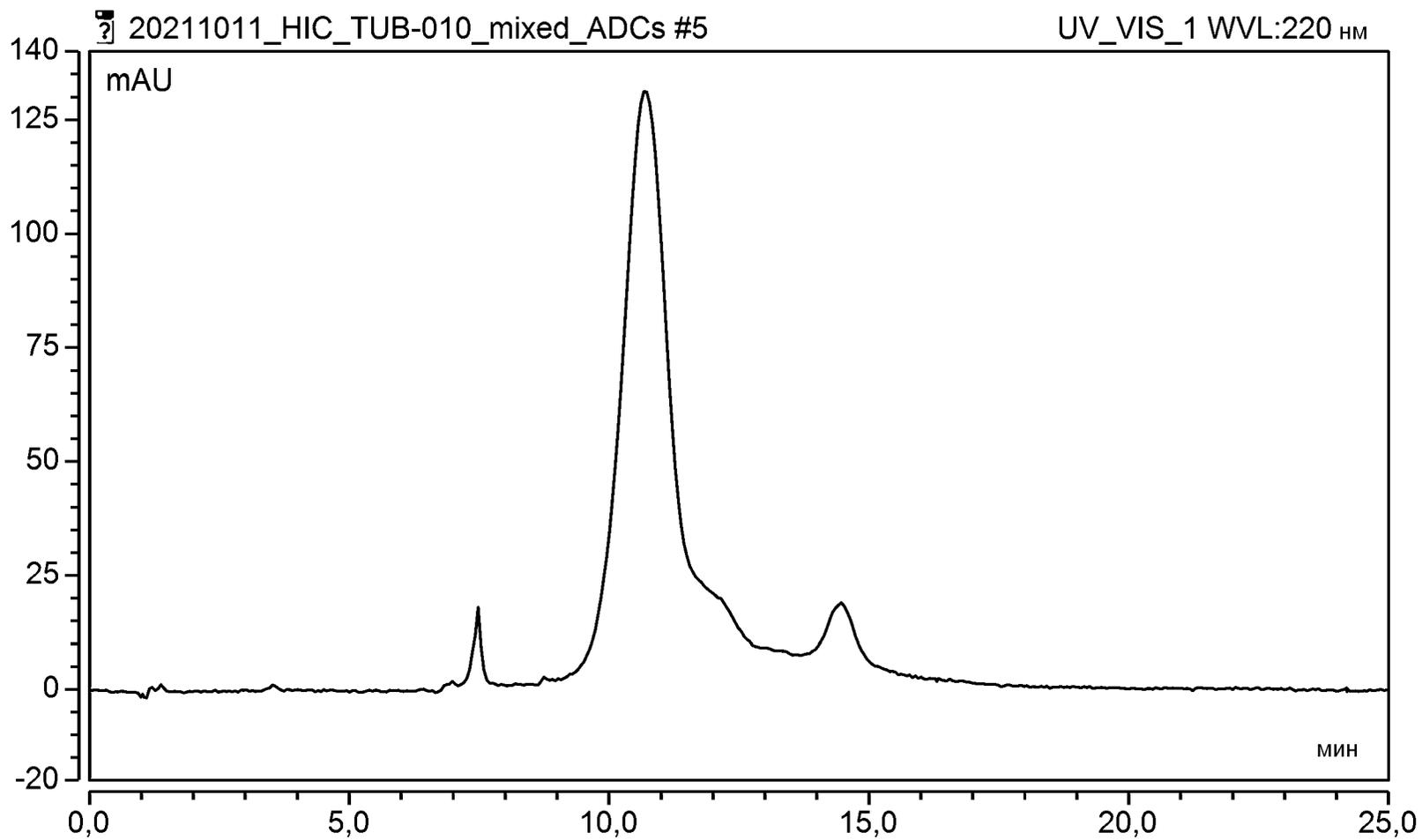
Фигура 37



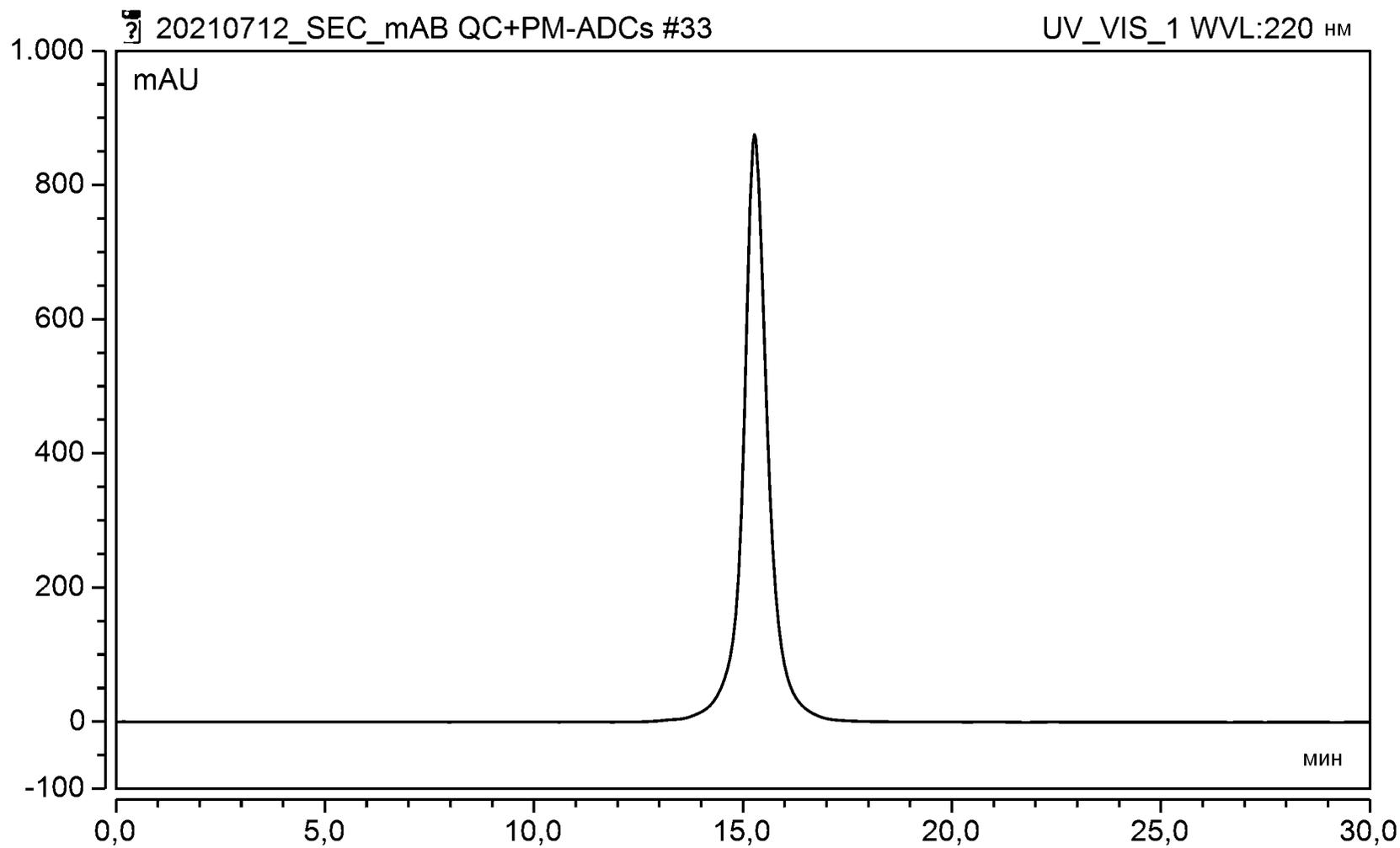
Фигура 38



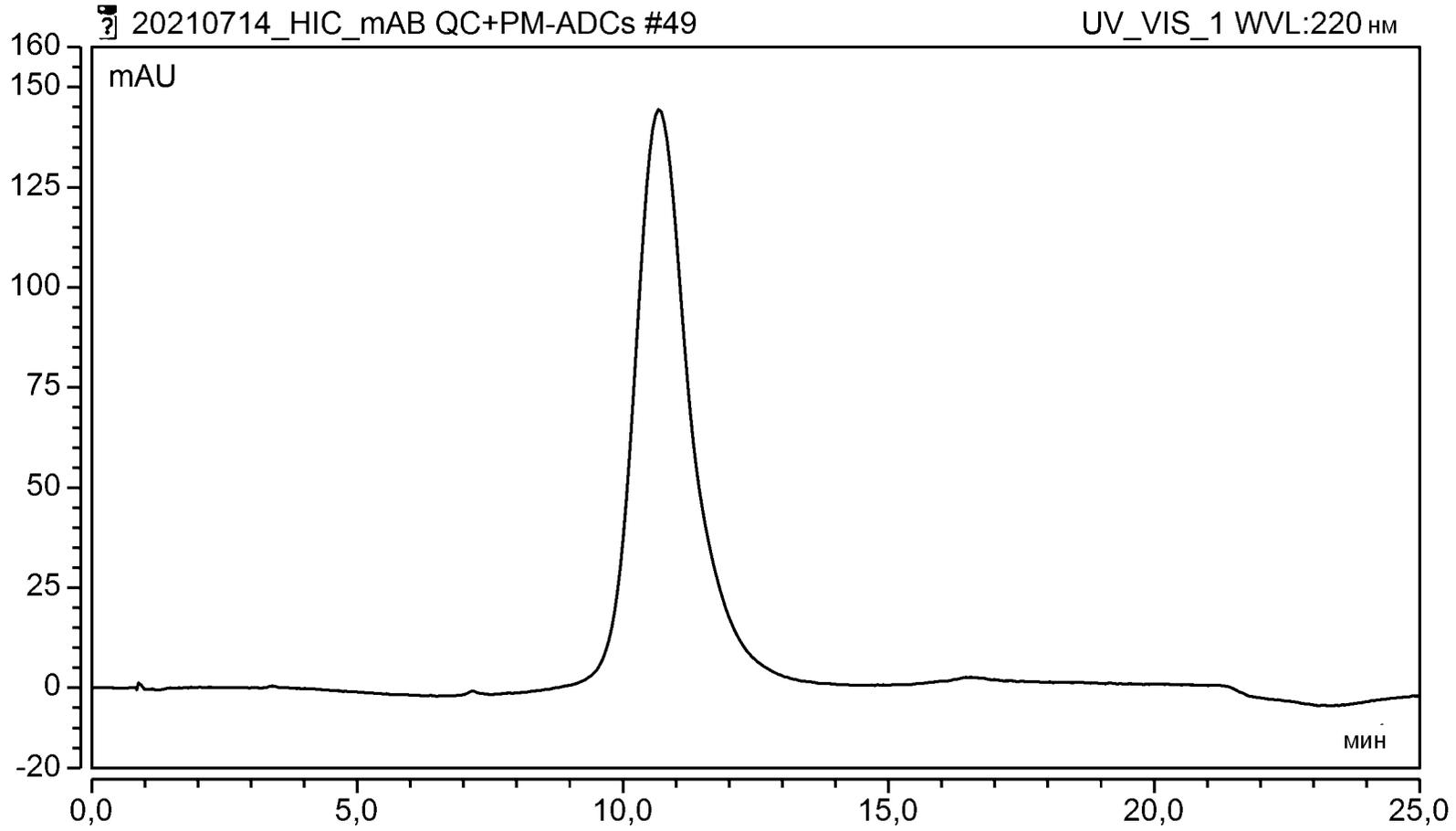
Фигура 39



Фигура 40



Фигура 41



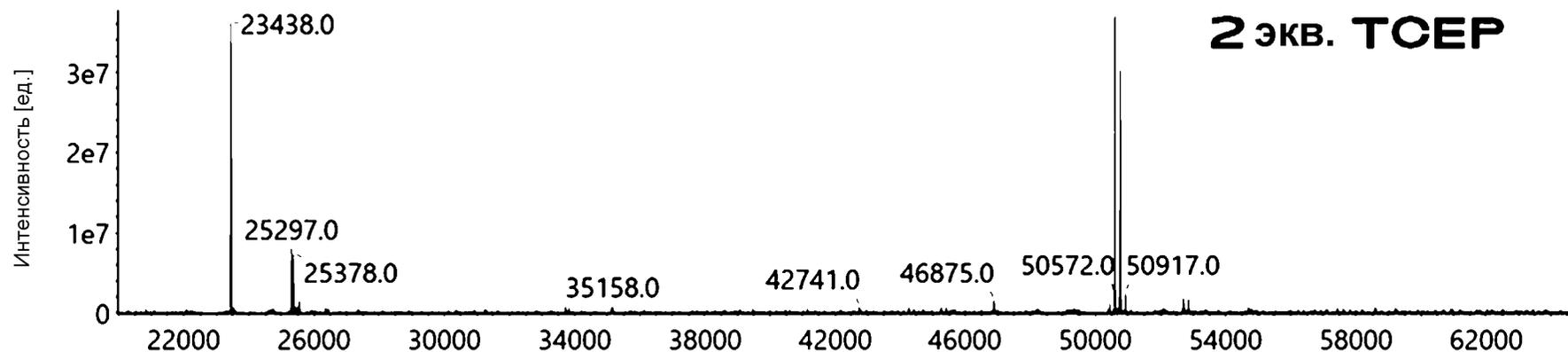
Фигура 42

Название заметки: 20210908\_PM040\_1

Название канала: 1: Среднее время 3.0013 мин : TOF MS (500-4000) ESI+ : MaxEnt1 : Объед.

Описание заметки:

Белок: БренLC – легкая цепь

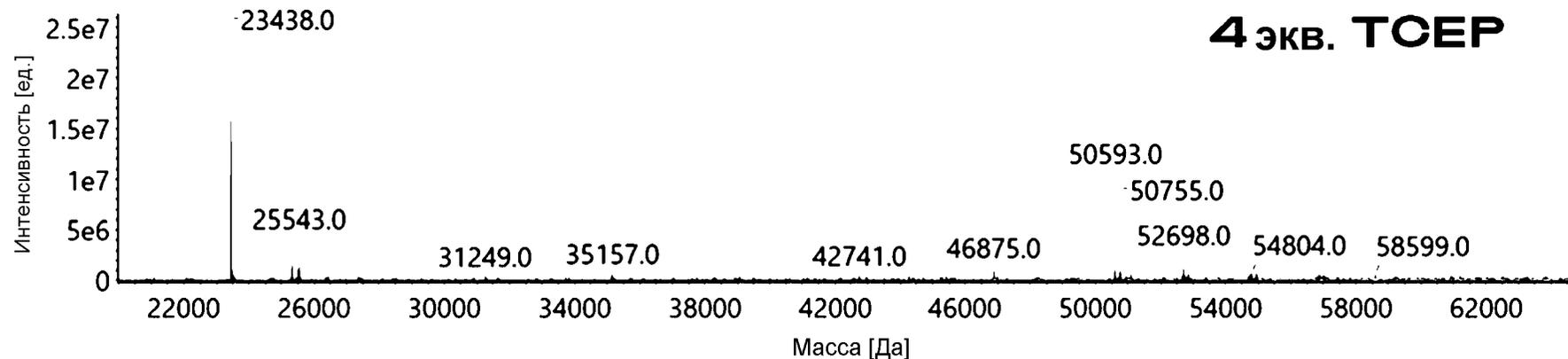


Название заметки: 20210908\_PM040\_2

Название канала: 1: Среднее время 3.0012 мин : TOF MS (500-4000) ESI+ : MaxEnt1 : Объед.

Описание заметки:

Белок: БренLC – легкая цепь

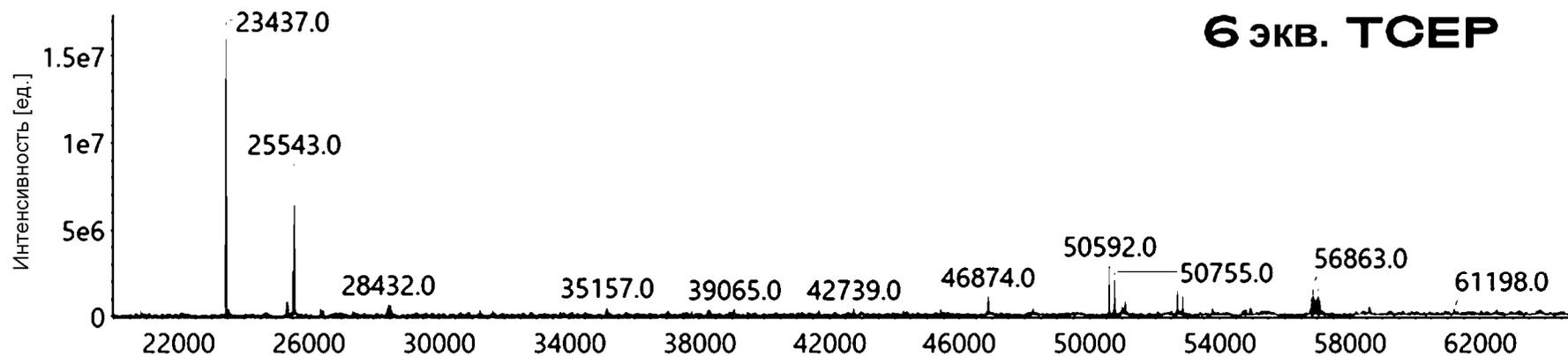


Фигура 42 (продолжение)

Название заметки: 20210908\_PM040\_3      Название канала: 1: Среднее время 3.0012 мин : TOF MS (500-4000) ESI+ : MaxEnt1 : Объед.

Описание заметки:

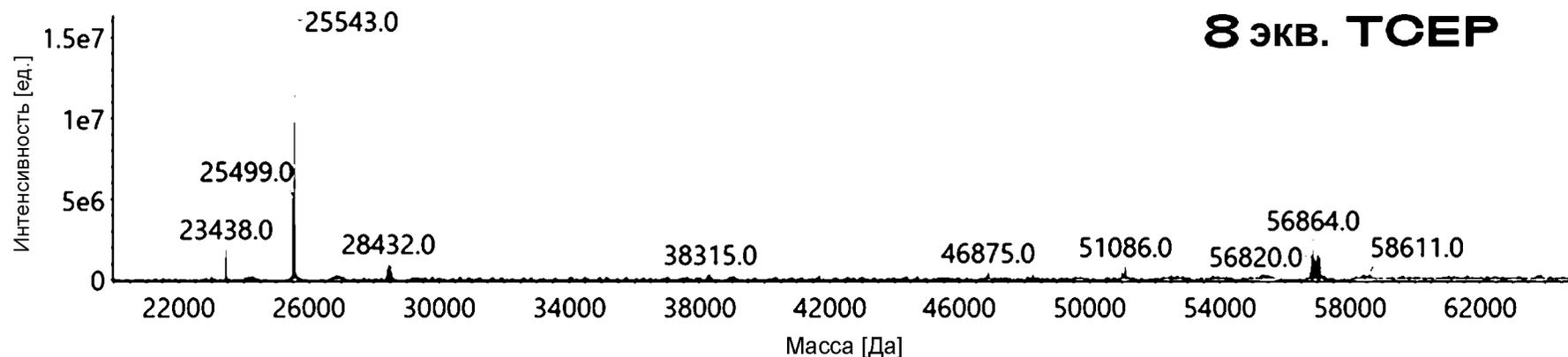
Белок: БренLC – легкая цепь



Название заметки: 20210908\_PM040\_4      Название канала: 1: Среднее время 3.0012 мин : TOF MS (500-4000) ESI+ : MaxEnt1 : Объед.

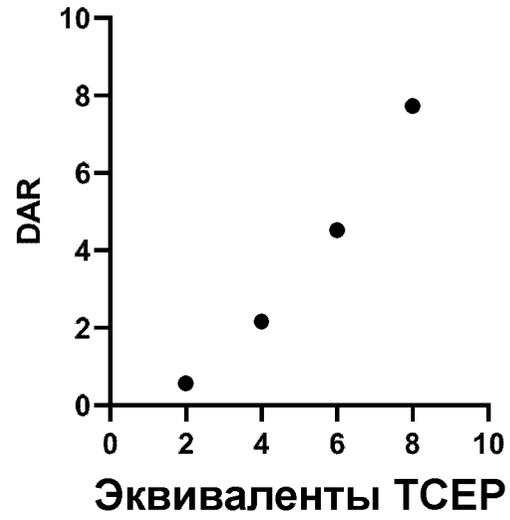
Описание заметки:

Белок: БренLC – легкая цепь

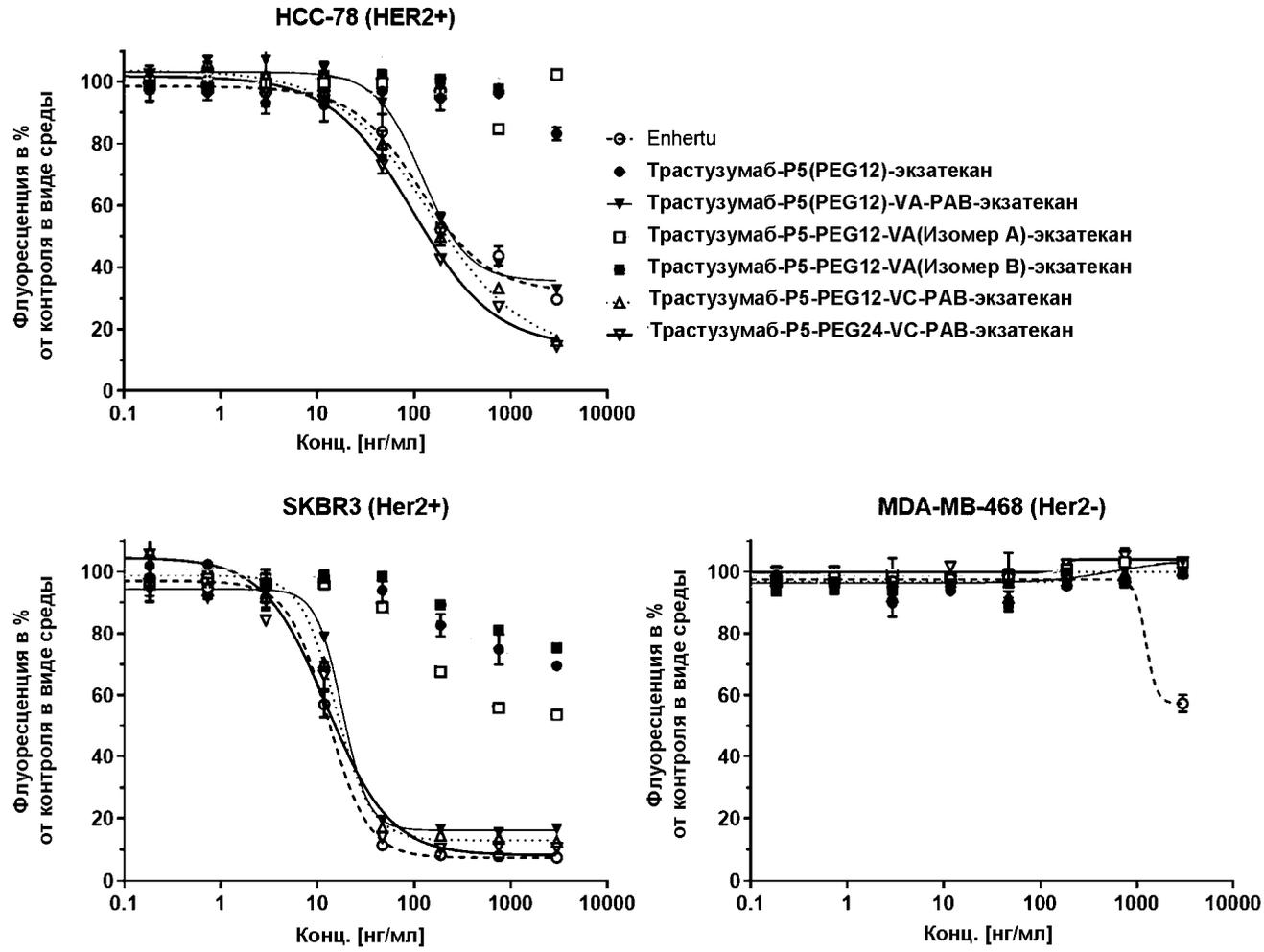


Фигура 42 (продолжение)

