

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490977 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.09.11(22) Дата подачи заявки  
2022.11.15(51) Int. Cl. *A61K 47/65* (2017.01)  
*A61K 47/68* (2017.01)  
*A61K 31/4745* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

## (54) КОНЬЮГАТ БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЕ СОБОЙ КАМПТОТЕЦИН, И ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202111351599.X

(32) 2021.11.15

(33) CN

(86) PCT/CN2022/132027

(87) WO 2023/083381 2023.05.19

(71) Заявитель:  
СИСТИМЬОН, ИНК. (US)

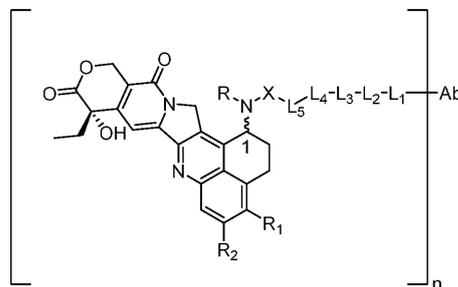
(72) Изобретатель:

Чжу И, Вань Вэйли, Юй Тяньцзы,  
Чжу Гуйли, Чжан Ийин, Чжо Ши,  
Чжан Юн, Ли Ганжуй (CN)

(74) Представитель:

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

(57) Биспецифическое антитело, одновременно нацеливающееся на два разных эпитопа или две разных мишени, сочетается с лекарственным средством, представляющим собой камптотецин, с образованием конъюгата биспецифическое антитело-токсин, который является стабильным при лечении и превосходным по однородности, и при этом отношение лекарственного средства к антителу (DAR) составляет 6,0-8,0. Конъюгат антитело-токсин имеет структуру, представленную общей формулой (I), где Ab представляет собой биспецифическое антитело, одновременно нацеливающееся на два разных эпитопа или две разных мишени, которое сочетается с линкером-лекарственным средством, представляющим собой камптотецин. Кроме того, настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения и очистки конъюгата антитело-токсин и его применению в лечении опухоли. Кроме того, настоящее изобретение дополнительно относится к соединению линкер-лекарственное средство, способному к сочетанию с Ab с образованием конъюгата антитело-токсин.



202490977 A1

202490977

A1

**КОНЬЮГАТ БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ  
СРЕДСТВО, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЕ СОБОЙ КАМПТОТЕЦИН, И ЕГО  
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Настоящее изобретение относится к области биофармацевтических препаратов и, конкретно, к конъюгату антитело-лекарственное средство, образованному биспецифическим антителом и лекарственным средством, представляющим собой камптотецин, и к способу получения и применения конъюгата антитело-лекарственное средство. Настоящее изобретение также относится к соединениям линкер-лекарственное средство, которые можно сочетать с Ab с образованием конъюгата антитело-токсин.

**УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и рецептор-3 эпидермального фактора роста человека (также известный как HER3 и ErbB3) представляют собой рецепторные протеинтирозинкиназы и принадлежат к подсемейству рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), рецепторных протеинтирозинкиназ, которое включает EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) и HER4 (ErbB-4).

Рецептор эпидермального фактора роста представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 170 кДа, который пронизывает клеточные мембраны и активируется при связывании с лигандами. После активации EGFR превращается из мономера в аутодимер или образует гетеродимер с другими представителями семейства HER. Образование димера активирует внутриклеточные киназные пути, которые управляют фосфорилированием нижележащих путей, включая пути MAPK, Akt и JNK, с индуцированием пролиферации клетки. Исследования продемонстрировали, что высокая экспрессия EGFR ассоциирована с пролиферацией опухолевых клеток, ангиогенезом, инвазией опухоли и т. п. Связанные с EGFR пути передачи сигнала играют очень важную роль в поддержании и росте эпидермальных тканей. В частности, EGFR может способствовать онкогенезу при раке молочной железы, злокачественной глиоме и раке легкого. В тканях рака легкого путь передачи сигнала EGFR демонстрирует стимулированное состояние, и имеется положительная корреляция между уровнем экспрессии EGFR и стадий развития рака. В то же время во все большем числе исследований EGFR применяется в качестве биомаркера

резистентности опухоли к лекарственным средствам, вследствие обнаружения вторичных мутаций EGFR при воздействии лекарственных средств.

Рецептор-3 эпидермального фактора роста (HER3 или ErbB3) также имеет структуру типичного рецептора эпидермального фактора роста, но у HER3 отсутствует структурный домен внутриклеточной протеинтирозинкиназы и, таким образом, он не способен к аутофосфорилированию. HER3 способен связываться с белками-лигандами и способствует их гетеродимеризации с другими представителями семейства рецепторов эпидермального фактора роста человека с активацией рецептор-опосредованных путей передачи сигнала, что не только выполняет функцию средства диверсификации сигналов, но также играет роль в амплификации сигнала и ускоряет прогрессирование опухоли. Херегулины (фактор роста глиальных клеток, фактор дифференцировки пч) способны активировать внутриклеточные киназа-зависимые многостадийные ответы с использованием путей передачи сигнала после связывания с трансмембранными рецепторами HER3 и HER4. Подавление данного пути передачи сигнала часто приводит к болезни Альцгеймера, сердечной недостаточности, атеросклерозу и раку и т.п. Повышение уровня экспрессии HER3 может способствовать онкогенезу и росту за счет взаимодействия с рецепторными тирозинкиназами (RTK). Также, поскольку HER3 является гетеродимерным молекулярным шапероном для других представителей семейства EGFR, он обладает потенциалом модулировать резистентность к лекарственным средствам, опосредованную путем передачи сигнала EGFR/HER2, в раковых клетках. Исследования также продемонстрировали, что HER3 препятствует терапии рака за счет активации путей передачи сигнала PI3K/AKT, MAPK/ERK и JAK/STAT.

Сверхэкспрессия/дисрегуляция EGFR и HER3 были тесно ассоциированы с развитием различных опухолей. Было показано, что EGFR и HER3 управляют прогрессированием опухоли у солидных опухолей, таких виды рака молочной железы, легкого, желудка и поджелудочной железы. В нескольких исследованиях было показано, что высокая экспрессия HER3 ассоциирована с клинической неудачей антител к EGFR и ингибиторов его. Несколько средств терапии с комбинацией лекарственных средств, нацеливающих на EGFR и HER3, уже находятся в разработке в клинических условиях.

В последние годы моноклональные антитела широко применялись в противоопухолевой терапии, но уровни их эффективности оставляют желать лучшего. У множества пациентов с опухолями наблюдаются недостаточные клинические

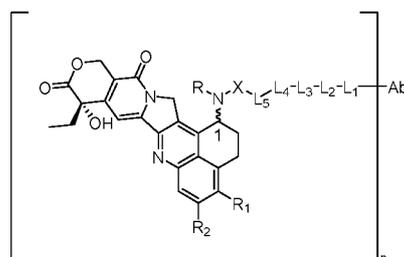
ответы, а у некоторых пациентов с клиническими ответами развивается резистентность к лекарственным средствам после длительного периода терапии моноклональными антителами, что приводит к рецидиву опухоли. Биспецифическое моноклональное антитело представляет собой молекулу моноклонального антитела с двумя разными антигенраспознающими последовательностями, которая способна связывать белковые молекулы двух антигенных эпитопов, и таким образом могут достигаться, например, множество новых и уникальных противоопухолевых механизмов, таких как опосредование уничтожения опухолевых клеток иммунными клетками, опосредование уничтожения опухолевых клеток токсичными малыми молекулами или блокирование путей передачи сигнала, которые способствуют росту опухолей. Разработка биспецифических моноклональных антител главным образом учитывает тот факт, что несколько медиаторов принимают участие в патогенезе опухолей посредством специфических или перекрывающихся механизмов, и если в одно и то же время блокируются несколько мишеней, это будет производить лучшие терапевтические эффекты, чем ингибирование одной мишени, и в то же время действие нескольких мишеней значительно снижает вероятность развития резистентности к лекарственным средствам. В настоящее время два биспецифических антитела, катумаксомаб и блинатумомаб, были одобрены для выпуска на рынок в США, и более пятидесяти молекул биспецифических антител проходят клинические испытания.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) представляют собой молекулы со специфически нацеливающимися эффектами уничтожения, полученными за счет присоединения низкомолекулярных токсинов с эффектами уничтожения клеток к антителам, и их применяют главным образом в лечении опухолей и других заболеваний. В лекарственных средствах, в которых связаны антитело и лекарственное средство, применяются антитела, которые способны специфически связываться с белками на поверхности опухолевых клеток, и следовательно характеризуются опухолевой специфичностью и потенциалом, недостижимым для традиционных лекарственных средств. В настоящее время 12 лекарственных средств, представляющих собой ADC, получили разрешение для выхода на рынок по всему миру, и сотни программ находятся на стадии клинических испытаний. Однако большинство программ с использованием ADC, находящихся на рынке или в клинических условиях, направлены на одну мишень и не могут достигать синергетических преимуществ терапии, направленной на две мишени.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения на основе всестороннего понимания класса лекарственных средств, представляющих собой ADC, раскрывают конъюгат биспецифическое антитело-лекарственное средство и способ его получения, фармацевтическую композицию, содержащую указанный конъюгат, и применение указанного конъюгата или фармацевтической композиции. Настоящее изобретение также относится к соединениям линкер-лекарственное средство, которые можно сочетать с биспецифическим антителом с образованием конъюгата антитело-токсин.

В первом аспекте настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват;

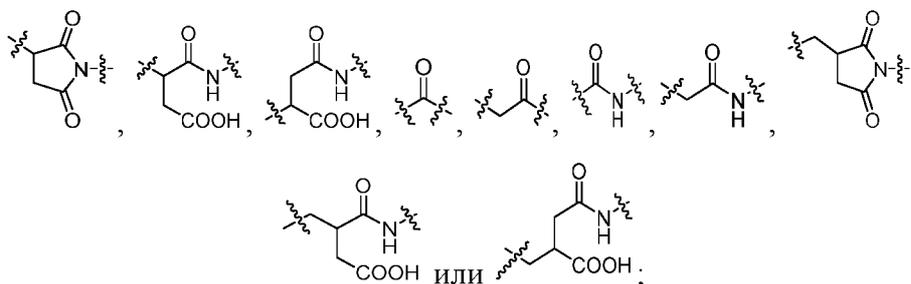


I,

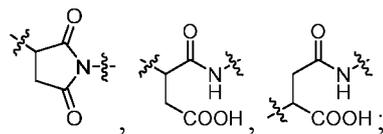
где

Ab представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые одновременно нацеливаются на два разных эпитопа или две разных мишени;

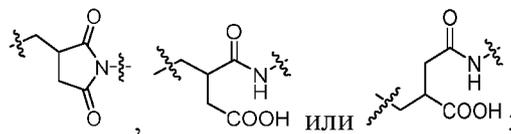
L<sub>1</sub> выбран без ограничения из группы:



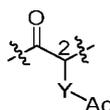
предпочтительно L<sub>1</sub> представляет собой



предпочтительно L<sub>1</sub> представляет собой



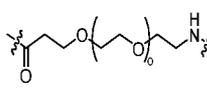
L<sub>2</sub> имеет структуру, представленную формулой A ниже:



формула A,

где Y представляет собой остов, выбранный из C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила или C3-С8циклоалкила; предпочтительно Y представляет собой C1-Сбалкил; Ac представляет собой гидрофильное структурное звено; и атом углерода № 2, присоединенный к Y, характеризуется абсолютной хиральностью в R-конфигурации или S-конфигурации;

L<sub>3</sub> присутствует или отсутствует, и, если присутствует, L<sub>3</sub> выбран из

гидрофильных звеньев на основе PEG: , o выбран из целого числа в диапазоне 1-10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10), предпочтительно целого числа в диапазоне 2-8;

L<sub>4</sub> представляет собой звено для ферментативного расщепления;

L<sub>5</sub> представляет собой связывающее звено;

в формуле I хиральный атом углерода № 1, присоединенный к N, характеризуется абсолютной хиральностью в R-конфигурации или S-конфигурации;

R выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила, замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно R выбран из атома водорода или C1-Сбалкильной группы;

R<sub>1</sub> выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, карбоксила, 3-7-членного гетероциклила, замещенного 3-7-членного гетероциклила, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила или замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно R<sub>1</sub> выбран из атома водорода или C1-Сбалкильной группы;

более предпочтительно R<sub>1</sub> выбран из C1-Сбалкила;

R<sub>2</sub> выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, карбоксила, 3-7-членного гетероциклила,

замещенного 3-7-членного гетероцикла, С6-С10арила, замещенного С6-С10арила, 5-10-членного гетероарила, замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно  $R_2$  выбран из атома водорода, галогена или С1-Сбалкильной группы;

более предпочтительно  $R_2$  выбран из галогена;

$X$  выбран из  $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-O-$ ,  $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-NH-$  или  $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-S-$ ;

предпочтительно  $X$  выбран из  $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-O-$ ;

каждый из  $R_a$  и  $R_b$  независимо выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, С1-Сбалкила, дейтерированного С1-Сбалкила, галогенированного С1-Сбалкила, С3-С8циклоалкила, С3-С8циклоалкил-С1-Сбалкила, С6-С10арил-С1-Сбалкила, С1-Сбалкокси-С1-Сбалкила, 3-7-членной гетероциклической группы, замещенной 3-7-членной гетероциклической группы, С6-С10арила, замещенного С6-С10арила, 5-10-членного гетероарила, замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно каждый из  $R_a$  и  $R_b$  независимо выбран из атома водорода, С1-Сбалкила, галоген-С1-Сбалкила, С3-С8циклоалкил-С1-Сбалкила или С6-С10арил-С1-Сбалкила;

в качестве альтернативы  $R_a$ ,  $R_b$  и атомы углерода, к которым они присоединены, составляют С3-С8циклоалкильную группу, С3-С8циклоалкил-С1-С6 алкильную группу, 3-7-членную гетероциклильную группу, замещенную 3-7-членную гетероциклильную группу; предпочтительно  $R_a$ ,  $R_b$  и атомы углерода, к которым они присоединены, составляют С3-С8циклоалкильную группу;

$R_3$ ,  $R_4$  являются идентичными или разными, и каждый из них независимо представляет собой атом водорода, атом дейтерия, галоген, С1-Сбалкил, галогенированный С1-Сбалкил, дейтерированный С1-Сбалкил, С1-Сбалкокси, гидроксил, амино, циано, нитро, гидрокси-С1-Сбалкил, С3-С8циклоалкил, 3-7-членный гетероцикл или замещенный 3-7-членный гетероцикл;

предпочтительно каждый из  $R_3$ ,  $R_4$  независимо представляет собой атом водорода или С1-Сбалкильную группу;

в качестве альтернативы  $R_3$ ,  $R_4$  и атомы углерода, к которым они присоединены, составляют С3-С8циклоалкильную группу, С3-С8циклоалкил-С1-Сбалкильную группу, 3-7-членную гетероциклическую группу или замещенную 3-7-членную гетероциклическую группу;

$m$  выбран из целых чисел 0-4 (например, 0, 1, 2, 3 или 4), предпочтительно 0, 1;  $n$

выбран из целых чисел 1-10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10).

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгаты лиганд-производное камптотецина, представленные общей формулой I, или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, где Ab представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые одновременно нацеливаются на два разных эпитопа или две разных мишени, предпочтительно биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые одновременно нацеливаются на EGFR и HER3.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где антитело Ab содержит тяжелую цепь IgG1, легкую к-цепь и структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv); где указанный структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv) образует конструкцию с тяжелой цепью IgG1 или легкой к-цепью; где указанная тяжелая цепь IgG1 и легкая к-цепь образуют часть IgG со специфичностью связывания в отношении EGFR; при этом указанный структурный домен на основе scFv характеризуется специфичностью связывания в отношении HER3, и структурный домен на основе соединен посредством линкера (например, имеющего аминокислотную последовательность (gly-gly-gly-gly-ser)<sub>n</sub>, где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, предпочтительно n представляет собой целое число, составляющее от 1 до 10) с С-концом или N-концом указанной тяжелой цепи IgG1 или С-концом или N-концом указанной легкой к-цепи; и где структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv) имеет следующий структурный порядок: N-конец-вариабельная область тяжелой цепи-спейсер-вариабельная область легкой цепи-С-конец или N-конец-вариабельная область легкой цепи-спейсер-вариабельная область тяжелой цепи-С-конец (например, указанный спейсер состоит из аминокислотной последовательности (gly-gly-gly-gly-ser)<sub>m</sub>, где m представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 3, предпочтительно m составляет 3, 4, 5 или 6).

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где легкая к-цепь антитела Ab содержит CDR, представленные под SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, и тяжелая цепь IgG1 содержит CDR, представленные под SEQ ID NO:

29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31, и структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv) содержит CDR варибельной области тяжелой цепи, представленные под SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, и CDR варибельной области легкой цепи, представленные под SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где легкая цепь антитела Ab содержит варибельную область, представленную под SEQ ID NO: 28, тяжелая цепь IgG1 содержит варибельную область, представленную под SEQ ID NO: 38, и структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv) содержит варибельную область тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 39, и варибельную область легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где аминокислотная последовательность легкой цепи антитела Ab представляет собой SEQ ID NO: 2, и аминокислотная последовательность конструкции из тяжелой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь антитела Ab, представляет собой SEQ ID NO: 1, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию из тяжелой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv), представляет собой SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где легкая к-цепь антитела Ab содержит CDR, представленные под SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43, тяжелая цепь IgG1 содержит CDR, представленные под SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47, и структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv) содержит CDR варибельной области тяжелой цепи, представленные под SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, и CDR варибельной области легкой

цепи, представленные под SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где легкая цепь антитела Ab содержит переменную область, представленную под SEQ ID NO: 44, тяжелая цепь IgG1 содержит переменную область, представленную под SEQ ID NO: 48, и структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv) содержит переменную область тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 39, и переменную область легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 40.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где аминокислотная последовательность легкой цепи антитела Ab представляет собой SEQ ID NO: 6, и аминокислотная последовательность конструкции из тяжелой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь антитела Ab, представляет собой SEQ ID NO: 5, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию из тяжелой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv), представляет собой SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где легкая цепь антитела Ab содержит переменную область, представленную под SEQ ID NO: 49, тяжелая цепь IgG1 содержит переменную область, представленную под SEQ ID NO: 52, и структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv) содержит переменную область тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 50, и переменную область легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 51.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где антитело Ab

имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 12, и конструкция из легкой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv) имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где антитело Ab имеет последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, под SEQ ID NO: 11, и конструкция из легкой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv) имеет кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где антитело Ab имеет аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 14, и конструкция из тяжелой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv) имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где антитело Ab имеет последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь, под SEQ ID NO: 13, и конструкция из тяжелой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv) имеет кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где антитело Ab имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 20, и конструкция из легкой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv) имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей

формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где антитело Ab имеет последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, под SEQ ID NO: 19, и конструкция из легкой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv) имеет кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где легкая цепь антитела Ab содержит переменную область, представленную под SEQ ID NO: 53, тяжелая цепь IgG1 содержит переменную область, представленную под SEQ ID NO: 54, и структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv) содержит переменную область тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 50, и переменную область легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 51.

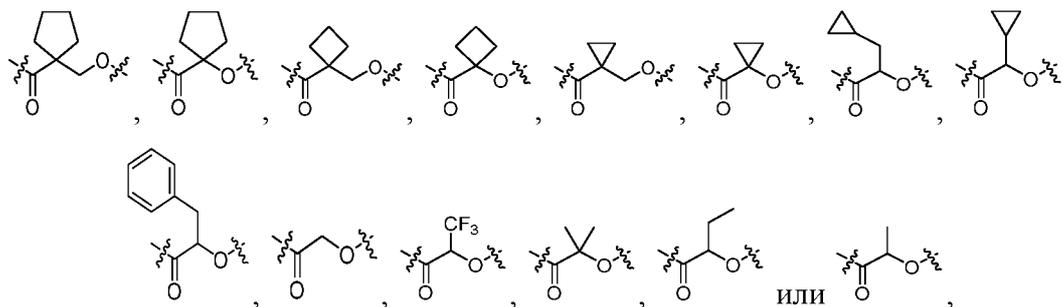
В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где антитело Ab имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 24, и аминокислотная последовательность конструкции из легкой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где антитело Ab имеет последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, под SEQ ID NO: 23, и конструкция из легкой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv) имеет кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где антитело Ab содержит две тяжелые цепи IgG1; две легкие к-цепи и два структурных домена на основе одноцепочечного Fv (scFv).

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгаты лиганд-производное камптотецина, представленные общей

формулой I, или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, где указанный X выбран без ограничения из следующих структур или их изомеров:



где левая волнистая линия связана с частью, представляющей собой производное камптотецина, а правая волнистая линия связана с L<sub>5</sub>.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгаты лиганд-производное камптотецина, представленные общей формулой I, или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, где L<sub>4</sub> выбран без ограничения из пептидных остатков, образованных из аминокислот;

где необязательно указанная аминокислота дополнительно замещена одним или несколькими заместителями, выбранными из атомов дейтерия, галогенов, гидроксила, циано, amino, нитро, карбоксила, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси и C3-С8циклоалкила или замещенного C3-С8циклоалкила;

предпочтительно указанный пептидный остаток представляет собой пептидный остаток, образованный из одной, двух или более аминокислот, выбранных из фенилаланина (F), глицина (G), валина (V), лизина (K), цитруллина (C), серина (S), глутаминовой кислоты (E) или аспарагиновой кислоты (D);

более предпочтительно указанный пептидный остаток представляет собой тетрапептидный остаток, состоящий из глицина (G)-глицина (G)-фенилаланина (F)-глицина (G).

Особенно предпочтительно указанный пептидный остаток представляет собой -GGFG-

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгаты лиганд-производное камптотецина, представленные общей формулой I, или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, характеризующиеся следующим образом:

L<sub>5</sub> без ограничения выбран из -NR<sub>5</sub>(CR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>)<sub>q</sub>- или химической связи, q выбран из целого числа в диапазоне 0-6 (например, 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6);

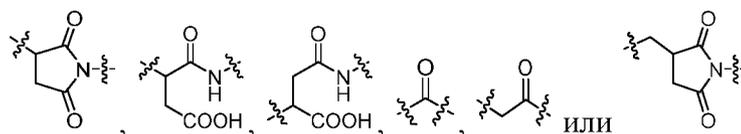
R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>7</sub> являются идентичными или разными, и каждый из них независимо

выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкильной группы, замещенной C1-Сбалкильной группы, дейтерированной C1-Сбалкильной группы, C3-С8циклоалкильной группы, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкильной группы, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкильной группы, 3-7-членной гетероциклической группы, замещенной 3-7-членной гетероциклической группы, C6-C10арильной группы, замещенного C6-C10арила, 5-10-членного гетероарила, замещенного 5-10-членного гетероарила;

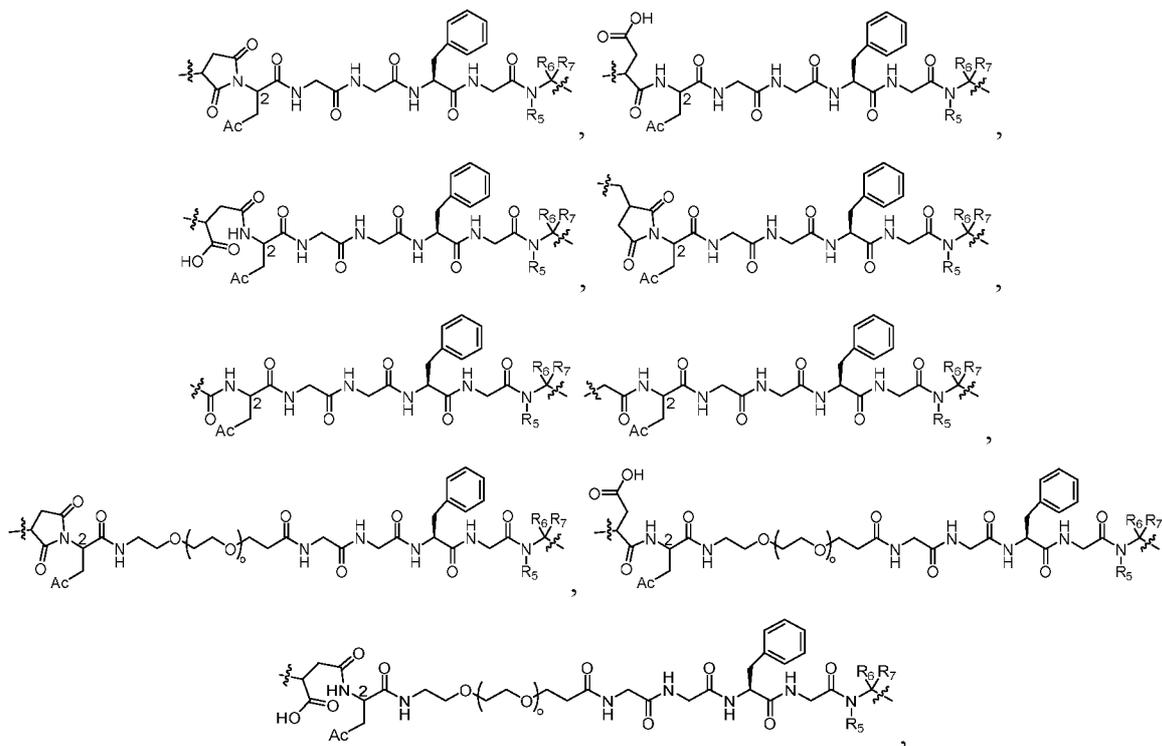
предпочтительно каждый из R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>7</sub> независимо выбран из атома водорода или C1-Сбалкильной группы;

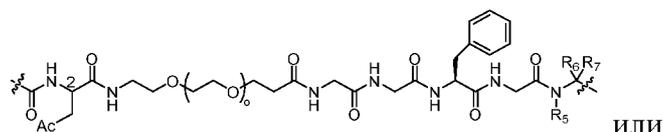
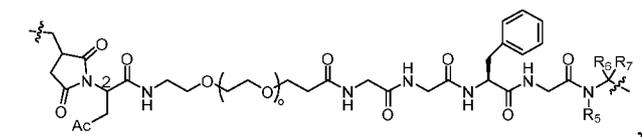
более предпочтительно каждый из R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>7</sub> независимо выбран из атома водорода.

В определенных вариантах осуществления L<sub>1</sub> выбран без ограничения из:

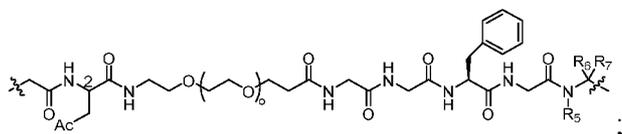


В некоторых вариантах осуществления первого аспекта настоящего изобретения раскрыты конъюгаты лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, где указанное связывающее звено -L<sub>1</sub>-L<sub>2</sub>-L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub>-L<sub>5</sub>- выбрано без ограничения из следующих структур;

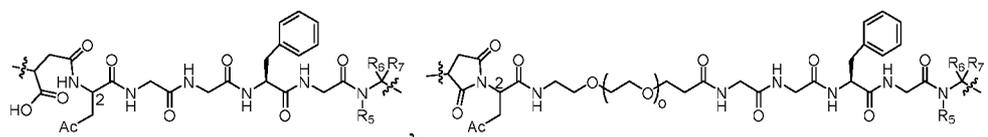
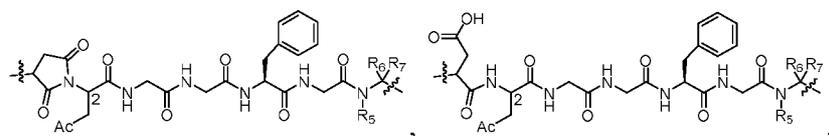




ИЛИ



предпочтительно



где

Ac представляет собой гидрофильное структурное звено;

$R_5$ ,  $R_6$  и  $R_7$  являются идентичными или разными, и каждый из них независимо выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, 3-7-членного гетероциклила, замещенного 3-7-членного гетероциклила, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила, замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно каждый из  $R_5$ ,  $R_6$  и  $R_7$  независимо выбран из атома водорода или C1-Сбалкильной группы;

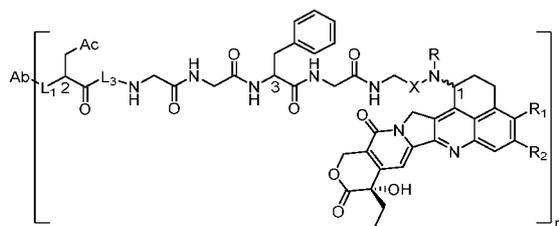
более предпочтительно каждый из  $R_5$ ,  $R_6$  и  $R_7$  независимо выбран из атома водорода;

атом углерода № 2, присоединенный к N, характеризуется абсолютной хиральностью в R-конфигурации или S-конфигурации;

левая волнистая линия связана с частью, представляющей собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а правая волнистая линия соединена с X;

о выбран из целых чисел 1-10 (т. е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10).

Во втором аспекте настоящего изобретения раскрыты конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой II, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват;

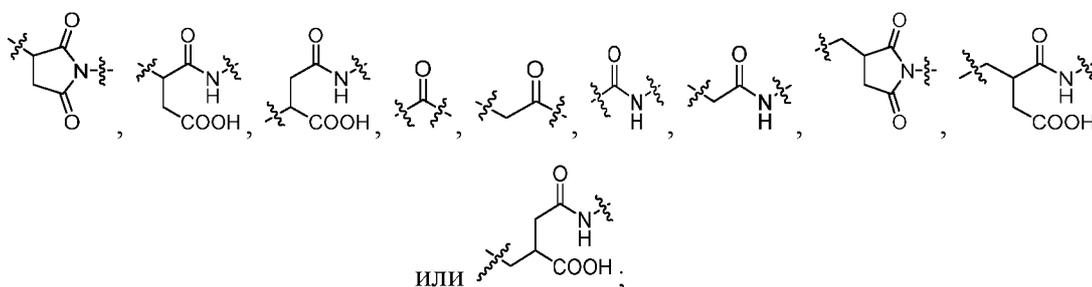


II,

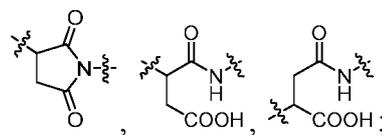
где

Ab представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые одновременно нацеливаются на EGFR и HER3;

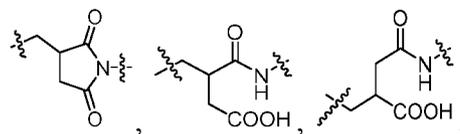
L<sub>1</sub> представляет собой связывающее звено, которое соединено с Ab, выбранное без ограничения из:



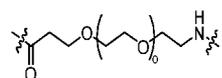
предпочтительно L<sub>1</sub> представляет собой:



предпочтительно L<sub>1</sub> представляет собой:



L<sub>3</sub> присутствует или отсутствует, и, если L<sub>3</sub> присутствует, L<sub>3</sub> выбран из



, о выбран из целых чисел 1-10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10), предпочтительно целых чисел 2-8;

Ac представляет собой гидрофильное структурное звено;

хиральные атомы углерода в положении 1, положении 2 и положении 3 характеризуются двумя хиральными конфигурациями, а именно абсолютной R-конфигурацией или абсолютной S-конфигурацией;

R выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно R выбран из атома водорода или C1-Сбалкильной группы;

$R_1$  выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, карбоксила, 3-7-членного гетероциклила, замещенного 3-7-членного гетероциклила, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила, замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно  $R_1$  выбран из атома водорода или C1-Сбалкильной группы;

более предпочтительно  $R_1$  выбран из C1-Сбалкила;

$R_2$  выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, карбоксила, 3-7-членного гетероциклила, замещенного 3-7-членного гетероциклила, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила, замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно  $R_2$  выбран из атома водорода, галогена или C1-Сбалкильной группы;

более предпочтительно  $R_2$  выбран из галогена;

$X$  выбран из  $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-O-$ ,  $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-NH-$  или  $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-S-$ ;

предпочтительно  $X$  выбран из  $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-O-$ ;

каждый из  $R_a$  и  $R_b$  независимо выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкильной группы, дейтерированной C1-Сбалкильной группы, галогенированной C1-Сбалкильной группы, C3-С8циклоалкильной группы, C3-С8циклоалкил-C1-С6 алкильной группы, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкильной группы, 3-7-членной гетероциклической группы, замещенной 3-7-членной гетероциклической группы, C6-С10арильной группы, замещенной C6-С10арильной группы, 5-10-членного гетероарила, замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно каждый из  $R_a$  и  $R_b$  независимо выбран из атома водорода, C1-Сбалкила, галоген-C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила или C6-С10арил-C1-Сбалкила;

в качестве альтернативы  $R_a$ ,  $R_b$  и атомы углерода, к которым они присоединены, составляют C3-С8циклоалкильную группу, C3-С8циклоалкил-C1-С6 алкильную группу, 3-7-членную гетероциклильную группу, замещенную 3-7-членную гетероциклильную группу; предпочтительно  $R_a$ ,  $R_b$  и атомы углерода, к которым они присоединены, составляют C3-С8циклоалкильную группу;

R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> являются идентичными или разными и независимо представляют собой атомы водорода, атомы дейтерия, галогены, C1-Сбалкил, галогенированный C1-Сбалкил, дейтерированный C1-Сбалкил, C1-Сбалкокси, гидроксил, amino, циано, нитро, гидрокси-C1-Сбалкил, C3-С8циклоалкил, 3-7-членный гетероциклил, замещенный 3-7-членный гетероциклил соответственно;

предпочтительно R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> независимо представляют собой атомы водорода или C1-Сбалкильные группы соответственно;

в качестве альтернативы R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> и атомы углерода, к которым они присоединены, составляют C3-С8циклоалкильную группу, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкильную группу, 3-7-членную гетероциклическую группу, замещенную 3-7-членную гетероциклическую группу;

m выбран из целых чисел 0-4 (т. е. 0, 1, 2, 3 или 4), предпочтительно 0, 1;

n выбран из целых чисел 1-10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10).

В некоторых вариантах осуществления первого и второго аспектов настоящего изобретения раскрыты указанные конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где указанное Ас имеет структуру, представленную формулой В, как указано ниже:



В,

где

Z выбран без ограничения из группы, состоящей из одного или нескольких из гидрофильной структурной карбоксильной группы, фосфорной кислоты, полифосфорной кислоты, фосфористой кислоты, сульфоновой кислоты, сульфоновой кислоты или полиэтиленгликоля (PEG);

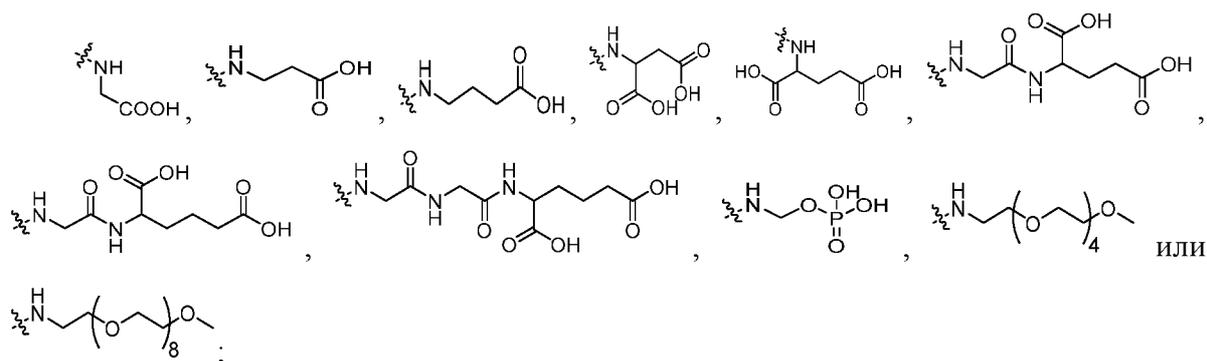
предпочтительно Z выбран из гидрофильной структурной карбоксильной группы, фосфорной кислоты или полиэтиленгликоля (PEG);

Y' представляет собой необязательно остов, соединяющий аминогруппу с Z; предпочтительно Y' представляет собой C1-Сбалкиленовую группу (например, метилен);

Ас соединено с углеродом в положении 2, который был помечен на структурной формуле I, с помощью остова Y.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта и второго аспекта настоящего изобретения раскрыты указанные конъюгат лиганд-производное

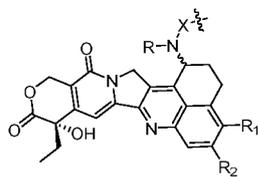
камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где указанное Ас выбрано без ограничения из глицина, (*D/L*) аланина, (*D/L*) лейцина, (*D/L*) изолейцина, (*D/L*) валина, (*D/L*) фенилаланина, (*D/L*) пролина, (*D/L*) триптофана, (*D/L*) серина, (*D/L*) тирозина, (*D/L*) цистеина, (*D/L*) цистина, (*D/L*) аргинина, (*D/L*) гистидина, (*D/L*) метионина, (*D/L*) аспарагина, (*D/L*) глутамина, (*D/L*) треонина, (*D/L*) аспарагиновой кислоты, (*D/L*) глутаминовой кислоты, природных или не природных производных аминокислот или следующих структур или их изомеров,



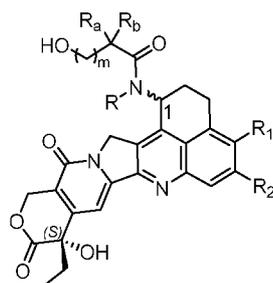
предпочтительно или .

В некоторых вариантах осуществления первого и второго аспектов настоящего изобретения раскрыты указанные конъюгаты лиганд-производное камптотецина или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, где указанное Ас выбрано без ограничения из глицина, фосфорной кислоты, (*D/L*) глутаминовой кислоты или гидрофильной структуры на основе полиэтиленгликоля.

В некоторых вариантах осуществления первого и второго аспектов настоящего изобретения раскрыты указанные конъюгаты лиганд-производное камптотецина или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, где указанный



имеет структуру, представленную формулой d ниже;



d,

где

R выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила, замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно R выбран из атома водорода или C1-Сбалкильной группы;

R<sub>1</sub> выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, карбоксила, 3-7-членного гетероциклила, замещенного 3-7-членного гетероциклила, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила, замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно R<sub>1</sub> выбран из атома водорода или C1-Сбалкильной группы;

более предпочтительно R<sub>1</sub> выбран из C1-Сбалкила;

R<sub>2</sub> выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, карбоксила, 3-7-членного гетероциклила, замещенного 3-7-членного гетероциклила, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила, замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно R<sub>2</sub> выбран из атома водорода, галогена или C1-Сбалкильной группы;

более предпочтительно R<sub>2</sub> выбран из галогена;

каждый из R<sub>a</sub> и R<sub>b</sub> независимо выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, галогенированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, 3-7-членной гетероциклической группы, замещенной 3-7-членной гетероциклической группы, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила, замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно каждый из R<sub>a</sub> и R<sub>b</sub> независимо выбран из атома водорода, C1-Сбалкила, галоген-C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила или C6-С10арил-C1-Сбалкила;

предпочтительно каждый из R<sub>a</sub> и R<sub>b</sub> независимо выбран из атома водорода, C1-Сбалкила, галоген-C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C6-С10арила; предпочтительно каждый из R<sub>a</sub> и R<sub>b</sub> независимо выбран из атома водорода, метильной

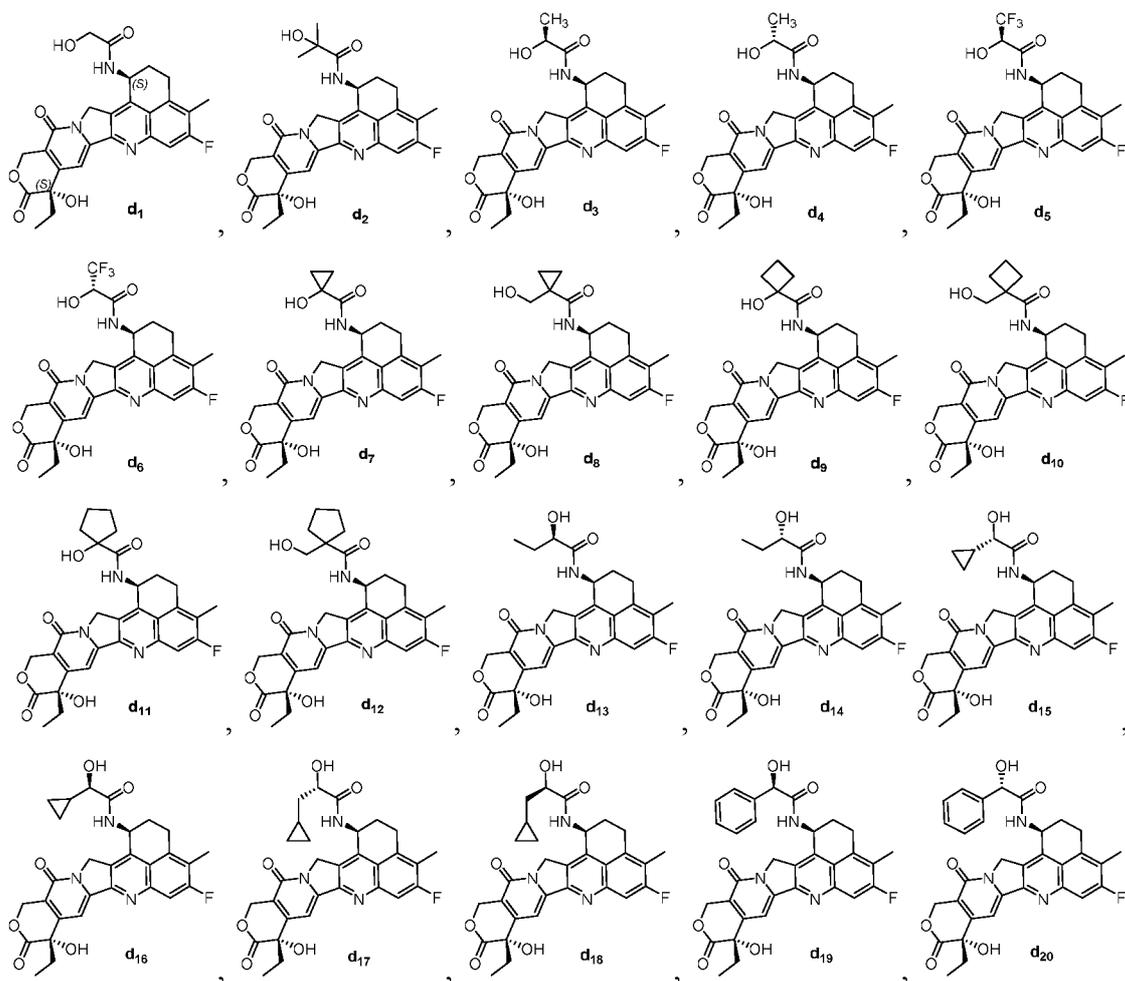
группы, этильной группы, трифторметильной группы, циклопропилметильной группы, фенильной группы;

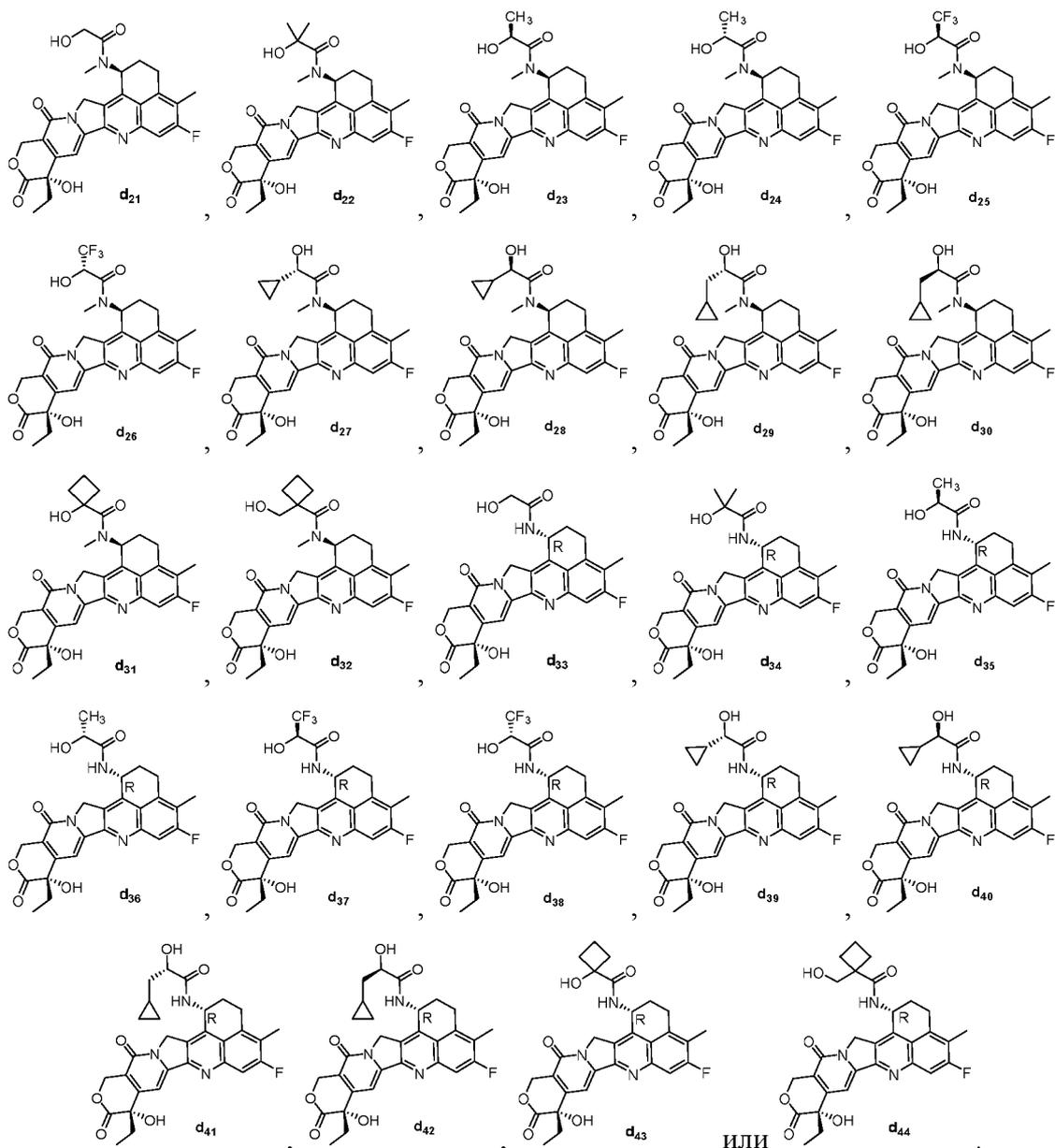
в качестве альтернативы  $R_a$ ,  $R_b$  и атомы углерода, к которым они присоединены, составляют С3-С8циклоалкильную группу, С3-С8циклоалкил-С1-Сбалкильную группу, 3-7-членную гетероциклическую группу, замещенную 3-7-членную гетероциклическую группу; предпочтительно  $R_a$ ,  $R_b$  и атомы углерода, к которым они присоединены, составляют С3-С8циклоалкильную группу (например, С3-С5циклоалкильную группу);

хиральный атом углерода в положении 1 характеризуется двумя хиральными конфигурациями, а именно абсолютной R-конфигурацией или абсолютной S-конфигурацией;

$m$  выбран из 0 или 1.

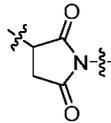
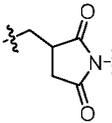
В некоторых вариантах осуществления первого и второго аспектов настоящего изобретения раскрыты указанные конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где указанная структурная формула  $d$  выбрана без ограничения из следующих соединений:





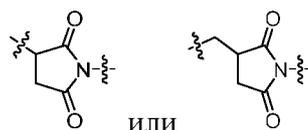
В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения L<sub>1</sub> может содержать сукцинимидную группу. В этих вариантах осуществления конъюгат лиганд-лекарственное средство может подвергаться гидролизу в условиях для легкого осуществления гидролиза, при этом сайтом гидролиза является сукцинимидная группа линкерного звена. Если лиганд содержит несколько элементов линкер-лекарственное средство, при различной степени гидролиза могут происходить следующие сценарии:

сукцинимидные группы являются полностью негидролизуемыми, т. е. все

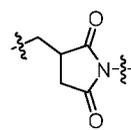
сукцинимидные группы находятся в форме закрытого кольца  или  ;

неполный гидролиз сукцинимидных групп, т. е. некоторые сукцинимидные

группы находятся в форме закрытого кольца

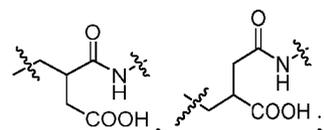
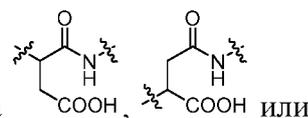


или



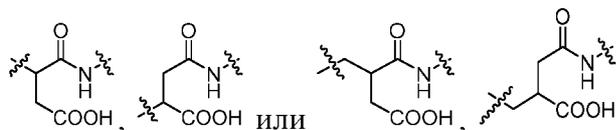
, и некоторые

сукцинимидные группы находятся в форме открытого кольца

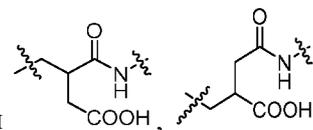


полный гидролиз сукцинимидных групп, т. е. все сукцинимидные группы

находятся в форме открытого кольца

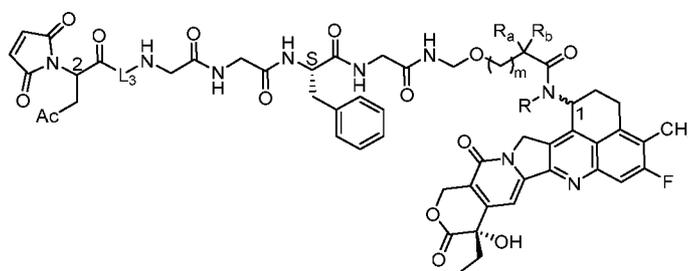


или



Таким образом, если в ADC одновременно присутствуют несколько  $L_1$ , содержащих сукцинимидные группы (т. е. Ab присоединено к нескольким элементам лекарственного средство-линкер, содержащим сукцинимидные группы), эти сукцинимидные группы могут находиться все в форме закрытого кольца, частично в форме открытого кольца или все в форме открытого кольца.

Следует понимать, что хотя в настоящей заявке сукцинимидная группа, фигурирующая в химической структурной формуле ADC, находится в форме закрытого кольца, в действительности она охватывает все три сценария сукцинимидов, а именно нахождение всех сукцинимидных групп в форме закрытого кольца, частично в форме открытого кольца или всех в форме открытого кольца. В третьем аспекте настоящего изобретения раскрыты соединения линкер-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, характеризующиеся наличием структуры, представленной формулой III ниже,



III,

где

R выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-

Сбалкила, С1-Сбалкокси-С1-Сбалкила, С6-С10арила, замещенного С6-С10арила, 5-10-членного гетероарила, замещенного 5-10-членного гетероарила;

R<sub>a</sub> выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, С1-Сбалкила, дейтерированного С1-Сбалкила, галогенированного С1-Сбалкила, С3-С8циклоалкила, С3-С8циклоалкил-С1-Сбалкила, С1-Сбалкокси-С1-Сбалкила, 3-7-членной гетероциклической группы, замещенной 3-7-членной гетероциклической группы, С6-С10арила, замещенного С6-С10арила, 5-10-членного гетероарила, замещенного 5-10-членного гетероарила;

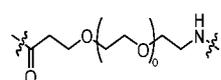
R<sub>b</sub> выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, С1-Сбалкила, дейтерированного С1-Сбалкила, галогенированного С1-Сбалкила, С3-С8циклоалкила, С3-С8циклоалкил-С1-Сбалкила, С1-Сбалкокси-С1-Сбалкила, 3-7-членной гетероциклической группы, замещенной 3-7-членной гетероциклической группы, С6-С10арила, замещенного С6-С10арила, 5-10-членного гетероарила, замещенного 5-10-членного гетероарила;

в качестве альтернативы R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub> и атомы углерода, присоединенные к ним, составляют С3-С8циклоалкильную группу, С3-С8циклоалкил-С1-Сбалкильную группу, 3-7-членную гетероциклическую группу, замещенную 3-7-членную гетероциклическую группу;

предпочтительно каждый из R<sub>a</sub> и R<sub>b</sub> независимо выбран из атома водорода, С1-Сбалкила, галоген-С1-Сбалкила, С3-С8циклоалкил-С1-Сбалкила, С6-С10арила; предпочтительно каждый из R<sub>a</sub> и R<sub>b</sub> независимо выбран из атома водорода, метильной группы, этильной группы, трифторметильной группы, циклопропилметильной группы, фенильной группы;

в качестве альтернативы R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub> и атомы углерода, к которым они присоединены, составляют С3-С8циклоалкильную группу, С3-С8циклоалкил-С1-Сбалкильную группу, 3-7-членную гетероциклильную группу, замещенную 3-7-членную гетероциклильную группу; предпочтительно R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub> и атомы углерода, к которым они присоединены, составляют С3-С8циклоалкильную группу (например, С3-С5циклоалкильную группу);

L<sub>3</sub> присутствует или отсутствует, и, если L<sub>3</sub> присутствует, он выбран из



, о выбран из целого числа от 1 до 10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10);

хиральный атом углерода в положении 1 или положении 2 характеризуется двумя

хиральностями, а именно абсолютной R-конфигурацией или абсолютной S-конфигурацией;

Ac представляет собой гидрофильное структурное звено;

m выбран из 0 или 1.

В некоторых вариантах осуществления третьего аспекта настоящего изобретения раскрыты указанные соединения линкер-лекарственное средство или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, где указанное Ac имеет структуру, представленную формулой В ниже,



В,

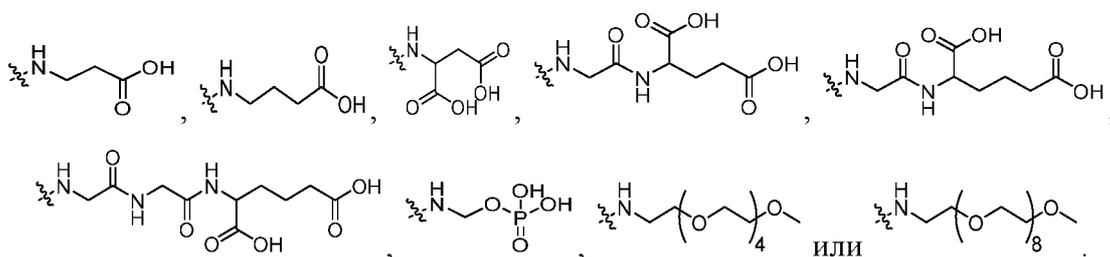
где

Z выбран без ограничения из группы, состоящей из одного или нескольких из гидрофильной структурной карбоксильной группы, фосфорной кислоты, полифосфорной кислоты, фосфористой кислоты, сульфоновой кислоты, сульфоновой кислоты или полиэтиленгликоля (PEG);

Y' представляет собой необязательный остов, соединяющий аминогруппу с Z; предпочтительно Y' представляет собой C1-Сбалкиленовую группу (например, метилен);

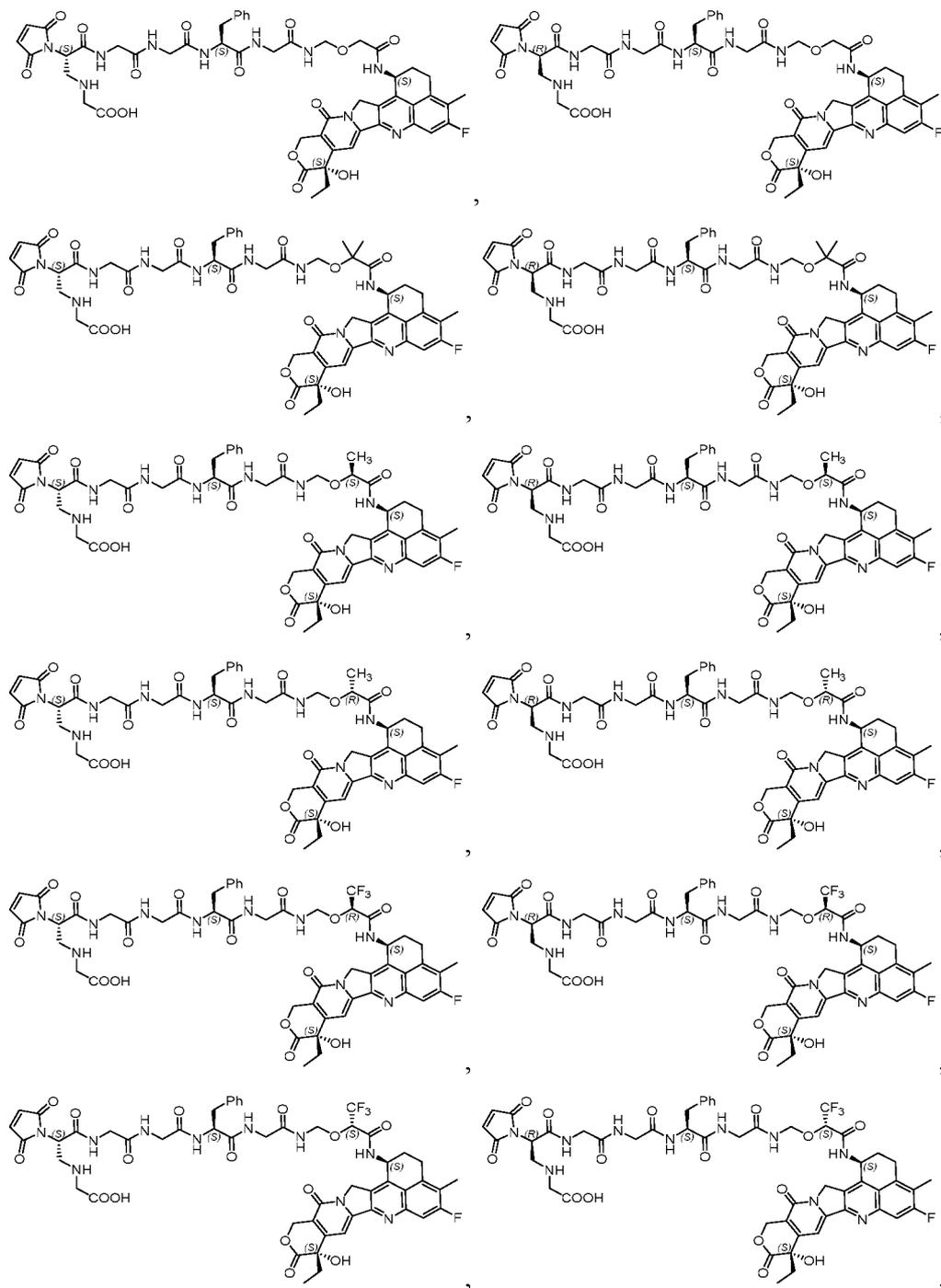
Ac соединено с углеродом в положении 2, который был помечен на структурной формуле I, с помощью остова Y.

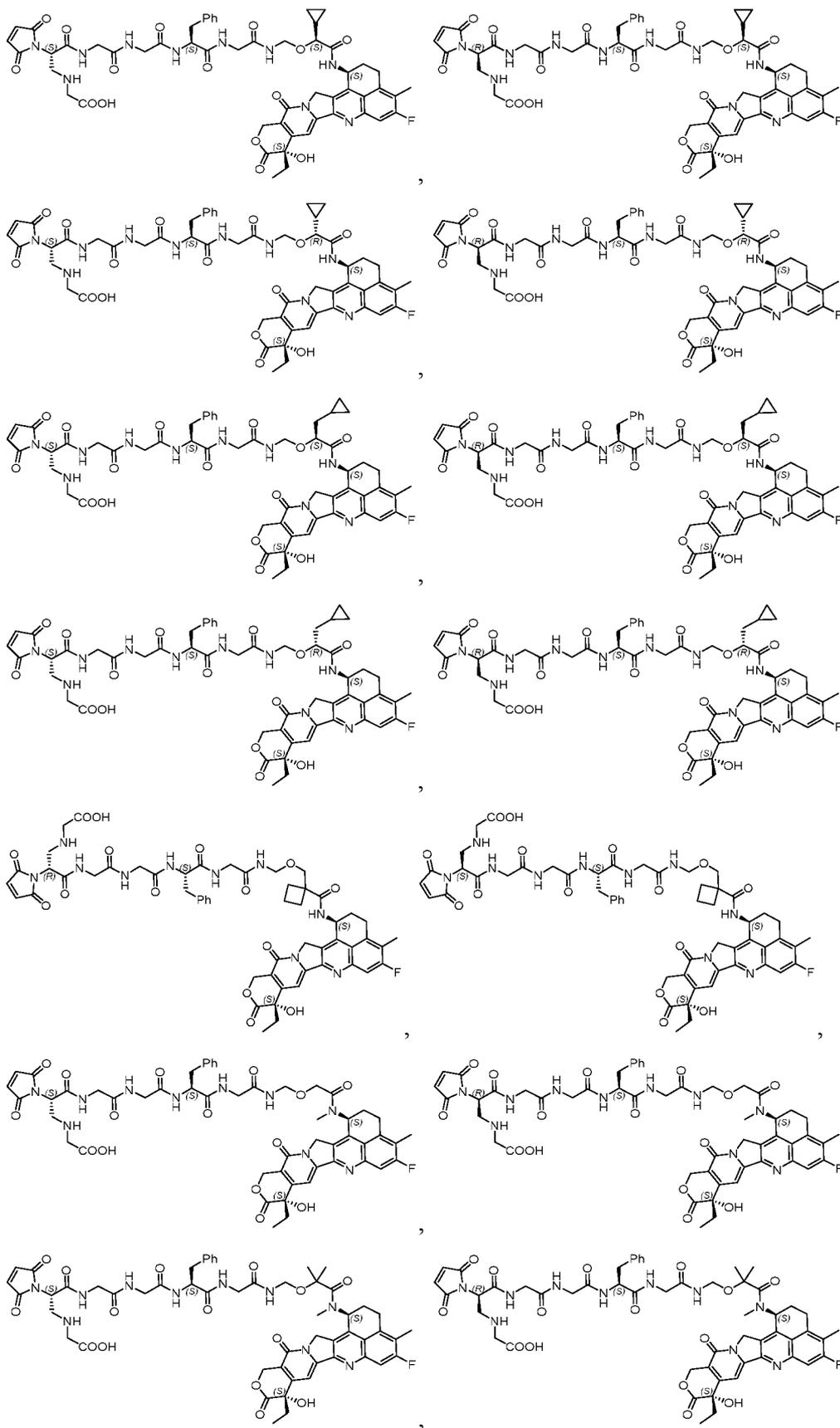
В некоторых вариантах осуществления третьего аспекта настоящего изобретения раскрыты соединения линкер-лекарственное средство или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, где указанное Ac выбрано без ограничения из глицина, (D/L) аланина, (D/L) лейцина, (D/L) изолейцина, (D/L) валина, (D/L) фенилаланина, (D/L) пролина, (D/L) триптофана, (D/L) серина, (D/L) тирозина, (D/L) цистеина, (D/L) цистина, (D/L) аргинина, (D/L) гистидина, (D/L) метионина, (D/L) аспарагина, (D/L) глутамина, (D/L) треонина, (D/L) аспарагиновой кислоты, (D/L) глутаминовой кислоты, природных или неприродных производных аминокислот или следующих структур:

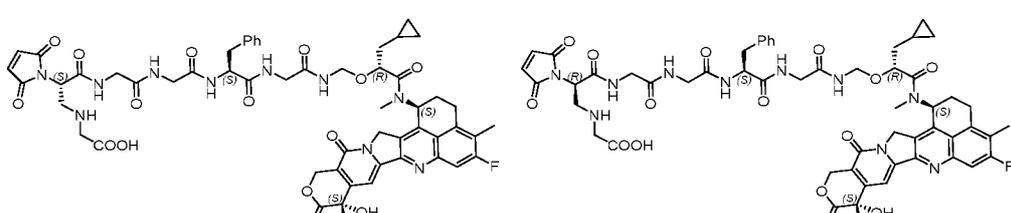
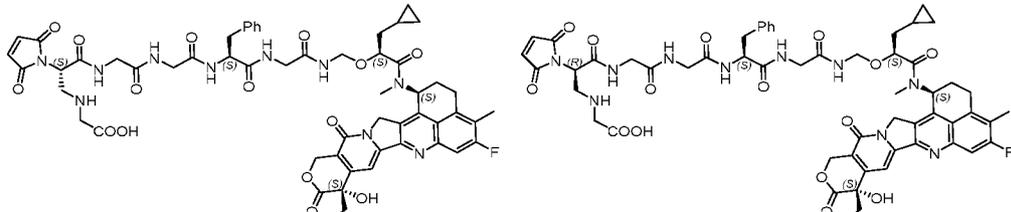
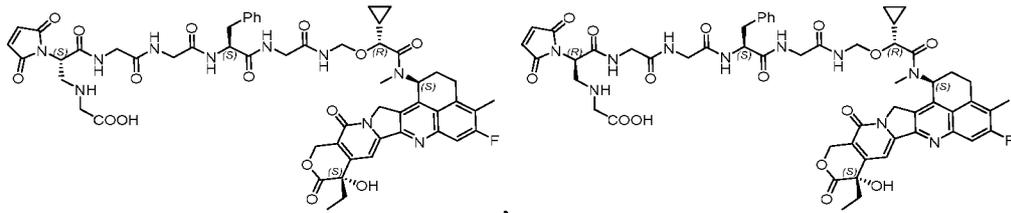
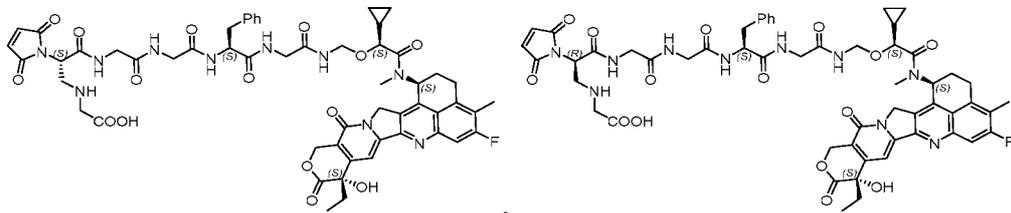
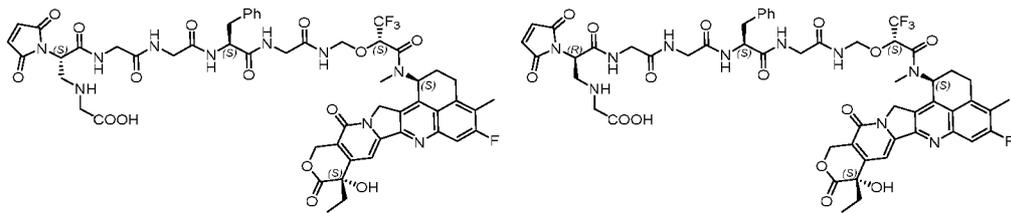
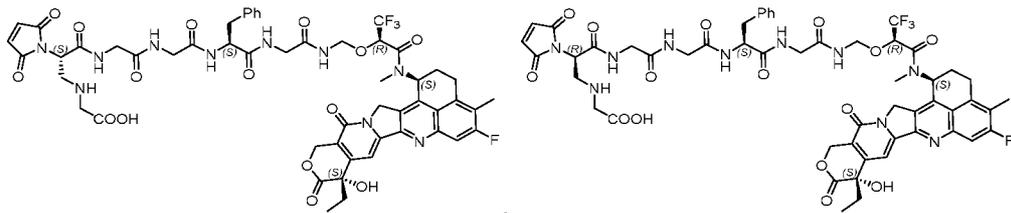
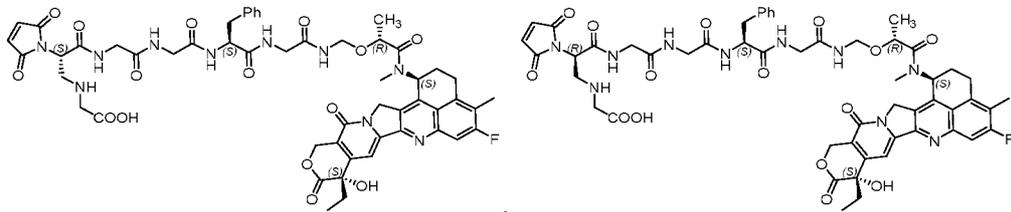
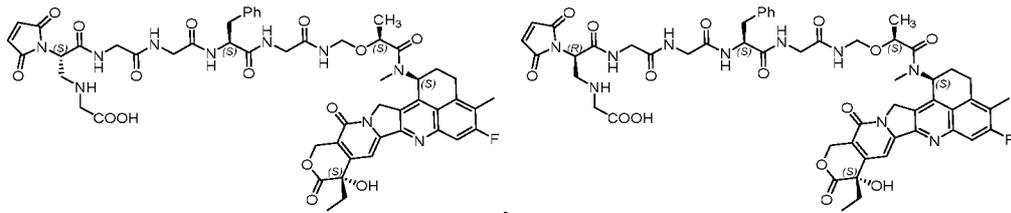


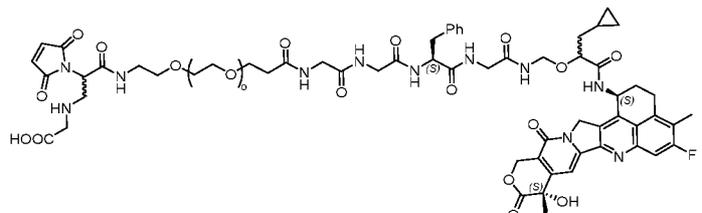
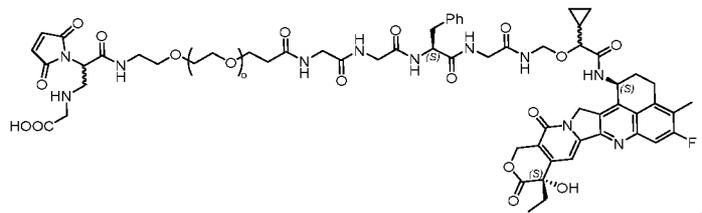
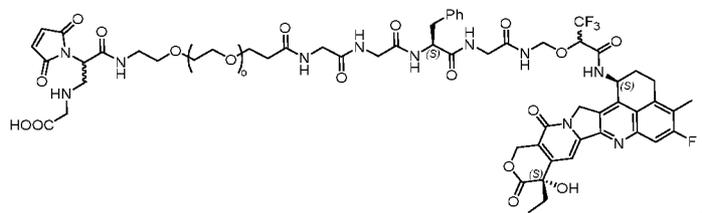
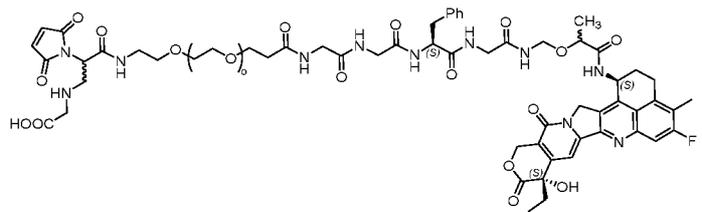
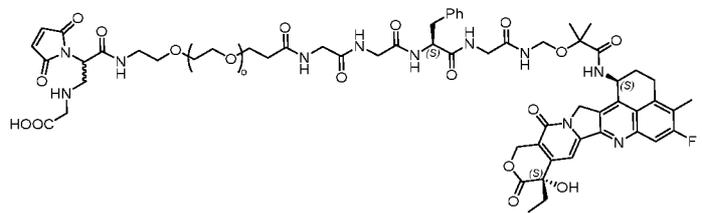
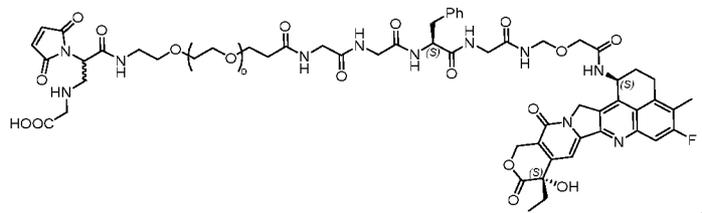
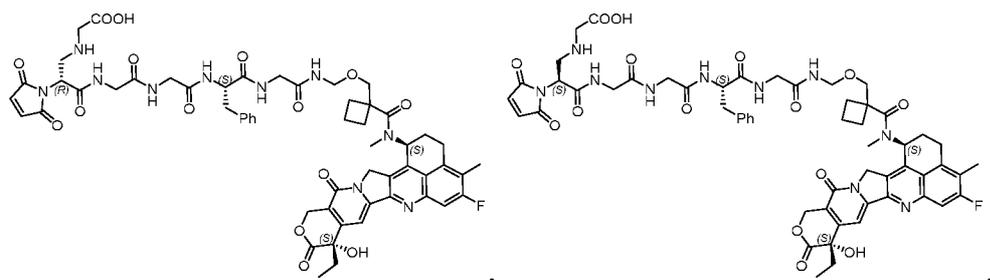
В некоторых вариантах осуществления третьего аспекта настоящего изобретения раскрыты соединения линкер-лекарственное средство или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, где Ас выбрано без ограничения из глицина, фосфорной кислоты, (*D/L*) глутаминовой кислоты или гидрофильной структуры на основе полиэтиленгликоля.

В некоторых вариантах осуществления третьего аспекта настоящего изобретения раскрыты соединения линкер-лекарственное средство или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, где указанные соединения линкер-лекарственное средство выбраны без ограничения из следующих структур или их изомеров:

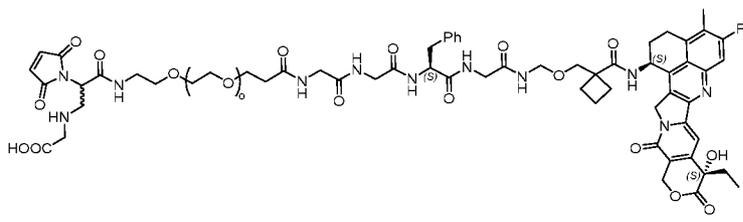








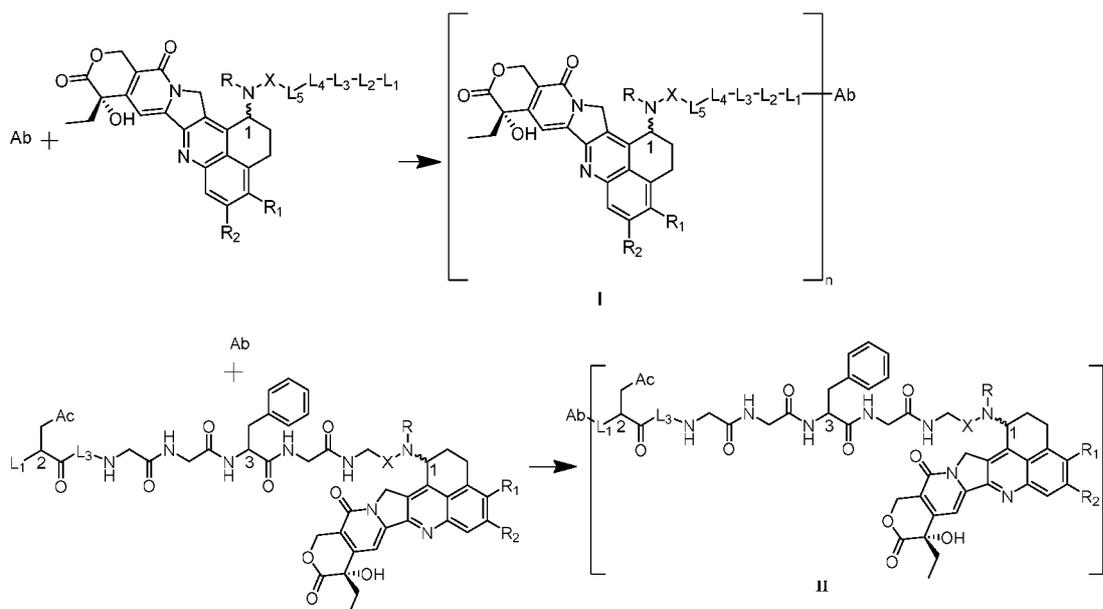
ИЛИ



где:  $n$  выбран из целых чисел 1-10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10).

Указанные соединения линкер-лекарственное средство или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, раскрытые в третьем аспекте настоящего изобретения, могут применяться в качестве промежуточных соединений для сочетания с Аб-лигандом с образованием конъюгатов лиганд-производное камптотецина формулы I или формулы II, описанных в первом аспекте и втором аспекте.

В четвертом аспекте настоящего изобретения раскрыт способ получения конъюгата лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата, представленных общей формулой I или общей формулой II, как описано в первом и втором аспектах, где способ включает следующие стадии:



при этом конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I или общей формулой II, получают посредством реакции сочетания восстановленного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с соединением линкер-лекарственное средство;

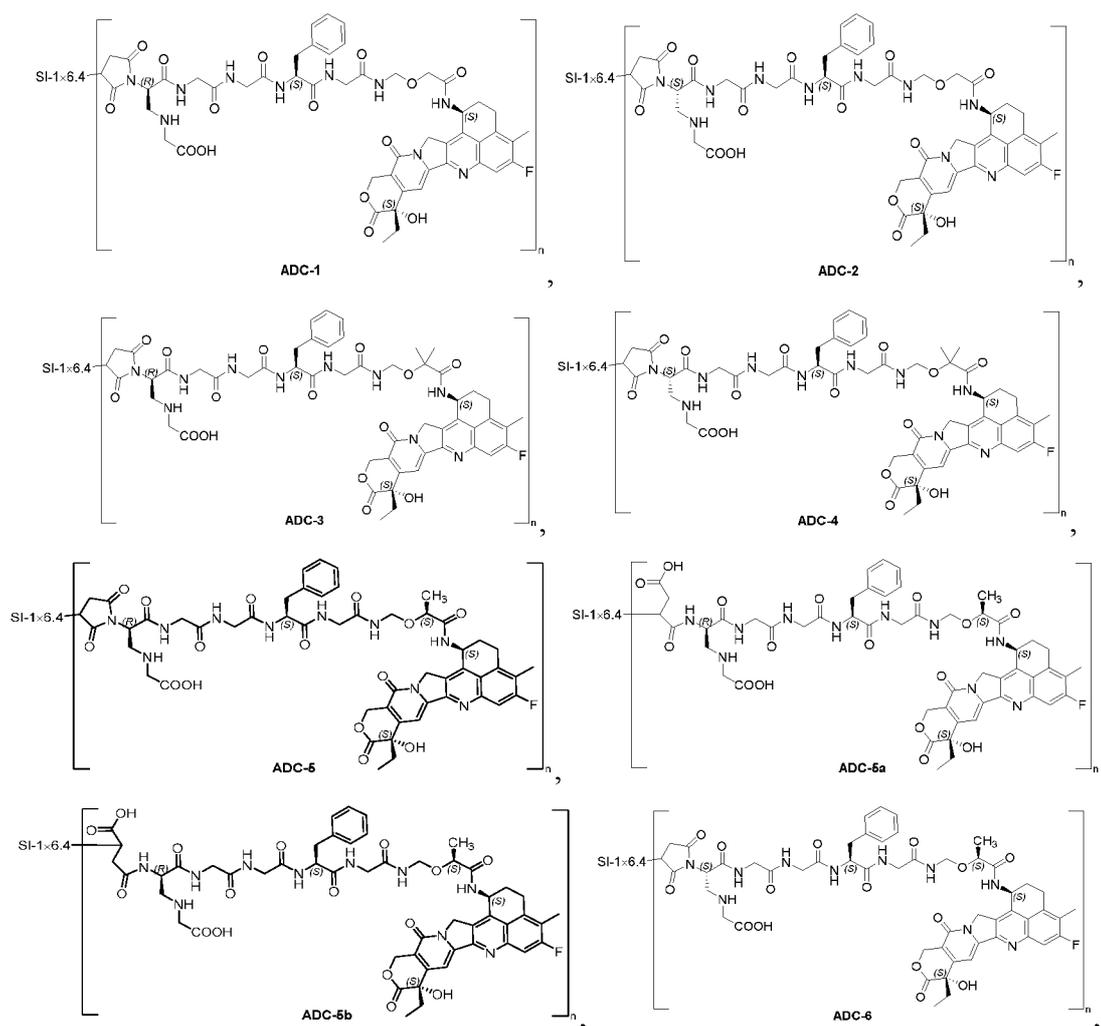
хиральный атом углерода в положении 1, положении 2 или положении 3 характеризуется абсолютной хиральностью в R-конфигурации или S-конфигурации;

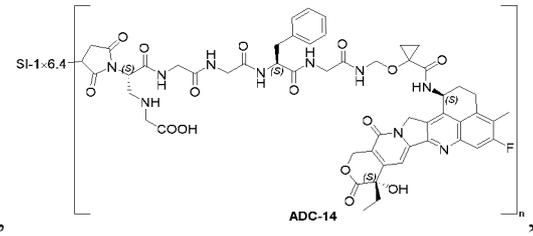
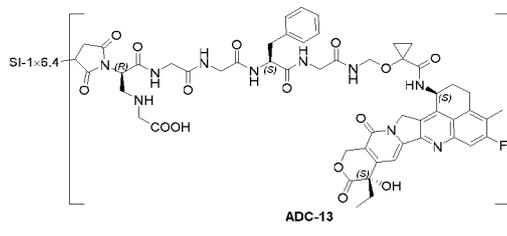
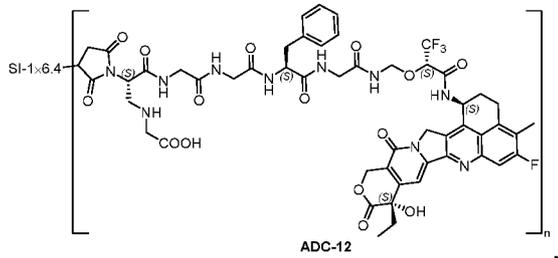
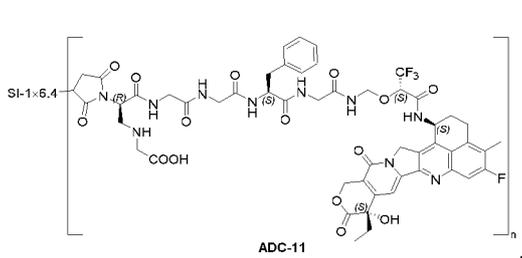
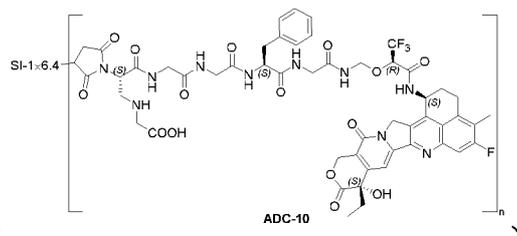
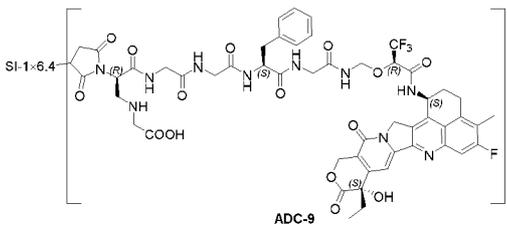
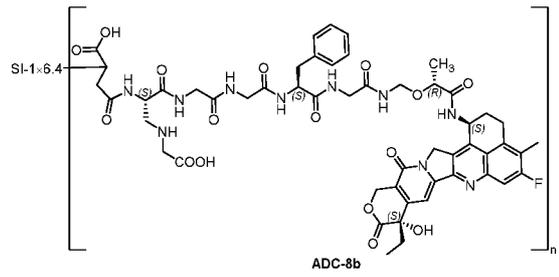
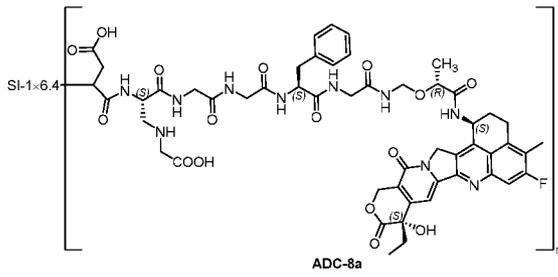
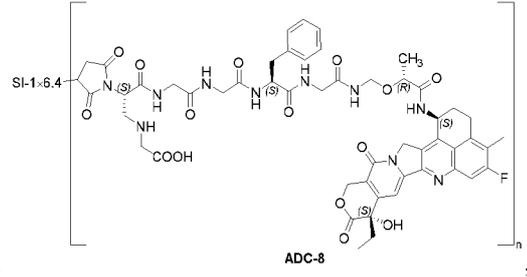
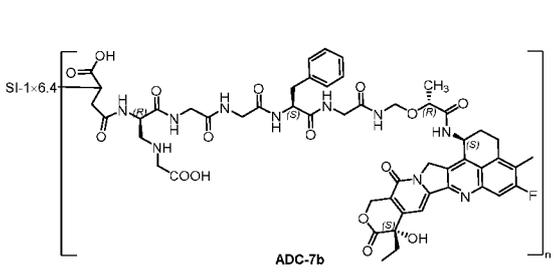
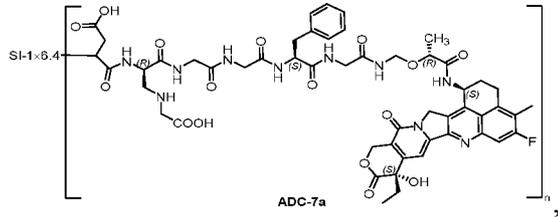
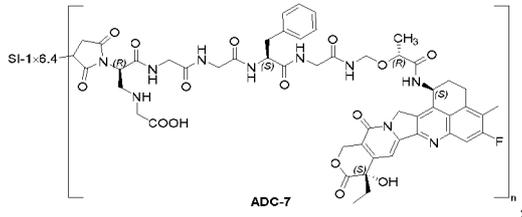
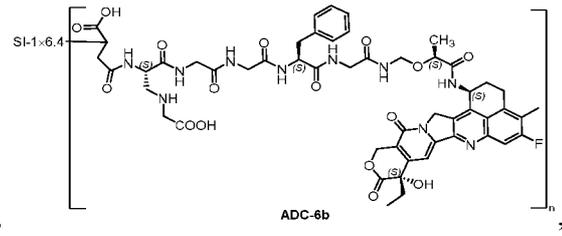
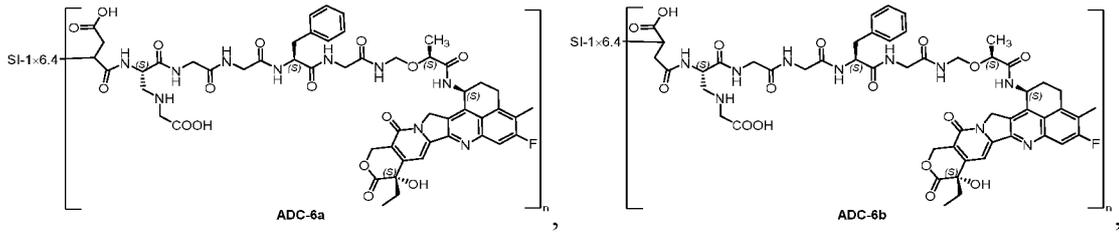
Ab, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub>, X, R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> и n являются такими, как описано ранее.

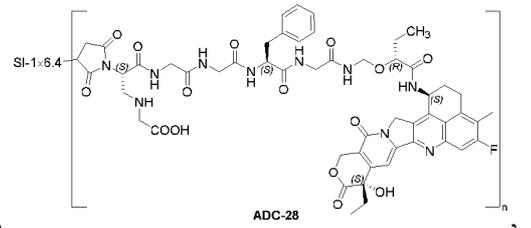
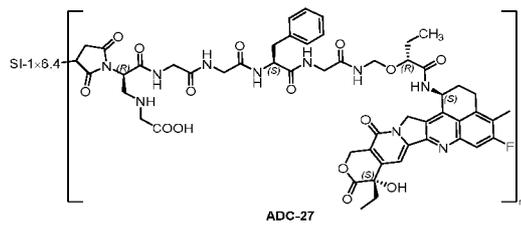
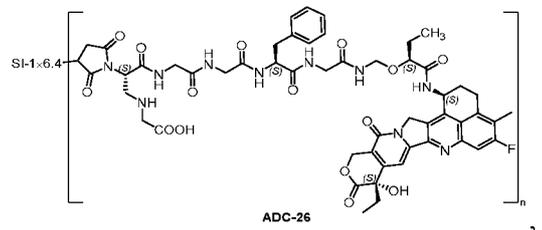
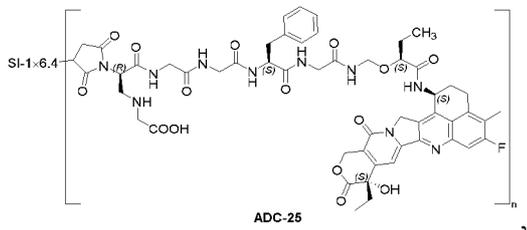
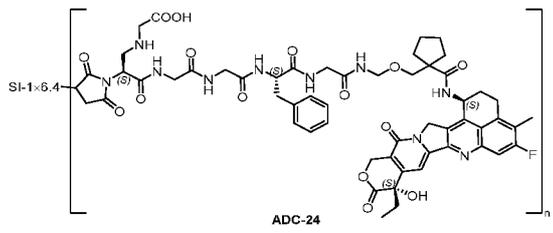
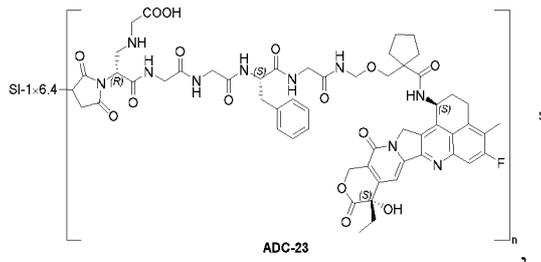
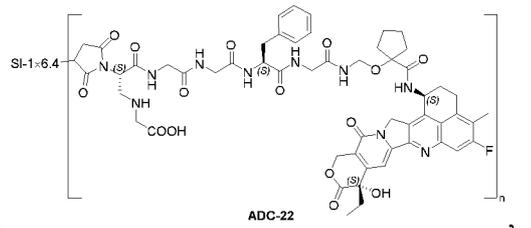
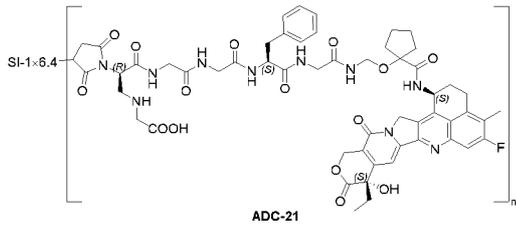
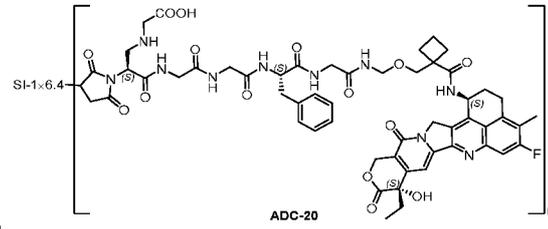
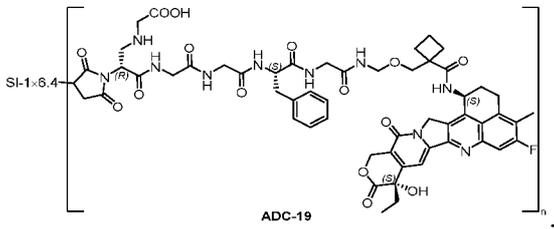
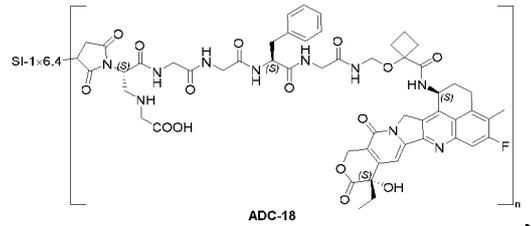
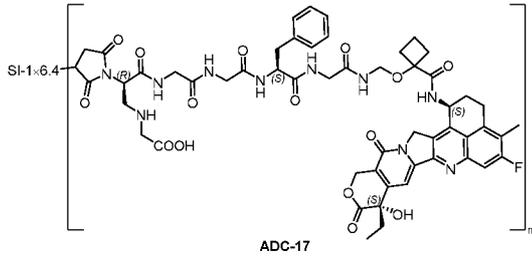
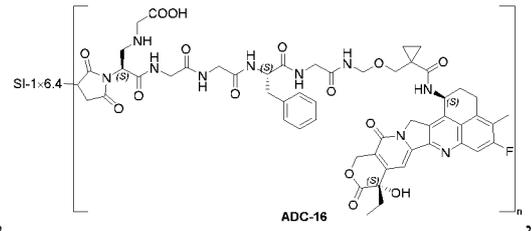
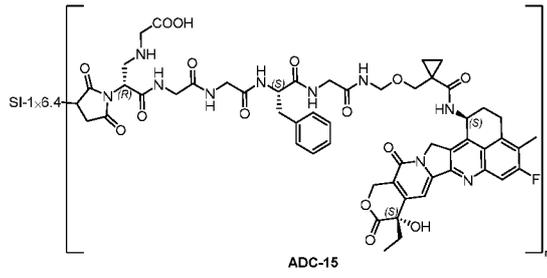
Настоящая заявка также относится к применению соединений линкер-лекарственное средство или их фармацевтически приемлемых солей или сольватов,

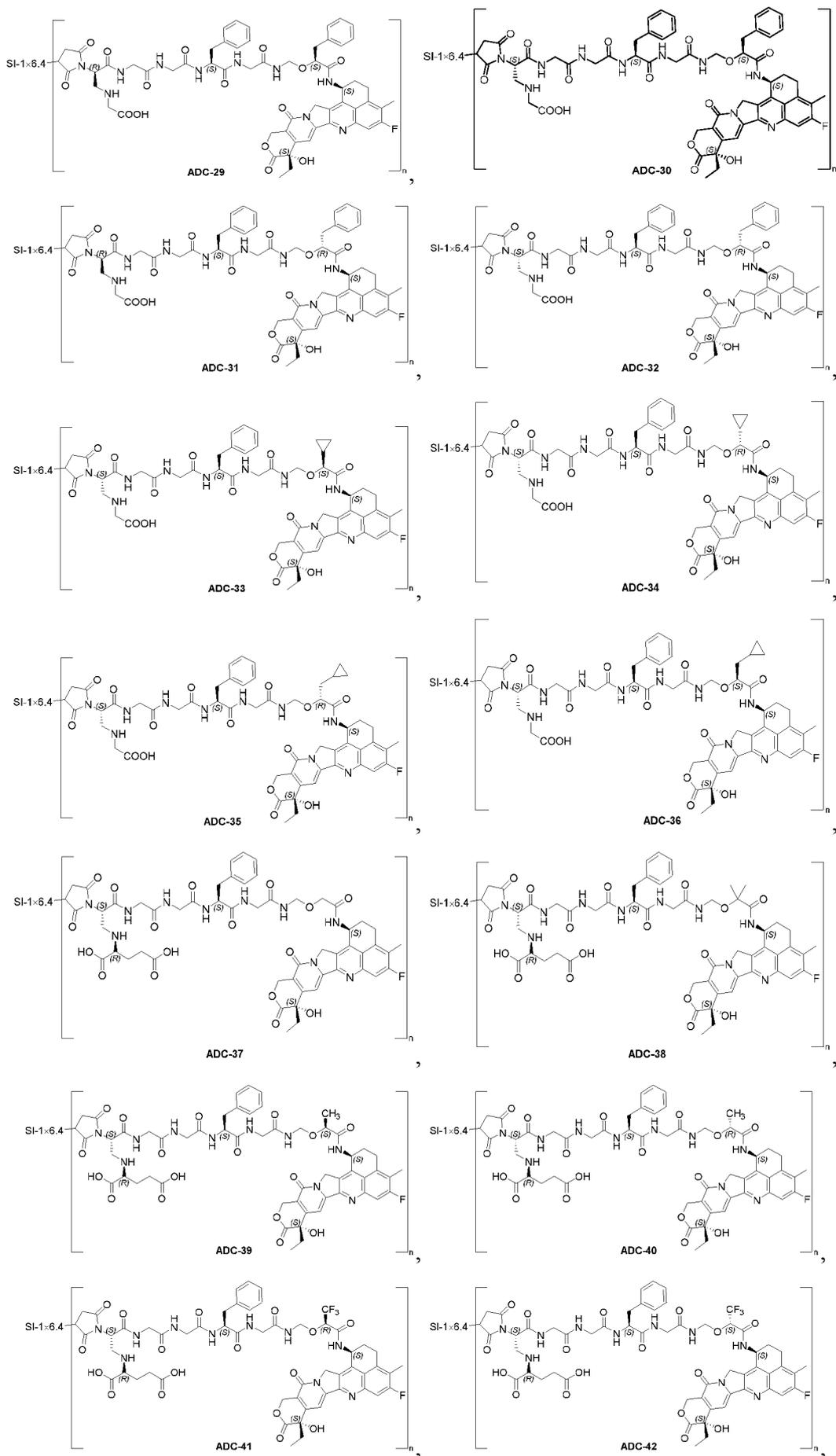
раскрытых и описанных в третьем аспекте, в качестве промежуточных соединений в получении конъюгатов лиганд-производное камптотецина или их фармацевтически приемлемых солей или сольватов. В определенных вариантах осуществления указанные конъюгаты лиганд-производное камптотецина или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты представляют собой конъюгаты лиганд-производное камптотецина или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, раскрытые в первом, втором и четвертом аспектах настоящего изобретения. В определенных вариантах осуществления указанное получение проводят в соответствии со способом получения, раскрытым в четвертом аспекте.