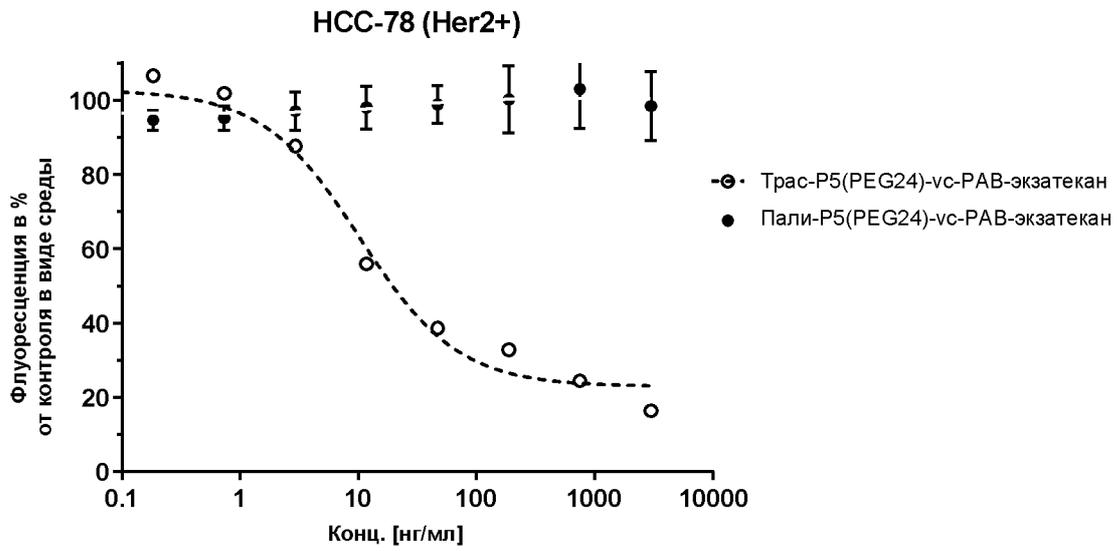
15 экв. линкера-полезной нагрузки



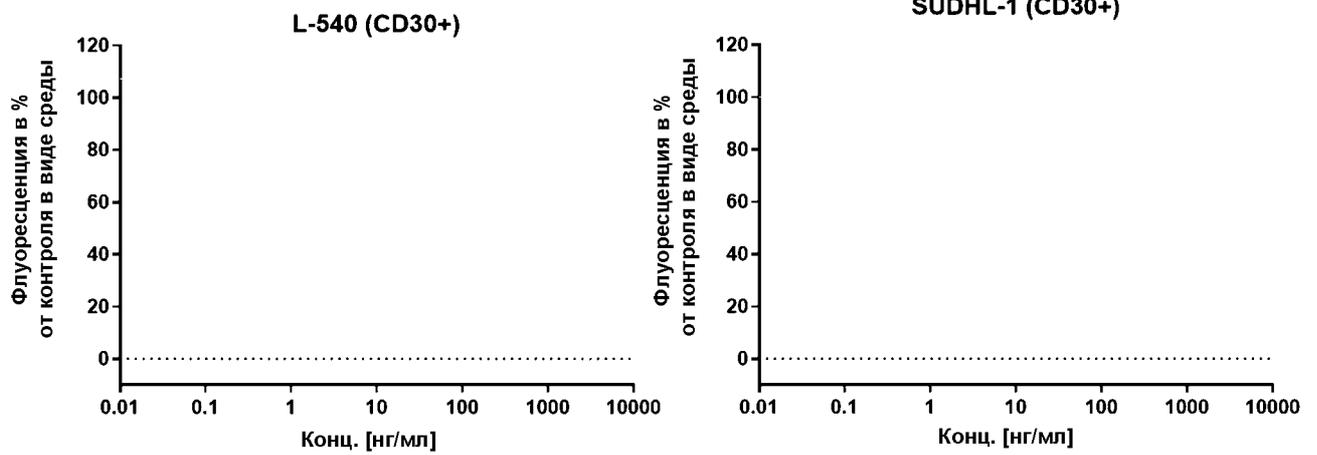
Фигура 43



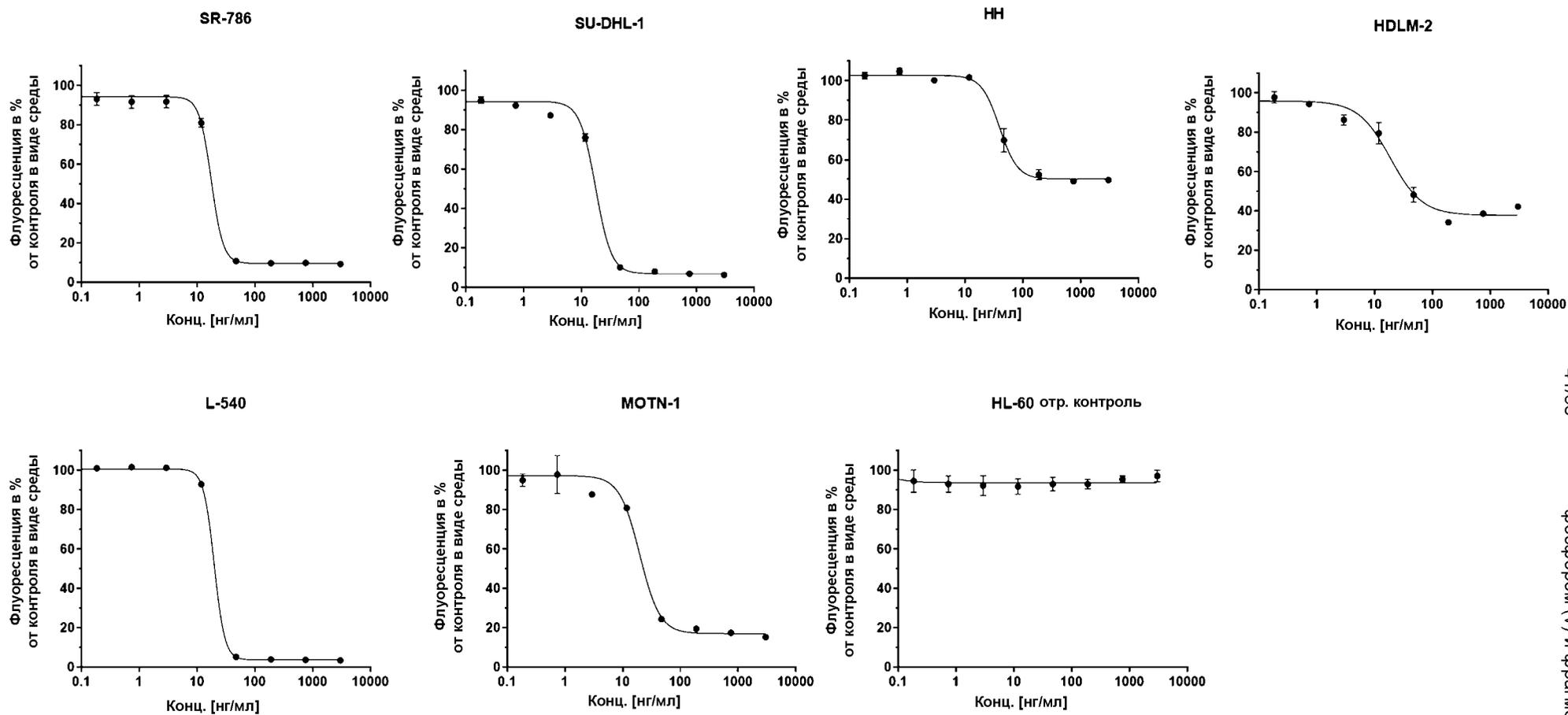
Фигура 44



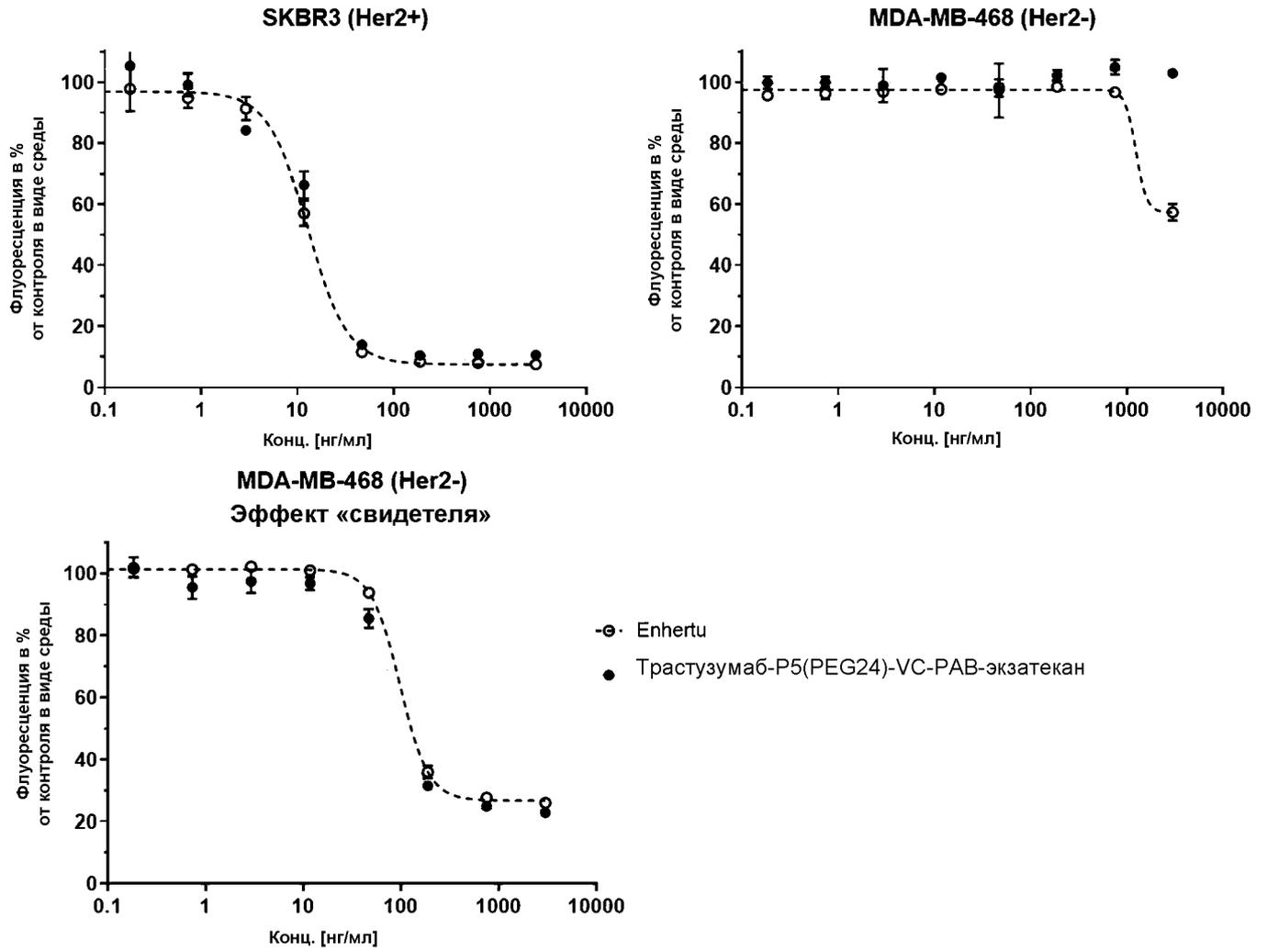
Фигура 45



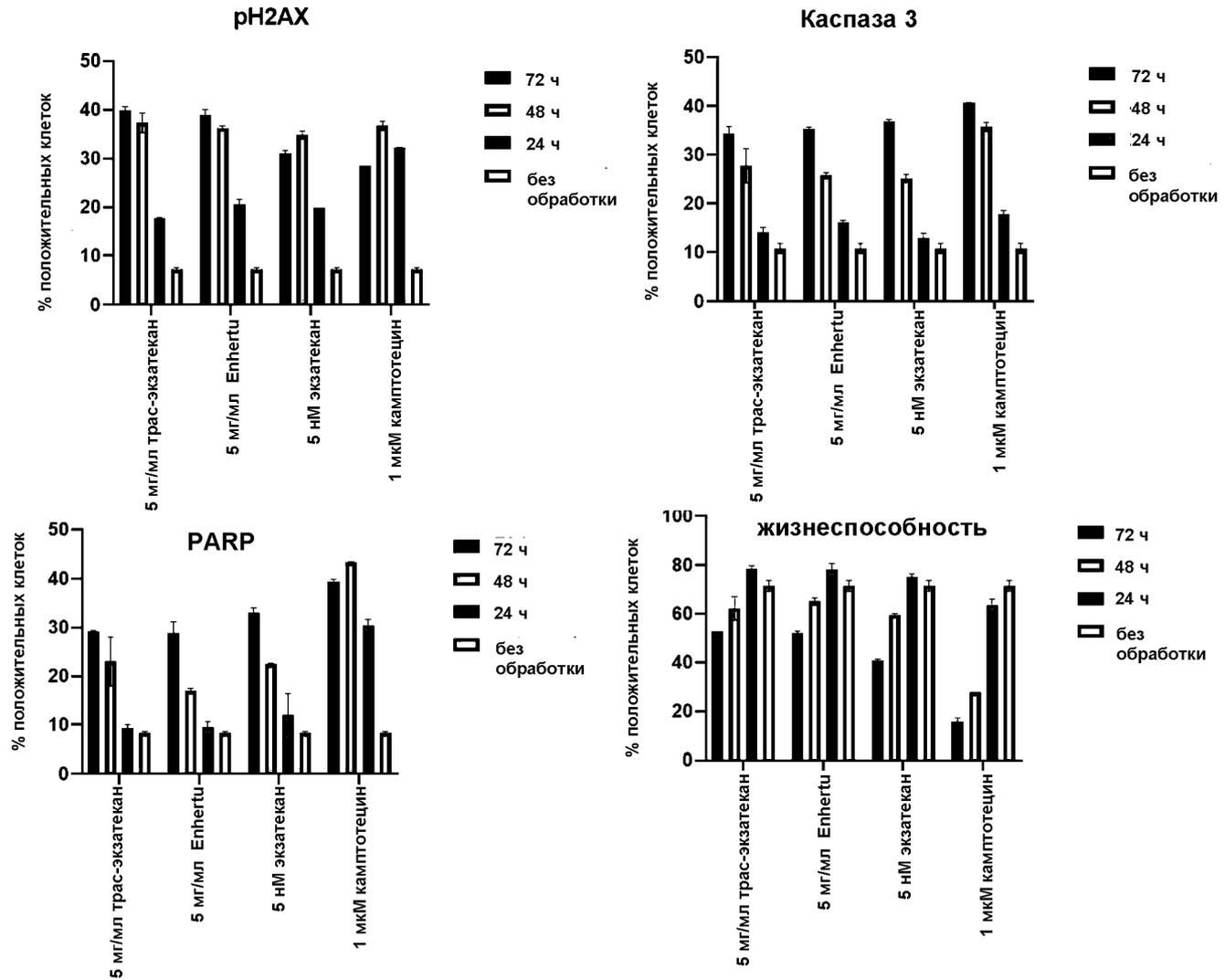