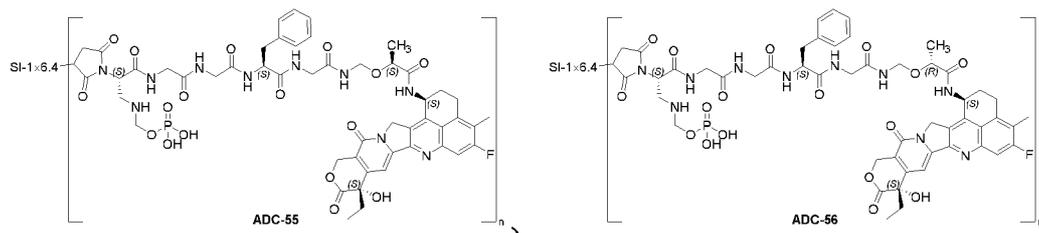
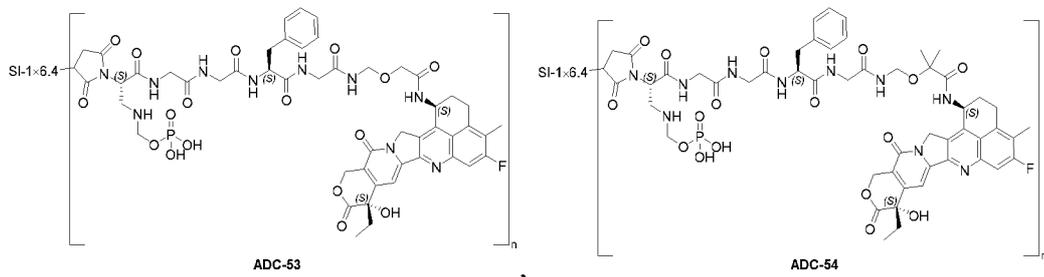
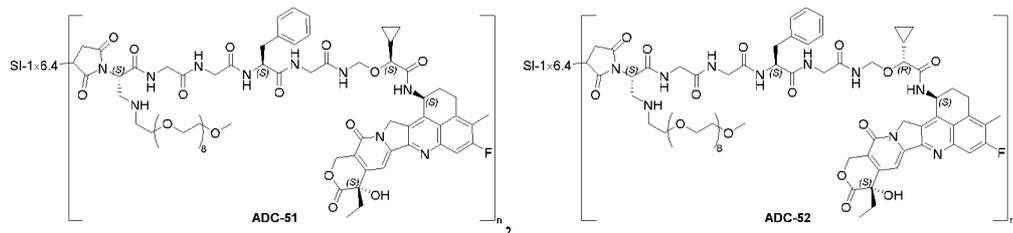
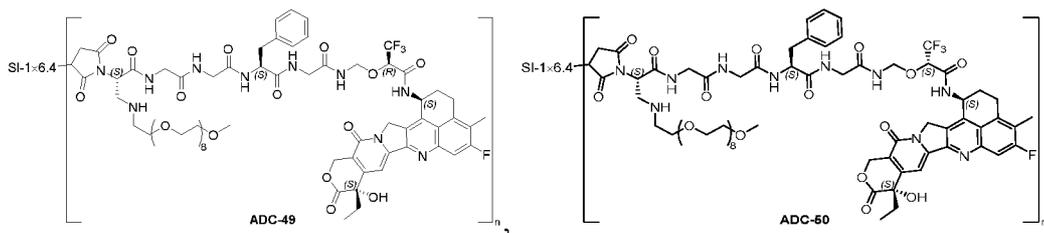
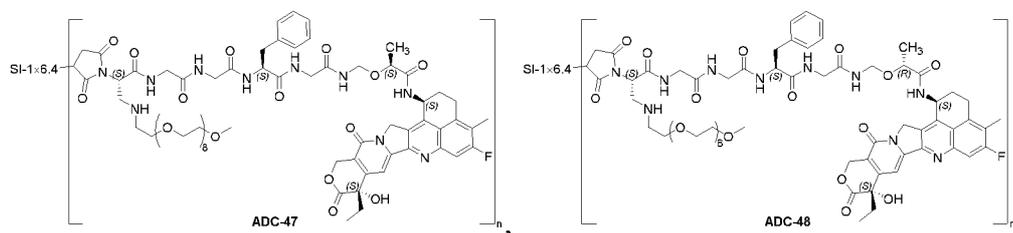
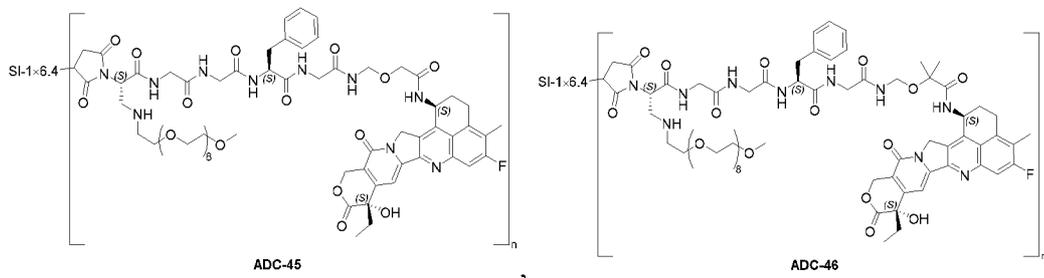
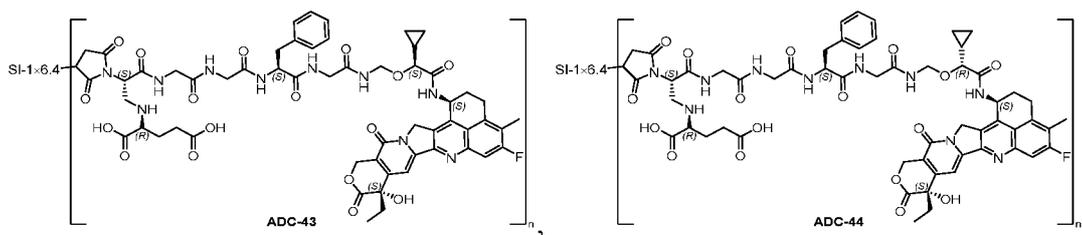
В некоторых вариантах осуществления первого аспекта, второго аспекта и четвертого аспекта настоящего изобретения раскрыты указанные конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где указанные конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват выбраны без ограничения из следующих структур, или структур с сукцинимидным открытым кольцом на их основе, или их изомеров,

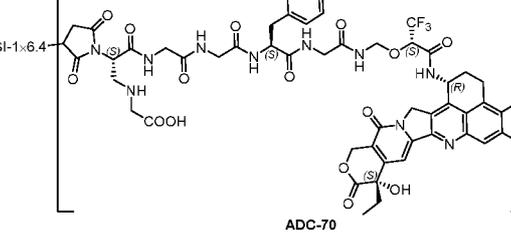
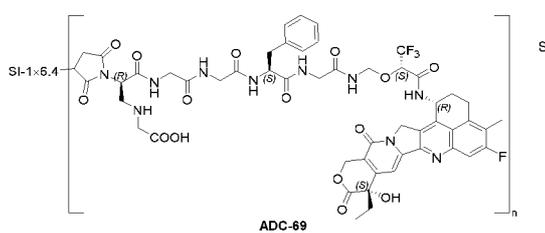
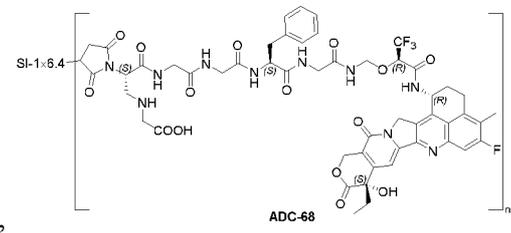
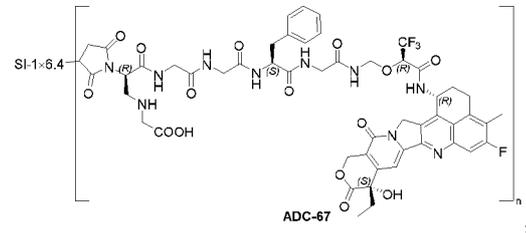
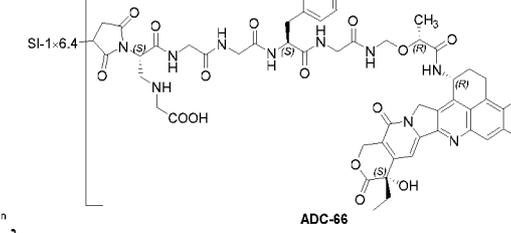
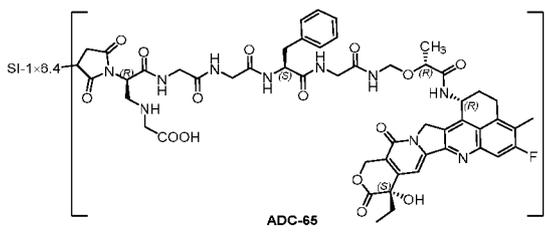
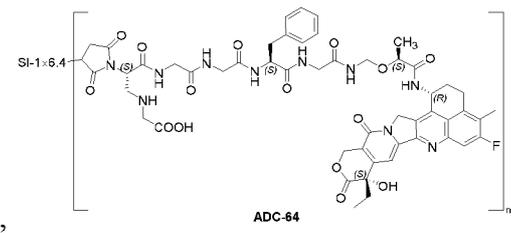
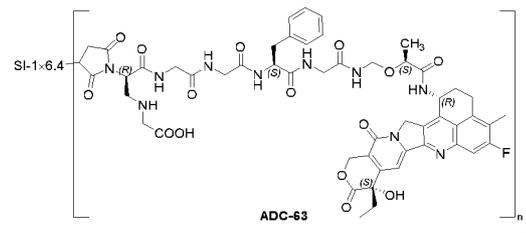
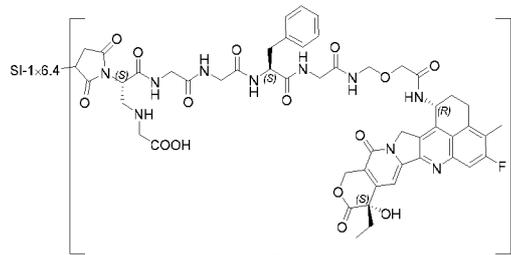
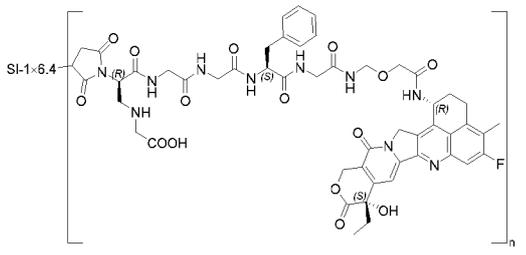
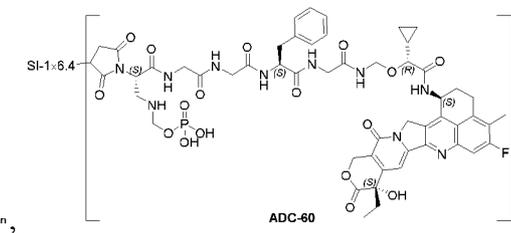
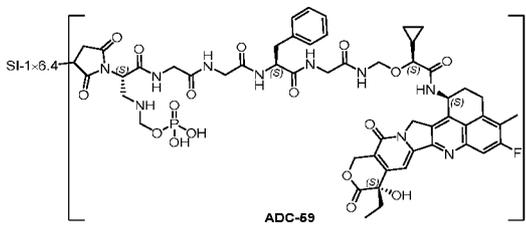
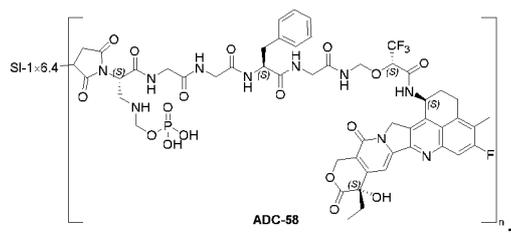
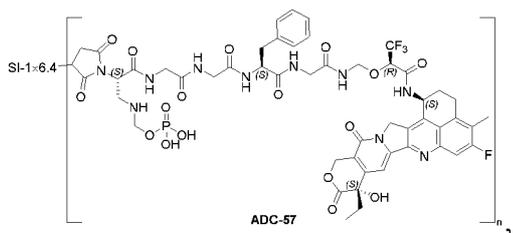


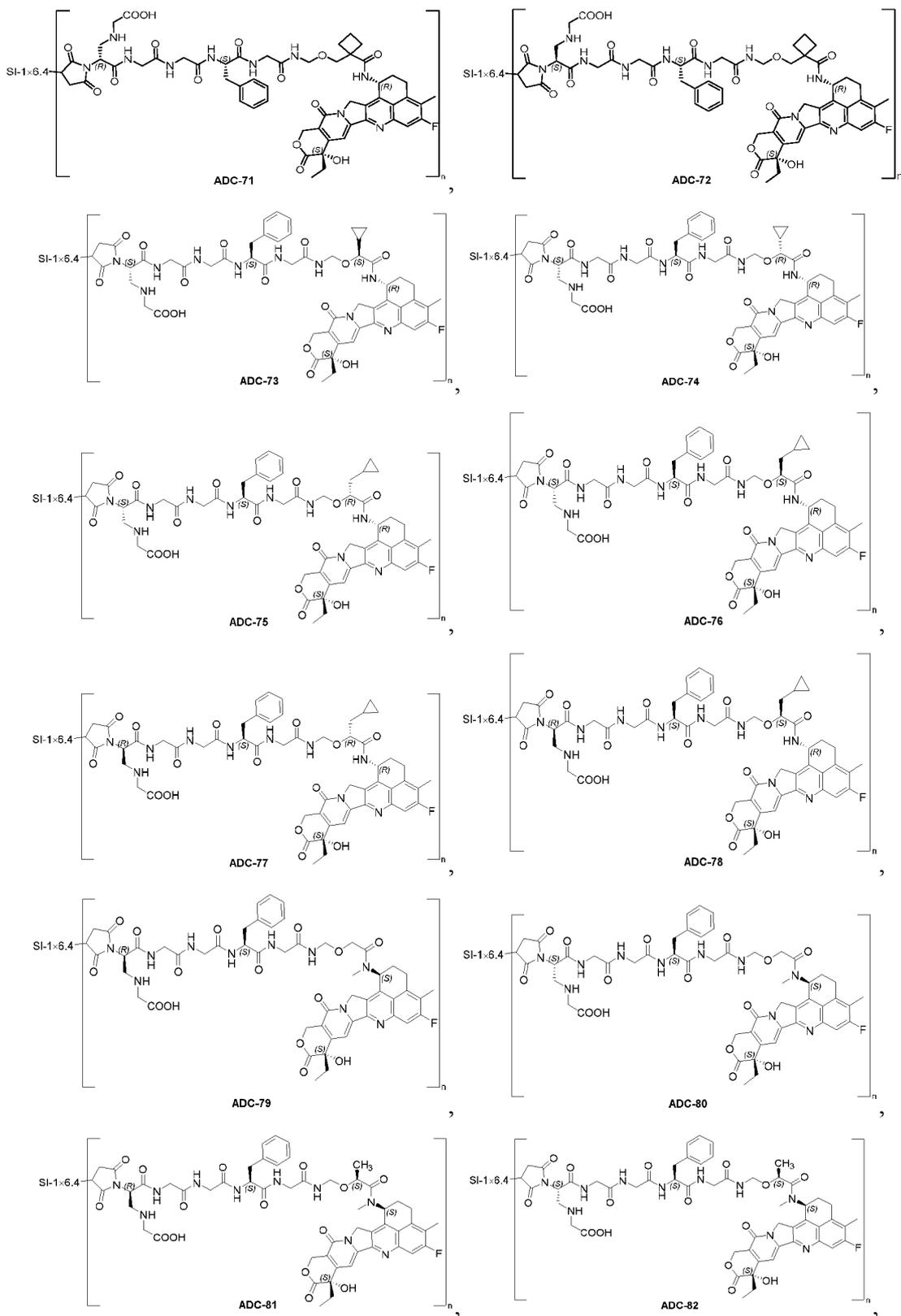


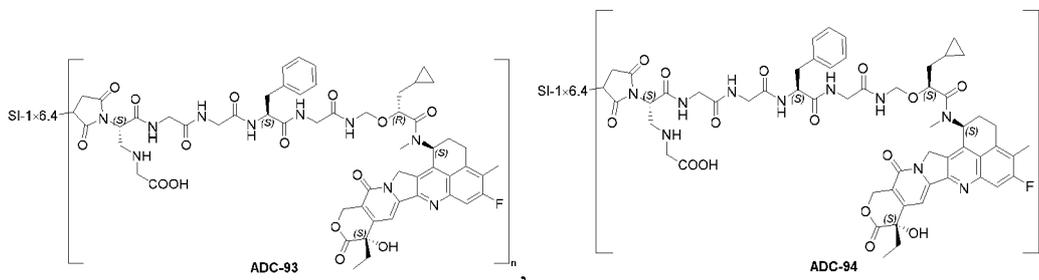
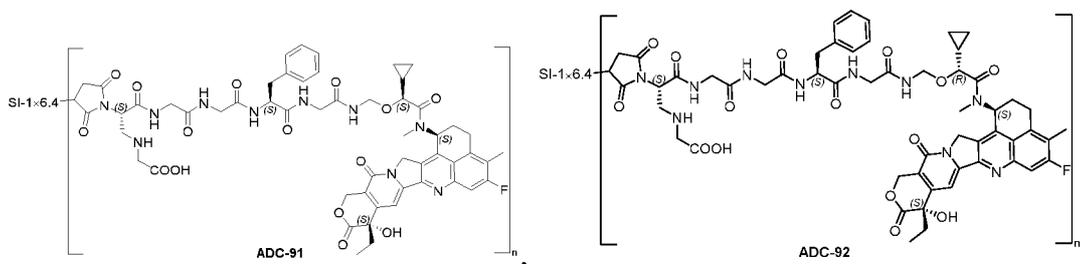
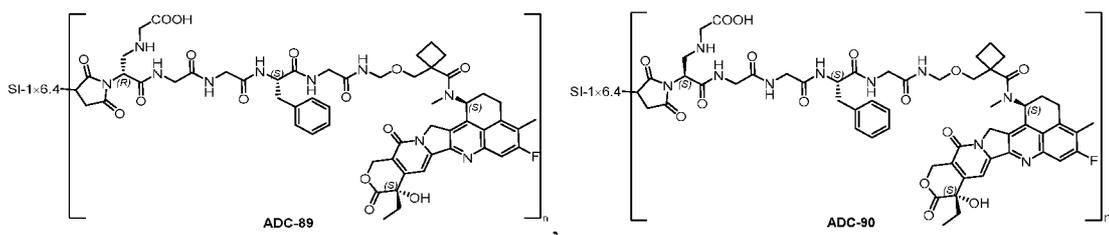
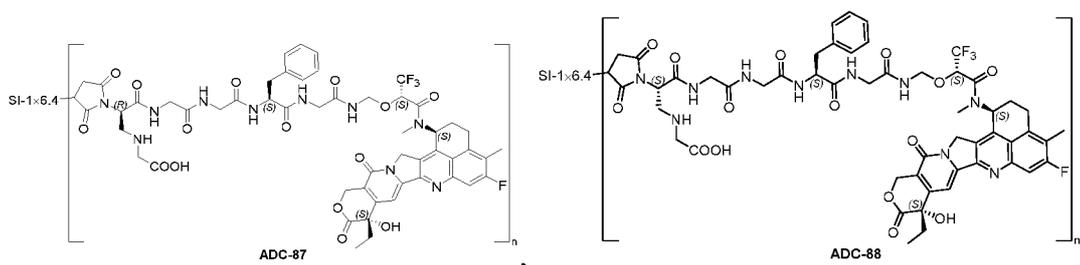
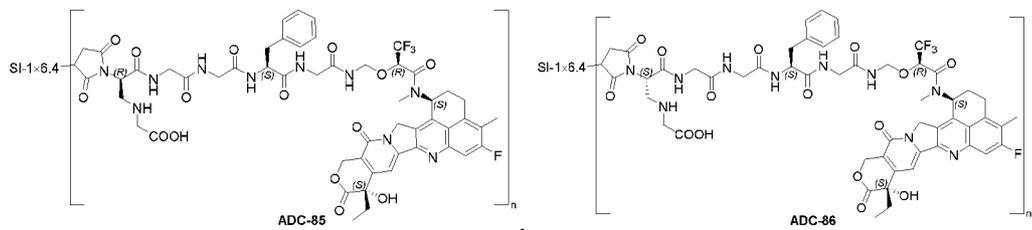
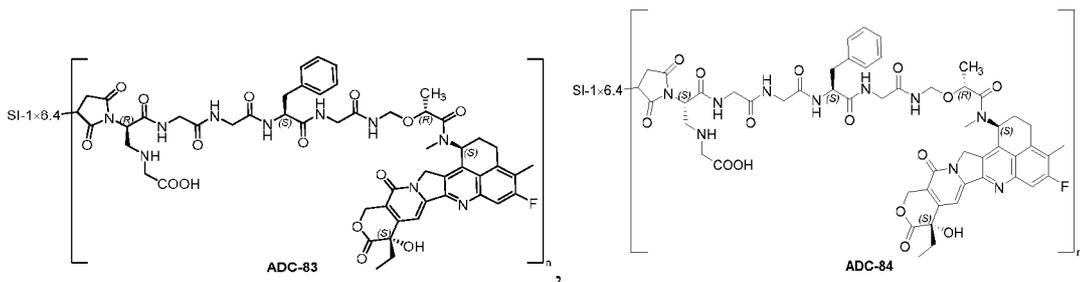


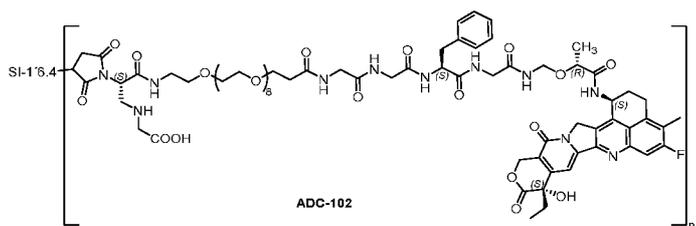
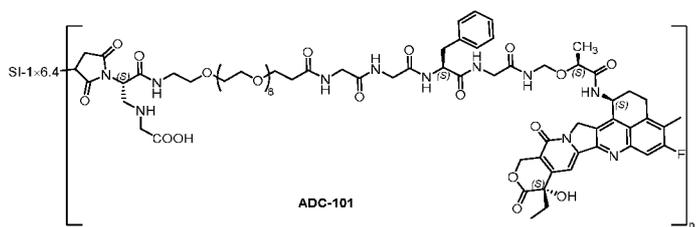
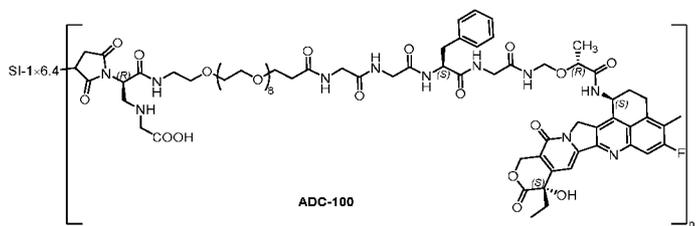
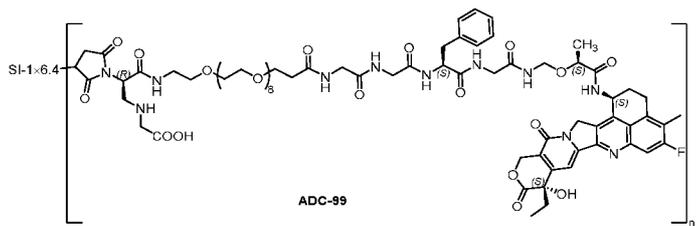
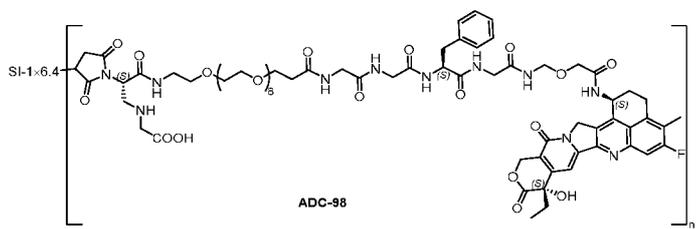
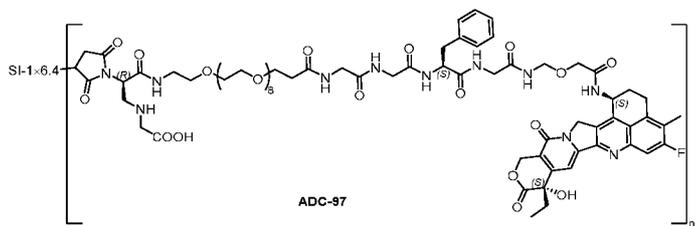
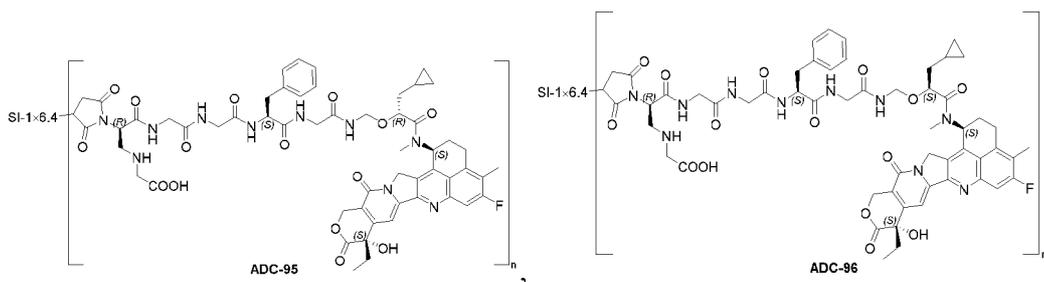


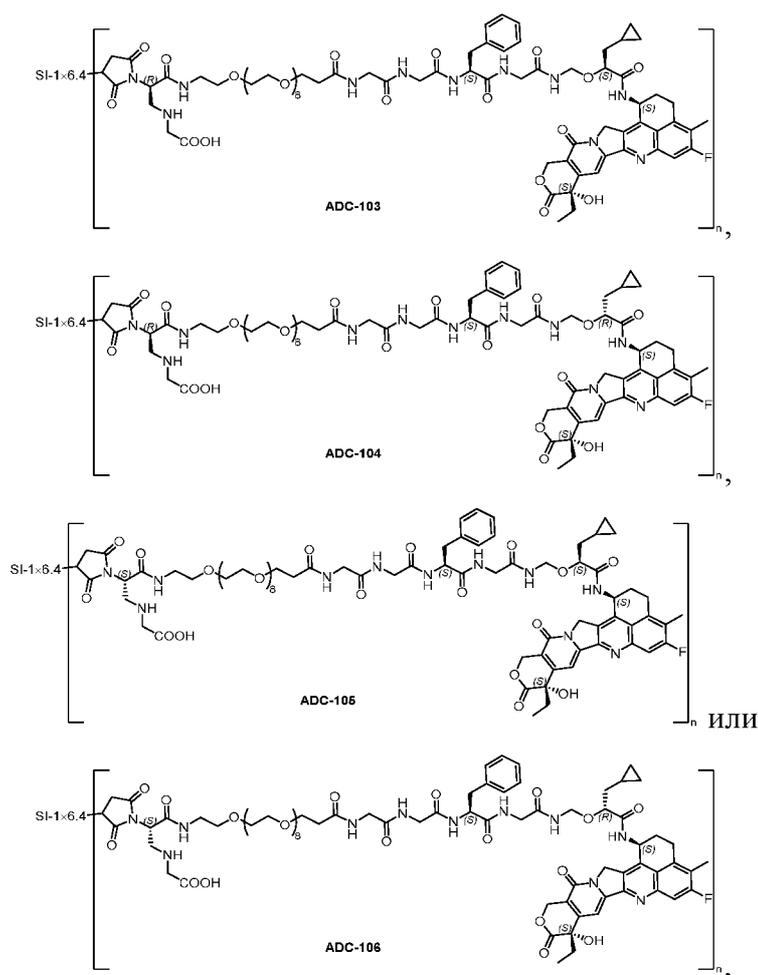










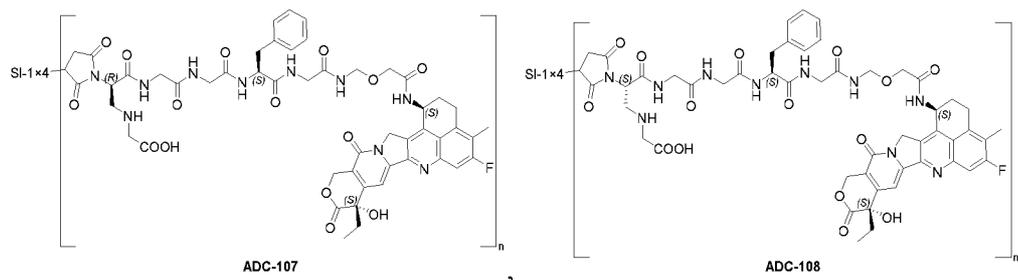


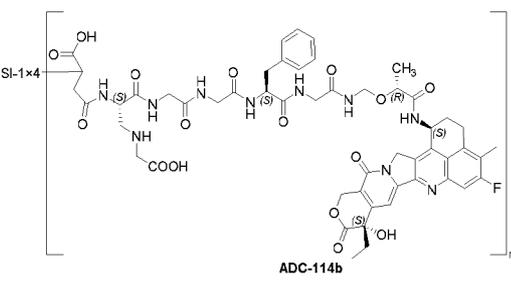
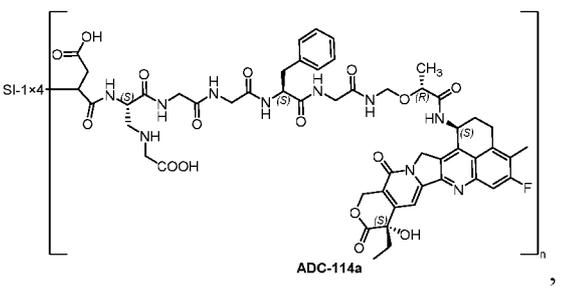
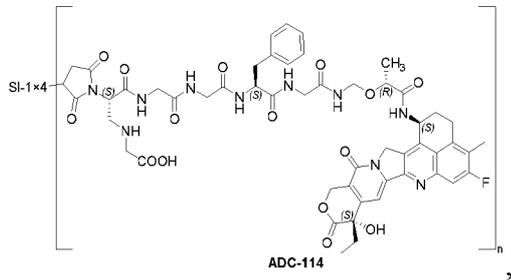
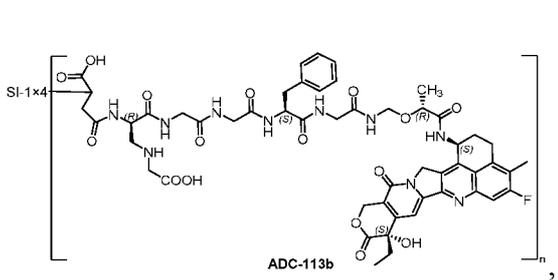
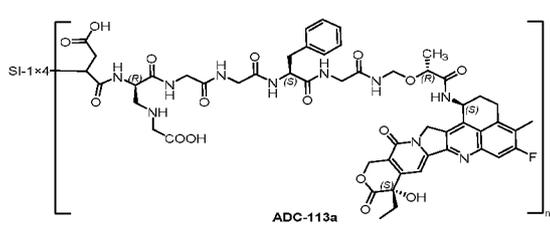
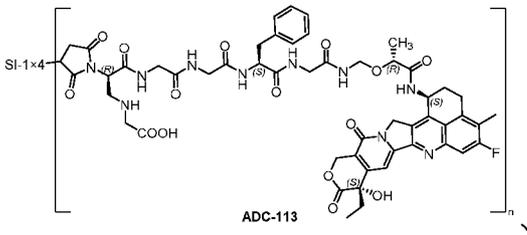
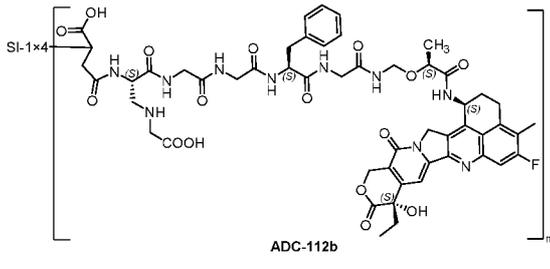
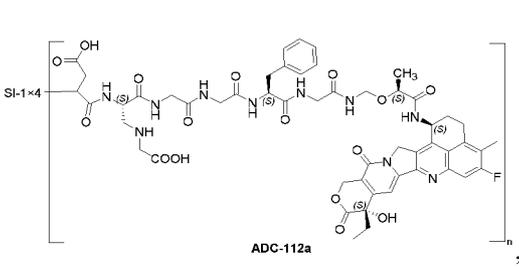
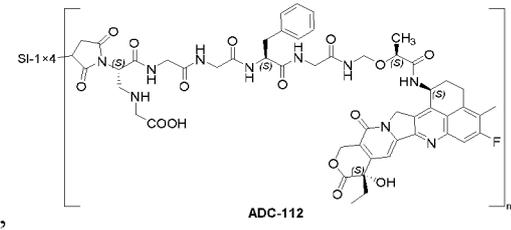
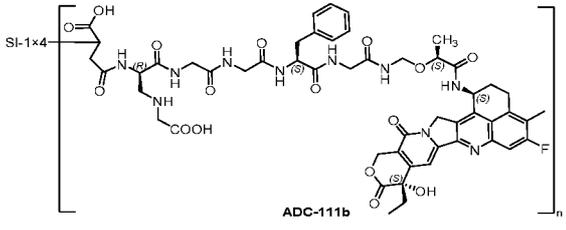
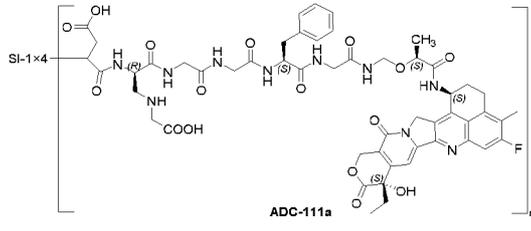
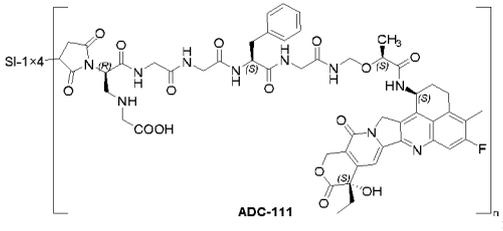
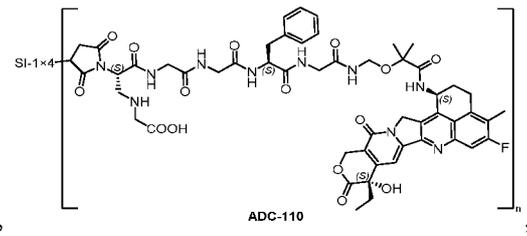
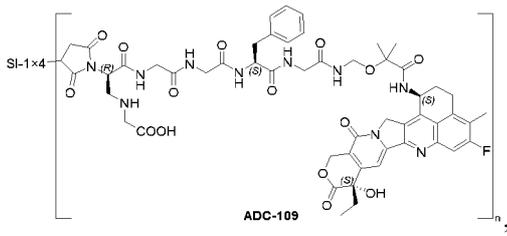
где

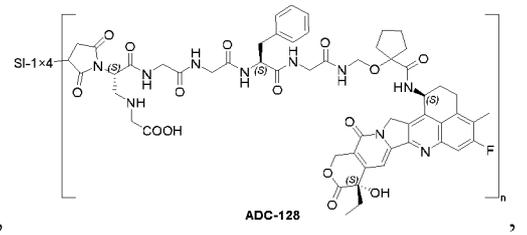
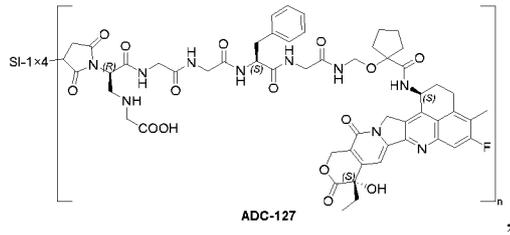
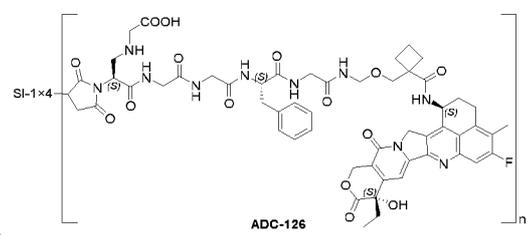
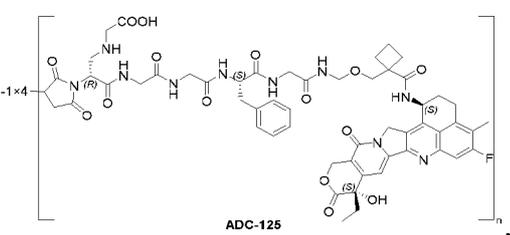
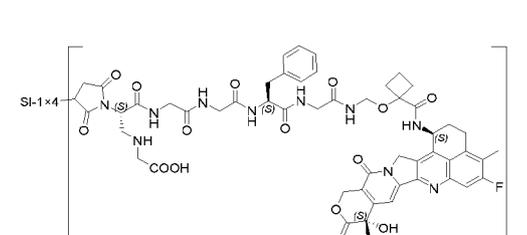
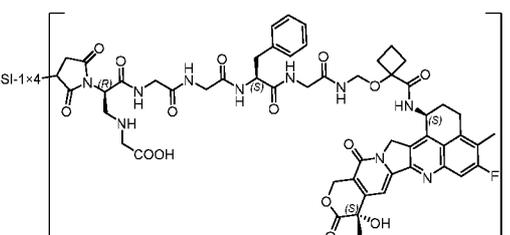
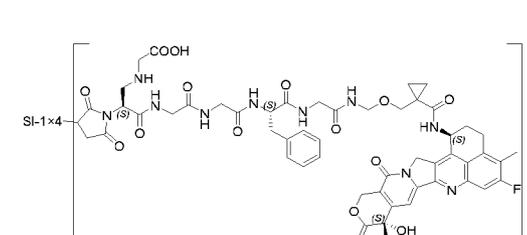
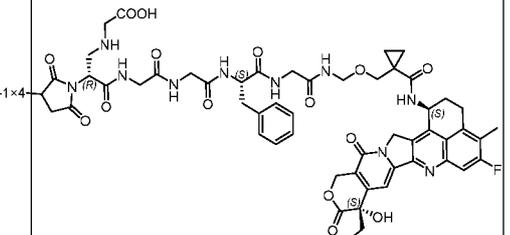
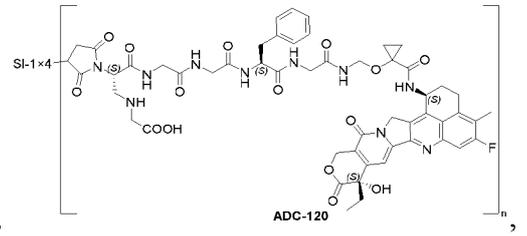
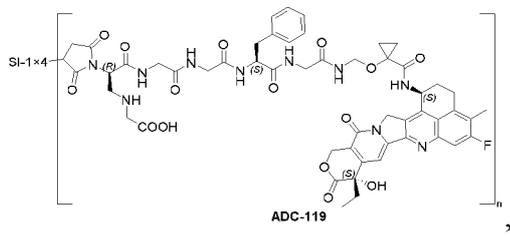
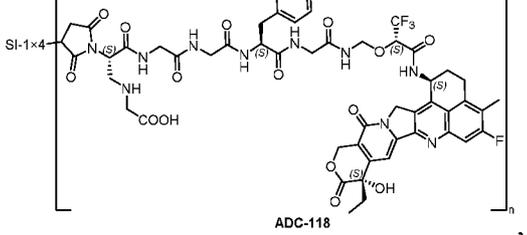
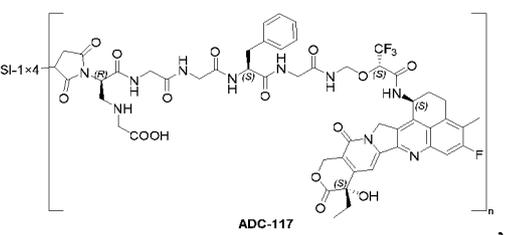
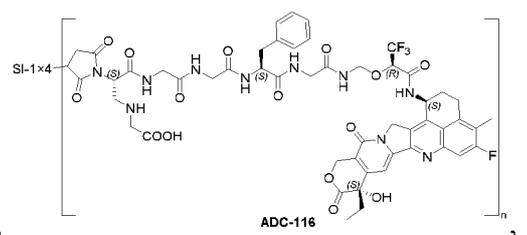
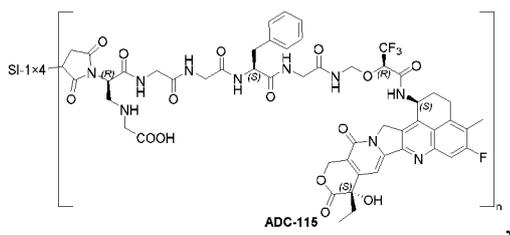
SI-1×6.4 представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, одновременно нацеливающиеся на EGFR и HER3;

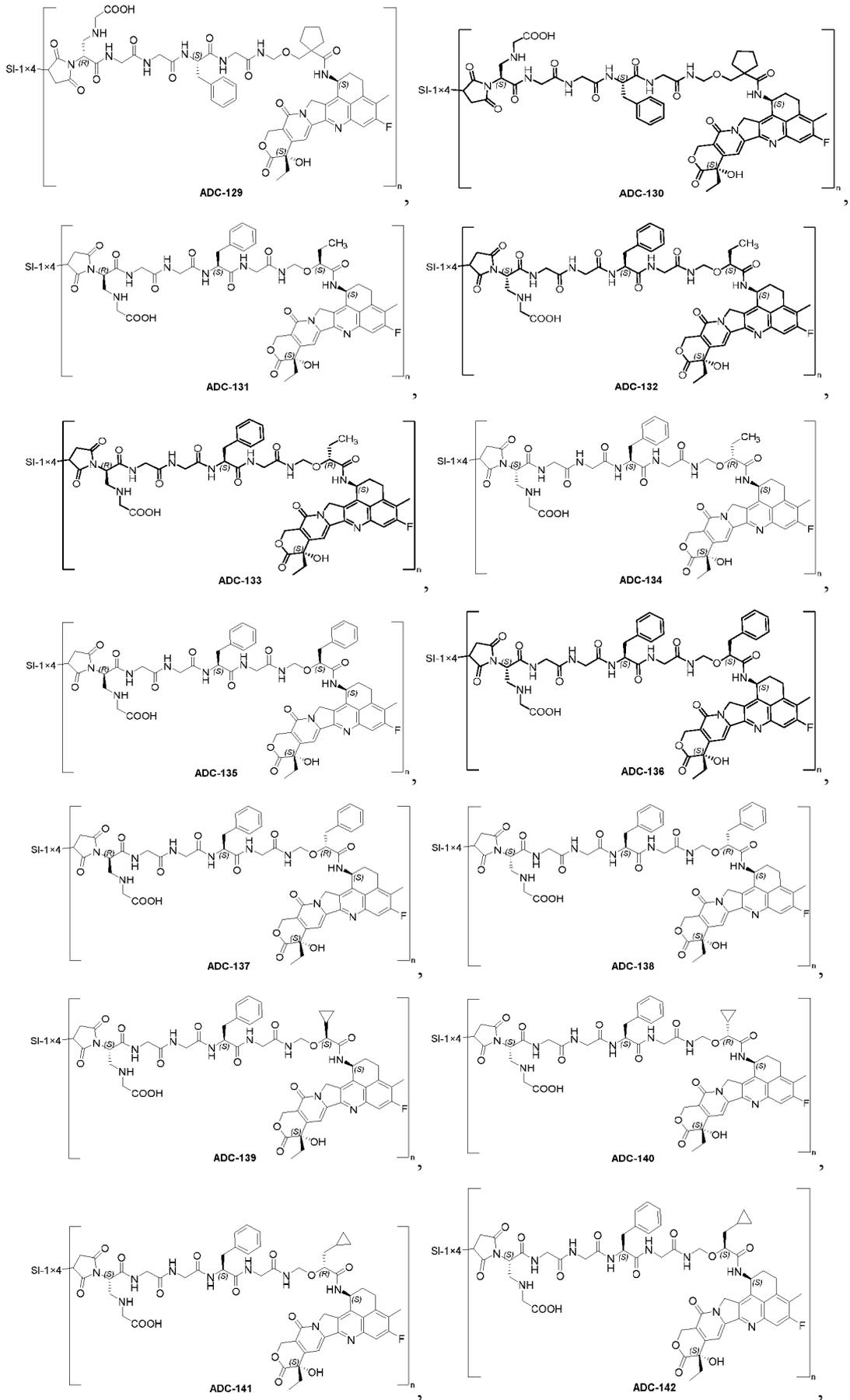
n выбран из целых чисел 1-10 (т. е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10).

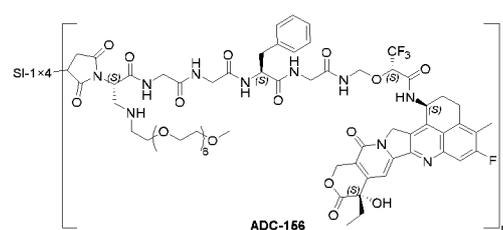
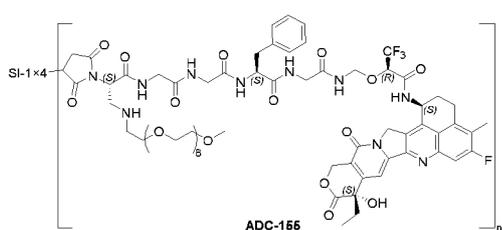
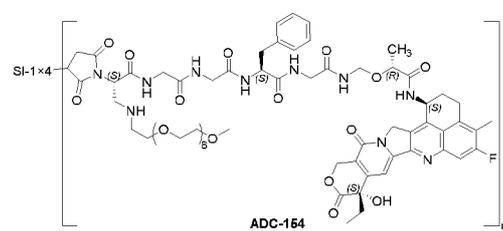
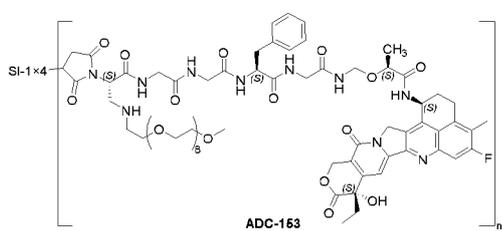
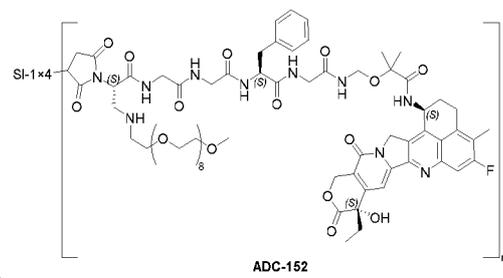
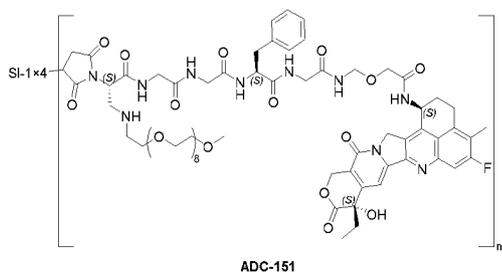
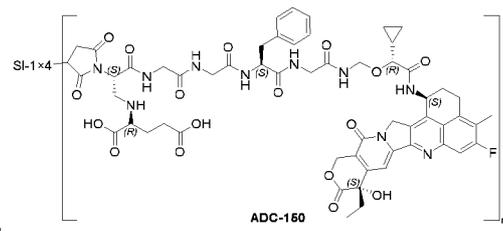
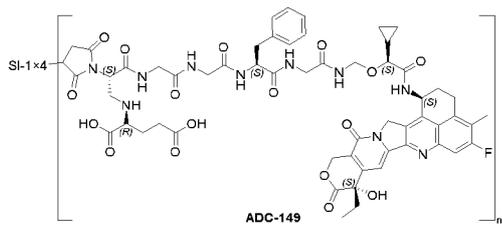
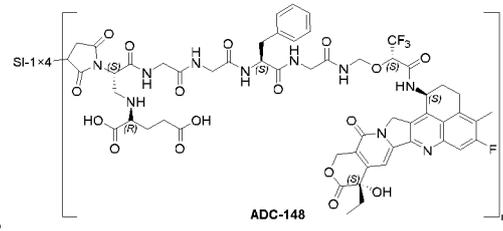
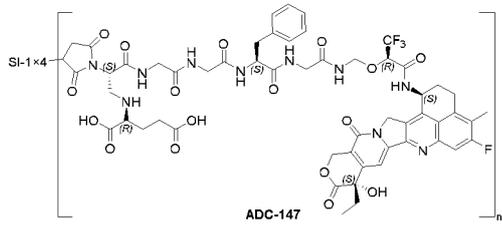
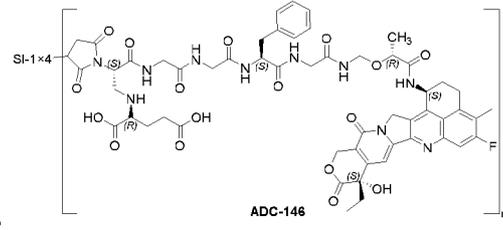
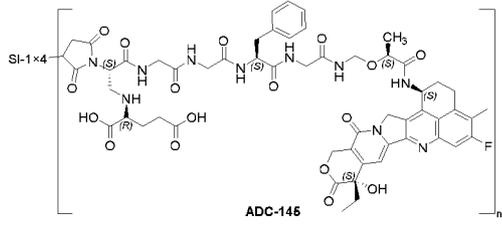
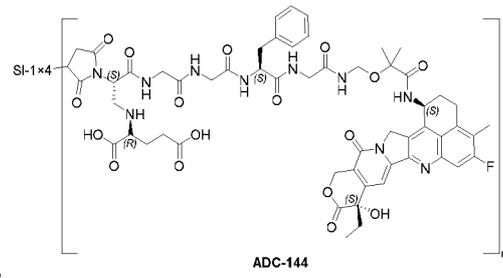
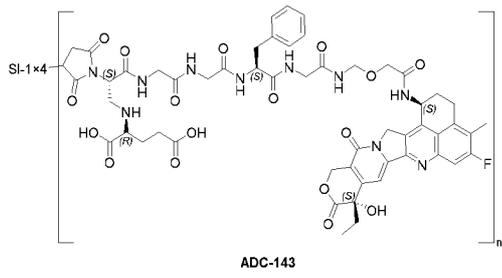
В некоторых вариантах осуществления первого аспекта, второго аспекта и четвертого аспекта настоящего изобретения раскрыты указанные конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где указанные конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват выбраны без ограничения из следующих структур, или структур с сукцинимидным открытым кольцом на их основе, или их изомеров,

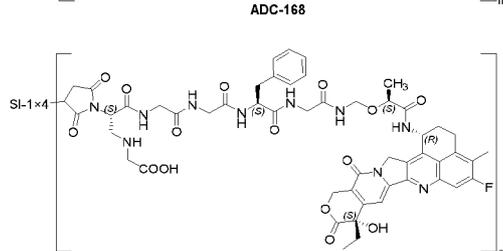
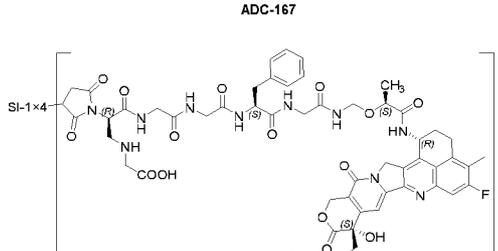
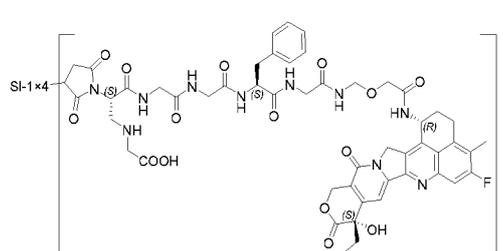
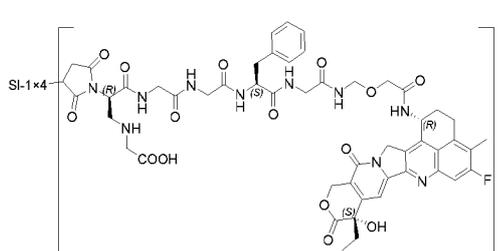
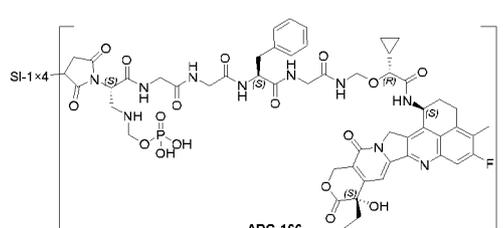
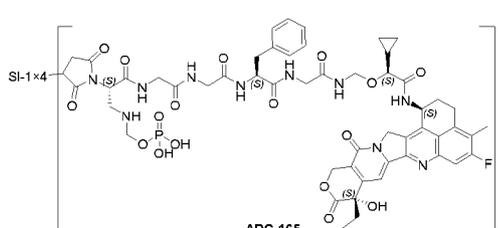
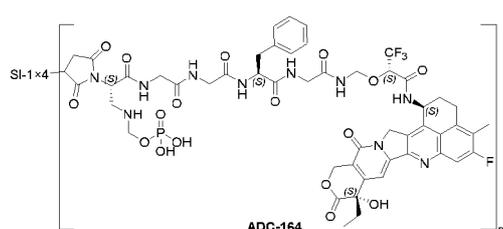
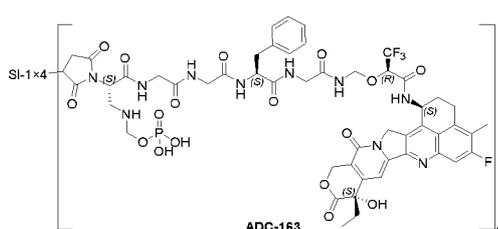
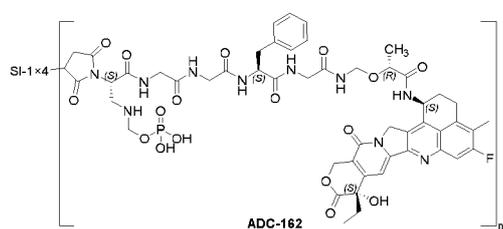
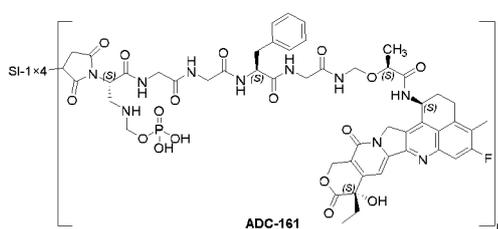
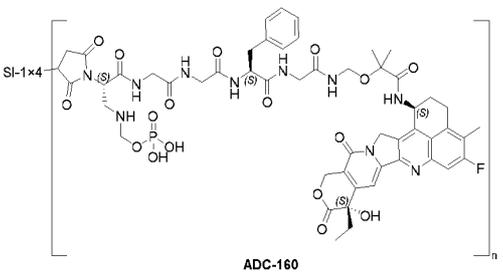
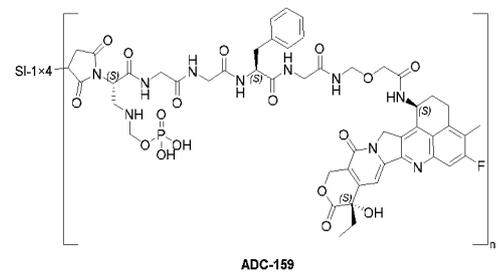
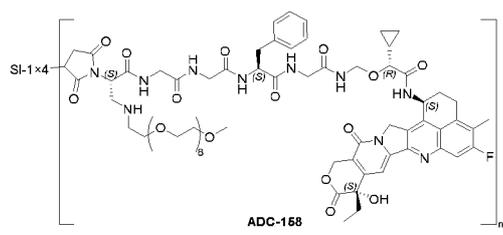
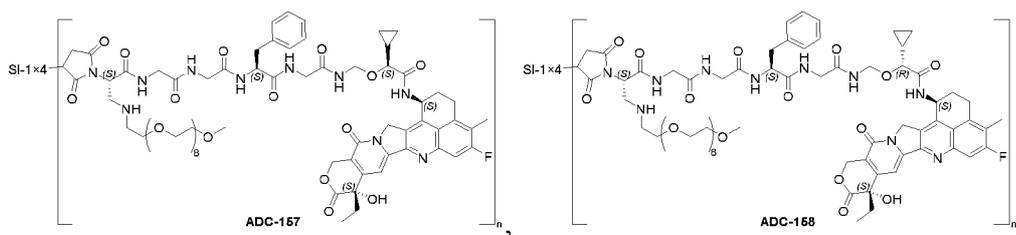


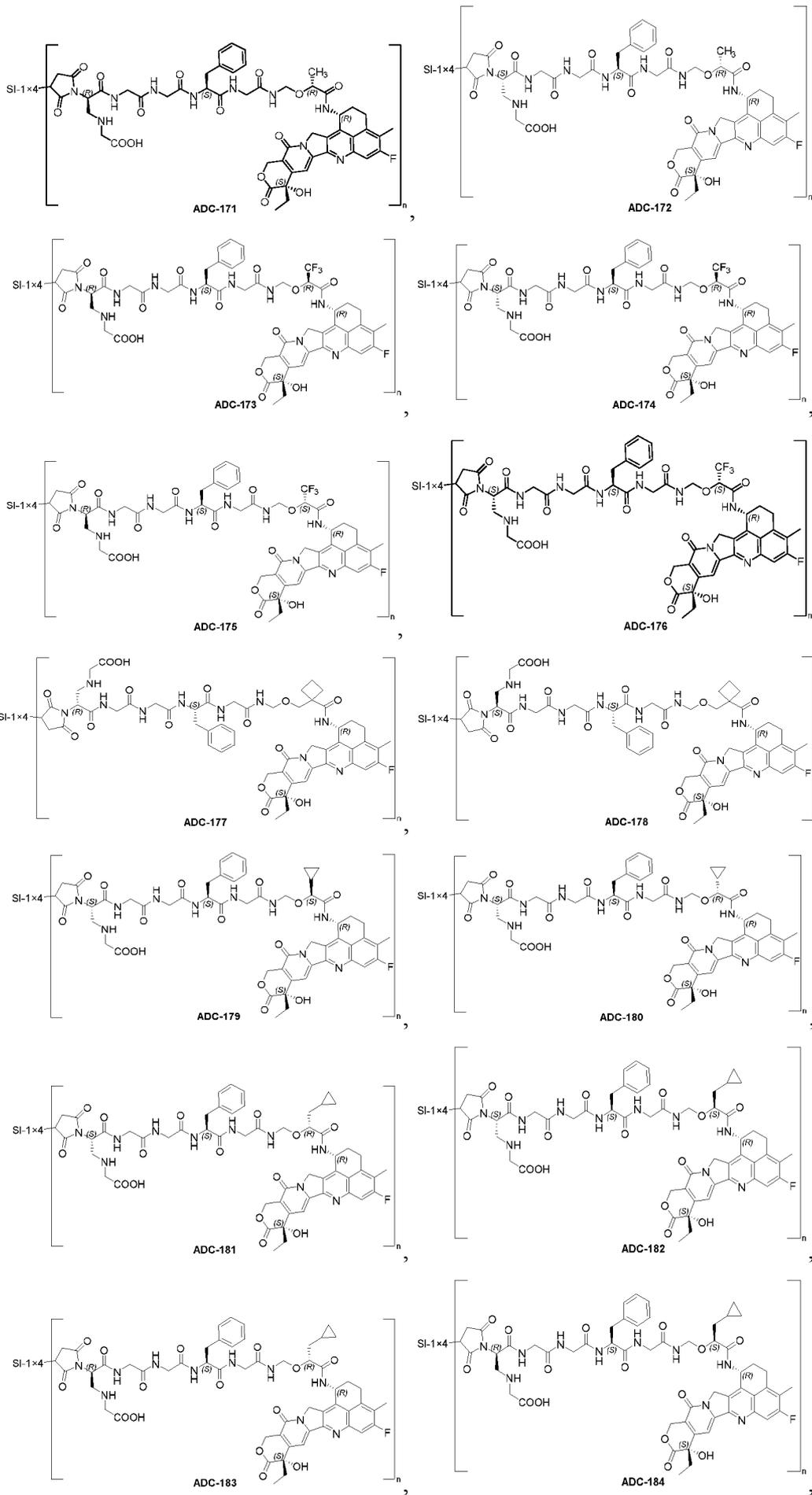


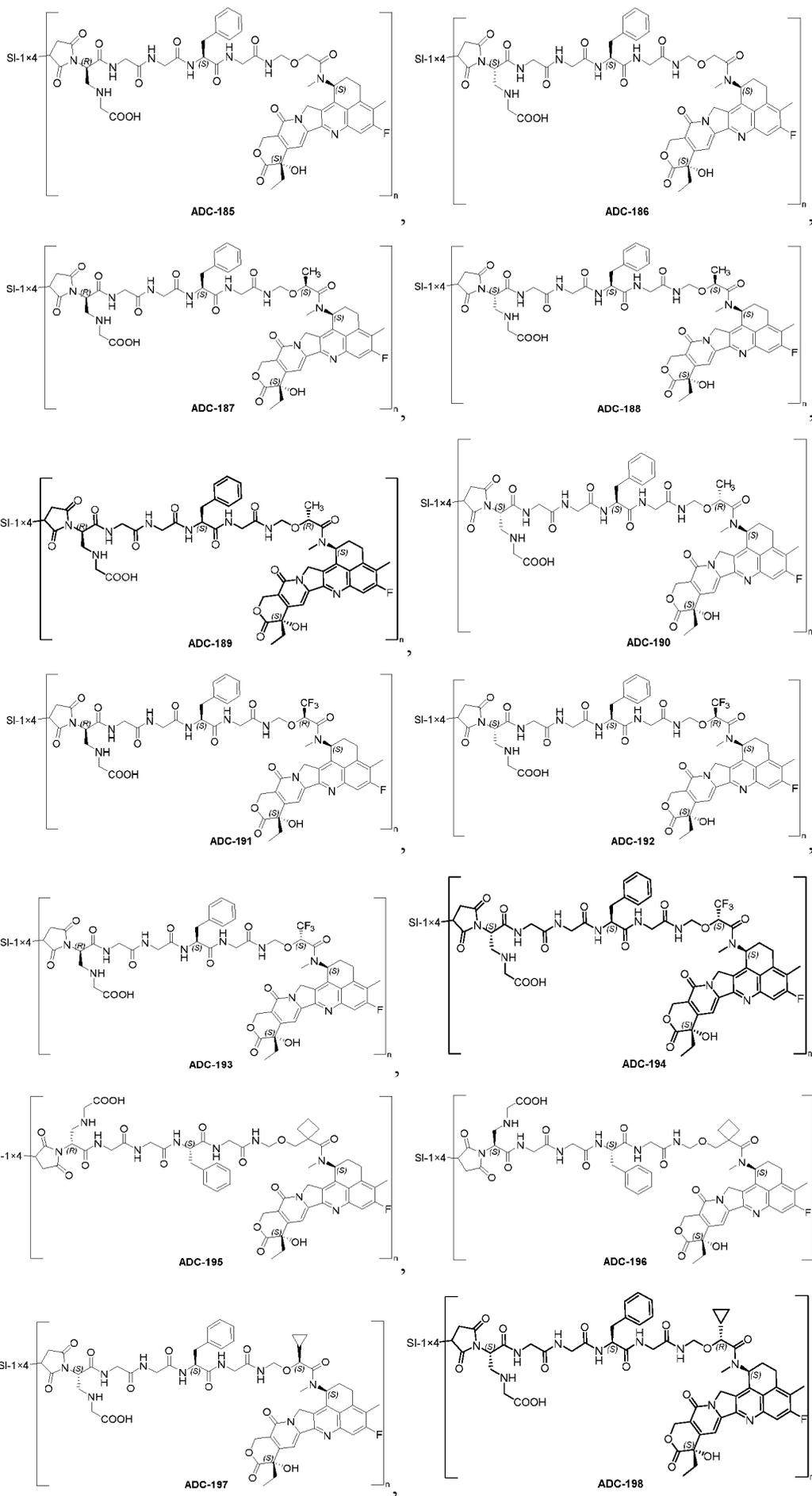


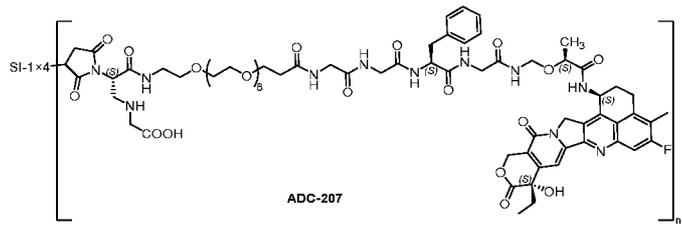
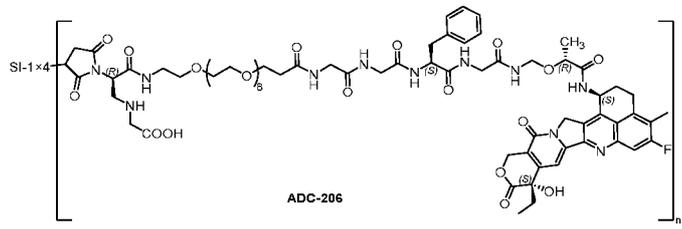
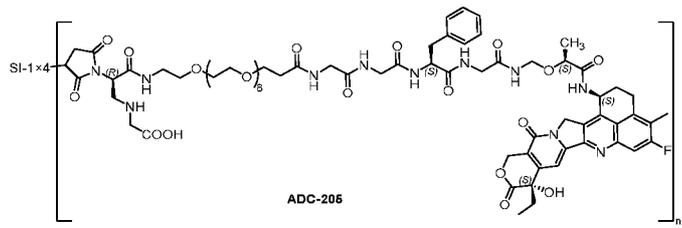
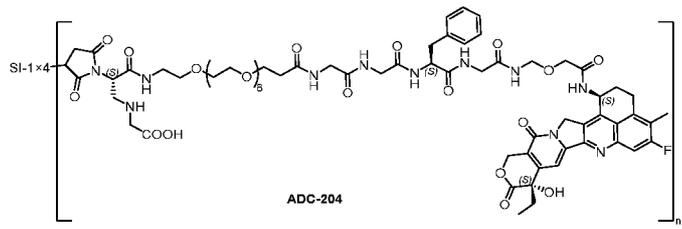
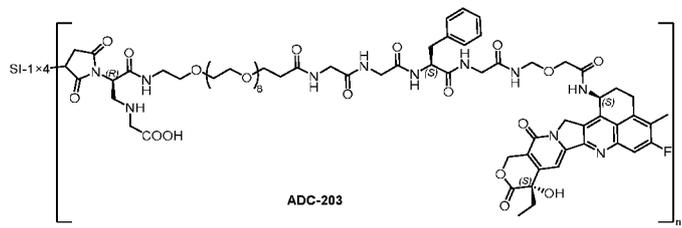
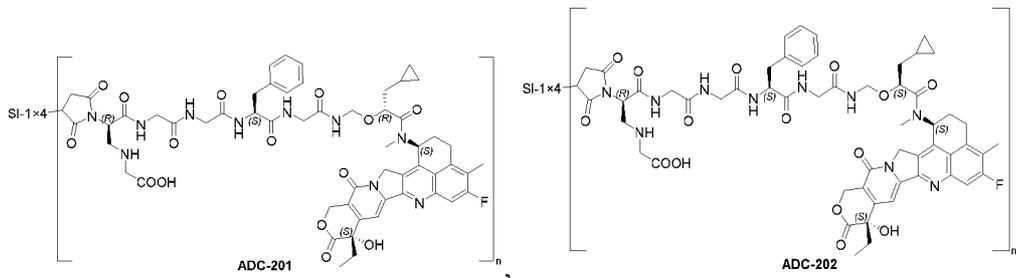
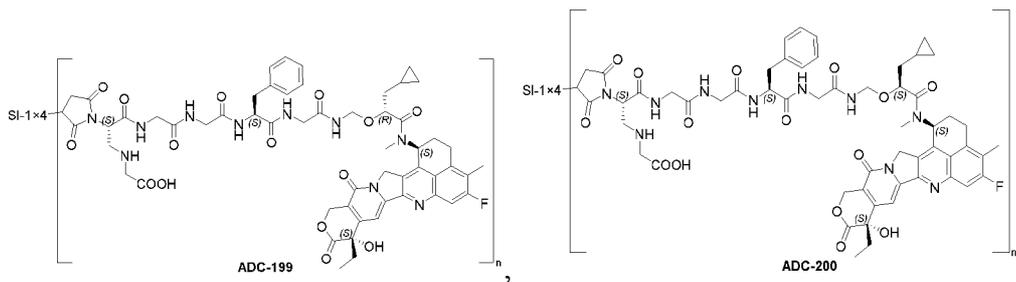


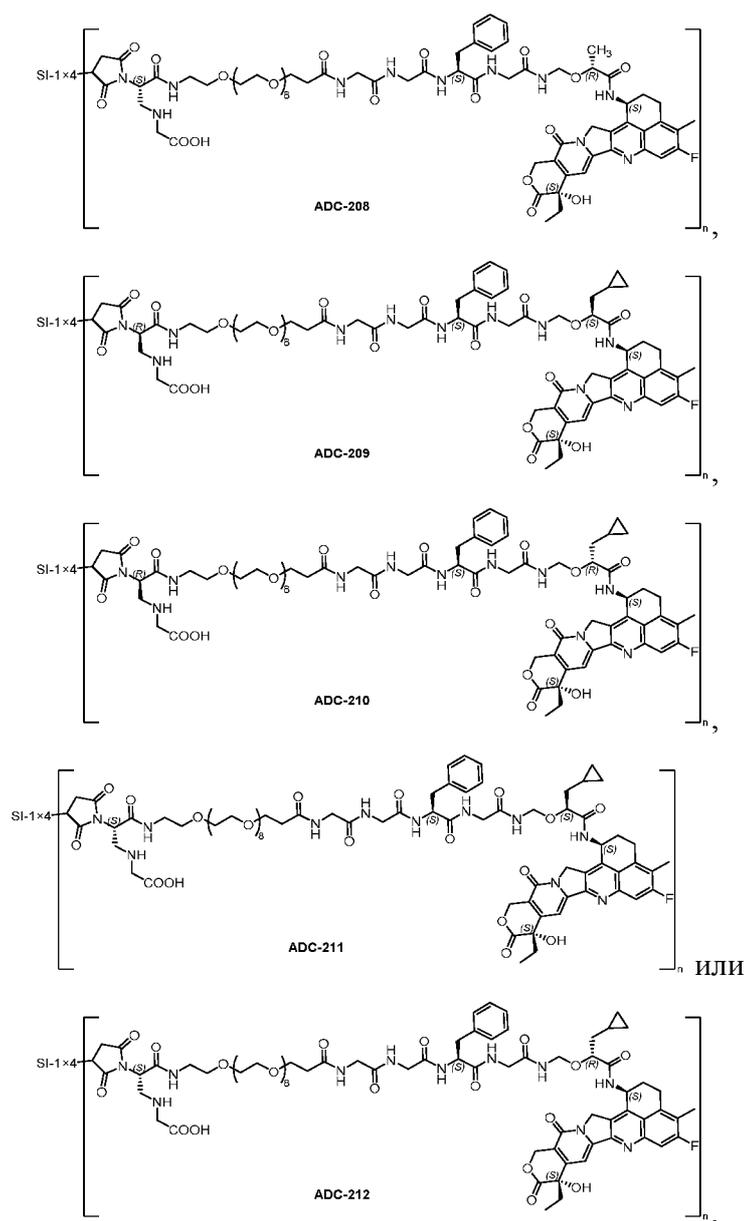










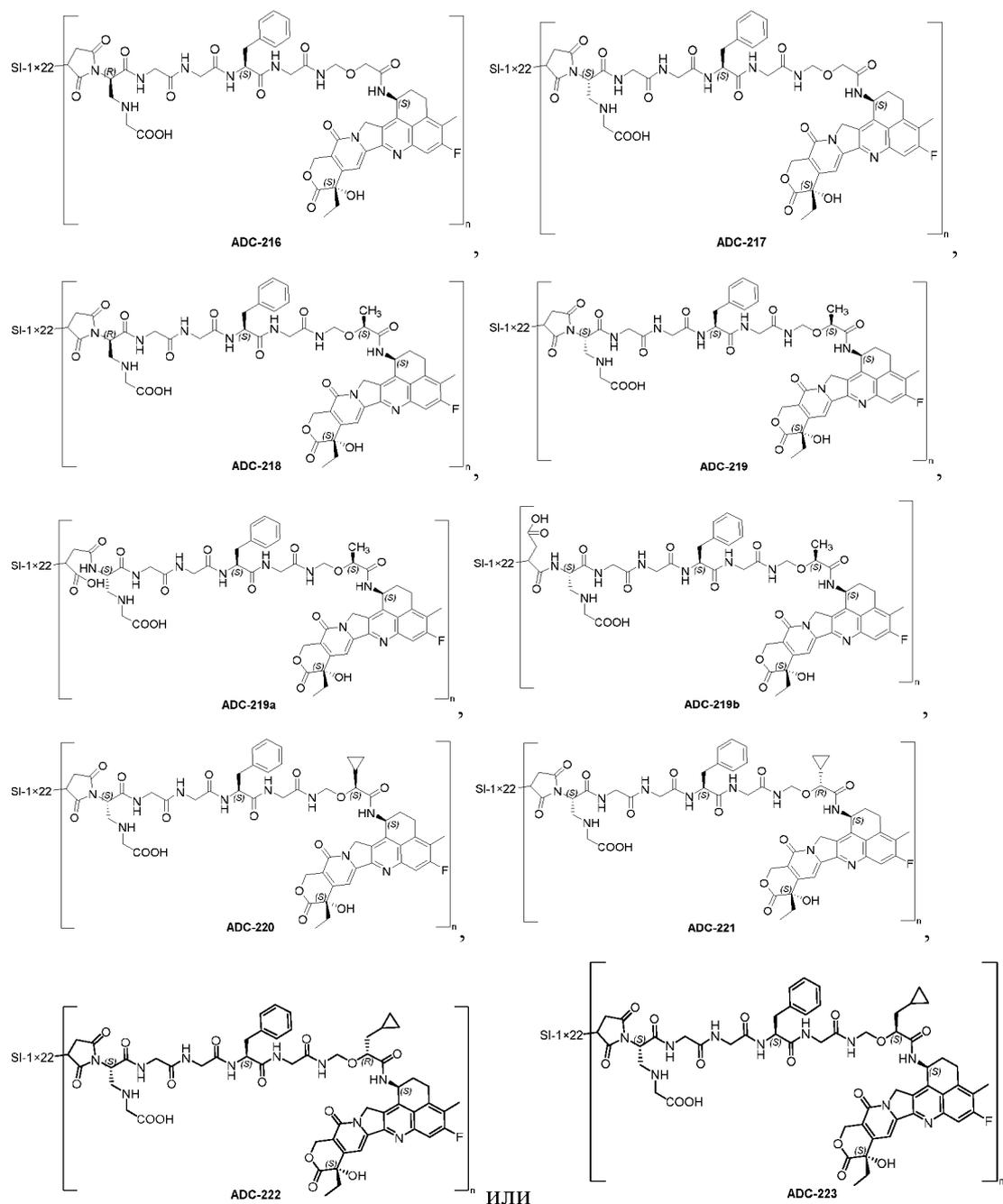


где

SI-1×4 представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, одновременно нацеливающиеся на EGFR и HER3;

n выбран из целых чисел 1-10 (т. е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10).

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта, второго аспекта и четвертого аспекта настоящего изобретения раскрыты указанные конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где указанные конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват выбраны без ограничения из следующих структур, или структур с сукцинимидным открытым кольцом на их основе, или их изомеров,

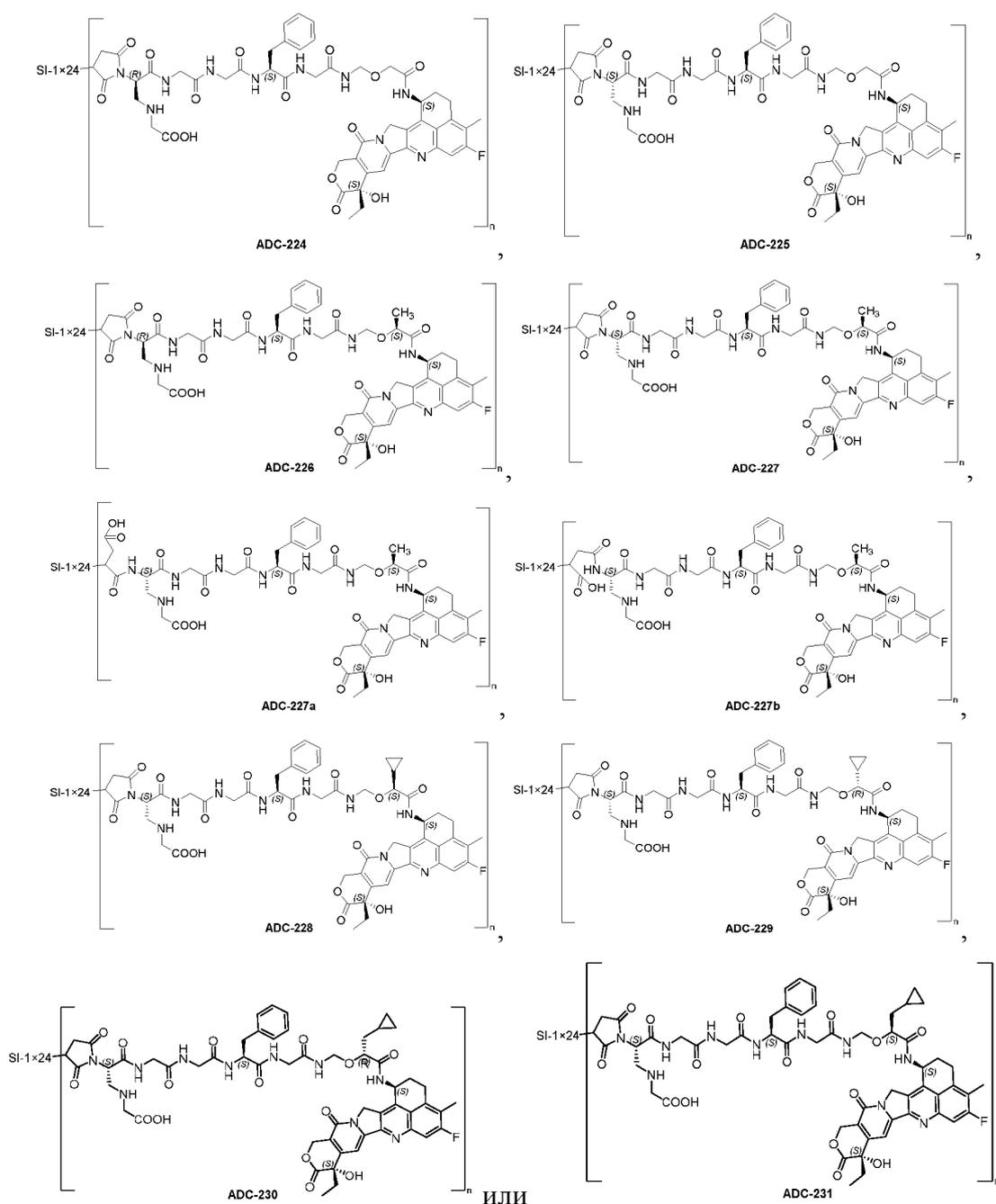


где

SI-1×22 представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, одновременно нацеливающиеся на EGFR и HER3;

n выбран из целых чисел 1-10 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10).

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта, второго аспекта и четвертого аспекта настоящего изобретения раскрыты указанные конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где указанные конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват выбраны без ограничения из следующих структур, или структур с сукцинимидным открытым кольцом на их основе, или их изомеров,

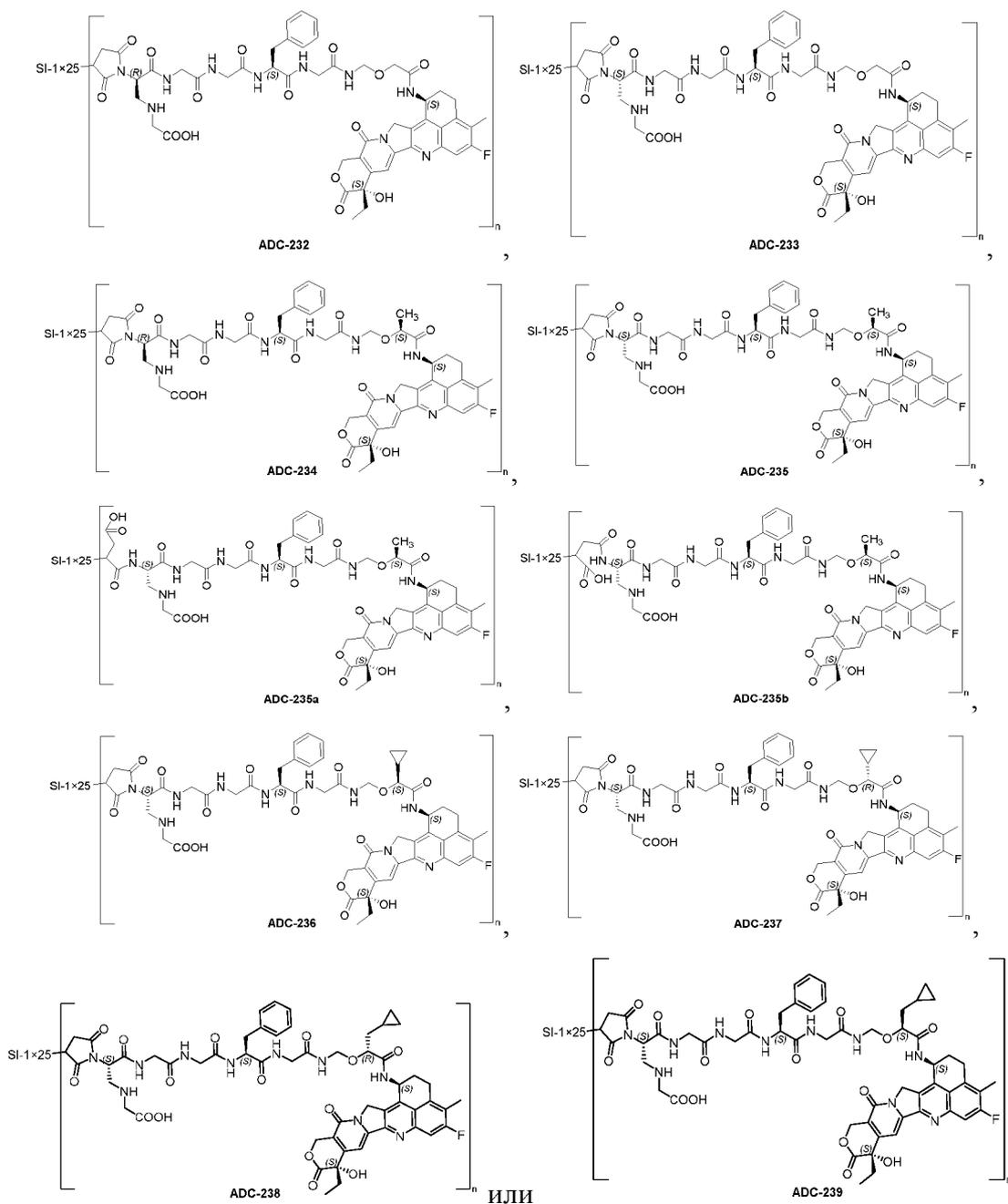


где

SI-1×24 представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, одновременно нацеливающиеся на EGFR и HER3;

n выбран из целых чисел 1-10 (т. е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10).

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта, второго аспекта и четвертого аспекта настоящего изобретения раскрыты указанные конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где указанные конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват выбраны без ограничения из следующих структур, или структур с сукцинимидным открытым кольцом на их основе, или их изомеров,

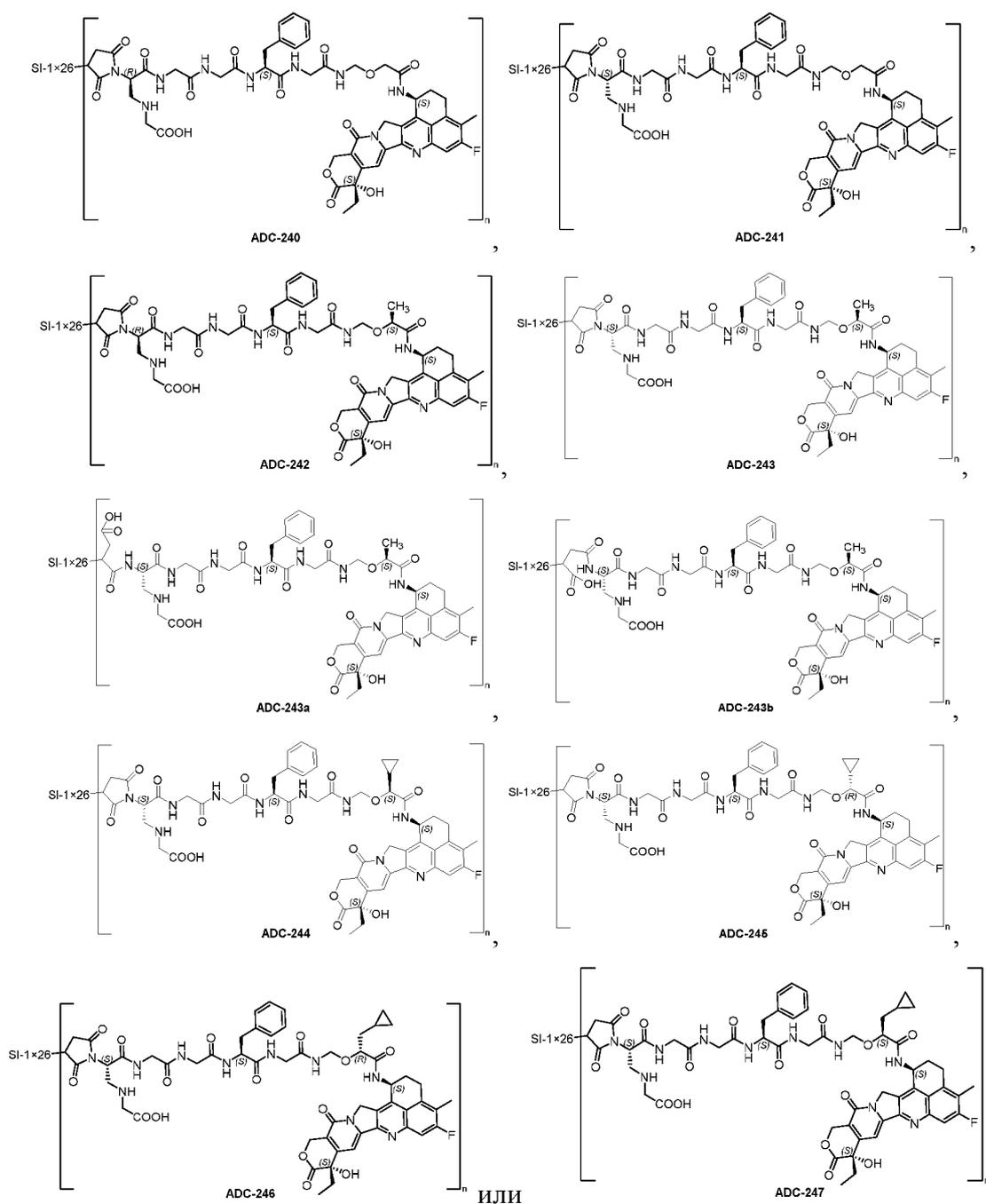


где

SI-1×25 представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, одновременно нацеливающиеся на EGFR и HER3;

n выбран из целых чисел 1-10 (т. е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10).