Фигура 46



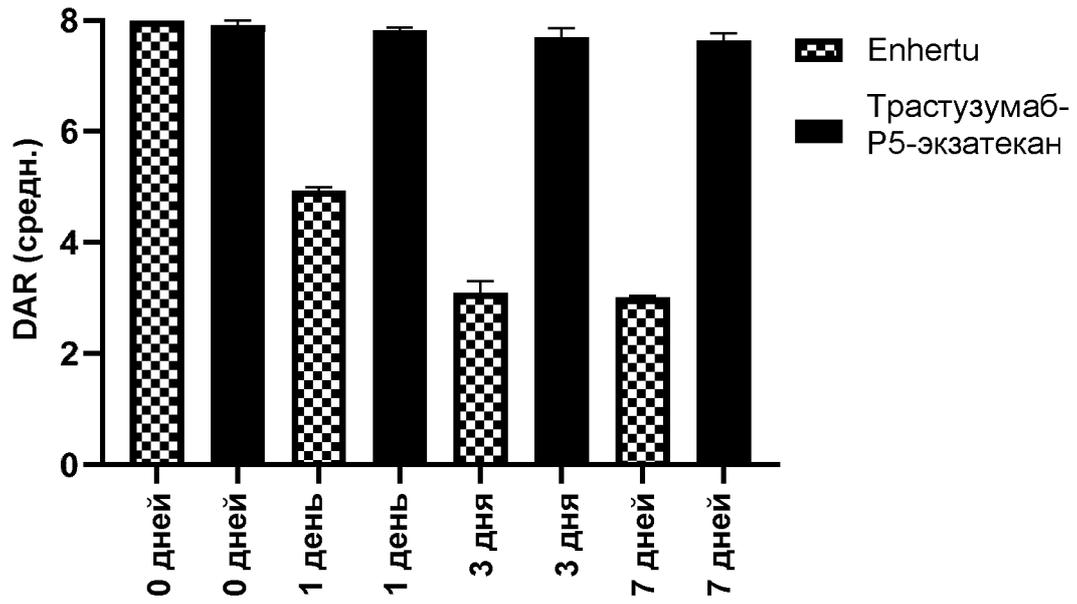
Фигура 47



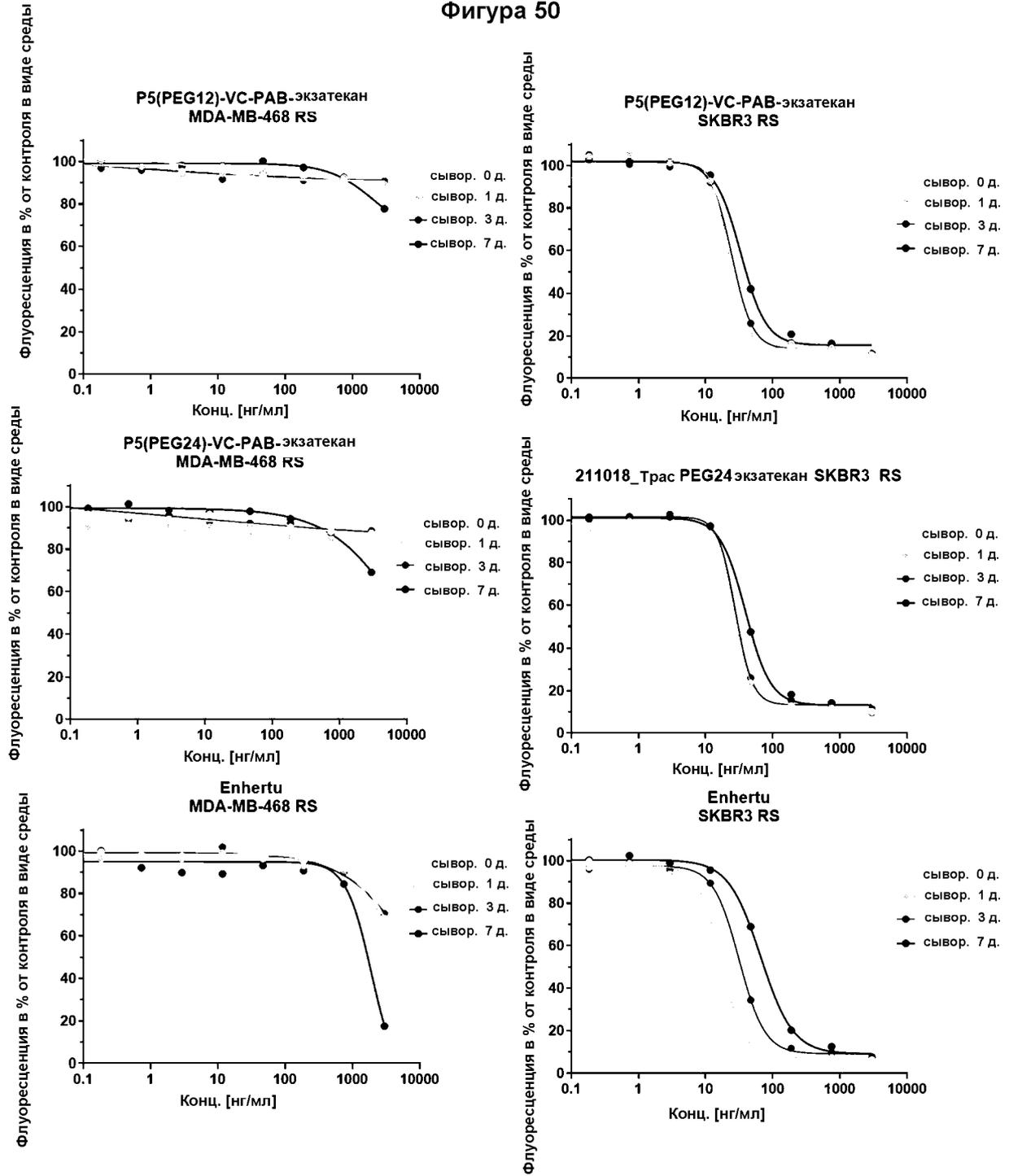
Фигура 48



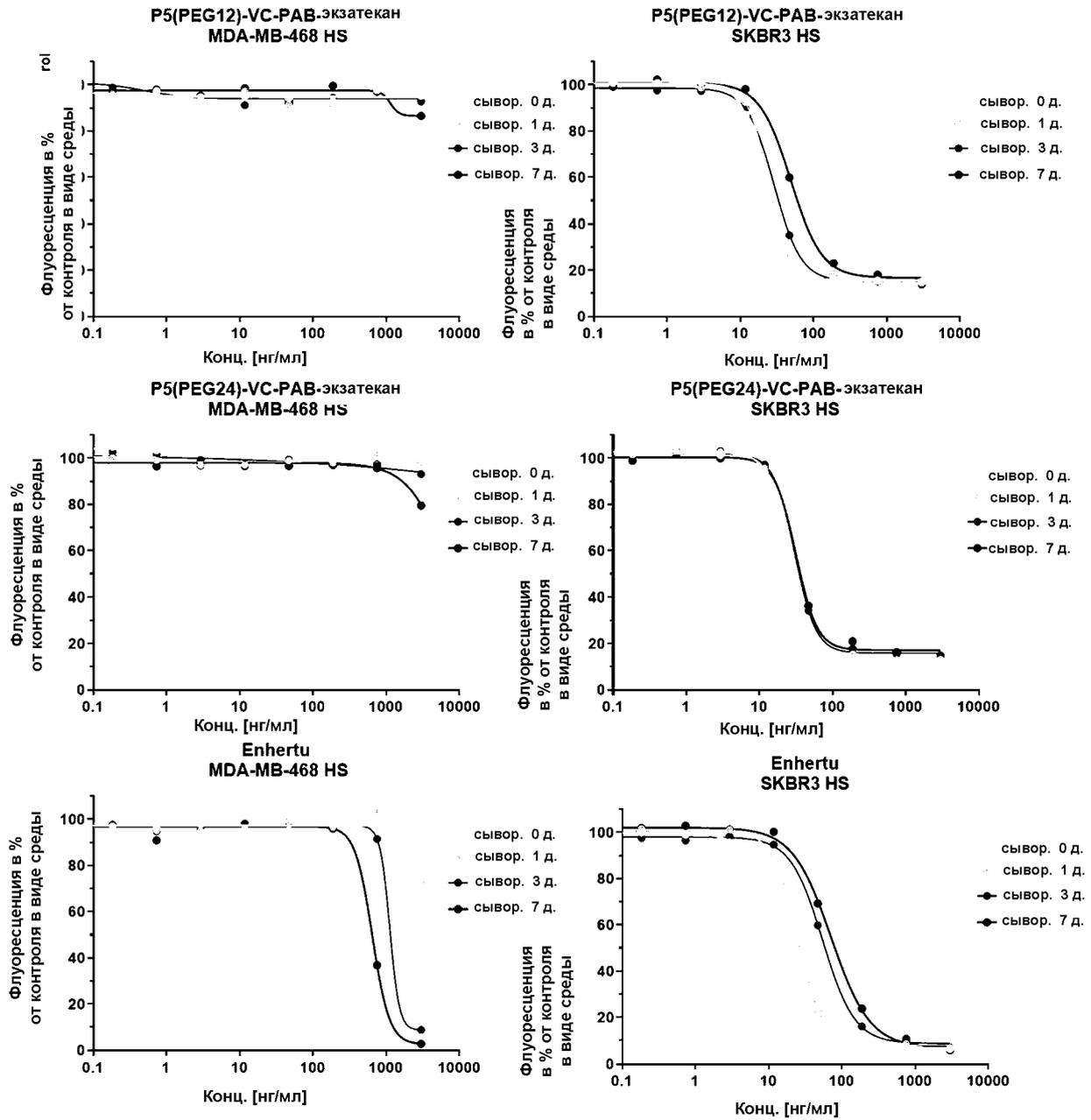
Фигура 49



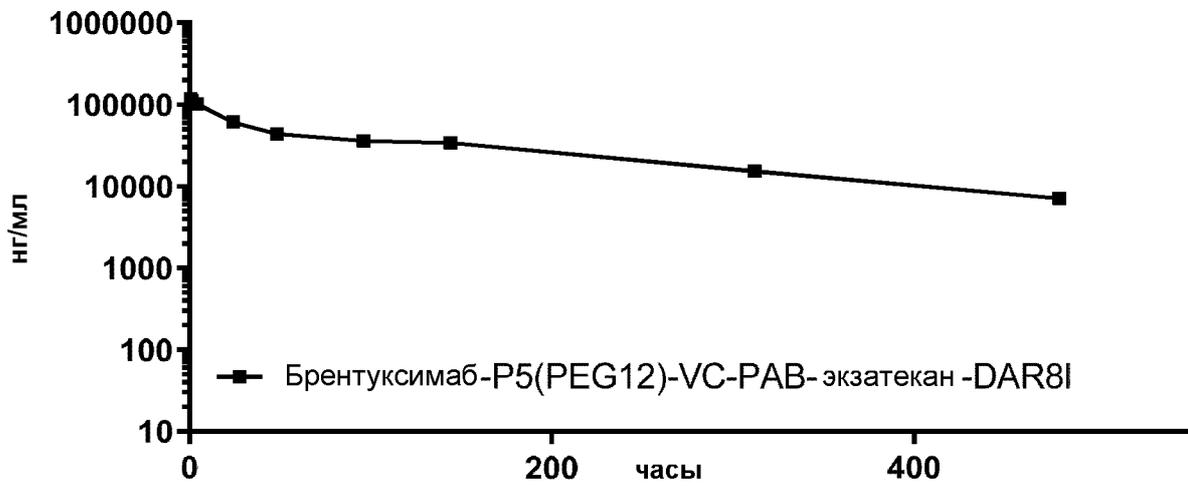
Фигура 50



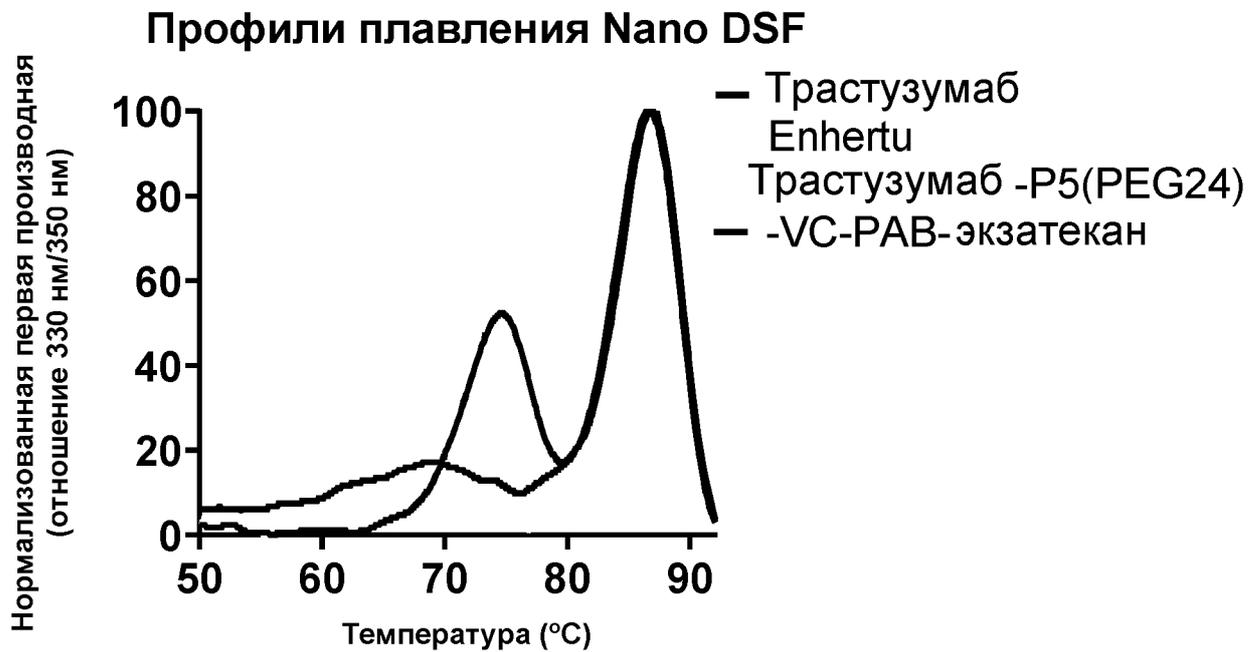
Фигура 51



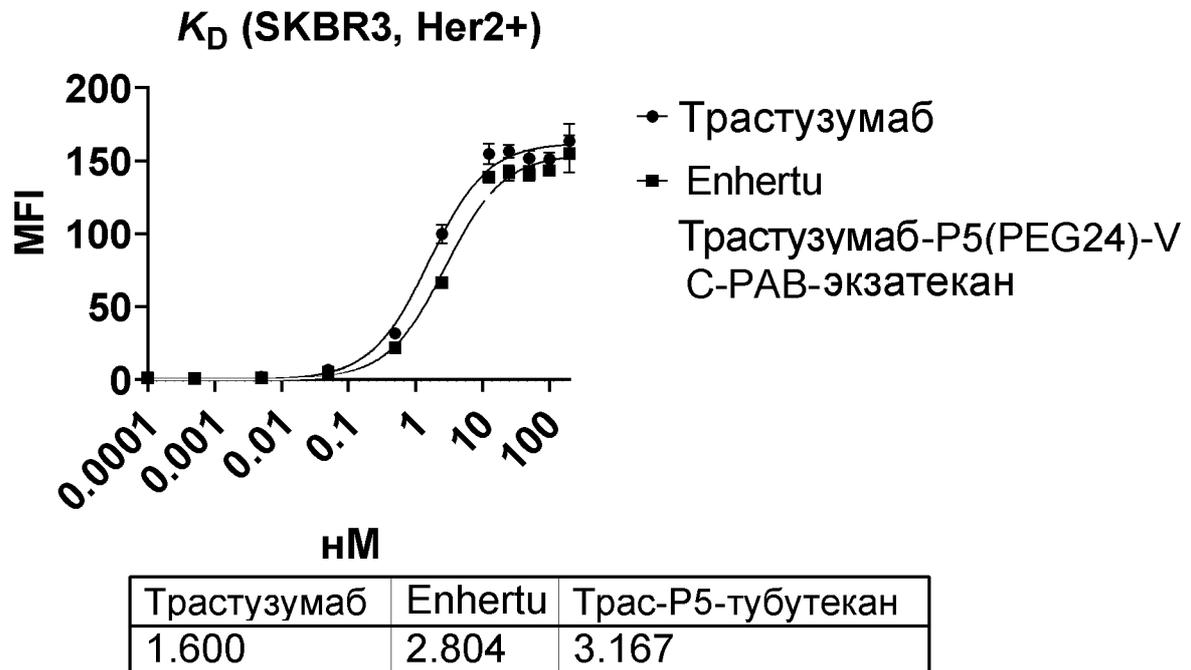
Фигура 52



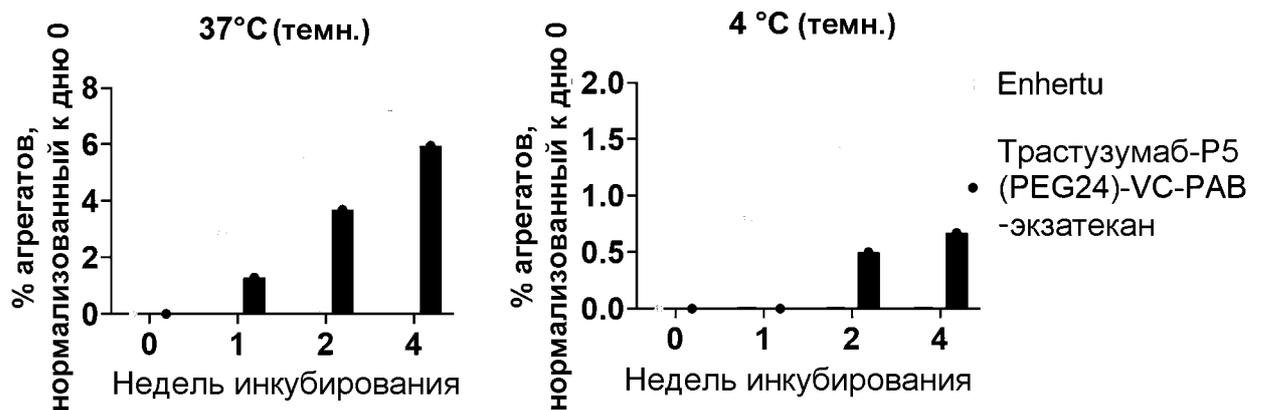
Фигура 53



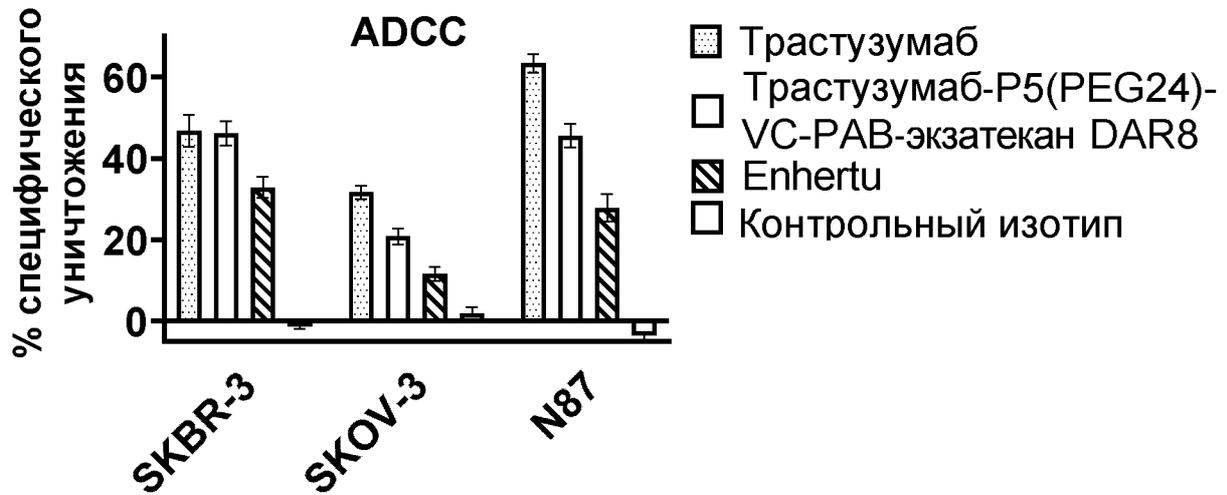
Фигура 54



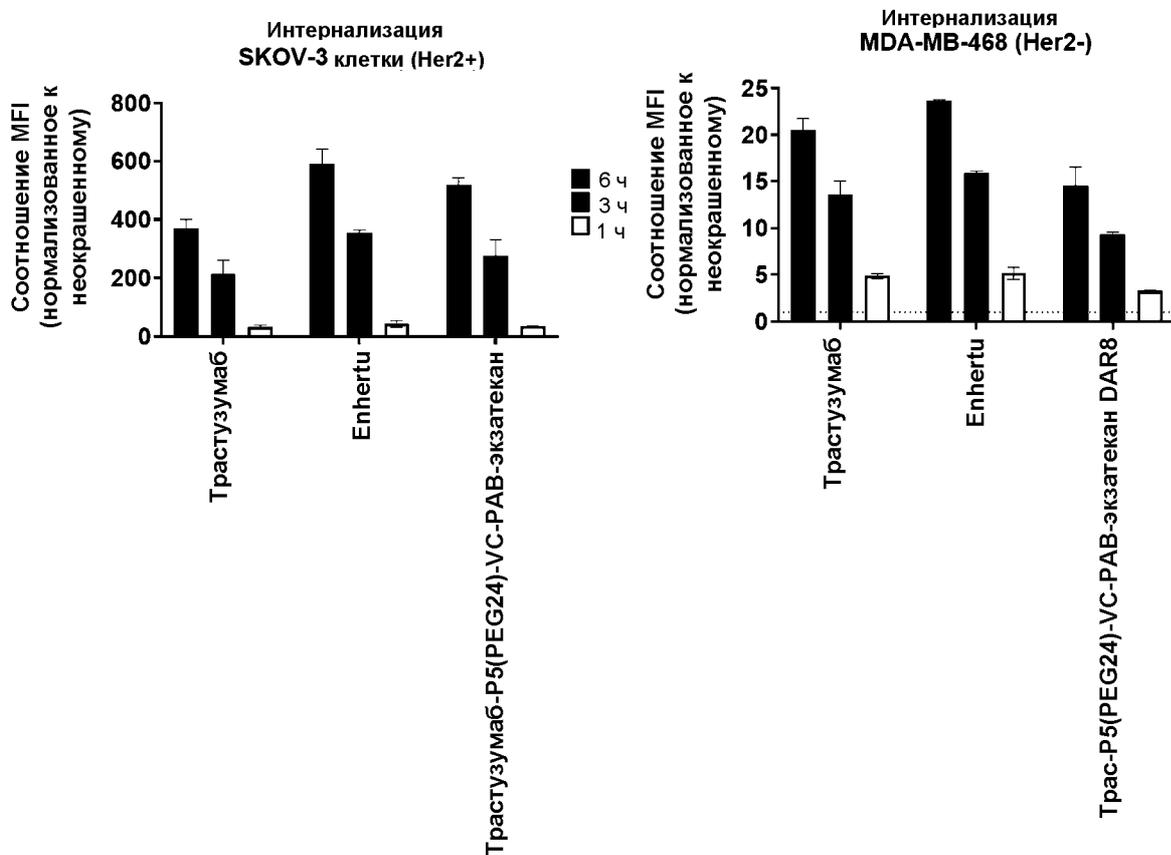
Фигура 55



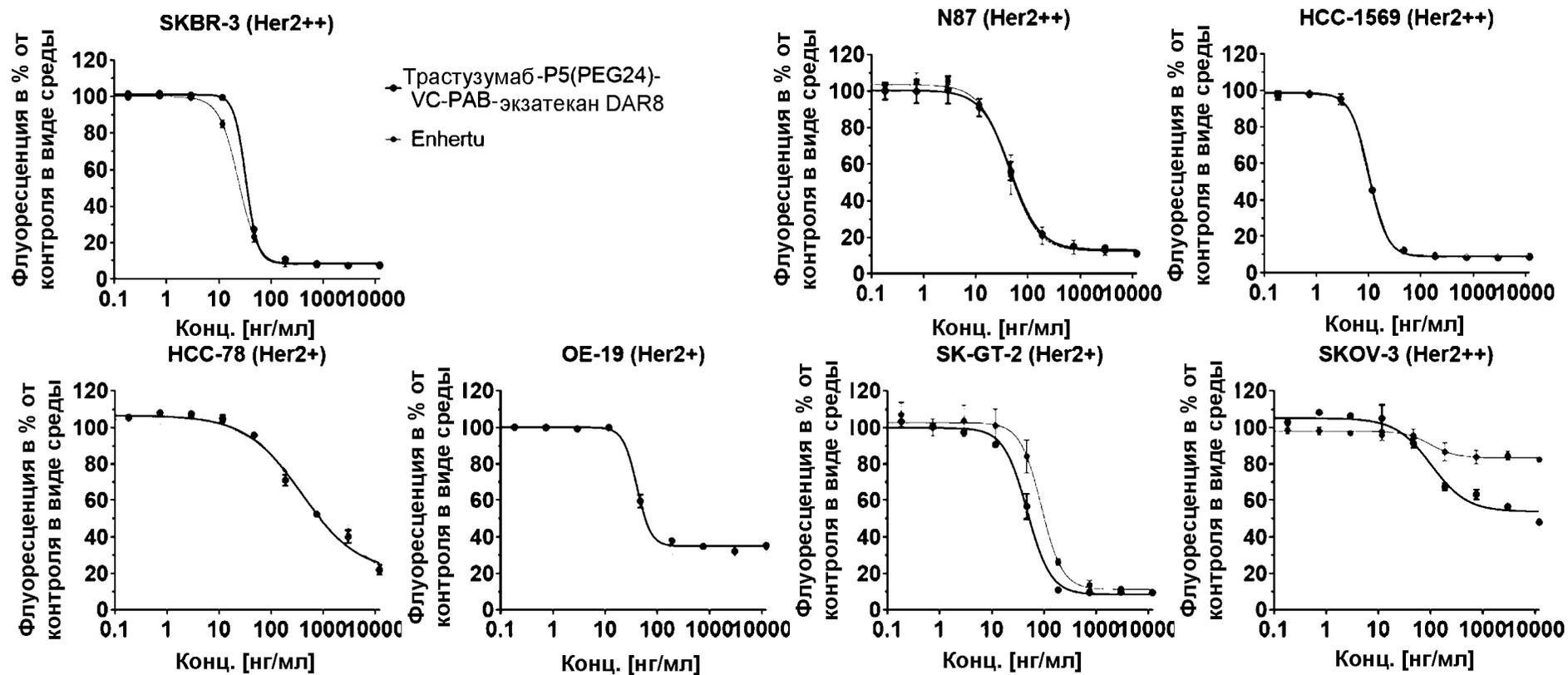