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта, второго аспекта и четвертого аспекта настоящего изобретения раскрыты указанные конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где указанные конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват выбраны без ограничения из следующих структур, или структур с сукцинимидным открытым кольцом на их основе, или их изомеров,



где

SI-1×26 представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, одновременно нацеливающиеся на EGFR и HER3;

n выбран из целых чисел 1-10 (т. е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10).

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта, второго аспекта и третьего аспекта настоящего изобретения раскрыты указанные конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, или соединение линкер-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где указанная фармацевтически приемлемая соль предусматривает соль натрия, соль калия, соль кальция или соль магния, образованные с кислотной функциональной группой

в структурной формуле, и ацетат, трифторацетат, цитрат, оксалат, тартрат, малат, нитрат, хлорид, бромид, йодид, сульфат, бисульфат, фосфат, лактат, олеат, аскорбат, салицилат, формиат, глутамат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат или п-толуолсульфонат, образованные с основной функциональной группой в структуре.

В пятом аспекте настоящего изобретения раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат лиганд-производное камптотецина, описанный в первом аспекте и во втором аспекте, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, или соединение линкер-лекарственное средство, описанное в третьем аспекте, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

В шестом аспекте настоящего изобретения раскрыт фармацевтический препарат, содержащий конъюгат лиганд-производное камптотецина, описанный в первом аспекте и во втором аспекте, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, или соединение линкер-лекарственное средство, описанное в третьем аспекте, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват.

В седьмом аспекте настоящего изобретения раскрыто применение следующего при получении лекарственных средств для лечения или предупреждения видов рака или опухолей: конъюгаты лиганд-производное камптотецина, описанные в первом аспекте и во втором аспекте, или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, или соединения линкер-лекарственное средство, описанные в третьем аспекте, или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, или фармацевтические композиции, описанные в пятом аспекте, и/или фармацевтические препараты, описанные в шестом аспекте;

в качестве альтернативы применение следующего при лечении или предупреждении рака или опухолей: конъюгаты лиганд-производное камптотецина, описанные в первом аспекте и во втором аспекте, или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, или соединения линкер-лекарственное средство, описанные в третьем аспекте, или их фармацевтически приемлемые соли или сольваты, или фармацевтические композиции, описанные в пятом аспекте, и/или фармацевтические препараты, описанные в шестом аспекте;

предпочтительно при раке или опухоли экспрессируются EGFR и/или HER3;

более предпочтительно рак или опухоль выбраны из аденокарциномы, рака яичника, рака шейки матки, рака матки, рака предстательной железы, рака почки, рака уретры, рака мочевого пузыря, рака печени, рака желудка, рака эндометрия, рака слюнной железы, рака пищевода, рака легкого, рака толстой кишки, ректального рака, колоректального рака, рака

кости, рака кожи, рака щитовидной железы, рака поджелудочной железы, меланомы, глиомы, нейробластомы, мультиформной глиобластомы, саркомы, лимфомы и лейкоза, а также других солидных опухолей или гемобластозов.

В восьмом аспекте настоящего изобретения раскрыт способ лечения или предупреждения рака или опухолей, причем способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, профилактически или терапевтически эффективного количества конъюгата лиганд-производное камптотецина, описанного в первом или втором аспекте, или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата, или соединения линкер-лекарственное средство, описанного в третьем аспекте, или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата, или фармацевтической композиции, описанной в пятом аспекте, и/или фармацевтического препарата, описанного в шестом аспекте;

предпочтительно при раке или опухоли экспрессируются EGFR и/или HER3;

более предпочтительно рак или опухоль выбраны из аденокарциномы, рака яичника, рака шейки матки, рака матки, рака предстательной железы, рака почки, рака уретры, рака мочевого пузыря, рака печени, рака желудка, рака эндометрия, рака слюнной железы, рака пищевода, рака легкого, рака толстой кишки, ректального рака, колоректального рака, рака кости, рака кожи, рака щитовидной железы, рака поджелудочной железы, меланомы, глиомы, нейробластомы, мультиформной глиобластомы, саркомы, лимфомы и лейкоза, а также других солидных опухолей или гемобластозов.

В вышеуказанных аспектах настоящего изобретения и их вариантах осуществления:

"С1-Сбалкил" и "С1-Сбалкил" в различных составных группах с участием "С1-Сбалкила" (например, "замещенный С1-Сбалкил", "дейтерированный С1-Сбалкил") может быть заменен на "С1-С20алкил", "С1-С12алкил" или "С1-С10алкил";

"С3-С8циклоалкил" и "С3-С8циклоалкил" в различных составных группах с участием "С3-С8циклоалкила" может быть заменен на "С3-С20циклоалкил" или "С3-С10циклоалкил";

"С1-Сбалкоксии" и "С1-Сбалкоксии" в различных составных группах с его участием может быть заменен на "С1-С20алкоксии", "С1-С12алкоксии" или "С1-С10алкоксии";

"С6-С10арил" и "С6-С10арил" в различных составных группах с его участием может быть заменен на "С6-С12арил";

"3-7-членная гетероциклическая группа" и "3-7-членная гетероциклическая группа" в различных составных группах с ее участием может быть заменена на "3-20-членную гетероциклическую группу", "3-12-членную гетероциклическую группу" или "3-10-членную гетероциклическую группу".

### Благоприятные эффекты

Конъюгат биспецифическое антитело к EGFR/HER3-лекарственное средство, представленный в настоящем изобретении, представляет собой ADC на основе биспецифического антитела, направленный против обеих мишеней EGFR/HER3, с надлежащей молекулярной стабильностью и надлежащей доклинической эффективностью и, как ожидается, обладающий превосходными клиническими терапевтическими эффектами.

### Описание графических материалов

На фиг. 1A проиллюстрировано обнаружение/измерение агрегации ADC-5 посредством SEC-HPLC.

На фиг. 1B проиллюстрировано обнаружение/измерение агрегации ADC-6 посредством SEC-HPLC.

На фиг. 1C проиллюстрировано обнаружение/измерение агрегации ADC-64 посредством SEC-HPLC.

На фиг. 1D проиллюстрировано обнаружение/измерение агрегации ADC-DS посредством SEC-HPLC.

На фиг. 1E проиллюстрировано обнаружение/измерение агрегации ADC-108 посредством SEC-HPLC.

На фиг. 1F проиллюстрировано обнаружение/измерение агрегации ADC-112 посредством SEC-HPLC.

На фиг. 1G проиллюстрировано обнаружение/измерение агрегации ADC-215 посредством SEC-HPLC.

На фиг. 1H проиллюстрировано обнаружение/измерение агрегации ADC-219 посредством SEC-HPLC.

На фиг. 1I проиллюстрировано обнаружение/измерение агрегации ADC-227 посредством SEC-HPLC.

На фиг. 1J проиллюстрировано обнаружение/измерение агрегации ADC-235 посредством SEC-HPLC.

На фиг. 2A проиллюстрировано обнаружение/измерение коэффициента сочетания лекарственное средство-антитело (DAR) в ADC-5 посредством RP-HPLC.

На фиг. 2B проиллюстрировано обнаружение/измерение коэффициента сочетания лекарственное средство-антитело (DAR) в ADC-6 посредством RP-HPLC.

На фиг. 2C проиллюстрировано обнаружение/измерение коэффициента сочетания

лекарственное средство-антитело (DAR) в ADC-10 посредством RP-HPLC.

На фиг. 2D проиллюстрировано обнаружение/измерение коэффициента сочетания лекарственное средство-антитело (DAR) в ADC-12 посредством RP-HPLC.

На фиг. 2E проиллюстрировано обнаружение/измерение коэффициента сочетания лекарственное средство-антитело (DAR) в ADC-64 посредством RP-HPLC.

На фиг. 2F проиллюстрировано обнаружение/измерение коэффициента сочетания лекарственное средство-антитело (DAR) в ADC-108 посредством RP-HPLC.

На фиг. 2G проиллюстрировано обнаружение/измерение коэффициента сочетания лекарственное средство-антитело (DAR) в ADC-112 посредством RP-HPLC.

На фиг. 2H проиллюстрировано обнаружение/измерение коэффициента сочетания лекарственное средство-антитело (DAR) в ADC-215 посредством RP-HPLC.

На фиг. 2I проиллюстрировано обнаружение/измерение коэффициента сочетания лекарственное средство-антитело (DAR) в ADC-219 посредством RP-HPLC.

На фиг. 2J проиллюстрировано обнаружение/измерение коэффициента сочетания лекарственное средство-антитело (DAR) в ADC-227 посредством RP-HPLC.

На фиг. 2K проиллюстрировано обнаружение/измерение коэффициента сочетания лекарственное средство-антитело (DAR) в ADC-235 посредством RP-HPLC.

На фиг. 2L проиллюстрировано обнаружение/измерение коэффициента сочетания лекарственное средство-антитело (DAR) в ADC-243 посредством RP-HPLC.

На фиг. 3A проиллюстрировано, что ADC-112 и антитело SI-1×4 сохраняют аффинность в отношении обоих антигенов EGFR и HER3-Fc.

На фиг. 3B проиллюстрировано, что ADC-6 и антитело SI-1×6.4 сохраняют аффинность в отношении обоих антигенов EGFR и HER3-Fc.

На фиг. 3C проиллюстрировано, что ADC-219 и антитело SI-1×22 сохраняют аффинность в отношении обоих антигенов EGFR и HER3-Fc.

На фиг. 3D проиллюстрировано, что ADC-227 и антитело SI-1×24 сохраняют аффинность в отношении обоих антигенов EGFR и HER3-Fc.

На фиг. 3E проиллюстрировано, что ADC-235 и антитело SI-1×25 сохраняют аффинность в отношении обоих антигенов EGFR и HER3-Fc.

На фиг. 3F проиллюстрировано, что ADC-243 и антитело SI-1×26 сохраняют аффинность в отношении обоих антигенов EGFR и HER3-Fc.

На фиг. 4A проиллюстрирована *in vitro* эффективность шести свободных антител, а также шести ADC в отношении A431.

На фиг. 4B проиллюстрирована *in vitro* эффективность шести свободных антител, а

также шести ADC в отношении VXPC-3.

На фиг. 4C проиллюстрирована *in vitro* эффективность шести свободных антител, а также шести ADC в отношении FaDu.

На фиг. 4D проиллюстрирована *in vitro* эффективность шести свободных антител, а также шести ADC в отношении HARA-B.

На фиг. 4E проиллюстрирована *in vitro* эффективность шести свободных антител, а также шести ADC в отношении HCC827.

На фиг. 4F проиллюстрирована *in vitro* эффективность шести свободных антител, а также шести ADC в отношении SW620.

На фиг. 5A проиллюстрированы результаты экспериментов по определению *in vivo* эффективности ADC-6 и свободного антитела SI-1×6.4 на модели одиночной опухоли A431.

На фиг. 5B проиллюстрированы результаты экспериментов по определению *in vivo* эффективности ADC-6, свободного антитела SI-1×6.4, цетуксимаба (Cet) и ADC-214 на модели одиночной опухоли SW620.

На фиг. 5C проиллюстрированы результаты экспериментов по определению *in vivo* эффективности ADC-6 и свободного антитела SI-1×6.4 на гетерогенных опухолях A431+SW620.

На фиг. 6A проиллюстрированы результаты экспериментов по определению *in vivo* эффективности ADC-6, ADC-219, ADC-235, ADC-227 и ADC-112 на модели одиночной опухоли A431.

На фиг. 6B проиллюстрированы результаты экспериментов по определению *in vivo* эффективности ADC-6, ADC-219, ADC-235, ADC-227 и ADC-112 на модели одиночной опухоли VXPC-3.

На фиг. 7A проиллюстрирована *in vitro* эффективность SI-1×6.4, цетуксимаба, ADC-6, ADC-214 и d3 на клеточной линии Ока-с-1 низкодифференцированного рака легкого человека, представляющего собой плоскоклеточную карциному.

На фиг. 7B проиллюстрирована *in vitro* эффективность SI-1×6.4, цетуксимаба, ADC-6, ADC-214 и d3 на клетках SK-MES-1 плоскоклеточной карциномы легкого человека.

Конкретные варианты осуществления  
Аббревиатуры и определения

Если не указано иное, подразумевается, что следующие термины и фразы, применяемые в данном документе, имеют значения, изложенные ниже. Когда в данном документе используется торговое наименование, если контекст не указывает на иное,

торговое наименование включает формулу продукта, лекарственное средство-дженерик и активный ингредиент указанного продукта под торговым наименованием.

Если не утверждается противоположное, термины, применяемые в формуле изобретения и описании в данном документе имеют значения, изложенные ниже.

Термин "лиганд" относится к макромолекулярному соединению, которое способно распознавать и связываться с антигеном или рецептором, ассоциированными с клеткой-мишенью. Лиганд служит для презентирования лекарственного средства популяции клеток-мишеней, связанных с лигандом; эти лиганды включают без ограничения белок-подобные гормоны, лектины, факторы роста, антитела или другие молекулы, способные к связыванию с клетками. В вариантах осуществления настоящего изобретения лиганд обозначен как Ab, и лиганд может образовать соединяющую связь с соединяющим звеном посредством гетероатома на лиганде, и предпочтительно представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело выбрано из химерных, гуманизированных, полностью человеческих или мышиных антител; предпочтительно моноклональных антител.

Лигандное звено является нацеливающим средством, которое специфически связывается с частью-мишенью. Указанный лиганд способен к специфическому связыванию с клеточным компонентом, или связыванию с клеточным компонентом, или связыванию с другими молекулами-мишенями, представляющими интерес. Часть-мишень или мишень, как правило, находится на поверхности клетки. В некоторых аспектах лигандное звено служит для доставки звена, представляющего собой лекарственное средство, к популяции специфических клеток-мишеней, с которыми взаимодействует лигандное звено. Лиганды включают без ограничения белки, полипептиды и пептиды, а также небелковые молекулы, такие как сахара. Подходящие лигандные звенья включают, например, антитела, такие как полноразмерные (интактные) антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. В вариантах осуществления, где лигандное звено представляет собой отличный от антитела нацеливающий реагент, оно может представлять собой пептид, или полипептид, или небелковую молекулу. Примеры таких нацеливающих реагентов включают интерфероны, лимфокины, гормоны, факторы роста и колониестимулирующие факторы, витамины, молекулы-транспортеры питательных веществ или любые другие молекулу или вещество, связывающие клетки. В некоторых вариантах осуществления линкер ковалентно присоединен к атому серы лиганда. В некоторых аспектах атом серы представляет собой атом серы цистеинового остатка и образует межцепочечную дисульфидную связь антитела. В другом аспекте атом серы

представляет собой атом серы цистеинового остатка, который был введен в лигандное звено и образует межцепочечную дисульфидную связь антитела. В другом аспекте атом серы представляет собой атом серы цистеинового остатка, который был введен в лигандное звено (например, посредством сайт-направленного мутагенеза или химической реакции). В других аспектах связанный с линкером атом серы выбран из цистеинового остатка, который образует межцепочечную дисульфидную связь антитела, или цистеинового остатка, который был введен в лигандное звено (например, посредством сайт-направленного мутагенеза или химической реакции). В некоторых вариантах осуществления система нумерации приведена в соответствии с EU-индексом в Kabat {[Kabat E.A et al, (1991)] "Sequences of proteins of Immunological Interest", пятое издание, публикация NIH 91-3242}.

Применяемые в данном документе термины "антитело" или "звено, представляющее собой антитело" включают в той или иной степени любую часть структуры антитела. Данное звено способно связываться, реактивно ассоциировать или образовывать комплекс с рецептором, антигеном или другим рецепторным звеном, которыми обладает популяция клеток-мишеней. Антитело может представлять собой любой белок или белок-подобную молекулу, и оно способно связываться, образовывать комплекс или взаимодействовать с частью популяции клеток, подлежащих обработке или биологически модифицированных. Антитела, образующие конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, сохраняют свою исходную антигенсвязывающую способность состояния дикого типа. Таким образом, антитела по настоящему изобретению способны к связыванию исключительно с антигенами. Соответствующие антигены включают, например, опухлеассоциированные антигены (ТАА), рецепторные белки клеточной поверхности и другие молекулы клеточной поверхности, регуляторы выживаемости клеток, регуляторы клеточной пролиферации, молекулы, ассоциированные с ростом и дифференцировкой тканей (о которых известно или прогнозируется, что они являются функциональными), лимфокины, цитокины, молекулы, принимающие участие в регуляции клеточного цикла, молекулы, принимающие участие в ангиогенезе, и молекулы, ассоциированные с ангиогенезом (о которых известно или прогнозируется, что они являются функциональными). Опухлеассоциированные факторы могут представлять собой факторы кластеров дифференцировки (например, белки CD).

Антитела, применяемые в конъюгатах антитело-лекарственное средство, включают без ограничения антитела, направленные против рецепторов клеточной поверхности и опухлеассоциированных антигенов. Такие опухлеассоциированные антигены хорошо

известны в данной области, и они могут быть получены с помощью способов и информации о получении антител, хорошо известных в данной области. Для разработки эффективных мишеней на клеточном уровне, которые могут использоваться в диагностике и терапии рака, исследователи пытаются обнаружить трансмембранные или другие опухолеассоциированные пептиды. Такие мишени могут специфически экспрессироваться на поверхности одной или нескольких раковых клеток с незначительной экспрессией или без экспрессии на поверхности одной или нескольких клеток, отличных от раковых. Как правило, такие опухолеассоциированные полипептиды в большей степени сверхэкспрессируются на поверхности раковых клеток, чем на поверхности клеток, отличных от раковых. Подтверждение таких опухолеассоциированных факторов может в значительной степени усилить свойства специфического нацеливания средств терапии рака на основе антител. Для удобства информация, связанная с антигенами, известными в данной области, отмечена ниже, включая название, другие названия и номер доступа в GenBank. Последовательности нуклеиновой кислоты и белковые последовательности, соответствующие опухолеассоциированным антигенам, можно найти в публично доступных базах данных, таких как GenBank. Опухлеассоциированные антигены, соответствующие нацеливанию антитела, включают все варианты и изоформы аминокислотной последовательности, характеризующиеся по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90% или 95% гомологией с последовательностями, подтвержденными в литературных источниках, или обладающие биологическими свойствами и характеристиками, которые идентичны таковым последовательностей опухолеассоциированного антигена в процитированной литературе.

Термин "ингибирует" или "ингибирование" означает, что выявляемое количество уменьшается или исключается полностью.

Термин "рак" относится к физиологическому состоянию или заболеванию, характеризующимся дисрегулируемым клеточным ростом. "Опухоль" включает раковые клетки.

Термин "аутоиммунное заболевание" относится к заболеваниям или нарушениям, которые происходят из тканей или белков, на которые нацеливается собственный организм индивидуума.

Термин "лекарственное средство" относится к цитотоксическим лекарственным средствам, обозначенным с помощью d, которые представляют собой химические молекулы, которые характеризуются сильной способностью нарушать нормальный рост у опухолевых клеток. Цитотоксические лекарственные средства в целом могут уничтожать

опухолевые клетки при достаточно высоких концентрациях, но вследствие отсутствия специфичности они будут также вызывать апоптоз нормальных клеток одновременно с уничтожением опухолевых клеток, приводя к серьезным побочным эффектам. Термин включает токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения, радиоизотопы (например, радиоизотопы  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$  и  $Lu^{176}$ ), токсичные лекарственные средства, химиотерапевтические лекарственные средства, антибиотики и нуклеолитические ферменты, предпочтительно токсичные лекарственные средства.

Термины "линкер", или "линкерный фрагмент", или "линкерное звено" относятся к фрагменту или связи химической структуры, которая присоединена к лиганду на одном конце и к лекарственному средству на другом конце или может быть присоединена к другим соединительным элементам и затем к лекарственному средству.

Соединительные элементы, включая удлинители, спейсеры и аминокислотные звенья, могут быть синтезированы посредством способов, известных из уровня техники, таких как описанные в US2005-0238649A1. Соединительные элементы могут представлять собой "расщепляемые соединительные элементы", которые облегчают высвобождение лекарственного средства в клетке. Например, могут использоваться кислотолабильные соединительные элементы (например, гидразон), чувствительные к протеазам (например, чувствительные к пептидазам) соединительные элементы, фотонестабильные соединительные элементы, диметильные соединительные элементы или дисульфид-содержащие соединительные элементы (Chari et al. *Cancer Research* 52:127-131, 1992); патент США № 5208020.

В соответствии с механизмом внутриклеточного высвобождения лекарственного средства применяемые в данном документе "линкеры" или "линкеры конъюгатов антитело-лекарственное средство" можно разделить на два типа: неразрушаемые линкеры и разрушаемые линкеры. В случае конъюгатов антитело-лекарственное средство, содержащих неразрушаемый линкер, механизм высвобождения лекарственного средства является следующим: после того как конъюгат связывается с антигеном и посредством эндоцитоза попадает в клетку, антитело подвергается ферментативному расщеплению в лизосомах с высвобождением активной молекулы, состоящей из низкомолекулярного лекарственного средства, линкера и аминокислотных остатков антитела. Произошедшее изменение в структуре молекулы лекарственного средства не снижает его цитотоксичность, но поскольку активная молекула характеризуется электрическим

зарядом (аминокислотные остатки), она не может проникать в прилегающие клетки. Следовательно, такие активные лекарственные средства не могут уничтожать прилегающие опухолевые клетки, которые не экспрессируют целевой антиген (клетки, отрицательные по антигену) (эффект случайно оказавшегося рядом) (Ducry et al., 2010, *Bioconjugate Chem.* 21: 5-13). В случае конъюгатов антитело-лекарственное средство, содержащих разрушаемый линкер, механизм высвобождения лекарственного средства является следующим: после того как конъюгат связывается с антигеном и посредством эндоцитоза попадает в клетку, конъюгат разрушается и высвобождает активный ингредиент (низкомолекулярное лекарственное средство само по себе) в клетке-мишени. Разрушаемые линкеры разделяют главным образом на чувствительные к химическим веществам линкеры и чувствительные к ферментам линкеры. Чувствительные к химическим веществам линкеры могут разрушаться селективно вследствие различий в свойствах плазмы крови и цитоплазмы или микроокружения опухоли. Такие свойства включают pH, концентрацию глутатиона и т. п. Чувствительные к pH линкеры, которые относительно стабильны в нейтральной или слабощелочной среде крови (pH 7,3-7,5), однако, будут гидролизоваться в пределах слабокислого микроокружения опухоли (pH 5,0-6,5) и лизосом (pH 4,5-5,0), например, гидразоны, карбонаты, ацетали и кетали. Вследствие ограниченной стабильности в плазме крови линкеров, разрушающихся под действием кислоты, конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе таких линкеров, как правило, характеризуются коротким периодом полужизни (2-3 дня). Данный короткий период полужизни несколько ограничивает применение чувствительных к pH линкеров в конъюгатах антитело-лекарственное средство нового поколения. Чувствительные к глутатиону линкеры также известны как линкеры с дисульфидной связью. Высвобождение лекарственного средства основано на разнице между высокой внутриклеточной концентрацией глутатиона (миллимолярный диапазон) и относительно низкой концентрацией глутатиона в крови (микромольный диапазон). Это особенно справедливо для опухолевых клеток, в которых низкое содержание кислорода приводит к усиленной активности редуктаз и тем самым к более высоким концентрациям глутатиона. Дисульфидные связи являются термодинамически стабильными и, следовательно, характеризуются лучшей стабильностью в плазме крови. Ферментативно-неустойчивые линкеры, такие как пептидные линкеры, обеспечивают лучший контроль высвобождения лекарственного средства. Пептидные линкеры могут эффективно разрезаться лизосомальными протеазами, такими как катепсины (катепсин В). Полагают, что данная пептидная связь является очень стабильной при циркуляции в плазме крови вследствие

неблагоприятного внеклеточного pH и присутствия сывороточных ингибиторов протеаз, приводящих к тому, что протеазы в норме неактивны за пределами клетки. Ввиду высокой стабильности в плазме крови и надлежащей селективности и эффективности внутриклеточного разрушения ферментативно-нестабильные линкеры широко применяются в качестве разрушаемых линкеров для конъюгатов антитело-лекарственное средство.

Термин "конъюгат антитело-лекарственное средство" относится к присоединению антитела к биологически активному лекарственному средству посредством стабильного связывающего звена. В контексте настоящего изобретения "конъюгат лиганд-лекарственное средство", предпочтительно конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), относится к присоединению моноклонального антитела или фрагмента антитела к биологически активному токсичному лекарственному средству посредством стабильного связывающего звена.

Трехбуквенные коды и однобуквенные коды для аминокислот, применяемые в настоящем изобретении, являются такими, как описано в *J. boyl. Chem.* 1968, 243, 3558.

Термин "алкил" относится к насыщенной алифатической углеводородной группе, которая представляет собой группу с прямой или разветвленной цепью, содержащую 1-20 атомов углерода (т. е. "C1-C20алкил"), предпочтительно алкильную группу, содержащую 1-12 атомов углерода (т. е. "C1-C12алкил"), более предпочтительно алкильную группу, содержащую 1-10 атомов углерода (т. е. "C1-C10алкил") и наиболее предпочтительно алкильную группу, содержащую 1-6 атомов углерода (т. е. "C1-C6алкил"). Неограничивающие примеры включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, втор-бутил, н-пентил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, н-гексил, 1-этил-2-метилпропил, 1,1,2-триметилпропил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2-этилбутил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 2,3-диметилбутил, н-гептил, 2-метилгексил, 3-метилгексил, 4-метилгексил, 5-метилгексил, 2,3-диметилпентил, 2,4-диметилпентил, 2,2-диметилпентил, 3,3-диметилпентил, 2-этилпентил, 3-этилпентил, н-октил, 2,3-диметилгексил, 2,4-диметилгексил, 2,5-диметилгексил, 2,2-диметилгексил, 3,3-диметилгексил, 4,4-диметилгексил, 2-этилгексил, 3-этилгексил, 4-этилгексил, 2-метил-2-этилпентил, 2-метил-3-этилпентил, н-нонил, 2-метил-2-этилгексил, 2-метил-3-этилгексил, 2,2-диэтилпентил, н-децил, 3,3-диэтилгексил, 2,2-диэтилгексил и их различные разветвленные изомеры и т. п. Более предпочтительными являются низшие алкильные группы, содержащие 1-6 атомов

углерода, и неограничивающие варианты осуществления включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, втор-бутил, н-пентил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, н-гексил, 1-этил-2-метилпропил, 1,1,2-триметилпропил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2-этилбутил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 2,3-диметилбутил и т. п. Алкильная группа может быть замещенной или незамещенной, и, если она является замещенной, группа-заместитель может размещаться в любой доступной точке присоединения, при этом указанная группа-заместитель предпочтительно представляет собой одну или несколько из следующих групп, независимо выбранных из алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкилтио, алкиламино, галогена, меркапто, гидроксид, нитро, циано, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио, гетероциклоалкилтио, оксо.

Термин "замещенный алкил" означает, что водород в алкильной группе был заменен группой-заместителем. Если в тексте не указано иное, группой-заместителем в алкильной группе может быть множество групп, выбранных из следующей группы: -галоген, -OR', -NR'R'', -SR', -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO<sub>2</sub>R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR'-C(O)NR''R''', -NR''C(O)<sub>2</sub>R', -NH-C(NH<sub>2</sub>)=NH, -NR'C(NH<sub>2</sub>)=NH, -NH-C(NH<sub>2</sub>)=NR', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R'', -NR'S(O)<sub>2</sub>R'', -CN и -NO<sub>2</sub>, при этом число заместителей составляет от 0 до (2m'+1), где m' представляет собой общее число атомов углерода в группе. Каждый из R', R'' и R''' независимо относится к водороду, незамещенному C<sub>1</sub>-алкилу, незамещенному C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>арилу (или C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>арилу), C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>арилу (или C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>арилу), замещенному 1-3 галогенами, незамещенному C<sub>1</sub>-алкилу, C<sub>1</sub>-алкокси или C<sub>1</sub>-алкилтиоалкокси или незамещенному C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>арил- (или C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>арил)-C<sub>1-4</sub>алкилу. Когда R' и R'' присоединены одному атому азота, они могут образовывать 3-, 4-, 5-, 6- или 7-членное кольцо вместе с таким атомом азота. Например, -NR'R'' включает 1-пирролидинил и 4-морфолинил.

Термин "алкилен" означает насыщенную прямую или разветвленную алифатическую углеводородную группу с двумя остатками, полученными за счет удаления двух атомов водорода от одного и того же атома углерода или двух разных атомов углерода исходного алкана, и представляет собой прямую или разветвленную группу, содержащую 1-20 атомов углерода, предпочтительно алкиленовую группу, содержащую 1-12 атомов углерода, более предпочтительно 1-6 атомов углерода. Неограничивающие примеры алкиленовых групп включают без ограничения метилен (-CH<sub>2</sub>-), 1,1-этилиден (-CH(CH<sub>3</sub>)-),

1,2-этилиден (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,1-пропилиден (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-), 1,2-пропилиден (-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-), 1,3-пропилиден (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,4-бутилиден (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) и 1,5-бутилиден (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), среди прочих. Алкиленовая группа может быть замещенной или незамещенной, и, если она является замещенной, заместитель может размещаться в любой доступной точке присоединения, при этом указанный заместитель предпочтительно независимо и необязательно замещен одним или несколькими заместителями, выбранными из алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкилтио, алкиламино, галогена, меркапто, гидроксила, нитро, циано, циклоалкила, гетероцикло, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио, гетероциклоалкилтио и оксо.

Термин "алкокси" относится к -O-(алкил) и -O-(циклоалкил), где алкил и циклоалкил являются такими, как определено выше. Неограничивающие примеры C1-C8алкокси включают метокси, этокси, пропокси, бутокси, циклопропокси, циклобутокси, циклопентилокси, циклогексилокси. Алкоксигруппа может быть необязательно замещенной или незамещенной, и, если она является замещенной, заместитель предпочтительно представляет собой одну или несколько из следующих групп, независимо выбранных из алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкилтио, алкиламино, галогена, меркапто, гидроксила, нитро, циано, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио, гетероциклоалкилтио.

Термин "циклоалкил" относится к насыщенному или частично ненасыщенному моноциклическому или полициклическому циклическому углеводородному заместителю, где циклоалкильное кольцо содержит от 3 до 20 атомов углерода (т.е. "C3-C20циклоалкил"), предпочтительно содержит от 3 до 12 атомов углерода (т.е. "C3-C12циклоалкил"), более предпочтительно содержит от 3 до 10 атомов углерода (т.е. "C3-C10циклоалкил"), наиболее предпочтительно содержит 3-8 атомов углерода (т.е. "C3-C8циклоалкил"). Неограничивающие примеры моноциклических циклоалкильных групп (например, "C3-C8циклоалкил") включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогексаденил, циклогептил, циклогептатриенил, циклооктил и т.п.; а полициклические циклоалкильные группы включают циклоалкильные группы из спироциклов, конденсированных колец и мостиковых колец.

Термин "гетероциклический" означает насыщенный или частично ненасыщенный моноциклический или полициклический циклический углеводородный заместитель, содержащий от 3 до 20 атомов в кольце (т.е. "3-20-членный гетероциклический"), где один или несколько атомов в кольце представляют собой гетероатом, выбранный из азота,

кислорода или  $S(O)_m$  (где  $m$  представляет собой целое число от 0 до 2), но за исключением частей кольца, представляющих собой -O-O-, -O-S- или -S-S-), при этом остальные атомы в кольце являются углеродом. Предпочтительно он содержит 3-12 атомов в кольце (т. е. "3-12-членная гетероциклическая группа"), 1-4 из которых представляют собой гетероатомы; более предпочтительно циклоалкильное кольцо содержит 3-10 атомов в кольце (т. е. "3-10-членная гетероциклическая группа"). Неограничивающие примеры моноциклических гетероциклических групп (например, 3-7-членных гетероциклических групп) включают пирролидинил, пиперидинил, пиперазинил, морфолинил, тиоморфолинил, гомопиперазинил и т. п. Полициклические гетероциклические группы включают спиро, конденсированные и мостиковые гетероциклические группы.

Термин "циклоалкилалкил" означает, что алкильная группа замещена одной или несколькими циклоалкильными группами, предпочтительно одной циклоалкильной группой, где алкил является таким, как определено выше, и где циклоалкил является таким, как определено выше, например, C3-C8циклоалкил-C1-C8алкил.

Термин "галогеналкил" означает алкильную группу, замещенную одним или несколькими галогенами, где алкильная группа является такой, как определено выше, например, галоген-C1-C8алкил.

Термин "дейтероалкил" означает алкильную группу, замещенную одним или несколькими атомами дейтерия, где алкильная группа является такой, как определено выше, например, дейтеро-C1-C8алкил.

Термин "C6-C12арил" относится к карбоциклическим группам с ароматической системой, содержащим 6-12 атомов углерода.

Термин "C6-C10арил" относится к карбоциклическим группам с ароматической системой, содержащим 6-10 атомов углерода, таким как фенил, нафтил и т. п.

Термин "5-10-членный гетероарил" относится к ароматическим гетероциклическим кольцам, как правило, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- и 10-членным гетероциклическим кольцам, содержащим 1-3 гетероатома, выбранные из N, O или S; при этом гетероарильное кольцо необязательно может быть дополнительно конденсировано с ароматическими и неароматическими углеродными кольцами и гетероциклическими кольцами или присоединено к ним. Неограничивающие примеры указанных 5-10-членных гетероарильных колец представляют собой, например, пиридинил, пирозинил, пиримидинил, пиридазинил, индолил, имидазолил, тиазолил, изотиазолил, тиоксазолил, пирролил, фенилпирролил, фуранил, фенилфуранил, оксазолил, изоксазолил, пиразолил, тиофенил, бензофуранил, бензотиофенил, бензо-1,3-диоксолан (бензодиоксол),

изодигидроиндолил, бензимидазолил, индазолил, хинолинил, изохинолинил, 1,2,3-триазолил, 1-фенил-1,2,3-триазолил, 2,3-дигидроиндолил, 2,3-дигидробензофуранил, 2,3-дигидробензотиофенил, бензопиранил, 2,3-дигидробензоксазинил, 2,3-дигидрохиноксалинил и другие.

Термин "замещенный С6-С10арил", или "замещенный 5-10-членный гетероарил", или "замещенный 3-7-членный гетероциклил" означает, что водород в арильной или гетероарильной или гетероциклической группе заменен группой-заместителем. Если в тексте не указано иное, заместителем в арильной или гетероарильной или гетероциклической группе может быть множество групп, выбранных из следующей группы: -галоген, -OR', -NR'R'', -SR', -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO<sub>2</sub>R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR'-C(O)NR''R''', -NR''C(O)<sub>2</sub>R', -NH-C(NH<sub>2</sub>)=NH, -NR''C(NH<sub>2</sub>)=NH, -NH-C(NH<sub>2</sub>)=NR', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>NR'R'', -NR'S(O)<sub>2</sub>R'', -CN и -NO<sub>2</sub>, при этом число заместителей составляет от 0 до (2m'+1), где m' представляет собой общее число атомов углерода в группе. Каждый из R', R'' и R''' независимо относится к водороду, незамещенному С<sub>1-8</sub>алкилу, незамещенному С6-С12арилу (или С6-С10арилу), С6-С12арилу (или С6-С10арилу), замещенному 1-3 галогенами, незамещенному С<sub>1-8</sub>алкилу, С<sub>1-8</sub>алкокси или С<sub>1-8</sub>тиоалкокси или незамещенному С6-С12арил- (или С6-С10арил)-С<sub>1-4</sub>алкилу. Когда R' и R'' присоединены одному атому азота, они могут образовывать 3-, 4-, 5-, 6- или 7-членное кольцо с этим атомом азота. Например, -NR'R'' включает 1-пирролидинил и 4-морфолинил.

Термин "гидроксил" относится к группе -ОН.

Термин "галоген" означает фтор, хлор, бром или йод.

Термин "амино" означает -NH<sub>2</sub>. Термин "нитро" означает -NO<sub>2</sub>.

Термин "амидная группа" означает -C(O)N(алкил) или (циклоалкил), где алкил и циклоалкил являются такими, как определено выше.

Термин "карбоксилатная группа" означает -C(O)O(алкил) или (циклоалкил), где алкил и циклоалкил являются такими, как определено выше.

Настоящее изобретение также включает различные дейтерированные формы формулы I. Каждый из доступных атомов водорода, присоединенных к атомам углерода, может быть независимо заменен атомом дейтерия. Специалист в данной области техники может синтезировать дейтерированную форму формулы I с учетом соответствующей литературы. При получении дейтерированных форм формулы I могут быть использованы коммерчески доступные дейтерированные исходные материалы, или они могут быть синтезированы посредством традиционных методик с применением дейтерированных

реагентов, при этом неограничивающие примеры дейтерированных реагентов включают дейтероборан, раствор тридейтероборана в тетрагидрофуране, дейтерированный гидрид лития-алюминия, дейтерированный этилйодид и дейтерированный метилйодид и т. п.

Термин "антитело" относится к иммуноглобулинам, которые представляют собой структуры с тетрапептидными цепями, состоящими из двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей, связанных межцепочечными дисульфидными связями. Иммуноглобулины отличаются по составу и порядку аминокислот в константной области тяжелой цепи и, следовательно, отличаются по своей антигенности. Соответственно, иммуноглобулины можно разделить на пять классов или изоформ иммуноглобулинов, т. е. IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответствующие тяжелые цепи которых представляют собой  $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\gamma$ -,  $\alpha$ - и  $\epsilon$ -цепи соответственно. Один класс Ig может быть дополнительно разделен на разные подклассы в соответствии с отличиями в аминокислотном составе их шарнирной области, а также числом и положениями дисульфидных связей тяжелой цепи, например, IgG можно разделить на IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи делятся на  $\kappa$ -цепи или  $\lambda$ -цепи по отличиям в константной области. Каждый из пяти классов Ig может содержать  $\kappa$ -цепь или  $\lambda$ -цепь. Антитела, описанные в настоящем изобретении, предпочтительно являются специфическими антителами против антигенов клеточной поверхности на клетках-мишенях, и неограничивающими вариантами осуществления являются следующие антитела: одно или несколько из антитела к EGFRvIII, антитела к DLL-3, антитела к PSMA, антитела к CD70, антитела к MUC16, антитела к ENPP3, антитела к TDGF1, антитела к ETBR, антитела к MSLN, антитела к TIM-1, антитела к LRRC15, антитела к LIV-1, антитела к CanAg/AFP, антитела к кладину 18.2, антитела к мезотелину, антитела к HER2 (ErbB2), антитела к EGFR, антитела к c-MET, антитела к SLITRK6, антитела к KIT/CD117, антитела к STEAP1, антитела к SLAMF7/CS1, антитела к NaPi2B/SLC34A2, антитела к GPNMB, антитела к HER3(ErbB3), антитела к MUC1/CD227, антитела к AXL, антитела к CD166, антитела к B7-H3 (CD276), антитела к PTK7/ССК4, антитела к PRLR, антитела к EFNA4, антитела к 5T4, антитела к NOTCH3, антитела к нектину-4, антитела к TROP-2, антитела к CD142, антитела к CA6, антитела к GPR20, антитела к CD174, антитела к CD71, антитела к EphA2, антитела к LYPD3, антитела к FGFR2, антитела к FGFR3, антитела к FR $\alpha$ , антитела к CEACAM, антитела к GCC, антитела к интегрину Av, антитела к CAIX, антитела к Р-кадгерину, антитела к GD3, антитела к кадгерину-6, антитела к LAMP1, антитела к FLT3, антитела к BCMA, антитела к CD79b, антитела к CD19, антитела к CD33, антитела к CD56, антитела к CD74, антитела к CD22, антитела к CD30, антитела к CD37, антитела к CD138, антитела к CD352,

антитела к CD25 или антитела к CD123.

Термин "сольват" или "соединение-растворитель" относится к образованию фармацевтически применимого сольвата из конъюгата лиганд-лекарственное средство по настоящему изобретению с одной или несколькими молекулами растворителя, при этом неограничивающие примеры молекул растворителя включают воду, этанол, ацетонитрил, изопропанол, DMSO и этилацетат.

Термин "загрузка лекарственным средством" относится к среднему числу цитотоксических лекарственных средств, загруженных на каждое антитело в формуле I. Она также может быть выражена как отношение количества лекарственного средства к количеству антитела, и загрузка лекарственным средством может находиться в диапазоне от 0-12, предпочтительно 1-10 цитотоксических лекарственных средств (D), присоединенных к каждому антителу (Ab). В вариантах осуществления настоящего изобретения загрузка лекарственным средством обозначается как n, среднее значение которого в качестве примера может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. Среднее число молекул лекарственного средства на молекулу ADC после реакции сочетания может быть идентифицировано посредством общепринятых способов, таких как спектроскопия в УФ/видимом свете, масс-спектрометрия, тесты ELISA и определение характеристик посредством HPLC.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения цитотоксическое лекарственное средство сочетается с группой сульфгидрил-SH свободного цистеина и/или группой сульфгидрил-SH цистеинового остатка, полученного посредством сайт-направленного мутагенеза, между цепями антитела посредством линкерного звена, и в целом число молекул лекарственного средства, которое может сочетаться с антителом в реакции сочетания, будет меньше или равно теоретическому максимуму.

Загрузку конъюгатов лиганд-цитотоксическое лекарственное средство можно контролировать посредством следующих неограничивающих способов, включающих:

- (1) осуществление контроля молярного отношения связывающего реагента к моноклональному антителу;
- (2) контроль времени и температуры реакции;
- (3) выбор разных реагентов для реакции.

Информацию по получению традиционных фармацевтических композиций см. в Китайской фармакопее.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" или "фармацевтически применимая соль" означает соль конъюгата лиганд-лекарственное средство по настоящему

изобретению или соль соединения, описанного в настоящем изобретении; при этом соли данного типа являются безопасными и эффективными при применении у млекопитающего и биологически активными, при необходимости. Конъюгаты лиганд-лекарственное средство по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну карбоксильную группу, поэтому они могут образовывать соли с основаниями, и неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых солей включают соли натрия, калия, кальция или магния и т. п.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" или "фармацевтически применимая соль" означает соль конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению или соль соединения, описанного в данном документе; при этом соли данного типа являются безопасными и эффективными при применении у млекопитающего и биологически активными, при необходимости. Конъюгаты лиганд-лекарственное средство по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну аминогруппу и, следовательно, могут образовывать соли с кислотами, при этом неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых солей включают гидрохлорид, гидробромид, гидройодат, сульфат, бисульфат, цитрат, ацетат, сукцинат, аскорбат, оксалат, нитрат, фосфат, гидрофосфат, дигидрофосфат, салицилат, гидроцитрат, тартрат, малеат, фумарат, формиат, бензоат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат.

"Кислотная аминокислота" относится к аминокислотам с изоэлектрической точкой, составляющей менее 7. Молекулы кислотных аминокислот обычно содержат одну или несколько кислотных групп, таких как карбоксильные группы, которые могут эффективно ионизироваться в отрицательно заряженные ионные формы в структуре для повышения гидрофильности. Кислотные аминокислоты могут быть природными или неприродными.

Термин "природные аминокислоты" относится к биологически синтезированным аминокислотам. Природные аминокислоты обычно относятся к L-типу, но имеется несколько исключений, таких как глицин, включая природные и синтезированные организмами.

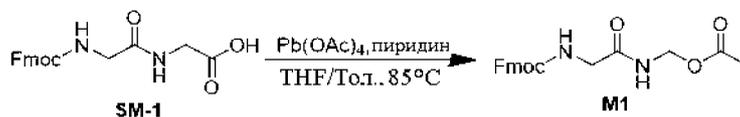
Термин "неприродные аминокислоты" означает аминокислоты, полученные посредством способов синтеза.

Настоящее изобретение дополнительно конкретизируется ниже в связи с конкретными вариантами осуществления, которые, как следует понимать, предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Способы тестирования, для которых конкретные условия не указаны, в следующих вариантах осуществления в целом выполняются в соответствии

с традиционными условиями или в соответствии с условиями, рекомендуемыми изготовителем. Все процентные величины, доли, соотношения или части приведены по весу, если не указано иное.

### Пример 1

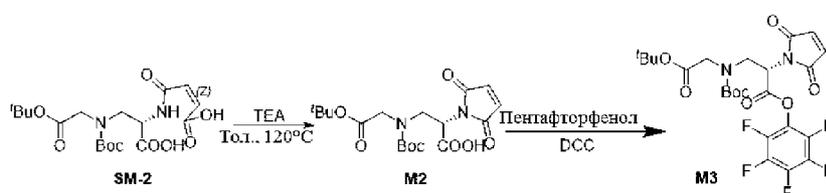
Синтез соединения M1:



В одnogорлую колбу объемом 5000 мл добавляли N-флуоренилметоксикарбонил-глицин-глицин (100 г, 282 ммоль, 1,0 экв.), тетраацетат свинца (175 г, 395 ммоль, 1,4 экв.), 2000 мл сухого тетрагидрофурана и 670 мл толуола, равномерно перемешивали, защищали с помощью азота, нагревали до 85°C и обеспечивали осуществление реакции в течение 2,5 ч. Ход реакции контролировали посредством TLC и после окончания реагирования исходных материалов проводили охлаждение до комнатной температуры и фильтрацию, фильтрат концентрировали при пониженном давлении и остаток очищали посредством колоночной хроматографии с получением соединения M1 (87 г); LC-MS:  $[M+NH_4]^+ = 386,0$ .

### Пример 2

Синтез соединения M3:



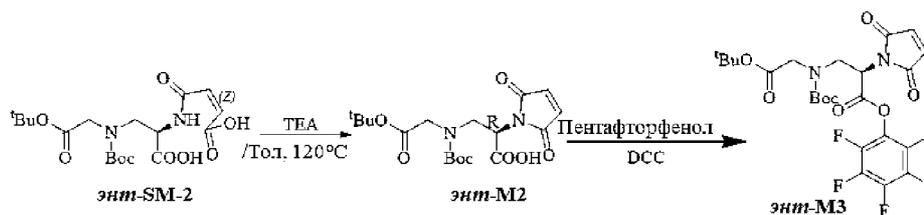
В одnogорлую колбу объемом 1000 мл добавляли соединение SM-2 (синтезированное в соответствии со способом, опубликованным в патенте CN108452321A) (40 г, 96 ммоль, 1,0 экв.), триэтиламин (26,7 мл, 2,0 экв.) и толуол (400 мл), нагревали до 120°C и реакцию осуществляли путем перегонки с обратным холодильником в течение 2 ч. Когда контроль посредством TLC продемонстрировал, что реакция по сути завершилась, проводили охлаждение до 50°C и растворитель удаляли путем centrifугирования при пониженном давлении. Проводили растворение с помощью этилацетата (150 мл) и воды (40 мл), pH доводили до 2-3 с помощью 1 М HCl при перемешивании в ледяной бане и проводили разделение жидкостей. Водный слой экстрагировали еще раз с помощью этилацетата, органические слои объединяли и проводили высушивание путем добавления

безводного сульфата натрия. После фильтрации посредством концентрирования получали светло-желтый маслянистый неочищенный продукт и неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (DCM: MeOH = 40:1) с получением соединения M2 (26,6 г); LC-MS:  $[M+H]^+ = 399,3$ .

В однокорпусную колбу объемом 1000 мл добавляли соединение M2 (26,5 г, 60,5 ммоль, 1,0 экв.), пентафторфенол (12,2 г, 66,5 ммоль, 1,1 экв.), DCC (13,7 г, 66,5 ммоль, 1,1 экв.) и THF (300 мл) и реакцию проводили при комнатной температуре в течение 30 мин (контролировали посредством TLC). Нерастворимый материал отфильтровывали. Реакционный раствор очищали непосредственно путем препаративной LC и полученный раствор концентрировали при 35°C на водяной бане при пониженном давлении путем откачивания воды с удалением ацетонитрила и лиофилизировали с получением соединения M3 (31,5 г) с выходом 64%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 565,1$ .

### Пример 3

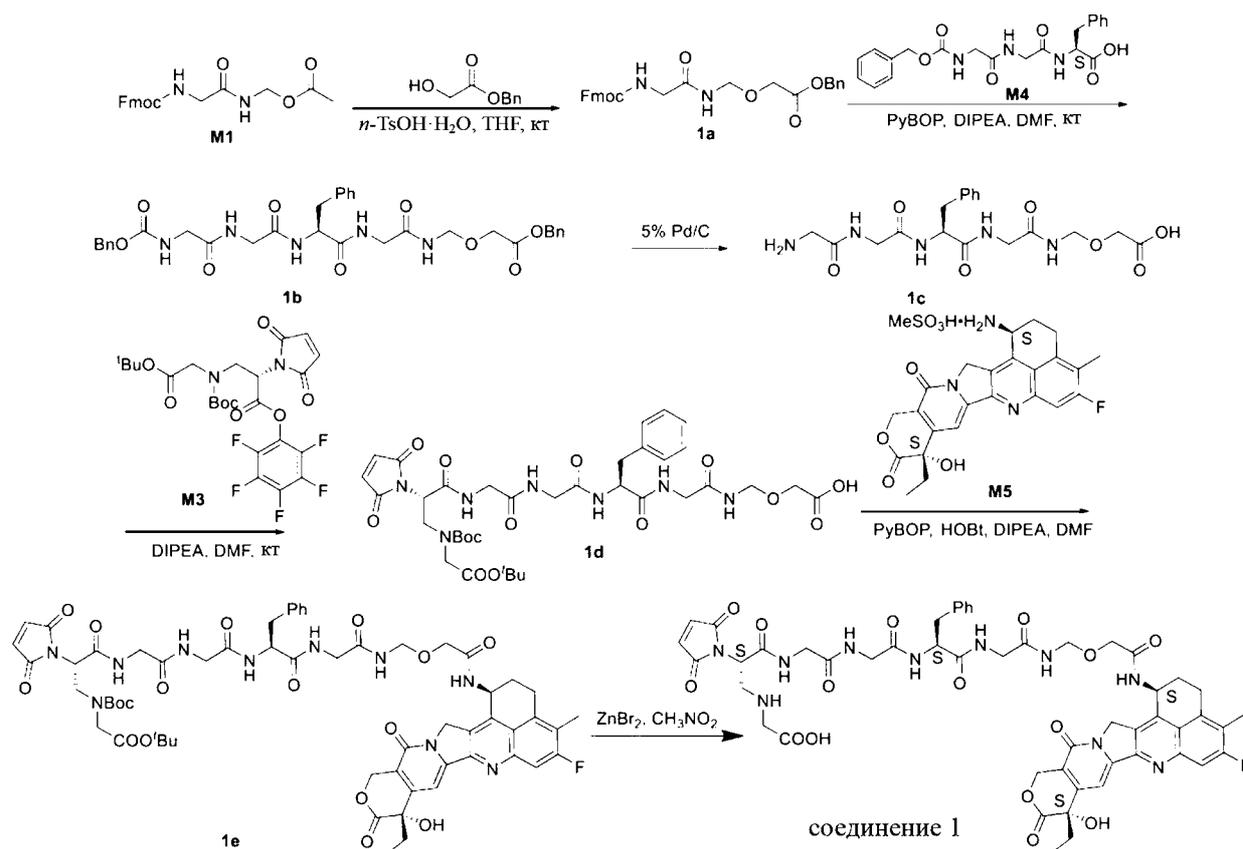
Синтез соединения энт-М3:



Соединение энт-М3 (27,8 г) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 2; LC-MS:  $[M+H]^+ = 565,2$ .

### Пример 4

Синтез соединения 1:



### Стадия 1. Соединение 1а.

В одnogорлую колбу объемом 250 мл добавляют M1 (6 г, 16,3 ммоль), 100 мл THF, моногидрат *p*-толуолсульфоновой кислоты (0,31 г, 1,63 ммоль), перемешивают и охлаждают до 0°C, проводят добавление по каплям бензилгидроксиацетата (5,4 г, 32,6 ммоль), затем естественным путем нагревают до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции (реакция длится в течение приблизительно 2-4 ч), с контролем посредством TLC. По завершении реакции добавляли насыщенный раствор NaHCO<sub>3</sub>, экстрагировали с помощью этилацетата, промывали с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушивали с помощью безводного сульфата натрия, фильтровали, концентрировали и остаток очищали с помощью колонки с силикагелем (PE:EA = 10:1-5:1-1:1) с получением 1а (4 г) с выходом 52%; LC-MS: [M+H]<sup>+</sup> = 475,18.

### Стадия 2. Соединение 1b.

В одnogорлую колбу объемом 25 мл добавляют 1а (2 г, 4,2 ммоль), 10 мл DMF, перемешивают при 0°C, добавляют DBU (766 мг, 5,04 ммоль) и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч. После завершения удаления защитной группы Fmoc, как выявлено посредством TLC, реакционный раствор отставляли, готовый для

применения.

Добавляли M4 (полученное в соответствии со способом, опубликованным в патенте CN111051330 A) (1,73 г, 4,2 ммоль), PyBOP (2,61 г, 5,04 ммоль), HOBT (680 мг, 5,04 ммоль) и 10 мл DMF в другую одногорлую колбу объемом 25 мл, добавляли DIPEA (830 мкл, 5,04 ммоль) на бане с ледяной водой, перемешивание продолжали в течение 30 мин, вышеуказанный реакционный раствор добавляли в реакционную колбу и температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции. Когда контроль посредством HPLC продемонстрировал окончание реакции, реакционный раствор очищали посредством препаративной LC с получением жидкости, обогащенной продуктом, обогащенную жидкость экстрагировали дихлорметаном, промывали с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушивали с помощью безводного сульфата натрия, фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением твердого вещества 1b (1,7 г) с выходом 63%; LCMS:  $[M+H]^+ = 648,26$ .

Стадия 3. Соединение 1c.

Добавляли 1b (900 мг, 1,39 ммоль) в одногорлую колбу объемом 25 мл и после растворения с помощью 15 мл DMF добавляли 900 мг 5% Pd/C и в течение 2 ч имела место реакция гидрогенизации. После завершения реакции проводили фильтрование с получением фильтрата, который применяли непосредственно на следующей стадии реакции без очистки.

Стадия 4. Соединение 1d.

Неочищенный продукт 1c помещали на баню с ледяной водой, добавляли DIPEA (235 мкл, 1,39 ммоль) и добавляли соединение M3 (784 мг, 1,39 ммоль), затем температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 1 ч. Когда реакция завершилась, как продемонстрировано путем контроля посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 1d (504 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 804,4$ .

Стадия 5. Соединение 1e.

Добавляют 1d (500 мг, 0,62 ммоль), M5 (310 мг, 0,62 ммоль), PyBOP (448 мг, 0,86 ммоль), HOBT (116 мг, 0,86 ммоль) и 15 мл DMF в одногорлую колбу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (378 мкл, 2,29 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как продемонстрировано путем контроля

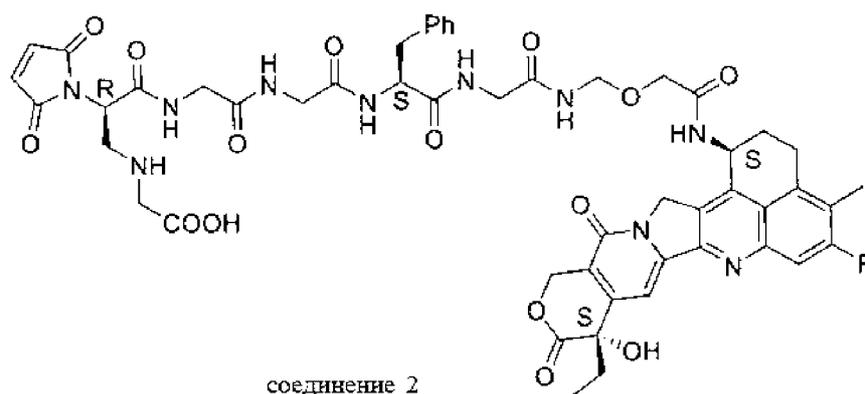
посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной соединением 1e, которую лиофилизировали с получением 1e (210 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1221,6$ .

#### Стадия 6. Соединение 1

Добавляли 1e (100 мг, 0,081 ммоль), бромид цинка (368 мг, 1,63 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и реакцию проводили при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как продемонстрировано путем контроля посредством HPLC, проводили концентрирование при пониженном давлении с удалением растворителя и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением твердого соединения 1 (60 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1065,3$ .

#### Пример 5

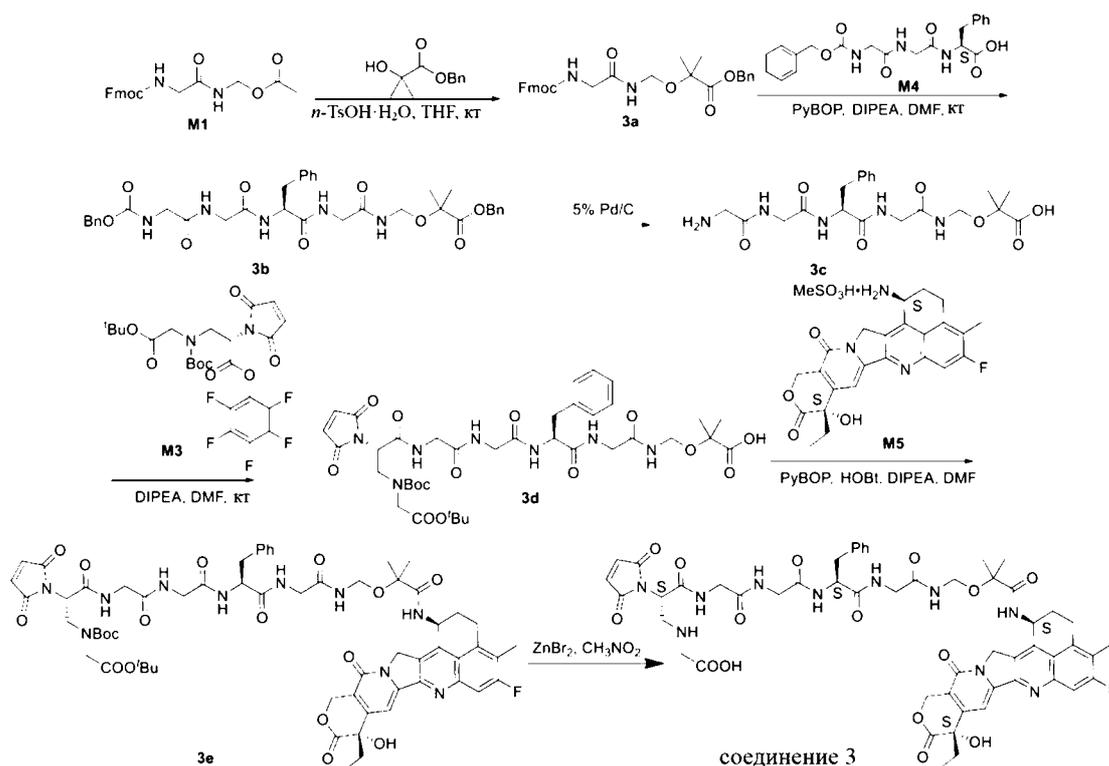
Синтез соединения 2:



Соединение 2 (51 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 4; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1065,3$ .

#### Пример 6

Синтез соединения 3:



### Стадия 1. Соединение 3а.

В одnogорлую колбу объемом 250 мл добавляют M1 (6 г, 16,3 ммоль), 100 мл THF, моногидрат *p*-толуолсульфоновой кислоты (0,31 г, 1,63 ммоль), перемешивают и охлаждают до 0°C, проводят добавление по каплям бензил-2-гидрокси-2-метилпропионата (6,3 г, 32,6 ммоль), затем проводят нагревание естественным образом до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции (реакция длится в течение приблизительно 2-4 ч), с контролем посредством TLC. По завершении реакции добавляли насыщенный раствор NaHCO<sub>3</sub> с последующим экстрагированием этилацетатом, промыванием с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушиванием с помощью безводного сульфата натрия, фильтрованием и концентрированием и остаток очищали с помощью колонки с силикагелем (PE:EA = 10:1-5:1-2:1) с получением 3а (4,2 г) с выходом 52%; LC-MS: [M+H]<sup>+</sup> = 503,3.

### Стадия 2. Соединение 3b.

В одnogорлую колбу объемом 25 мл добавляют 3а (2 г, 4,0 ммоль) и 10 мл DMF, перемешивают при 0°C, добавляют DBU (760 мг, 5,0 ммоль) и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч. После завершения удаления защитной группы Fmoc, как выявлено посредством TLC, реакционный раствор отставляли, готовый для применения.

Добавляют M4 (1,65 г, 4,0 ммоль), PyBOP (2,59 г, 5,0 ммоль), HOBT (675 мг,

5,0 ммоль) и 10 мл DMF в другую одnogорлую колбу объемом 25 мл и добавляют DIPEA (823 мкл, 5,04 ммоль) на бане с ледяной водой, продолжают перемешивание в течение 30 мин и затем добавляют вышеуказанный реакционный раствор в реакционную колбу и температуру повышают до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции. После завершения реакции, как продемонстрировано путем контроля посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством препаративной LC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую экстрагировали дихлорметаном, промывали с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушивали с помощью безводного сульфата натрия и фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением твердого вещества 3b (1,4 г) с выходом 53%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 676,2$ .

#### Стадия 3. Соединение 3c.

Добавляют 3b (700 мг, 1,04 ммоль) в одnogорлую колбу объемом 25 мл, растворяют в 10 мл DMF, добавляют 700 мг 5% Pd/C и проводят реакцию гидрогенизации в течение 1,5 ч. После завершения реакции проводили фильтрацию с получением фильтрата, который применяли непосредственно на следующей стадии реакции без очистки.

#### Стадия 4. Соединение 3d.

Помещают неочищенный продукт 3c на баню с ледяной водой, добавляют DIPEA (210 мкл, 1,25 ммоль) и затем соединение M3 (704 мг, 1,25 ммоль), затем температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч. После завершения реакции, как продемонстрировано путем контроля посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 3d (486 мг); LC-MS:  $[M-H]^- = 830,5$ .

#### Стадия 5. Соединение 3e.

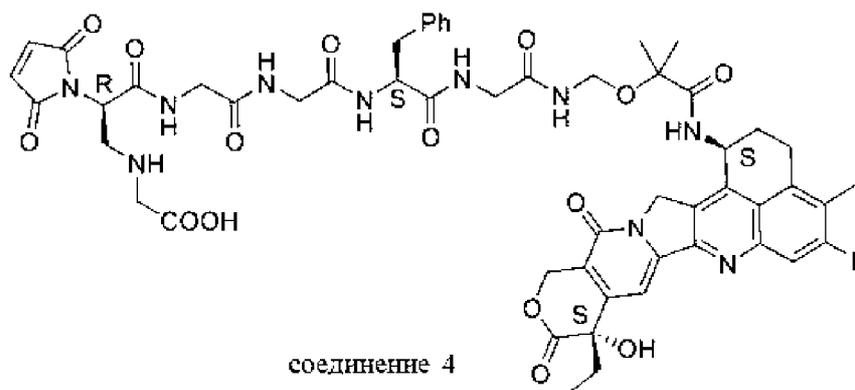
Добавляют 3d (300 мг, 0,36 ммоль), M5 (180 мг, 0,36 ммоль), PyBOP (260 мг, 0,5 ммоль), HOBT (67 мг, 0,5 ммоль) и 10 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (219,5 мкл, 1,33 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 3 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной соединением 3e, которую лиофилизировали с получением 3e (157 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1249,6$ .

## Стадия 6. Соединение 3.

Добавляют 3e (100 мг, 0,08 ммоль), бромид цинка (360 мг, 1,6 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, проводят концентрирование при пониженном давлении с удалением растворителя, с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением твердого соединения 3 (64 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1093,1$ .

## Пример 7

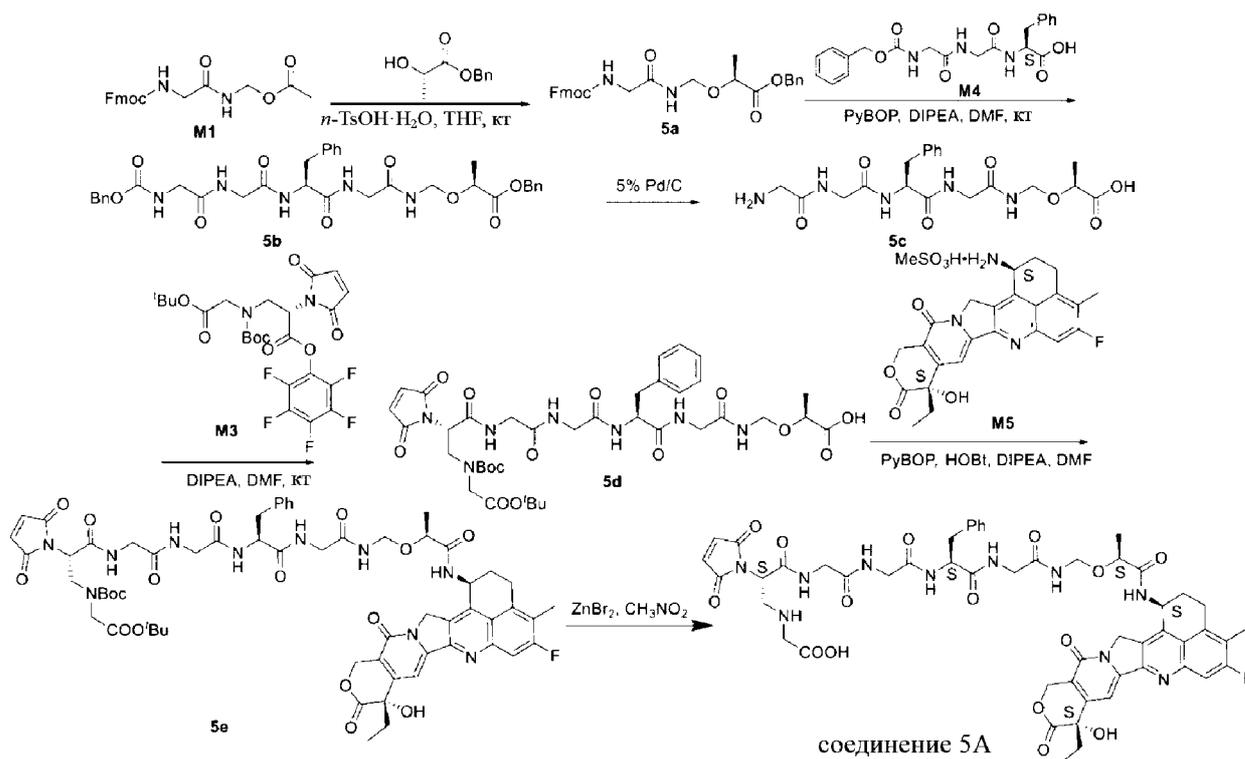
## Синтез соединения 4.



Соединение 4 (60 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 6; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1093,2$ .

## Пример 8

## Синтез соединения 5A.



### Стадия 1. Соединение 5a.

Добавляют **M1** (500 мг, 1,4 ммоль, 1,0 экв.), моногидрат *p*-толуолсульфоновой кислоты (26 мг, 0,1 ммоль, 0,1 экв.) и 10 мл THF в одnogорлую колбу объемом 25 мл, тщательно перемешивают, затем температуру снижают до 0°C, и затем медленно добавляют бензиловый сложный эфир L-молочной кислоты (1,2 г, 7,0 ммоль, 5 экв.), и затем температуру повышают до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции. Проводили контроль посредством TLC и по завершении реакции добавляли насыщенный раствор NaHCO<sub>3</sub> с последующим экстрагированием с помощью этилацетата, высушиванием над безводным сульфатом натрия, фильтрованием и концентрированием и остаток очищали с помощью колонки с обращенной фазой с получением **5a** (400 мг);

LC-MS: [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> = 506,2.

<sup>1</sup>H RMN (400 Mz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD): 1,39 (3H, d, *J* = 6,8 Hz), 3,78 (2H, t, *J* = 4,0 Hz), 4,17-4,27 (2H, m), 4,42 (2H, d, *J* = 4,0 Hz), 4,72-4,85 (2H, m), 5,11-5,58 (2H, m), 5,43 (1H, s), 7,06 (1H, t, *J* = 8,0 Hz), 7,25-7,33 (6H, m), 7,38 (2H, t, *J* = 8,0 Hz), 7,57 (2H, d, *J* = 8,0 Hz), 7,75 (2H, d, *J* = 8,0 Hz).

### Стадия 2. Соединение 5b.

Добавляют соединение **5a** (400 мг, 0,8 ммоль, 1,0 экв.) и 4 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 25 мл, тщательно перемешивают и затем температуру снижают до 0°C

перед медленным добавлением DBU (137 мг, 0,9 ммоль, 1,1 экв.). После завершения добавления температуру повышают до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции. Ход реакции контролировали посредством TLC и по завершении реакции реакционный раствор обозначали как реакционный раствор ①.

В другую одnogорлую колбу объемом 25 мл добавляют M4 (372 мг, 0,9 ммоль, 1,1 экв.), PyBOP (852 мг, 1,6 ммоль, 2,0 экв.) и 3 мл DMF, перемешивают при комнатной температуре в течение 5 мин и добавляют реакционный раствор ①. Реакцию проводили при комнатной температуре и контролировали посредством HPLC. Когда реакция завершилась, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением соединения 5b (326 мг); LC-MS:  $[M+NH_4]^+ = 679,2$ .

Стадия 3. Соединение 5c.

Добавляют 5b (4,0 г, 6,05 ммоль, 1,0 экв.) в одnogорлую колбу объемом 100 мл, растворяют в DMF (60 мл), затем добавляют 5% Pd/C (4 г) и проводят реакцию гидрогенизации при комнатной температуре в течение 4 ч (HPLC применяли для контроля протекания реакции). Отфильтровывали Pd/C и фильтрат помещали непосредственно на баню с ледяной водой (приблизительно 0°C) без подвергания концентрированию, готовый для применения.

Стадия 4. Соединение 5d.

Помещают неочищенный продукт 5c на баню с ледяной водой, добавляют DIPEA (1,1 мл, 1,1 экв.), и затем соединение M3 (3,4 г, 6,05 ммоль), и затем температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 5d (3,15 г); LC-MS:  $[M-H]^- = 816,3$ .

Стадия 5. Соединение 5e.

Добавляют 5d (2,07 г, 2,53 ммоль, 1,0 экв.), M5 (1,35 г, 2,53 ммоль, 1,0 экв.), PyBOP (1,98 г, 3,79 ммоль, 1,5 экв.), HOBT (0,51 г, 3,79 ммоль, 1,5 экв.) и DMF (40 мл) в одnogорлую колбу объемом 100 мл, добавляют DIPEA (1,05 мл, 1,5 экв.) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч (контролировали посредством HPLC). Реакционный раствор непосредственно очищали путем препаративной LC и обогащенную жидкость концентрировали на водяной бане при пониженном давлении с помощью водяного насоса при 35°C с удалением ацетонитрила и высушивали посредством сублимации с получением соединения 5e (1,92 г) с выходом 61%; LC-MS:

$[M+H]^+ = 1235,4$ .

Стадия 6. Соединение 5A.

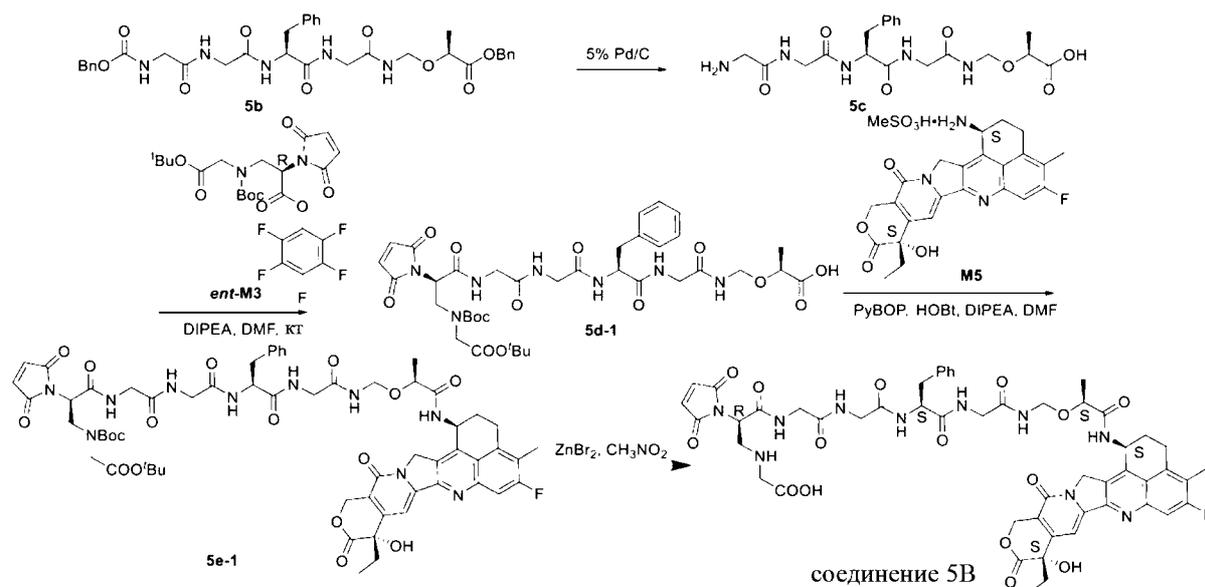
В одnogорлую колбу объемом 100 мл добавляют соединение 5e (1,0 г, 0,8 ммоль, 1,0 экв.) и 35 мл нитрометана и после растворения добавляют бромид цинка (3,64 г, 16 ммоль, 20,0 экв.), обеспечивают осуществление реакции в течение 30 мин на масляной бане при 40°C (стабилизировали заранее путем предварительного нагревания) и концентрируют при 45°C на водяной бане при пониженном давлении с помощью водяного насоса с удалением нитрометана, с получением желтого остатка в виде твердого вещества (контролировали посредством HPLC). После получения кислоты получали жидкость, обогащенную соединением 5A, и концентрировали при 35°C на водяной бане при пониженном давлении с помощью водяного насоса с удалением ацетонитрила путем центрифугирования и лиофилизировали с получением соединения 5A (786 мг) с выходом 90%.

LC-MS:  $[M+H]^+ = 1079,4$ .

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,39 - 9,02 (m, 1H), 8,70 (t,  $J = 6,5$  Hz, 1H), 8,64 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 8,56 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 8,34 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 8,16 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H), 8,01 (t,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 7,71 (d,  $J = 10,9$  Hz, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,28 - 7,15 (m, 4H), 7,14 (s, 2H), 5,53 (dd,  $J = 14,5, 6,4$  Hz, 1H), 5,49 - 5,34 (m, 2H), 5,22 (d,  $J = 18,8$  Hz, 1H), 5,09 (d,  $J = 18,7$  Hz, 1H), 5,03 (dd,  $J = 9,6, 3,9$  Hz, 1H), 4,73 (dd,  $J = 9,9, 6,9$  Hz, 1H), 4,59 (dd,  $J = 10,1, 6,5$  Hz, 1H), 4,49 (ddd,  $J = 13,2, 8,6, 4,4$  Hz, 1H), 4,14 (dd,  $J = 13,3, 6,6$  Hz, 2H), 3,93 (s, 2H), 3,84 (dd,  $J = 16,5, 6,3$  Hz, 1H), 3,76 (dd,  $J = 16,9, 5,7$  Hz, 2H), 3,70 (dd,  $J = 5,2$  Hz, 2H), 3,60 (dd,  $J = 16,7, 5,4$  Hz, 1H), 3,52 (dd,  $J = 16,4, 5,1$  Hz, 1H), 3,45 (dd,  $J = 12,8, 10,1$  Hz, 1H), 3,25 - 3,15 (m, 1H), 3,14 - 3,05 (m, 1H), 3,01 (dd,  $J = 13,7, 4,1$  Hz, 1H), 2,73 (dd,  $J = 13,5, 9,8$  Hz, 1H), 2,54 - 2,47 (m, 1H), 2,33 (s, 2H), 2,17 (d,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 1,91 - 1,79 (m, 2H), 1,33 (d,  $J = 6,6$  Hz, 2H), 0,87 (t,  $J = 7,3$  Hz, 2H).

Пример 9

Синтез соединения 5B.



### Стадия 1. Соединение 5d-1.

Добавляют соединение 5b (300 мг, 0,45 ммоль, 1,0 экв.) и DMF (3 мл) в одnogорлую колбу объемом 25 мл, перемешивают до растворения, добавляют 5% Pd/C (300 мг), три раза проводят замену атмосферы на водород, проводят реакцию гидрогенизации в течение 2 ч и контролируют в отношении окончания реакции посредством HPLC. После прохождения реакции посредством фильтрации удаляют Pd/C, фильтрат охлаждают до 0-5°C, добавляют DIPEA (65 мг 0,5 ммоль, 1,1 экв.), затем в фильтрат добавляют энТ-М3 (255 мг, 0,45 ммоль), затем температуру повышают до 20±5°C, и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч, и контролируют в отношении окончания реакции посредством HPLC. После завершения реакции проводили препаративную очистку посредством HPLC и жидкость, обогащенную продуктом, собирали и лиофилизировали с получением соединения 5d-1 (200 мг) с выходом 54%; LC-MS: [M-H]<sup>-</sup> = 816,3.

### Стадия 2. Соединение 5e-1.

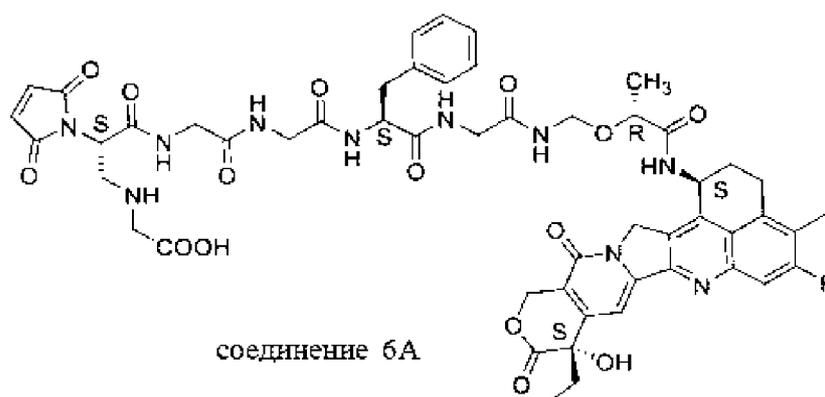
Добавляют соединение 5d-1 (200 мг, 0,24 ммоль, 1,0 экв.), M5 (127 мг, 0,24 ммоль, 1,0 экв.), PyBOP (187 мг, 0,36 ммоль, 1,2 экв.), HOBT (48 мг, 0,36 ммоль, 1,2 экв.) и DMF (6 мл) в одnogорлую колбу объемом 25 мл, температуру понижают на бане с ледяной водой до 0-5°C и добавляют DIPEA (62 мг, 0,48 ммоль, 2,0 экв.). После завершения добавления температуру повышают до 20±5°C, и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч, и применяют HPLC для контроля в отношении завершения реакции. Реакционный раствор подвергали препаративной очистке посредством HPLC и жидкость, обогащенную продуктом, собирали и лиофилизировали с получением соединения 5e-1 (162,8 мг); LC-MS: [M+H]<sup>+</sup> = 1235,4.

## Стадия 3. Соединение 5B

Последовательно добавляют соединение 5e-1 (110 мг, 0,089 ммоль, 1,0 экв.),  $ZnBr_2$  (400 мг, 1,78 ммоль, 20,0 экв.) и  $CH_3NO_2$  (10 мл) в одnogорлую колбу объемом 25 мл. После добавления температуру повышают до  $40^\circ C$  и обеспечивают осуществление реакции в течение 0,5 ч и затем останавливают реакцию. Реакционный раствор высушивали непосредственно при  $45^\circ C$  путем высушивания в центрифуге при пониженном давлении с получением желтого твердого вещества. Отбирали образцы и ход реакции контролировали посредством HPLC. Высушенное в центрифуге твердое вещество непосредственно очищали путем препаративной HPLC и жидкость, обогащенную продуктом, собирали и лиофилизировали с получением соединения 5B (73,4 мг) с выходом 76,5%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1079,4$ .

## Пример 10

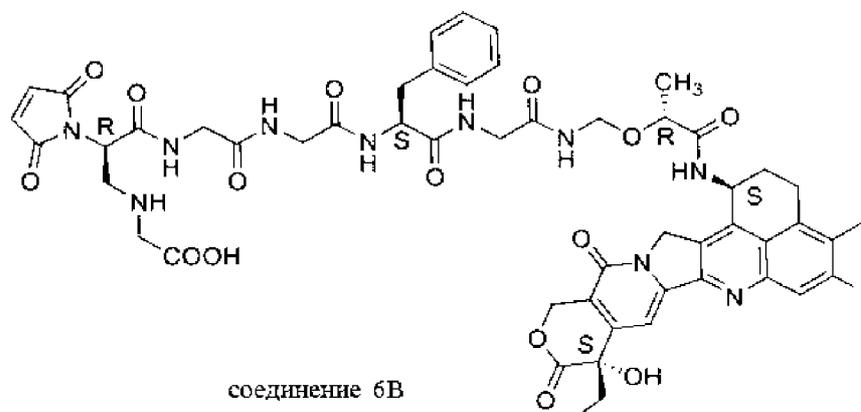
## Получение соединения 6A



Соединение 6A (71 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 8; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1079,4$ .

## Пример 11

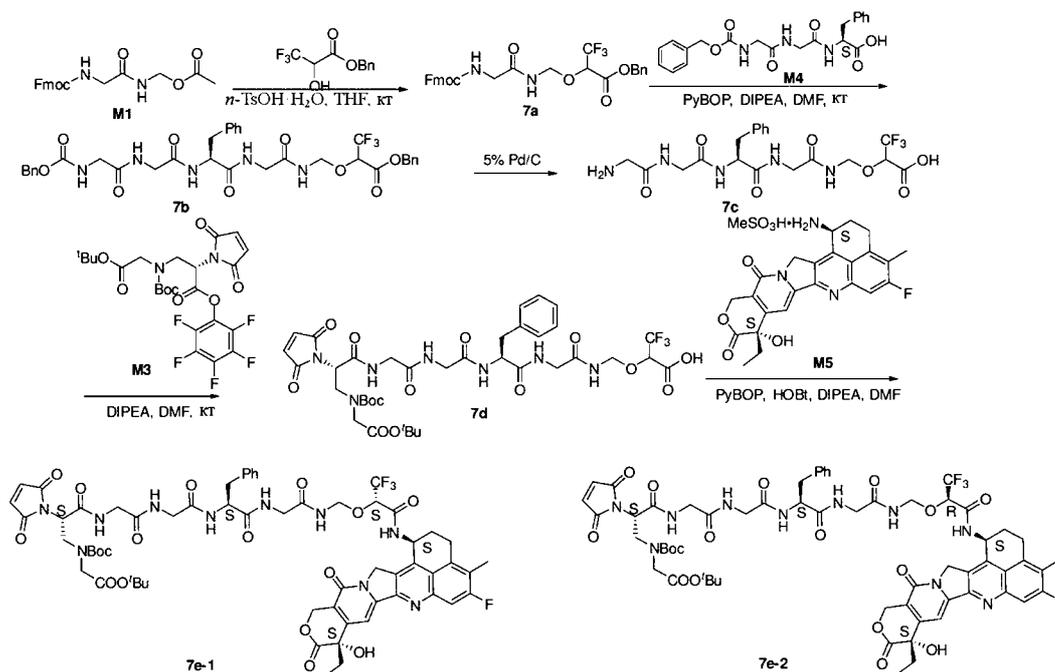
## Получение соединения 6B



Соединение 6B (59 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 9; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1079,4$ .

## Пример 12

## Получение соединений 7A и 7B



## Стадия 1. Соединение 7a.

В одностороннюю колбу объемом 250 мл добавляют M1 (10 г, 27,1 ммоль), бензил-3,3,3-трифторлактат (получали в соответствии со способом, опубликованным в патенте WO2020063673A1) (12,7 г, 54,3 ммоль), ацетат цинка (9,96 г, 54,3 ммоль) и 100 мл толуола, нагревают до 100°C и обеспечивают осуществление реакции в течение 4 ч. Когда реакция завершается, температуру снижают до комнатной температуры, фильтруют с удалением нерастворимого материала и концентрируют фильтрат с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (PE:EA = 10:1-5:1-2:1) с получением 5,15 г целевого материала, выход: 35,1%; LC-MS: [M+H]<sup>+</sup> = 543,17.

## Стадия 2. Соединение 7b.

Добавляют 7a (5 г, 9,2 ммоль) и 15 мл DMF в одностороннюю колбу объемом 50 мл, растворяют до прозрачного состояния, и затем добавляют DBU (1,68 г, 11 ммоль) на бане с ледяной водой, и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч, и реакционный раствор обозначают как реакционный раствор (1).

Берут другую одностороннюю колбу объемом 50 мл, добавляют M4 (3,8 г, 9,2 ммоль), PyBOP (5,75 г, 11 ммоль), HOBT (1,49 г, 11 ммоль) и 10 мл DMF. После растворения добавляют DIPEA (1,82 мл, 11 ммоль) на бане с ледяной водой и продолжают осуществление реакции в течение 30 мин, затем добавляют реакционный раствор (1),

и температуру повышают до комнатной температуры, и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч. Протекание реакции контролировали посредством HPLC. После завершения реакции реакционный раствор очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением обогащенной жидкости. Обогащенную жидкость экстрагировали дихлорметаном, промывали с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушивали с помощью безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали с получением 4,1 г твердого вещества с выходом 62,3%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 716,25$ .

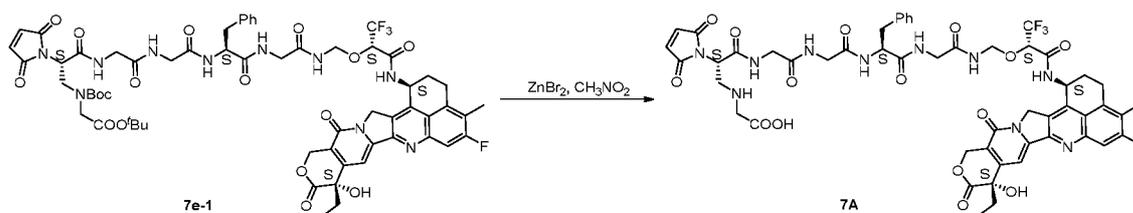
#### Стадия 3. Соединение 7d.

Добавляют 7b (900 мг, 1,26 ммоль) в одногорлую колбу объемом 25 мл, и после растворения с помощью 15 мл DMF добавляют 900 мг 5% Pd/C, и проводят реакцию гидрогенизации в течение 2 ч. После завершения реакции проводят фильтрацию, помещают фильтрат на баню с ледяной водой, добавляют DIPEA (228 мкл, 1,38 ммоль), и затем добавляют M3 (712 мг, 1,26 ммоль), и затем температуру повышают до комнатной температуры, и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч. Когда реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 525 мг продукта с выходом 47,9%; LC-MS:  $[M-H]^- = 870,33$ .

#### Стадия 4. Соединение 7e.

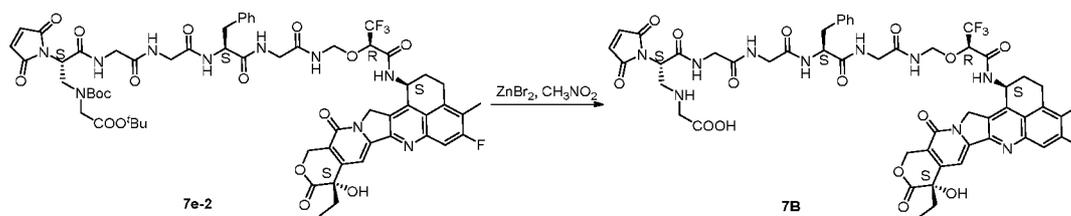
Добавляют 7d (500 мг, 0,57 ммоль), M5 (305 мг, 0,57 ммоль), RuBOP (448 мг, 0,86 ммоль), HOBT (116 мг, 0,86 ммоль) и 15 мл DMF в одногорлую колбу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (378 мкл, 2,29 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкостей, обогащенных соединением 7e-1 и соединением 7e-2, и обогащенные жидкости лиофилизировали с получением 150 мг соединения 7e-1, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1289,46$ , и 220 мг соединения 7e-2, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1289,46$ , соответственно.

#### Стадия 5. Соединение 7A.



Добавляют 7e-1 (100 мг, 0,077 ммоль), бромид цинка (349 мг, 1,55 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 52 мг твердого вещества; результат согласно TOF: 1133,3613.

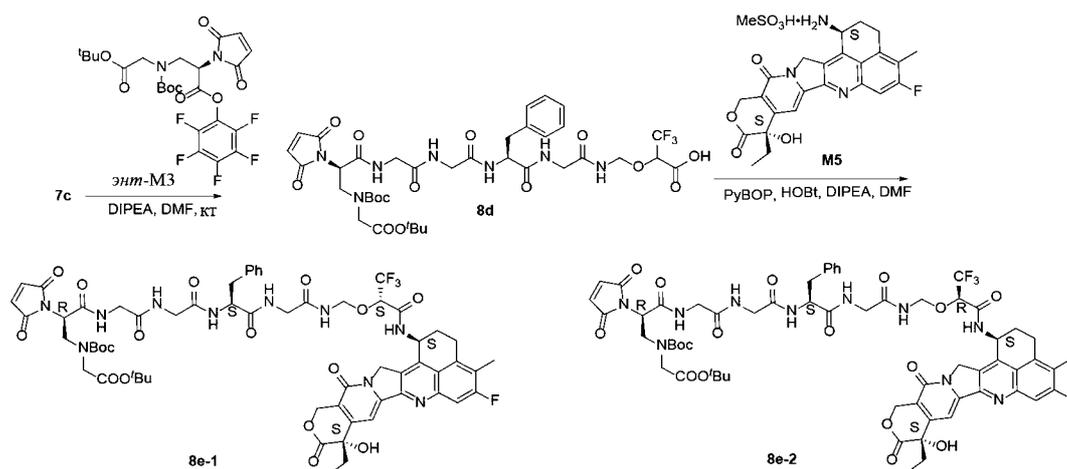
Стадия 6. Соединение 7B.



Добавляют 7e-2 (100 мг, 0,077 ммоль), бромид цинка (349 мг, 1,55 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 63 мг твердого вещества; результат согласно TOF: 1133,3668.

Пример 13

Синтез соединений 8A и 8B.



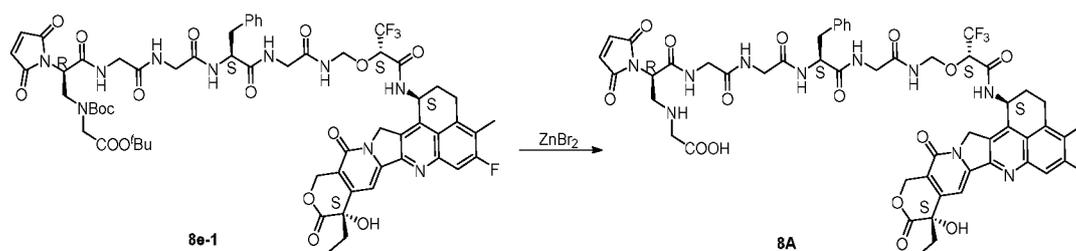
### Стадия 1. Соединение 8d.

В одnogорлую колбу объемом 25 мл добавляли 7c (900 мг, 1,83 ммоль), 20 мл DMF применяли для растворения, затем добавляли DIPEA (303 мкл, 1,83 ммоль), и добавляли энТ-М3 (1034 мг, 1,83 ммоль), и затем температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 613 мг продукта с выходом 38,5%; LC-MS:  $[M-H]^- = 870,32$ .

### Стадия 2. Соединение 8e-1 и соединение 8e-2.

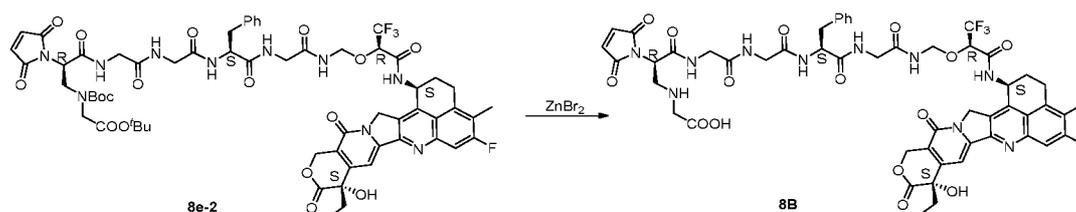
Добавляют 8d (500 мг, 0,57 ммоль), M5 (305 мг, 0,57 ммоль), PyBOP (448 мг, 0,86 ммоль), HOBT (116 мг, 0,86 ммоль) и 15 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (378 мкл, 2,29 ммоль) на бане с ледяной водой и температуру повышают до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкостей, обогащенных соединением 8e-1 и соединением 8e-2, и обогащенные жидкости лиофилизировали с получением 140 мг соединения 8e-1 и 210 мг соединения 8e-2 соответственно. LC-MS соединения 8e-1:  $[M+H]^+ = 1289,47$ ; LC-MS соединения 8e-2:  $[M+H]^+ = 1289,47$ .