Фигура 56



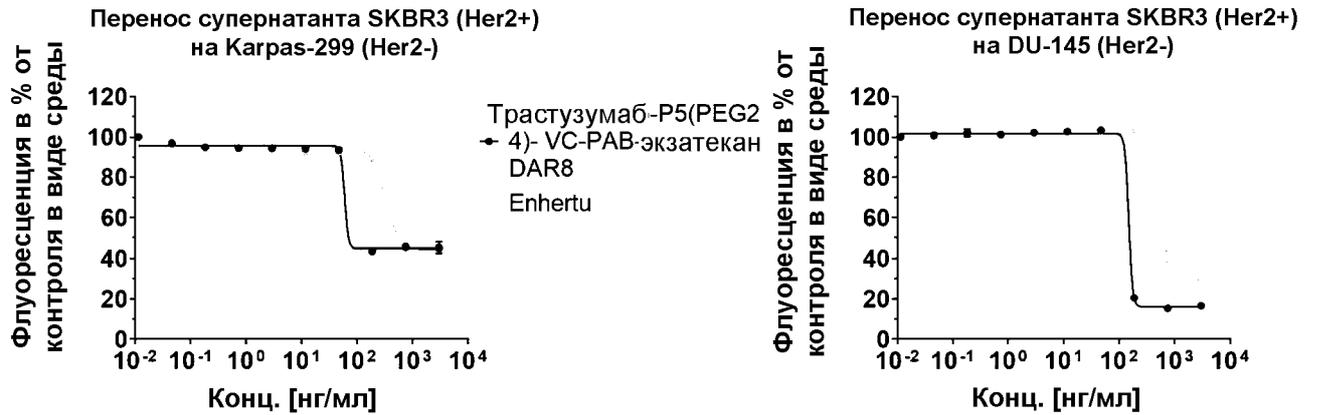
Фигура 57



Фигура 58

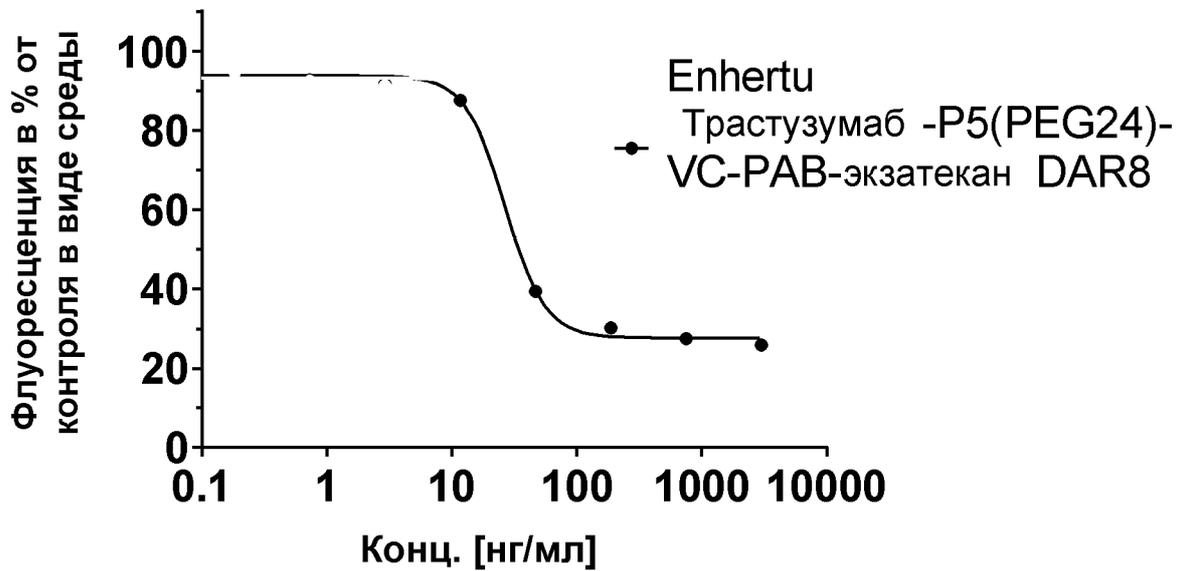


Фигура 59

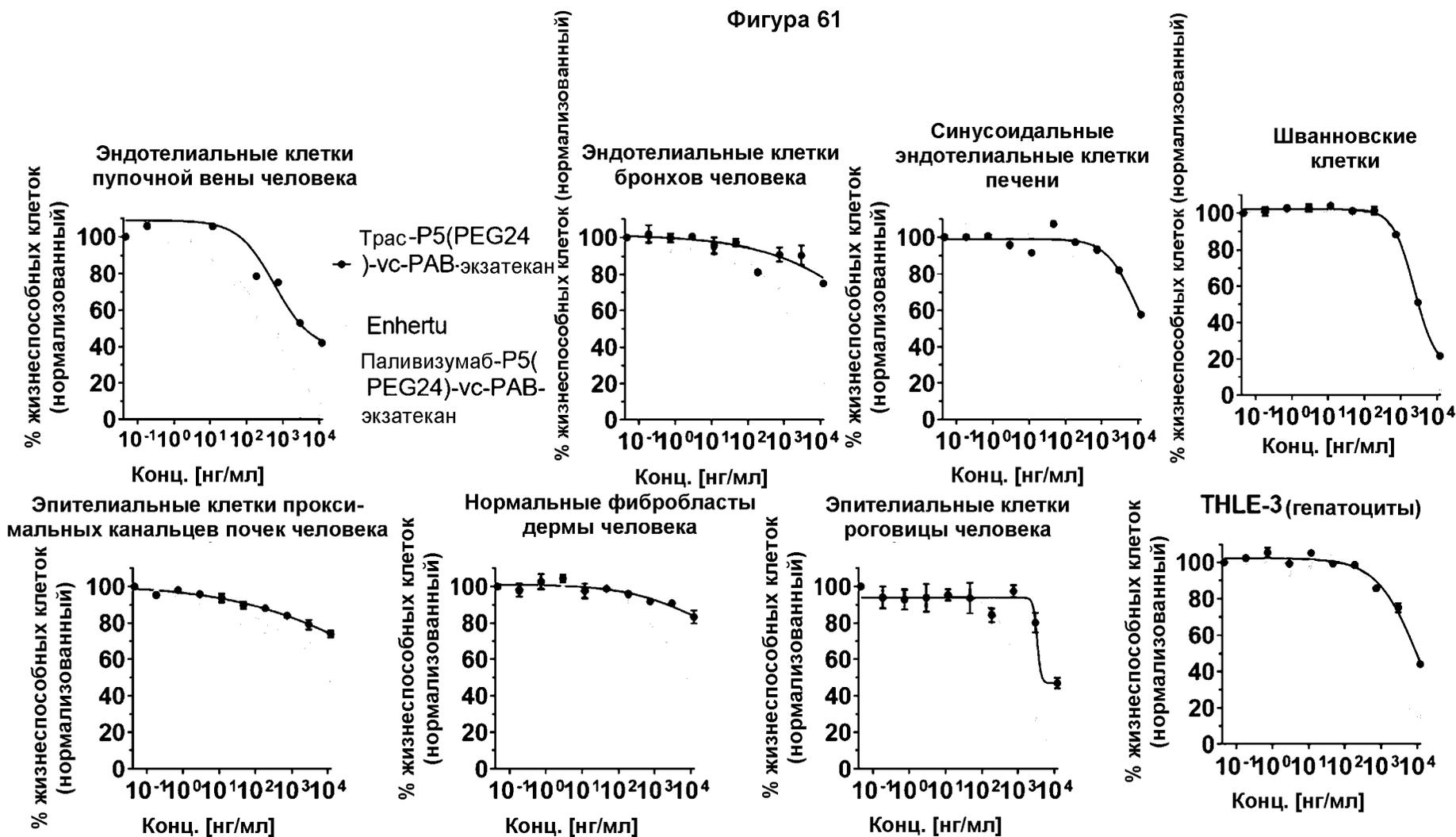


Фигура 60

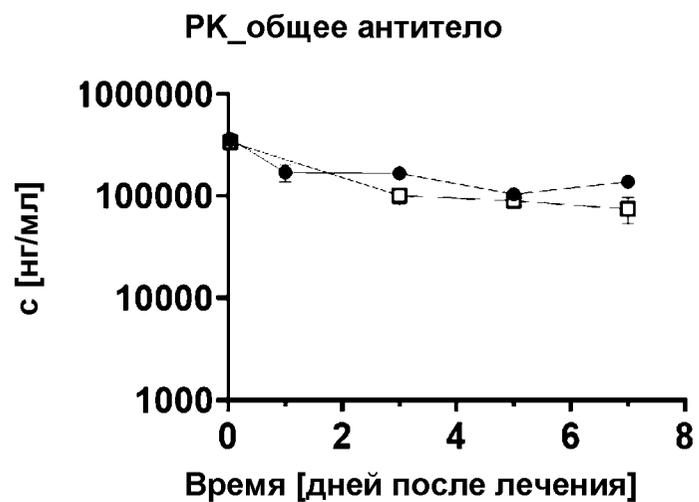
Уничтожение MDA-MB-468 (Her2-) в объединенной культуре с SKBR-3 (Her2+) и MDA-MB-468 (Her2-)



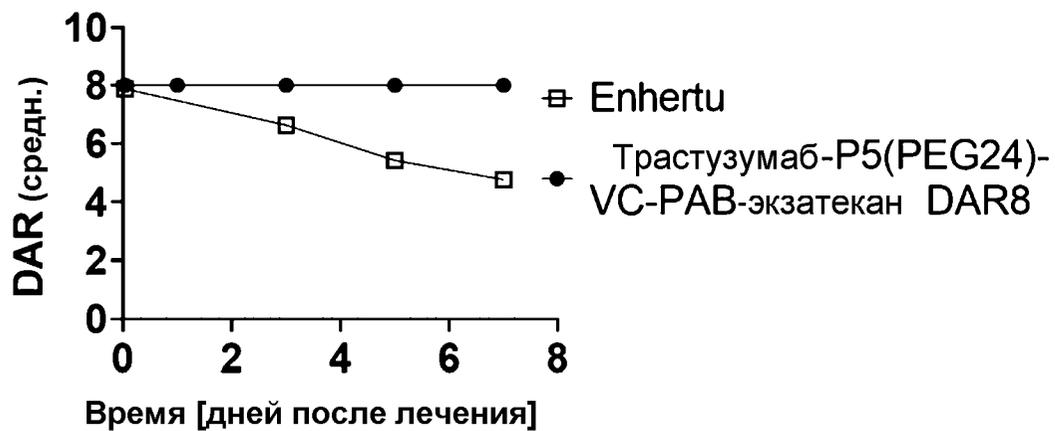
Фигура 61



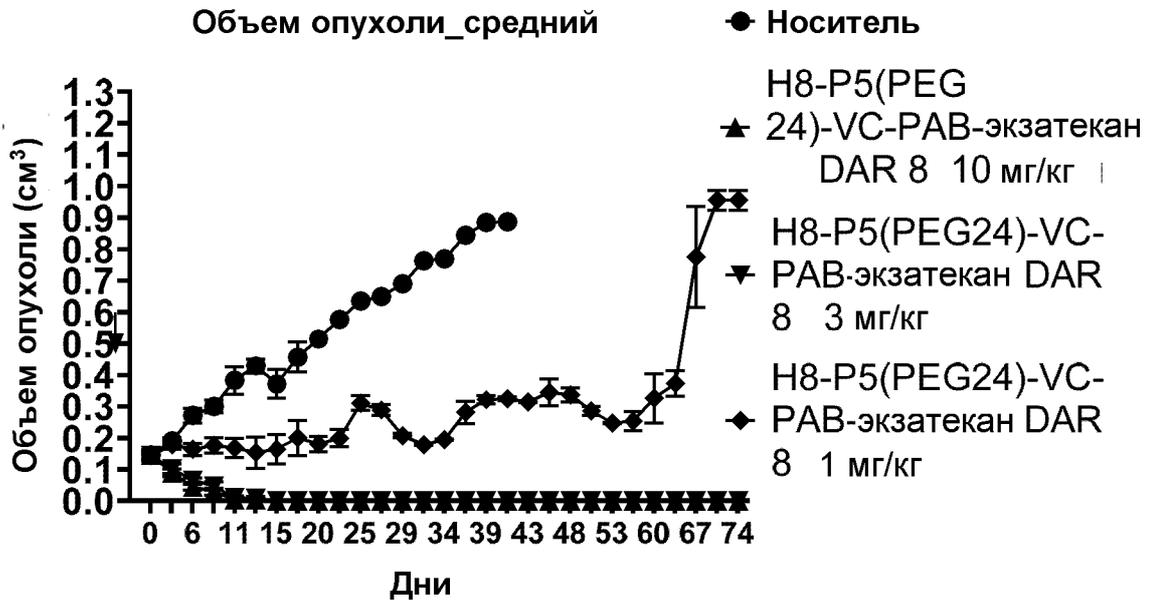
Фигура 62



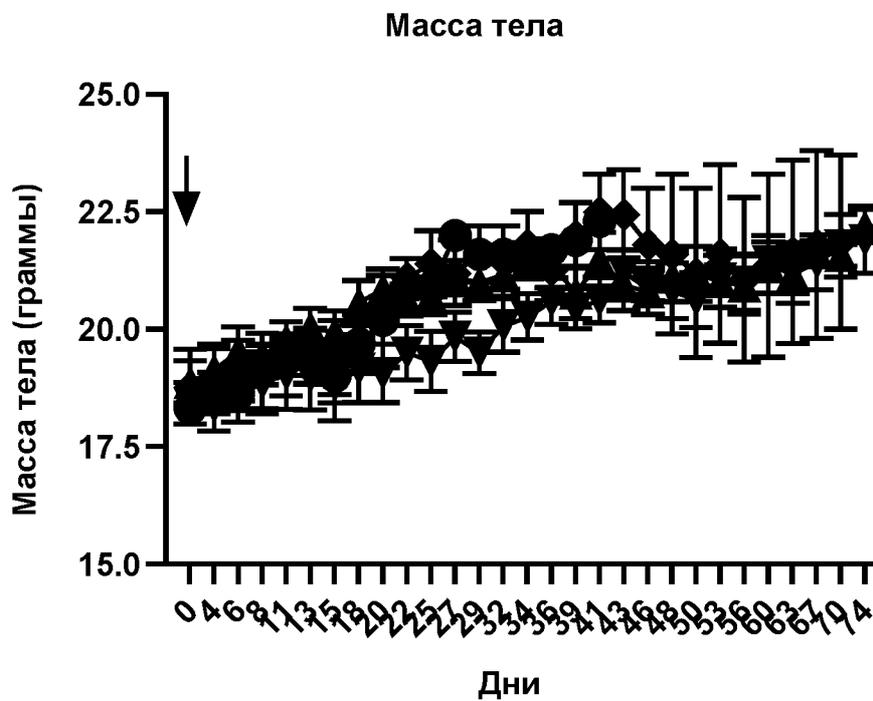
Отношение лекарственное средство:антитело  
в зависимости от времени циркуляции