### Стадия 3. Соединение 8A.



Добавляют соединение 8e-1 (100 мг, 0,077 ммоль), бромид цинка (349 мг, 1,55 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 50 мг твердого вещества; результат согласно TOF: 1133,3623.

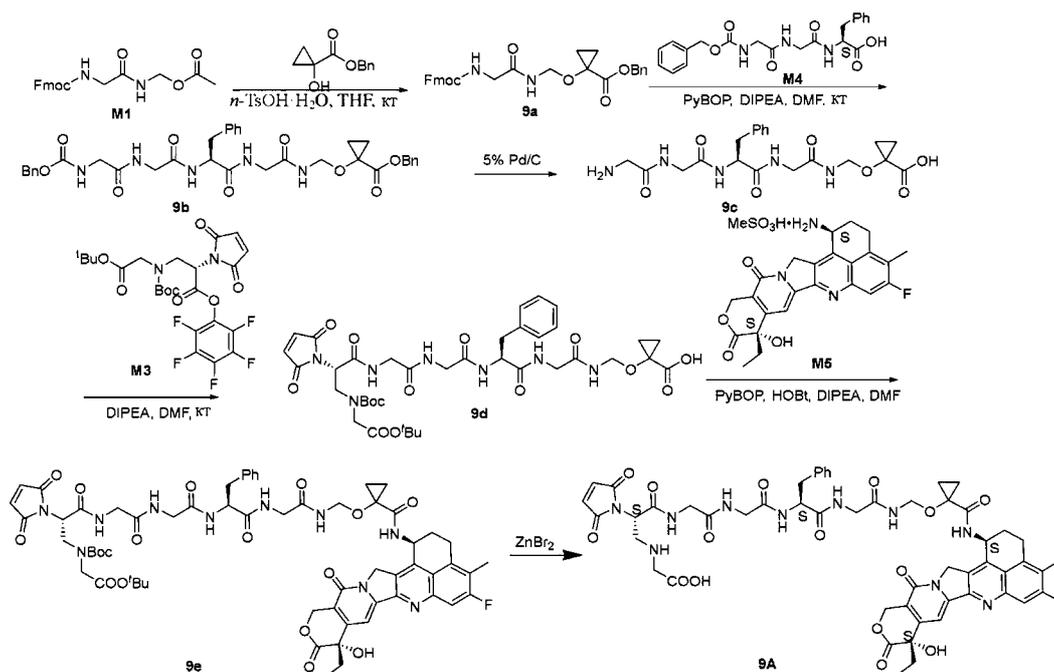
Стадия 4. Соединение 8B.



Добавляют соединение 8e-2 (100 мг, 0,077 ммоль), бромид цинка (349 мг, 1,55 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 58 мг твердого вещества; результат согласно TOF: 1133,3653.

Пример 14

Синтез соединения 9A.



### Стадия 1. Соединение 9а.

В одnogорлую колбу объемом 250 мл добавляют M1 (6 г, 16,3 ммоль), 100 мл THF и моногидрат *p*-толуолсульфоновой кислоты (0,31 г, 1,63 ммоль), перемешивают и охлаждают до 0°C, по каплям добавляют бензил-2-гидрокси-2-циклопропилацетат (получали в соответствии со способом, опубликованным в патенте US20050020645 A1) (6,3 г, 32,6 ммоль), затем естественным образом нагревают до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции (реакция длится в течение приблизительно 2-4 ч) с контролем путем TLC. По завершении реакции добавляли насыщенный раствор NaHCO<sub>3</sub> с последующим экстрагированием этилацетатом, промыванием с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушиванием с помощью безводного сульфата натрия, фильтрованием и концентрированием и остаток очищали с помощью колонки с силикагелем (PE:EA = 10:1-5:1-2:1) с получением 9а (3,7 г) с выходом 45%; LC-MS: [M+H]<sup>+</sup> = 501,5.

### Стадия 2. Соединение 9b.

В одnogорлую колбу объемом 25 мл добавляют 9а (2 г, 4,0 ммоль) и 10 мл DMF, перемешивают при 0°C, добавляют DBU (760 мг, 5,0 ммоль) и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч. После завершения контролируемого путем TLC удаления защитной группы Fmoc реакционный раствор оставляли, готовый для применения.

Добавляют M4 (1,65 г, 4,0 ммоль), PyBOP (2,59 г, 5,0 ммоль), HOBT (675 мг, 5,0 ммоль) и 10 мл DMF в другую одnogорлую колбу объемом 25 мл, добавляют DIPEA (823 мкл, 5,04 ммоль) на бане с ледяной водой, продолжают перемешивание в

течение 30 мин, и затем добавляют вышеуказанный реакционный раствор в реакционную колбу, и температуру повышают до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали путем препаративной LC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую экстрагировали дихлорметаном, промывали с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушивали с помощью безводного сульфата натрия и фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением 1,5 г твердого вещества с выходом 56%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 674,7$ .

Стадия 3. Соединение 9c.

Добавляли 9b (900 мг, 1,3 ммоль) в одnogорлую колбу объемом 25 мл, и после растворения с помощью 10 мл DMF добавляли 900 мг 5% Pd/C, и выполняли реакцию гидрогенизации в течение 1,5 ч. После завершения реакции проводили фильтрацию с получением фильтрата, который применяли непосредственно на следующей стадии реакции без очистки.

Стадия 4. Соединение 9d.

Помещают неочищенный продукт 9c на баню с ледяной водой, добавляют DIPEA (223 мкл, 1,3 ммоль) и затем соединение M3 (750 мг, 1,3 ммоль), затем температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 9d (529 мг); LC-MS:  $[M-H]^- = 828,4$ .

Стадия 5. Соединение 9e.

Добавляют 9d (500 мг, 0,6 ммоль), M5 (300 мг, 0,6 ммоль), PyBOP (416 мг, 0,8 ммоль), HOBT (108 мг, 0,5 ммоль) и 15 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (351 мкл, 2,13 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 3 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной соединением 9e, которую лиофилизировали с получением 9e (257 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1247,5$ .

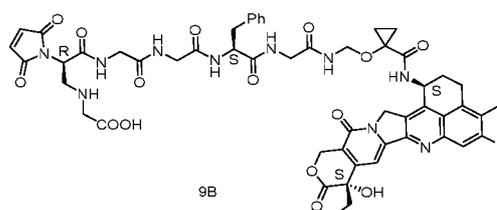
Стадия 6. Соединение 9A.

Добавляют 9e (100 мг, 0,08 ммоль), бромид цинка (360 мг, 1,6 ммоль) и 5 мл

нитрометана в однокорлую колбу объемом 25 мл и выполняют реакцию при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением твердого соединения 9A (55 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1091,3$ .

### Пример 15

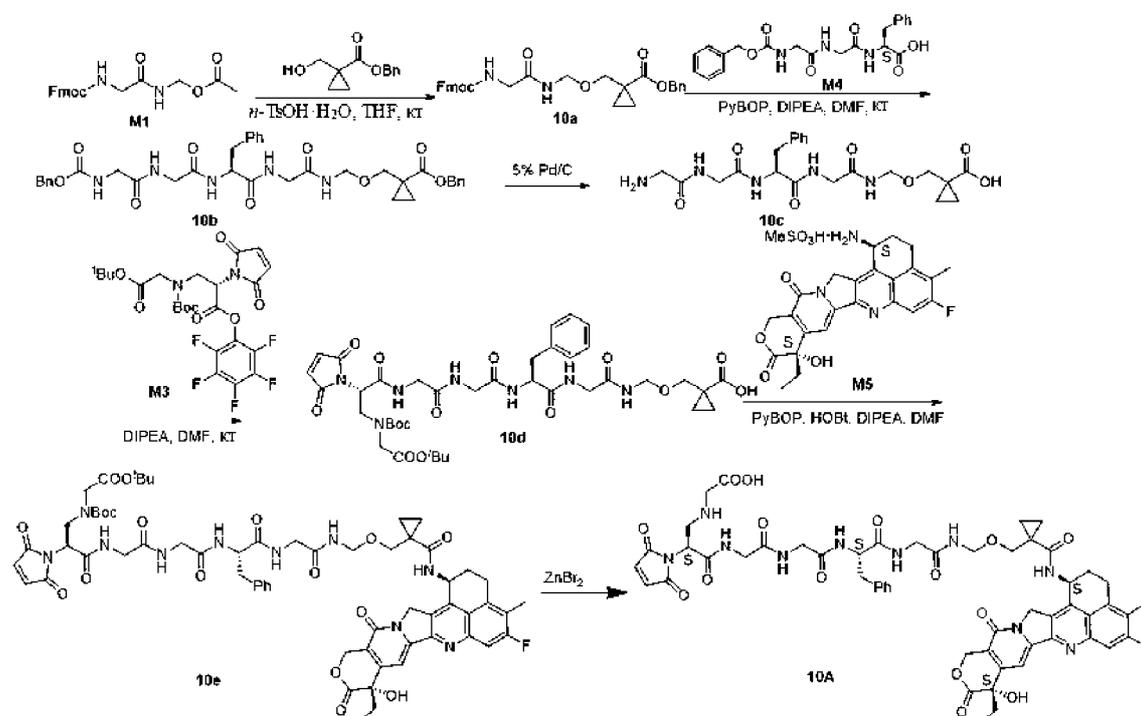
Синтез соединения 9B.



Соединение 9B (44 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 14; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1091,3$ .

### Пример 16

Синтез соединения 10A.



Стадия 1. Соединение 10a.

В однокорлую колбу объемом 250 мл добавляют M1 (6 г, 16,3 ммоль), 100 мл THF и моногидрат п-толуолсульфоновой кислоты (0,31 г, 1,63 ммоль), перемешивают и охлаждают до 0°C, по каплям добавляют бензил-3-гидрокси-2-циклопропилпропионат

(полученный со ссылкой на способ, опубликованный в патенте WO2013187496A1) (6,7 г, 32,6 ммоль), затем естественным образом нагревают до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции (осуществление реакции в течение приблизительно 2-4 ч) с контролем путем TLC. По завершении реакции добавляли насыщенный раствор  $\text{NaHCO}_3$  с последующим экстрагированием этилацетатом, промыванием с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушиванием с помощью безводного сульфата натрия, фильтрованием и концентрированием и остаток очищали с помощью колонки с силикагелем (PE:EA = 10:1-5:1-2:1) с получением 10a (4,9 г) с выходом 58%; LC-MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 515,4$ .

Стадия 2. Соединение 10b.

В одnogорлую колбу объемом 25 мл добавляют 10a (4 г, 7,8 ммоль) и 10 мл DMF, перемешивают при  $0^\circ\text{C}$ , добавляют DBU (1,2 г, 8,0 ммоль) и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч. После завершения контролируемого путем TLC удаления защитной группы Fmoc отставляли реакционный раствор, готовый для применения.

Добавляют M4 (3,3 г, 8,0 ммоль), PyBOP (5,2 г, 10,0 ммоль), HOBT (1,35 г, 10,0 ммоль) и 10 мл DMF в другую одnogорлую колбу объемом 25 мл и добавляют DIPEA (1,65 мл, 10,1 ммоль) на бане с ледяной водой, продолжают перемешивание в течение 50 мин и затем добавляют вышеуказанный реакционный раствор в реакционную колбу, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали путем препаративной LC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую экстрагировали дихлорметаном, промывали с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушивали с помощью безводного сульфата натрия и фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением 2,3 г твердого вещества с выходом 42%; LC-MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 688,8$ .

Стадия 3. Соединение 10c.

Добавляют 10b (1,0 г, 1,45 ммоль) в одnogорлую колбу объемом 25 мл, растворяют в 15 мл DMF до прозрачного состояния, затем добавляют 1,0 г 5% Pd/C и проводят реакцию гидрогенизации в течение 1,5 ч. После завершения реакции проводили фильтрацию с получением фильтрата, который применяли непосредственно на следующей стадии реакции без очистки.

Стадия 4. Соединение 10d.

Неочищенный продукт 10с помещали на баню с ледяной водой, добавляли DIPEA (258 мкл, 1,5 ммоль), и затем добавляли соединение М3 (837 мг, 1,45 ммоль), и затем температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 1 ч. По завершении реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 10d (499 мг); LC-MS:  $[M-H]^- = 842,4$ .

Стадия 5. Соединение 10е.

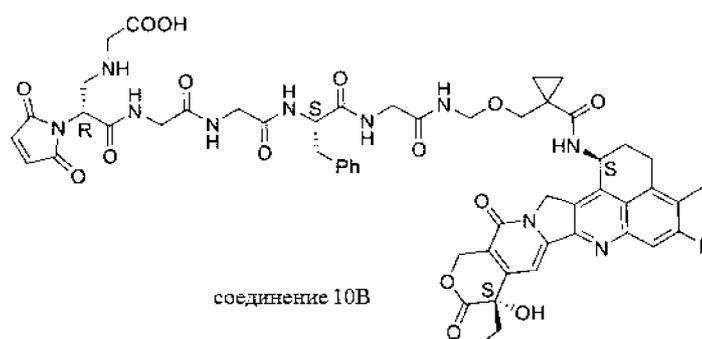
Добавляли 10d (400 мг, 0,48 ммоль), М5 (240 мг, 0,48 ммоль), PyBOP (250 мг, 0,48 ммоль), HOBT (104 мг, 0,48 ммоль) и 15 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляли DIPEA (330 мкл, 2,0 ммоль) на бане с ледяной водой и температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 3 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной соединением 10е, которую лиофилизировали с получением 10е (188 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1261,5$ .

Стадия 6. Соединение 10А.

Добавляли 10е (100 мг, 0,08 ммоль), бромид цинка (360 мг, 1,6 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и реакцию выполняли при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением твердого соединения 10А (61 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1105,4$ .

### Пример 17

Синтез соединения 10В.

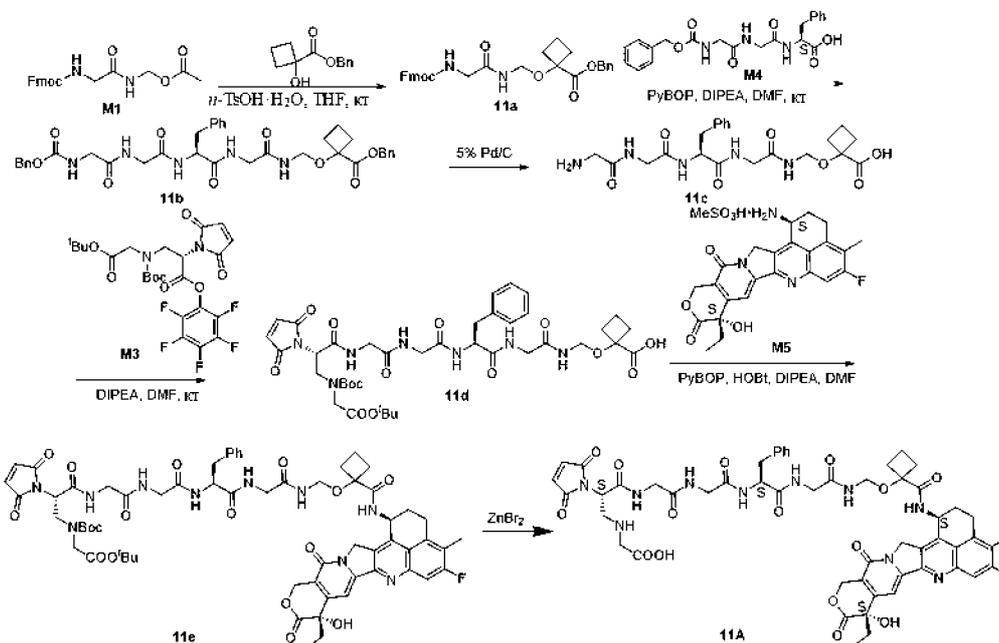


Соединение 10В (75 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 16; LC-

MS:  $[M+H]^+ = 1105,4$ .

### Пример 18

Синтез соединения 11A.



Стадия 1. Соединение 11a.

В одnogорлую колбу объемом 250 мл добавляют M1 (6 г, 16,3 ммоль), 100 мл THF и моногидрат п-толуолсульфоновой кислоты (0,31 г, 1,63 ммоль), перемешивают и охлаждают до 0°C, по каплям добавляют бензил-2-гидрокси-2-циклобутилацетат (синтезировали согласно способу, опубликованному в литературе, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56(13), 5541-5552) (6,7 г, 32,6 ммоль), затем естественным образом нагревают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции (осуществление реакции в течение приблизительно 2-4 ч) с контролем путем TLC. По завершении реакции добавляли насыщенный раствор NaHCO<sub>3</sub> с последующим экстрагированием этилацетатом, промыванием с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушиванием с помощью безводного сульфата натрия, фильтрованием и концентрированием и остаток очищали с помощью колонки с силикагелем (PE:EA = 10:1-5:1-2:1) с получением 11a (5,1 г) с выходом 62%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 515,7$ .

Стадия 2. Соединение 11b.

В одnogорлую колбу объемом 25 мл добавляют 11a (4 г, 7,8 ммоль) и 10 мл DMF, перемешивают при 0°C, добавляют DBU (1,2 г, 8,0 ммоль) и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч. После завершения контролируемого путем TLC удаления защитной группы Fmoc отставляли реакционный раствор, готовый для

применения.

Добавляют М4 (3,3 г, 8,0 ммоль), РуВОР (5,2 г, 10,0 ммоль), НОВt (1,35 г, 10,0 ммоль) и 10 мл DMF в другую одногорлую колбу объемом 25 мл и добавляют DIPEA (1,63 мл, 10,0 ммоль) на бане с ледяной водой, продолжают перемешивание в течение 40 мин, и затем добавляют вышеуказанный реакционный раствор в реакционную колбу, и температуру повышают до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали путем препаративной LC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую экстрагировали дихлорметаном, промывали с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушивали с помощью безводного сульфата натрия и фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением 2,3 г твердого вещества с выходом 42%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 688,3$ .

Стадия 3. Соединение 11c.

Добавляют 11b (2,0 г, 2,9 ммоль) в одногорлую колбу объемом 25 мл, и после растворения с помощью 25 мл DMF добавляют 2,0 г 5% Pd/C, и выполняют реакцию гидрогенизации в течение 3 ч. После завершения реакции полученное фильтровали с получением фильтрата, который применяли непосредственно на следующей стадии реакции без очистки.

Стадия 4. Соединение 11d.

Неочищенный продукт 11c помещали на баню с ледяной водой, добавляли DIPEA (516 мкл, 3,0 ммоль), и затем добавляли соединение М3 (1,7 г, 2,9 ммоль), и затем температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 11d (934 мг); LC-MS:  $[M-H]^- = 842,4$ .

Стадия 5. Соединение 11e.

Добавляют 11d (800 мг, 0,96 ммоль), М5 (480 мг, 0,96 ммоль), РуВОР (500 мг, 0,96 ммоль), НОВt (208 мг, 0,96 ммоль) и 30 мл DMF в одногорлую колбу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (660 мкл, 4,0 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 4 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкости,

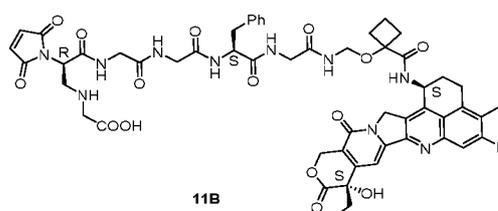
обогащенной соединением 11e, которую лиофилизировали с получением 11e (401 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1261,4$ .

Стадия 6. Соединение 11A.

Добавляли 11e (150 мг, 0,12 ммоль), бромид цинка (532 мг, 2,4 ммоль) и 10 мл нитрометана в одностороннюю колбу объемом 25 мл и реакцию выполняли при 40°C в течение 1 ч. После того, как реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением твердого соединения 11A (86 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1105,4$ .

### Пример 19

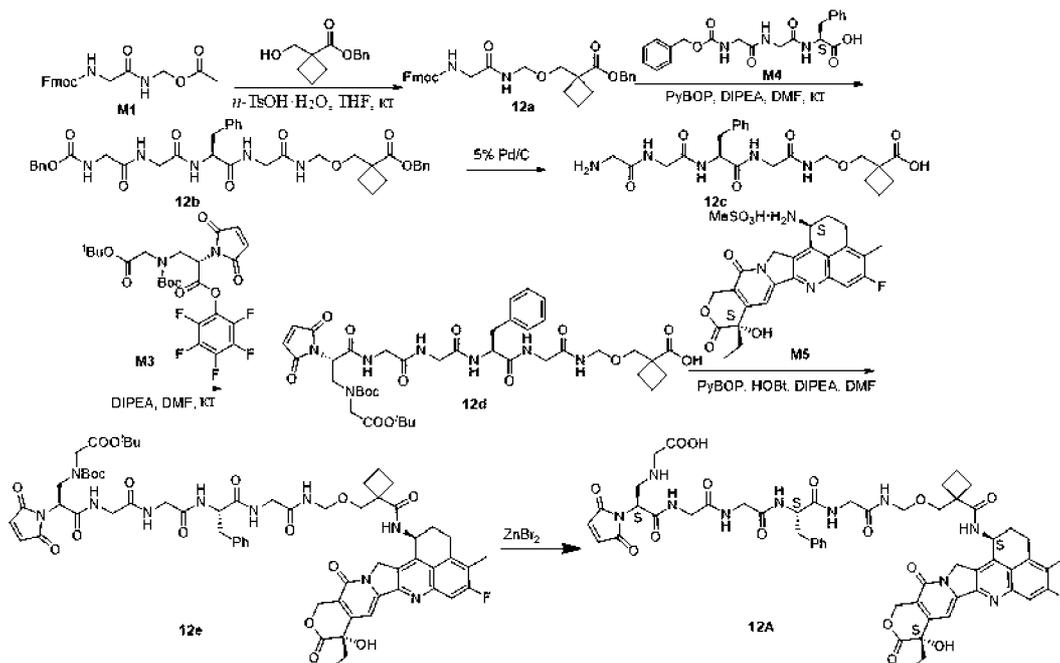
Синтез соединения 11B.



Соединение 11B (50 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 18. LC-MS:  $[M+H]^+ = 1105,4$ .

### Пример 20

Синтез соединения 12A.



Стадия 1. Соединение 12a.

В одnogорлую колбу объемом 250 мл добавляют M1 (6 г, 16,3 ммоль), 100 мл THF и моногидрат п-толуолсульфоновой кислоты (0,31 г, 1,63 ммоль), перемешивают и охлаждают до 0°C, по каплям добавляют бензил-3-гидрокси-2-циклобутилпропионат (получали в соответствии со способом, опубликованным в патенте WO2009011285A1) (7,2 г, 32,6 ммоль). Затем нагревают до комнатной температуры естественным образом с обеспечением осуществления реакции (осуществление реакции в течение приблизительно 2-4 ч) с контролем путем TLC. По завершении реакции добавляли насыщенный раствор NaHCO<sub>3</sub> с последующим экстрагированием этилацетатом, промыванием с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушиванием с помощью безводного сульфата натрия, фильтрованием и концентрированием и остаток очищали с помощью колонки с силикагелем (PE:EA = 10:1-5:1-2:1) с получением 12a (4,5 г) с выходом 52%; LC-MS: [M+H]<sup>+</sup> = 529,4.

Стадия 2. Соединение 12b.

В одnogорлую колбу объемом 25 мл добавляют 12a (4 г, 7,6 ммоль) и 10 мл DMF, перемешивают при 0°C, добавляют DBU (1,2 г, 8,0 ммоль) и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч. После завершения контролируемого путем TLC удаления защитной группы Fmoc отставляли реакционный раствор, готовый для применения.

Добавляют M4 (3,2 г, 7,6 ммоль), RuBOP (4,7 г, 9,0 ммоль), HOBT (1,22 г, 9,0 ммоль) и 10 мл DMF в другую одnogорлую колбу объемом 25 мл, добавляют DIPEA (1,49 мл, 0,9 ммоль) на бане с ледяной водой и продолжают перемешивание в течение 30 мин, затем добавляют вышеуказанный реакционный раствор в реакционную колбу и повышают температуру до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали путем препаративной LC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую экстрагировали дихлорметаном, промывали с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушивали с помощью безводного сульфата натрия и фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением 2,0 г твердого вещества с выходом 37%; LC-MS: [M+H]<sup>+</sup> = 702,8.

Стадия 3. Соединение 12c.

Добавляют 12b (1,0 г, 1,43 ммоль) в одnogорлую колбу объемом 25 мл и растворяют в 15 мл DMF до прозрачного состояния, добавляют 1,0 г 5% Pd/C и выполняют реакцию гидрогенизации в течение 1,5 ч. После завершения реакции

полученное фильтровали с получением фильтрата, который применяли непосредственно на следующей стадии реакции без очистки.

Стадия 4. Соединение 12d.

Помещают неочищенный продукт 12c на баню с ледяной водой, добавляют DIPEA (258 мкл, 1,5 ммоль) и затем соединение M3 (825 мг, 1,43 ммоль), температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 12d (522 мг); LC-MS:  $[M-H]^- = 856,4$ .

Стадия 5. Соединение 12e.

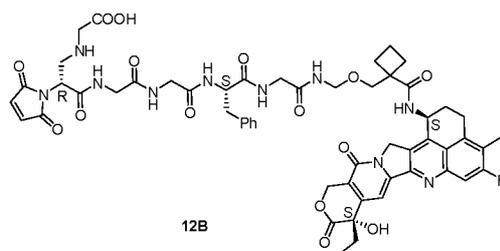
Добавляют 12d (400 мг, 0,47 ммоль), M5 (240 мг, 0,47 ммоль), PyBOP (250 мг, 0,47 ммоль), HOBT (101 мг, 0,47 ммоль) и 15 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (330 мкл, 2,0 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 3 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной соединением 12e, которую лиофилизировали с получением 12e (198 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1275,4$ .

Стадия 6. Соединение 12A.

Добавляют 12e (100 мг, 0,08 ммоль), бромид цинка (360 мг, 1,6 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и выполняют реакцию при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением твердого соединения 12A (55 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1119,4$ .

#### Пример 21

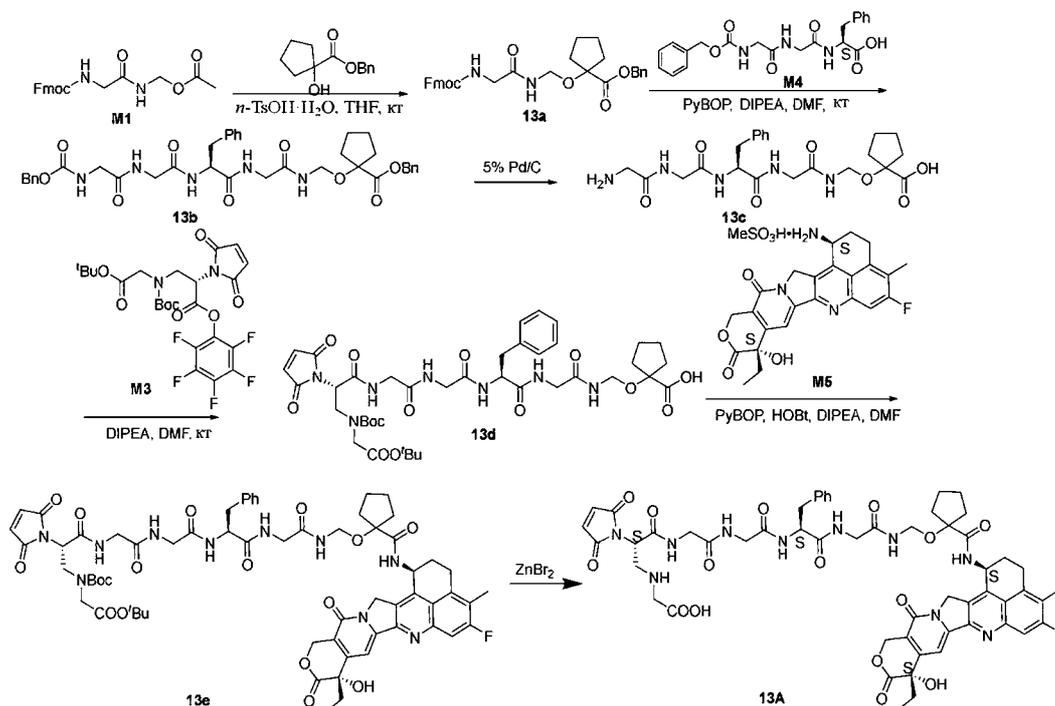
Синтез соединения 12B.



Соединение 12B (50 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 20; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1119,4$ .

### Пример 22

Синтез соединения 13A.



Стадия 1. Соединение 13a.

В одногорлую колбу объемом 250 мл добавляют M1 (6 г, 16,3 ммоль), 100 мл THF и моногидрат п-толуолсульфоновой кислоты (0,31 г, 1,63 ммоль), перемешивают и охлаждают до 0°C, по каплям добавляют бензил-2-гидрокси-2-циклопентилацетат (синтезировали посредством способа, опубликованного в литературе, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56(13), 5541-5552) (7,2 г, 32,6 ммоль), затем естественным образом нагревают до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции (осуществление реакции в течение приблизительно 2-4 ч) с контролем путем TLC. По завершении реакции добавляли насыщенный раствор  $\text{NaHCO}_3$  с последующим экстрагированием этилацетатом, промыванием с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушиванием с помощью безводного сульфата натрия, фильтрованием и концентрированием и остаток очищали с помощью

колонки с силикагелем (PE:EA = 10:1-5:1-2:1) с получением 13a (4,6 г) с выходом 53%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 529,5$ .

Стадия 2. Соединение 13b.

В одnogорлую колбу объемом 25 мл добавляют 13a (4 г, 7,6 ммоль) и 10 мл DMF, перемешивают при 0°C, добавляют DBU (1,17 г, 7,8 ммоль) и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч. После завершения контролируемого путем TLC удаления защитной группы Fmoc отставляли реакционный раствор, готовый для применения.

Добавляют M4 (3,14 г, 7,6 ммоль), RuBOP (4,42 г, 8,5 ммоль), HOBT (1,15 г, 8,5 ммоль) и 10 мл DMF в другую одnogорлую колбу объемом 25 мл, добавляют DIPEA (1,39 мл, 0,85 ммоль) на бане с ледяной водой, продолжают перемешивание в течение 30 мин, и затем добавляют вышеуказанный реакционный раствор в реакционную колбу, и температуру повышают до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали путем препаративной LC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую экстрагировали дихлорметаном, промывали с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушивали с помощью безводного сульфата натрия и фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением 2,1 г твердого вещества с выходом 39%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 702,8$ .

Стадия 3. Соединение 13c.

Добавляли 13b (1,5 г, 1,87 ммоль) в одnogорлую колбу объемом 25 мл, и после растворения с помощью 25 мл DMF добавляли 1,5 г 5% Pd/C, и выполняли реакцию гидрогенизации в течение 3 ч. После завершения реакции проводили фильтрацию и получали фильтрат и применяли непосредственно на следующей стадии реакции без очистки.

Стадия 4. Соединение 13d.

Неочищенный продукт 13c помещали на баню с ледяной водой, добавляли DIPEA (333 мкл, 1,93 ммоль) и затем добавляли соединение M3 (1,1 г, 1,87 ммоль) перед повышением температуры до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 1 ч. По завершении реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 13d (519 мг); LC-MS:  $[M-H]^- = 856,6$ .

Стадия 5. Соединение 13e.

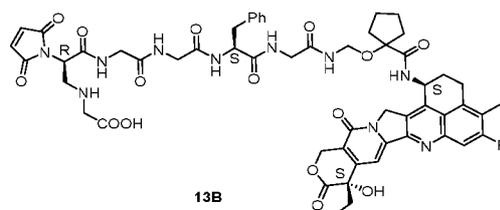
Добавляют 13d (400 мг, 0,47 ммоль), M5 (240 мг, 0,48 ммоль), PyBOP (250 мг, 0,48 ммоль), HOBT (103 мг, 48 ммоль) и 15 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (330 мкл, 2,0 ммоль) на бане с ледяной водой и температуру повышают до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 4 ч. По завершении реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной соединением 13e, которую лиофилизировали с получением 13e (187 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1275,5$ .

Стадия 6. Соединение 13A.

Добавляют 13e (100 мг, 0,08 ммоль), бромид цинка (355 мг, 0,16 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и выполняют реакцию при 40°C в течение 1 ч. По завершении реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением твердого соединения 13A (60 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1119,6$ .

### Пример 23

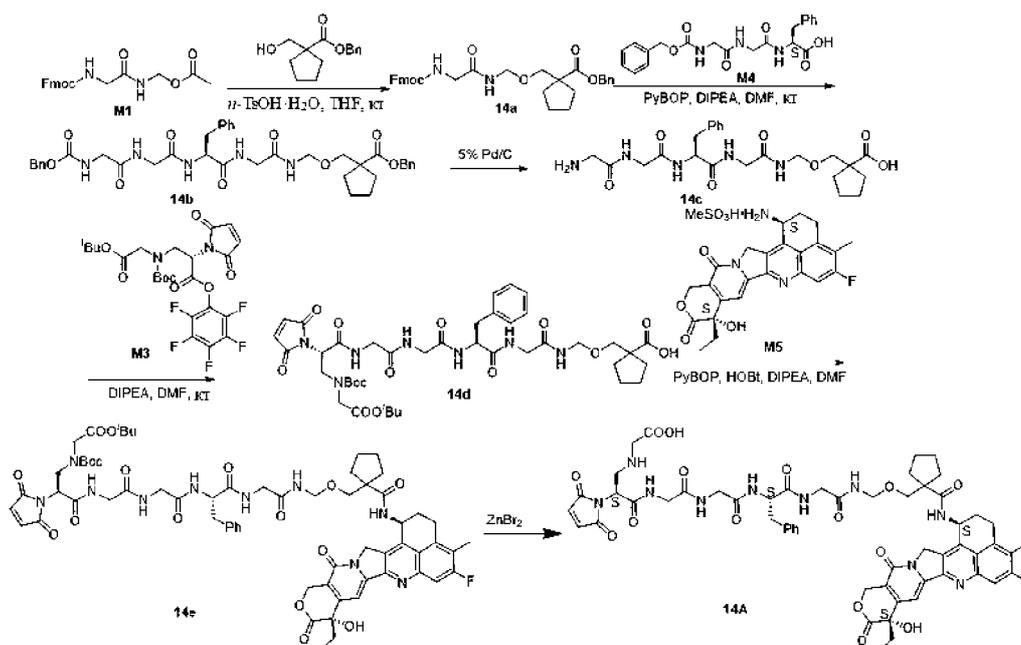
Синтез соединения 13B.



Соединение 13B (51 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 22; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1119,6$ .

### Пример 24

Синтез соединения 14A.



### Стадия 1. Соединение 14а.

В одnogорлую колбу объемом 250 мл добавляют M1 (6 г, 16,3 ммоль), 100 мл THF и моногидрат *p*-толуолсульфоновой кислоты (0,31 г, 1,63 ммоль), перемешивают и охлаждают до 0°C, по каплям добавляют бензил-3-гидрокси-2-циклопентилпропионат (синтезировали посредством способа, опубликованного в патенте WO2009011285A1) (7,6 г, 32,6 ммоль), затем естественным образом нагревают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции (осуществление реакции в течение приблизительно 2-4 ч) с контролем путем TLC. По завершении реакции добавляли насыщенный раствор NaHCO<sub>3</sub> с последующим экстрагированием этилацетатом, промыванием с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушиванием с помощью безводного сульфата натрия, фильтрованием и концентрированием и остаток очищали с помощью колонки с силикагелем (PE:EA = 10:1-5:1-2:1) с получением 14а (4,4 г) с выходом 49%; LC-MS: [M+H]<sup>+</sup> = 543,6.

### Стадия 2. Соединение 14b.

В одnogорлую колбу объемом 25 мл добавляют 14а (4 г, 7,4 ммоль) и 10 мл DMF, перемешивают при 0°C, добавляют DBU (1,2 г, 8,0 ммоль) и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч. После завершения удаления защитной группы Fmoc, как выявлено посредством TLC, оставляли реакционный раствор, готовый для применения.

Добавляют M4 (3,1 г, 7,4 ммоль), PyBOP (4,6 г, 8,8 ммоль), HOBT (1,19 г, 8,8 ммоль) и 10 мл DMF в другую одnogорлую колбу объемом 25 мл, добавляют DIPEA (1,49 мл, 9,0 ммоль) на бане с ледяной водой и продолжают перемешивание в

течение 30 мин, затем добавляют вышеуказанный реакционный раствор в реакционную колбу и повышают температуру до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали путем препаративной LC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую экстрагировали дихлорметаном, промывали с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушивали с помощью безводного сульфата натрия и фильтровали и фильтрат концентрировали при пониженном давлении с получением 2,6 г твердого вещества с выходом 49%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 716,4$ .

Стадия 3. Соединение 14с.

В одnogорлую колбу объемом 25 мл добавляли 14b (1,0 г, 1,4 ммоль), и после растворения с помощью 15 мл DMF добавляли 1,0 г 5% Pd/C, и реакцию гидрогенизации выполняли в течение 1,5 ч. После завершения реакции проводили фильтрацию и получали фильтрат и применяли непосредственно на следующей стадии реакции без очистки.

Стадия 4. Соединение 14d.

Неочищенный продукт 14с помещали на баню с ледяной водой, добавляли DIPEA (248 мкл, 1,5 ммоль), затем добавляли соединение M3 (808 мг, 1,4 ммоль), затем температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 1 ч. Когда реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 14d (500 мг); LC-MS:  $[M-H]^- = 870,5$ .

Стадия 5. Соединение 14е.

Добавляют 14d (400 мг, 0,46 ммоль), M5 (235 мг, 0,46 ммоль), RuBOP (245 мг, 0,46 ммоль), HOBT (99 мг, 0,46 ммоль) и 15 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (331 мкл, 2,0 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 3 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной соединением 14е, которую лиофилизировали с получением 14е (146 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1289,5$ .

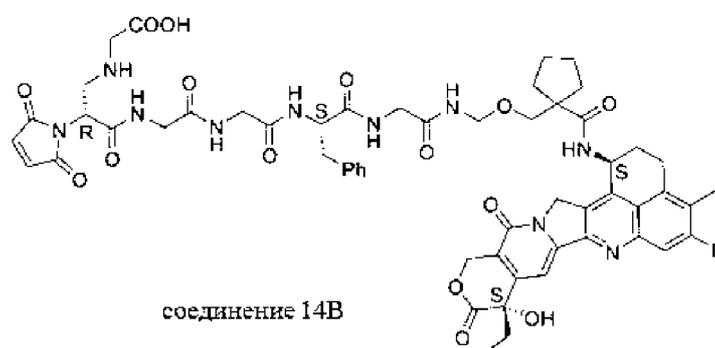
Стадия 6. Соединение 14A.

Добавляли 14е (100 мг, 0,08 ммоль), бромид цинка (360 мг, 1,6 ммоль) и 5 мл

нитрометана в однокорлую колбу объемом 25 мл и реакцию выполняли при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением твердого соединения 14А (52 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1133,4$ .

### Пример 25

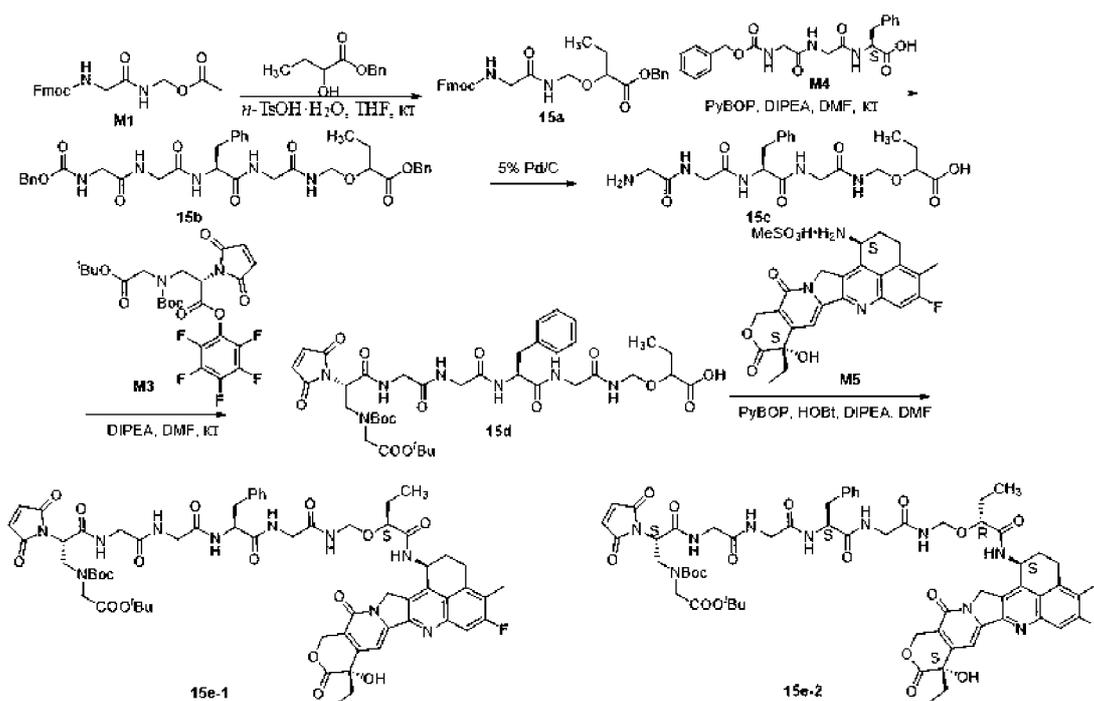
Синтез соединения 14В.



Соединение 14В (48 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 24; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1133,4$ .

### Пример 26

Синтез соединений 15А и 15В.



Стадия 1. Соединение 15а.

В однокорную колбу объемом 250 мл добавляли М1 (10 г, 27,1 ммоль), бензил-2-гидроксипутират (получали посредством способа, опубликованного в литературе, *Chemical Communications*, 2019, 55(53), 7699-7702) (10,5 г, 54,3 ммоль), ацетат цинка (9,96 г, 54,3 ммоль) и 100 мл толуола, нагревали до 100°C и обеспечивали осуществление реакции в течение 4 ч. После того, как реакция завершилась, температуру понижали до комнатной температуры, проводили фильтрацию с удалением нерастворимого материала и фильтрат концентрировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (PE:EA = 10:1-5:1-2:1) с получением 5,67 г целевого материала с выходом 42%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 503,5$ .

Стадия 2. Соединение 15b.

Добавляют 15a (5 г, 9,95 ммоль) и 15 мл DMF в однокорную колбу объемом 50 мл, и после растворения добавляют DBU (1,68 г, 11 ммоль) на бане с ледяной водой, и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч. Реакционный раствор обозначали как реакционный раствор ①.

В другую однокорную колбу объемом 50 мл добавляли М4 (4,1 г, 10,0 ммоль), PyBOP (5,75 г, 11 ммоль), HOBT (1,49 г, 11 ммоль) и 10 мл DMF, и после растворения добавляли DIPEA (1,82 мл, 11 ммоль) на бане с ледяной водой, и реакцию продолжали в течение 40 мин, затем добавляли реакционный раствор ① и температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч. Протекание реакции контролировали посредством HPLC. После завершения реакции реакционный раствор очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением обогащенной жидкости. Обогащенную жидкость экстрагировали дихлорметаном, промывали с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушивали с помощью безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали с получением 4,6 г твердого вещества с выходом 68%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 676,7$ .

Стадия 3. Соединение 15d.

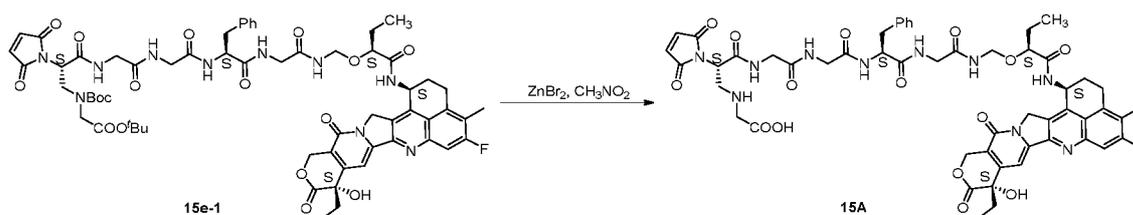
Добавляют 15b (2,0 г, 2,96 ммоль) в однокорную колбу объемом 25 мл, растворяют в 15 мл DMF, затем добавляют 2,0 г 5% Pd/C и проводят реакцию гидrogenизации в течение 2 ч. После завершения реакции выполняли фильтрацию и фильтрат помещали на баню, содержащую ледяную воду, и добавляли DIPEA (496 мкл, 3,0 ммоль) с последующим добавлением М3 (1,7 г, 2,96 ммоль) и затем температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 1 ч. Когда реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор

очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 1120,0 мг продукта с выходом 45%; LC-MS:  $[M-H]^- = 830,3$ .

#### Стадия 4. Соединение 15e.

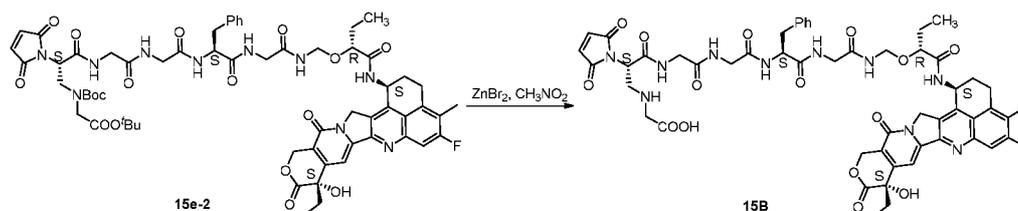
Добавляют 15d (500 мг, 0,60 ммоль), M5 (321 мг, 0,60 ммоль), RuBOP (469 мг, 0,90 ммоль), HOBT (121 мг, 0,90 ммоль) и 15 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (446 мкл, 2,7 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкостей, обогащенных соединением 15e-1 и соединением 15e-2, и обогащенные жидкости лиофилизировали с получением 138 мг соединения 15e-1, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1249,5$ , и 140 мг соединения 15e-2, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1249,5$ , соответственно.

#### Стадия 5. Соединение 15A.



Добавляют 15e-1 (100 мг, 0,08 ммоль), бромид цинка (360 мг, 1,6 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 59 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1093,4$ .

#### Стадия 6. Соединение 15B.

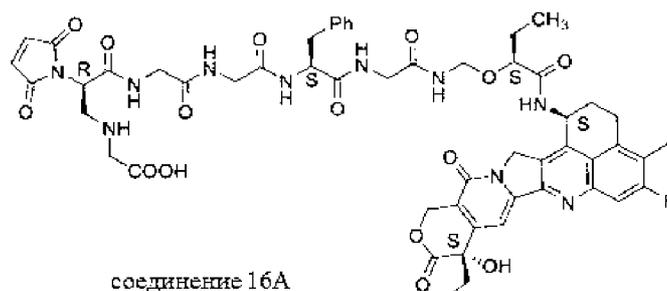


Добавляют 15e-2 (100 мг, 0,08 ммоль), бромид цинка (360 мг, 1,6 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено

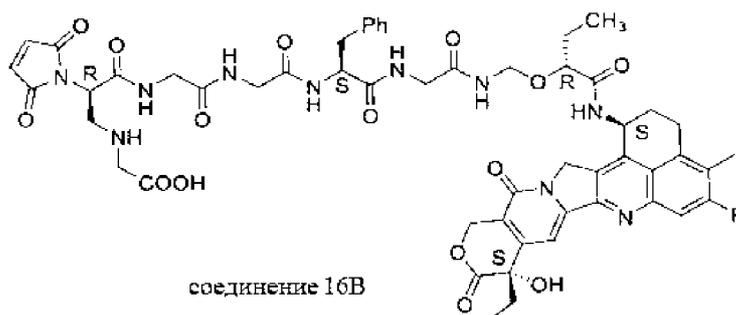
посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 60 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1093,4$ .

### Пример 27

Синтез соединений 16A и 16B.



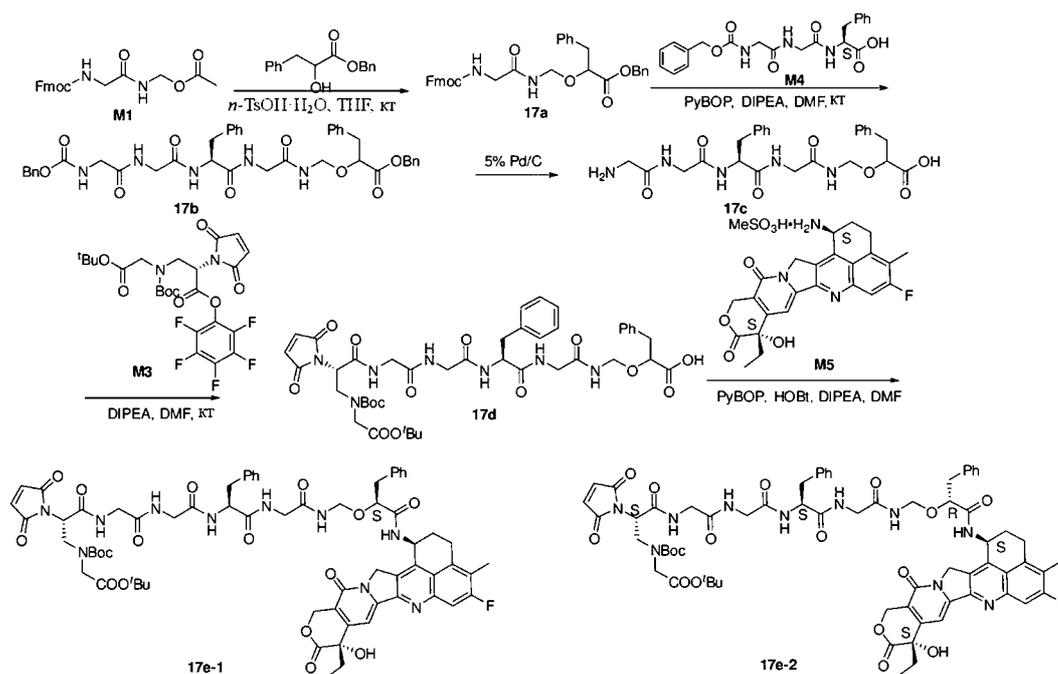
Соединение 16A (55 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 26; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1093,4$ .



Соединение 16B (54 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 26; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1093,4$ .

### Пример 28

Синтез соединений 17A и 17B.



### Стадия 1. Соединение 17а.

Добавляют **M1** (10 г, 27,1 ммоль), бензил-2-гидроксифенилпропионат (синтезировали посредством способа, опубликованного в литературе, *Nature Communications*, 2020, 11(1), 56) (14,7 г, 54,3 ммоль), ацетат цинка (9,96 г, 54,3 ммоль) и 100 мл толуола в одnogорлую колбу объемом 250 мл, нагревают до 100°C и обеспечивают осуществление реакции в течение 4 ч. После того, как реакция завершилась, температуру снижали до комнатной температуры, фильтрацию проводили с удалением нерастворимого материала и фильтрат концентрировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (PE:EA = 10:1-5:1-2:1) с получением 6,13 г целевого материала с выходом 40%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 565,6$ .

### Стадия 2. Соединение 17b.

В одnogорлую колбу объемом 50 мл добавляют **17a** (5 г, 8,86 ммоль) и 15 мл DMF, и после растворения добавляют DBU (1,53 г, 10 ммоль) на бане с ледяной водой, и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч, и обозначают реакционный раствор как реакционный раствор ①.

В другую одnogорлую колбу объемом 50 мл добавляют **M4** (3,6 г, 8,86 ммоль), PyBOP (5,23 г, 10 ммоль), HOBT (1,36 г, 10 ммоль) и 10 мл DMF, и после растворения добавляют DIPEA (1,65 мл, 10 ммоль) на бане с ледяной водой, и продолжают осуществление реакции в течение 30 мин, затем добавляют реакционный раствор ①, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление

реакции в течение 2 ч. Протекание реакции контролировали посредством HPLC. После завершения реакции реакционный раствор очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением обогащенной жидкости. Обогащенную жидкость экстрагировали дихлорметаном, промывали с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушивали с помощью безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали с получением 5,0 г твердого вещества с выходом 77%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 738,3$ .

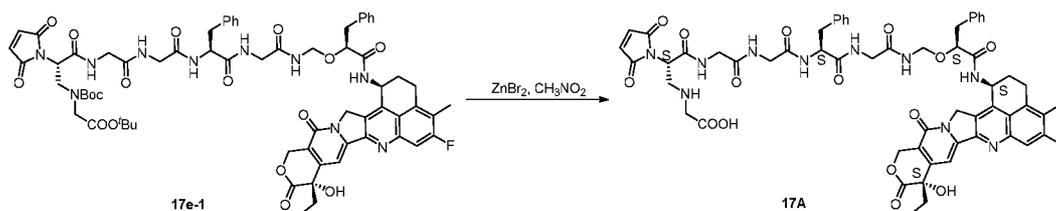
### Стадия 3. Соединение 17d.

Добавляют 17b (3,0 г, 4,07 ммоль) в одnogорлую колбу объемом 25 мл, и после растворения с помощью 15 мл DMF добавляют 3,0 г 5% Pd/C, и проводят реакцию гидрогенизации в течение 2 ч. Когда реакция завершилась, проводили фильтрацию, фильтрат помещали на баню с ледяной водой, и добавляли DIPEA (744 мкл, 4,5 ммоль) с последующим добавлением M3 (2,34 г, 4,07 ммоль), и затем температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 1 ч. Когда реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 1,2 г продукта с выходом 33%; LC-MS:  $[M-H]^- = 892,4$ .

### Стадия 4. Соединение 17e.

Добавляли 17d (500 мг, 0,56 ммоль), M5 (300 мг, 0,56 ммоль), RuBOP (438 мг, 0,84 ммоль), HOBT (113 мг, 0,84 ммоль) и 15 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляли DIPEA (330 мкл, 2,0 ммоль) на бане с ледяной водой и температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч. После того, как реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкостей, обогащенных соединением 17e-1 и соединением 17e-2, и обогащенные жидкости лиофилизировали с получением 156 мг соединения 17e-1, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1311,4$ , и 150 мг соединения 17e-2, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1311,7$ , соответственно.

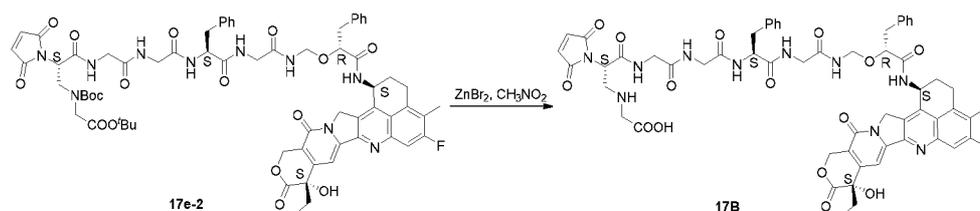
### Стадия 5. Соединение 17A.



Добавляли 17e-1 (100 мг, 0,08 ммоль), бромид цинка (360 мг, 1,6 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и реакцию выполняли при 40°C в

течение 1 ч. После того, как реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 43 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1155,4$ .

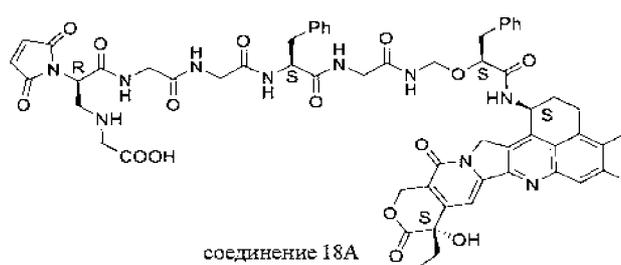
Стадия 6. Соединение 17B.



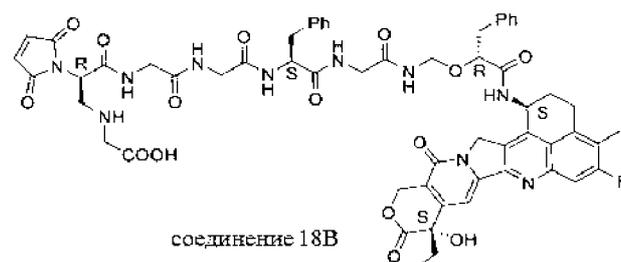
Добавляли 17e-2 (100 мг, 0,08 ммоль), бромид цинка (360 мг, 1,6 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и реакцию выполняли при 40°C в течение 1 ч. После того, как реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 40 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1155,4$ .

### Пример 29

Синтез соединений 18A и 18B.



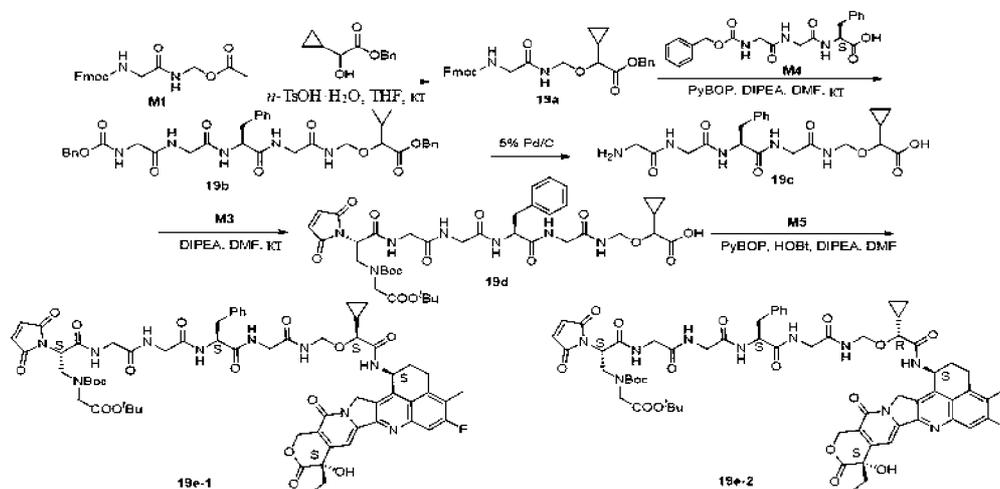
Соединение 18A (54 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 28; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1155,4$ .



Соединение 18В (55 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 28; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1155,4$ .

### Пример 30

Синтез соединений 19А и 19В.



Стадия 1. Соединение 19а.

Добавляют M1 (10 г, 27,1 ммоль), бензил-2-циклопропил-2-гидроксиацетат (получали в соответствии со способом, опубликованным в патенте WO2020244657A1) (11,2 г, 54,3 ммоль), ацетат цинка (9,96 г, 54,3 ммоль) и 100 мл толуола в одnogорлую колбу объемом 250 мл, нагревают до 100°C и обеспечивают осуществление реакции в течение 4 ч. Когда реакция завершилась, температуру снижали до комнатной температуры, проводили фильтрование с удалением нерастворимого материала и фильтрат концентрировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (PE:EA = 10:1-5:1-2:1) с получением 4,97 г целевого материала с выходом 36%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 515,2$ .

Стадия 2. Соединение 19b.

Добавляют 19а (4 г, 7,8 ммоль) и 10 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, и после растворения добавляют DBU (1,42 г, 9,3 ммоль) на бане с ледяной водой, и обеспечивают осуществление реакции в течение 1 ч. Реакционный раствор обозначали как реакционный раствор ①.

В другую одnogорлую колбу объемом 50 мл добавляли M4 (3,2 г, 7,8 ммоль), PyBOP (4,5 г, 8,6 ммоль), HOBT (1,16 г, 8,6 ммоль) и 10 мл DMF, и после растворения добавляли DIPEA (1,65 мл, 10 ммоль) на бане с ледяной водой, и реакцию продолжали в течение 30 мин, затем добавляли реакционный раствор ① и температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч. Протекание реакции контролировали посредством HPLC и после завершения реакции

реакционный раствор очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением обогащенной жидкости. Обогащенную жидкость экстрагировали дихлорметаном, промывали с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушивали с помощью безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали с получением 4,2 г твердого вещества с выходом 78%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 688,3$ .

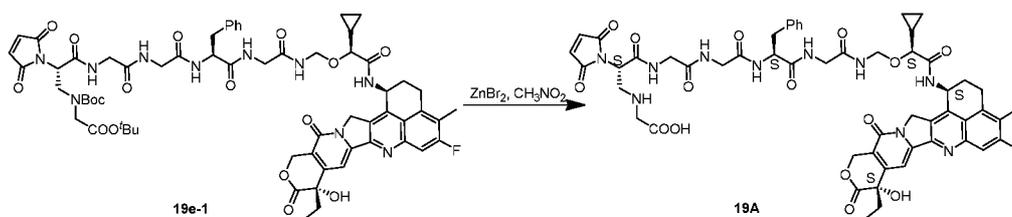
Стадия 3. Соединение 19d.

В одногорлую колбу объемом 25 мл добавляли 19b (1000 мг, 1,45 ммоль), и после растворения с помощью 15 мл DMF добавляли 1000 мг 5% Pd/C, и реакцию гидрогенизации проводили в течение 2 ч. Когда реакция завершилась, проводили фильтрование, фильтрат помещали на баню с ледяной водой, и добавляли DIPEA (248 мкл, 1,5 ммоль) с последующим добавлением M3 (720 мг, 1,45 ммоль), и затем температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 1 ч. Когда реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 503 мг продукта с выходом 41%; LC-MS:  $[M-H]^- = 842,3$ .

Стадия 4. Соединения 19e-1 и 19e-2.

Добавляли 19d (500 мг, 0,59 ммоль), M5 (317 мг, 0,59 ммоль), PyBOP (339 мг, 0,65 ммоль), HOBT (88 мг, 0,86 ммоль) и 10 мл DMF в одногорлую колбу объемом 50 мл, и добавляли DIPEA (292 мкл, 1,77 ммоль) на бане с ледяной водой, и температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч. После того, как реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкостей, обогащенных соединением 19e-1 и соединением 19e-2, и обогащенные жидкости лиофилизировали с получением 112 мг соединения 19e-1, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1261,5$ , и 131 мг соединения 19e-2, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1261,5$ , соответственно.

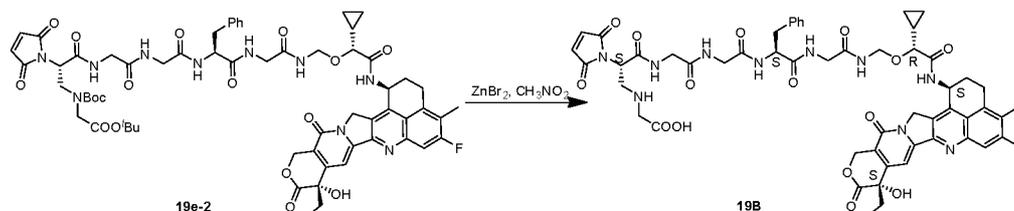
Стадия 5. Соединение 19A.



Добавляли 19e-1 (100 мг, 0,079 ммоль), бромид цинка (357 мг, 1,59 ммоль) и 5 мл нитрометана в одногорлую колбу объемом 25 мл и реакцию выполняли при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC,

растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 55 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1105,4$ .

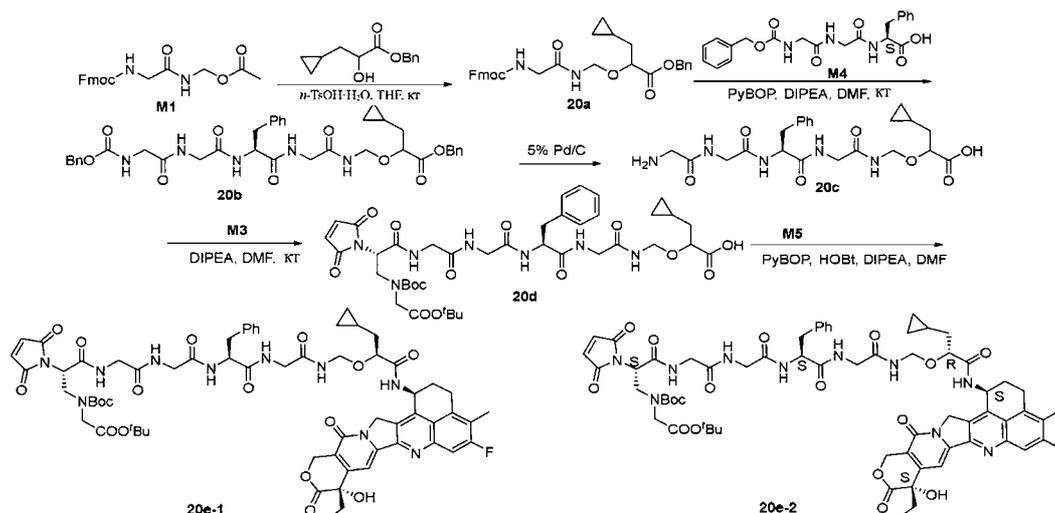
Стадия 6. Соединение 19В.



Добавляли 19e-2 (100 мг, 0,079 ммоль), бромид цинка (357 мг, 1,59 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и реакцию выполняли при 40°C в течение 1 ч. После того, как реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 58 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1105,4$ .

### Пример 31

Синтез соединений 20A и 20B.



Стадия 1. Соединение 20a.

Добавляют M1 (10 г, 27,1 ммоль), бензил-2-гидроксициклопропилпропионат (синтезировали посредством способа, опубликованного в патенте WO2020063676A) (12,0 г, 54,3 ммоль), ацетат цинка (9,96 г, 54,3 ммоль) и 100 мл толуола в одnogорлую

колбу объемом 250 мл, нагревают до 100°C и обеспечивают осуществление реакции в течение 4 ч. Когда реакция завершается, температуру снижают до комнатной температуры. Фильтруют с удалением нерастворимого материала и фильтрат концентрируют с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (PE:EA = 10:1-5:1-2:1) с получением 5,09 г целевого материала; LC-MS:  $[M+H]^+ = 529,2$ .

Стадия 2. Соединение 20b.

Добавляли 20a (4 г, 7,6 ммоль) и 10 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, и после растворения добавляли DBU (1,39 г, 9,1 ммоль) на бане с ледяной водой, и реакцию выполняли в течение 1 ч, и реакционный раствор обозначали как реакционный раствор ①.

В другую одnogорлую колбу объемом 50 мл добавляли M4 (3,12 г, 7,6 ммоль), RuBOP (4,5 г, 8,6 ммоль), HOBT (1,16 г, 8,6 ммоль) и 10 мл DMF, и после растворения добавляли DIPEA (1,65 мл, 10 ммоль) на бане с ледяной водой, и реакцию продолжали в течение 30 мин, и затем добавляли реакционный раствор ①, и температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч. Проводили HPLC для контроля протекания реакции, и когда реакция завершилась, реакционный раствор очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением обогащенной жидкости. Обогащенную жидкость экстрагировали дихлорметаном, промывали с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушивали с помощью безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали с получением 4,5 г твердого вещества с выходом 84%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 702,3$ .

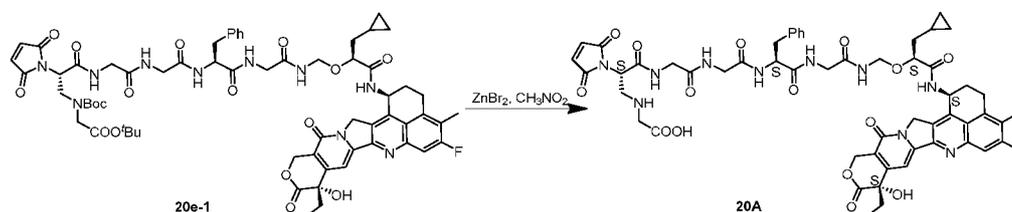
Стадия 3. Соединение 20d.

Добавляют 20b (1000 мг, 1,42 ммоль) в одnogорлую колбу объемом 25 мл, и после растворения с помощью 15 мл DMF добавляют 1000 мг 5% Pd/C, и проводят реакцию гидрогенизации в течение 2 ч. После того, как реакция завершилась, проводили фильтрацию, фильтрат помещали на баню с ледяной водой, и затем добавляли DIPEA (248 мкл, 1,5 ммоль) с последующим добавлением M5 (708 мг, 1,42 ммоль), и температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 1 ч. Когда реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 443 мг продукта с выходом 36%; LC-MS:  $[M-H]^- = 856,4$ .

Стадия 4. Соединения 20e-1 и 20e-2.

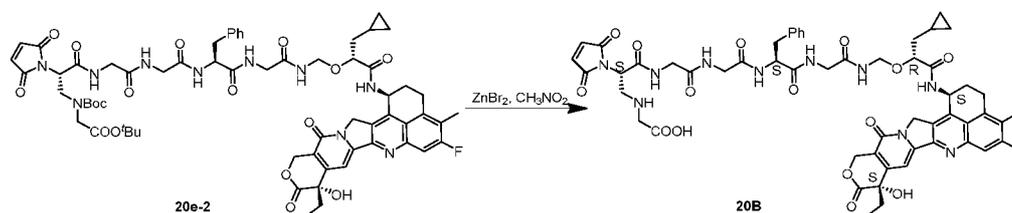
Добавляли 20d (400 мг, 0,47 ммоль), мезилат экзатекана (250 мг, 0,47 ммоль), РуВОР (223 мг, 0,56 ммоль), НОВт (83 мг, 0,56 ммоль) и 10 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляли DIPEA (248 мкл, 1,5 ммоль) на бане с ледяной водой и температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч. После того, как реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкостей, обогащенных соединением 20e-1 и соединением 20e-2, которые лиофилизировали с получением 103 мг соединения 20e-1, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1275,5$ , и 103 мг соединения 20e-2, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1275,5$ , соответственно.

Стадия 5. Соединение 20A.



В одnogорлую колбу объемом 25 мл добавляли 8A (100 мг, 0,078 ммоль), бромид цинка (352 мг, 1,57 ммоль) и 5 мл нитрометана и реакцию выполняли при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 51 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1119,4$ .

Стадия 6. Соединение 20B.

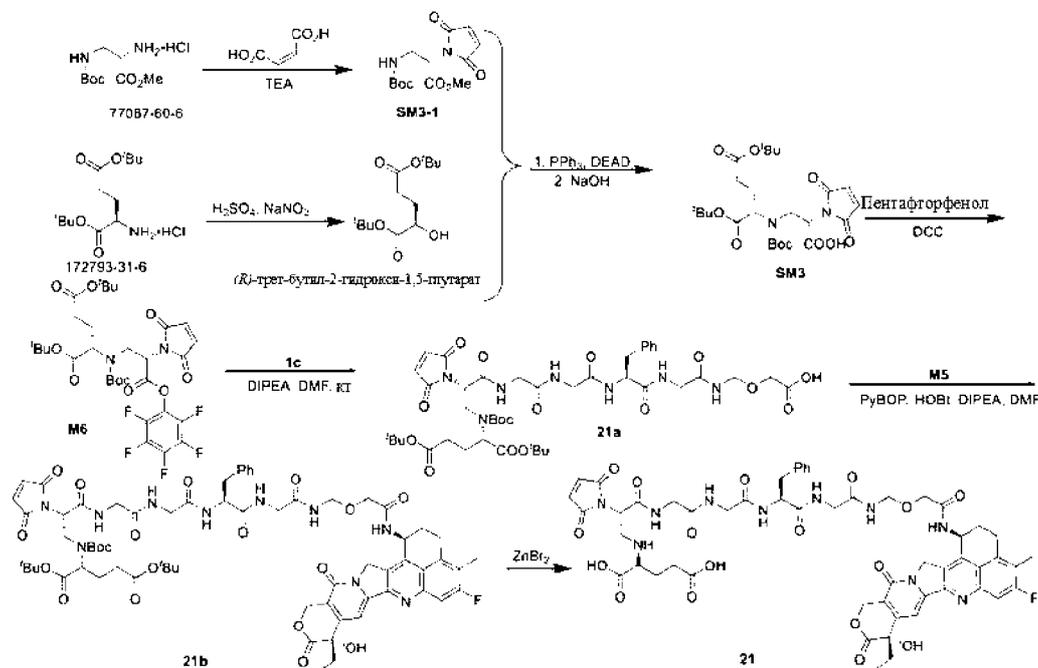


Добавляли 20e-2 (100 мг, 0,079 ммоль), бромид цинка (357 мг, 1,59 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и реакцию выполняли при 40°C в течение 1 ч. После того, как реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и

обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 47 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1119,4$ .

### Пример 32

Синтез соединения 21.



Стадия 1. Соединение SM3-1.

Добавляют 77087-60-6 (100 г, 458 ммоль), малеиновую кислоту (53,4 г, 460 ммоль), TEA (64 мл, 460 ммоль) и 1000 мл толуола в одnogорлую колбу объемом 2000 мл и нагревают до 100°C с обеспечением осуществления реакции в течение 5 ч. После того, как реакция завершилась, температуру снижали до комнатной температуры, и затем проводили фильтрование с удалением нерастворимого материала, и фильтрат концентрировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (PE:EA = 100:1-50:1-20:1) с получением 75,6 г целевого материала; LC-MS:  $[M+H]^+ = 299,1$ .

Стадия 2. Соединение (R)-трет-бутил-2-гидрокси-1,5-глутарат.

Добавляют 172793-31-6 (100 г, 338 ммоль) и 1000 мл воды в одnogорлую колбу объемом 2000 мл, затем последовательно добавляют нитрит натрия (35 г, 507 ммоль) и концентрированную серную кислоту (32 мл, 35 ммоль) и медленно повышают температуру до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 24 ч. После того, как реакция завершилась, три раза проводили экстракцию с помощью 500 мл этилацетата и органическую фазу высушивали с помощью безводного сульфата натрия, фильтровали, и концентрировали при пониженном

давлении с удалением растворителя, и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (PE:EA = 50:1-30:1-2:1) с получением 91,2 г целевого материала; LC-MS:  $[M+H]^+ = 261,4$ .

Стадия 3. Соединение SM3.

Добавляют (*R*)-трет-бутил-2-гидрокси-1,5-глутарат (50 г, 192 ммоль) и 1000 мл безводного тетрагидрофурана в одnogорлую колбу объемом 2000 мл, температуру охлаждают до 0°C на бане с ледяной водой, затем последовательно добавляют PPh<sub>3</sub> (87,7 г, 288 ммоль), DEAD (50,2 г, 288 ммоль) и SM3-1 (57,3, 192 ммоль). Температуру медленно повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 13 ч. После завершения реакции нерастворимый материал удаляли посредством фильтрации и фильтрат концентрировали с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (PE:EA = 50:1-30:1-1:1) с получением 68,6 г продукта.

Вышеуказанный продукт растворяли в 500 мл метанола, охлаждали до 0°C на бане с ледяной водой, по каплям добавляли NaOH (64 мл, 190 ммоль, 3 моль/л) при данной температуре и реакцию проводили в течение 12 ч при поддержании данной температуры. Далее pH доводили до 3 путем добавления HCl (6 моль/л), пять раз проводили экстракцию с помощью 500 мл дихлорметана, проводили высушивание с помощью безводного сульфата натрия с последующим фильтрованием, фильтрат концентрировали при пониженном давлении и полученный неочищенный продукт очищали путем колоночной хроматографии (DCM/MeOH = 50/1-20/1-2/1) с получением 50,4 г SM3; LC-MS:  $[M-H]^- = 525,5$ .

Стадия 4. Соединение M6.

В одnogорлую колбу объемом 2000 мл добавляли соединение SM3 (50 г, 95 ммоль, 1,0 экв.), пентафторфенол (19,2 г, 104,5 ммоль, 1,1 экв.), DCC (21,5 г, 104,5 ммоль, 1,1 экв.) и THF (600 мл), и реакцию выполняли при комнатной температуре в течение 1 ч (контролировали посредством TLC), и нерастворимый материал отфильтровывали. Реакционный раствор очищали непосредственно путем препаративной LC и обогащенную жидкость концентрировали при 35°C на водяной бане при пониженном давлении с помощью водяного насоса с удалением ацетонитрила и лиофилизировали с получением соединения M6 (51,9 г) с выходом 79%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 693,3$ .

Стадия 5. Соединение 21a.

В одnogорлую колбу объемом 25 мл добавляли 1с (1 г, 2,36 ммоль) и после растворения с помощью 25 мл DMF добавляли DIPEA (430 мкл, 2,6 ммоль) затем

добавляли М6 (1177 мг, 2,36 ммоль) и затем температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 1 ч. Завершение реакции определяли посредством HPLC и реакционный раствор очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 555 мг продукта; LC-MS:  $[M-H]^- = 931,0$ .

#### Стадия 6. Соединение 21b.

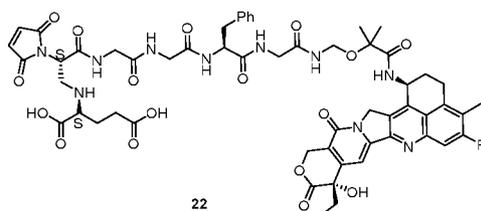
В однокорную колбу объемом 100 мл добавляли 21a (500 мг, 0,54 ммоль), мезилат экзатекана М5 (285 мг, 0,54 ммоль), PyBOP (239 мг, 0,6 ммоль), HOBT (239 мг, 0,6 ммоль) и 10 мл DMF, добавляли DIPEA (248 мкл, 1,5 ммоль) на бане с ледяной водой и температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной соединением 21b, которую лиофилизировали с получением 231 мг соединения; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1349,5$ .

#### Стадия 7. Соединение 21.

Соединение 21b (200 мг, 0,1488 ммоль), бромид цинка (665 мг, 2,96 ммоль) и 10 мл нитрометана добавляли в однокорную колбу объемом 25 мл и реакцию выполняли при 40°C в течение 1 ч. После того, как реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 103 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1137,5$ .

#### Пример 33

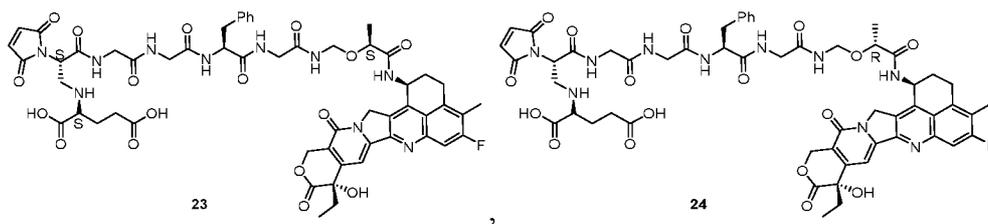
##### Синтез соединения 22.



С применением соединений М6 и 3с в качестве исходных материалов и со ссылкой на путь синтеза из примера 32 получали соединение 22 (91 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1165,5$ .

#### Пример 34

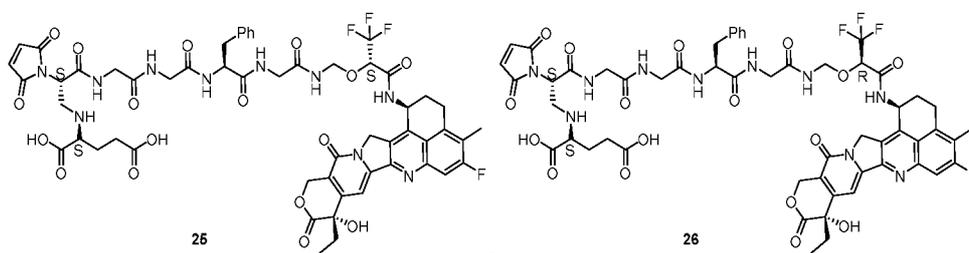
Синтез соединений 23 и 24.



С применением соединений М6 и 5с в качестве исходных материалов и со ссылкой на путь синтеза из примера 32 получали 102 мг соединения 23, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1151,4$ ; получали 99 мг соединения 24, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1151,4$ .

#### Пример 35

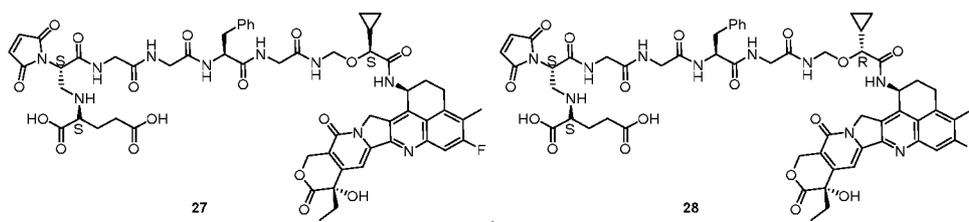
Синтез соединений 25 и 26.



С применением соединений М6 и 7с в качестве исходных материалов и со ссылкой на путь синтеза из примера 32 получали 83 мг соединения 25, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1205,7$ ; получали 80 мг соединения 26, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1205,7$ .

#### Пример 36

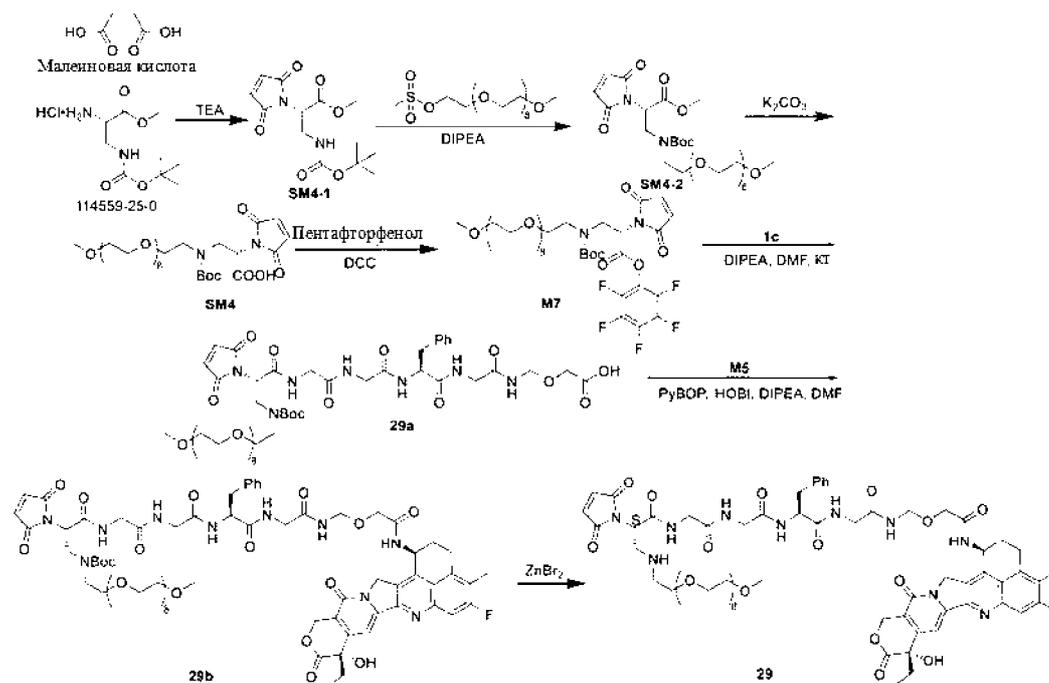
Синтез соединений 27 и 28.



С применением соединений М6 и 19с в качестве исходных материалов и со ссылкой на путь синтеза из примера 32 получали 100 мг соединения 27, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1177,5$ ; получали 101 мг соединения 28, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1177,5$ .

#### Пример 37

Синтез соединения 29.



### Стадия 1. Соединение SM4-1.

В одnogорлую колбу объемом 5000 мл добавляли малеиновую кислоту (50 г, 431 ммоль, 1,0 экв.), 114559-25-0 (110 г, 431 ммоль, 1 экв.), TEA (263 г, 2,16 моль, 5 экв.) и толуол (2000 мл), проводили нагревание с обеспечением осуществления реакции с обратным холодильником в течение 5 ч (контролировали посредством TLC) и нерастворимый материал отфильтровывали. Реакционный раствор непосредственно подвергали ротационной перегонке при пониженном давлении с удалением растворителя и остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (PE/EA = 50/1-20/1-1/1) с получением SM4-1 (64,7 г) с выходом 50%; LC-MS: [M+H]<sup>+</sup> = 299,2.

### Стадия 2. Соединение SM4-2.

Добавляли SM4-1 (64 г, 215 ммоль) в одnogорлую колбу объемом 2000 мл и после растворения с помощью 1000 мл DMF добавляли DIPEA (71 мл, 430 ммоль), и затем добавляли метансульфонат монометилового эфира нонаэтиленгликоля (111,5 г, 220 ммоль), и затем температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч. Завершение реакции определяли посредством HPLC и реакционный раствор очищали путем колоночной хроматографии на силикагеле (PE/EA = 50/1-20/1-1/1) с получением 59,9 г продукта; LC-MS: [M+H]<sup>+</sup> = 709,4.

### Стадия 3. Соединение SM4.

Добавляли SM4-2 (59 г, 83 ммоль) в одnogорлую колбу объемом 2000 мл и после растворения с помощью 1000 мл MeOH добавляли K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (11,75 г, 85 ммоль) и затем выполняли реакцию при комнатной температуре в течение 4 ч. Когда реакция

завершилась, как выявлено посредством HPLC, нерастворимые материалы удаляли посредством фильтрации, и реакционный раствор очищали непосредственно путем препаративной LC, и обогащенную жидкость концентрировали при 35°C на водяной бане при пониженном давлении с помощью водяного насоса с удалением ацетонитрила и затем лиофилизировали с получением соединения SM4 (27 г); LC-MS:  $[M-H]^- = 693,5$ .

#### Стадия 4. Соединение M7.

В одnogорлую колбу объемом 500 мл добавляли соединение SM4 (25 г, 36 ммоль, 1,0 экв.), пентафторфенол (7,3 г, 40 ммоль, 1,1 экв.), DCC (8,2 г, 40 ммоль, 1,1 экв.) и THF (200 мл), реакцию выполняли при комнатной температуре в течение 1 ч (контролировали посредством TLC) и нерастворимый материал отфильтровывали. Реакционный раствор очищали непосредственно путем препаративной LC и обогащенную жидкость концентрировали при 35°C на водяной бане при пониженном давлении с помощью водяного насоса с удалением ацетонитрила и лиофилизировали с получением соединения M7 (23,3 г) с выходом 93%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 695,8$ .

#### Стадия 5. Соединение 29a.

В одnogорлую колбу объемом 25 мл добавляли 1с (1 г, 2,36 ммоль) и после растворения с помощью 25 мл DMF добавляли DIPEA (430 мкл, 2,6 ммоль) затем добавляли M7 (1640 мг, 2,36 ммоль) и затем температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 1 ч. Завершение реакции определяли посредством HPLC и реакционный раствор очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 609 мг продукта; LC-MS:  $[M-H]^- = 1098,5$ .

#### Стадия 6. Соединение 29b.

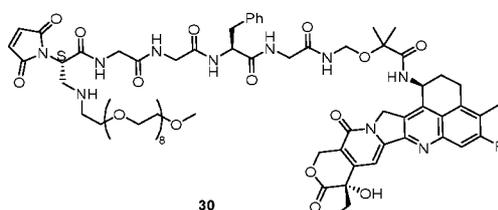
Добавляли 29a (500 мг, 0,45 ммоль), мезилат экзатекана M5 (240 мг, 0,45 ммоль), PyBOP (215 мг, 0,54 ммоль), HOBT (215 мг, 0,54 ммоль) и 10 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 100 мл, добавляли DIPEA (248 мкл, 1,5 ммоль) на бане с ледяной водой и температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной соединением 29b, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 187 мг соединения; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1517,6$ .

#### Стадия 7. Соединение 29

Соединение 29b (150 мг, 0,988 ммоль), бромид цинка (223 мг, 0,988 ммоль) и 10 мл нитрометана добавляли в однокорную колбу объемом 25 мл и реакцию выполняли при 40°C в течение 1 ч. После того, как реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 114 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1517,9$ .

### Пример 38

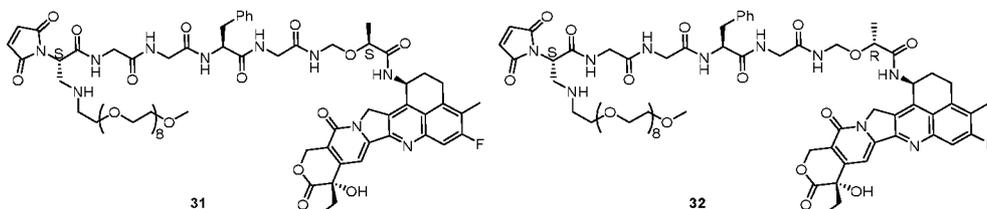
Синтез соединения 30.



С применением соединений M7 и 3с в качестве исходных материалов и со ссылкой на путь синтеза из примера 37 получали соединение 30 (125 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1445,6$ .

### Пример 39

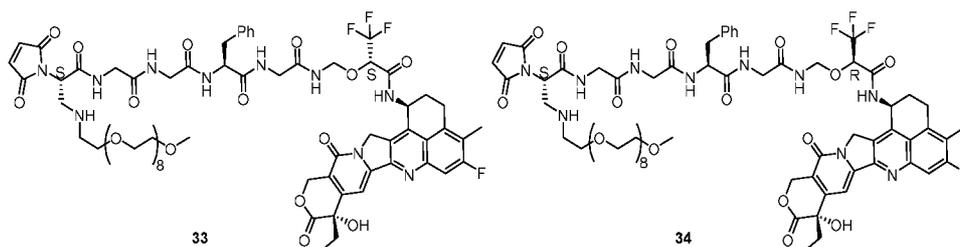
Синтез соединений 31 и 32.



С применением соединений M7 и 5с в качестве исходных материалов и со ссылкой на путь синтеза из примера 37 получали 61 мг соединения 31, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1431,7$ ; получали 63 мг соединения 32, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1431,7$ .

### Пример 40

Синтез соединений 33 и 34.

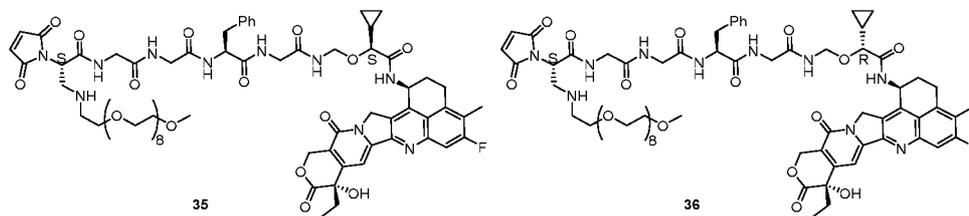


С применением соединений M7 и 7с в качестве исходных материалов со ссылкой

на путь синтеза из примера 37 получали 60 мг соединения 33, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1485,6$ ; получали 58 мг соединения 34, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1485,6$ .

### Пример 41

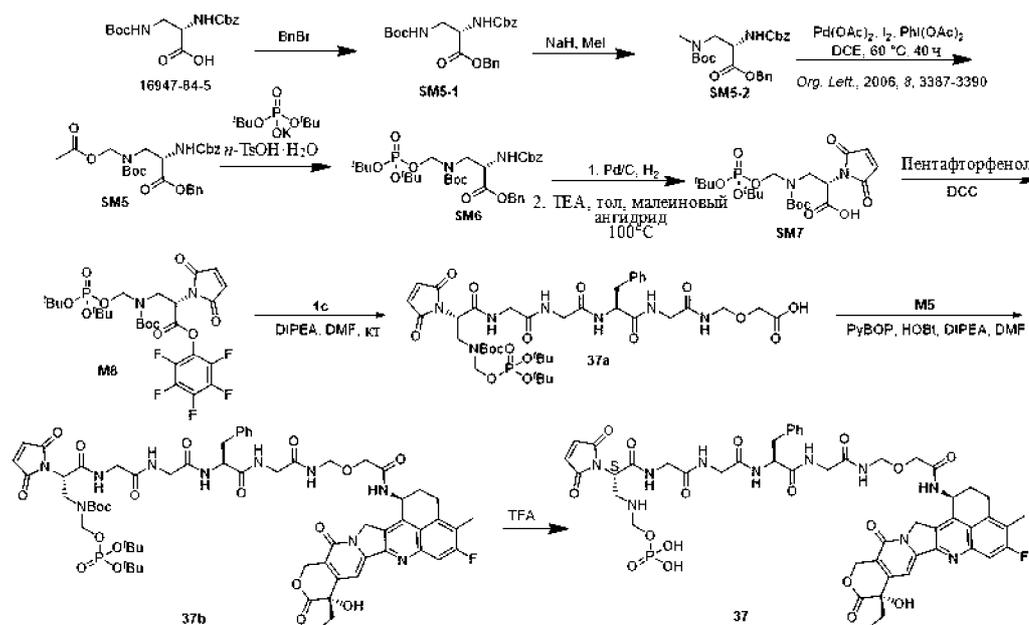
Синтез соединений 35 и 36.



С применением соединений M7 и 19с в качестве исходных материалов и со ссылкой на путь синтеза из примера 37 получали 102 мг соединения 35, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1457,8$ ; получали 102 мг соединения 36, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1457,8$ .

### Пример 42

Синтез соединения 37.



Стадия 1. Соединение SM5-1.