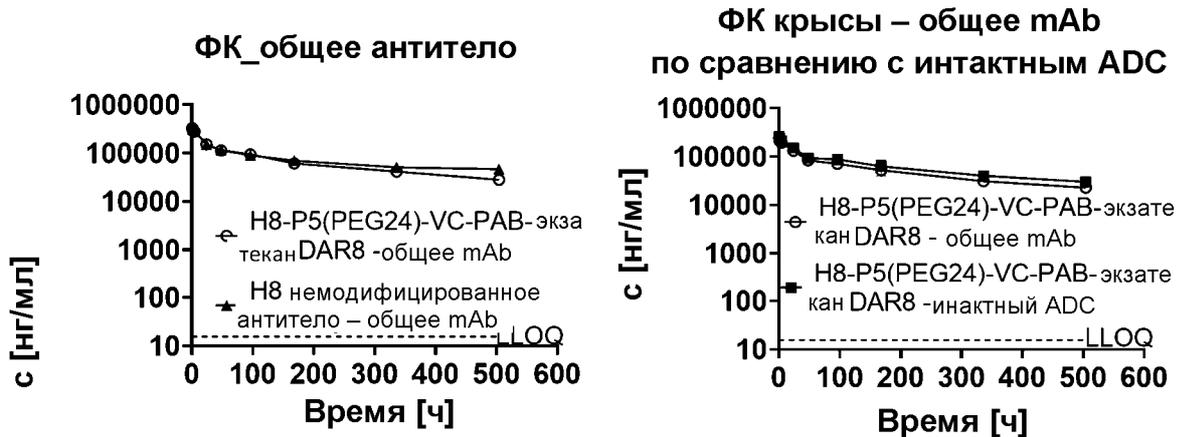
Фигура 63



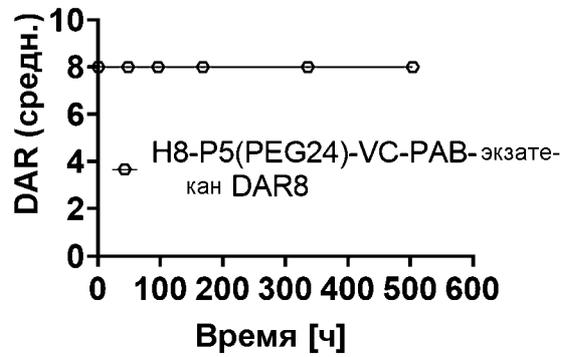
Фигура 64



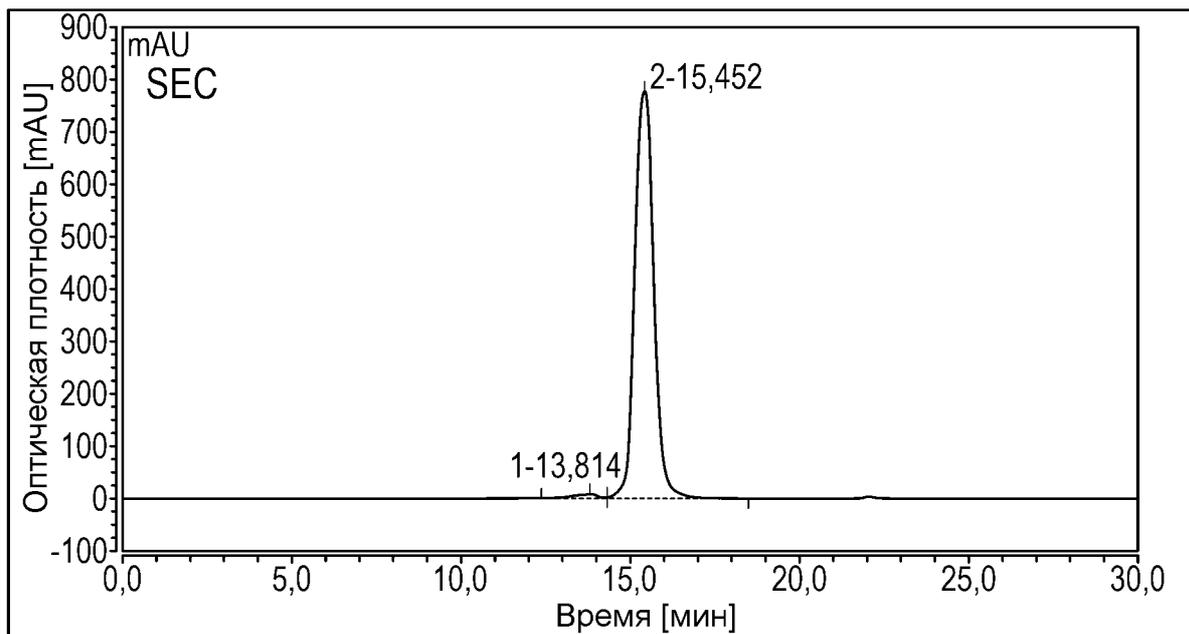
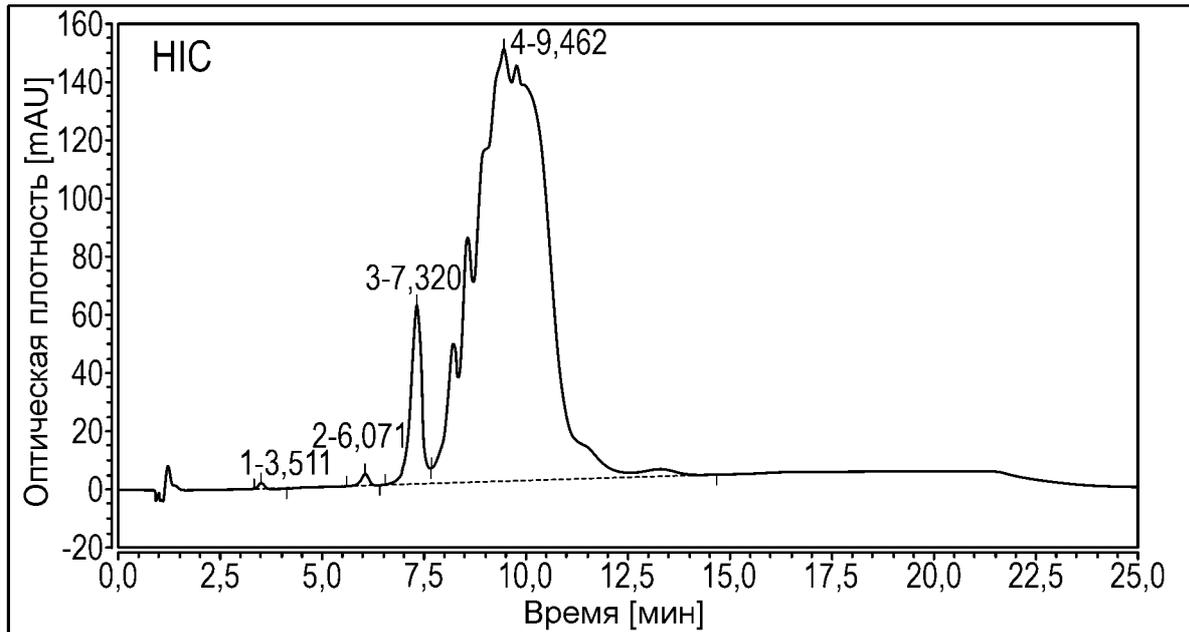
Фигура 65



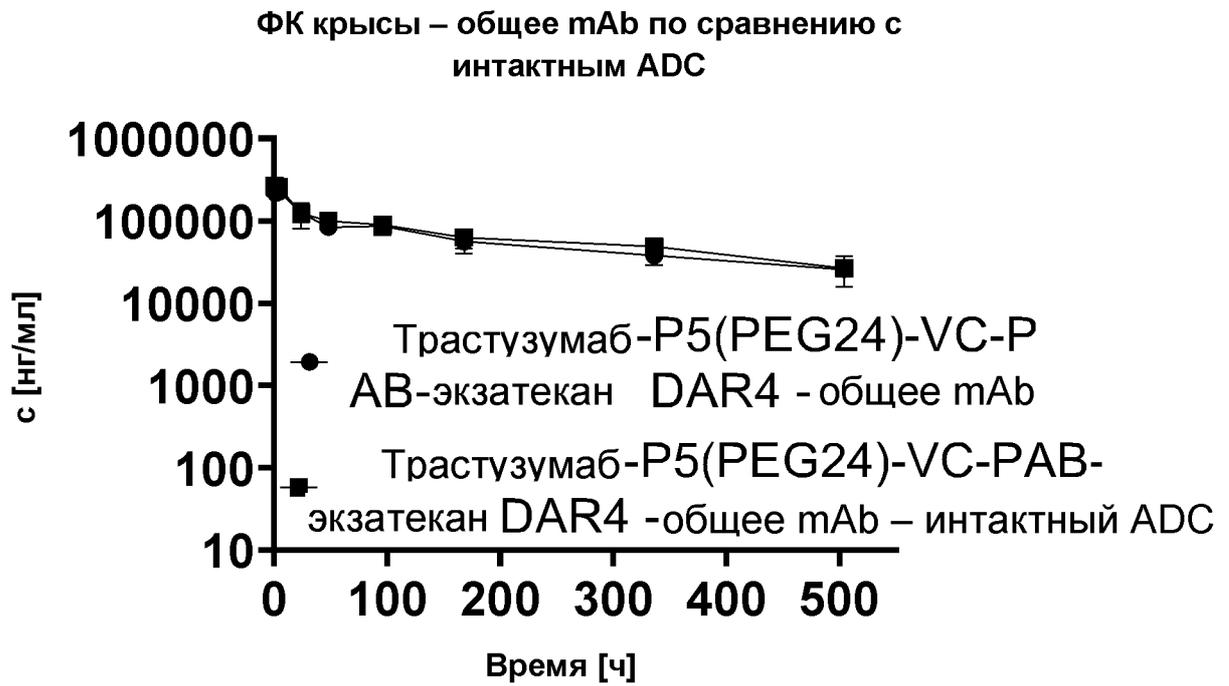
Отношение лекарственное средство:антитело в зависимости от времени циркуляции



Фигура 66



Фигура 67



Фигура 68