В одностороннюю колбу объемом 2000 мл добавляли соединение 16947-84-5 (100 г, 295 ммоль, 1,0 экв.), DIPEA (50 мл, 300 ммоль), бензилбромид (51,3 г, 300 ммоль) и THF (1000 мл), и обеспечивали осуществление реакции при комнатной температуре в течение 12 ч (контролировали посредством TLC), и нерастворимый материал отфильтровывали. Растворитель непосредственно удаляли из реакционного раствора путем ротационной перегонки при пониженном давлении и остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (PE/EA = 50/1-20/1-2/1) с получением SM5-1 (110,1 г) с выходом 87%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 429,2$ .

## Стадия 2. Соединение SM5-2.

В одnogорлую колбу объемом 2000 мл добавляли соединение SM5-1 (100 г, 233,4 ммоль, 1,0 экв.) и THF (1000 мл), охлаждали до 0°C на бане с ледяной водой, порциями добавляли NaN (37,4 г, 933,5 ммоль) и MeI (132,5 г, 933,5 ммоль) и реакцию поддерживали при 0°C в течение 24 ч (контролировали посредством TLC). Реакцию гасили путем добавления 500 мл насыщенного водного раствора NH<sub>4</sub>Cl, три раза проводили экстракцию с помощью 500 мл этилацетата с последующим высушиванием органической фазы с помощью безводного сульфата натрия и фильтрованием. Растворитель непосредственно удаляли из фильтрата путем ротационной перегонки при пониженном давлении и остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (PE/EA = 100/1-50/1-10/1) с получением SM5-2 (37,1 г); LC-MS: [M+H]<sup>+</sup> = 443,3.

Стадия 3. Соединение SM5 (см. *Org. Lett.*, 2006, 8, 3387-3390).

В одnogорлую колбу объемом 1000 мл добавляли соединение SM5-2 (35 г, 79 ммоль, 1,0 экв.) и DCE (500 мл), последовательно добавляли диацетат палладия (180 мг, 0,8 ммоль), I<sub>2</sub> (20 г, 79 ммоль) и диацетат йодбензола (40,8 г, 126,4 ммоль) и температуру повышали до 60°C с обеспечением осуществления реакции в течение 40 ч (контролировали посредством TLC). Реакцию гасили путем добавления 500 мл насыщенного водного раствора тиосульфата натрия, три раза проводили экстракцию с помощью 500 мл дихлорметана с последующим высушиванием органической фазы с помощью безводного сульфата натрия и фильтрованием. Растворитель непосредственно удаляли из фильтрата путем ротационной перегонки при пониженном давлении и остаток подвергали колоночной хроматографии на силикагеле (PE/EA = 100/1-50/1-10/1) с получением SM5 (28 г); LC-MS: [M+H]<sup>+</sup> = 501,3.

## Стадия 4. Соединение SM6.

В одnogорлую колбу объемом 500 мл добавляли соединение SM5 (25 г, 50 ммоль, 1,0 экв.), ди-трет-бутилфосфат калия (13,66 г, 55 ммоль, 1,1 экв.), моногидрат п-толуолсульфоновой кислоты (951 мг, 5 ммоль, 0,1 экв.) и THF (200 мл), и реакцию выполняли при комнатной температуре в течение 1 ч (контролировали посредством TLC), и нерастворимый материал отфильтровывали. Реакционный раствор очищали непосредственно путем препаративной LC и обогащенную жидкость концентрировали при 35°C на водяной бане при пониженном давлении с помощью водяного насоса с удалением ацетонитрила и лиофилизировали с получением соединения SM6 (15,1 г) с выходом 46%; LC-MS: [M+H]<sup>+</sup> = 651,4.

## Стадия 5. Соединение SM7.

Добавляли SM6 (15 г, 23 ммоль) и 100 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 250 мл и после растворения добавляли 15 г 5% Pd/C на бане с ледяной водой, атмосферу в системе три раза заменяли водородом и реакцию выполняли при комнатной температуре в течение 12 ч. Удаляли Pd/C посредством фильтрации и затем растворитель удаляли путем ротационной перегонки при пониженном давлении с помощью масляного насоса, оставляя неочищенный продукт, готовый для применения.

В другую одnogорлую колбу объемом 250 мл добавляют вышеуказанный неочищенный продукт и 100 мл толуола, триэтиламин (6,4 мл, 46 ммоль) и малеиновый ангидрид (2,4 г, 24 ммоль) и после растворения температуру повышают до 100°C с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч. Применяют HPLC для контроля протекания реакции, и когда реакция завершается, очищают реакционный раствор посредством HPLC с получением обогащенной жидкости. Обогащенную жидкость экстрагировали дихлорметаном, промывали с помощью насыщенного раствора хлорида натрия, высушивали с помощью безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали с получением 4,2 г твердого вещества с выходом 36%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 507,3$ .

## Стадия 6. Соединение M8.

В одnogорлую колбу объемом 100 мл добавляли соединение SM7 (4 г, 7,9 ммоль, 1,0 экв.), пентафторфенол (1,6 г, 8,7 ммоль, 1,1 экв.), DCC (1,8 г, 8,7 ммоль, 1,1 экв.) и THF (60 мл), и реакцию выполняли при комнатной температуре в течение 1 ч (контролировали посредством TLC), и нерастворимый материал отфильтровывали. Реакционный раствор очищали непосредственно путем препаративной LC и обогащенную жидкость концентрировали при 35°C на водяной бане при пониженном давлении с помощью водяного насоса с удалением ацетонитрила и лиофилизировали с получением соединения M8 (3,7 г) с выходом 70%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 673,2$ .

## Стадия 7. Соединение 37a.

В одnogорлую колбу объемом 25 мл добавляли 1с (1 г, 2,36 ммоль) и после растворения с помощью 25 мл DMF добавляли DIPEA (430 мкл, 2,6 ммоль) затем добавляли M8 (1,2 г, 2,36 ммоль) и затем температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 1 ч. Завершение реакции определяли посредством HPLC и реакционный раствор очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением обогащенной

жидкости, которую лиофилизировали с получением 488 мг продукта; LC-MS:  $[M-H]^- = 911,0$ .

Стадия 8. Соединение 37b.

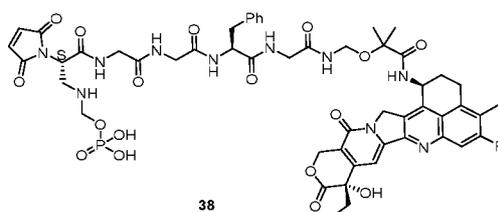
Добавляли 37a (400 мг, 0,44 ммоль), мезилат экзатекана M5 (235 мг, 0,44 ммоль), PyBOP (199 мг, 0,5 ммоль), HOBT (69 мг, 0,5 ммоль) и 10 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 100 мл, добавляли DIPEA (218 мкл, 1,32 ммоль) на бане с ледяной водой и температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч. После того, как реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной соединением 37b, которую лиофилизировали с получением 201 мг соединения; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1329,6$ .

Стадия 9. Соединение 37.

Соединение 37b (130 мг, 0,098 ммоль), бромид цинка (221 мг, 0,98 ммоль) и 10 мл нитрометана добавляли в одnogорлую колбу объемом 25 мл и реакцию выполняли при 40°C в течение 1 ч. После того, как реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением 96 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1117,4$ .

#### Пример 43

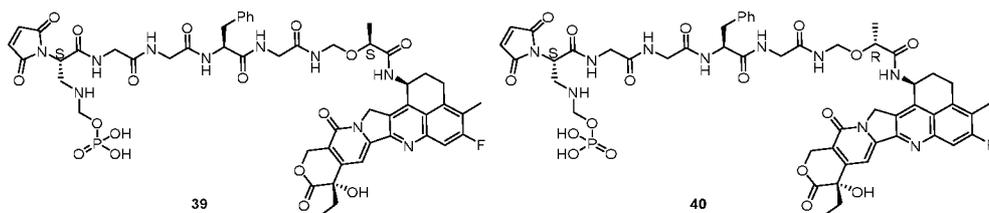
Синтез соединения 38.



С применением соединений M8 и 3c в качестве исходных материалов и со ссылкой на путь синтеза из примера 42 получали соединение 38 (51 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1145,6$ .

#### Пример 44

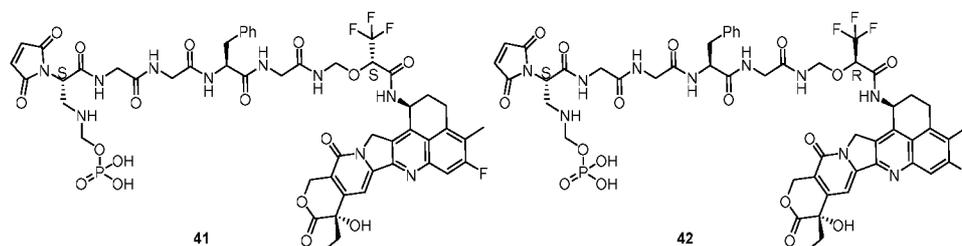
Синтез соединений 39 и 40.



С применением соединений М8 и 5с в качестве исходных материалов и со ссылкой на путь синтеза из примера 42 получали 57 мг соединения 39, LC-MS:  $[M+H]^+$  = 1131,4; получали 60 мг соединения 40, LC-MS:  $[M+H]^+$  = 1131,4.

#### Пример 45

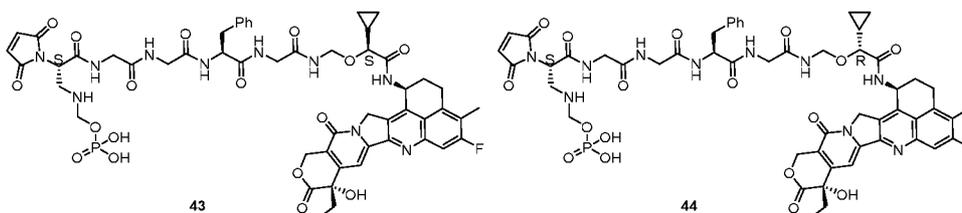
Синтез соединений 41 и 42.



С применением соединений М7 и 7с в качестве исходных материалов со ссылкой на путь синтеза из примера 42 получали 44 мг соединения 41, LC-MS:  $[M+H]^+$  = 1185,3; получали 44 мг соединения 42, LC-MS:  $[M+H]^+$  = 1185,3.

#### Пример 46

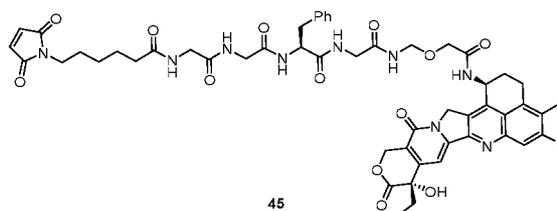
Синтез соединений 43 и 44.



С применением соединений М8 и 19с в качестве исходных материалов и со ссылкой на путь синтеза из примера 42 получали 62 мг соединения 43, LC-MS:  $[M+H]^+$  = 1157,4; получали 59 мг соединения 44, LC-MS:  $[M+H]^+$  = 1157,4.

#### Пример 47 (сравнительный пример)

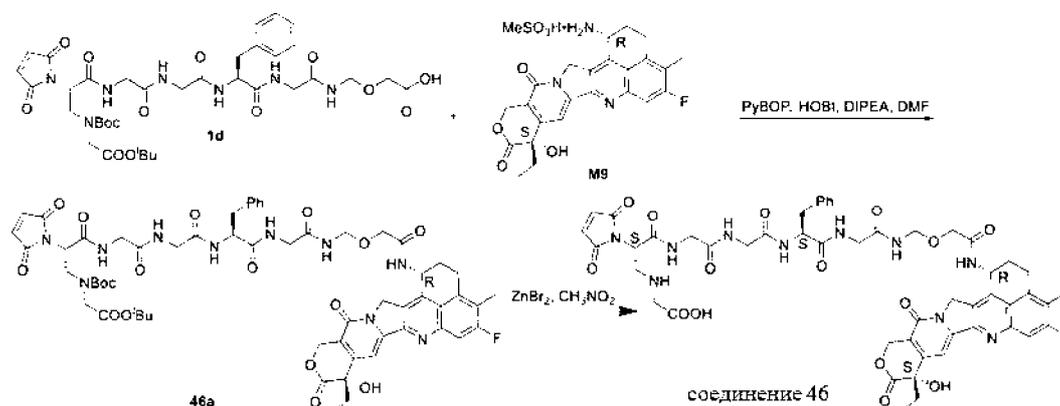
Синтез соединения 45.



Соединение 45 синтезировали посредством способа, предусмотренного в примере 58 из патента "CN104755494A".

## Пример 48

Синтез соединения 46.



Стадия 1. Соединение 46а.

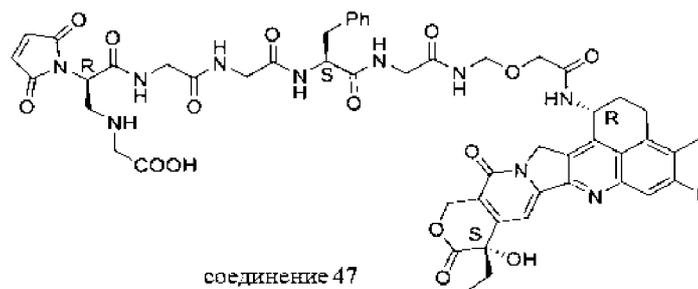
Добавляли 1d (500 мг, 0,62 ммоль), M9 (310 мг, 0,62 ммоль), PyBOP (448 мг, 0,86 ммоль), HOBT (116 мг, 0,86 ммоль) и 15 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляли DIPEA (378 мкл, 2,29 ммоль) на бане с ледяной водой и температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 46а (210 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1221,6$ .

Стадия 2. Соединение 46

Добавляли 46а (200 мг, 0,162 ммоль), бромид цинка (736 мг, 3,26 ммоль) и 10 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и реакцию выполняли при 40°C в течение 1 ч. После того, как реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали путем высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением твердого соединения 46 (120 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1065,3$ .

## Пример 49

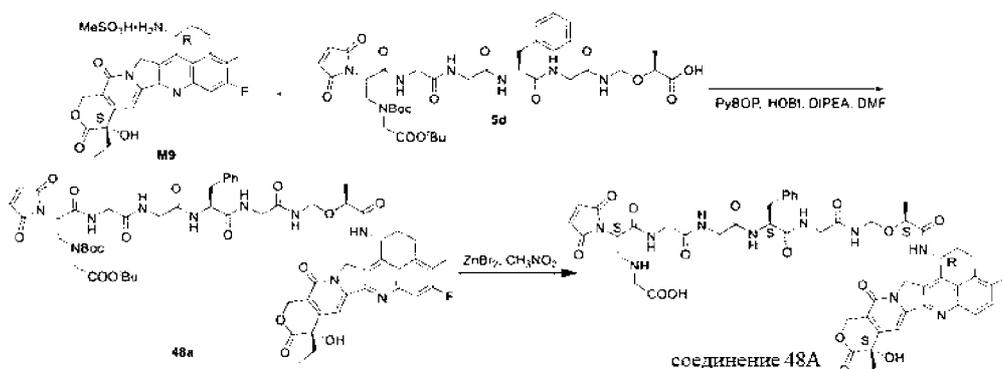
Синтез соединения 47.



Соединение 47 (81 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 48; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1065,3$ .

### Пример 50

Синтез соединения 48А.



Стадия 1. Соединение 48а.

Добавляют 5d (1,66 г, 2,02 ммоль, 1,0 экв.), M9 (1,08 г, 2,02 ммоль, 1,0 экв.), PyBOP (1,58 г, 3,03 ммоль, 1,5 экв.), HOBT (0,41 г, 3,03 ммоль, 1,5 экв.) и DMF (40 мл) в одногорлую колбу объемом 100 мл. Добавляли DIPEA (0,84 мл, 1,5 экв.) на бане с ледяной водой и температуру повышали до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч (контролировали посредством HPLC). Реакционный раствор непосредственно очищали путем препаративной LC и обогащенную жидкость концентрировали при 35°C на водяной бане при пониженном давлении с помощью водяного насоса с удалением ацетонитрила и высушивали посредством сублимации с получением соединения 48а (1,54 г) с выходом 61%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1235,4$ .

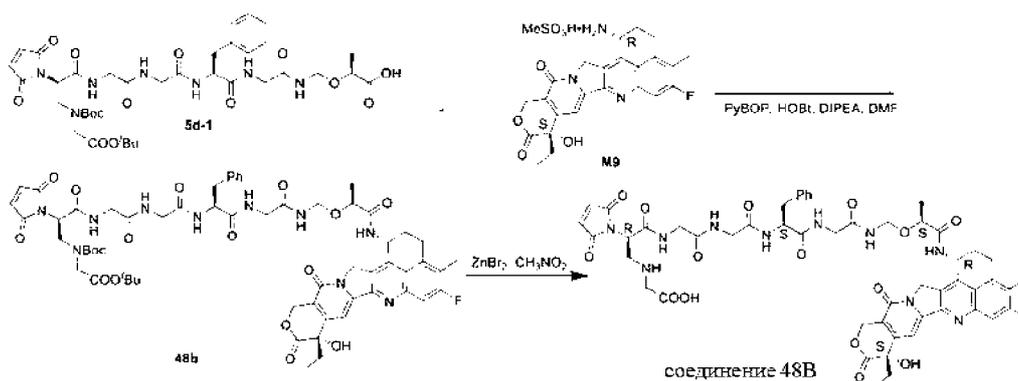
Стадия 6. Соединение 48А.

Добавляют соединение 48а (1,0 г, 0,8 ммоль, 1,0 экв.) и 35 мл нитрометана в одногорлую колбу объемом 100 мл и после растворения добавляют бромид цинка (3,64 г, 16 ммоль, 20,0 экв.), обеспечивают осуществление реакции на масляной бане при 40°C (с предварительным нагреванием для стабилизации) в течение 30 мин и проводят концентрирование на водяной бане при 45°C при пониженном давлении с

помощью водяного насоса с удалением нитрометана с получением желтого остатка в виде твердого вещества (контролировали посредством HPLC). Обогащенную жидкость получали путем получения с помощью кислоты. Обогащенную жидкость концентрировали при 35°C на водяной бане при пониженном давлении с помощью водяного насоса с удалением ацетонитрила путем центрифугирования и лиофилизировали с получением соединения 48A (786 мг) с выходом 90%.

### Пример 51

#### Синтез соединения 48B.



#### Стадия 1. Соединение 48b.

Соединение 5d-1 (200 мг, 0,24 ммоль, 1,0 экв.), M9 (127 мг, 0,24 ммоль, 1,0 экв.), PyBOP (187 мг, 0,36 ммоль, 1,2 экв.), HOBT (48 мг, 0,36 ммоль, 1,2 экв.) и DMF (6 мл) добавляли в одnogорлую колбу объемом 25 мл. Температуру понижали до 0-5°C на бане с ледяной водой, добавляли DIPEA (62 мг, 0,48 ммоль, 2,0 экв.) и затем температуру повышали до 20±5°C с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч. Окончание реакции определяли посредством HPLC. Реакционный раствор очищали непосредственно путем препаративной HPLC и жидкость, обогащенную продуктом, собирали и лиофилизировали с получением соединения 48b (150,2 мг); LC-MS: [M+H]<sup>+</sup> = 1235,4.

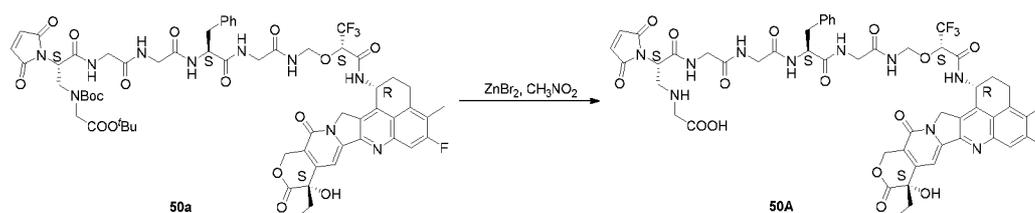
#### Стадия 2. Соединение 48B.

Соединение 48b (100 мг, 0,081 ммоль, 1,0 экв.), ZnBr<sub>2</sub> (364 мг, 1,62 ммоль, 20,0 экв.) и CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> (10 мл) последовательно добавляли в одnogорлую колбу объемом 25 мл и затем температуру повышали до 40°C с обеспечением осуществления реакции в течение 0,5 ч. Реакцию останавливали и реакционный раствор непосредственно высушивали в центрифуге при 45°C при пониженном давлении с получением желтого твердого вещества с отбором образцов для контроля реакции посредством HPLC. Высушенное в центрифуге твердое вещество непосредственно очищали путем препаративной HPLC и жидкость, обогащенную продуктом, собирали и



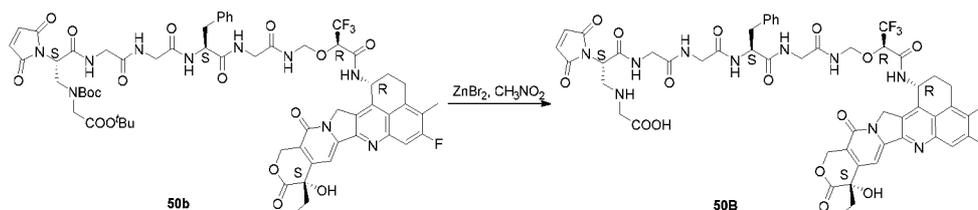
повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкостей, обогащенных соединением 50a и соединением 50b, и обогащенные жидкости высушивали посредством сублимации соответственно с получением 170 мг соединения 50a, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1289,46$ , и 202 мг соединения 50b, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1289,46$ .

### Стадия 2. Соединение 50A.



Добавляют 50a (100 мг, 0,077 ммоль), бромид цинка (349 мг, 1,55 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую высушивали посредством сублимации с получением 44 мг твердого вещества.

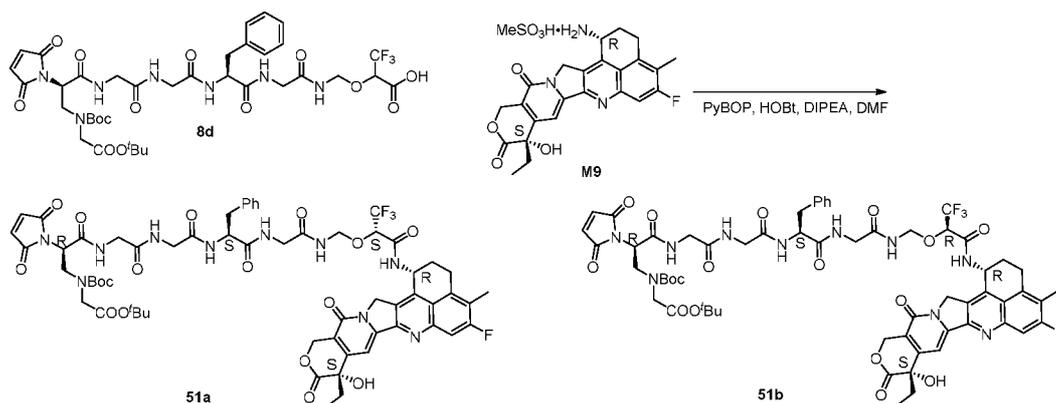
### Стадия 3. Соединение 50B.



Добавляют 50b (100 мг, 0,077 ммоль), бромид цинка (349 мг, 1,55 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую высушивали посредством сублимации с получением 45 мг твердого вещества.

### Пример 55

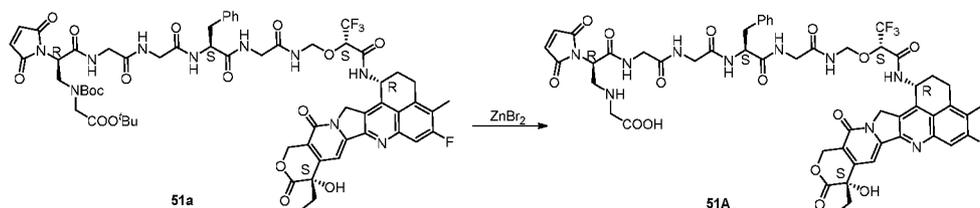
Синтез соединений 51A и 51B.



Стадия 1. Соединение 51a и соединение 51b.

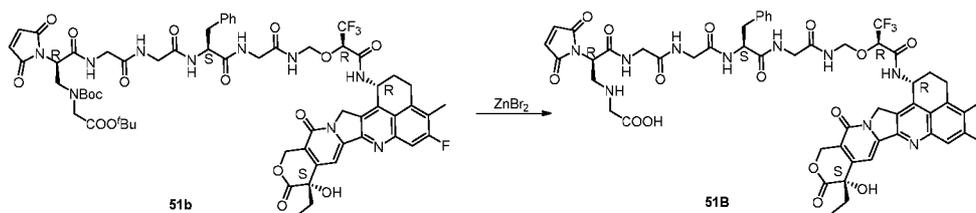
Добавляют 8d (500 мг, 0,57 ммоль), M9 (305 мг, 0,57 ммоль), PyBOP (448 мг, 0,86 ммоль), HOBT (116 мг, 0,86 ммоль) и 15 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (378 мкл, 2,29 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч. После того, как реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкостей, обогащенных соединением 51a и соединением 51b, которые соответственно лиофилизировали с получением 190 мг соединения 51a и 186 мг соединения 51b. LC-MS соединения 51a:  $[M+H]^+ = 1289,47$ ; LC-MS соединения 51b:  $[M+H]^+ = 1289,47$ .

Стадия 2. Соединение 51A.



Добавляют соединение 51a (100 мг, 0,077 ммоль), бромид цинка (349 мг, 1,55 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением 39 мг твердого вещества.

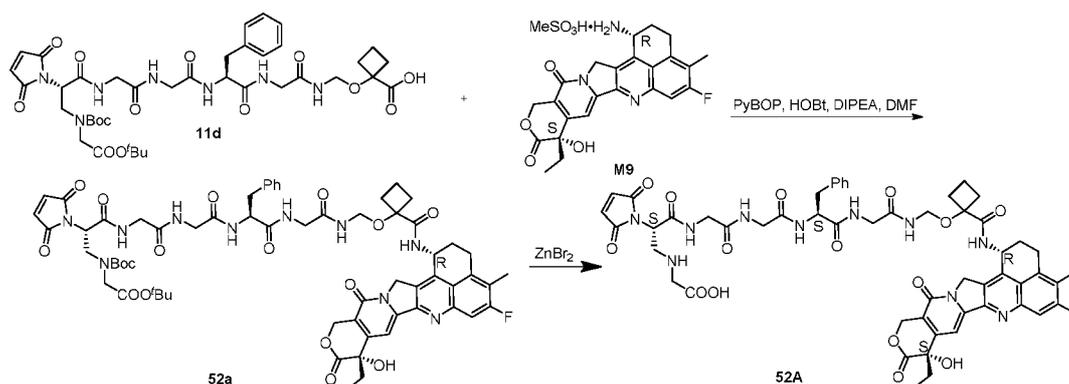
Стадия 3. Соединение 51B.



Добавляют соединение 51b (100 мг, 0,077 ммоль), бромид цинка (349 мг, 1,55 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую высушивали посредством сублимации с получением 60 мг твердого вещества.

### Пример 56

#### Синтез соединения 52A.



#### Стадия 1. Соединение 52a.

Добавляют 11d (800 мг, 0,96 ммоль), M9 (480 мг, 0,96 ммоль), PyBOP (500 мг, 0,96 ммоль), HOBT (208 мг, 0,96 ммоль) и 30 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (660 мкл, 4,0 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 4 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной соединением 52a, которую лиофилизировали с получением 52a (388 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1261,4$ .

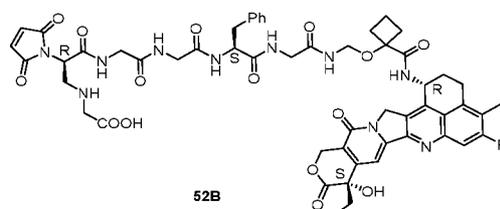
#### Стадия 2. Соединение 52A.

Добавляют 52a (150 мг, 0,12 ммоль), бромид цинка (532 мг, 2,4 ммоль) и 10 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном

давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением твердого соединения 52A (79 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1105,4$ .

### Пример 57

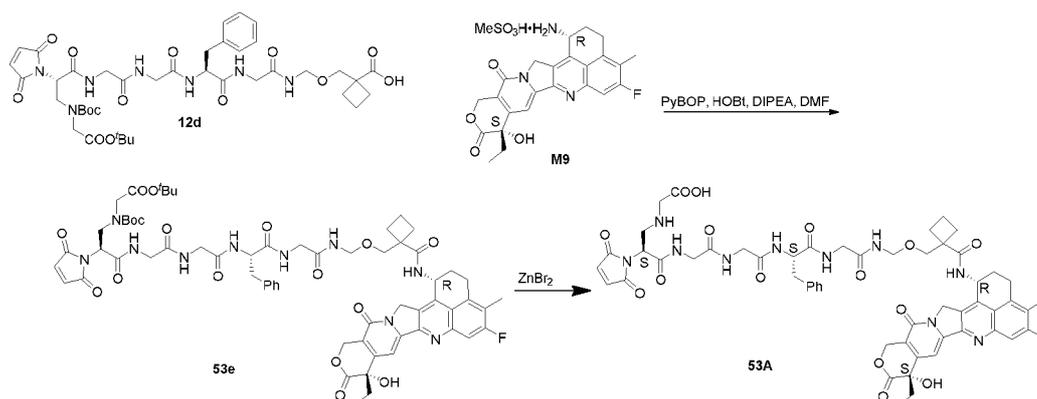
Синтез соединения 52B.



Соединение 52B (50 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 56. LC-MS:  $[M+H]^+ = 1105,4$ .

### Пример 58

Синтез соединения 53A.



Стадия 1. Соединение 53а.

Добавляют 12d (400 мг, 0,47 ммоль), M9 (240 мг, 0,47 ммоль), PyBOP (250 мг, 0,47 ммоль), HOBT (101 мг, 0,47 ммоль) и 15 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (330 мкл, 2,0 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 3 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной соединением 53а, которую лиофилизировали с получением 53а (200 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1275,4$ .

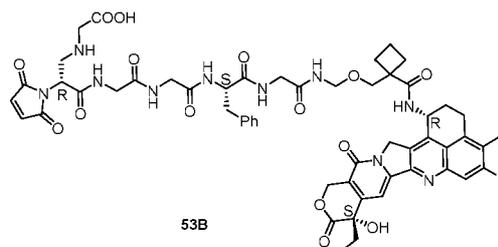
Стадия 2. Соединение 53А.

Добавляют 53а (100 мг, 0,08 ммоль), бромид цинка (360 мг, 1,6 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено

посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением твердого соединения 53A (51 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1119,4$ .

### Пример 59

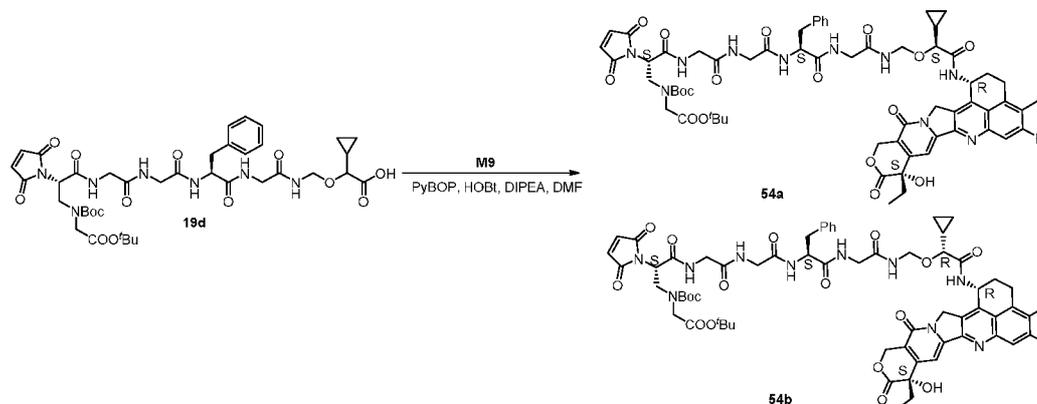
Синтез соединения 53B.



Соединение 53B (50 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 58; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1119,4$ .

### Пример 60

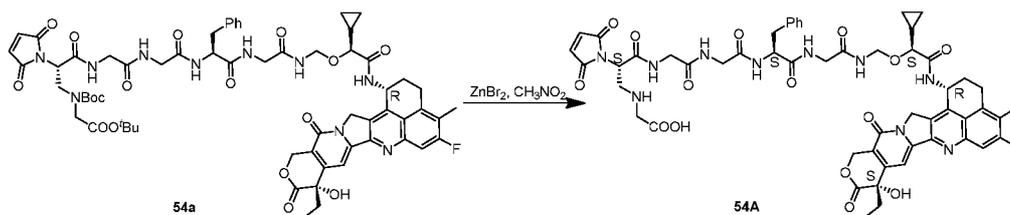
Синтез соединений 54A и 54B.



Стадия 1. Соединения 54a и 54b.

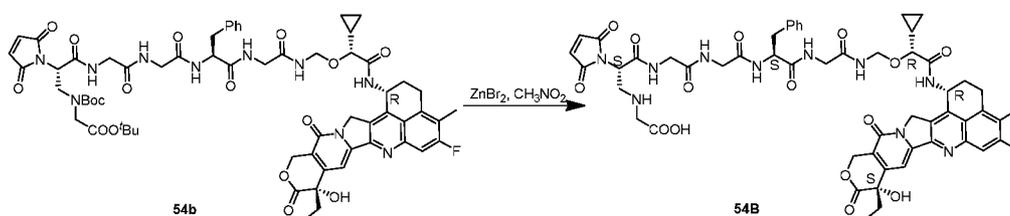
Добавляют 19d (500 мг, 0,59 ммоль), M9 (317 мг, 0,59 ммоль), PyBOP (339 мг, 0,65 ммоль), HOBT (88 мг, 0,86 ммоль) и 10 мл DMF в одностороннюю колбу объемом 50 л, добавляют DIPEA (292 мкл, 1,77 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкостей, обогащенных соединениями 54a и 54b. Обогащенные растворы лиофилизировали по отдельности с получением 103 мг соединения 54a, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1261,5$ , и 111 мг соединения 54b, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1261,5$ .

Стадия 2. Соединение 54A.



Добавляют 54a (100 мг, 0,079 ммоль), бромид цинка (357 мг, 1,59 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением 61 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1105,4$ .

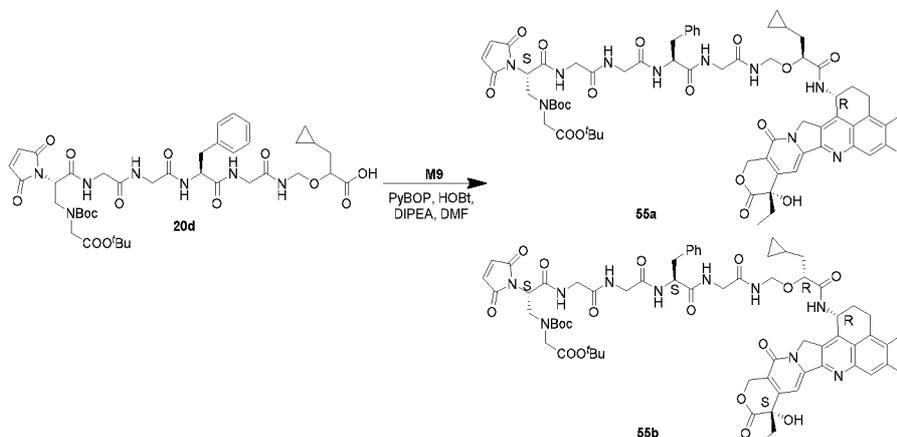
Стадия 3. Соединение 54B.



Добавляют 54b (100 мг, 0,079 ммоль), бромид цинка (357 мг, 1,59 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением 57 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1105,4$ .

### Пример 61

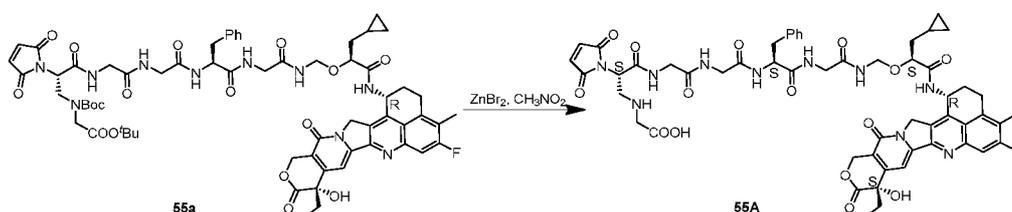
Синтез соединений 55a и 55b.



Стадия 1. Соединения 55a и 55b.

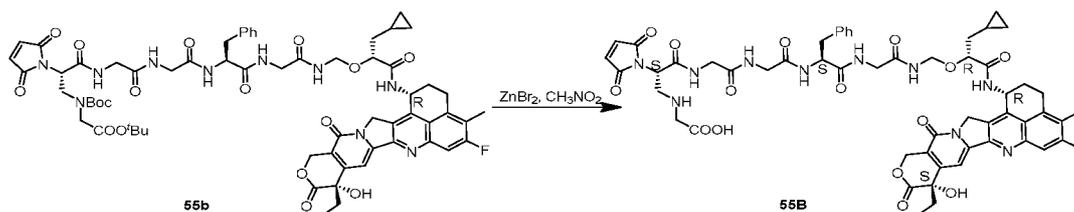
Добавляют 20d (400 мг, 0,47 ммоль), M9 (250 мг, 0,47 ммоль), RuBOP (223 мг, 0,56 ммоль), HOBT (83 мг, 0,56 ммоль) и 10 мл DMF в одnogорлую колу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (248 мкл, 1,5 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч. После того, как реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкостей, обогащенных соединениями 55a и 55b. Обогащенные жидкости по отдельности высушивали посредством сублимации с получением 100 мг соединения 55a, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1275,5$ , и 101 мг соединения 55b, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1275,5$ .

Стадия 2. Соединение 55A.



Добавляют 55a (100 мг, 0,078 ммоль), бромид цинка (352 мг, 1,57 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением 42 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1119,4$ .

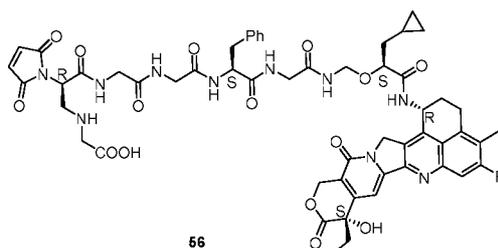
Стадия 3. Соединение 55B.



Добавляют 55b (100 мг, 0,079 ммоль), бромид цинка (357 мг, 1,59 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением 45 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1119,4$ .

Пример 62

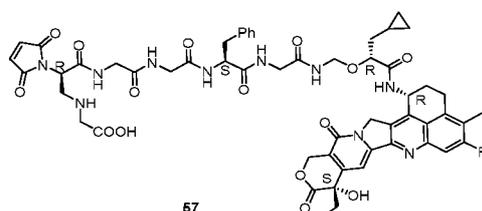
Синтез соединения 56.



Соединение 56 (50 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 60; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1119,3$ .

### Пример 63

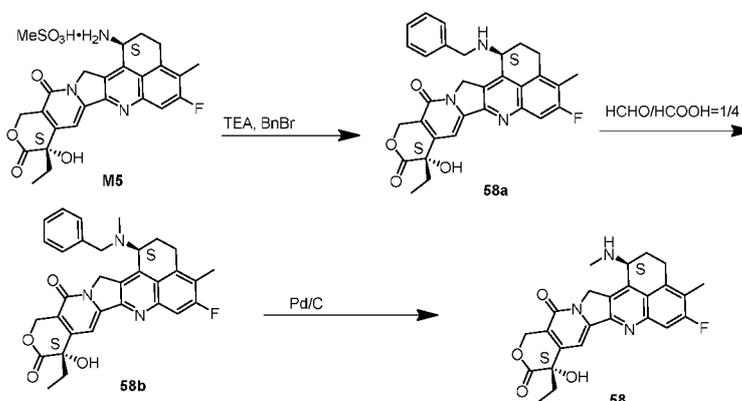
Синтез соединения 57.



Соединение 57 (50 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 61; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1119,4$ .

### Пример 64

Синтез соединения 58.



Стадия 1. Синтез соединения 58a.

Добавляют 400 мл DMF к мезилату экзатекана M5 (15 г, 28 моль, полученному посредством способа, раскрытого в заявке на патент "EP0737683A1"), охлаждают на бане с ледяной водой до 0°C, по каплям добавляют триэтиламин и доводят pH до 7-8. Бензилбромид (9,6 г, 56 ммоль) по каплям добавляли на бане с ледяной водой, температуру повышали до комнатной температуры (25°C) с обеспечением осуществления реакции в течение 1 часа, завершение реакции определяли посредством TLC, реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении, полученный неочищенный продукт очищали посредством препаративной

высокоэффективной жидкостной хроматографии (система ацетонитрил/очищенная вода), соединение, соответствующее целевому пику, собирали, ацетонитрил удаляли при пониженном давлении, затем проводили лиофилизацию с получением приблизительно 11 г соединения 58a, желтого твердого вещества, с выходом приблизительно 74%, MS масса/заряд:  $[M+H]^+$  526,3.

Стадия 2. Синтез соединения 58b.

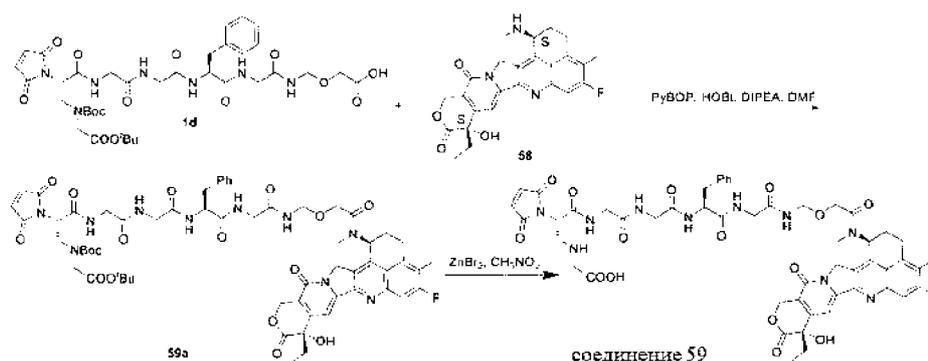
При комнатной температуре последовательно добавляли соединение 58a (11 г, 21 моль) и 120 мл муравьиной кислоты для растворения в одnogорлую колбу объемом 250 мл, добавляли 30 мл формальдегида (40% водный раствор) к полученному ярко-желтому раствору и температуру повышали до 50°C с обеспечением осуществления реакции в течение 1 ч. Когда реакция завершилась, как выявлено посредством TLC, температуру охлаждали до комнатной температуры, и реакционный раствор очищали посредством препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (система ацетонитрил/очищенная вода), и собирали соединение, соответствующее целевому пику. После удаления ацетонитрила при пониженном давлении проводили лиофилизацию с получением приблизительно 4,5 г соединения 58b, желтого порошкообразного твердого вещества, выход приблизительно 40%, MS масса/заряд:  $[M+H]^+$  540,6.

Стадия 3. Синтез соединения 58.

При комнатной температуре добавляют соединение 58b (2,3 г, 4,3 моль) в одnogорлую колбу объемом 250 мл, добавляют 100 мл DMF для растворения, добавляют 2,3 г 5% Pd/C к полученному ярко-желтому раствору, применяют баллон с водородом для замены атмосферы в системе и поддерживают реакцию при комнатной температуре в течение 1,5 часа. Завершение реакции затем определяли посредством HPLC, Pd/C удаляли посредством фильтрации, и полученный реакционный раствор концентрировали и затем очищали посредством препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (система ацетонитрил/очищенная вода). Соединение, соответствующее целевому пику, собирали и после удаления ацетонитрила при пониженном давлении проводили лиофилизацию с получением приблизительно 1,0 г соединения 58, желтого порошкообразного твердого вещества, с выходом приблизительно 52%, MS масса/заряд:  $[M+H]^+$  450,5.

Пример 65

Синтез соединения 59.



### Стадия 1. Соединение 59а.

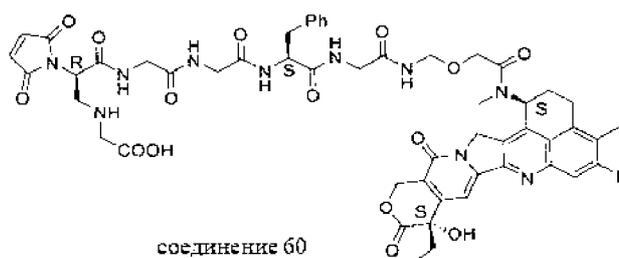
Добавляют 1d (500 мг, 0,62 ммоль), 58 (279 мг, 0,62 ммоль), PyBOP (448 мг, 0,86 ммоль), HOBT (116 мг, 0,86 ммоль) и 15 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (378 мкл, 2,29 ммоль) на бане с ледяной водой, повышают температуру до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 59а (166 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1235,6$ .

### Стадия 2. Соединение 59.

Добавляли 59а (100 мг, 0,081 ммоль), бромид цинка (368 мг, 1,63 ммоль) и 10 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и реакцию выполняли при 40°C в течение 1 ч. После того, как реакция завершилась, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении и получали неочищенный продукт. Неочищенный продукт очищали посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии с получением жидкости, обогащенной продуктом, и обогащенную жидкость лиофилизировали с получением твердого соединения 59 (43 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1079,3$ .

### Пример 66

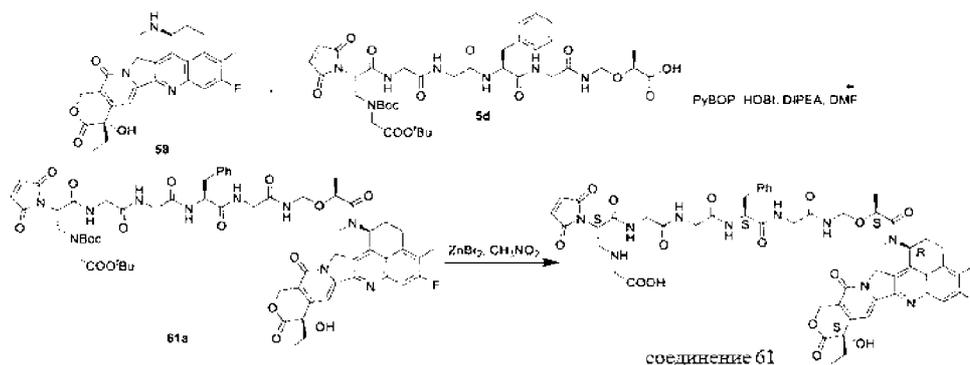
#### Синтез соединения 60



Соединение 60 (40 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 65; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1079,3$ .

## Пример 67

Синтез соединения 61.



Стадия 1. Соединение 61а.

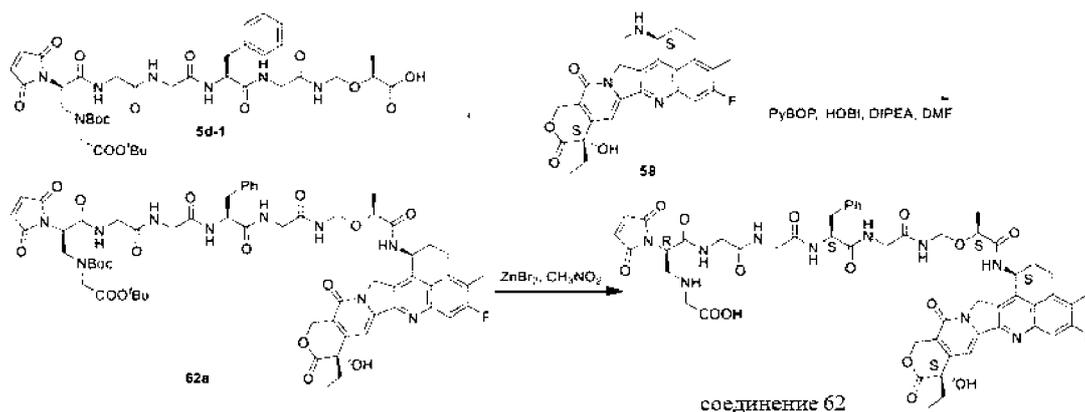
Добавляют 5d (1,66 г, 2,02 ммоль, 1,0 экв.), 58 (0,91 г, 2,02 ммоль, 1,0 экв.), PyBOP (1,58 г, 3,03 ммоль, 1,5 экв.), HOBT (0,41 г, 3,03 ммоль, 1,5 экв.) и DMF (40 мл) в одностороннюю колбу объемом 100 мл, добавляют DIPEA (0,84 мл, 1,5 экв.) на бане с ледяной водой и повышают температуру до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч (контролировали посредством HPLC). Реакционный раствор очищали непосредственно путем препаративной LC, обогащенную жидкость концентрировали при 35°C на водяной бане при пониженном давлении с помощью водяного насоса с удалением ацетонитрила и лиофилизировали с получением соединения 61а (1,21 г); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1249,4$ .

Стадия 2. Соединение 61.

Добавляют соединение 61а (1,0 г, 0,8 ммоль, 1,0 экв.) и 35 мл нитрометана в одностороннюю колбу объемом 100 мл и после растворения добавляют бромид цинка (3,64 г, 16 ммоль, 20,0 экв.), обеспечивают осуществление реакции на масляной бане при 40°C (предварительно нагревали для стабилизации) в течение 30 мин и концентрируют при 45°C на водяной бане при пониженном давлении с помощью водяного насоса с удалением нитрометана с получением желтого остатка в виде твердого вещества (контролировали посредством HPLC). После получения кислоты получали обогащенную жидкость. Обогащенную жидкость концентрировали при 35°C на водяной бане при пониженном давлении с помощью водяного насоса с удалением ацетонитрила путем центрифугирования и высушивали посредством сублимации с получением соединения 61 (786 мг). LC-MS:  $[M+H]^+ = 1093,6$ .

## Пример 68

Синтез соединения 62.



### Стадия 1. Соединение 62а.

Добавляют соединение 5d-1 (200 мг, 0,24 ммоль, 1,0 экв.), 58 (110,3 мг, 0,24 ммоль, 1,0 экв.), PyBOP (187 мг, 0,36 ммоль, 1,2 экв.), HOBT (48 мг, 0,36 ммоль, 1,2 экв.) и DMF (6 мл) в одnogорлую колбу объемом 25 мл, температуру понижают до 0-5°C на бане с ледяной водой и добавляют DIPEA (62 мг, 0,48 ммоль, 2,0 экв.). Затем температуру повышают до 20±5°C с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч и применяют HPLC для контроля в отношении окончания реакции. Реакционный раствор непосредственно очищали путем препаративной HPLC и жидкость, обогащенную продуктом, собирали и высушивали посредством сублимации с получением соединения 62а (120,9 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1249,4$ .

### Стадия 2. Соединение 62.

Последовательно добавляют соединение 62а (100 мг, 0,081 ммоль, 1,0 экв.), ZnBr<sub>2</sub> (364 мг, 1,62 ммоль, 20,0 экв.) и CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> (10 мл) в одnogорлую колбу объемом 25 мл. После завершения добавления повышают температуру до 40°C и обеспечивают осуществление реакции в течение 0,5 ч. Реакцию останавливали и реакционный раствор непосредственно высушивали в центрифуге при пониженном давлении при 45°C с получением желтого твердого вещества, образец которого отбирали для контроля реакции посредством HPLC. Высушенное в центрифуге твердое вещество непосредственно очищали путем препаративной HPLC и жидкость, обогащенную продуктом, собирали и лиофилизировали с получением соединения 62 (61 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1093,4$ .

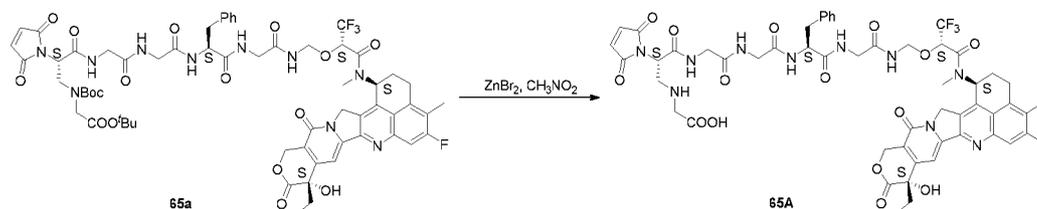
### Пример 69

Получение соединения 63.



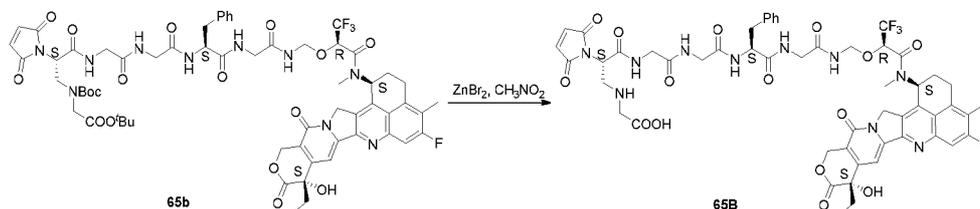
реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкостей, обогащенных соединениями 65a и 65b. Обогащенные жидкости лиофилизировали по отдельности с получением 155 мг соединения 65a, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1303,4$ , и 158 мг соединения 65b, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1303,6$ .

### Стадия 2. Соединение 65A.



Добавляют 50a (100 мг, 0,077 ммоль), бромид цинка (349 мг, 1,55 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 49 мг твердого вещества.

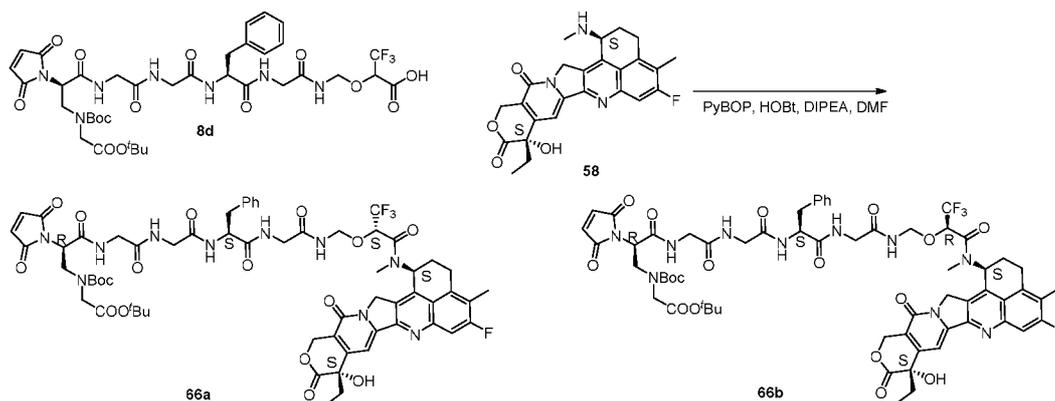
### Стадия 3. Соединение 65B.



Добавляют 65b (100 мг, 0,077 ммоль), бромид цинка (349 мг, 1,55 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 47 мг твердого вещества.

### Пример 72

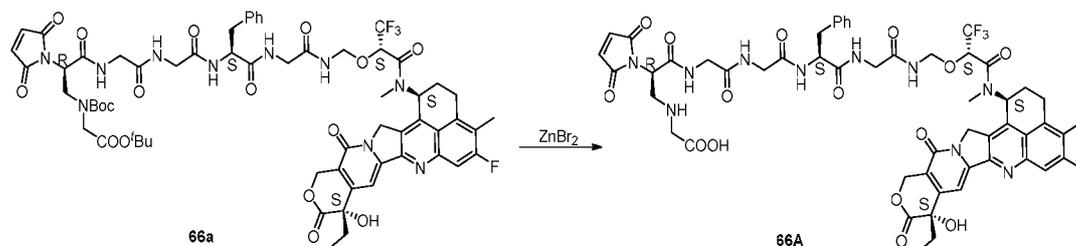
Синтез соединений 66A и 66B.



Стадия 1. Соединение 66a и соединение 66b.

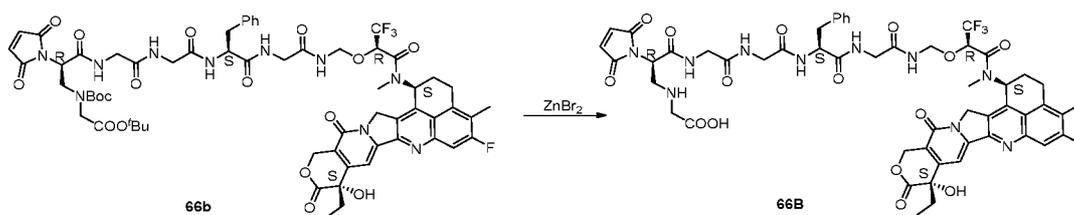
Добавляют 8d (500 мг, 0,57 ммоль), 58 (256,8 мг, 0,57 ммоль), PyBOP (448 мг, 0,86 ммоль), HOBT (116 мг, 0,86 ммоль) и 15 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (378 мкл, 2,29 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкостей, обогащенных соединением 66a и соединением 66b, и обогащенные жидкости по отдельности лиофилизировали с получением 160 мг соединения 66a и 160 мг соединения 66b. LC-MS соединения 66a:  $[M+H]^+ = 1303,7$ ; LC-MS соединения 66b:  $[M+H]^+ = 1303,6$ .

Стадия 2. Соединение 66A.



Добавляют соединение 66a (100 мг, 0,077 ммоль), бромид цинка (349 мг, 1,55 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением 57 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1147,5$ .

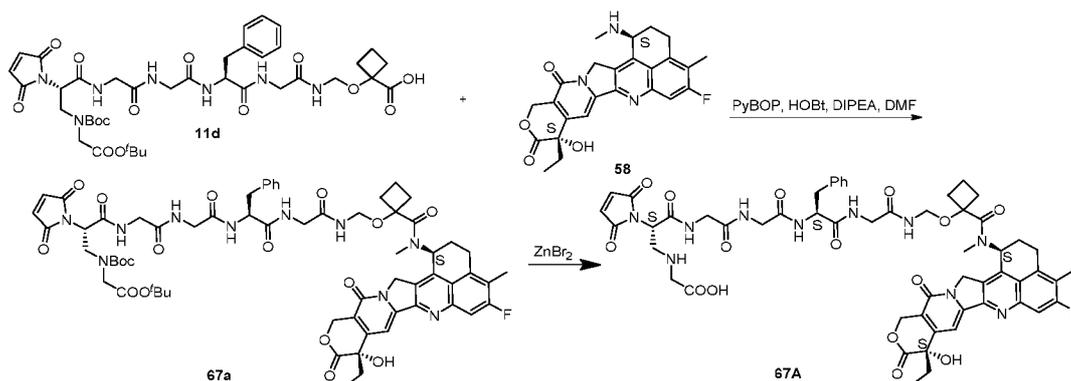
Стадия 3. Соединение 66B.



Добавляют соединение 66b (100 мг, 0,077 ммоль), бромид цинка (349 мг, 1,55 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением 57 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1147,5$ .

### Пример 73

Синтез соединения 67A.



Стадия 1. Соединение 67a.

Добавляют 11d (800 мг, 0,96 ммоль), 58 (432,5 мг, 0,96 ммоль), PyBOP (500 мг, 0,96 ммоль), HOBT (208 мг, 0,96 ммоль) и 30 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (660 мкл, 4,0 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 4 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной соединением 67a, которую лиофилизировали с получением 67a (402 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1275,4$ .

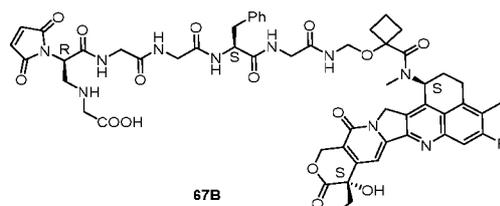
Стадия 2. Соединение 67A.

Добавляют 67a (100 мг, 0,78 ммоль), бромид цинка (356 мг, 1,57 ммоль) и 10 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено

посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением твердого соединения 67A (47 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1119,5$ .

### Пример 74

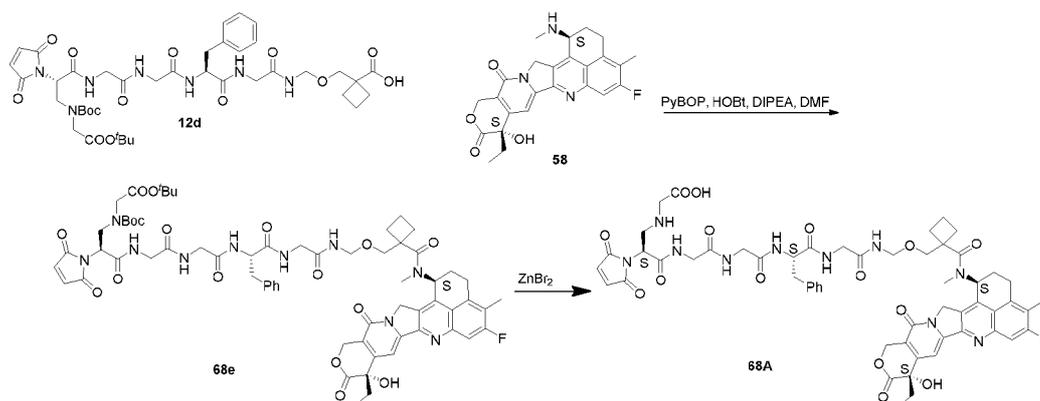
Синтез соединения 67B.



Соединение 67B (50 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 73. LC-MS:  $[M+H]^+ = 1119,4$ .

### Пример 75

Синтез соединения 68A.



Стадия 1. Соединение 68a.

Добавляют 12d (400 мг, 0,47 ммоль), 58 (211,7 мг, 0,47 ммоль),  $\text{PyBOP}$  (250 мг, 0,47 ммоль),  $\text{HOBT}$  (101 мг, 0,47 ммоль) и 15 мл  $\text{DMF}$  в одnogорлую колбу объемом 50 мл, добавляют  $\text{DIPEA}$  (330 мкл, 2,0 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 3 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной соединением 68a, которую лиофилизировали с получением 68a (177 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1289,4$ .

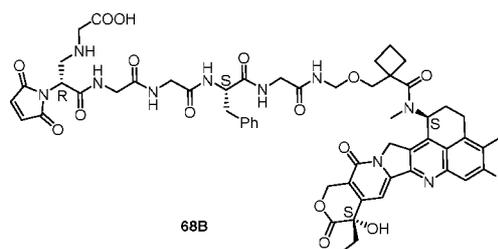
Стадия 2. Соединение 68A.

Добавляют 68a (100 мг, 0,08 ммоль), бромид цинка (360 мг, 1,6 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление

реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением твердого соединения 68A (45 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1133,4$ .

### Пример 76

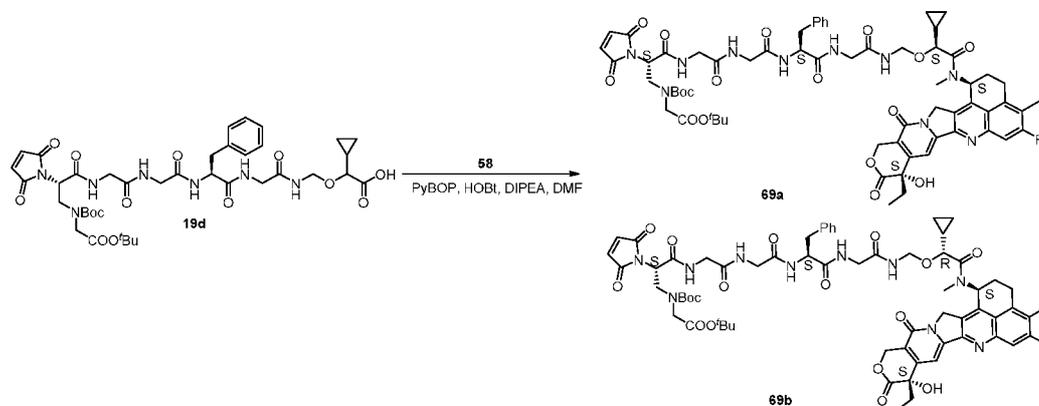
Синтез соединения 68B.



Соединение 68B (50 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 75; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1133,4$ .

### Пример 77

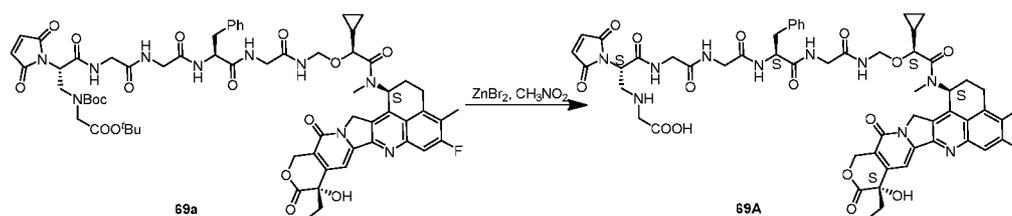
Синтез соединений 69A и 68B.



Стадия 1. Соединения 69a и 69b.

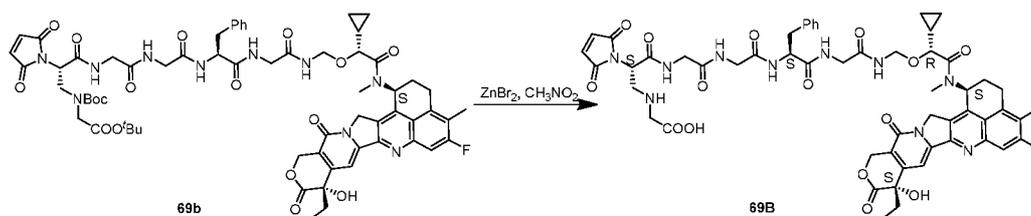
Добавляют 19d (500 мг, 0,59 ммоль), 58 (266 мг, 0,59 ммоль), PyBOP (339 мг, 0,65 ммоль), HOBT (88 мг, 0,86 ммоль) и 10 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 50 л, добавляют DIPEA (292 мкл, 1,77 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкостей, обогащенных соединениями 69a и 69b. Обогащенные растворы высушивали посредством сублимации по отдельности с получением 109 мг соединения 69a, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1275,5$ , и 111 мг соединения 69b, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1275,7$ .

## Стадия 2. Соединение 69A.



Добавляют 69a (100 мг, 0,078 ммоль), бромид цинка (352 мг, 1,56 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением 53 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1119,4$ .

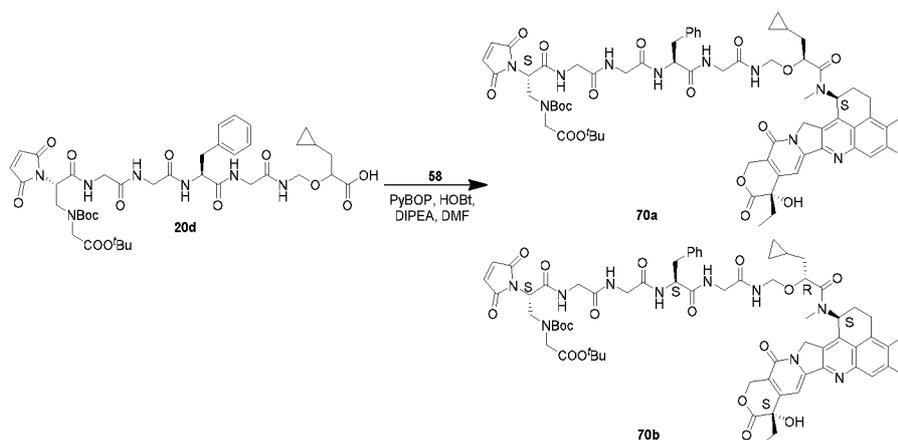
## Стадия 3. Соединение 69B.



Добавляют 69b (100 мг, 0,078 ммоль), бромид цинка (352 мг, 1,56 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением 54 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1119,4$ .

## Пример 78

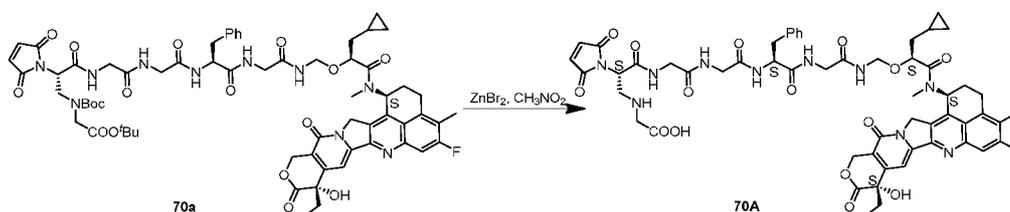
Синтез соединений 70A и 70B.



## Стадия 1. Соединения 70a и 70b.

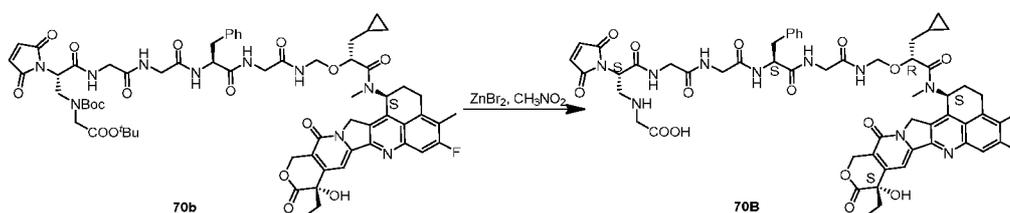
Добавляют 20d (400 мг, 0,47 ммоль), 58 (211,7 мг, 0,47 ммоль), PyBOP (223 мг, 0,56 ммоль), HOBT (83 мг, 0,56 ммоль) и 10 мл DMF в одnogорлую колу объемом 50 мл, добавляют DIPEA (248 мкл, 1,5 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкостей, обогащенных соединениями 70a и 70b. Обогащенные жидкости высушивали посредством сублимации по отдельности с получением 106 мг соединения 70a, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1289,5$ , и 101 мг соединения 70b, LC-MS:  $[M+H]^+ = 1289,4$ .

## Стадия 2. Соединение 70A.



Добавляют 70a (100 мг, 0,078 ммоль), бромид цинка (352 мг, 1,57 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением 39 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1133,4$ .

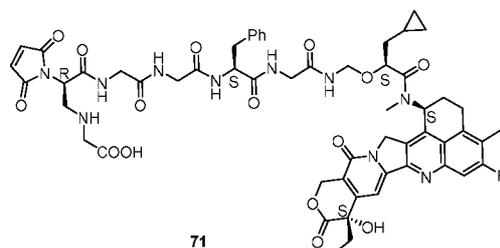
## Стадия 3. Соединение 70B.



Добавляют 70b (100 мг, 0,078 ммоль), бромид цинка (352 мг, 1,56 ммоль) и 5 мл нитрометана в одnogорлую колу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением 35 мг твердого вещества; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1133,4$ .

## Пример 79

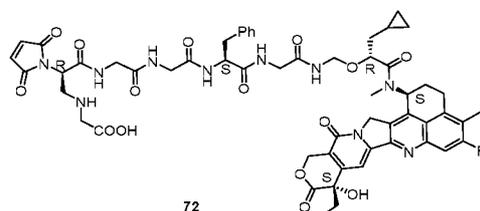
Синтез соединения 71.



Соединение 71 (30 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 78; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1133,3$ .

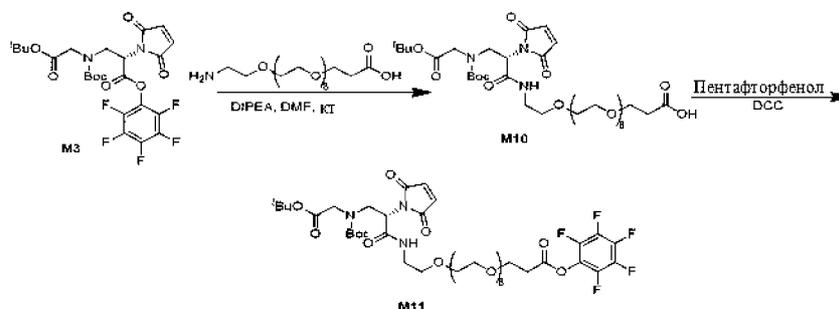
## Пример 80

Синтез соединения 72.



Соединение 72 (33 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 78; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1133,4$ .

## Пример 81



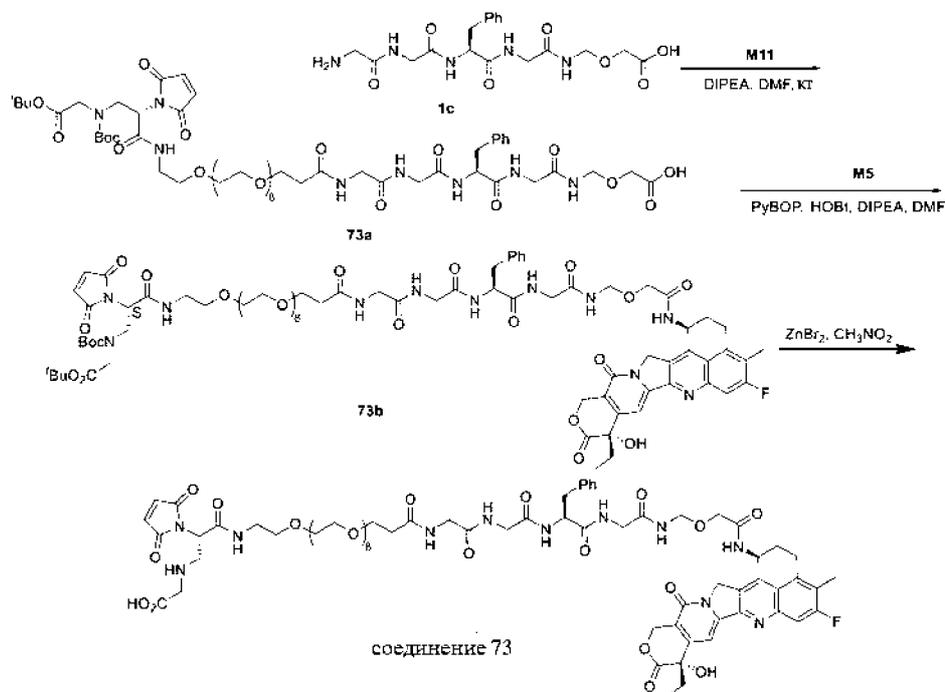
Синтез соединения M11.

В одnogорлую колбу объемом 100 мл добавляют соединение M3 (11,0 г, 19,5 ммоль, 1,0 экв.), DIPEA (2,8 г, 21,4 ммоль, 1,1 экв.), 27-амино-4,7,10,13,16,19,22,25-октаоксагептакозановую кислоту (9,7 г, 20,5 ммоль, 1,05 экв.) и DMF (60 мл) и обеспечивают осуществление реакции при комнатной температуре (контролировали посредством TLC) в течение 20 минут. Реакционный раствор очищали непосредственно путем препаративной LC и обогащенную жидкость концентрировали при 35°C на водяной бане при пониженном давлении с помощью водяного насоса с удалением ацетонитрила и лиофилизировали с получением соединения M10 (13,2 г) с выходом 78%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 866,5$ .

Добавляют соединение M10 (13,0 г, 15 ммоль, 1,0 экв.), пентафторфенол (3 г, 16,5 ммоль, 1,1 экв.), DCC (3,4 г, 16,5 ммоль, 1,1 экв.) и THF (30 мл) в одnogорлую колбу объемом 100 мл, обеспечивают осуществление реакции при комнатной температуре в течение 30 мин (контролировали посредством TLC) и отфильтровывают нерастворимый материал. Реакционный раствор непосредственно очищали путем препаративной LC и обогащенную жидкость концентрировали при 35°C на водяной бане при пониженном давлении с помощью водяного насоса с удалением ацетонитрила и лиофилизировали с получением соединения M11 (14,2 г) с выходом 92%; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1032,5$ .

### Пример 82

Синтез соединения 73.



Стадия 1. Синтез соединения 73а.

Добавляют 10 мл DMF к M11 (1 г, 0,79 моль), охлаждают на бане с ледяной водой до 0°C, добавляют соединение 1с (334 мг, 0,79 моль) и DIPEA (154 мг, 1,19 моль) и поддерживают условия с обеспечением осуществления реакции в течение 1 ч. Осуществляют контроль посредством TLC в отношении завершения реакции. Реакционный раствор очищали посредством препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (система ацетонитрил/очищенная вода) и соединение, соответствующее целевому пику, собирали. После удаления ацетонитрила при пониженном давлении проводили высушивание посредством сублимации с получением приблизительно 1,2 г соединения 73а, MS масса/заряд:  $[M+H]^+ = 1271,9$ .

Стадия 2. Синтез соединения 73b.

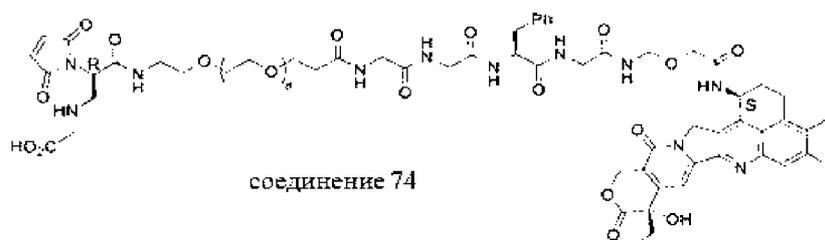
Добавляют 73a (1,2 г, 0,94 ммоль), M5 (500 мг, 0,94 ммоль), PyBOP (625 мг, 1,2 ммоль), HOBT (162 мг, 1,2 ммоль) и 15 мл DMF в одногорлую колбу объемом 25 мл, добавляют DIPEA (310 мг, 2,4 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 73b (709 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1720,8$ .

Стадия 3. Синтез соединения 73.

Добавляют 73b (200 мг, 0,116 ммоль), бромид цинка (523 мг, 2,32 ммоль) и 10 мл нитрометана в одногорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением твердого соединения 73 (88 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1532,6$ .

### Пример 83

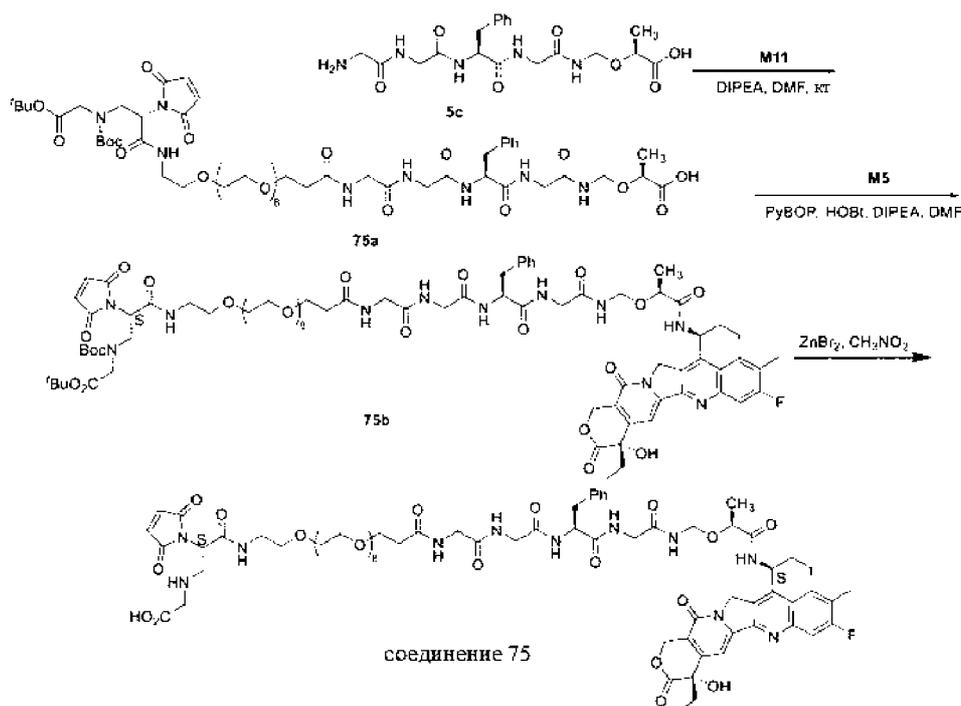
Синтез соединения 74:



Соединение 74 (90 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 82; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1532,6$ .

### Пример 84

Синтез соединения 75.



### Стадия 1. Синтез соединения 75а.

Добавляют 10 мл DMF к M11 (1 г, 0,79 моль), охлаждают на бане с ледяной водой до 0°C, добавляют соединение 5с (345 мг, 0,79 моль) и DIPEA (154 мг, 1,19 моль) и поддерживают условия с обеспечением осуществления реакции в течение 1 ч. Осуществляют контроль посредством TLC в отношении завершения реакции. Реакционный раствор очищали посредством препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (система ацетонитрил/очищенная вода) и соединение, соответствующее целевому пику, собирали. После удаления ацетонитрила при пониженном давлении проводили лиофилизацию с получением 0,9 г соединения 75а, MS масса/заряд:  $[M+H]^+ = 1285,6$ .

### Стадия 2. Синтез соединения 75b.

Добавляют 75а (700 мг, 0,54 ммоль), M5 (289 мг, 0,54 ммоль), PyBOP (313 мг, 0,6 ммоль), HOBT (81 мг, 0,6 ммоль) и 10 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 25 мл, добавляют DIPEA (155 мг, 1,2 ммоль) на бане с ледяной водой, температуру повышают до комнатной температуры и обеспечивают осуществление реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением обогащенной жидкости, которую лиофилизировали с получением 75b (304 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1734,8$ .

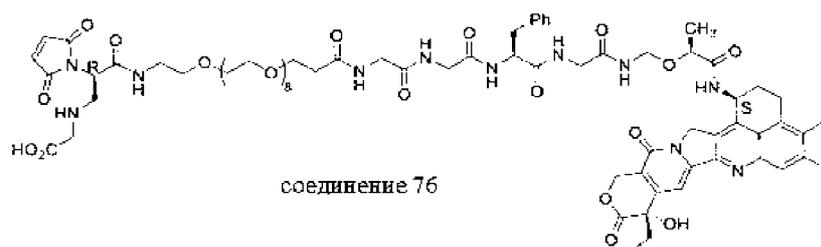
### Стадия 3. Синтез соединения 75.

Добавляют 75b (200 мг, 0,116 ммоль), бромид цинка (523 мг, 2,32 ммоль) и 10 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление

реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением твердого соединения 75 (96 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1546,6$ .

### Пример 85

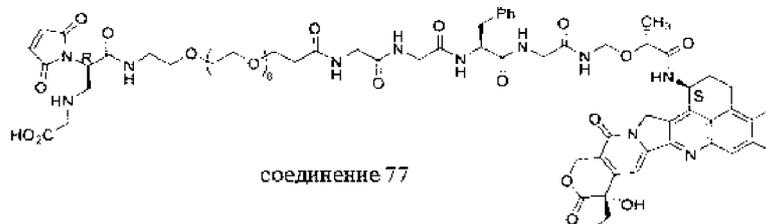
Синтез соединения 76.



Соединение 76 (92 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 84; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1546,5$ .

### Пример 86

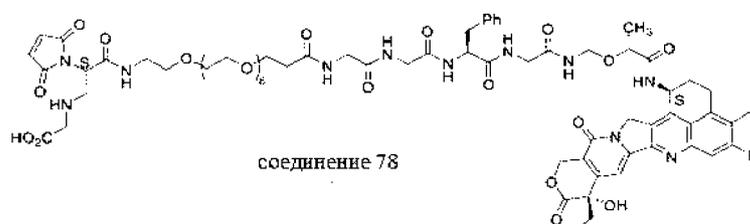
Синтез соединения 77.



Соединение 77 (87 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 84; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1546,5$ .

### Пример 87

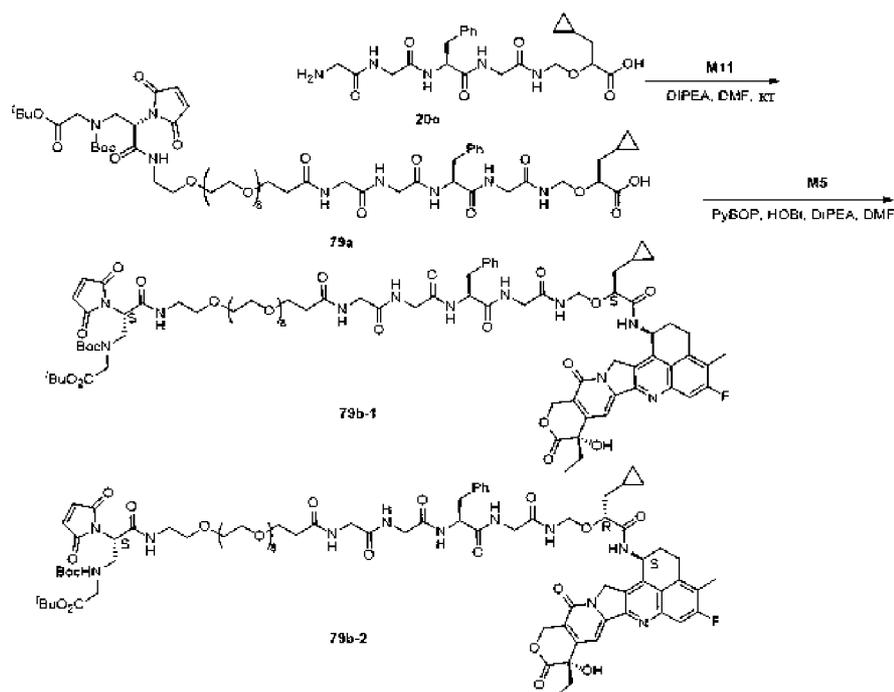
Синтез соединения 78.



Соединение 78 (94 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 84; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1546,7$ .

### Пример 88

Синтез соединений 79 и 80.



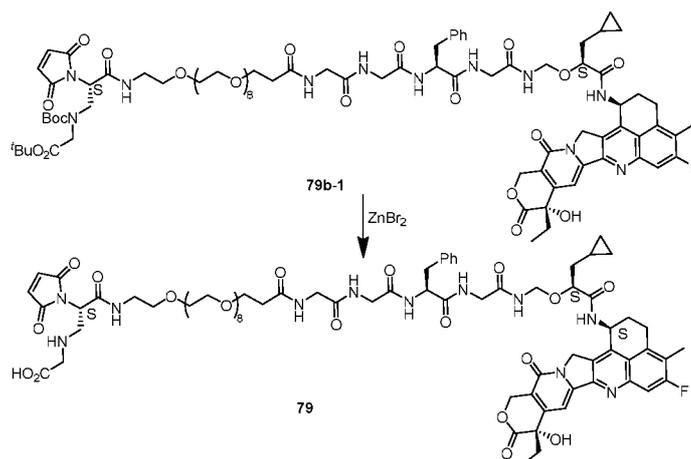
### Стадия 1. Синтез соединения 79а.

Добавляют 10 мл DMF к M11 (1 г, 0,79 моль), охлаждают до 0°C на бане с ледяной водой, добавляют соединение 20с (377 мг, 0,79 моль) и DIPEA (154 мг, 1,19 моль) и поддерживают условия с обеспечением осуществления реакции в течение 1 ч. Осуществляют контроль посредством TLC в отношении завершения реакции. Реакционный раствор очищали посредством препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (система ацетонитрил/очищенная вода) и соединение, соответствующее целевому пику, собирали. После удаления ацетонитрила при пониженном давлении проводили лиофилизацию с получением 783 мг соединения 79а, MS масса/заряд:  $[M+H]^+ = 1325,8$ .

### Стадия 2. Синтез соединений 79b-1 и 79b-2.

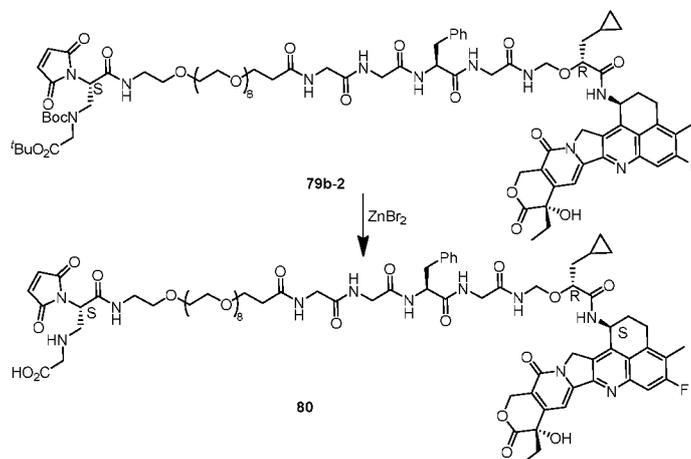
Добавляют 79а (600 мг, 0,45 ммоль), M5 (240 мг, 0,45 ммоль), PyBOP (261 мг, 0,5 ммоль), HOBT (68 мг, 0,5 ммоль) и 10 мл DMF в одnogорлую колбу объемом 25 мл, добавляют DIPEA (130 мг, 1 ммоль) на бане с ледяной водой и температуру повышают до комнатной температуры с обеспечением осуществления реакции в течение 2 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, реакционный раствор очищали посредством HPLC с получением жидкостей, обогащенных соединениями 79b-1 и 79b-2, и обогащенные жидкости лиофилизировали с получением 79b-1 (124 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1743,0$ ; и получением 79b-2 (122 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1743,0$ .

### Стадия 3. Синтез соединения 79.



Добавляют 79b-1 (100 мг, 0,057 ммоль), бромид цинка (258 мг, 1,15 ммоль) и 10 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением твердого соединения 79 (30 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1586,9$ .

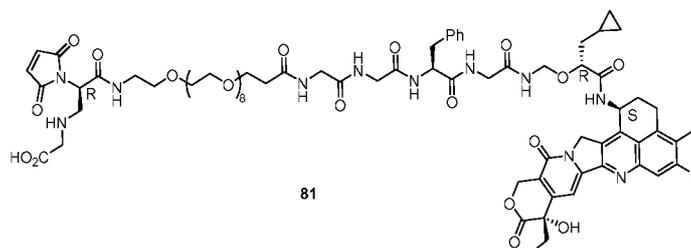
Стадия 4. Синтез соединения 80.



Добавляют 79b-2 (100 мг, 0,057 ммоль), бромид цинка (258 мг, 1,15 ммоль) и 10 мл нитрометана в одnogорлую колбу объемом 25 мл и обеспечивают осуществление реакции при 40°C в течение 1 ч. После завершения реакции, как выявлено посредством HPLC, растворитель удаляли путем концентрирования при пониженном давлении с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт очищали посредством HPLC с получением жидкости, обогащенной продуктом, которую лиофилизировали с получением твердого соединения 80 (33 мг); LC-MS:  $[M+H]^+ = 1587,0$ .

## Пример 89

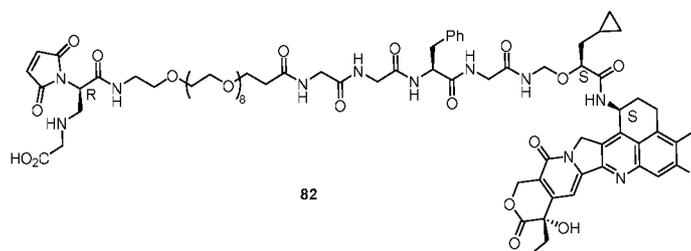
Синтез соединения 81.



Соединение 81 (24 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 88; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1586,9$ .

## Пример 90

Синтез соединения 82.



Соединение 82 (29 мг) получали со ссылкой на путь синтеза из примера 88; LC-MS:  $[M+H]^+ = 1586,9$ .

## Пример 91

## 1) Экспрессия и очистка антитела SI-1×6.4

Суспензию клеток Expi293 (Shanghai OPM Biosciences Co., Ltd.) применяли для экспрессии антитела SI-1×6.4. За день до трансфекции клетки инокулировали при плотности  $0,9 \times 10^6$  клеток/мл во встряхиваемой колбе объемом 1 л, содержащей 300 мл среды OPM-293 CD05 (81075-001, Shanghai OPM Biosciences Co., Ltd.), культивирование проводили в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 120 об./мин во встряхивателе для клеточных культур. На следующий день плазмидой, экспрессирующей антитело, трансфицировали клетки с помощью PEI-MAX, при этом массовое соотношение плазида:PEI-MAX составляло 1:3. Добавку OPM-293 ProFeed добавляли в концентрации 5% (объем/объем) в первый день после трансфекции и затем снова в концентрации 5% (объем/объем) на третий день после трансфекции и проводили центрифугирование со сбором супернатанта на шестой день после трансфекции.

Собранный супернатант экспрессирующих клеток элюировали с помощью 0,05 М ацетата натрия (pH 3,6) на колонке для аффинной хроматографии с белком А (UniMab 50, Suzhou Nanomicro Technology Co., Ltd.), и pH захваченного антитела доводили до

7,0 с помощью 1 М Tris-HCl (pH 8,8) при 0,7/10 (объем/объем), и затем пропускали через колонку SEC для гель-фильтрационной хроматографии (Superdex 200, GE) с удалением примесей, таких как полимеры, при этом буфер для антител заменяли на 20 мМ PB (pH 6,5).

Антитело SI-1 × 6.4

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь,

SEQ ID NO: 1

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGTCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTC  
AGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTGGCACAAACATACTGGTATCAGCAA  
AGAACAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGA  
TTCSTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAG  
TGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTACTGTCAACAAAATAATAACTGGCCAACC  
ACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCC  
TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC  
TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC  
TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT  
CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAA  
CAGGGGAGAGTGTTAG

Аминокислотная последовательность легкой цепи,

SEQ ID NO: 2

DILLTQSPVILSVSPGERV<sup>1</sup>SF<sup>2</sup>SCRASOSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIK<sup>3</sup>YANESIS<sup>4</sup>IGIPSRF<sup>5</sup>SGSGS  
GTDFTL<sup>6</sup>SINSVESEDIADYYCOQNNNWPTTFGAGTKLEL<sup>7</sup>KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA  
SVVCLLN<sup>8</sup>FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK<sup>9</sup>DSTYLSSTL<sup>10</sup>TL<sup>11</sup>SKADY<sup>12</sup>EK

где переменная область представляет собой

SEQ ID NO: 28

DILLTQSPVILSVSPGERV<sup>1</sup>SF<sup>2</sup>SCRASOSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIK<sup>3</sup>YANESIS<sup>4</sup>IGIPSRF<sup>5</sup>SGSGS  
GTDFTL<sup>6</sup>SINSVESEDIADYYCOQNNNWPTTFGAGTKLEL<sup>7</sup>K

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 25), CDR2 (SEQ ID NO: 26) и CDR3 (SEQ ID NO: 27) соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию тяжелой цепи и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv),

SEQ ID NO: 3

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTC  
 CATCACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAACTAACTATGGTGTACACTGGGTTCGCC  
 AGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGTGGTGGAAACACA  
 GACTATAATACACCTTTTACATCCAGACTGAGCATCAACAAGGACAATTCCAAGAGCC  
 AAGTTTTCTTTAAAATGAACAGTCTGCAATCTAATGACACAGCCATATATTAAGTGTGCC  
 AGAGCCCTCACCTACTATGATTACGAGTTTGTCTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCA  
 CTGTCTTAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAA  
 GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG  
 AACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGGTGCACACCTTC  
 CCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC  
 TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCAGCAAC  
 ACCAAGGTGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCC  
 ACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA  
 ACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGGA  
 CGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG  
 TGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG  
 GTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC  
 AAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAA  
 AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGA  
 CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCG  
 CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCC  
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC  
 AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA  
 CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGCGGTGGAGGGTCCGGCGG  
 TGGTGGATCACAGGTGCAATTGCAGGAGTCGGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGAG  
 GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATTGGATGAG  
 CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAACC  
 ATGGAAGTGCAGTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATCACCATCTCCAGAG  
 ACGACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACG  
 GCTGTGTACTACTGTGCGAGAGATCGTGGGGTGGGCTACTTCGATCTCTGGGGCCGTG  
 GCACCCTGGTACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGTTCCGGC  
 GGTGGCGGCTCCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGA  
 CAGTCGATACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTTTG  
 TCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAACTCATGATCTATGATGTCAG  
 TGATCGGCCCTCAGGGGTGTCTGATCGCTTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGC  
 CTCCCTGATCATCTCTGGCCTCCAGGCTGACGACGAGGCTGATTACTGACGCTCA  
 TATGGGAGCAGCAGCACTCATGTGATTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGACCGTCTA  
 TAA

Аминокислотная последовательность для конструкции тяжелой цепи и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv),

SEQ ID NO: 4

QVQLKOSGPGGLVOPSO<sub>1</sub>LSITCTVSGFSLTNYGVHWVROSPGKGLEWLG<sub>1</sub>IWSGGNTIDYNTIP<sub>1</sub>  
LSRLSINKDNSKSOV<sub>1</sub>FKMNSLOSNDIAIYYCARALTYDYELAYWGOGLVTVSSASTKGPS<sub>1</sub>  
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
 VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK  
 PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS  
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV  
 SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSQVQLQESGGGLYKPGGSLRLSCAASGF<sub>1</sub>  
TFSSYWAMSWVRQAPGKLEWVANINRDGSASYFDISKGRFTISRDDAKNSLYLQMN<sub>1</sub>SLRAE<sub>1</sub>  
DTAIYYCARDIGYFDLWGRGTLTVSSGGGGGSGGGGSGGGGSQALTOPASVSGSPGQSI<sub>1</sub>  
TISCIGTSSDEGGYNEF<sub>1</sub>SWYQOHPGKAPKLMYD<sub>1</sub>SDRPSGV<sub>1</sub>SDRFSGSKSGNTASLIISGLOA<sub>1</sub>  
DDEADYYC<sub>1</sub>SSYGSSSTH<sub>1</sub>IFGGGTKVTVL<sub>1</sub>

где переменная область тяжелой цепи представляет собой

SEQ ID NO: 38

QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGIIHWVRQSPGKGLEWLGIIWSGIGNIDYNIIP  
ELSRLSINKDNSKSOVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTITVSS

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 29), CDR2 (SEQ ID NO: 30) и CDR3 (SEQ ID NO: 31) соответственно.

Переменная область тяжелой цепи в структурном домене на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой

SEQ ID NO: 39

QVQLQESGGGLV'KPGGSLRLS'CAASGFTFSNYHMHWVRQAPGKGLEWVANINRIGSASYYTID  
SLKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIGYFDLWGRGTLVTVSS

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 32), CDR2 (SEQ ID NO: 33) и CDR3 (SEQ ID NO: 34) соответственно.

Переменная область легкой цепи в структурном домене на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой

SEQ ID NO: 40

QSALTQPASVSGSPGQSIITSCIGTSSDEGGYNEVSWYQQHPGKAPKLMYDLSDRPSGVSDRF  
SGSKSGNTASLIISGLQADDEADYYCSYGSSTHVI'FGGGTKVTVI

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 35), CDR2 (SEQ ID NO: 36) и CDR3 (SEQ ID NO: 37) соответственно.

2) Экспрессия и очистка антитела SI-1×22: аналогичный способ применяли для экспрессии и очистки антитела SI-1×22.

Антитело SI-1×22

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию легкой цепи и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv),

SEQ ID NO: 9

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGTCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTC  
 AGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTGGCACAAACATACTGTTATCAGCAA  
 AGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGG  
 ATTCCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAAC  
 AGTGTGGAGTCTGAAGATAATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAATAATAACTGGCCA  
 ACCACGTTCCGTTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATC  
 TGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTG  
 TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAA  
 CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA  
 GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC  
 AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG  
 CTCAACAGGGGAGAGTGTGGTGGCGGCGGAAGTGGCGGTGGAGGATCCGGCGGTG  
 GTGGATCACAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGAGGG  
 TCCCTGAGTCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATTGGATGAGCT  
 GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAACC GCGAT  
 GGAAGTGCAGTTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGA  
 CGACGCCAAGA ACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGG  
 CTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGTGGGGTGGGCTACTTCGATCTCTGGGGCCGTG  
 GCACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGTTCCGGC  
 GGTGGCGGCTCCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGA  
 CAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTTT  
 GTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCCAAACATGATCTATGATGTC  
 AGTGATCGGCCCTCAGGGGTGTCTGATCGCTTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCAACACG  
 GCCTCCCTGATCATCTCTGGCCTCCAGGCTGACGACGAGGCTGATTACTGCAGC  
 TCATATGGGAGCAGCAGCACTCATGTGATTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGACCGT  
 CCTATAA

Аминокислотная последовательность конструкции легкой цепи и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv),

SEQ ID NO: 10

DILLTQSPVILSVSPGERVFSFCRASQSIGINIIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGS  
GTDFTLSINSVESEDIADYYCOQNNNWPITIFGCGTKLELKRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA  
 SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTLKADYEK  
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSOVVOLOESGGGLVKPGGS  
LSLSCAASGFTFSYBMSWVROAPGKGLEWVANINRDGSASYVDSIKGRITISRDDAKNSLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCARDRGYGYDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSALTQP  
ASVSGSPGQSITISCTGTSSDIEGGYNEFSWYQOHPGKAPKLMYDIESDRIISGVSDRFSGSKSG  
NTASLIISGLOADDEADYYCSSEYSSSTHIFGGGTKVTVL

где переменная область легкой цепи представляет собой

SEQ ID NO: 49

DILLTQSPVILSVSPGERVFSFCRASQSIGINIIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGS  
GTDFTLSINSVESEDIADYYCOQNNNWPITIFGCGTKLELK

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 25), CDR2 (SEQ ID NO: 26) и CDR3 (SEQ ID NO: 27) соответственно.

Переменная область тяжелой цепи в структурном домене на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой

SEQ ID NO: 50

QVQLQESGGGLV<sup>K</sup>PGGSL<sup>L</sup>SCAASGFTFSSY<sup>M</sup>MSW<sup>R</sup>QAPGKGLEW<sup>V</sup>ANINRDGSASYY<sup>D</sup>  
SLKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<sup>R</sup>YGYFDLWGRGTLV<sup>T</sup>SS

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 32), CDR2 (SEQ ID NO: 33) и CDR3 (SEQ ID NO: 34) соответственно.

Вариабельная область легкой цепи в структурном домене на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой

SEQ ID NO: 51

QSALTQPASVSGSPGQSITISC<sup>T</sup>IGISSD<sup>I</sup>GGYNE<sup>F</sup>SWYQQHPGKAPKLMY<sup>D</sup>DSDR<sup>R</sup>SGVSDR<sup>R</sup>  
FSGSKSGNTASLIISGLQADDEADYYC<sup>S</sup>SYGSS<sup>T</sup>HYIFGGG<sup>T</sup>TKV<sup>T</sup>VL

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 35), CDR2 (SEQ ID NO: 36) и CDR3 (SEQ ID NO: 37) соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелые цепи,

SEQ ID NO: 11

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTC  
CATCACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAACTAACTATGGTGTACACTGGGTTCCG  
CAGTCTCCAGGAAAGTGCCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGTGGTGAAACAC  
AGACTATAATACACCTTTCACATCCAGACTGAGCATCAACAAGGACAATTCCAAGA  
GCCAAGTTTTCTTTAAAATGAACAGTCTGCAATCTAATGACACAGCCATATATTACT  
GTGCCAGAGCCCTCACCTACTATGATTACGAGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTC  
TGGTCACTGTCTCTGCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCT  
CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC  
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA  
CACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC  
CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC  
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACA  
CATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC

CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG  
GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACTGGTACGTGGACGG  
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG  
TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGACACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA  
GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT  
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCCG  
GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC  
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGA  
CCACGCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGT  
GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG  
CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи,

SEQ ID NO: 12

QV<sup>L</sup>QK<sup>S</sup>QSGPGLV<sup>O</sup>PSQSL<sup>S</sup>ITCTV<sup>S</sup>GFSL<sup>N</sup>YGI<sup>H</sup>WV<sup>R</sup>QSPGK<sup>L</sup>EWL<sup>G</sup>I<sup>W</sup>SGG<sup>N</sup>I<sup>D</sup>YN<sup>I</sup>P  
E<sup>T</sup>SR<sup>L</sup>SI<sup>N</sup>KD<sup>N</sup>SK<sup>S</sup>OV<sup>F</sup>FK<sup>M</sup>NS<sup>L</sup>Q<sup>S</sup>ND<sup>T</sup>AI<sup>Y</sup>Y<sup>C</sup>AR<sup>A</sup>L<sup>T</sup>Y<sup>D</sup>Y<sup>E</sup>FA<sup>W</sup>GO<sup>G</sup>TL<sup>V</sup>TV<sup>S</sup>AA<sup>S</sup>T<sup>K</sup>GP<sup>S</sup>  
VF<sup>L</sup>AP<sup>S</sup>SK<sup>S</sup>TSG<sup>G</sup>TAAL<sup>G</sup>CL<sup>V</sup>K<sup>D</sup>Y<sup>F</sup>PE<sup>P</sup>VT<sup>V</sup>SW<sup>N</sup>SG<sup>A</sup>L<sup>T</sup>SG<sup>V</sup>HT<sup>F</sup>PA<sup>V</sup>L<sup>Q</sup>SS<sup>G</sup>LY<sup>S</sup>LS<sup>S</sup>  
V<sup>V</sup>TV<sup>P</sup>SS<sup>S</sup>L<sup>G</sup>T<sup>Q</sup>TY<sup>I</sup>C<sup>N</sup>V<sup>N</sup>H<sup>K</sup>PS<sup>N</sup>T<sup>K</sup>V<sup>D</sup>K<sup>R</sup>VE<sup>P</sup>K<sup>S</sup>CD<sup>K</sup>TH<sup>T</sup>CP<sup>P</sup>CA<sup>P</sup>ELL<sup>G</sup>GP<sup>S</sup>V<sup>F</sup>LP<sup>F</sup>  
PK<sup>P</sup>K<sup>D</sup>TL<sup>M</sup>IS<sup>R</sup>T<sup>P</sup>EV<sup>T</sup>C<sup>V</sup>V<sup>V</sup>D<sup>V</sup>SH<sup>E</sup>DP<sup>E</sup>V<sup>K</sup>FN<sup>W</sup>Y<sup>V</sup>D<sup>G</sup>VE<sup>V</sup>HN<sup>A</sup>K<sup>T</sup>K<sup>P</sup>REE<sup>Q</sup>YN<sup>S</sup>TY<sup>R</sup>V<sup>V</sup>  
V<sup>S</sup>VL<sup>T</sup>VL<sup>H</sup>Q<sup>D</sup>WL<sup>N</sup>G<sup>K</sup>EY<sup>K</sup>CK<sup>V</sup>SN<sup>K</sup>AL<sup>P</sup>API<sup>E</sup>K<sup>T</sup>ISK<sup>A</sup>K<sup>G</sup>Q<sup>P</sup>REP<sup>Q</sup>V<sup>Y</sup>TL<sup>P</sup>PS<sup>R</sup>DEL<sup>T</sup>KN<sup>Q</sup>  
Q<sup>V</sup>SL<sup>T</sup>CL<sup>V</sup>K<sup>G</sup>F<sup>Y</sup>PS<sup>D</sup>IA<sup>V</sup>EW<sup>E</sup>S<sup>N</sup>G<sup>Q</sup>PEN<sup>N</sup>Y<sup>K</sup>TP<sup>P</sup>V<sup>L</sup>SD<sup>G</sup>S<sup>F</sup>FL<sup>Y</sup>SK<sup>L</sup>TV<sup>D</sup>K<sup>S</sup>R<sup>W</sup>Q<sup>Q</sup>G<sup>N</sup>  
NF<sup>F</sup>CS<sup>V</sup>M<sup>H</sup>EAL<sup>H</sup>N<sup>H</sup>Y<sup>T</sup>Q<sup>K</sup>SL<sup>S</sup>LP<sup>G</sup>

где вариабельная область тяжелой цепи представляет собой

SEQ ID NO: 52

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGFIHWVRQSPGKCLEWLGFIWSSGQNTDYNIT  
ITSRLSINKDNSKSOVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYLEFAYWGQGLVTVSA

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 29), CDR2 (SEQ ID NO: 30) и CDR3 (SEQ ID NO: 31) соответственно.

(3) Экспрессия и очистка антитела SI-1×24: аналогичный способ применяли для экспрессии и очистки антитела SI-1×24.

Антитело SI-1×24

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь,

SEQ ID NO: 13

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGTCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTC  
AGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTGGCACAAACATACACTGGTATCAGCAA  
AGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGG  
ATTCCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAAC  
AGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTACTGTCAACAAAATAATAACTGGCCA  
ACCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATC  
TGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGTTGTG  
TGCCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAA  
CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA  
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC  
AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG  
CTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

Аминокислотная последовательность легкой цепи,

SEQ ID NO: 14

DILLTQSPVILSVSPGERVFSFSCRASQSIGTNIHWYQOORTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGS  
GTDFTLSINSVESEDIADYYCOONNWPITFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA  
SVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEK  
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

где вариабельная область представляет собой

SEQ ID NO: 28

DILLTQSPVILSVSPGERVFSFSCRASQSIGTNIHWYQOORTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGS  
GTDFTLSINSVESEDIADYYCOONNWPITFGAGTKLELK

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 25), CDR2 (SEQ ID NO: 26) и CDR3 (SEQ ID NO: 27) соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию тяжелой цепи и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv),

SEQ ID NO: 15

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAG  
 ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAACC GCGATGGAAGTGC  
 GAGTTACTATGTGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACGACGCCAA  
 GAACACTACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTA  
 CTGTGCGAGAGATCGTGGGGTGGGCTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGT  
 CACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCGGTT CAGGCGGAGGTGGTTCCGGCGGTGGCGGCT  
 CCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCAC  
 CATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTTTGTCTCCTGGTAC  
 CAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCATGATCTATGATGTCAGTGATCGGCC  
 TCAGGGGTGTCTGATCGCTTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGATC  
 ATCTCTGGCCTCCAGGCTGACGACGAGGCTGATTACTGCAGCTCATATGGGAGCA  
 GCAGCACTCATGTGATTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGACCGTCTTAGGCGGTGGAG  
 GATCCGGCGGTGGTGGATCACAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTG  
 CAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAATAACT  
 ATGGTGTACTACTGGGTTCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGA  
 TATGGAGTGGTGGAAACACAGACTATAATACACCTTTCACATCCAGACTGAGCATCAA  
 CAAGGACAATTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTTAAATGAACAGTCTGCAATCTAATGAC  
 ACAGCCATATATTA CTGTGCCAGAGCCCTCACCTACTATGATTACGAGTTTGCTTACTG  
 GGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTT  
 CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT  
 GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGA  
 CCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCA  
 GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG  
 TGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGT  
 GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC  
 AGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA  
 GGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACT  
 GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG  
 TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTG  
 AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGA  
 GAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC  
 CCCATCCC GGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
 GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC  
 AACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCA  
 AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG  
 ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT  
 TAA

Аминокислотная последовательность конструкции тяжелой цепи и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv),

SEQ ID NO: 16

QVLOESGGGLV KPGGSLRLS CAASGF TFSY WMN WVROAPGKGLEWVANINRDGSASY YLD  
SLKGRFTISRDDAKNSLYLOMNSLRAEDTAVYYCAR DRGIVCFEDLWGRGTLVTVSSGGGGSG  
GGGSGGGGSQSALTOPASVSGSPGOSITISCTGINSDFGGINFLSNWYQOHPGKAPKLMYDLS  
DRPSGVSDRFSGSKSGNTASLIISGLQADDEADYYCSSYGSSTHIFGGGTKVTVLGGGGSGG  
GGSQVQLKOSGPGLVOPSQSLITCTVSGFSLNYGIHWVROSPGKGLEWLGVIWSSGNTDY  
NIPFTSRLSINKDNSKSOVTFKMNLSLQNDTAVYYCARALYYDYELAYWGQGLVTVSSASTK  
 GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLOSSGLYSL  
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF  
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR  
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK  
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

где варибельная область тяжелой цепи представляет собой

SEQ ID NO: 38

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGIIHWVROSPGKGLEWLGITWESGNIIDYNI  
IFSRLSINKDNSKSKQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYIDYELAYWGQGLTVTVSS

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 29), CDR2 (SEQ ID NO: 30) и CDR3 (SEQ ID NO: 31) соответственно.

Варибельная область тяжелой цепи в структурном домене на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой

SEQ ID NO: 39

QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMISWVROAPGKGLEWVANINRDGSASYIID  
SIKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGIGYFDLWGRGTLTVTVSS

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 32), CDR2 (SEQ ID NO: 33) и CDR3 (SEQ ID NO: 34) соответственно.

Варибельная область легкой цепи в структурном домене на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой

SEQ ID NO: 40

QSALTQPASVSGSPGQSITISCIGLSSDIUGGYNELSWYQQHPGKAPKLMYIDESDRPSGVSIDRF  
SGSKSGNTASLIISGLQADDEADYYCSYGSSTHLLIFGGGKTKVTVL

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 35), CDR2 (SEQ ID NO: 36) и CDR3 (SEQ ID NO: 37) соответственно.

#### Пример 92

##### 1) Экспрессия и очистка антитела SI-1×4

Суспензию клеток (Shanghai OPM Biosciences Co., Ltd.) применяли для экспрессии антитела SI-1×4. За день до трансфекции клетки инокулировали при плотности  $0,9 \times 10^6$  клеток/мл во встряхиваемой колбе объемом 1 л, содержащей 300 мл среды OPM-293 CD05 (81075-001, Shanghai OPM Biosciences Co., Ltd.), и культивировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 120 об./мин во встряхивателе для клеточных культур. На следующий день плазмидой, экспрессирующей антитело, трансфицировали клетки с помощью PEI-MAX, при этом массовое соотношение плазмида:PEI-MAX составляло 1:3. Добавку OPM-293 ProFeed добавляли в концентрации 5% (объем/объем) в первый день после трансфекции, и затем снова в концентрации 5% (объем/объем) на третий день после трансфекции, и затем проводили центрифугирование со сбором супернатанта на шестой день после трансфекции.

Собранный супернатант экспрессирующих клеток собирали и элюировали с помощью 0,05 М ацетата натрия (pH 3,6) на колонке для аффинной хроматографии с белком A (UniMab 50, Suzhou Nanomicro Technology Co., Ltd.), и pH захваченного

антитела доводили до 7,0 с помощью 1 М Tris-HCl (pH 8,8) при 0,7/10 (объем/объем), и затем пропускали через колонку SEC для гель-фильтрационной хроматографии (Superdex 200, GE) с удалением примесей, таких как полимеры, при этом буфер для антител заменяли на 20 мМ PB (pH 6,5).

Антитело SI-1×4

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь,

SEQ ID NO: 5

GATATTCAAATGACTCAATCTCCTTCTTCTCTTTCTGCTTCTGTTGGTGATCGTGTTACT  
ATTACTTGTGCTTCTTCTCAAAATATTGTTCAATCTAATGGTAATACTTATCTTGATTGGT  
ATCAACAAACTCCTGGTAAAGCTCCTAAACTTCTTATTTATAAAGTTTCTAATCGTTTT  
TCTGGTGTTCCTTCTCGTTTTTCTGGTCTGGTCTGGTACTGATTTTACTTTTACTATT  
TCTTCTTCAACCTGAAGATATTGCTACTTATTATTGTTTTCAATATCTCATGTTTCTT  
GGACTTTTGGTCAAGGTAATAAATTCAAATTACTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGT  
CTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGC  
CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC  
CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC  
CTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG  
TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA  
ACAGGGGAGAGTGTTAG

Аминокислотная последовательность легкой цепи,

SEQ ID NO: 6

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQNIIVHSNGNIYLDWYQOTPGKAPKLLIYKISNRISGVP  
SRFSGSGSGTDFTFTISSLOPEDIATYYCTQYSHLPWTFGQGTKLOITRTVAAPSVFIFPPSDEQ  
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTSK  
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

где варибельная область представляет собой

SEQ ID NO: 44

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQNIIVHSNGNIYLDWYQOTPGKAPKLLIYKISNRISGVP  
SRFSGSGSGTDFTFTISSLOPEDIATYYCTQYSHLPWTFGQGTKLOIT

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 41), CDR2 (SEQ ID NO: 42) и CDR3 (SEQ ID NO: 43) соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию тяжелой цепи и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv),

SEQ ID NO: 7

CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGCAGCAGCGTGA  
AGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAACTACTACATCTACTGGGTGC  
GGCAGGCCCGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCGGCATCAACCCACCAGCGGC  
GGCAGCAACTTCAACGAGAAGTTCAAGACCCGGGTGACCATCACCGCCGACGAGAG  
CAGCACCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCTTCTA  
CTTCTGCACCCGGCAGGGCCTGTGGTTCGACAGCGACGGCCGGGGCTTCGACTTCTG  
GGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCT  
TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC  
TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGA  
CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCA  
GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG  
TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGT  
GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC  
AGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA  
GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACT  
GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG  
TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTG  
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGA  
GAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC  
CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
GCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC  
AACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCA  
AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG  
ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT  
GGCGGTGGAGGGTCCGGCGGTGGTGGATCACAGGTGCAATTGCAGGAGTCCGGGGG  
AGGCCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTAC  
CTTAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG  
GGTGGCCAACATAAACCGCGATGGAAGTGCAGTTACTATGTGGACTCTGTGAAGGG  
CCGATTCACCATCTCCAGAGACGACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAG  
CCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATCGTGGGGTGGGCTA  
CTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCAACCGTCTCGAGCGGTGGAGGGGTT  
AGGCGGAGGTGGTTCCGGCGGTGGCGGCTCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTC  
CGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGA  
CGTTGGTGGTTATAACTTTGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAAGCCCCAA  
ACTCATGATCTATGATGTCAGTGATCGGCCCTCAGGGGTGTCTGATCGCTTCTCCGGC  
TCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGATCATCTCTGGCCTCCAGGCTGACGACGAG  
GCTGATTATTACTGCAGCTCATATGGGAGCAGCAGCACTCATGTGATTTTCGGCGGAG  
GGACCAAGGTGACCGTCTATAA

Аминокислотная последовательность конструкции тяжелой цепи и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv),

SEQ ID NO: 8

QVQLOOSGAEVKKPGSSFKVSKASGYFTNYIYVWVROAPGQGLEWIGGINPTSIGGSNI NE  
KFKTRVTTADESSTAYMELSSLRSEDTAFYFCTROGLWFDSDGRGDEFWGQGTITVTVSSAS  
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGL  
YLSVVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRD  
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSQVQLOESGGGLVKPGGSL  
RLSCAASGFTFSSYIWMVWVROAPGKGLEWVANINRIGSASYIYFDSTKGRFTISRDDAKNSLYL  
OMNSLRAEDTAVYYCARDRGIYFDLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSQALTOPAS  
VSGSPGOSITISCIGTSSDIYGGYNIISWYQQHPGKAPKLMYDIYSDRPSGVSDRFSGSKSGNT  
ASLIHSGLQADDEADYYCSYSGSSSIHIFGGGTKVTVL

где переменная область тяжелой цепи представляет собой

SEQ ID NO: 48

QVQLQOSGAEVKKPGSSFKVSKASGYFTNYIYVWRQAPGQGLEWIGGINPTSIGGSNI NE  
KFKTRVTTADESSTAYMELSSLRSEDTAFYFCTROGLWFDSDGRGDEFWGQGTITVTVSS

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 45), CDR2 (SEQ ID NO: 46) и CDR3 (SEQ ID NO: 47) соответственно.

Переменная область тяжелой цепи в структурном домене на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой

SEQ ID NO: 39

QVQLOESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYIWMVWVROAPGKGLEWVANINRIGSASYIYFD  
STKGRFTISRDDAKNSLYLOMNSLRAEDTAVYYCARDRGIYFDLWGRGTLVTVSS

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 32), CDR2 (SEQ ID NO: 33) и CDR3 (SEQ ID NO: 34) соответственно.

Переменная область легкой цепи в структурном домене на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой

SEQ ID NO: 40

QSALTQPASVSGSPGOSITISCIGTSSDIYGGYNIISWYQQHPGKAPKLMYDIYSDRPSGVSDRF  
SGSKSGNTASLIHSGLQADDEADYYCSYSGSSSIHIFGGGTKVTVL

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 35), CDR2 (SEQ ID NO: 36) и CDR3 (SEQ ID NO: 37) соответственно.

2) Экспрессия и очистка антитела SI-1×25: аналогичный способ применяли для экспрессии и очистки антитела SI-1×25.

Антитело SI-1 x 25

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию легкой цепи и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv),

SEQ ID NO: 17

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAG  
TCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGTCCGCC  
AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAACC CGCGATGGAAGTGCG  
AGTTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACGACGCCAAG  
AACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTAC  
TGTGCGAGAGATCGTGGGGTGGGCTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCTGGTC  
ACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTACGGCGGAGGTGGTTCCGGCGGTGGCGGCTC  
CCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGATCACC  
ATCTCCTGC ACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTTTGTCTCCTGGTACC  
AACAAACACCCAGGCAAAGCCCCCAAACATCATGATCTATGATGTCAGTGATCGGCCCT  
CAGGGGTGTCTGATCGCTTCTCCGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGATCAT  
CTCTGGCCTCCAGGCTGACGACGAGGCTGATTACTGCAGCTCATATGGGAGCAGC  
AGCACTCATGTGATTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGACCGTCCTAGGCGGTGGAGG  
ATCCGGCGGTGGTGGATCAGACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGTCATCCTGTCTGTG  
AGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTGGCACAAA  
CATACTGTTATCAGCAAAGAACAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCT  
TCTGAGTCTATCTCTGGGATTCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATT  
TACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTACTGTCAACA  
AAATAATAACTGGCCAACCACGTTCCGTTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTAC  
GGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA  
ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT  
GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG  
GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGA  
CTACGAGAAACACAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC  
CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

Аминокислотная последовательность конструкции легкой цепи и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv),

SEQ ID NO: 18

QVQLQESGGGLYKPGGSLSLSCAASGFTFSSYWMNWVROAPGKGLEWVANINRDKGSASYTID  
SLKGRFTISRDDAKNSLYLOMNSLRAEDTAVYYCARDRGLGYFDLWGRGTLVTVSSGGGSG  
GGGSGGGGSQSALTOPASVSGSPGOSITISCTGTSSTLCKGNYYSWYOOHPGKAPKLMYDES  
DRPSGVSDRFSGSKSGNTASLIISGLOADDEADYYCSSTYSSSIHYIFGGGTKVTVLGGGSGG  
GGSDILLTQSPVILSVSPGERVFSFSCRASQSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSG  
SGSGTDFLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGCGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS  
GTASVVCLLNFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTKAD  
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

где переменная область легкой цепи представляет собой

SEQ ID NO: 49

DILLTQSPVILSVSPGERVFSFSCRASQSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGS  
GTDFLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGCGTKLELK

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 25), CDR2 (SEQ ID NO: 26) и CDR3 (SEQ ID NO: 27) соответственно.

Переменная область тяжелой цепи в структурном домене на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой

SEQ ID NO: 50

QVQLQESGGGLV<sup>K</sup>PGGSL<sup>L</sup>SL<sup>L</sup>CAASGFTFS<sup>S</sup>YW<sup>M</sup>SW<sup>R</sup>QAPGKGLEWV<sup>A</sup>NIN<sup>R</sup>DG<sup>S</sup>AS<sup>Y</sup>Y<sup>L</sup>D<sup>L</sup>  
SL<sup>K</sup>GRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAV<sup>Y</sup>Y<sup>C</sup>AR<sup>L</sup>D<sup>K</sup>GL<sup>G</sup>Y<sup>F</sup>D<sup>L</sup>WGRGTLTV<sup>S</sup>S

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 32), CDR2 (SEQ ID NO: 33) и CDR3 (SEQ ID NO: 34) соответственно.

Вариабельная область легкой цепи в структурном домене на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой

SEQ ID NO: 51

QSALTQPASVSGSPGQ<sup>S</sup>ITISC<sup>T</sup>IG<sup>T</sup>SS<sup>I</sup>Y<sup>G</sup>GY<sup>N</sup>L<sup>F</sup>SWY<sup>Q</sup>QHPGKAPKLM<sup>I</sup>Y<sup>D</sup>L<sup>S</sup>DR<sup>P</sup>SGV<sup>S</sup>DR<sup>F</sup>  
SGSKSGNTASLHSGLQADDEAD<sup>Y</sup>Y<sup>C</sup>SS<sup>Y</sup>GS<sup>S</sup>TH<sup>V</sup>L<sup>F</sup>GGG<sup>T</sup>KV<sup>T</sup>VL

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 35), CDR2 (SEQ ID NO: 36) и CDR3 (SEQ ID NO: 37) соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь,

SEQ ID NO: 19

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTC  
 CATCACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAAC<sup>T</sup>AAC<sup>T</sup>ATGGTGTACACTGGGTT<sup>C</sup>GC  
 CAGTCTCCAGGAAAGTGCCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGTGGTGGAAACAC  
 AGACTATAATACACCTTTCACATCCAGACTGAGCATCAACAAGGACAATTCCAAGA  
 GCCAAGTTTCTTTAA<sup>A</sup>ATGAACAGTCTGCAATCTAATGACACAGCCATATATTACT  
 GTGCCAGAGCCCTCACCTACTATGATTACGAGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTC  
 TGGTCACTGTCTCTGCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCT  
 CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC  
 TTCCCGAACC<sup>G</sup>GTGACGGTGTCTGGA<sup>A</sup>CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC<sup>G</sup>TGCA  
 CACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC  
 CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC  
 CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAA<sup>A</sup>CTCACA  
 CATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC  
 CCCC<sup>A</sup>AAACCC<sup>A</sup>AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG  
 GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG  
 CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG  
 TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA  
 GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT  
 CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGG  
 GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC  
 AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA<sup>A</sup>CTACAAGA  
 CCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGT  
 GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG  
 CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи,

SEQ ID NO: 20

QV<sup>L</sup>Q<sup>S</sup>Q<sup>S</sup>GG<sup>L</sup>V<sup>K</sup>PG<sup>G</sup>SL<sup>L</sup>SL<sup>L</sup>CA<sup>A</sup>SG<sup>F</sup>TF<sup>S</sup>YW<sup>M</sup>SW<sup>R</sup>Q<sup>A</sup>PG<sup>K</sup>GL<sup>E</sup>W<sup>V</sup>A<sup>N</sup>IN<sup>R</sup>D<sup>G</sup>S<sup>A</sup>Y<sup>Y</sup>L<sup>D</sup>  
SL<sup>K</sup>GR<sup>F</sup>TS<sup>R</sup>DD<sup>A</sup>KN<sup>S</sup>LY<sup>L</sup>QM<sup>N</sup>SL<sup>R</sup>AE<sup>D</sup>TA<sup>V</sup>Y<sup>C</sup>AR<sup>L</sup>D<sup>K</sup>GL<sup>G</sup>Y<sup>F</sup>D<sup>L</sup>W<sup>G</sup>R<sup>G</sup>TL<sup>T</sup>V<sup>S</sup>S  
Q<sup>S</sup>AL<sup>T</sup>Q<sup>P</sup>AS<sup>V</sup>SG<sup>S</sup>PG<sup>Q</sup>S<sup>I</sup>TISC<sup>T</sup>IG<sup>T</sup>SS<sup>I</sup>Y<sup>G</sup>GY<sup>N</sup>L<sup>F</sup>SW<sup>Y</sup>Q<sup>Q</sup>HP<sup>G</sup>K<sup>A</sup>PK<sup>L</sup>M<sup>I</sup>Y<sup>D</sup>L<sup>S</sup>DR<sup>P</sup>SG<sup>V</sup>S<sup>D</sup>R<sup>F</sup>  
SG<sup>S</sup>KS<sup>G</sup>SG<sup>N</sup>TAS<sup>L</sup>H<sup>S</sup>GL<sup>Q</sup>AD<sup>D</sup>EAD<sup>Y</sup>Y<sup>C</sup>SS<sup>Y</sup>GS<sup>S</sup>TH<sup>V</sup>L<sup>F</sup>GG<sup>G</sup>T<sup>K</sup>V<sup>T</sup>VL  
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS<sup>G</sup>VHT<sup>F</sup>PAVLQSSGLYSLSS  
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF  
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV

VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN  
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  
 NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

где переменная область тяжелой цепи представляет собой

SEQ ID NO: 52

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGFIHWVRQSPGKCLEWLGFIWSSGNTIDYNIIP  
ELSRLSINKDNSKSOVFFKMNSLQSNDAIYYCARALDYDYELAYWGQGLVTVSA

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 29),  
 CDR2 (SEQ ID NO: 30) и CDR3 (SEQ ID NO: 31) соответственно.

(3) Экспрессия и очистка антитела SI-1×26: аналогичный способ применяли для  
 экспрессии и очистки антитела SI-1×26.

Антитело SI-1×26

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию легкой  
 цепи и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv),

SEQ ID NO: 21

GATATTCAAATGACTCAATCTCCTTCTTCTCTTTCTGCTTCTGTTGGTGATCGTGTТАCT  
 ATTACTTGTCTGTTCTTCTCAAААТАТТGTTCAТTCTAATGGTAATACTTATCTTGATTGGT  
 ATCAACAАACTCCTGGTAAAGCTCCTAAACTTCTTATTTATAAAGTTTCTAATCGTTTT  
 TCTGGTGTTCCTTCTCGTTTTTCTGGTТCTGGTТCTGGTACTGATTTTACTTTTACTATT  
 TCTTCTCTTCAACCTGAAGATATTGCTACTTATTATTGTTTTCAATATTCTCATGTTCTT  
 GGACTTTTGGTTGCGGТАCTAAACTTCAAATTACTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGT  
 CTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAАCTGCCTCTGTTGTGTGC  
 CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC  
 CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC  
 CTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAАAG  
 TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA  
 ACAGGGGAGAGTGTGGTGGCGGCGGAAGTGGCGGTGGAGGATCCGGCGGTGGTGG  
 ATCACAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCC  
 TGAGTCTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATTGGATGAGCTGGGT  
 CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAACC GCGATGGAA  
 GTGCGAGTТАCTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACGACG  
 CCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGT  
 ATTACTGTGCGAGAGATCGTGGGGTGGGCTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCТ  
 GGTCACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTCAAGCGGAGGTGGTTCCGGCGGTGGCG  
 GCTCCCAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGGACAGTCGAT  
 CACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTGGTGGTTATAACTTTGTCTCCTGG  
 TACCAACAACACCAGGCAAAGCCCCCAAАCTCATGATCTATGATGTCAGTGATCGG  
 CCTCAGGGGTGTCTGATCGTТCTCCGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTG  
 ATCATCTCTGGCCTCCAGGCTGACGACGAGGCTGATTATTACTGCAGCTCATATGGGA  
 GCAGCAGCACTCATGTGATTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGACCGTCCTATAA

Аминокислотная последовательность конструкции легкой цепи и структурного  
 домена на основе одноцепочечного Fv (scFv),

SEQ ID NO: 22



CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCCGGCAGCAGCGTGA  
 AGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAACTACTACATCTACTGGGTGC  
 GGCAGGCCCGCCAGTGTCTGGAGTGGATCGGCGGCATCAACCCACCAGCGGC  
 GGCAGCAACTTCAACGAGAAGTTC AAGACCCGGGTGACCATCACCGCCGACGAGAG  
 CAGCACCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCTTCTA  
 CTTCTGCACCCGGCAGGGCCTGTGGTTCGACAGCGACGGCCGGGGCTTCGACTTCTG  
 GGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCT  
 TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC  
 TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGA  
 CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCA  
 GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG  
 TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGT  
 GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC  
 AGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA  
 GGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACT  
 GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAG  
 TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTG  
 AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGA  
 GAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC  
 CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
 GCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC  
 AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCA  
 AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG  
 ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT  
 TAA

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи,

SEQ ID NO: 24

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKFSCKASGYTFITNYIYWVROAPGQCLEWIGGINPISGGSNINE  
KFKTRVTTADESSTAYMELSSLRSEDTAFYFCTROGLWFDSDGRGFDLWGQGTITVSSAS  
 TKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGL  
 YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS  
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYITLPPSRD  
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

где вариабельная область тяжелой цепи представляет собой

SEQ ID NO: 54

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKFSCKASGYTFITNYIYWVROAPGQCLEWIGGINPISGGSNINE  
KFKTRVTTADESSTAYMELSSLRSEDTAFYFCTROGLWFDSDGRGFDLWGQGTITVSS

где подчеркнутые части представляют собой, слева направо, CDR1 (SEQ ID NO: 45),  
 CDR2 (SEQ ID NO: 46) и CDR3 (SEQ ID NO: 47) соответственно.

### Пример 93

1) Образец конъюгата антитело SI-1×6.4-лекарственное средство получали путем сочетания антитела SI-1×6.4 с полезной нагрузкой.

После клеточной экспрессии и очистки посредством аффинной хроматографии с белком А и хроматографии на молекулярных ситах антитело SI-1×6.4 заменяли в 20 mM PB, буфер с pH 6,5, и антитело SI-1×6.4 концентрировали или разбавляли до

концентрации белка, составляющей 3 мг/мл. Полезная нагрузка представляла собой белый порошок, который растворяли до концентрации 20 мг/мл с помощью DMA и отстаивали. Для открытия межцепочечных дисульфидных связей антитела SI-1×6.4 сначала добавляли 20-кратный ТЕСР в соответствии с молекулярным соотношением и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 3 ч. Затем добавляли 20-кратный раствор полезной нагрузки в соответствии с молекулярным соотношением и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 1 ч. После того, как реакция завершилась, полезную нагрузку, которая не была подвергнута сочетанию с SI-1×6.4, удаляли посредством ультрафильтрации с использованием центрифужной пробирки для ультрафильтрации на 30 кДа и таким образом получали образец конъюгата антитело SI-1×6.4-лекарственное средство.

2) Образец конъюгата антитело SI-1×22-лекарственное средство получали путем сочетания антитела SI-1×22 с полезной нагрузкой аналогичным способом.

3) Образец конъюгата антитело SI-1×24-лекарственное средство получали путем сочетания антитела SI-1×24 с полезной нагрузкой аналогичным способом.

#### Пример 94

1) Образец конъюгата антитело SI-1×4-лекарственное средство получали путем сочетания антитела SI-1×4 с полезной нагрузкой.

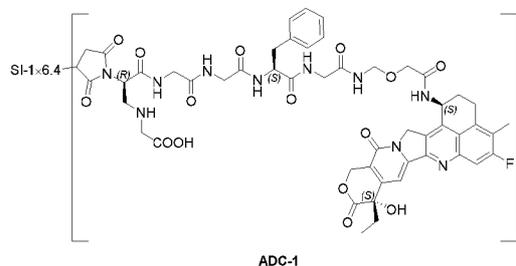
После клеточной экспрессии и очистки посредством аффинной хроматографии с белком А и хроматографии на молекулярных ситах антитело SI-1×4 заменяли в 20 мМ РВ, буфер с рН 6,5, и антитело SI-1×4 концентрировали или разбавляли до концентрации белка, составляющей 3 мг/мл. Полезная нагрузка представляла собой белый порошок, который растворяли до концентрации 20 мг/мл с помощью DMA и отстаивали. Для открытия межцепочечных дисульфидных связей антитела SI-1×4 сначала добавляли 20-кратный ТЕСР в соответствии с молекулярным соотношением и выполняли реакцию при комнатной температуре в течение 3 ч. Затем добавляли 20-кратный раствор полезной нагрузки в соответствии с молекулярным соотношением и выполняли реакцию при комнатной температуре в течение 1 ч. По завершении реакции полезную нагрузку, которая не была подвергнута сочетанию с SI-1×4, удаляли посредством ультрафильтрации с использованием центрифужной пробирки для ультрафильтрации на 30 кДа с получением образца конъюгата антитело SI-1×4-лекарственное средство.

2) Образец конъюгата антитело SI-1×25-лекарственное средство получали путем сочетания антитела SI-1×25 с полезной нагрузкой аналогичным способом.

3) Образец конъюгата антитело SI-1×26-лекарственное средство получали путем сочетания антитела SI-1×26 с полезной нагрузкой аналогичным способом.

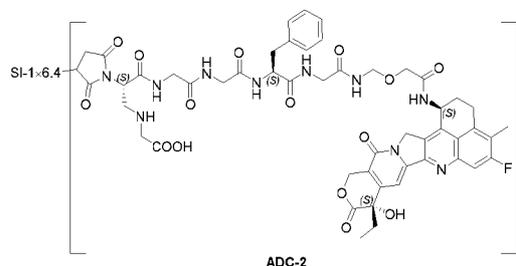
#### Пример 95

ADC-1 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



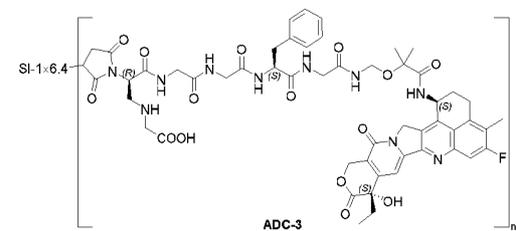
#### Пример 96

ADC-2 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



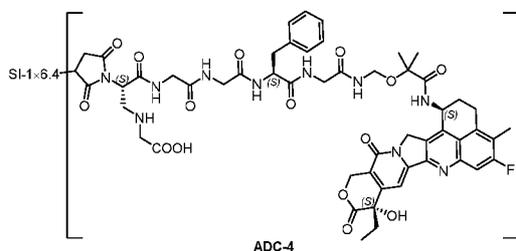
#### Пример 97

ADC-3 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



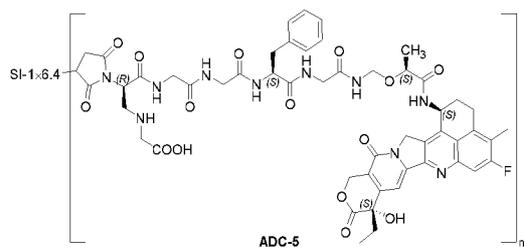
#### Пример 98

ADC-4 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



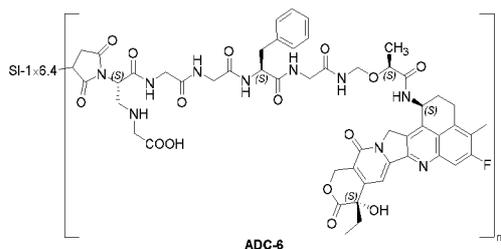
#### Пример 99

ADC-5 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



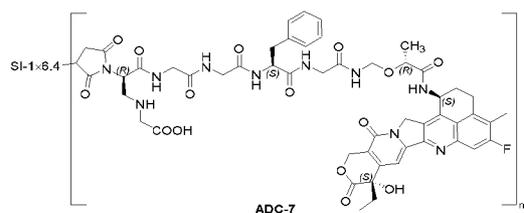
Пример 100

ADC-6 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



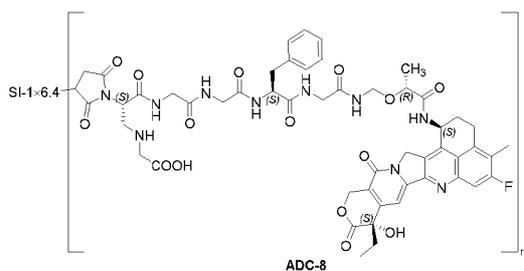
Пример 101

ADC-7 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



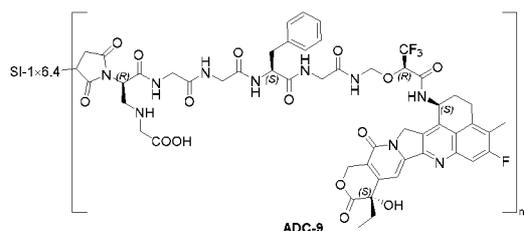
Пример 102

ADC-8 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



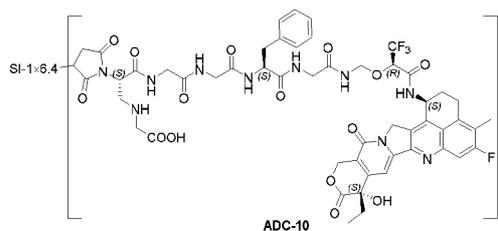
Пример 103

ADC-9 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



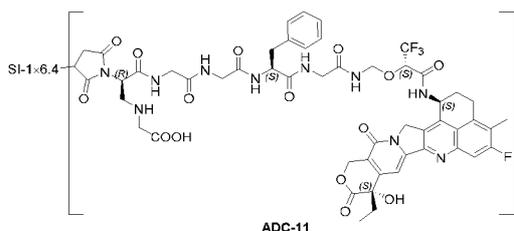
Пример 104

ADC-10 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



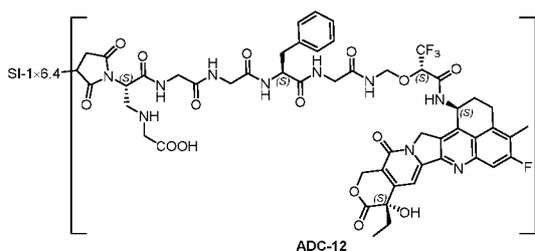
Пример 105

ADC-11 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



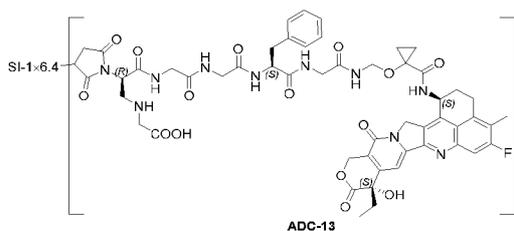
Пример 106

ADC-12 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



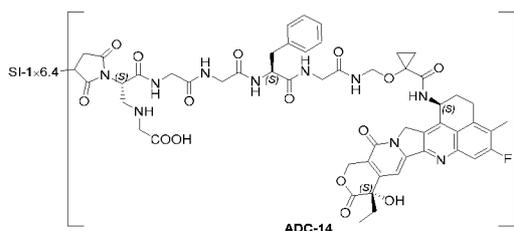
Пример 107

ADC-13 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



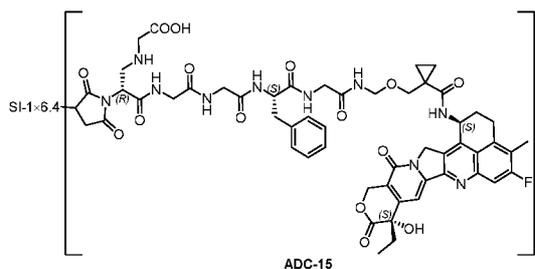
Пример 108

ADC-14 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



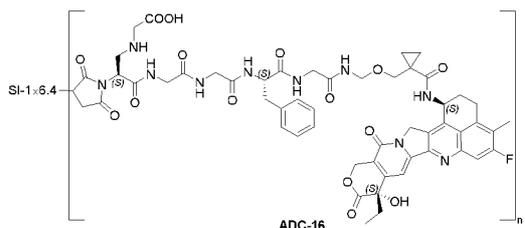
Пример 109

ADC-15 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



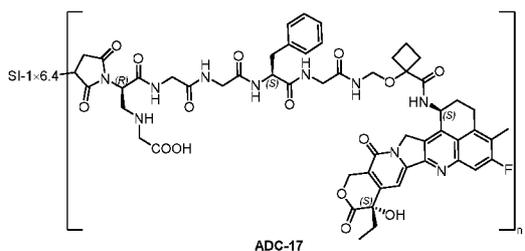
## Пример 110

ADC-16 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



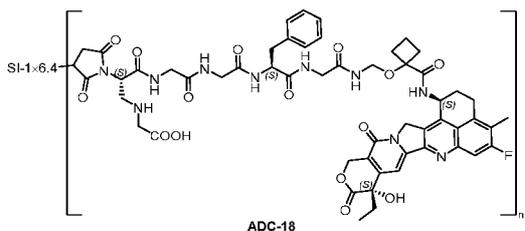
## Пример 111

ADC-17 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



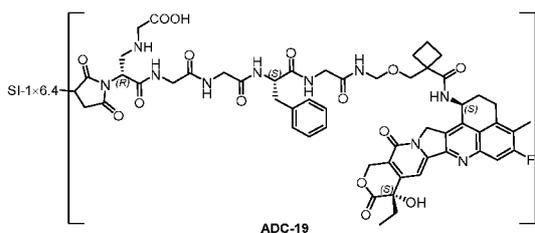
## Пример 112

ADC-18 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



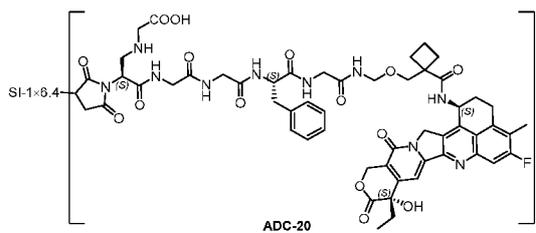
## Пример 113

ADC-19 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



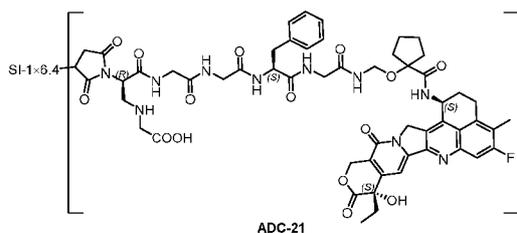
## Пример 114

ADC-20 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



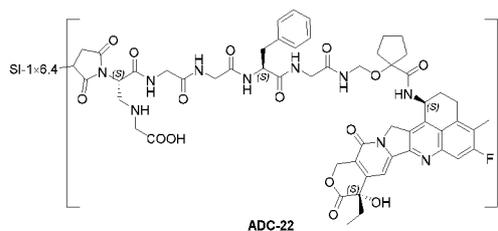
Пример 115

ADC-21 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



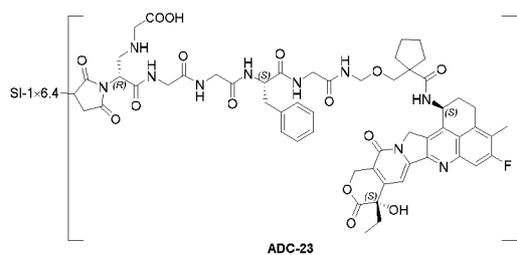
Пример 116

ADC-22 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



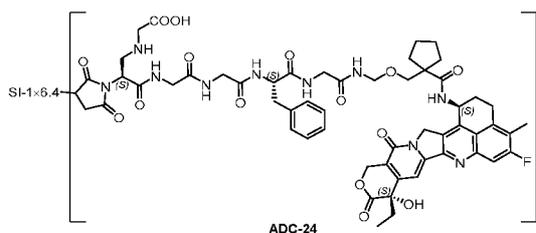
Пример 117

ADC-23 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



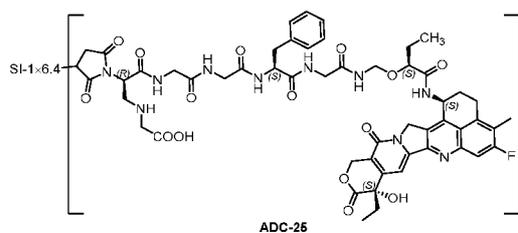
Пример 118

ADC-24 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



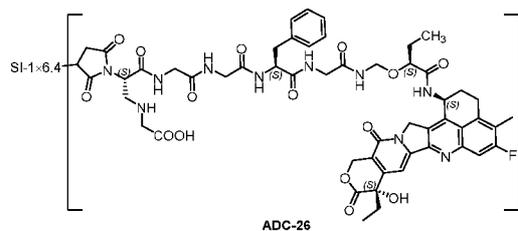
Пример 119

ADC-25 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



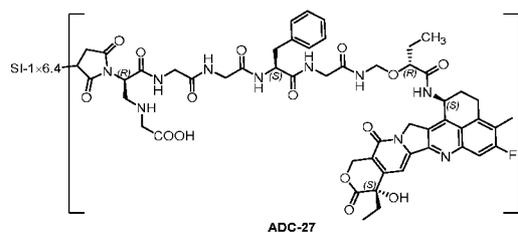
Пример 120

ADC-26 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



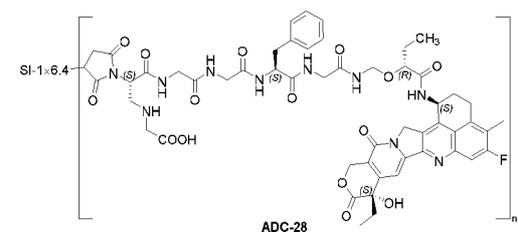
Пример 121

ADC-27 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93, v



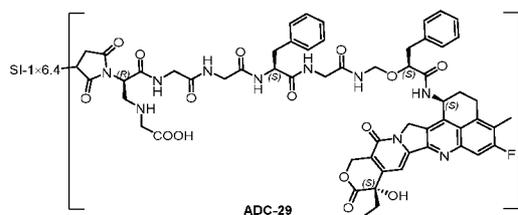
Пример 122

ADC-28 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



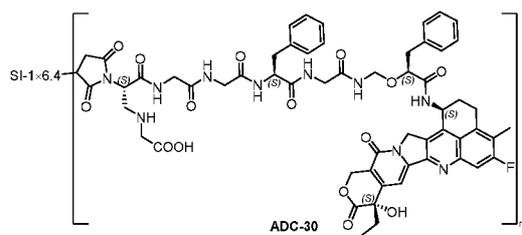
Пример 123

ADC-29 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



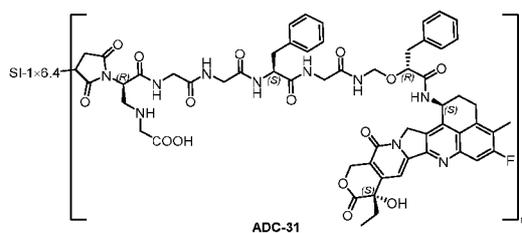
Пример 124

ADC-30 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



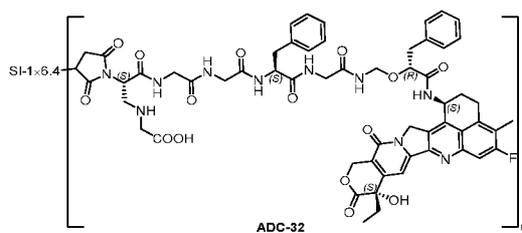
Пример 125

ADC-31 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



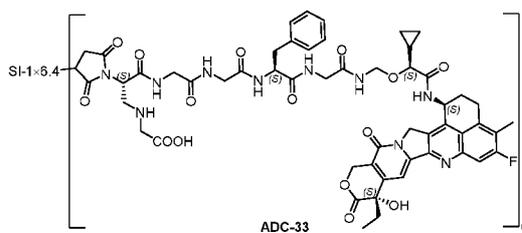
Пример 126

ADC-32 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



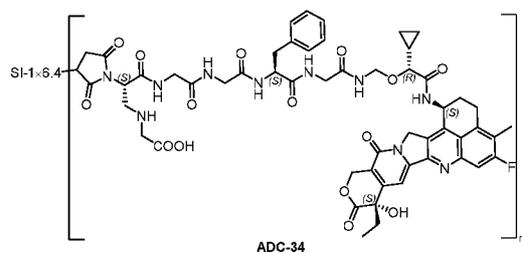
Пример 127

ADC-33 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



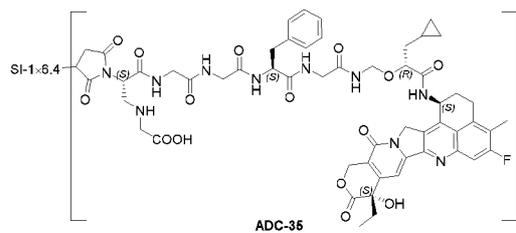
Пример 128

ADC-34 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



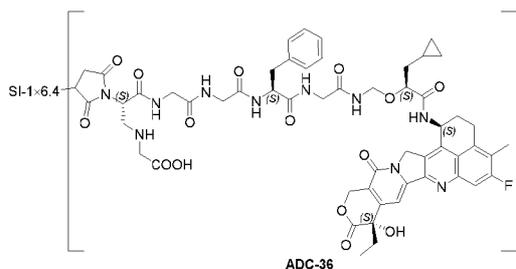
Пример 129

ADC-35 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



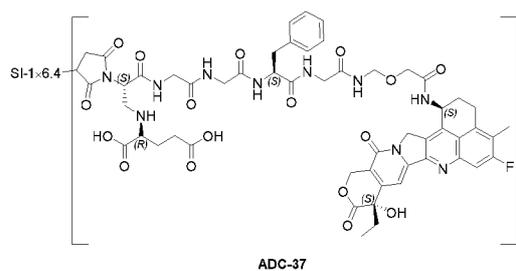
Пример 130

ADC-36 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



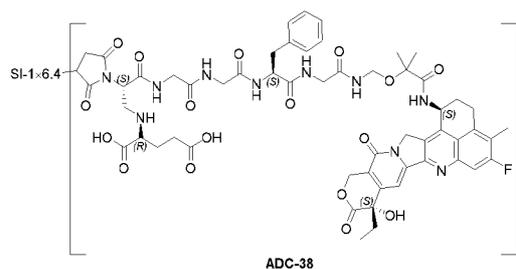
Пример 131

ADC-37 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



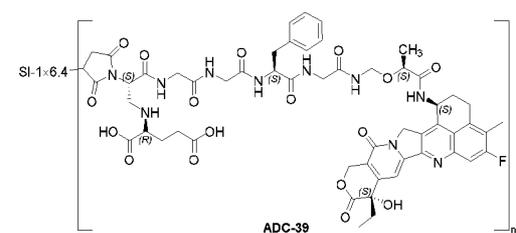
Пример 132

ADC-38 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



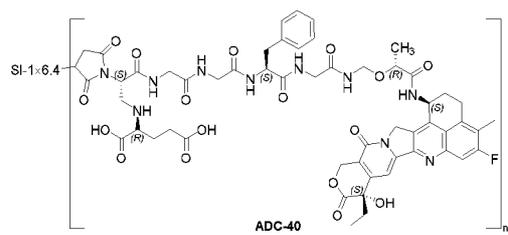
Пример 133

ADC-39 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



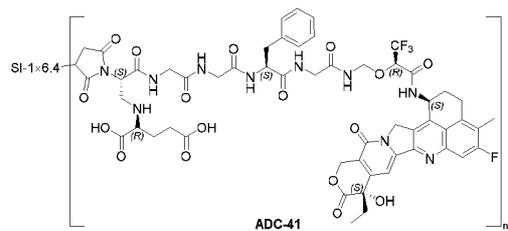
Пример 134

ADC-40 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



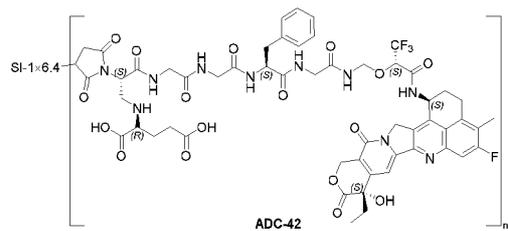
Пример 135

ADC-41 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



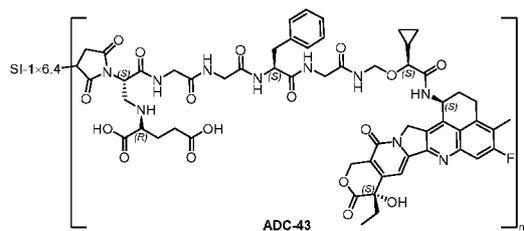
Пример 136

ADC-42 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



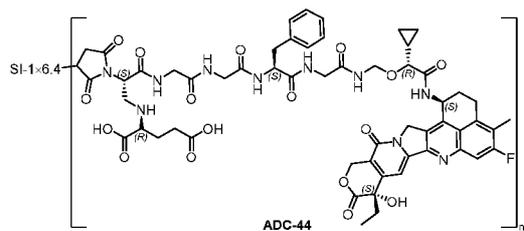
Пример 137

ADC-43 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



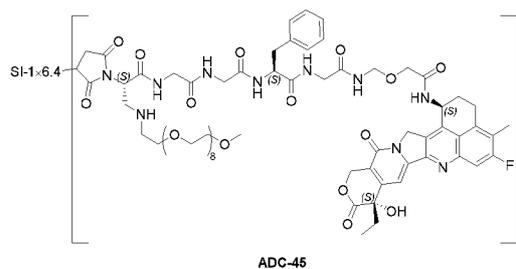
Пример 138

ADC-44 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



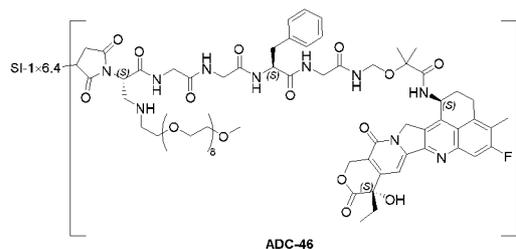
Пример 139

ADC-45 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



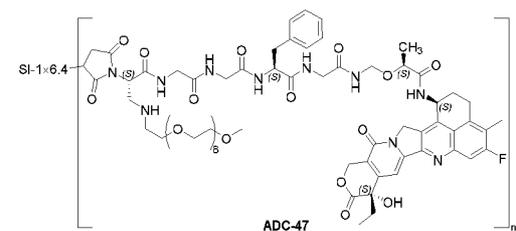
Пример 140

ADC-46 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



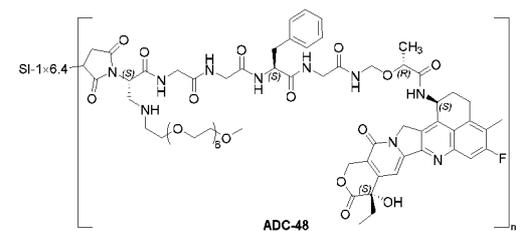
Пример 141

ADC-47 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



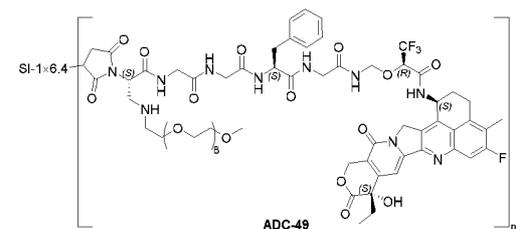
Пример 142

ADC-48 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



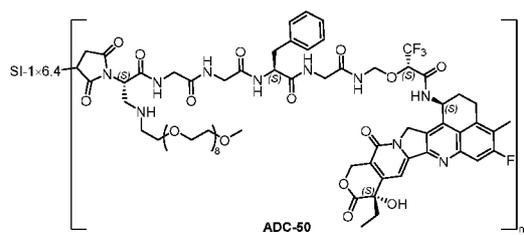
Пример 143

ADC-49 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



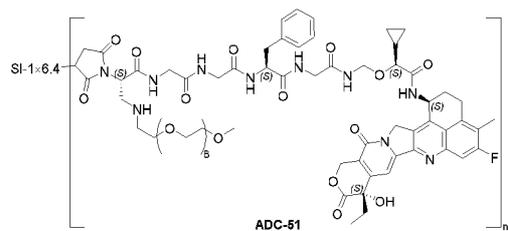
Пример 144

ADC-50 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



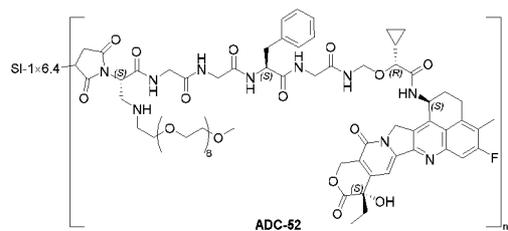
Пример 145

ADC-51 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



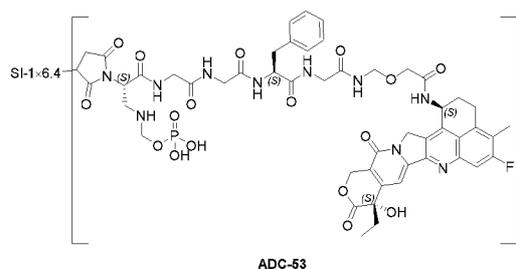
Пример 146

ADC-52 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



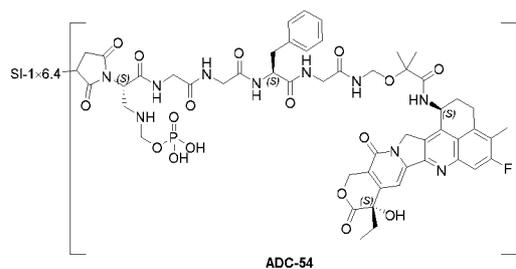
Пример 147

ADC-53 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



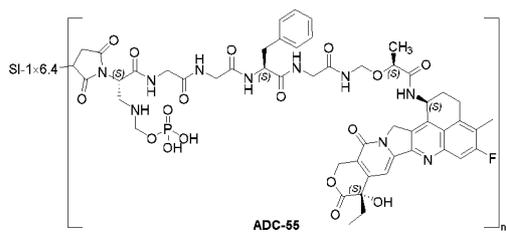
Пример 148

ADC-54 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



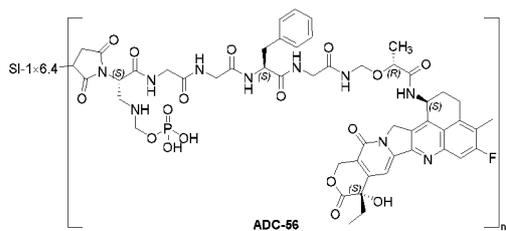
Пример 149

ADC-55 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



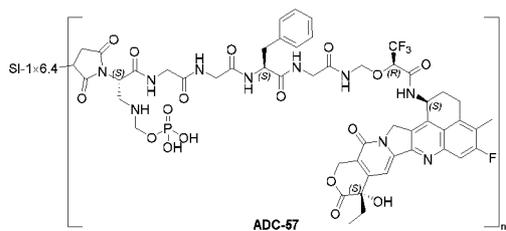
Пример 150

ADC-56 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



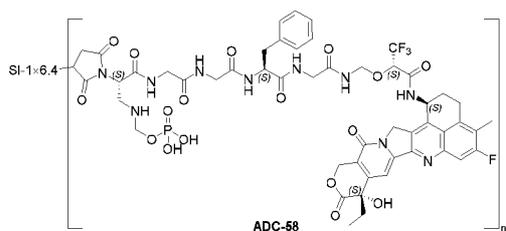
Пример 151

ADC-57 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



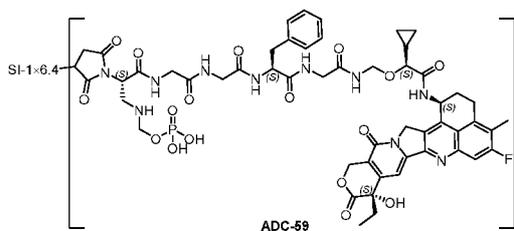
Пример 152

ADC-58 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



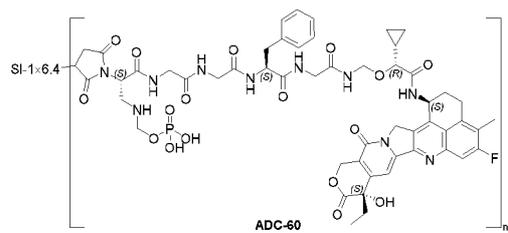
Пример 153

ADC-59 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



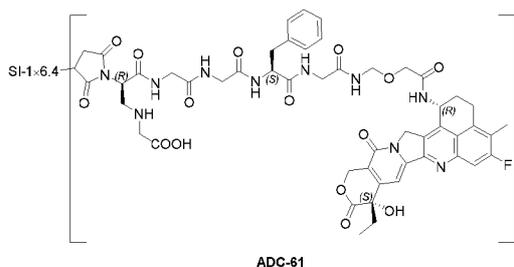
Пример 154

ADC-60 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



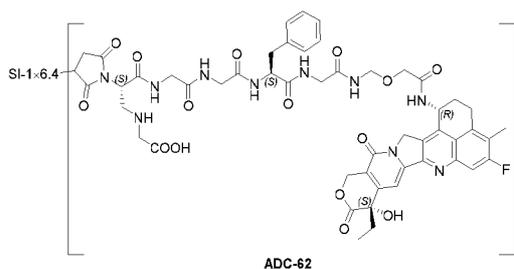
Пример 155

ADC-61 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



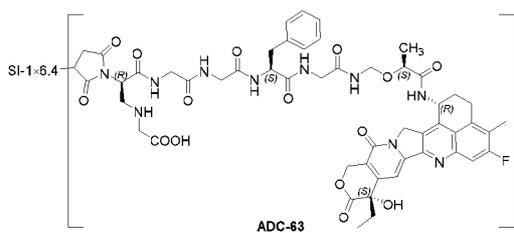
Пример 156

ADC-62 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



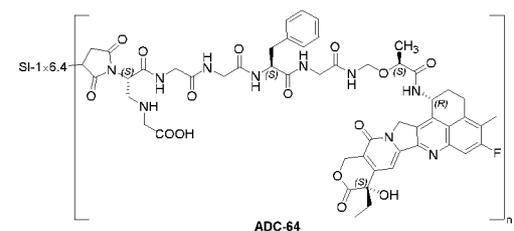
Пример 157

ADC-63 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



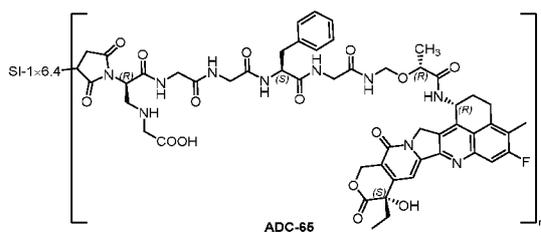
Пример 158

ADC-64 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



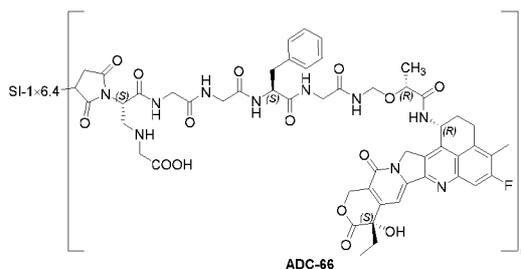
Пример 159

ADC-65 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



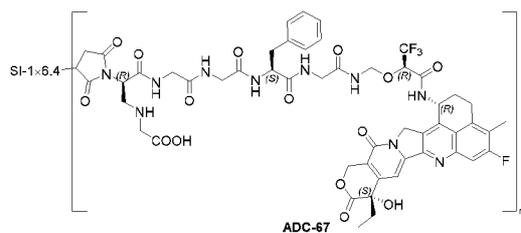
Пример 160

ADC-66 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



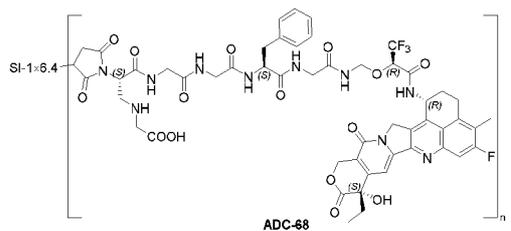
Пример 161

ADC-67 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



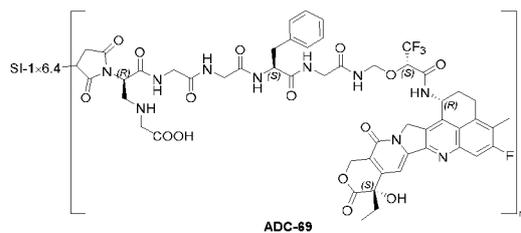
Пример 162

ADC-68 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



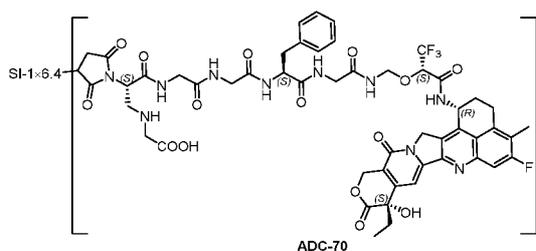
Пример 163

ADC-69 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



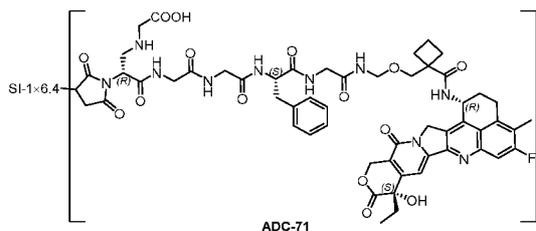
Пример 164

ADC-70 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



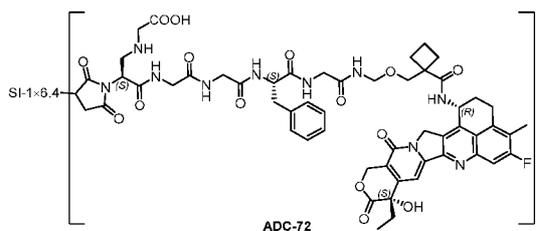
Пример 165

ADC-71 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



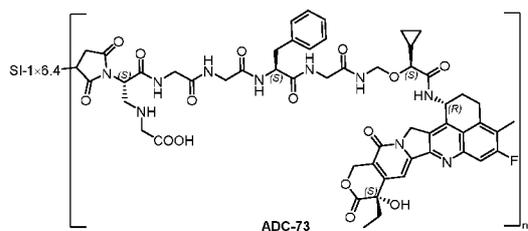
Пример 166

ADC-72 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



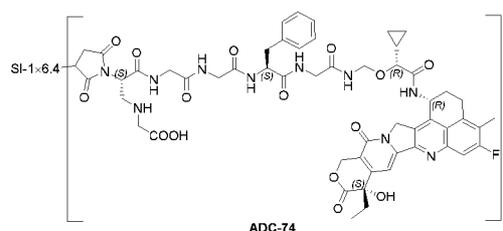
Пример 167

ADC-73 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



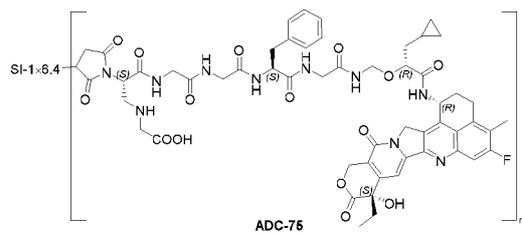
Пример 168

ADC-74 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



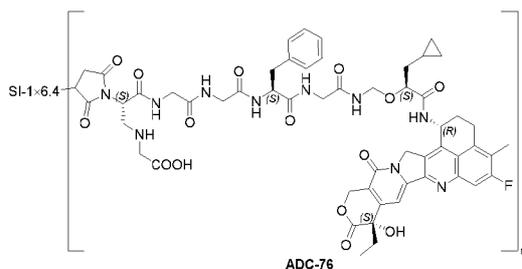
Пример 169

ADC-75 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



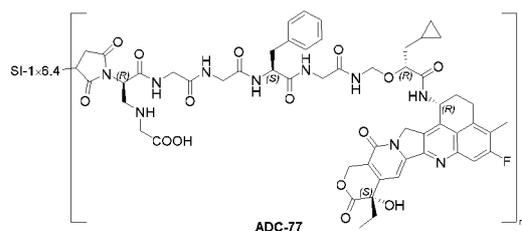
Пример 170

ADC-76 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



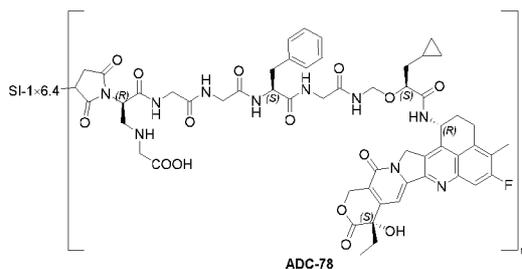
Пример 171

ADC-77 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



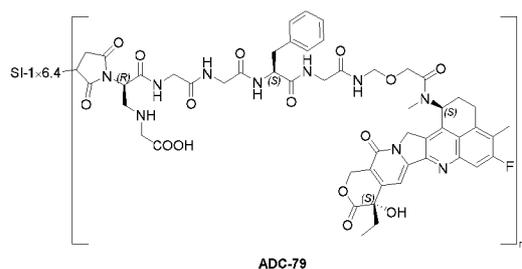
Пример 172

ADC-78 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



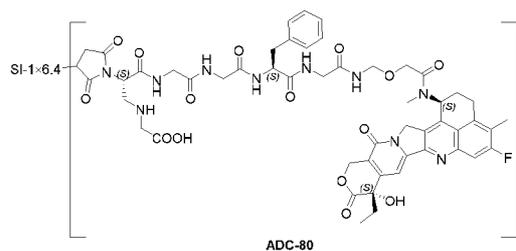
Пример 173

ADC-79 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



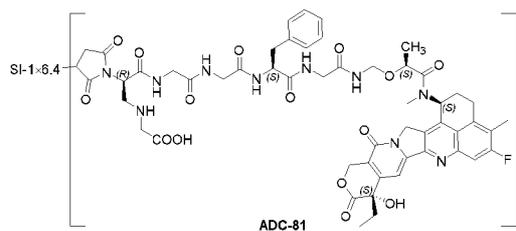
Пример 174

ADC-80 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



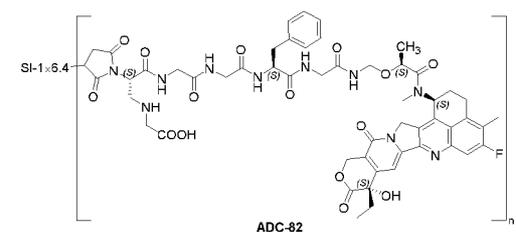
Пример 175

ADC-81 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



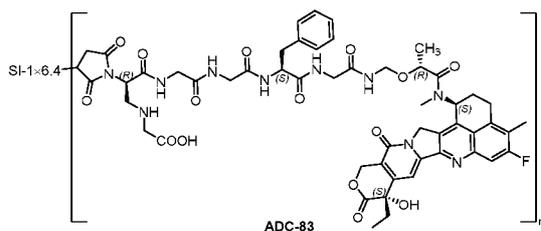
Пример 176

ADC-82 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



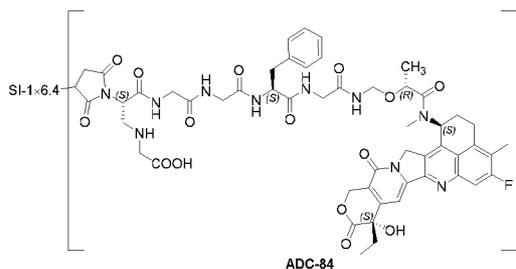
Пример 177

ADC-83 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



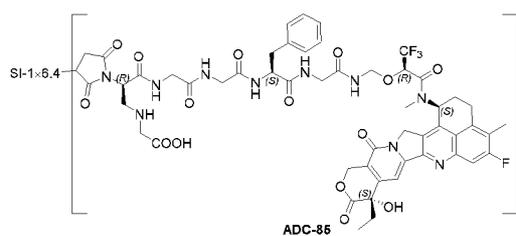
Пример 178

ADC-84 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



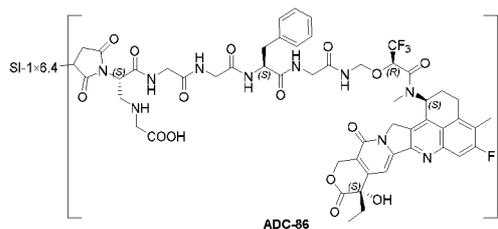
Пример 179

ADC-85 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



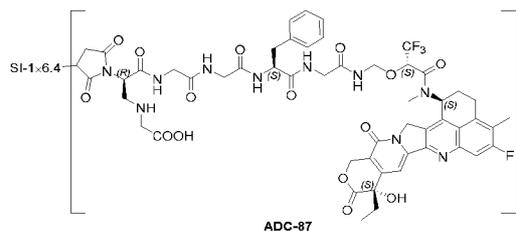
Пример 180

ADC-86 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



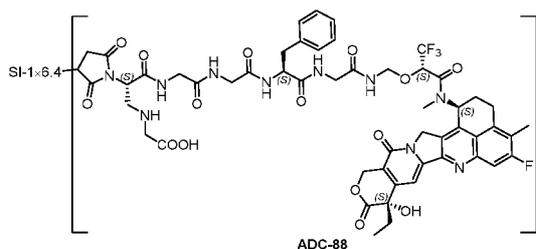
Пример 181

ADC-87 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



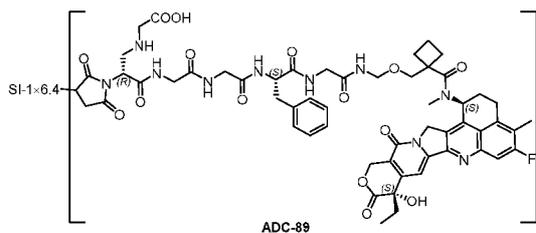
Пример 182

ADC-88 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



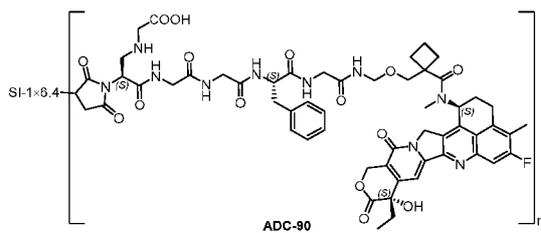
Пример 183

ADC-89 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



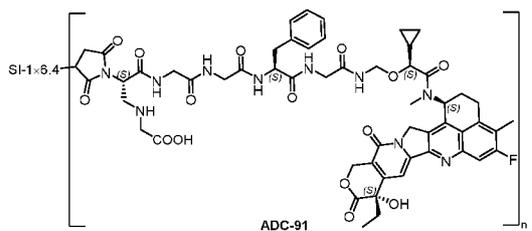
Пример 184

ADC-90 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



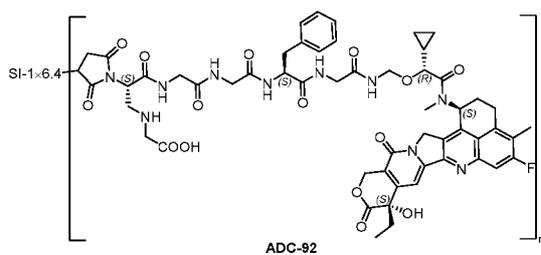
Пример 185

ADC-91 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



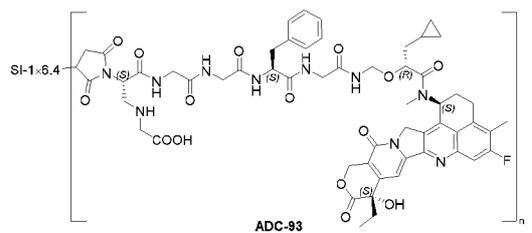
Пример 186

ADC-92 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



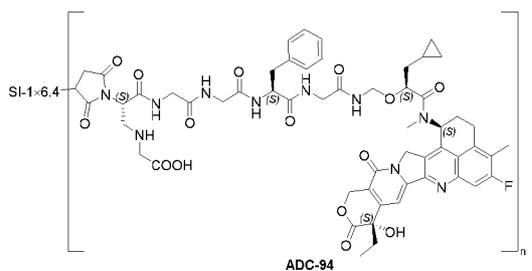
Пример 187

ADC-93 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



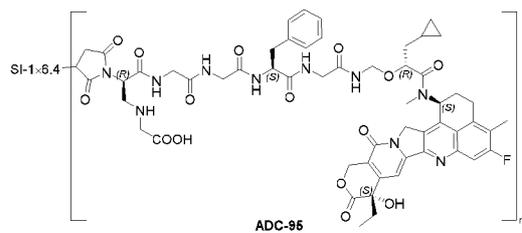
Пример 188

ADC-94 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



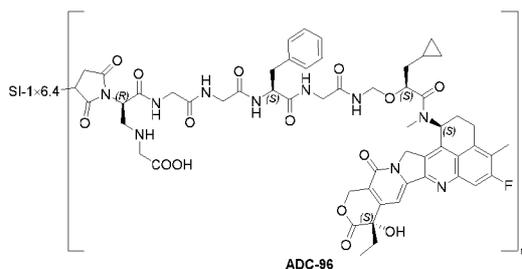
Пример 189

ADC-95 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



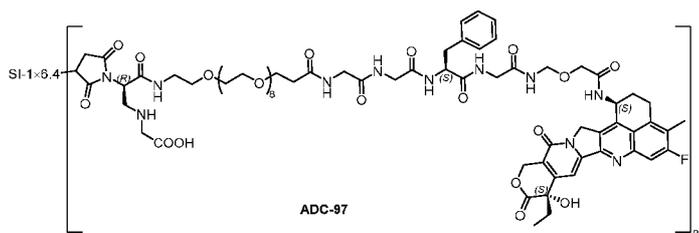
Пример 190

ADC-96 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



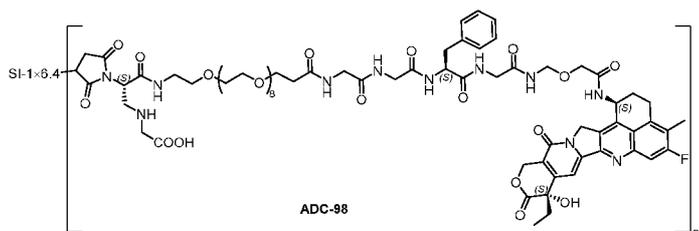
Пример 191

ADC-97 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



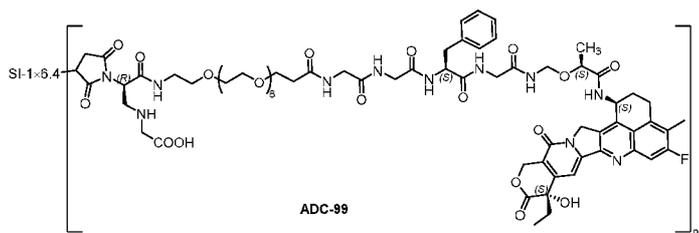
Пример 192

ADC-98 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



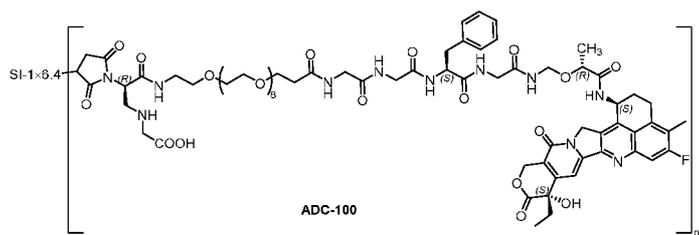
Пример 193

ADC-99 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



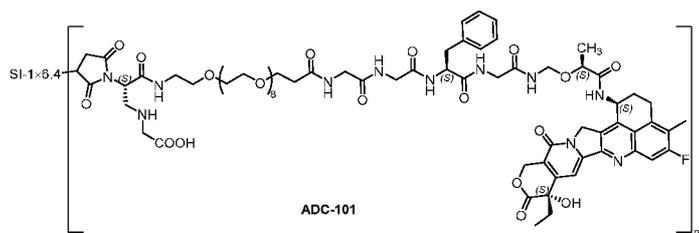
Пример 194

ADC-100 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



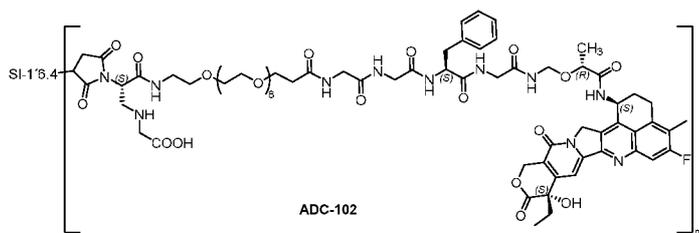
Пример 195

ADC-101 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



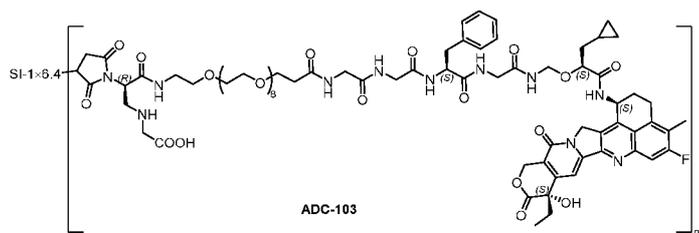
Пример 196

ADC-102 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



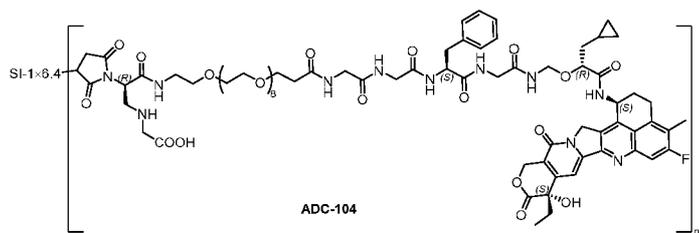
Пример 197

ADC-103 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



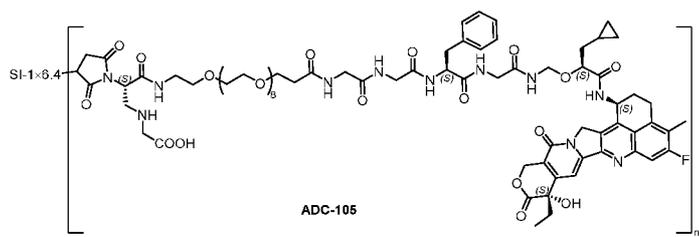
Пример 198

ADC-104 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



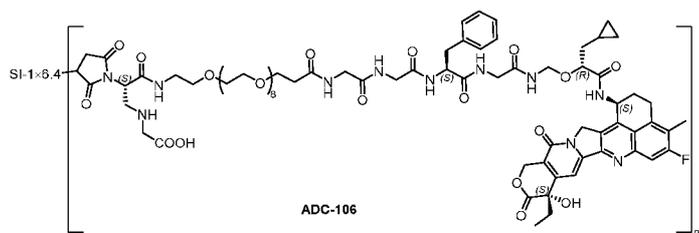
Пример 199

ADC-105 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



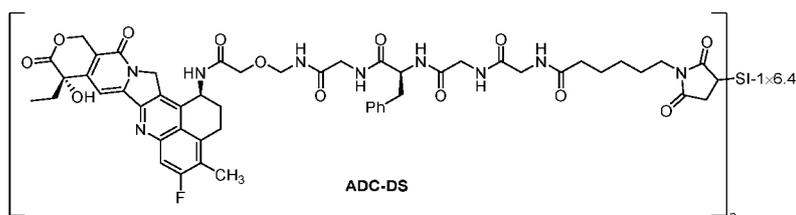
Пример 200

ADC-106 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



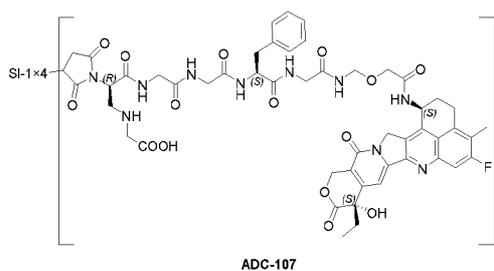
Пример 201

ADC-DS получали из соединения 45 в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



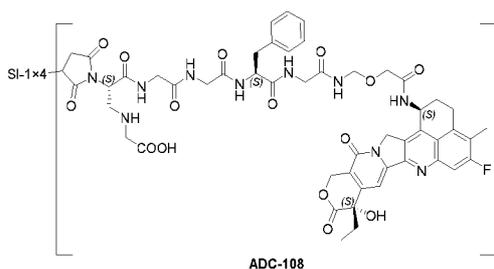
Пример 202

ADC-107 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



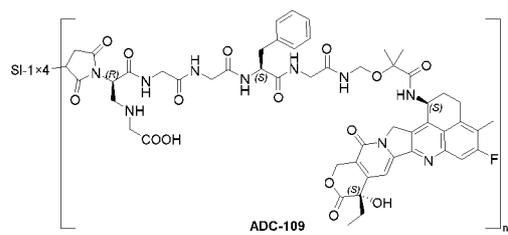
Пример 203

ADC-108 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



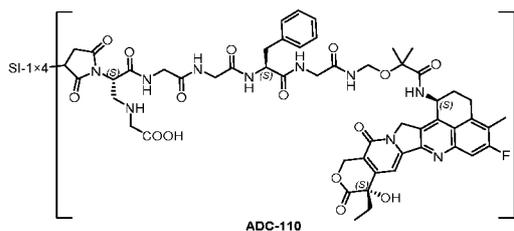
Пример 204

ADC-109 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



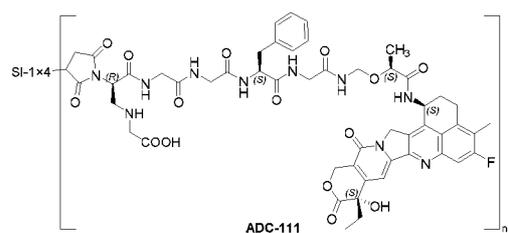
Пример 205

ADC-110 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



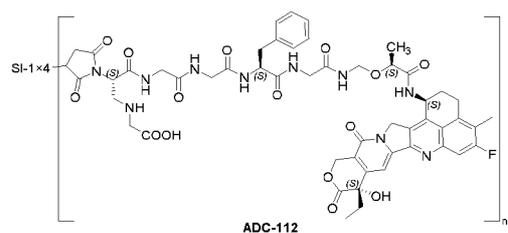
Пример 206

ADC-111 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



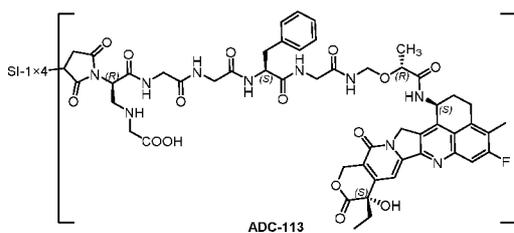
Пример 207

ADC-112 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



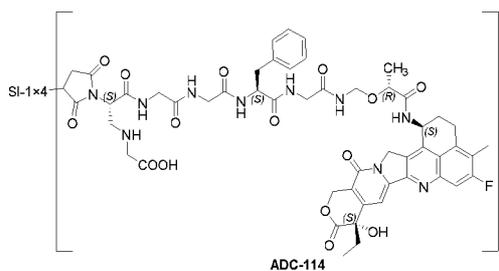
Пример 208

ADC-113 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



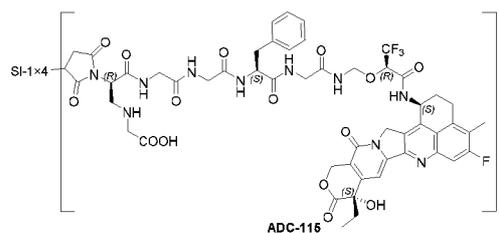
Пример 209

ADC-114 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



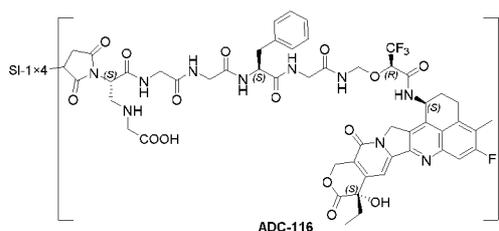
## Пример 210

ADC-115 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



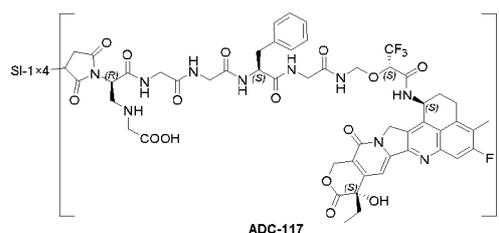
## Пример 211

ADC-116 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



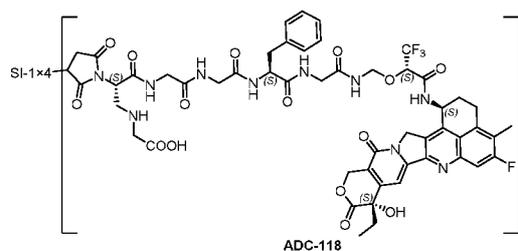
## Пример 212

ADC-117 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



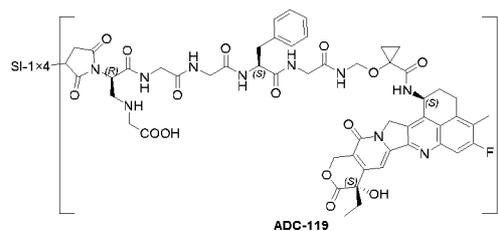
## Пример 213

ADC-118 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



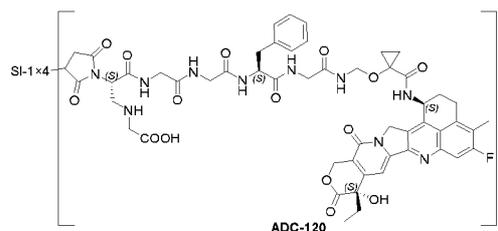
## Пример 214

ADC-119 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



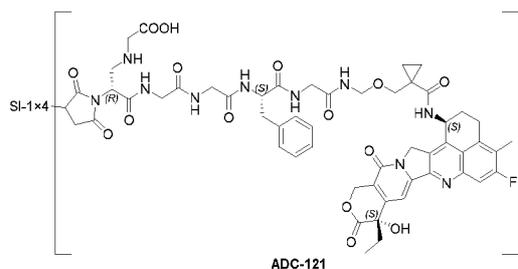
Пример 215

ADC-120 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



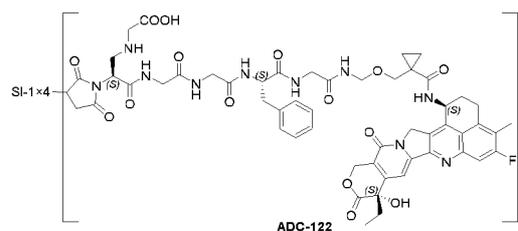
Пример 216

ADC-121 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



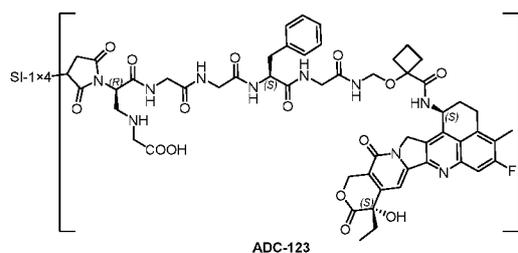
Пример 217

ADC-122 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



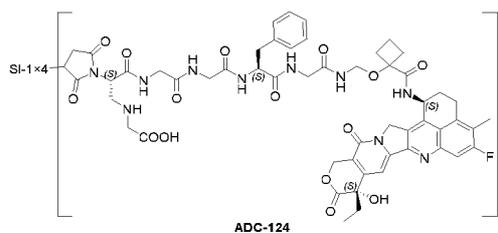
Пример 218

ADC-123 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



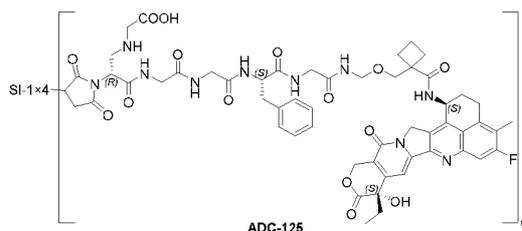
Пример 219

ADC-124 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



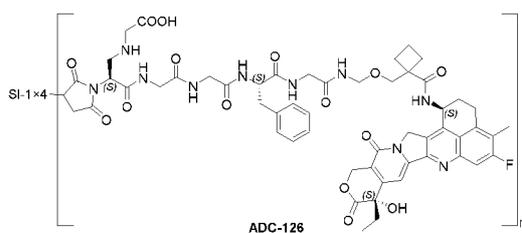
Пример 220

ADC-125 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



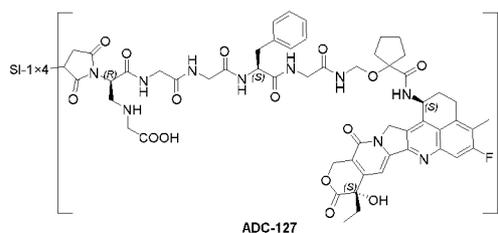
Пример 221

ADC-126 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



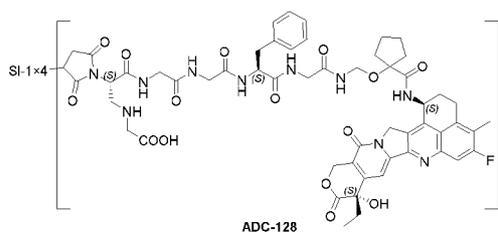
Пример 222

ADC-127 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



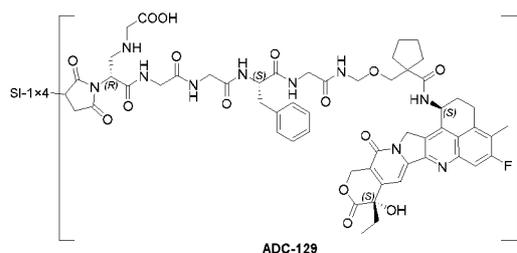
Пример 223

ADC-128 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



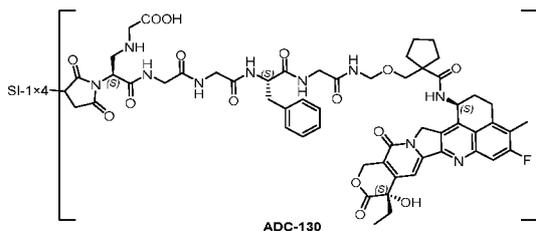
Пример 224

ADC-129 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



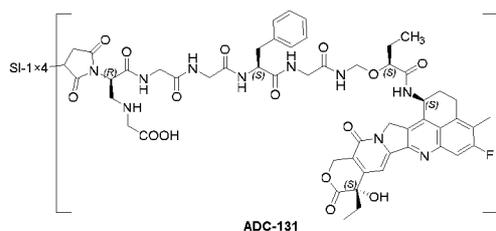
Пример 225

ADC-130 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



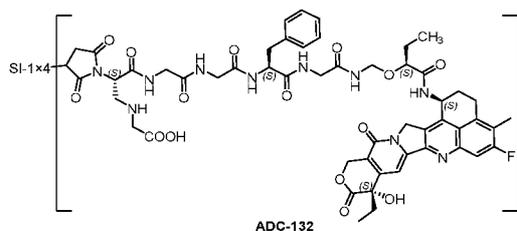
Пример 226

ADC-131 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



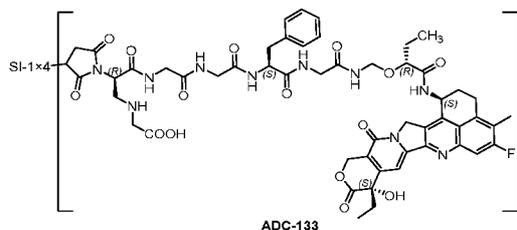
Пример 227

ADC-132 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



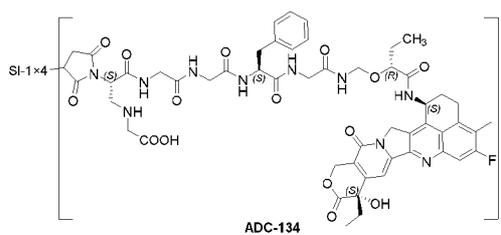
Пример 228

ADC-133 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



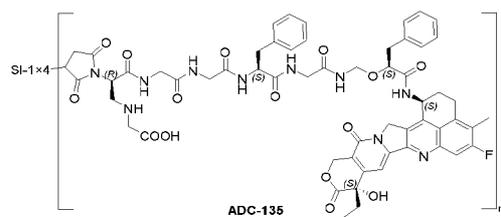
Пример 229

ADC-134 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



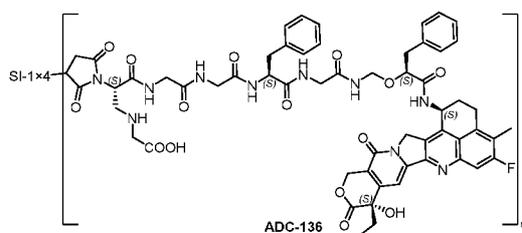
Пример 230

ADC-135 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



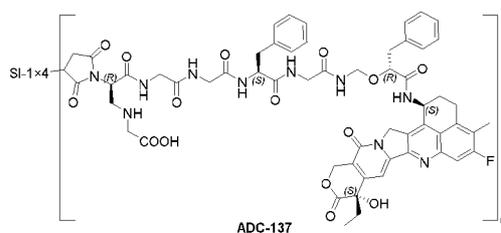
Пример 231

ADC-136 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



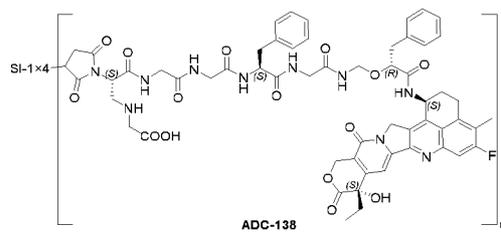
Пример 232

ADC-137 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



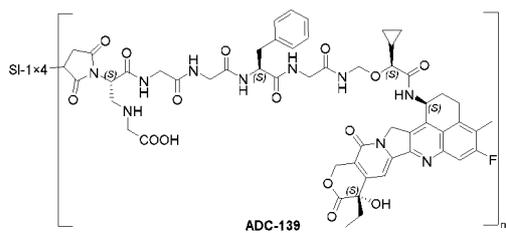
Пример 233

ADC-138 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



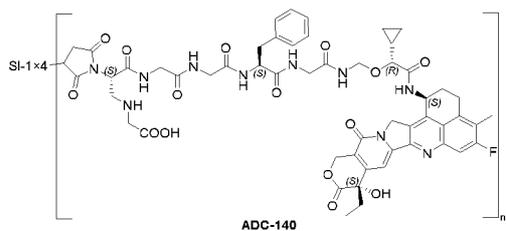
Пример 234

ADC-139 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



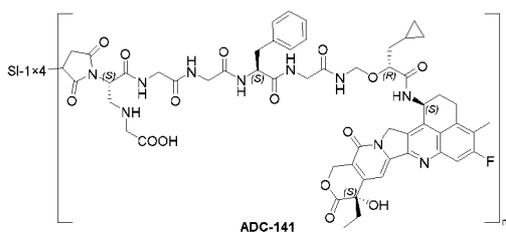
Пример 235

ADC-140 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



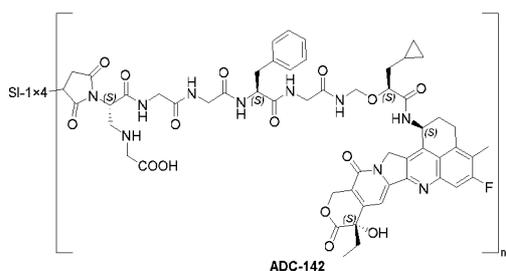
Пример 236

ADC-141 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



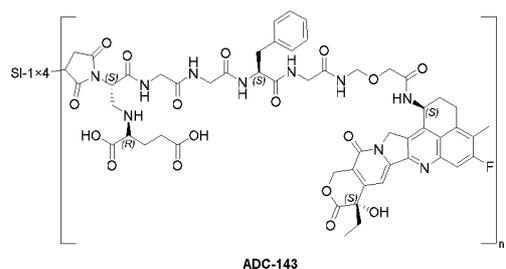
Пример 237

ADC-142 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



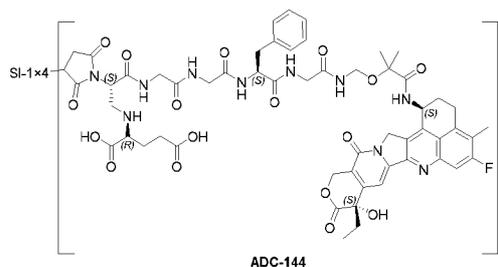
Пример 238

ADC-143 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



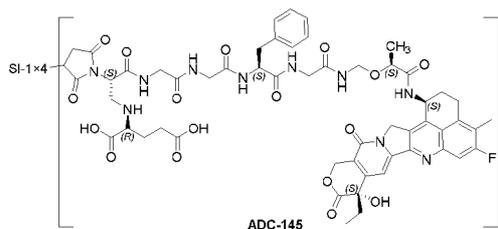
Пример 239

ADC-144 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



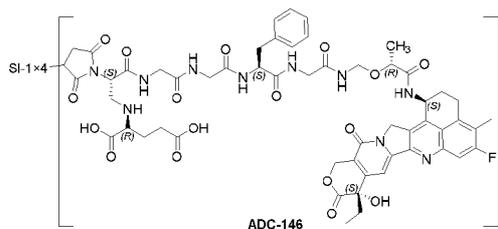
Пример 240

ADC-145 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



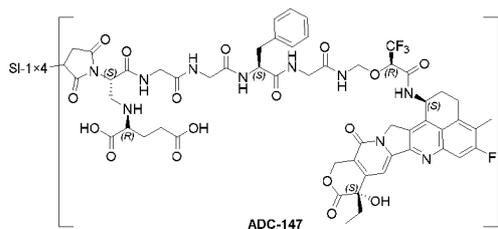
Пример 241

ADC-146 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



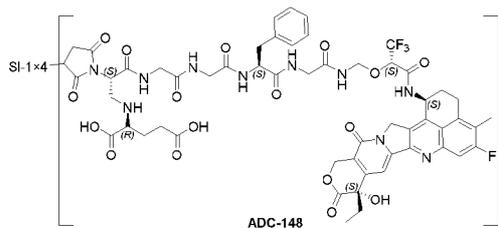
Пример 242

ADC-147 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



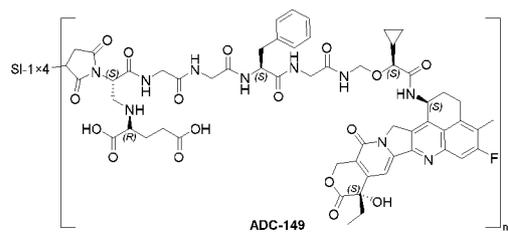
Пример 243

ADC-148 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



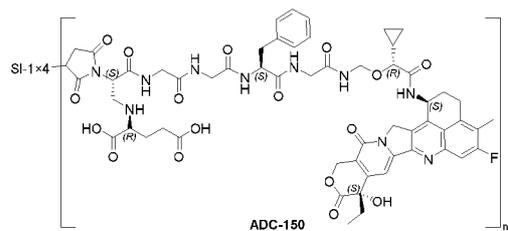
Пример 244

ADC-149 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



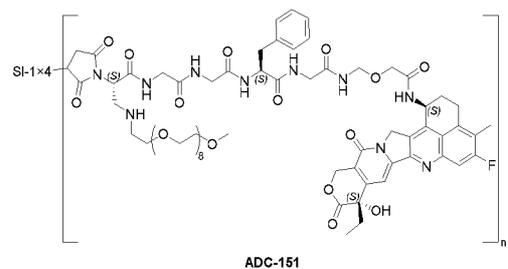
Пример 245

ADC-150 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



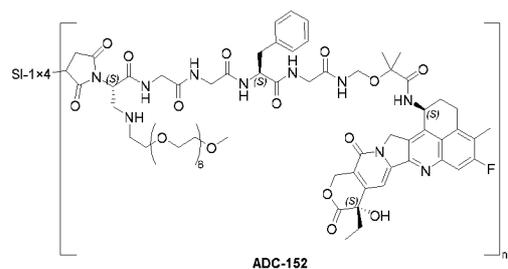
Пример 246

ADC-151 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



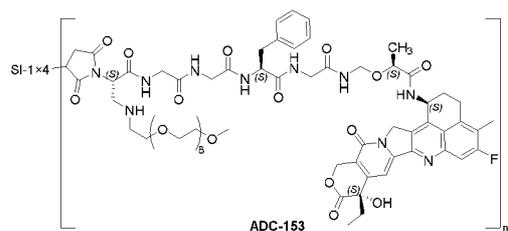
Пример 247

ADC-152 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



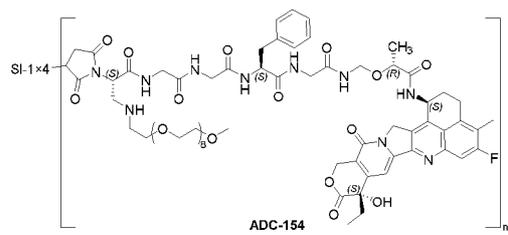
Пример 248

ADC-153 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



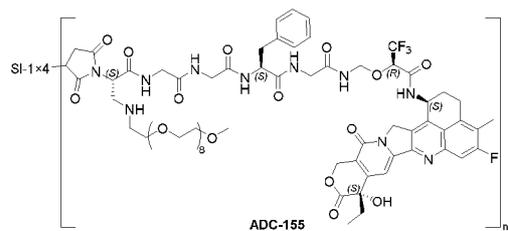
Пример 249

ADC-154 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



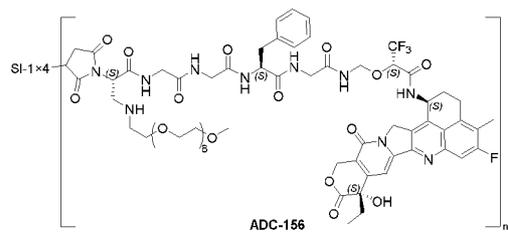
Пример 250

ADC-155 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



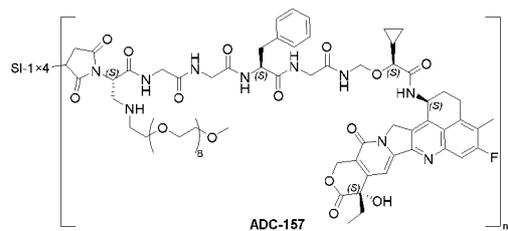
Пример 251

ADC-156 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



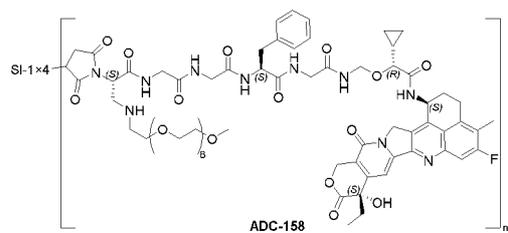
Пример 252

ADC-157 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



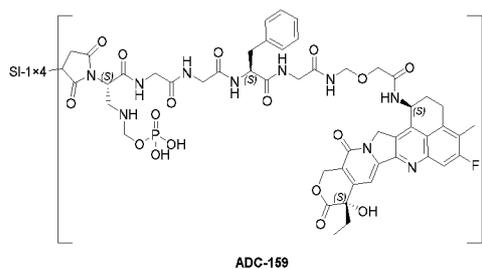
Пример 253

ADC-158 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



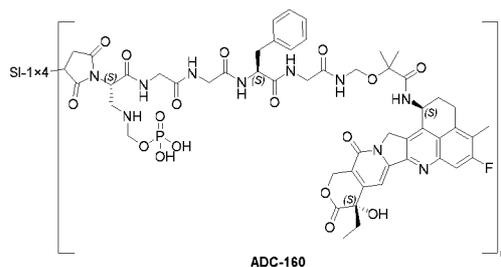
Пример 254

ADC-159 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



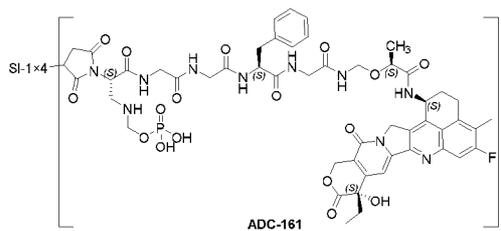
## Пример 255

ADC-160 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



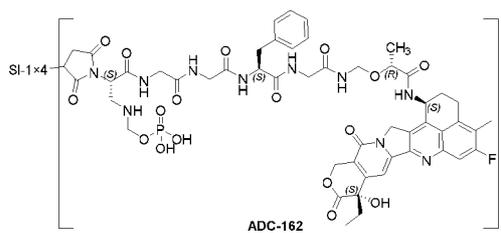
## Пример 256

ADC-161 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



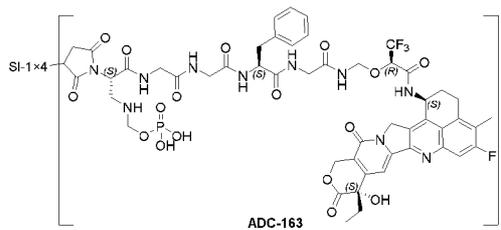
## Пример 257

ADC-162 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



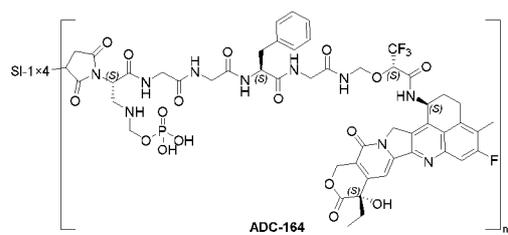
## Пример 258

ADC-163 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



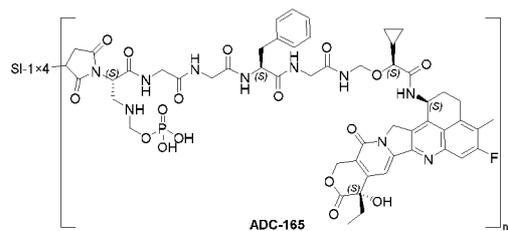
## Пример 259

ADC-164 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



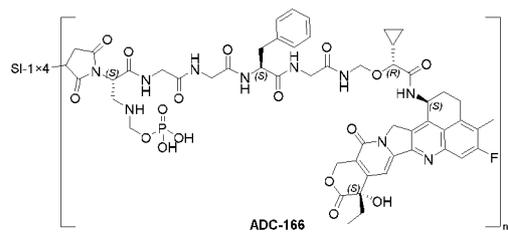
Пример 260

ADC-165 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



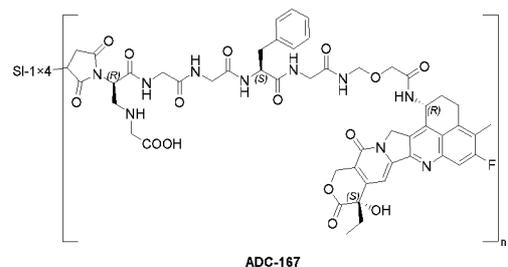
Пример 261

ADC-166 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



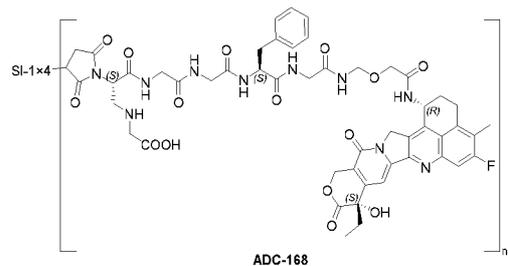
Пример 262

ADC-167 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



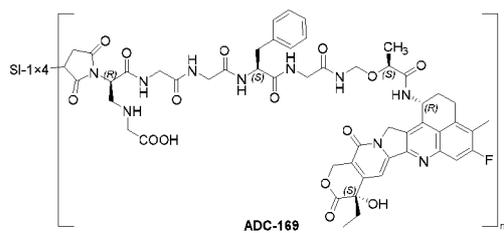
Пример 263

ADC-168 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



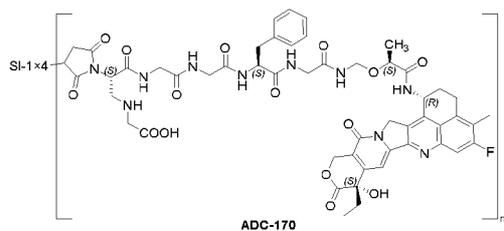
Пример 264

ADC-169 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



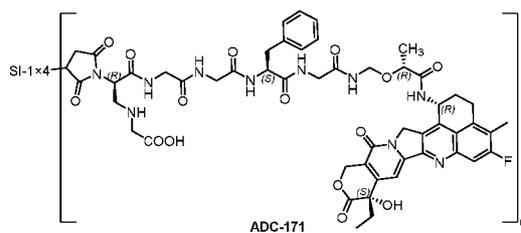
Пример 265

ADC-170 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



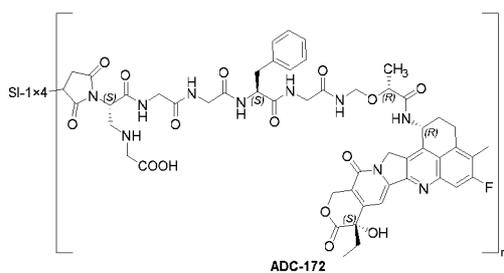
Пример 266

ADC-171 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



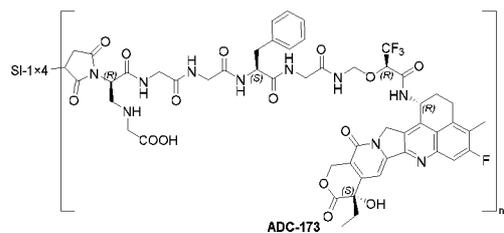
Пример 267

ADC-172 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



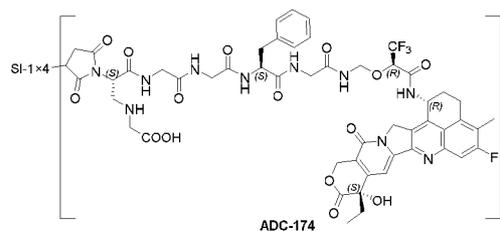
Пример 268

ADC-173 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



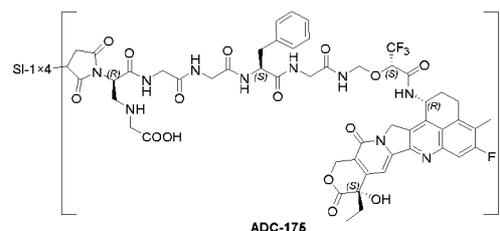
Пример 269

ADC-174 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



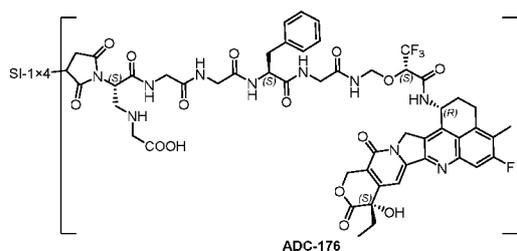
Пример 270

ADC-175 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



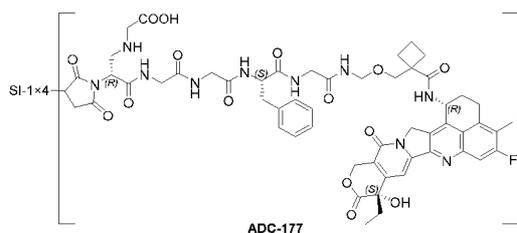
Пример 271

ADC-176 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



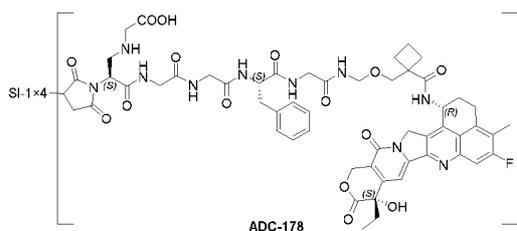
Пример 272

ADC-177 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



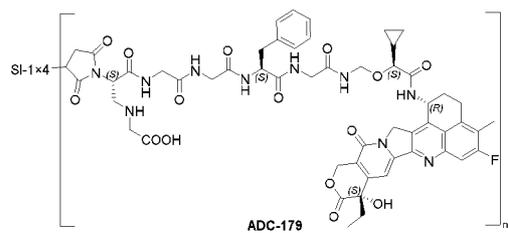
Пример 273

ADC-178 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



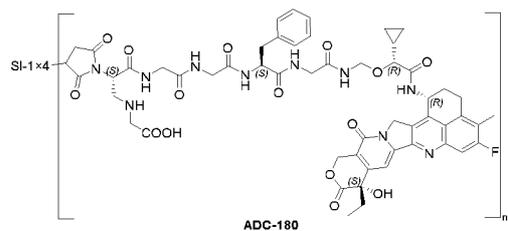
Пример 274

ADC-179 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



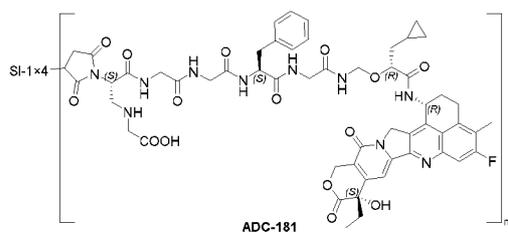
Пример 275

ADC-180 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



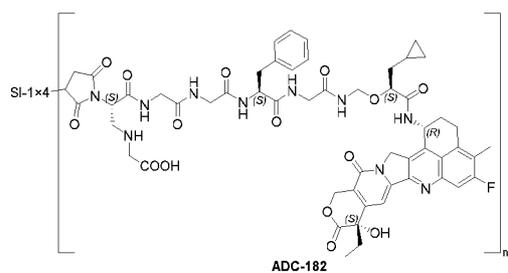
Пример 276

ADC-181 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



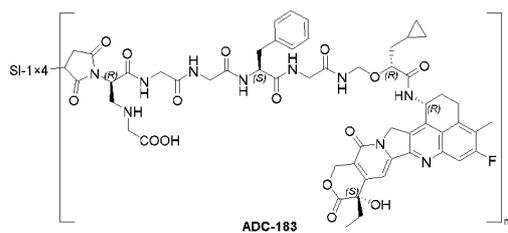
Пример 277

ADC-182 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



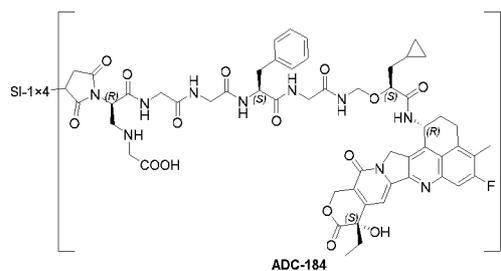
Пример 278

ADC-183 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



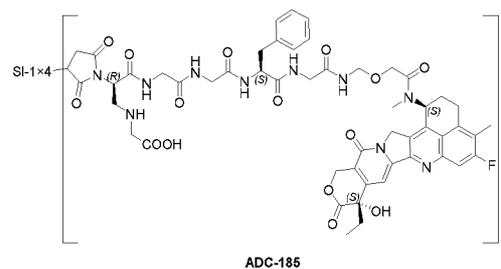
Пример 279

ADC-184 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



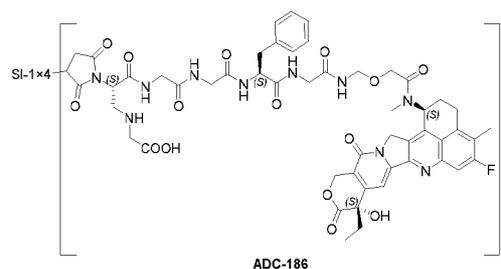
Пример 280

ADC-185 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



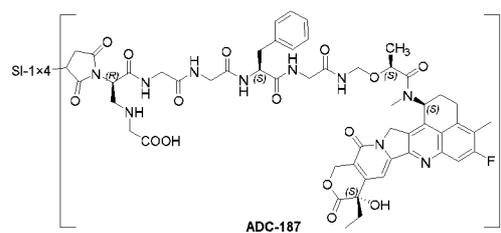
Пример 281

ADC-186 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



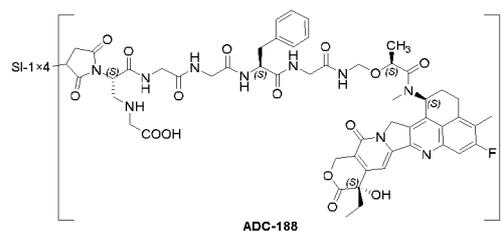
Пример 282

ADC-187 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



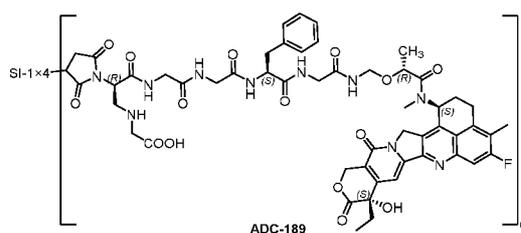
Пример 283

ADC-188 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



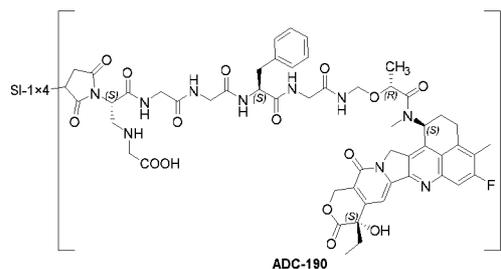
Пример 284

ADC-189 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



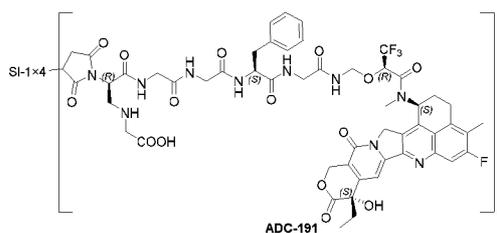
Пример 285

ADC-190 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



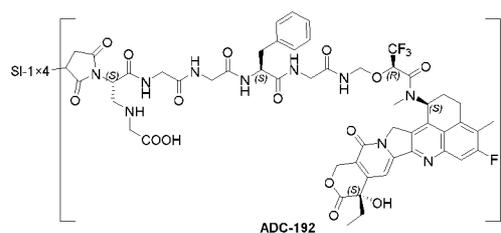
Пример 286

ADC-191 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



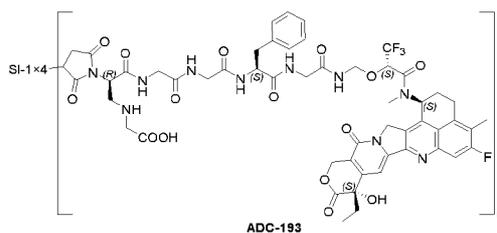
Пример 287

ADC-192 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



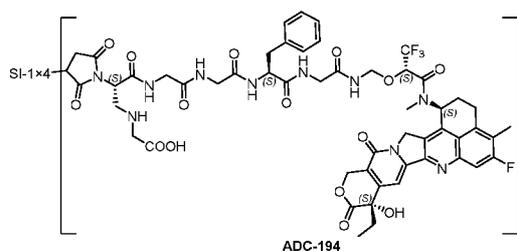
Пример 288

ADC-193 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



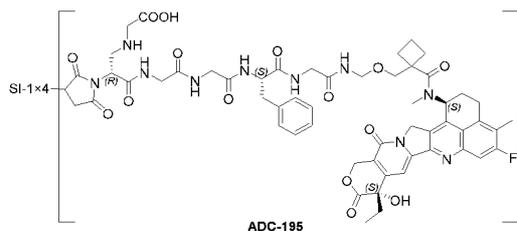
Пример 289

ADC-194 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



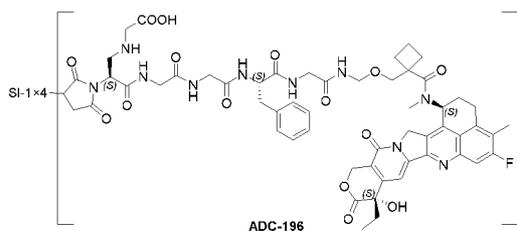
Пример 290

ADC-195 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



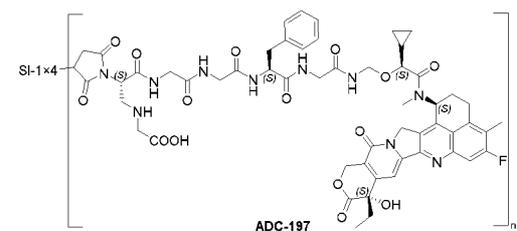
Пример 291

ADC-196 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



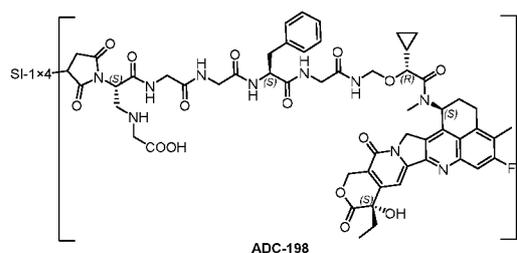
Пример 292

ADC-197 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



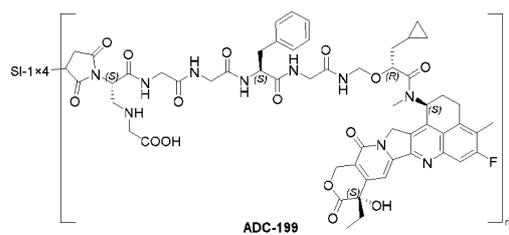
Пример 293

ADC-198 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



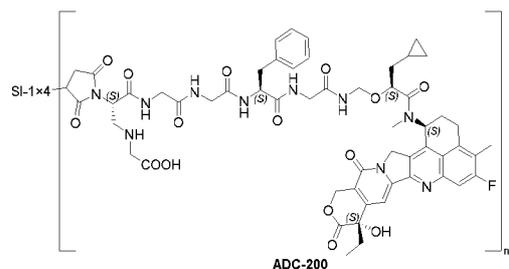
Пример 294

ADC-199 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



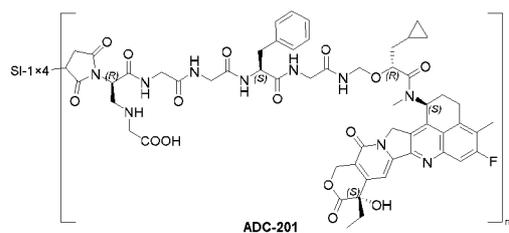
Пример 295

ADC-200 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



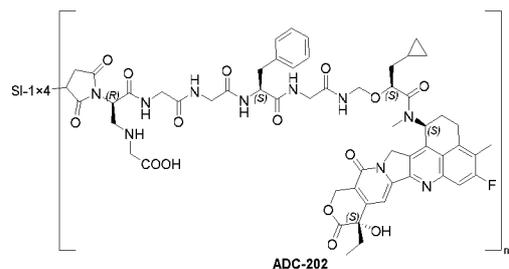
Пример 296

ADC-201 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



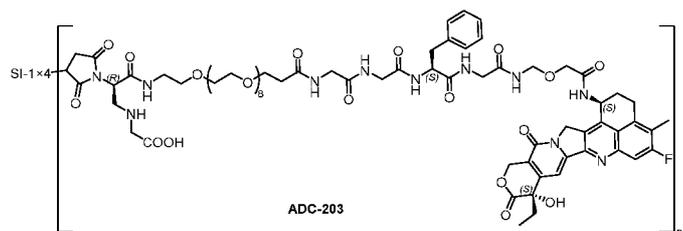
Пример 297

ADC-202 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



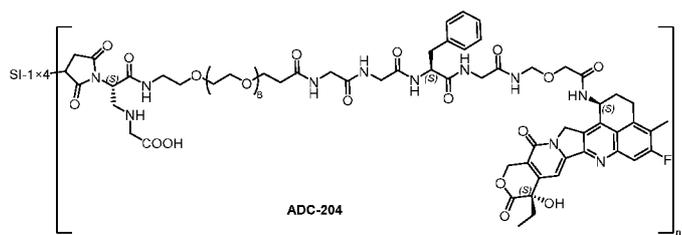
Пример 298

ADC-203 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



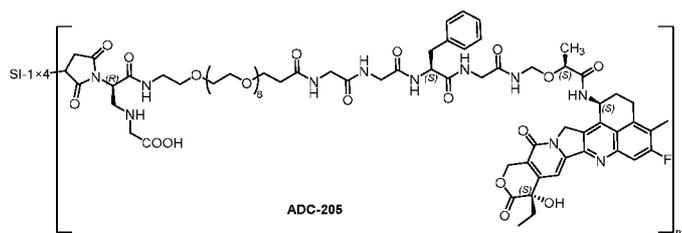
Пример 299

ADC-204 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



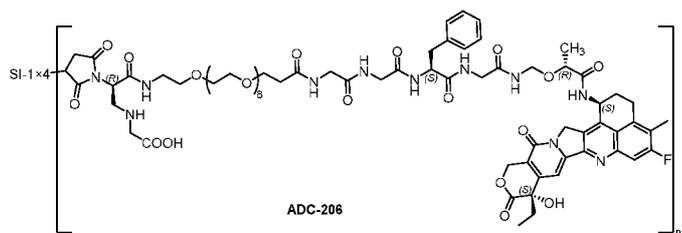
Пример 300

ADC-205 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



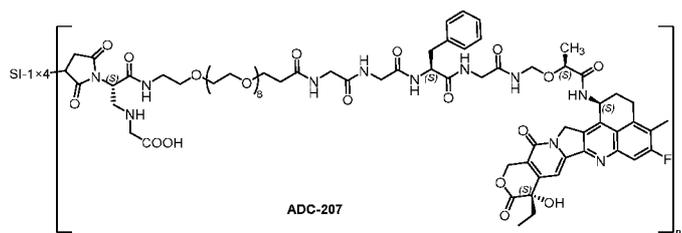
Пример 301

ADC-206 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



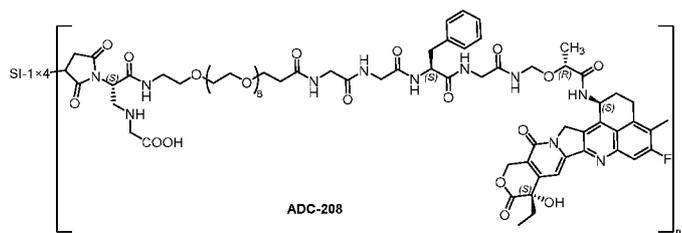
Пример 302

ADC-207 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



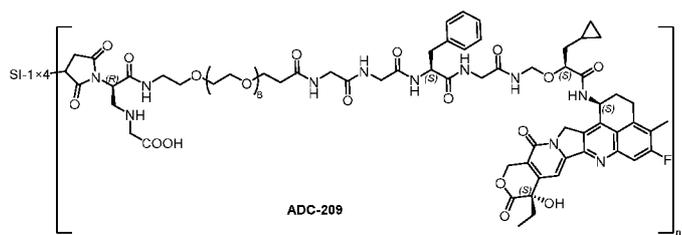
Пример 303

ADC-208 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



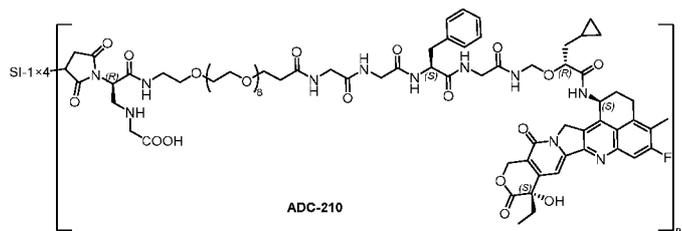
Пример 304

ADC-209 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



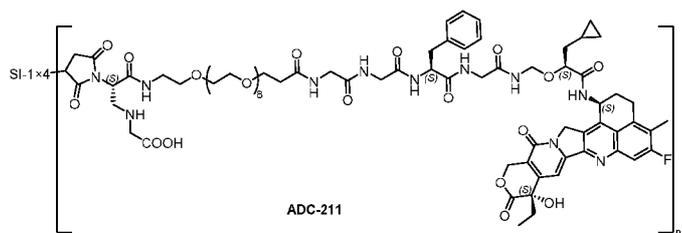
Пример 305

ADC-210 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



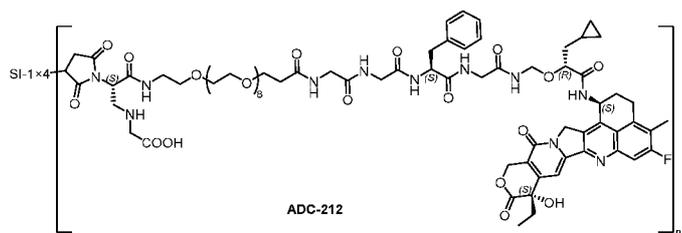
Пример 306

ADC-211 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



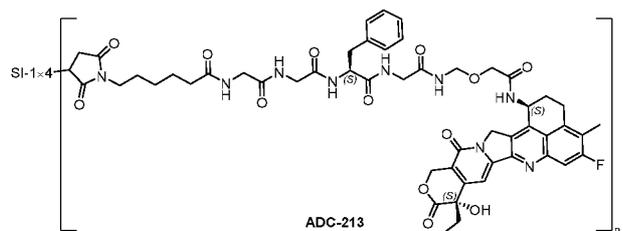
Пример 307

ADC-212 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



Пример 308

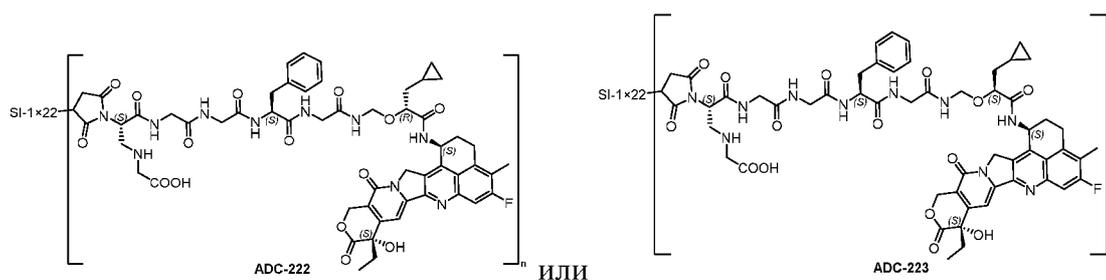
ADC-213 получали из соединения 45 в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



Пример 309

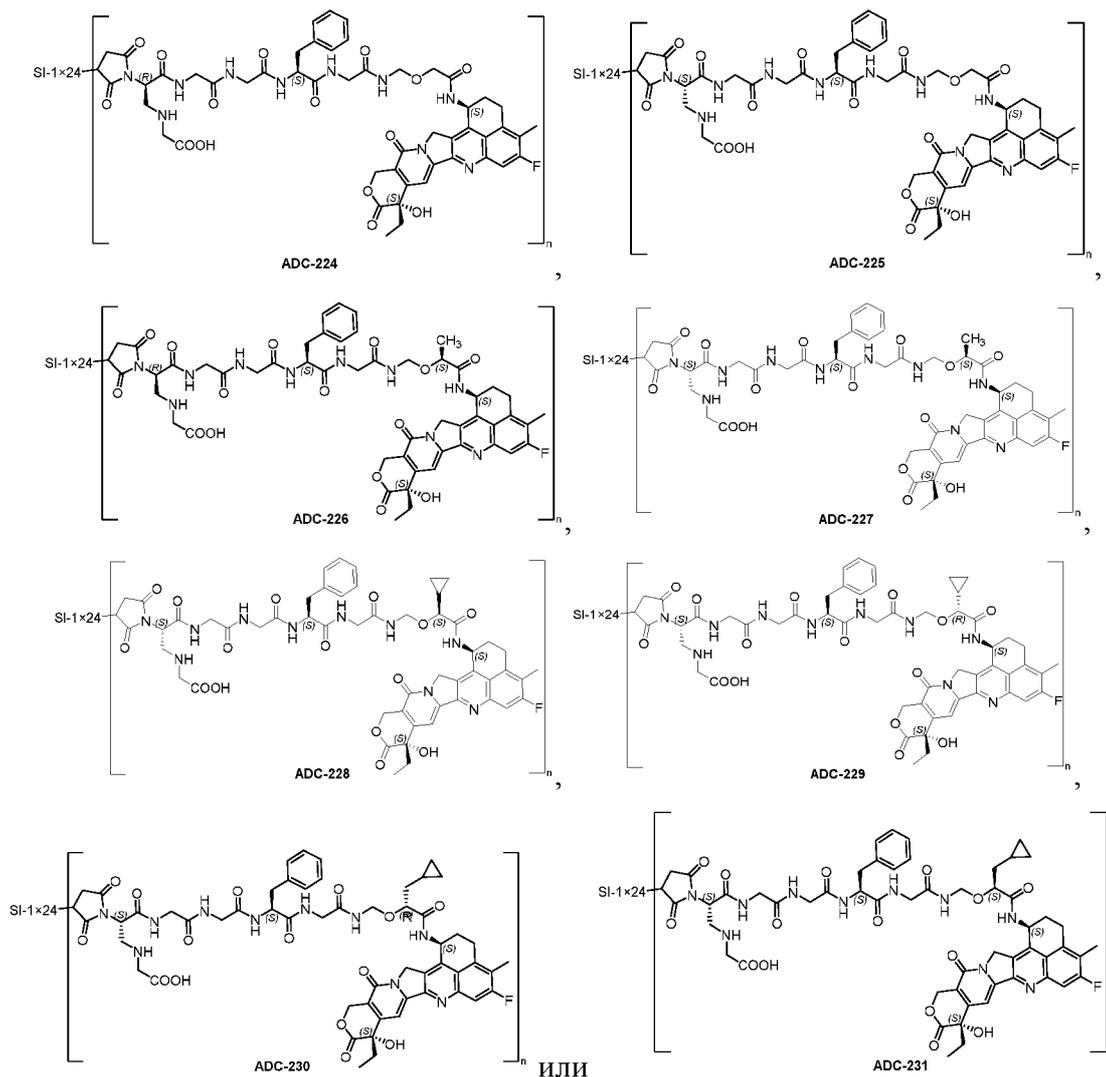
ADC-214 получали из соединения 5A в соответствии с универсальным способом





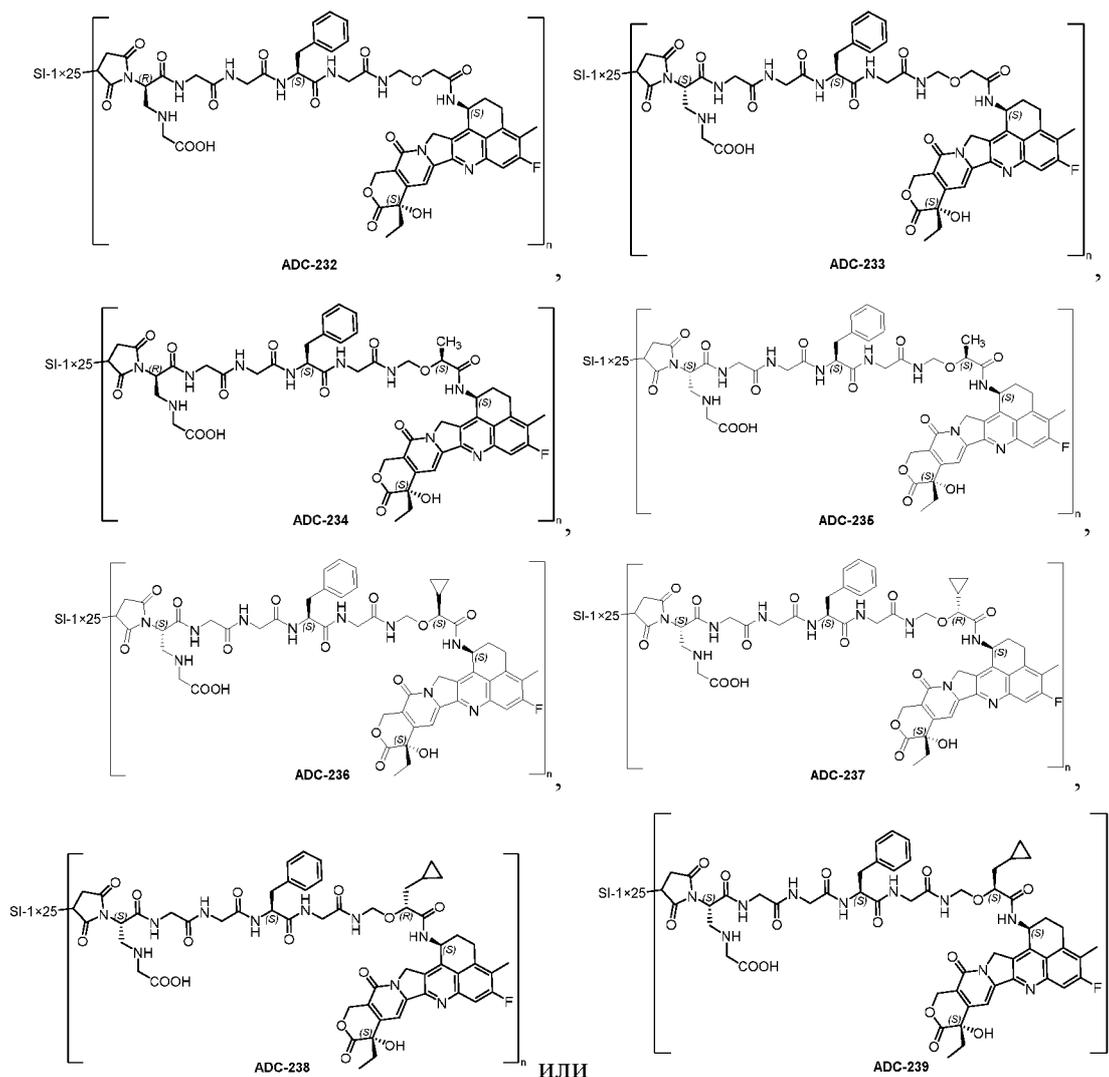
## Пример 312

От ADC-224 до ADC-231 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 93,



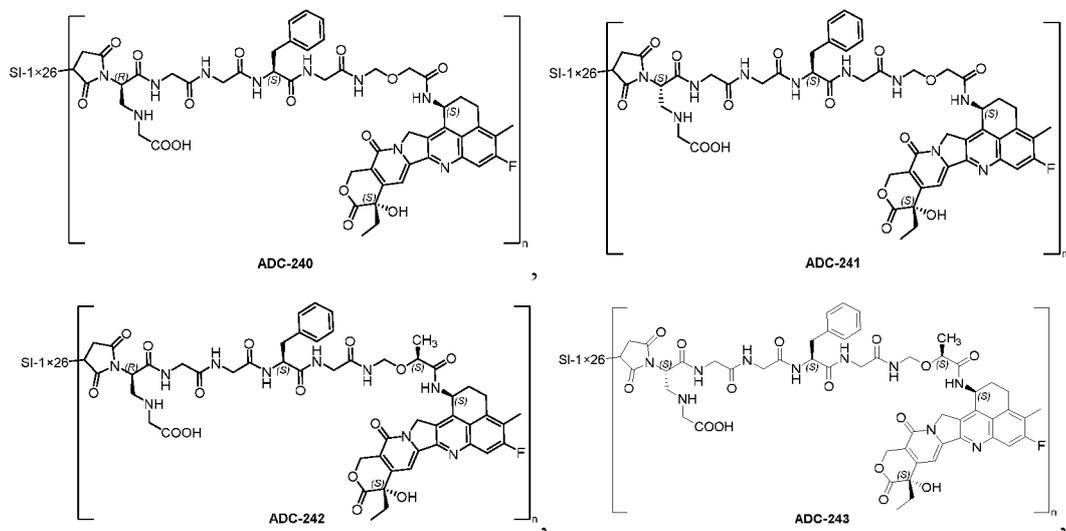
## Пример 313

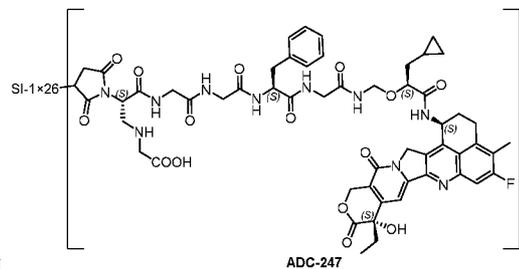
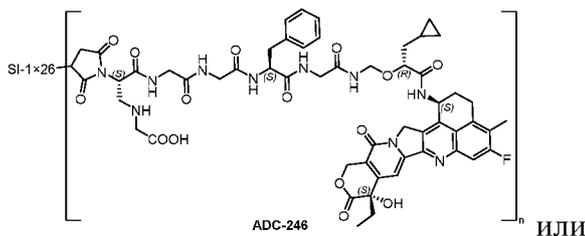
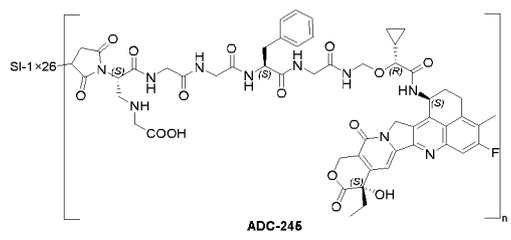
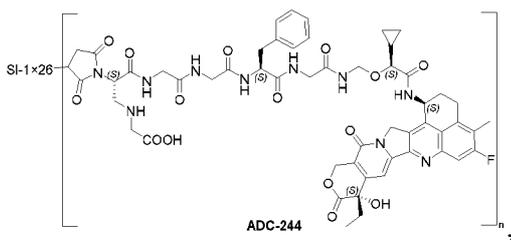
От ADC-232 до ADC-239 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,



## Пример 314

От ADC-240 до ADC-247 получали в соответствии с универсальным способом сочетания из примера 94,





## Пример 315

Содержание мономера определяли с применением способа SEC-HPLC.

Хроматографическая колонка: Biocore SEC-300, 5 мкм, 4,6×300 мм.

Производитель: NanoChrom, № продукта: B213-050030-04630S.

Подвижная фаза: 50 mM PB + 300 mM NaCl + 200 mM Arg + 5% IPA, pH = 6,5.

Таблица 1. Методологические параметры

Параметры	Настройки
Расход	0,3 мл/мин
Значения длины волны	214 нм и 280 нм
Температура колонки	30°C
Температура пластины для образца	Комнатная температура
Объем введения	20 мкг
Максимальное давление	150 бар/15 МПа/2175 фунтов/кв. дюйм
Градиент	Изократический
Продолжительность работы	20 минут

Таблица 2. Данные по содержанию мономеров для раскрытого конъюгата лиганд-лекарственное средство (ADC), раскрытого в настоящей заявке.

Название молекулы	Разложение, %	Агрегат, %	Уровень мономера, %
ADC-1	0,01	1,60	98,39
ADC-2	0,0	1,51	98,49
ADC-5	0,0	2,43	97,57
ADC-6	0,0	2,42	97,58
ADC-7	0,12	2,16	97,72
ADC-8	0,07	1,37	98,56
ADC-10	0,05	1,35	98,60
ADC-11	0,11	1,51	98,38
ADC-12	0,05	1,62	98,33
ADC-13	0,08	1,30	98,62
ADC-14	0,02	1,49	98,49

ADC-48	0,06	1,71	98,23
ADC-52	0,05	1,56	98,39
ADC-DS	0,0	2,82	97,18
ADC-64	0,0	1,16	98,84
ADC-68	0,01	0,44	98,55
ADC-75	0,0	1,61	98,39
ADC-81	0,2	1,59	98,39
ADC-87	0,07	1,30	98,63
ADC-96	0,08	1,32	98,60
ADC-102	0,05	1,31	98,64
ADC-108	0,0	6,36	93,64
ADC-112	1,2	2,81	95,99
ADC-113	0,03	1,22	98,75
ADC-120	0,0	1,73	98,27
ADC-122	0,01	1,44	98,55
ADC-129	0,13	2,54	97,33
ADC-130	0,37	2,18	97,45
ADC-131	0,60	1,00	98,40
ADC-132	0,03	2,22	97,75
ADC-133	0,53	1,37	98,10
ADC-145	0,11	1,24	98,65
ADC-158	0,98	2,89	96,13
ADC-160	0,10	1,45	98,45
ADC-172	0,65	1,31	98,04
ADC-179	0,1	1,06	98,84
ADC-188	0,11	1,33	98,56
ADC-193	0,11	1,51	98,38
ADC-206	0,09	1,32	98,59
ADC-214	0,03	1,18	98,79
ADC-215	0,0	3,01	96,99
ADC-219	0,0	7,35	92,65
ADC-227	0,06	4,5	95,44
ADC-235	0,1	6,83	93,07

ВЫВОД ADC, раскрытый в настоящем изобретении, характеризуется низкой скоростью разложения и низкой скоростью агрегации и обладает превосходным свойством высокого содержания мономеров.

#### Пример 316

Отношение антител к лекарственному средству DAR определяли с применением способа RP-HPLC.

Название хроматографической колонки: Proteomix RP-1000, 4,6×100 мм, 5 мкм, 1000A. Производитель: Serax.

Таблица 3. Методологические параметры

Параметры	Настройки			
Подвижная фаза	А: 0,1% водный раствор TFA; В: 0,1% раствор TFA в ацетонитриле			
Расход	0,5 мл/мин			
Длина волны	214 нм и 280 нм			
Температура колонки	65°C			
Температура пластины для образца	Комнатная температура			
Объем введения	25 мкг			
Максимальное давление	100 бар/10 МПа/1450 фунтов/кв. дюйм			
Градиент	Время (мин)	Скорость потока (мл/мин)	Подвижная фаза А (%)	Подвижная фаза В (%)
	0,0	0,5	75	25
	3	0,5	75	25
	28	0,5	50	50
	30	0,5	5	95
	32	0,5	5	95
	33	0,5	75	25
	40	0,5	75	25

Таблица 4. Подробные данные по коэффициенту сочетания ADC лекарственное средство-антитело (DAR)

Название образца	Номер партии	RP-DAR	Название образца	Номер партии	RP-DAR
ADC-5	20201028	7,65	ADC-120	20200708	7,83
ADC-6	20200923	6,99	ADC-122	20200708	6,97
ADC-10	20200104	7,38	ADC-137	20191125	7,44
ADC-12	20191125	7,61	ADC-140	20200708	7,52
ADC-18	20201028	7,71	ADC-142	20201028	7,50
ADC-23	20200104	7,19	ADC-143	20201028	7,61
ADC-24	20200104	7,09	ADC-159	20200708	7,28
ADC-36	20200708	7,44	ADC-160	20200708	7,89
ADC-41	20201028	7,81	ADC-168	20201028	7,24
ADC-42	20201028	7,55	ADC-169	20201028	7,89
ADC-55	20200708	7,54	ADC-170	20201028	7,55
ADC-59	20200708	7,57	ADC-171	20201028	6,91
ADC-64	20201028	7,42	ADC-176	20200708	7,32
ADC-70	20200104	7,60	ADC-183	20200708	7,18
ADC-71	20200104	7,50	ADC-184	20200708	7,49
ADC-72	20200104	7,42	ADC-185	20200708	7,30
ADC-88	20200708	7,31	ADC-186	20200708	7,77
ADC-96	20191125	7,75	ADC-190	20200708	7,26
ADC-100	20200708	7,56	ADC-199	20191125	7,42
ADC-108	20200708	7,62	ADC-214	20201028	7,85
ADC-112	20201116	7,46	ADC-215	20211013	7,38
ADC-219	20211015	7,14	ADC-227	20211013	7,46
ADC-235	20211013	7,26	ADC-243	20211027	7,38

ВЫВОД ADC, раскрытый в настоящем изобретении, обладает превосходным свойством высокого значения DAR, которое может значительно увеличивать концентрацию лекарственного средства в местоположении целевого сайта при той же дозе вводимого лекарственного средства, представляющего собой ADC.

ADC сохранял аффинность соответствующих исходных биспецифических антител SI-1×6.4, SI-1×4, SI-1×22, SI-1×24, SI-1×25 и SI-1×26 к EGFR и HER3.

Относительные значения аффинности SI-1×6.4 по сравнению с ADC-6 и SI-1×4 по сравнению с ADC-112 к EGFR и HER3 сравнивали посредством сэндвич-ELISA с двойным антигеном. Конкретные стадии были следующими.

Планшеты, покрытые рекомбинантным антигеном EGFR-His\*6, связывали с белком 1% бычьей сыворотки; затем SI-1×6.4, ADC-6, SI-1×4 и ADC-112 разбавляли соответственно и затем разбавляли до начальной концентрации 5000 нг/мл в последовательных 3-кратных градиентах, всего 11 концентраций; образцы инкубировали на покрытых планшетах для ELISA в течение определенного периода времени с последующей инкубацией меченного биотином антигена HER3-Fc, с последующей инкубацией HRP-меченного стрептавидина; наконец, осуществляли проявление цвета ТМВ с последующим завершением с помощью раствора серной кислоты и определяли значение поглощения при 450 нм на микропланшет-ридере. Результаты анализа наносили на график в зависимости от концентрации для OD450 нм.

**ВЫВОД** Как показано на прилагаемых фигурах 3А и 3В, после сочетания ADC-6 и ADC-112 сохраняли значения аффинности, подобные таковым SI-1×6.4 и SI-1×4 соответственно, без существенной разницы в значениях EC50; что указывает на то, что сочетание токсинов с SI-1×6.4 и SI-1×4 не влияло на их аффинность в отношении антигена.

Аналогично, при применении способа тестирования, аналогичного описанному выше, результаты показаны на фиг. 3С, Фиг. 3D, фиг. 3Е и фиг. 3F; после сочетания ADC-219, ADC-227, ADC-235 и ADC-243 сохраняли значения аффинности, подобные таковым SI-1×22, SI-1×24, SI-1×25 и SI-1×26 соответственно, без существенной разницы в значениях EC50; что указывает на то, что сочетание токсинов с SI-1×22, SI-1×24, SI-1×25 и SI-1×26 не влияло на их аффинность в отношении антигена.

### Пример 318

#### Фармакодинамические анализы *in vitro*

Различные линии опухолевых клеток человеческого происхождения (клетки A431 эпидермального рака человека, клетки ВХРС-3 аденокарциномы поджелудочной железы человека *in situ*, клетки FaDu плоскоклеточной карциномы глотки человека, клеточная линия HARA-B плоскоклеточной карциномы легкого человека, клетки HCC827 немелкоклеточного рака легкого человека и клетки SW620 рака толстой

кишки человека) использовали в качестве экспериментальных моделей для оценки *in vitro* эффективности подвергнутого сочетанию с ADC лекарственного средства по настоящему изобретению. Определенным количеством опухолевых клеток инокулировали 96-луночный планшет и к клеткам добавляли разбавленное с градиентом тестируемое антитело и соответствующее лекарственное средство, представляющее собой ADC, с последующей 5-дневной обработкой; жизнеспособность клеток определяли с использованием аламарового синего или MTS и ингибирующее действие тестируемого антитела и ADC в отношении линий опухолевых клеток оценивали путем расчета IC<sub>50</sub>. Начальная концентрация лекарственного средства, представляющего собой антитело, составляла 500 нМ, и разбавление было 7-кратным, всего 8 точек концентрации, и обработку выполняли в течение 5 дней. Способ окончательного расчета был следующим: выживаемость = (экспериментальная группа - отрицательный контроль) / (контрольная группа - группа отрицательного контроля) × 100%, затем применяли Graph Pad Prism для аппроксимации кривой с расчетом половины ингибирующей концентрации (IC<sub>50</sub>), а также эффективности (%).

Таблица 5. Эффективность шести свободных антител (SI-1X4, SI-1×6.4, SI-1X22, SI-1X24, SI-1X25, SI-1X26) и шести ADC (ADC-112, ADC-6, ADC-219, ADC-227, ADC-235, ADC-243) в отношении A431 *in vitro*

<b>A431</b>			
Группы	IC <sub>50</sub> (нМ)	Группы	Эффективность (%)
ADC-112	4,95	ADC-112	85,63
ADC-6	0,98	ADC-6	87,88
ADC-219	0,75	ADC-219	89,37
ADC-227	0,77	ADC-227	86,13
ADC-235	0,81	ADC-235	86,86
ADC-243	3,61	ADC-243	89,63
SI-1X4	>500	SI-1X4	31,99
SI-1X6.4	6,98	SI-1X6.4	62,18
SI-1X22	4,47	SI-1X22	69,01
SI-1X24	6,23	SI-1X24	69,98

SI-1X25	5,54	SI-1X25	75,89
SI-1X26	>500	SI-1X26	44,63

Таблица 6. Эффективность шести свободных антител (SI-1X4, SI-1×6.4, SI-1X22, SI-1X24, SI-1X25, SI-1X26) и шести ADC (ADC-112, ADC-6, ADC-219, ADC-227, ADC-235, ADC-243) в отношении ВХРС-3 *in vitro*

<b>ВхРС-3</b>			
Группы	IC <sub>50</sub> (нМ)	Группы	Эффективность (%)
ADC-112	46,75	ADC-112	61,96
ADC-6	12,29	ADC-6	61,02
ADC-219	16,58	ADC-219	65,64
ADC-227	32,48	ADC-227	68,85
ADC-235	15,69	ADC-235	68,24
ADC-243	16,69	ADC-243	65,96
SI-1X4	>500	SI-1X4	N/A
SI-1X6.4	>500	SI-1X6.4	N/A
SI-1X22	>500	SI-1X22	N/A
SI-1X24	>500	SI-1X24	N/A
SI-1X25	>500	SI-1X25	N/A
SI-1X26	>500	SI-1X26	N/A

Таблица 7. Эффективность шести свободных антител (SI-1X4, SI-1×6.4, SI-1X22, SI-1X24, SI-1X25, SI-1X26) и шести ADC (ADC-112, ADC-6, ADC-219, ADC-227, ADC-235, ADC-243) в отношении FaDu *in vitro*

<b>FaDu</b>			
Группы	IC <sub>50</sub> (нМ)	Группы	Эффективность (%)
ADC-112	1,01	ADC-112	74,09
ADC-6	0,18	ADC-6	74,31
ADC-219	0,21	ADC-219	74,68
ADC-227	0,25	ADC-227	72,44

ADC-235	0,28	ADC-235	74,09
ADC-243	0,40	ADC-243	72,63
SI-1X4	>500	SI-1X4	23,34
SI-1X6.4	>500	SI-1X6.4	38,92
SI-1X22	>500	SI-1X22	39,45
SI-1X24	>500	SI-1X24	36,18
SI-1X25	>500	SI-1X25	41,65
SI-1X26	>500	SI-1X26	34,43

Таблица 8. Эффективность шести свободных антител (SI-1X4, SI-1×6.4, SI-1X22, SI-1X24, SI-1X25, SI-1X26), а также шести ADC (ADC-112, ADC-6, ADC-219, ADC-227, ADC-235, ADC-243) в отношении HARA-B *in vitro*

<b>HARA-B</b>			
Группы	IC <sub>50</sub> (нМ)	Группы	Эффективность (%)
ADC-112	14,73	ADC-112	60,67
ADC-6	3,89	ADC-6	73,43
ADC-219	2,37	ADC-219	73,4
ADC-227	2,45	ADC-227	71,07
ADC-235	3,18	ADC-235	73
ADC-243	9,93	ADC-243	64,77
SI-1X6.4	>500	SI-1X6.4	39,27
SI-1X22	>500	SI-1X22	43,36
SI-1X24	>500	SI-1X24	43,65
SI-1X25	>500	SI-1X25	44,73
SI-1X26	>500	SI-1X26	36,55
SI-1X4	>500	SI-1X4	44,32

Таблица 9. Эффективность шести свободных антител (SI-1X4, SI-1×6.4, SI-1X22, SI-1X24, SI-1X25, SI-1X26) и шести ADC (ADC-112, ADC-6, ADC-219, ADC-227, ADC-235, ADC-243) в отношении HCC827 *in vitro*.

<b>HCC827</b>
---------------

Группы	IC <sub>50</sub> (нМ)	Группы	Эффективность (%)
ADC-112	2,35	ADC-112	73,10
ADC-6	1,06	ADC-6	71,31
ADC-219	0,65	ADC-219	71,21
ADC-227	0,51	ADC-227	66,61
ADC-235	0,43	ADC-235	68,22
ADC-243	2,11	ADC-243	69,56
SI-1X4	>500	SI-1X4	18,52
SI-1X6.4	2,08	SI-1X6.4	60,02
SI-1X22	1,42	SI-1X22	63,69
SI-1X24	1,48	SI-1X24	66,70
SI-1X25	1,32	SI-1X25	69,43
SI-1X26	>500	SI-1X26	28,44

Таблица 10. Эффективность шести свободных антител (SI-1X4, SI-1×6.4, SI-1X22, SI-1X24, SI-1X25, SI-1X26) и шести ADC (ADC-112, ADC-6, ADC-219, ADC-227, ADC-235, ADC-243) в отношении SW620 *in vitro*.

<b>SW620</b>			
Группы	IC <sub>50</sub> (нМ)	Группы	Эффективность (%)
ADC-112	5,82	ADC-112	70,72
ADC-6	4,51	ADC-6	75,35
ADC-219	4,20	ADC-219	75,56
ADC-227	5,78	ADC-227	70,76
ADC-235	4,69	ADC-235	73,94
ADC-243	3,91	ADC-243	69,68
SI-1X4	>500	SI-1X4	4,02

SI-1X6.4	>500	SI-1X6.4	0,24
SI-1X22	>500	SI-1X22	3,45
SI-1X24	>500	SI-1X24	5,61
SI-1X25	>500	SI-1X25	5,92
SI-1X26	>500	SI-1X26	6,47

ВЫВОД В клетках A431 эпидермального рака человека, клетках ВХРС-3 аденокарциномы поджелудочной железы человека *in situ*, клетках FaDu плоскоклеточной карциномы глотки человека, клеточной линии HARA-B плоскоклеточной карциномы легкого человека, клетках HCC827 немелкоклеточного рака легкого человека и клетках SW620 рака толстой кишки человека шесть ADC (ADC-112, ADC-6, ADC-219, ADC-227, ADC-235, ADC-243) демонстрировали более чувствительную эффективность и более сильное ингибирование роста опухолевых клеток по сравнению с соответствующими им свободными антителами (SI-1X4, SI-1×6.4, SI-1X22, SI-1X24, SI-1X25, SI-1X26) (фигура 4A - фигура 4F и таблица 5 - таблица 10).

#### Пример 319

Тестирование эффективности *in vivo*

В настоящем изобретении бестимусным мышам BALB/c подкожно инокулировали различные линии опухолевых клеток человека (A431, SW620, A431 + SW620) в качестве экспериментальных моделей для оценки эффективности лекарственных средств, подвергнутых сочетанию с ADC, *in vivo*. Некоторое количество линий опухолевых клеток инокулировали подкожно бестимусным мышам BALB/c, и когда объем опухоли достигал 150-300 мм<sup>3</sup>, антитела и соответствующие лекарственные средства, представляющие собой ADC, вводили путем инъекции в хвостовую вену; лекарственные средства вводили один раз в неделю четыре раза при непрерывном наблюдении и измерения опухоли проводили два раза в неделю с оценкой ингибирующего действия тестируемых антител и ADC в отношении линий опухолевых клеток.

ВЫВОД

В модели одной опухоли A431 с высокой экспрессией EGFR 10 мг/кг ADC-6 (DAR = 8) демонстрировали более сильное ингибирование опухоли по сравнению со свободным антителом SI-1×6.4 (фигура 5A).

В модели одной опухоли SW620 с низкой экспрессией EGFR 10 и 15 мг/кг ADC-6 также демонстрировали более сильное подавление опухоли по сравнению с 15 мг/кг свободного антитела SI-1×6.4; и оно было сильнее, чем подавление опухоли с помощью Cet-ADC (ADC-214, DAR = 8) в дозе, соответствующей молекулярной молярной концентрации (фигура 5B).

В гетерогенных опухолях A431 + SW620 5, 15 и 30 мг/кг ADC-6 аналогичным образом демонстрировали более сильное ингибирование опухоли по сравнению с 30 мг/кг свободного антитела SI-1×6.4 (фигура 5C).

### Пример 320

Тестирование эффективности *in vivo*

Бестимусных мышей BALB/c, которым подкожно инокулировали клетки A431 эпидермального рака человека и клетки ВхРС3 рака поджелудочной железы человека, использовали в качестве экспериментальных моделей в настоящем изобретении для оценки эффективности лекарственных средств, подвергнутых сочетанию с ADC, *in vivo*. Определенное количество линий опухолевых клеток инокулировали подкожно самкам бестимусных мышей BALB/c со стороны правого плеча, и когда средний объем опухоли увеличивался до 180-250 мм<sup>3</sup>, соответствующие лекарственные средства, представляющие собой ADC, вводили путем инъекции в хвостовую вену один раз в неделю в течение четырех последовательных введений под непрерывным наблюдением и объем опухоли измеряли дважды в неделю для оценки ингибирующего действия тестируемых лекарственных средств, представляющих собой ADC, в отношении роста опухолей.

$$\% \text{ изменение до } D_0 = (D_n - D_0) / D_0 * 100;$$

$\% \text{ TGI} = 1 - [\text{изменения объема опухоли в группе обработки/изменения объема опухоли в контрольной группе}] \times 100.$

В модели опухоли A431 одного тела с высокой экспрессией EGFR через 42 дня после первого введения каждое тестируемое лекарственное средство, представляющее собой ADC, вызывало значительное ингибирование роста опухоли ( $P < 0,05$ ) в модели подкожного трансплантата опухоли из клеток A431 эпидермального рака человека у бестимусных мышей BALB/c, где ADC-6, ADC-219, ADC-235, ADC-227 и ADC-112 характеризовались сопоставимыми эффектами подавления опухоли, причем все они демонстрировали сильные эффекты подавления опухоли (фигура 6A).

В модели опухоли ВхРС3 одного тела со средней экспрессией EGFR через 35 дней после первого введения каждое тестируемое лекарственное средство, представляющее собой ADC, вызывало значительное ингибирование роста опухоли ( $P < 0,05$ ) в модели подкожного трансплантата опухоли из клеток ВхРС3 эпидермального рака человека у бестимусных мышей BALB/с, где ADC-6, ADC-219, ADC-235, ADC-227 и ADC-112 характеризовались сопоставимыми эффектами подавления опухоли, причем все они демонстрировали сильные эффекты подавления опухоли (фигура 6B).

#### Пример 321

Эффективность соединения **5A**, представляющего собой полезную нагрузку, *in vitro*

##### 1) Экспериментальные материалы

Клетки: клетки для тестирования получали из Банка клеток Китайской академии наук.

Среда DMEM для клеточных культур: Gibco.

FBS: BLOWEST.

##### 2) Получение культуральной среды

Среда для роста (с 10% FBS, пенициллином/стрептомицином (100 ед./мл).

Среда для выявления (с 1% FBS, пенициллином/стрептомицином (100 ед./мл).

##### 3) Процесс

Включают УФ-свет в боксе биобезопасности за 30 мин, а затем включают вентиляцию на 3 мин. Помещают среду для роста, среду для выявления, D-PBS и панкреатин на водяную баню с постоянной температурой 37°C для предварительного нагрева, и затем стерилизуют поверхность спиртом, и помещают в бокс биобезопасности. Помещают клетки с конфлюэнтностью приблизительно 80% в бокс биобезопасности, удаляют старую среду, промывают с помощью D-PBS, извлекают и удаляют, расщепляют панкреатином в течение 2-3 мин, а затем добавляют среду для роста и нейтрализации и центрифугируют при 1200 об./мин в течение 3 мин. Удаляют супернатант, полученный в ходе центрифугирования, равномерно смешивают с 4 мл среды для выявления и собирают 100 мкл для подсчета (при этом отбирают 50 мкл клеточной жидкости, добавляют 50 мкл красителя трипанового синего и равномерно перемешивают, после чего следует подсчет). Распределение по планшету осуществляли в соответствии с предварительно оптимизированной плотностью распределения клеток; 80 мкл/лунка распределяли по 96-луночному планшету, при этом только 80 мкл среды для выявления добавляли в лунки E11 и F11 и 150 мкл DPBS добавляли в крайние лунки. Через 24 ч после распределения по планшету добавляли

разбавленное антитело по 20 мкл на лунку и устанавливали контроль; в 11-ю колонку добавляли только 20 мкл среды для выявления и для каждой концентрации устанавливали 2 дублирующие лунки; после добавления равномерное перемешивание осуществляли на вихревом смесителе для клеток при 550 об./мин в течение 3 мин.

Разбавление раствора. Используют среду для выявления для получения 300 мкл раствора тестируемого образца с начальной концентрацией 5 мкМ в первой колонке 96-луночного планшета с V-образным дном, добавляют 240 мкл среды для выявления в колонки со второй по 10-ю соответственно, отбирают 60 мкл из равномерно перемешанной первой колонки и добавляют во вторую колонку, равномерно перемешивают сверху и снизу многоканальной пипеткой 10 раз, удаляют наконечники пипеток и поочередно выполняют операции для следующих 7 концентраций.

#### 4) Выявление

Через 4 дня достают реагент MTS, размораживают при комнатной температуре в темноте, затем тщательно и равномерно перемешивают с применением вихревого смесителя, затем добавляют 20 мкл реагента CellTiter One Solution Reagen MTS на 100 мкл объема клеточной культуры по боковой стенке лунок в боксе биобезопасности, осторожно стучат по поверхности планшета, чтобы равномерно перемешать раствор MTS, и затем помещают в инкубатор для клеточных культур и оставляют инкубироваться в течение 2 ч в темноте. В конце реакции вынимают 96-луночный планшет и измеряют значение поглощения OD490 нм в микропланшет-ридере и регистрируют, систематизируют, анализируют и сохраняют данные.

#### 5) Результаты

В таблице 11 проиллюстрировано, что соединение **5A** (полезная нагрузка) демонстрировало хорошее ингибирование следующих клеток солидной опухоли и клеток гематомы.

Таблица 11 Ингибирующее действие соединения **5A** в отношении клеток H1975 немелкоклеточной аденокарциномы легкого человека, клеток HCC827 немелкоклеточного рака легкого человека, клеток A431 эпидермального рака человека, клеток NCI-N87 рака желудка человека, клеток ВХРС-3 аденокарциномы поджелудочной железы человека *in situ*, клеток A431 эпидермального рака человека + клетки SW620 рака толстой кишки человека, клеток ZR-75-1 рака молочной железы человека, клеток H929 плазмноклеточного лейкоза человека, клеток RPMI8226 множественной миеломы человека, клеток JLN-3 лейкоза человека, клеток MDA-MB-

361 рака молочной железы человека и клеток SK-BR-3 рака молочной железы человека *in vitro*.

Группа	IC50 (нМ)	Эффективность, %
H1975	970,33	76,78
HCC827	655,60	80,57
A431	438,77	84,97
NCI-N87	1023,92	63,93
BxPC-3	320,09	64,4
A431 + SW620	604,87	68,26
ZR-75-1	557,95	54,79
H929	23,94	99,03
RPMI8226	147,00	93,61
JJN-3	36,11	80,59
MDA- MB-361	572,13	62,34
SK-BR-3	732,43	70,9

Пример 322. Данные по эффективности *in vitro* для ADC-6 и ADC-214

Эффективность лекарственных средств, подвергнутых сочетанию с ADC, оценивали *in vitro* с использованием экспериментальной модели двух линий опухолевых клеток человека (клеточной линии Ока-с-1 плоскоклеточной карциномы низкодифференцированного рака легкого человека, клеток SK-MES-1 плоскоклеточной карциномы легкого человека).

Определенным количеством опухолевых клеток инокулируют 96-луночный планшет, добавляют к клеткам разбавленное с градиентом тестируемое антитело и соответствующее лекарственное средство, представляющее собой ADC, обрабатывают в течение 5 дней, измеряют жизнеспособность клеток с применением аламарового синего или MTS и оценивают ингибирующее действие тестируемого антитела, ADC и низкомолекулярного лекарственного средства d3 на линиях опухолевых клеток путем расчета IC50. Начальная концентрация лекарственного средства, представляющего

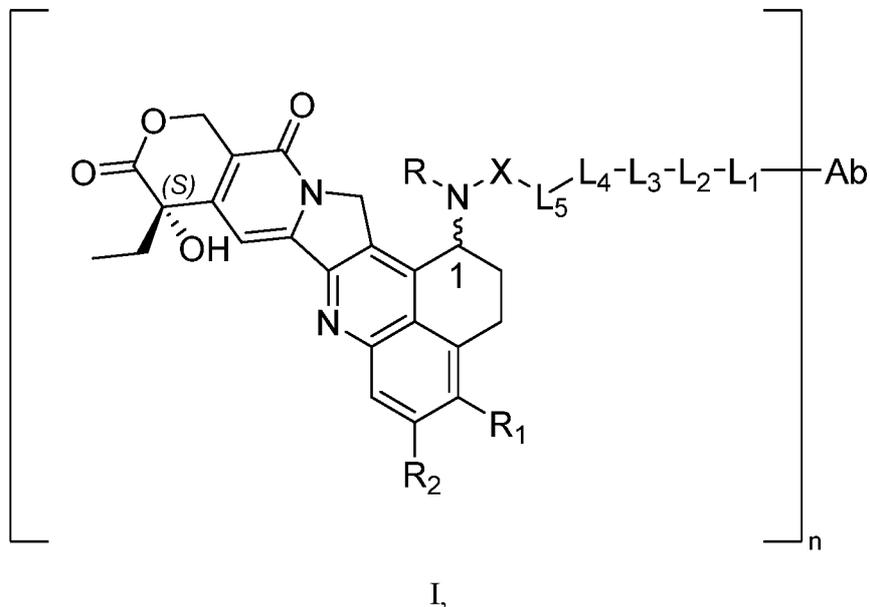
собой антитело, составляла 500 нМ, и разбавление было 7-кратным, всего 7 точек концентрации, и обработку выполняли в течение 5 дней. Способ окончательного расчета был следующим:  $\text{выживаемость} = (\text{экспериментальная группа} - \text{отрицательный контроль}) / (\text{контрольная группа} - \text{группа отрицательного контроля}) \times 100\%$ , с последующей аппроксимацией кривой с использованием Graph Pad Prism и расчетом половины ингибирующей концентрации (IC50). Результаты показаны на фигурах 7А и 7В и в таблице 12.

Таблица 12. Эффективность SI-1×6.4, цетуксимаба, ADC-6, ADC-214 и d3 *in vitro* на клеточной линии Ока-с-1 плоскоклеточной карциномы низкодифференцированного рака легкого человека и клетках SK-MES-1 плоскоклеточной карциномы легкого человека

Группа	IC50 (нМ)				
	SI-1×6.4	Цетуксимаб	ADC-6	ADC-214	d3
Ока-с-1	0,033	0,015	0,013	0,017	0,846
SK-MES-1	0,227	0,289	0,097	0,542	2,044

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

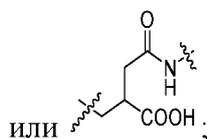
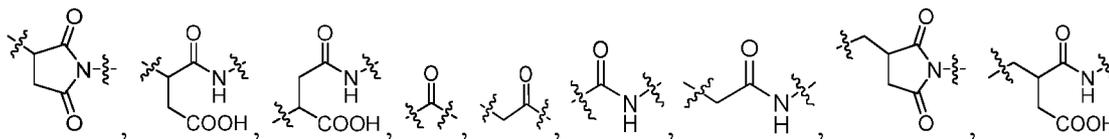
1. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват;



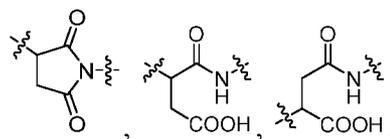
где

Ab представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые одновременно нацеливаются на два разных эпитопа или две разных мишени;

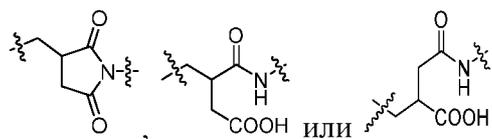
L<sub>1</sub> выбран без ограничения из:



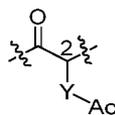
предпочтительно L<sub>1</sub> представляет собой



предпочтительно L<sub>1</sub> представляет собой



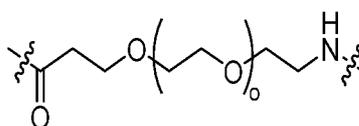
L<sub>2</sub> имеет структуру, представленную формулой А ниже:



формула А,

где Y представляет собой остов, выбранный из C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила или C3-С8циклоалкила; предпочтительно Y представляет собой C1-Сбалкил; Ac представляет собой гидрофильное структурное звено; и атом углерода № 2, присоединенный к Y, характеризуется абсолютной хиральностью в R-конфигурации или S-конфигурации;

L<sub>3</sub> присутствует или отсутствует, и, если присутствует, L<sub>3</sub> выбран из



гидрофильных звеньев на основе PEG: , о выбран из целых чисел 1-10, предпочтительно целых чисел 2-8;

L<sub>4</sub> представляет собой звено для ферментативного расщепления;

L<sub>5</sub> представляет собой связывающее звено;

хиральный атом углерода № 1, присоединенный к N в формуле I, характеризуется абсолютной хиральностью в R-конфигурации или S-конфигурации;

R выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно R выбран из атома водорода или C1-Сбалкильной группы;

R<sub>1</sub> выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, карбоксила, 3-7-членного гетероциклила, замещенного 3-7-членного гетероциклила, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно R<sub>1</sub> выбран из атома водорода или C1-Сбалкильной группы;

более предпочтительно R<sub>1</sub> выбран из C1-Сбалкила;

R<sub>2</sub> выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, карбоксила, 3-7-членного гетероциклила, замещенного 3-7-членного гетероциклила, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно  $R_2$  выбран из атома водорода, галогена или C1-Сбалкильной группы;

более предпочтительно  $R_2$  выбран из галогена;

X выбран из  $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-O-$ ,  $-C(O)-CR_aR_{ab}-(CR_3R_4)_m-NH-$  или  $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-S-$ ;

предпочтительно X выбран из  $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-O-$ ;

каждый из  $R_a$  и  $R_b$  независимо выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, галогенированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C6-С10арил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, 3-7-членной гетероциклической группы, замещенной 3-7-членной гетероциклической группы, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно каждый из  $R_a$  и  $R_b$  независимо выбран из атома водорода, C1-Сбалкила, галоген-C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила или C6-С10арил-C1-Сбалкила;

в качестве альтернативы  $R_a$ ,  $R_b$  и атомы углерода, с которыми они соединены, образуют C3-С8циклоалкильную группу, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкильную группу, 3-7-членную гетероциклическую группу или замещенную 3-7-членную гетероциклическую группу; предпочтительно  $R_a$ ,  $R_b$  и атомы углерода, с которыми они соединены, образуют C3-С8циклоалкильную группу;

$R_3$ ,  $R_4$  являются идентичными или разными, и каждый из них независимо представляет собой атом водорода, атом дейтерия, галоген, C1-Сбалкил, галогенированный C1-Сбалкил, дейтерированный C1-Сбалкил, C1-Сбалкокси, гидроксил, амина, циано, нитро, гидрокси-C1-Сбалкил, C3-С8циклоалкил, 3-7-членный гетероциклил или замещенный 3-7-членный гетероциклил;

предпочтительно каждый из  $R_3$ ,  $R_4$  независимо представляет собой атом водорода или C1-Сбалкильную группу;

в качестве альтернативы  $R_3$ ,  $R_4$  и атомы углерода, соединенные с ними, образуют C3-С8циклоалкильную группу, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкильную группу, 3-7-членную гетероциклическую группу или замещенную 3-7-членную гетероциклическую группу;

m выбран из целых чисел 0-4, предпочтительно 0, 1; n выбран из целых чисел 1-10.

2. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой

I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по п. 1, где Ab представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые одновременно нацеливаются на два разных эпитопа или две разных мишени, предпочтительно биспецифическое антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые одновременно нацеливаются на EGFR и HER3.

3. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по п. 1 или п. 2, где антитело Ab содержит тяжелую цепь IgG1, легкую к-цепь и структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv); где структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv) образует конструкцию с тяжелой цепью IgG1 или легкой к-цепью; где тяжелая цепь IgG1 и легкая к-цепь образуют часть IgG со специфичностью связывания в отношении EGFR; структурный домен на основе scFv характеризуется специфичностью связывания в отношении HER3, и структурный домен на основе scFv связан посредством линкера (например, имеющего аминокислотную последовательность  $(\text{gly-gly-gly-gly-ser})_n$ , где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, и предпочтительно n представляет собой целое число от 1 до 10) с С-концом или N-концом тяжелой цепи IgG1 или С-концом или N-концом легкой к-цепи; и где структурный домен на основе одноцепочечного Fv имеет следующий структурный порядок: N-конец-вариабельная область тяжелой цепи-спейсер-вариабельная область легкой цепи-С-конец или N-конец-вариабельная область легкой цепи-спейсер-вариабельная область тяжелой цепи-С-конец (например, спейсер состоит из аминокислотной последовательности  $(\text{gly-gly-gly-gly-ser})_m$ , где m представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 3, и предпочтительно m составляет 3, 4, 5 или 6).

4. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-3, где легкая к-цепь антитела Ab содержит CDR, представленные под SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, тяжелая цепь IgG1 содержит CDR, представленные под SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31, и структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv) содержит CDR вариабельной области тяжелой цепи, представленные под SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, и CDR вариабельной области легкой цепи, представленные под SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37.

5. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой

I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-4, где легкая цепь антитела Ab содержит переменную область, представленную под SEQ ID NO: 28, тяжелая цепь IgG1 содержит переменную область, представленную под SEQ ID NO: 38, и структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv) содержит переменную область тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 39, и переменную область легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 40.

6. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-5, где аминокислотная последовательность легкой цепи антитела Ab представляет собой SEQ ID NO: 2, и аминокислотная последовательность конструкции из тяжелой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой SEQ ID NO: 4.

7. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-6, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь антитела Ab, представляет собой SEQ ID NO: 1, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию из тяжелой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv), представляет собой SEQ ID NO: 3.

8. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-3, где легкая к-цепь антитела Ab содержит CDR, представленные под SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 43, тяжелая цепь IgG1 содержит CDR, представленные под SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47, и структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv) содержит CDR переменной области тяжелой цепи, представленные под SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, и CDR переменной области легкой цепи, представленные под SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 и SEQ ID NO: 37.

9. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-3 и п. 8, где легкая цепь антитела Ab содержит переменную область, представленную под SEQ ID NO: 44, тяжелая цепь IgG1 содержит переменную область, представленную под SEQ ID NO: 48, и структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv) содержит переменную область тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 39, и переменную область легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 40.

10. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1–3 и пп. 8-9, где аминокислотная последовательность легкой цепи антитела Ab представляет собой SEQ ID NO: 6, и аминокислотная последовательность конструкции из тяжелой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой SEQ ID NO: 8.

11. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1–3 и пп. 8-10, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь антитела Ab, представляет собой SEQ ID NO: 5, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию из тяжелой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv), представляет собой SEQ ID NO: 7.

12. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-3 и п. 4, где легкая цепь антитела Ab содержит переменную область, представленную под SEQ ID NO: 49, тяжелая цепь IgG1 содержит переменную область, представленную под SEQ ID NO: 52, и структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv) содержит переменную область тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 50, и переменную область легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 51.

13. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-3, 4 и п. 12, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела Ab представляет собой SEQ ID NO: 12, и аминокислотная последовательность конструкции из легкой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой SEQ ID NO: 10.

14. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-3, 4 и пп. 12-13, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь антитела Ab, представляет собой SEQ ID NO: 11, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию из легкой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv), представляет собой SEQ ID NO: 9.

15. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-3, 4 и п. 5, где аминокислотная последовательность легкой цепи антитела Ab представляет собой SEQ ID NO: 14, и аминокислотная последовательность конструкции из тяжелой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой SEQ ID NO: 16.

16. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-3, 4, 5 и п. 15, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь антитела Ab, представляет собой SEQ ID NO: 13, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию из тяжелой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv), представляет собой SEQ ID NO: 15.

17. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-3, 4 и п. 12, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела Ab представляет собой SEQ ID NO: 20, и аминокислотная последовательность конструкции из легкой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой SEQ ID NO: 18.

18. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-3, 4, 12 и п. 17, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь антитела Ab, представляет собой SEQ ID NO: 19, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию из легкой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv), представляет собой SEQ ID NO: 17.

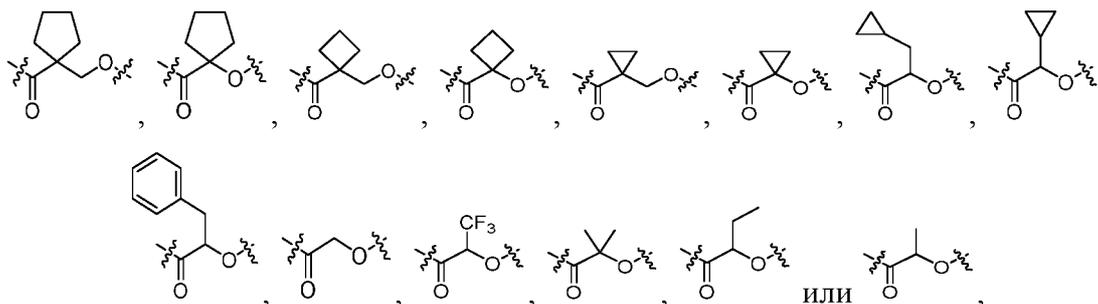
19. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-3 и п. 8, где легкая цепь антитела Ab содержит переменную область, представленную под SEQ ID NO: 53, тяжелая цепь IgG1 содержит переменную область, представленную под SEQ ID NO: 54, и структурный домен на основе одноцепочечного Fv (scFv) содержит переменную область тяжелой цепи, представленную под SEQ ID NO: 50, и переменную область легкой цепи, представленную под SEQ ID NO: 51.

20. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-3, 8 и п. 19, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела Ab представляет собой SEQ ID NO: 24, и аминокислотная последовательность конструкции из легкой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv) представляет собой SEQ ID NO: 22.

21. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-3, 8 и пп. 19-20, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь антитела Ab, представляет собой SEQ ID NO: 23, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая конструкцию из легкой цепи антитела и структурного домена на основе одноцепочечного Fv (scFv), представляет собой SEQ ID NO: 21.

22. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-21, где антитело Ab содержит две тяжелые цепи IgG1; две легкие к-цепи и два структурных домена на основе одноцепочечного Fv (scFv).

23. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-22, где указанный X выбран без ограничения из следующих структур или их изомеров:



где левая волнистая линия соединена с частью, представляющей собой производное камптотецина, а правая волнистая линия соединена с L<sub>5</sub>.

24. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-23, где L<sub>4</sub> выбран без ограничения из пептидных остатков, образованных из аминокислот,

где необязательно аминокислота дополнительно замещена одним или несколькими заместителями, выбранными из атомов дейтерия, галогенов, гидроксила,

циано, amino, нитро, карбоксила, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси и C3-С8циклоалкила или замещенного C3-С8циклоалкила;

предпочтительно пептидный остаток представляет собой пептидный остаток, образованный из одной, двух или более аминокислот, выбранных из фенилаланина (F), глицина (G), валина (V), лизина (K), цитруллина (C), серина (S), глутаминовой кислоты (E) или аспарагиновой кислоты (D);

более предпочтительно пептидный остаток представляет собой тетрапептидный остаток, состоящий из глицина (G) - глицина (G) - фенилаланина (F) - глицина (G).

25. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-24, где:

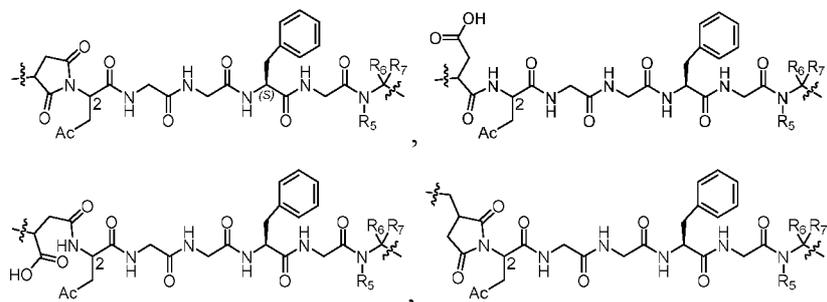
$L_5$  выбран без ограничения из  $-NR_5(CR_6R_7)_q-$  или химической связи, и  $q$  выбран из целых чисел 0-6;

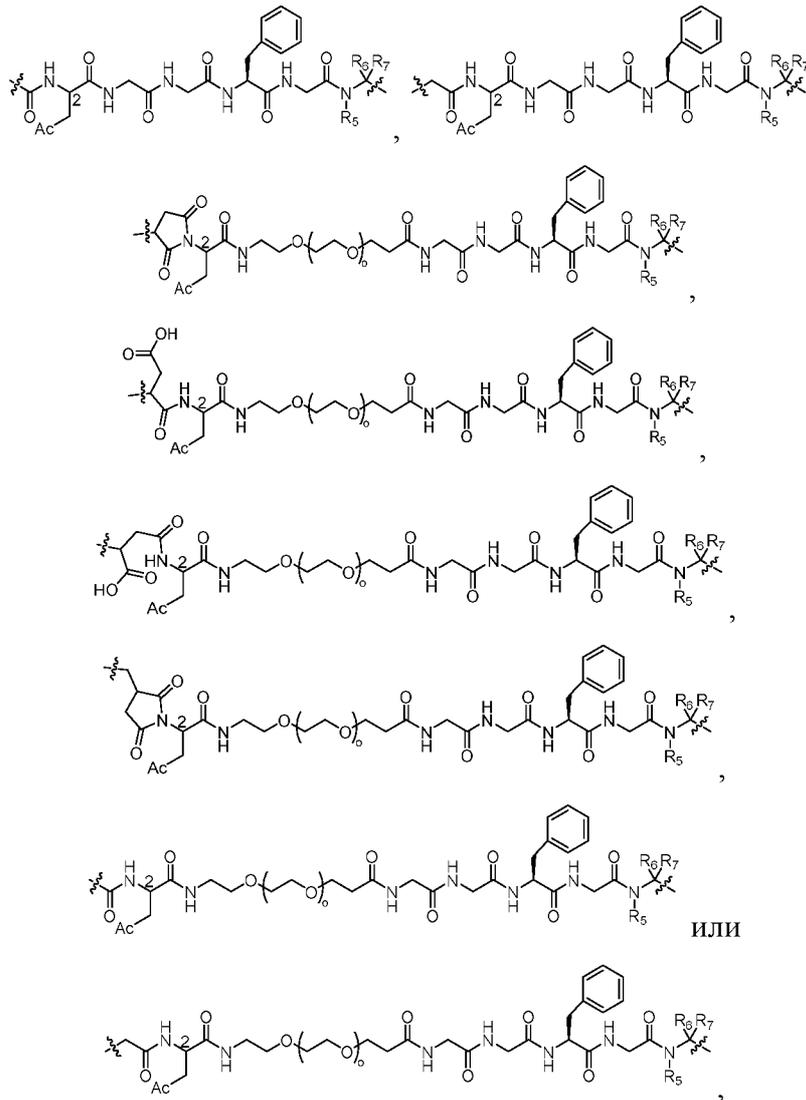
$R_5$ ,  $R_6$  и  $R_7$  являются идентичными или разными, и каждый из них независимо выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкильной группы, замещенной C1-Сбалкильной группы, дейтерированной C1-Сбалкильной группы, C3-С8циклоалкильной группы, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкильной группы, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкильной группы, 3-7-членной гетероциклической группы, замещенной 3-7-членной гетероциклической группы, C6-С10арильной группы, замещенной C6-С10арильной группы, 5-10-членной гетероарильной группы и замещенной 5-10-членной гетероарильной группы;

предпочтительно каждый из  $R_5$ ,  $R_6$  и  $R_7$  независимо выбран из атома водорода или C1-Сбалкильной группы;

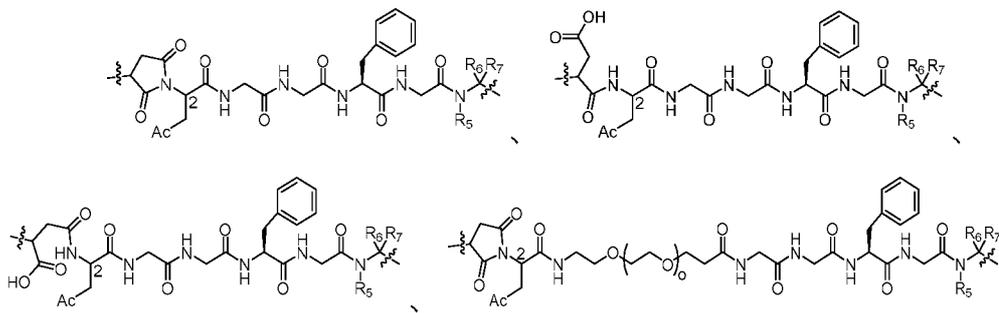
более предпочтительно каждый из  $R_5$ ,  $R_6$  и  $R_7$  независимо выбран из атома водорода.

26. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-25, где связывающее звено  $-L_1-L_2-L_3-L_4-L_5-$  выбрано без ограничения из следующих структур;





предпочтительно:



где

Ac представляет собой гидрофильное структурное звено;

R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>7</sub> являются идентичными или разными, и каждый из них независимо выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, 3-7-членного гетероциклила, замещенного 3-7-

членного гетероцикла, C6-C10арила, замещенного C6-C10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно каждый из R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>7</sub> независимо выбран из атома водорода или C1-Сбалкильной группы;

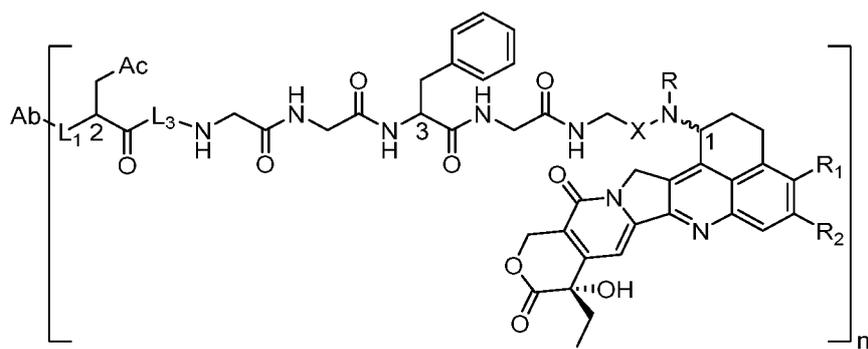
более предпочтительно каждый из R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> и R<sub>7</sub> независимо выбран из атома водорода;

атом углерода № 2, соединенный с N, характеризуется абсолютной хиральностью в R-конфигурации или S-конфигурации;

левая волнистая линия связана с частью, представляющей собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, а правая волнистая линия связана с X;

o выбран из целых чисел 1-10.

27. Конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой II, или его фармацевтически приемлемые соль или сольват;

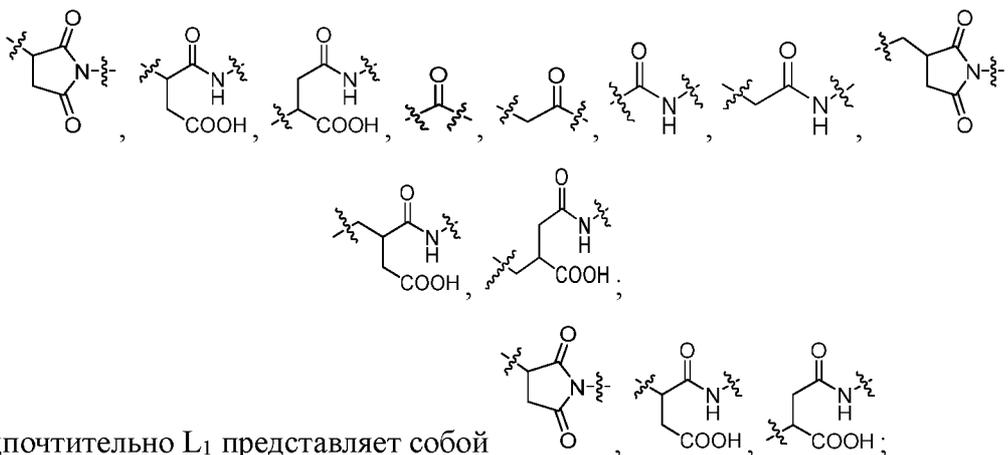


II,

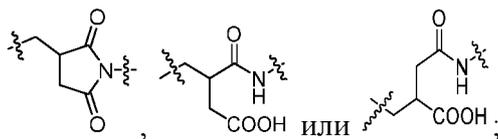
где

Ab представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые одновременно нацеливаются на EGFR и HER3;

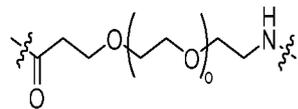
L<sub>1</sub> представляет собой связывающее звено, соединенное с Ab, и выбрано без ограничения из:



предпочтительно  $L_1$  представляет собой



$L_3$  присутствует или отсутствует, и, если  $L_3$  присутствует,  $L_3$  выбран из



,  $o$  выбран из целых чисел 1-10, предпочтительно целых чисел 2-

8;

As представляет собой гидрофильное структурное звено;

хиральные атомы углерода в положении 1, положении 2 и положении 3 характеризуются двумя хиральными конфигурациями, абсолютной R-конфигурацией или абсолютной S-конфигурацией;

R выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-C8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, C6-C10арила, замещенного C6-C10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно R выбран из атома водорода или C1-Сбалкильной группы;

$R_1$  выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-C8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, карбоксила, 3-7-членного гетероциклила, замещенного 3-7-членного гетероциклила, C6-C10арила, замещенного C6-C10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно  $R_1$  выбран из атома водорода или C1-Сбалкильной группы;

более предпочтительно  $R_1$  выбран из C1-Сбалкила;

$R_2$  выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-C8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, карбоксила, 3-7-членного гетероциклила, замещенного 3-7-членного гетероциклила, C6-C10арила, замещенного C6-C10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно  $R_2$  выбран из атома водорода, галогена или C1-Сбалкильной группы;

более предпочтительно  $R_2$  выбран из галогена;

X выбран из  $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-O-$ ,  $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-NH-$  или  $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-S-$ ;

предпочтительно X выбран из  $-C(O)-CR_aR_b-(CR_3R_4)_m-O-$ ;

каждый из  $R_a$  и  $R_b$  независимо выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, галогенированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкила, C3-С8циклоалкил-С1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-С1-Сбалкила, 3-7-членной гетероциклической группы, замещенной 3-7-членной гетероциклической группы, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно каждый из  $R_a$  и  $R_b$  независимо выбран из атома водорода, C1-Сбалкила, галоген-С1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-С1-Сбалкила или C6-С10арил-С1-Сбалкила;

в качестве альтернативы  $R_a$ ,  $R_b$  и атомы углерода, к которым они присоединены, образуют C3-С8циклоалкильную группу, C3-С8циклоалкил-С1-Сбалкильную группу, 3-7-членную гетероциклическую группу или замещенную 3-7-членную гетероциклическую группу; предпочтительно  $R_a$ ,  $R_b$  и атомы углерода, к которым они присоединены, образуют C3-С8циклоалкильную группу;

$R_3$  и  $R_4$  являются идентичными или разными, и каждый из них независимо представляет собой атом водорода, атом дейтерия, галоген, C1-Сбалкил, галогенированный C1-Сбалкил, дейтерированный C1-Сбалкил, C1-Сбалкокси, гидроксил, амино, циано, нитро, гидрокси-С1-Сбалкил, C3-С8циклоалкил, 3-7-членный гетероциклил или замещенный 3-7-членный гетероциклил;

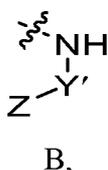
предпочтительно каждый из  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляет собой атом водорода или C1-Сбалкильную группу;

в качестве альтернативы  $R_3$ ,  $R_4$  и атомы углерода, присоединенные к ним, образуют C3-С8циклоалкильную группу, C3-С8циклоалкил-С1-Сбалкильную группу, 3-7-членную гетероциклическую группу или замещенную 3-7-членную гетероциклическую группу;

$m$  выбран из целых чисел 0-4, предпочтительно 0, 1;

$n$  выбран из целых чисел 1-10.

28. Конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-27, где  $Ac$  имеет структуру, представленную формулой В ниже,



где

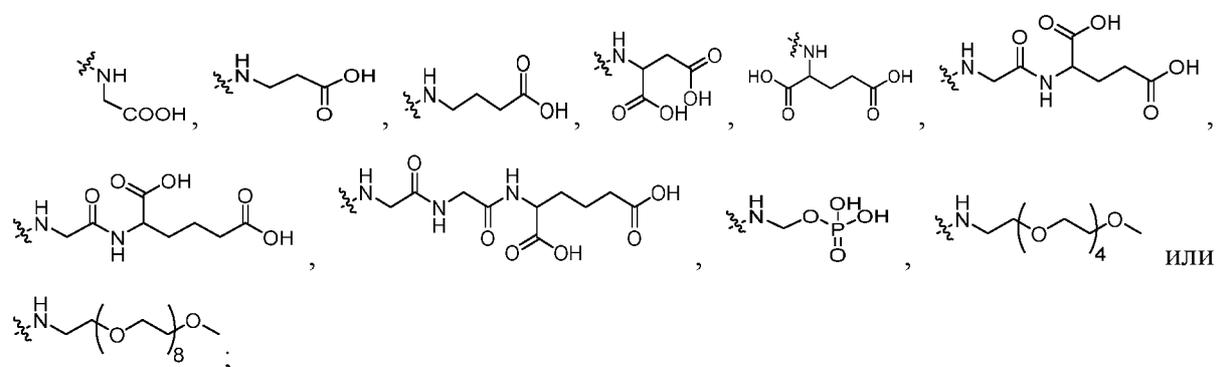
Z выбран без ограничения из группы, состоящей из одного или нескольких из гидрофильной структурной карбоксильной группы, фосфорной кислоты, полифосфорной кислоты, фосфористой кислоты, сульфоновой кислоты, сульфоновой кислоты или полиэтиленгликоля (PEG);

предпочтительно Z выбран из гидрофильной структурной карбоксильной группы, фосфорной кислоты или полиэтиленгликоля (PEG);

Y' представляет собой необязательный остов, соединяющий аминогруппу с Z; предпочтительно Y' представляет собой C1-Сбалкил;

As связано с атомом углерода в положении 2, отмеченном в структурной формуле I, посредством остова Y.

29. Конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-28, где As выбрано без ограничения из глицина, (D/L) аланина, (D/L) лейцина, (D/L) изолейцина, (D/L) валина, (D/L) фенилаланина, (D/L) пролина, (D/L) триптофана, (D/L) серина, (D/L) тирозина, (D/L) цистеина, (D/L) цистина, (D/L) аргинина, (D/L) гистидина, (D/L) метионина, (D/L) аспарагина, (D/L) глутамина, (D/L) треонина, (D/L) аспарагиновой кислоты, (D/L) глутаминовой кислоты, природных или неприродных производных аминокислот или следующих структур или их изомеров,

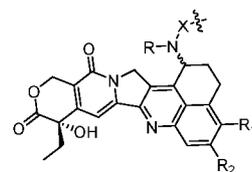


предпочтительно  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$  или  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_8$ .

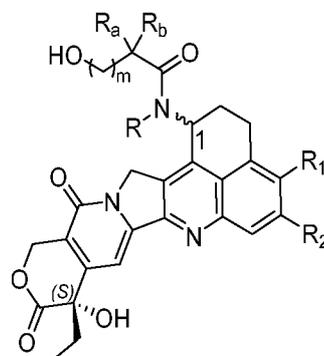
30. Конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-29, где As выбрано без ограничения из глицина, фосфорной кислоты, (D/L) глутаминовой кислоты или гидрофильной структуры на основе полиэтиленгликоля.

31. Конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически

приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-30, где структуру, представленную формулой d ниже;



имеет



d,

где

R выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно R выбран из атома водорода или C1-Сбалкильной группы;

R<sub>1</sub> выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, карбоксила, 3-7-членного гетероциклила, замещенного 3-7-членного гетероциклила, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно R<sub>1</sub> выбран из атома водорода или C1-Сбалкильной группы;

более предпочтительно R<sub>1</sub> выбран из C1-Сбалкила;

R<sub>2</sub> выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, карбоксила, 3-7-членного гетероциклила, замещенного 3-7-членного гетероциклила, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

предпочтительно R<sub>2</sub> выбран из атома водорода, галогена или C1-Сбалкильной группы;

более предпочтительно R<sub>2</sub> выбран из галогена;

каждый из  $R_a$  и  $R_b$  независимо выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, галогенированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, 3-7-членной гетероциклической группы, замещенной 3-7-членной гетероциклической группы, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

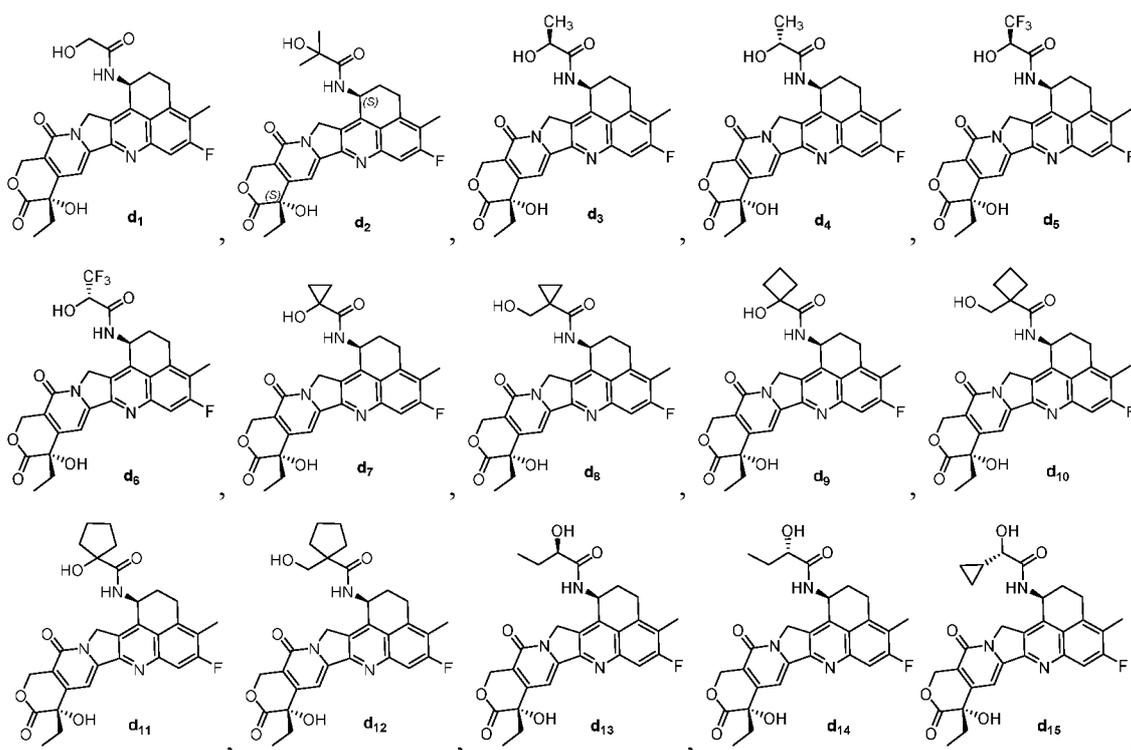
предпочтительно каждый из  $R_a$  и  $R_b$  независимо выбран из атома водорода, C1-Сбалкильной группы, галоген-C1-Сбалкильной группы, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкильной группы и C6-С10арильной группы;

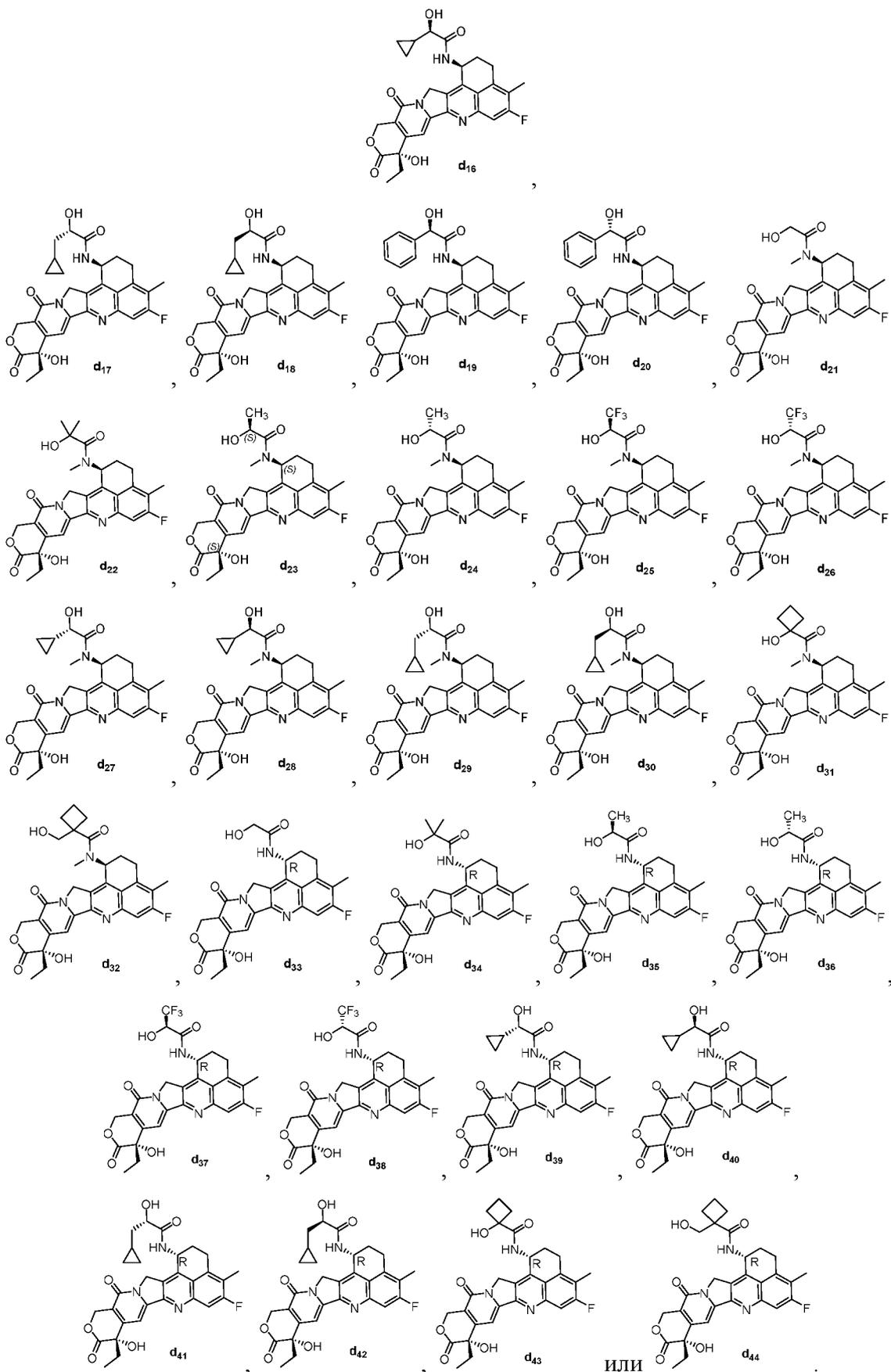
в качестве альтернативы  $R_a$ ,  $R_b$  и атомы углерода, с которыми они соединены, образуют C3-С8циклоалкильную группу, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкильную группу, 3-7-членную гетероциклическую группу или замещенную 3-7-членную гетероциклическую группу; предпочтительно  $R_a$ ,  $R_b$  и атомы углерода, с которыми они связаны, образуют C3-С8циклоалкильную группу;

хиральный атом углерода в положении 1 характеризуется двумя хиральными конфигурациями, абсолютной R-конфигурацией или абсолютной S-конфигурацией;

$m$  выбран из 0 или 1.

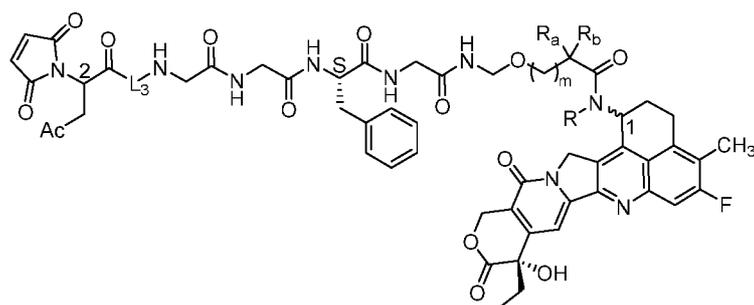
32. Конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-31, где структурная формула  $d$  выбрана без ограничения из следующих соединений:





33. Соединение линкер-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, характеризующиеся наличием структуры,

представленной формулой III ниже,



III,

где

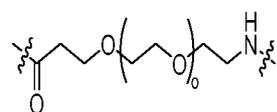
R выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, замещенного C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

R<sub>a</sub> выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, галогенированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, 3-7-членной гетероциклической группы, замещенной 3-7-членной гетероциклической группы, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

R<sub>b</sub> выбран из атома водорода, атома дейтерия, галогена, C1-Сбалкила, дейтерированного C1-Сбалкила, галогенированного C1-Сбалкила, C3-С8циклоалкила, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкила, C1-Сбалкокси-C1-Сбалкила, 3-7-членной гетероциклической группы, замещенной 3-7-членной гетероциклической группы, C6-С10арила, замещенного C6-С10арила, 5-10-членного гетероарила и замещенного 5-10-членного гетероарила;

в качестве альтернативы R<sub>a</sub>, R<sub>b</sub> и атомы углерода, присоединенные к ним, образуют C3-С8циклоалкильную группу, C3-С8циклоалкил-C1-Сбалкильную группу, 3-7-членную гетероциклическую группу или замещенную 3-7-членную гетероциклическую группу;

L<sub>3</sub> присутствует или отсутствует, и, если L<sub>3</sub> присутствует, он выбран из



, o выбран из целых чисел от 1 до 10;

хиральный атом углерода в положении 1 или положении 2 характеризуется двумя хиральностями, абсолютной R-конфигурацией или абсолютной S-конфигурацией;

As представляет собой гидрофильное структурное звено;

m выбран из 0 или 1.

34. Соединение линкер-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по п. 33, где As имеет структуру, представленную формулой B ниже:



B,

где

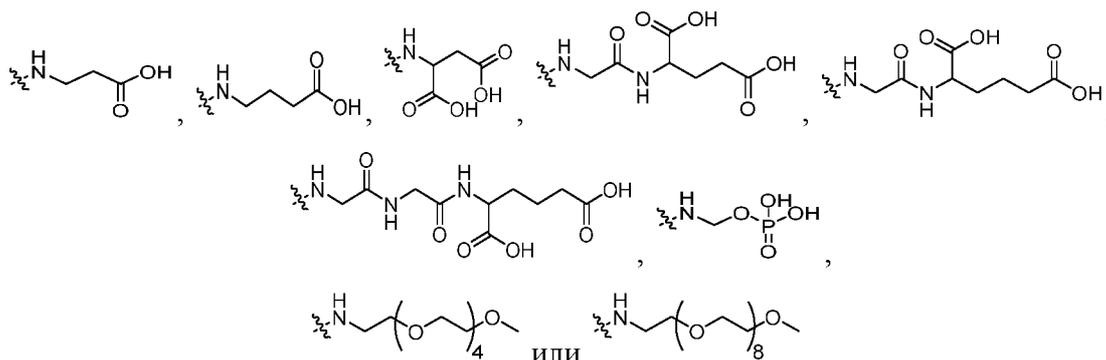
Z выбран без ограничения из группы, состоящей из одного или нескольких из гидрофильной структурной карбоксильной группы, фосфорной кислоты, полифосфорной кислоты, фосфористой кислоты, сульфоновой кислоты, сульфоновой кислоты или полиэтиленгликоля (PEG);

Y' представляет собой необязательный остов, связывающий аминогруппу и Z;

As соединено с углеродом в положении 2, помеченным на структурной формуле I, с помощью остова Y;

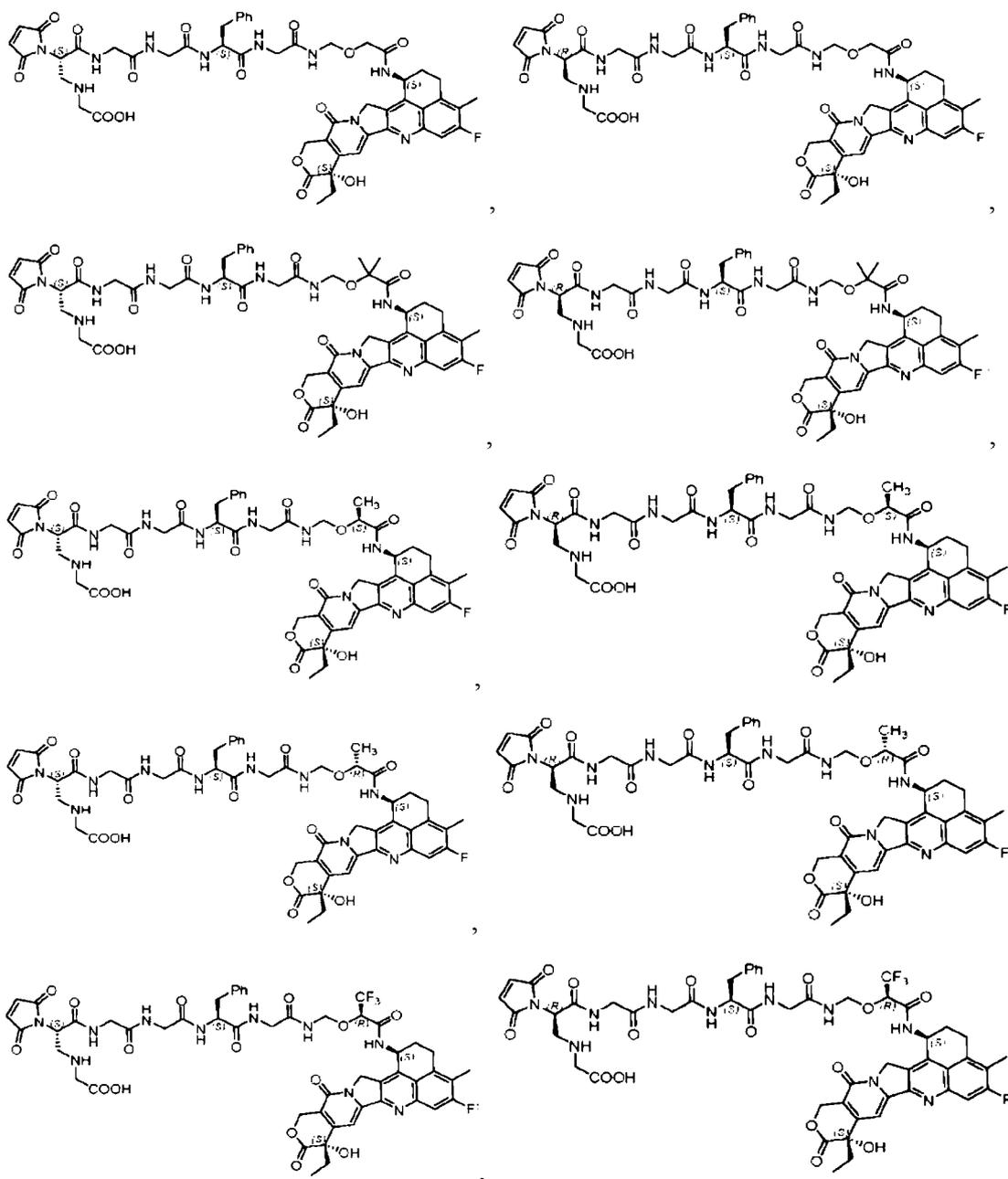
предпочтительно соединение линкер-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемые соль или сольват применяются для сочетания с Аб-лигандом с образованием конъюгата лиганд-производное камптотецина формулы I или формулы II по любому из пп. 1-32.

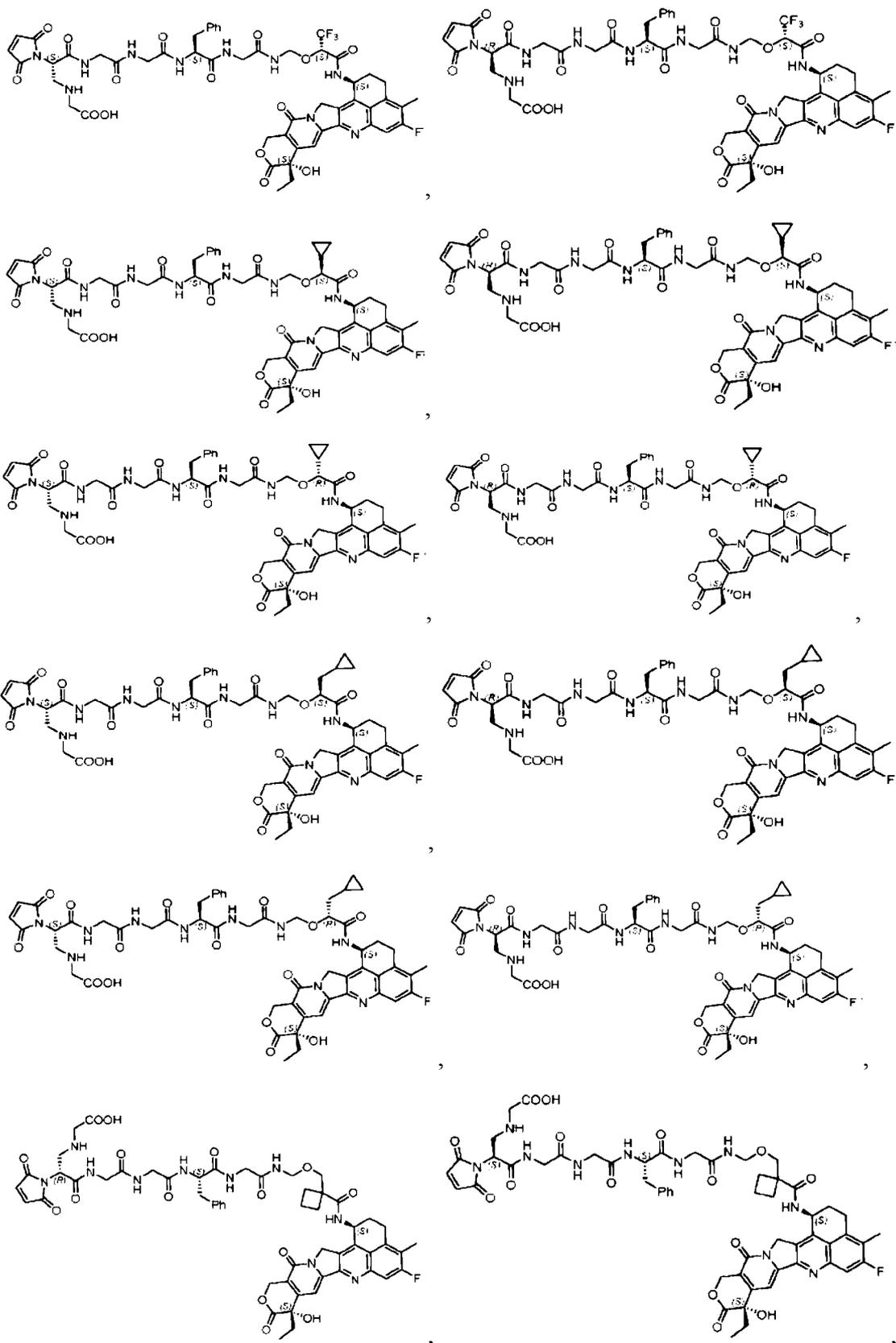
35. Соединение линкер-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по п. 33 или п. 34, где As выбрано без ограничения из глицина, (D/L) аланина, (D/L) лейцина, (D/L) изолейцина, (D/L) валина, (D/L) фенилаланина, (D/L) пролина, (D/L) триптофана, (D/L) серина, (D/L) тирозина, (D/L) цистеина, (D/L) цистина, (D/L) аргинина, (D/L) гистидина, (D/L) метионина, (D/L) аспарагина, (D/L) глутамина, (D/L) треонина, (D/L) аспарагиновой кислоты, (D/L) глутаминовой кислоты, природных или не природных производных аминокислот или следующих структур,

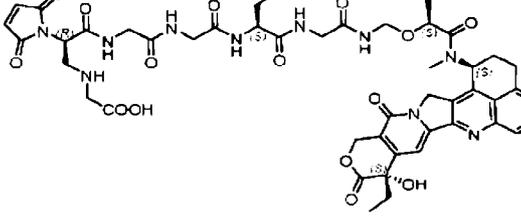
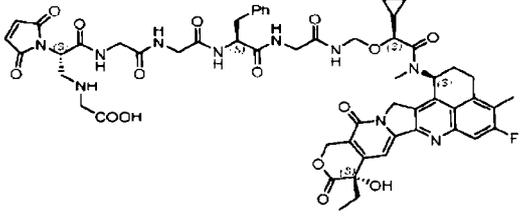
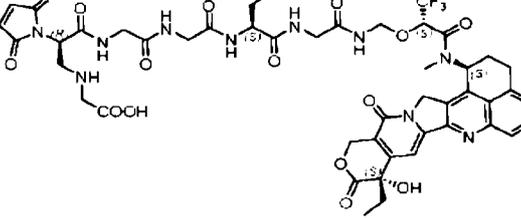
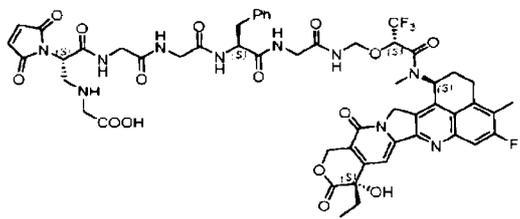
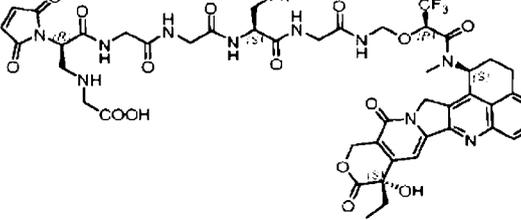
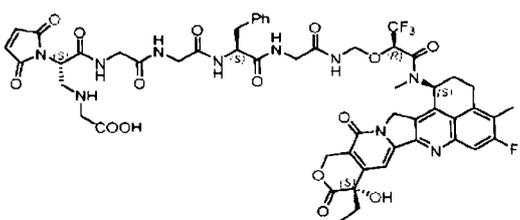
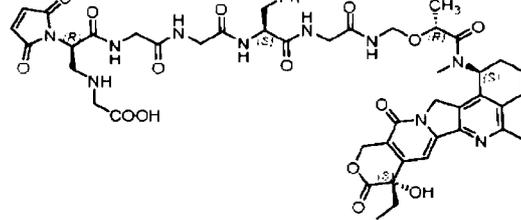
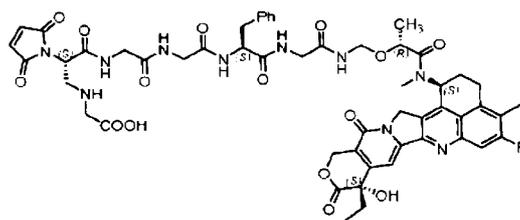
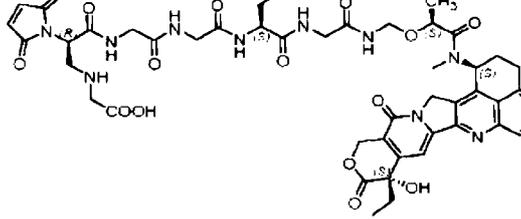
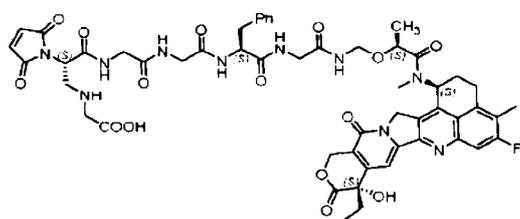
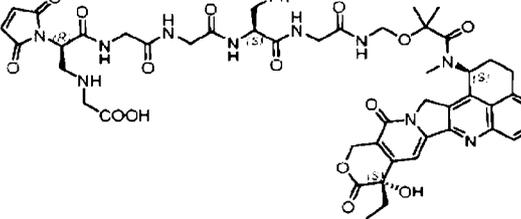
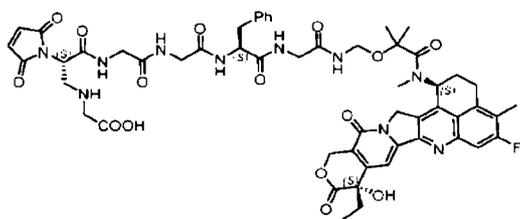
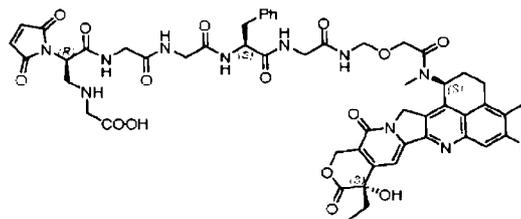
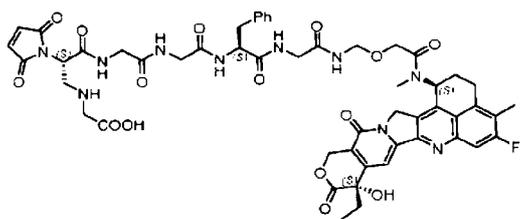


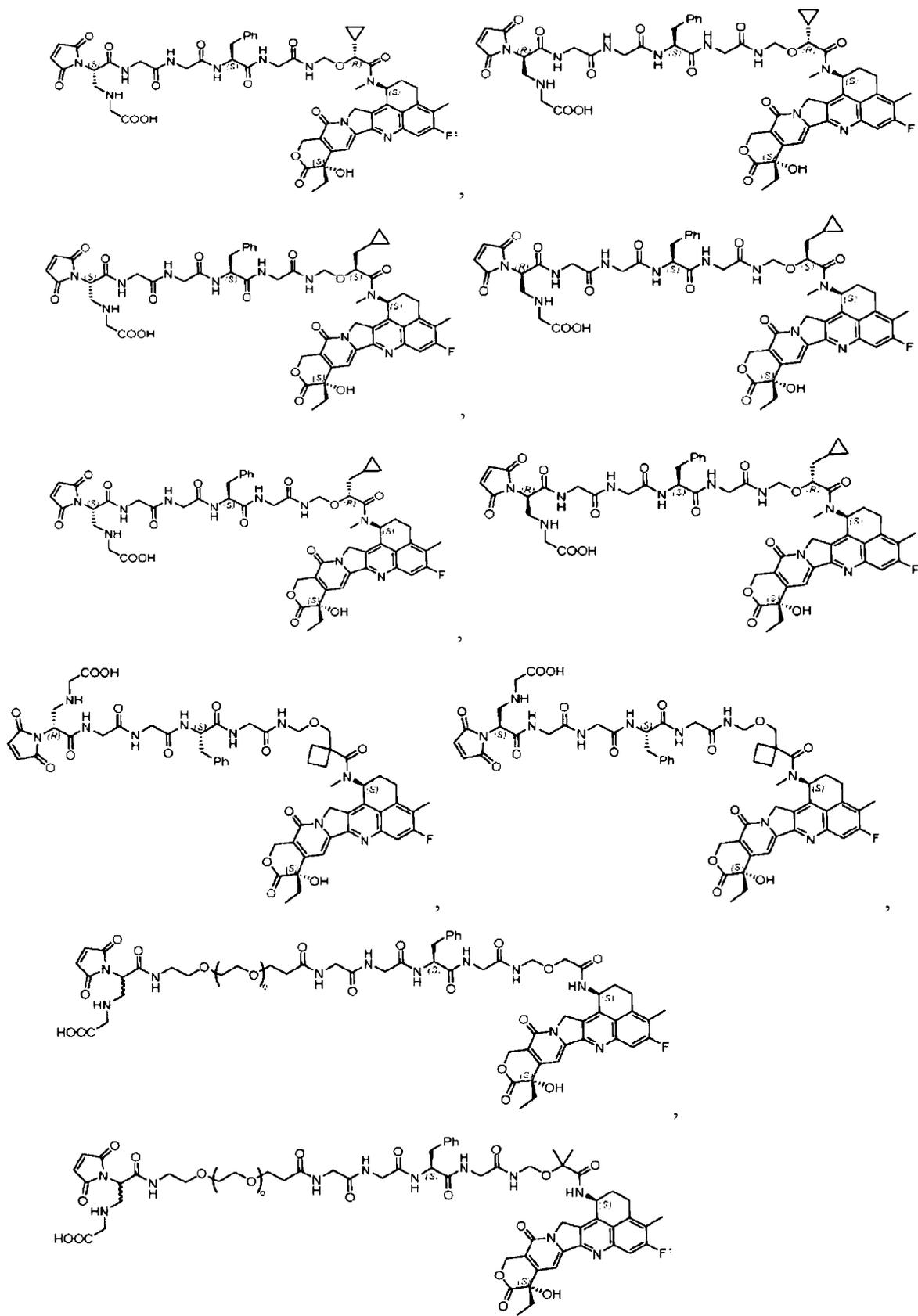
36. Соединение линкер-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 33-35, где Ас выбрано без ограничения из глицина, фосфорной кислоты, (*D/L*) глутаминовой кислоты или гидрофильной структуры на основе полиэтиленгликоля.

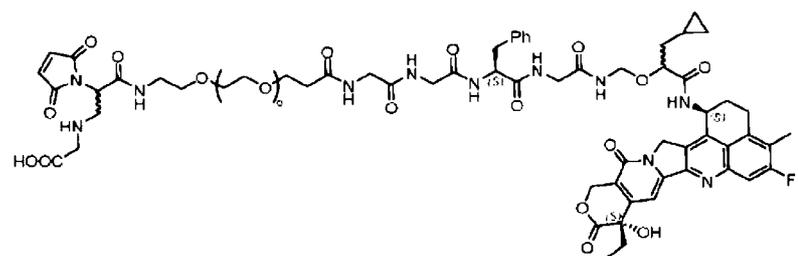
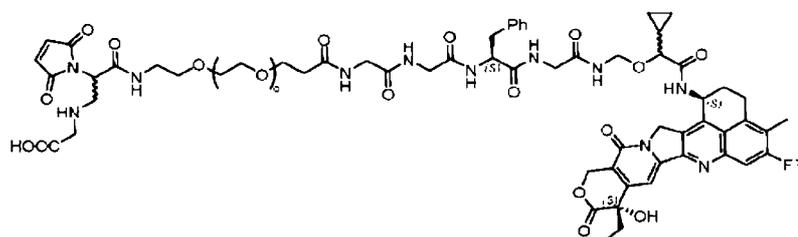
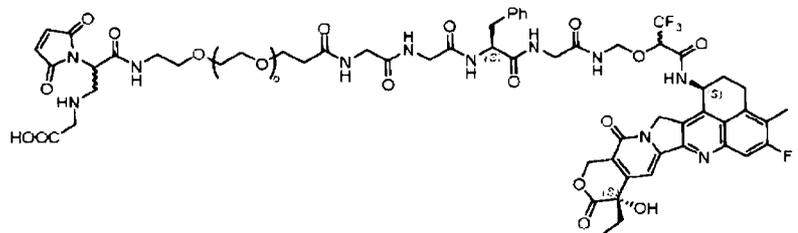
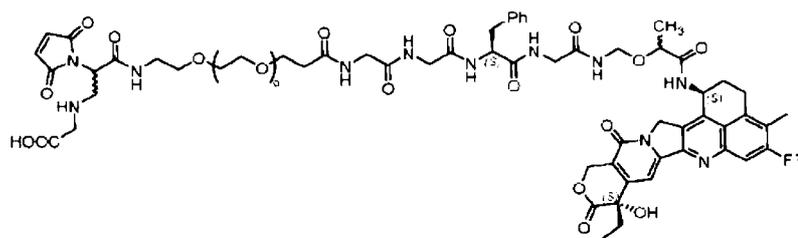
37. Соединение линкер-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 33-36, где соединение линкер-лекарственное средство выбрано без ограничения из следующих структур или их изомеров,



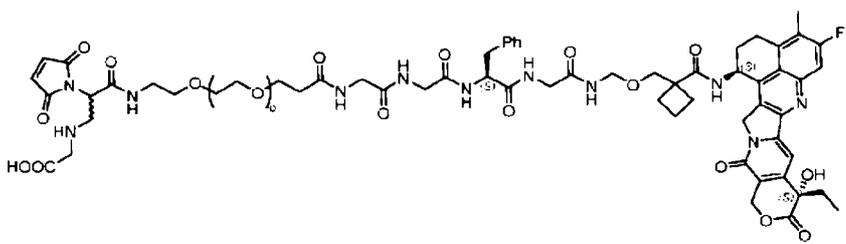






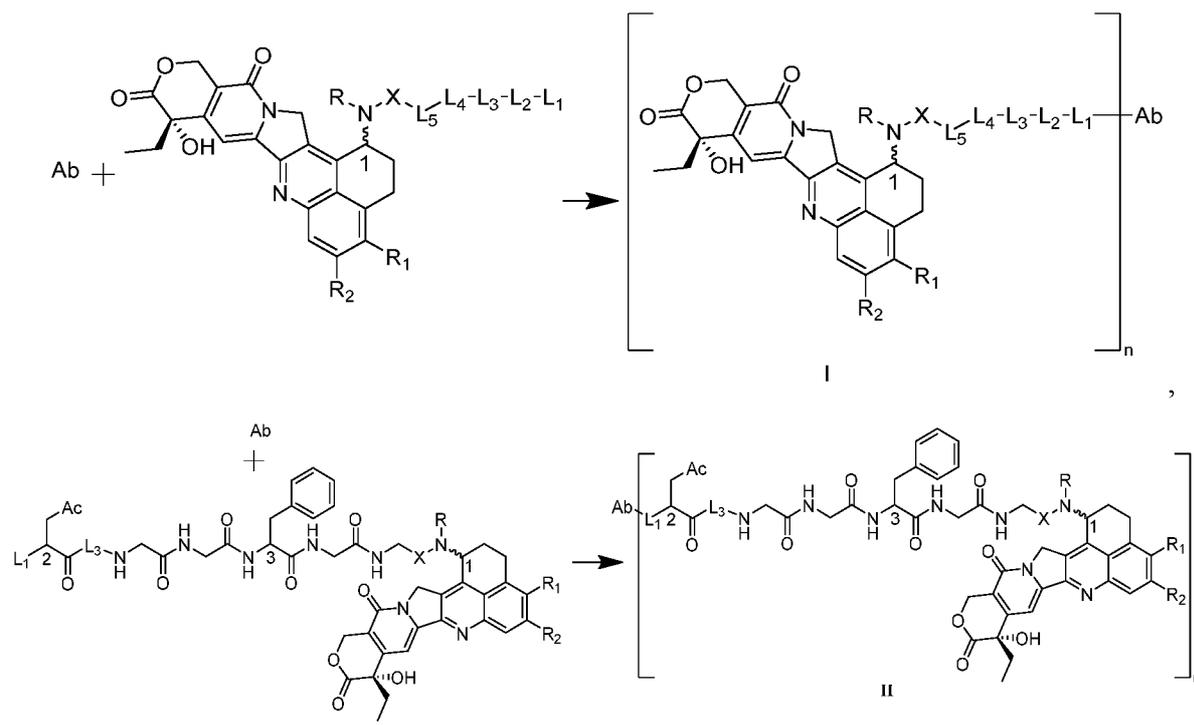


ИЛИ



где  $o$  выбран из целых чисел 1-10.

38. Способ получения конъюгата лиганд-производное камптотецина, представленного общей формулой I или общей формулой II, или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата, характеризующийся наличием следующих стадий:

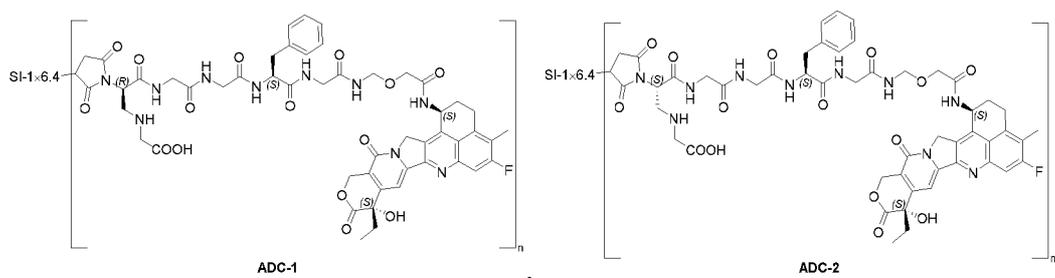


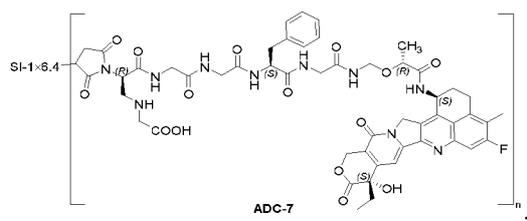
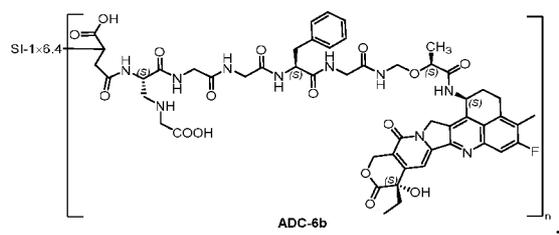
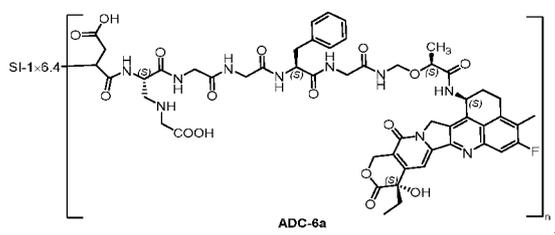
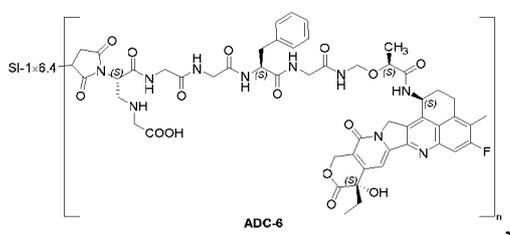
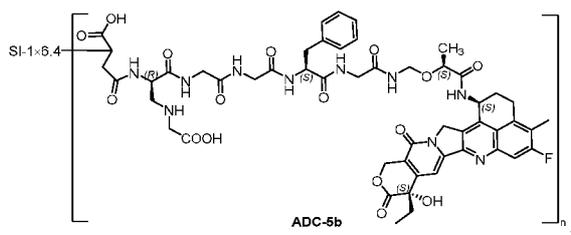
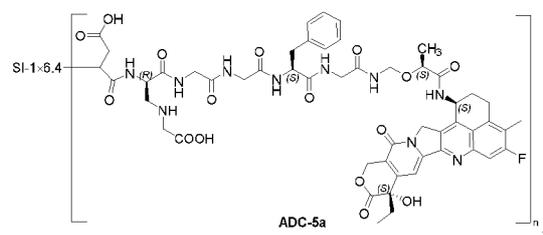
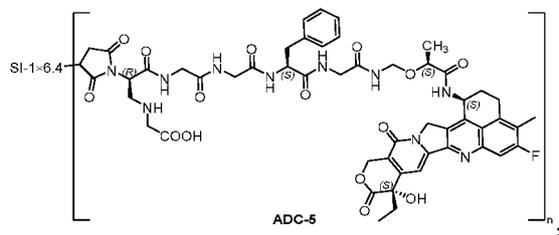
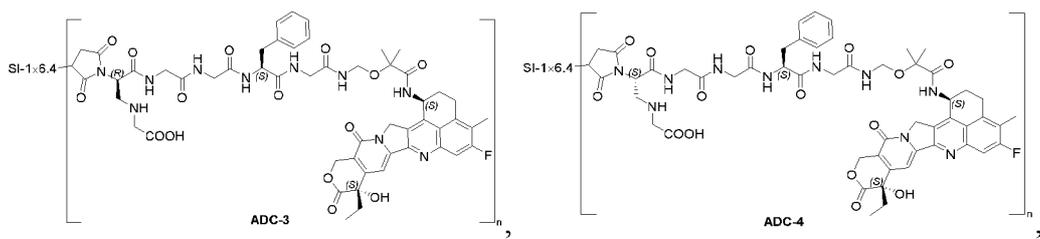
при этом конъюгат лиганд-производное камптотецина, представленный общей формулой I или общей формулой II, получают посредством реакции сочетания восстановленного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с соединением линкер-лекарственное средство;

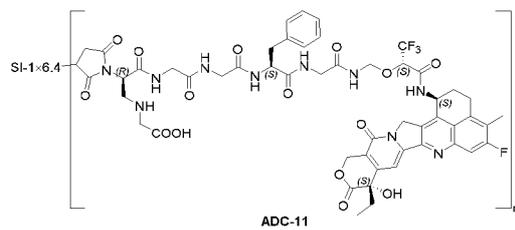
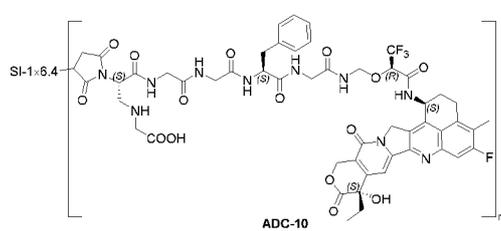
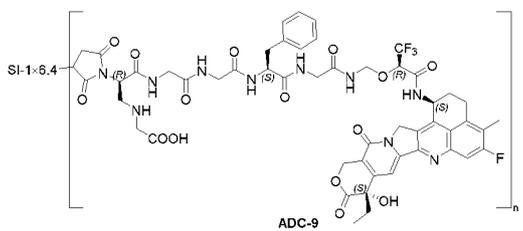
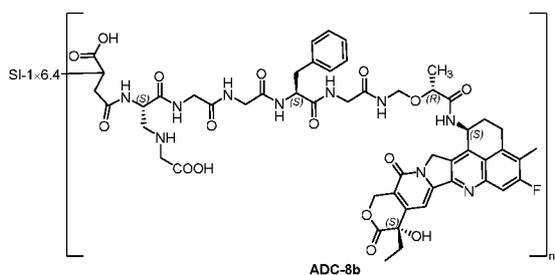
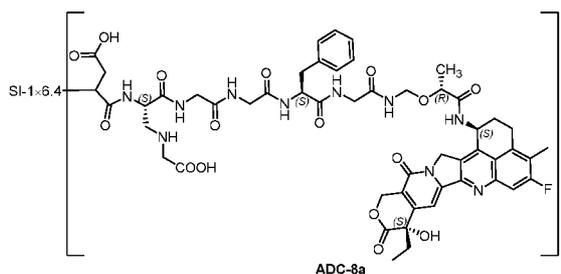
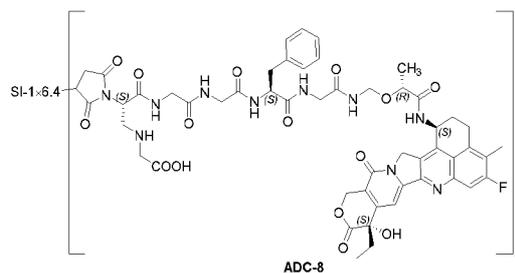
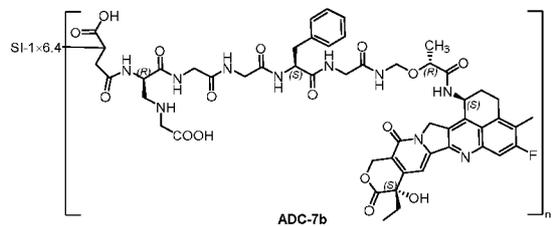
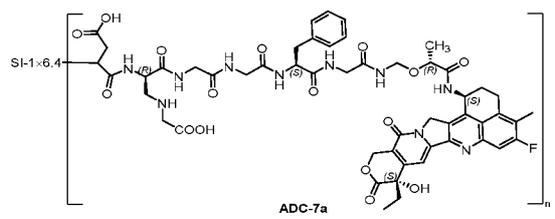
хиральный атом углерода в положении 1, положении 2 или положении 3 характеризуется абсолютной хиральностью в R-конфигурации или S-конфигурации;

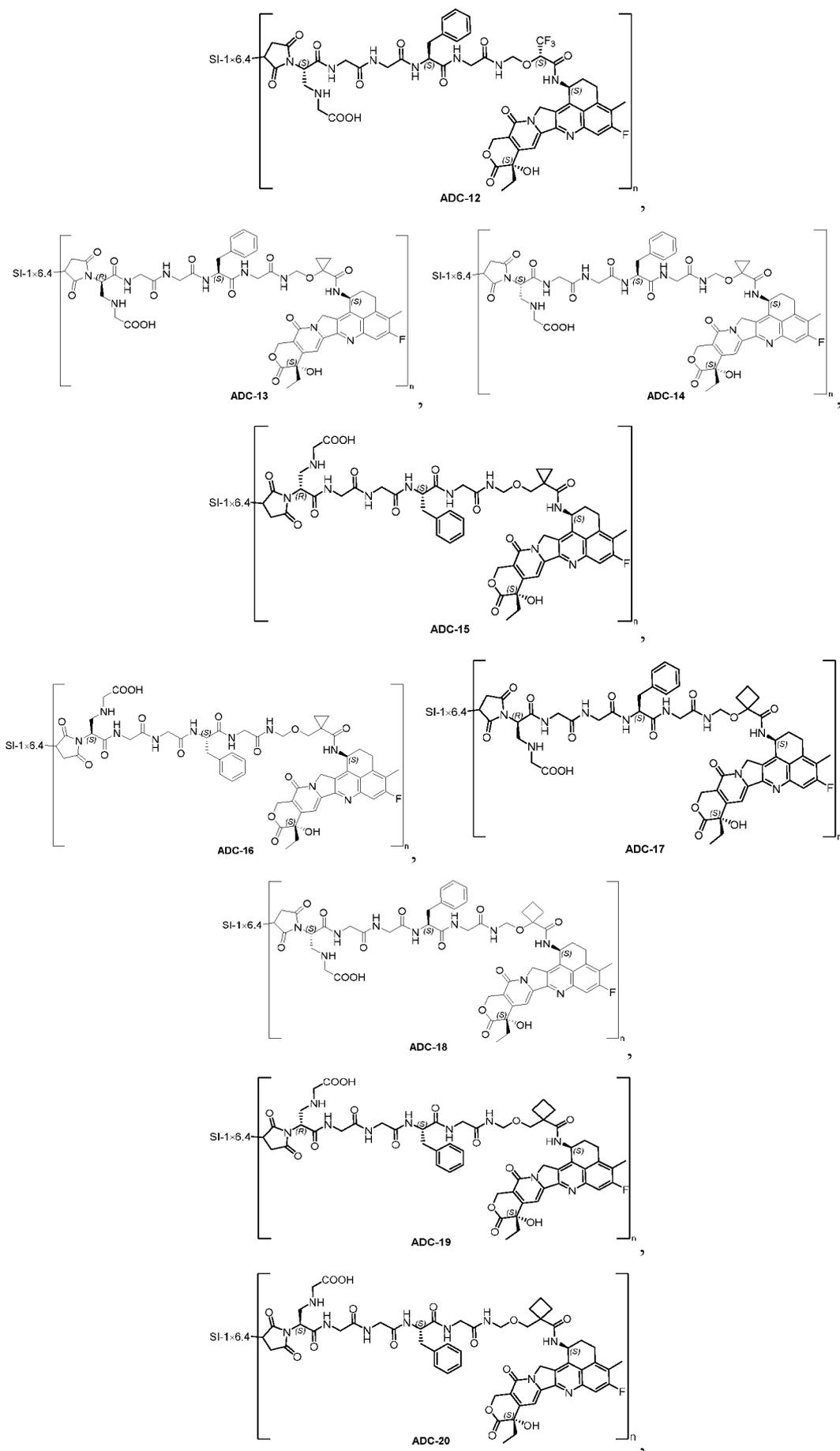
Ab, L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub>, X, R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> и n являются такими, как описано в любом из пп. 1-37.

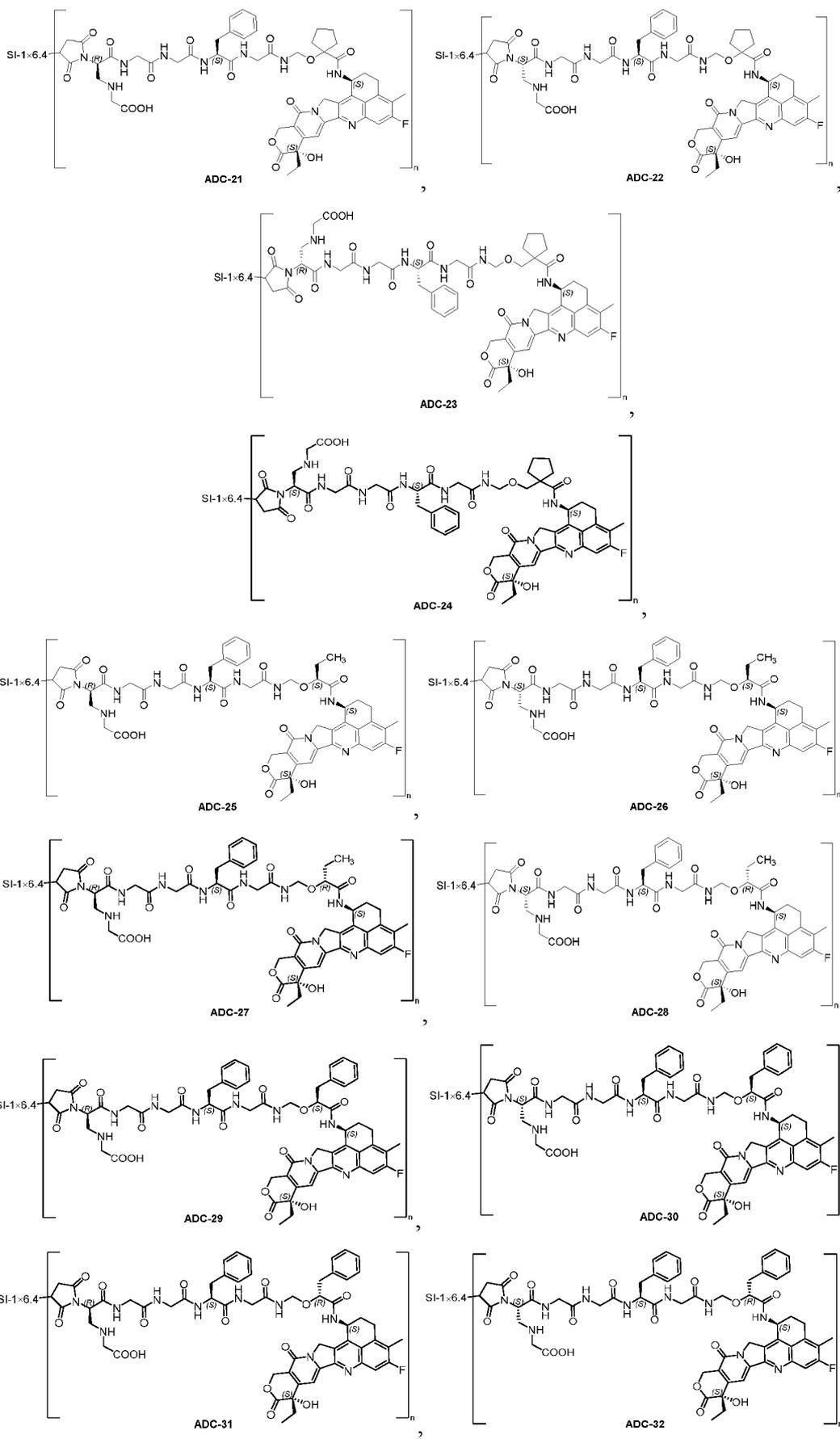
39. Конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-32 или способ по п. 38, где конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват выбраны без ограничения из следующих структур, или структур с сукцинимидным открытым кольцом на их основе, или их изомеров,

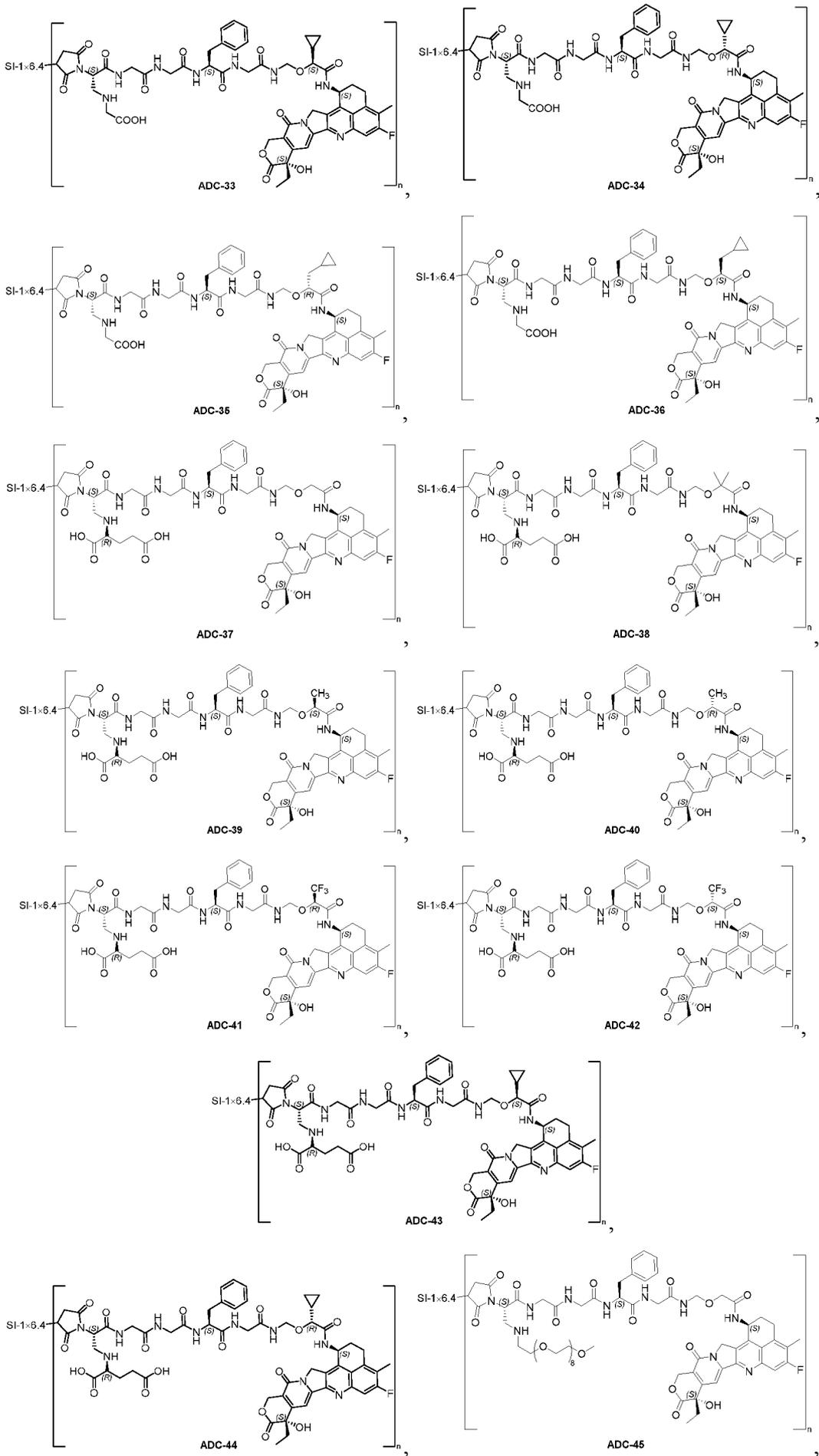


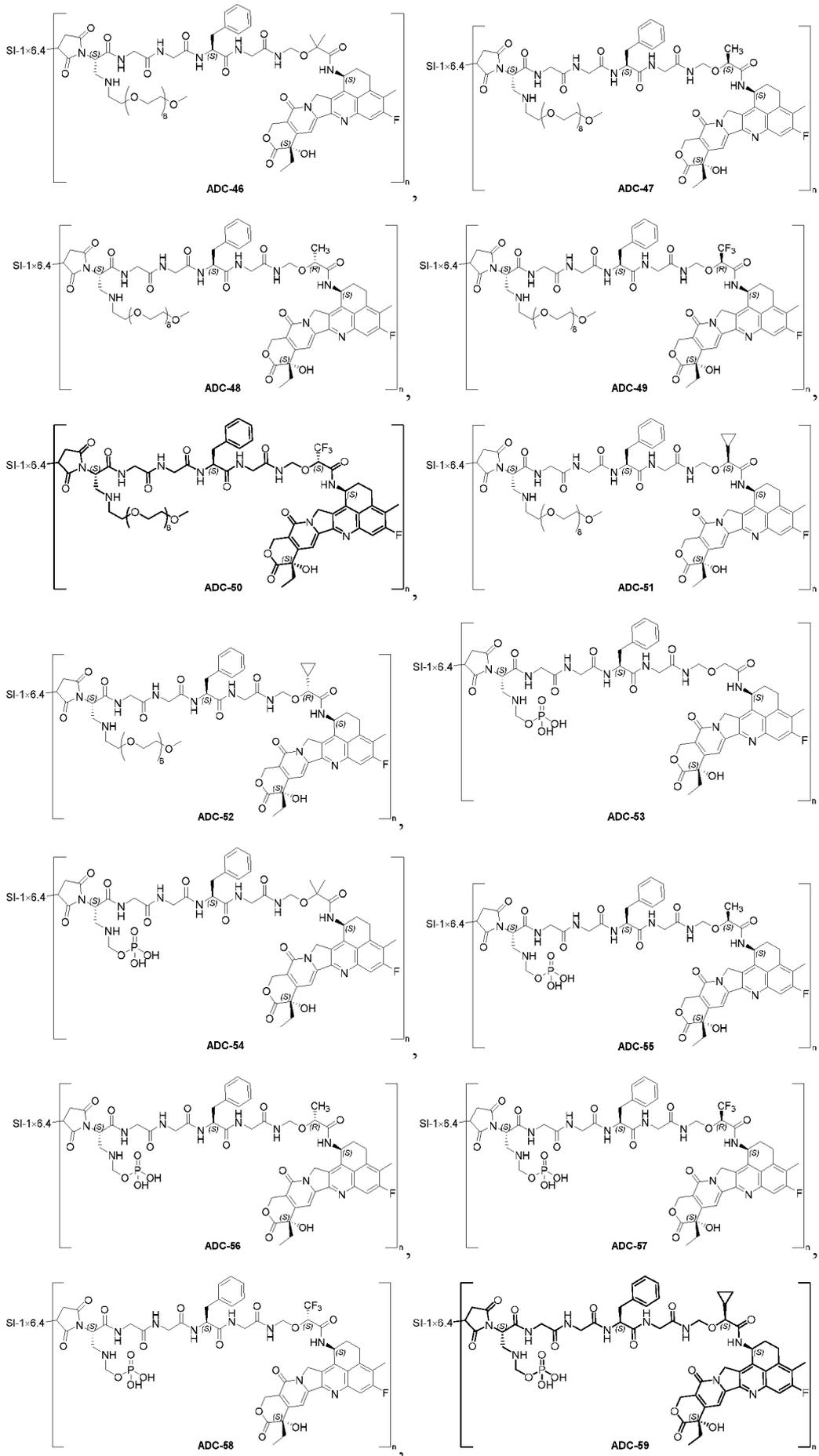


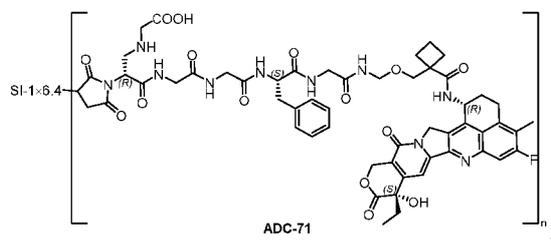
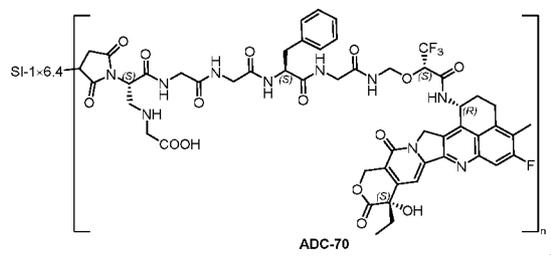
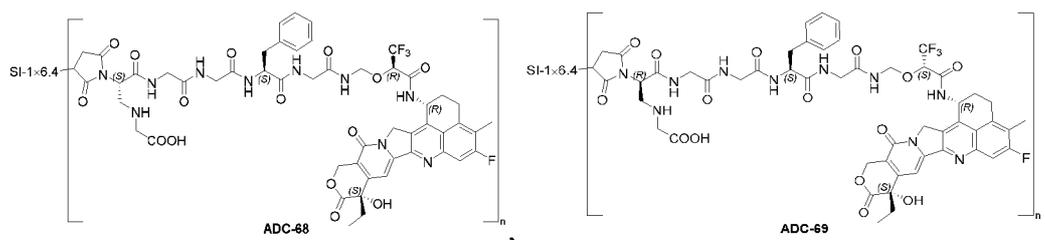
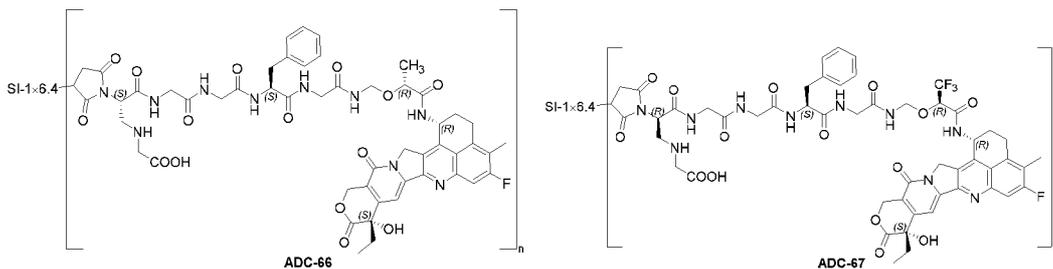
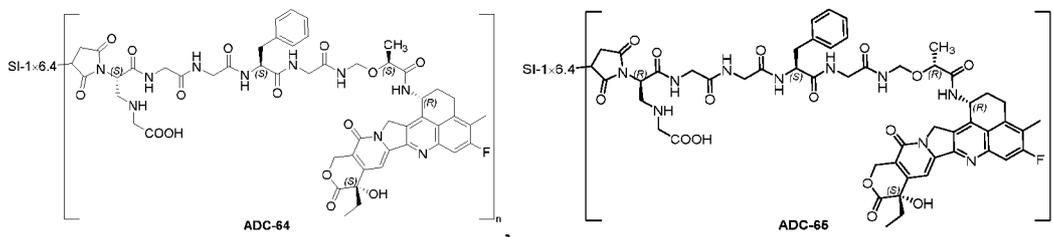
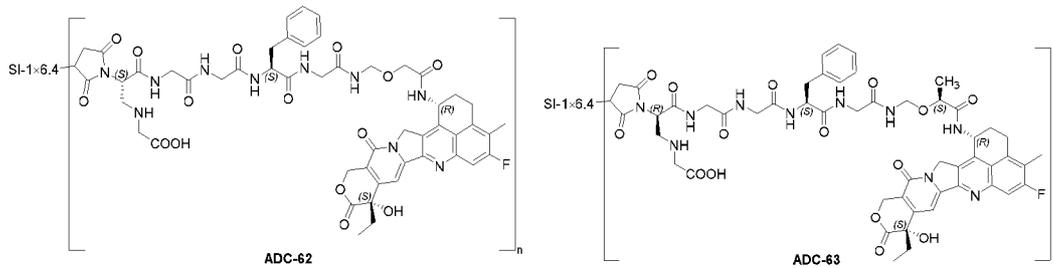
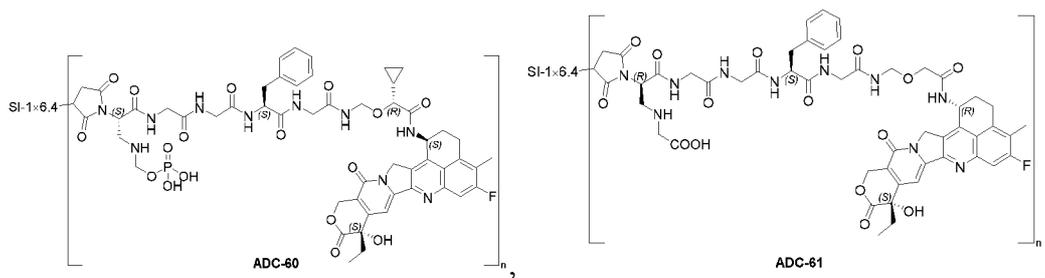


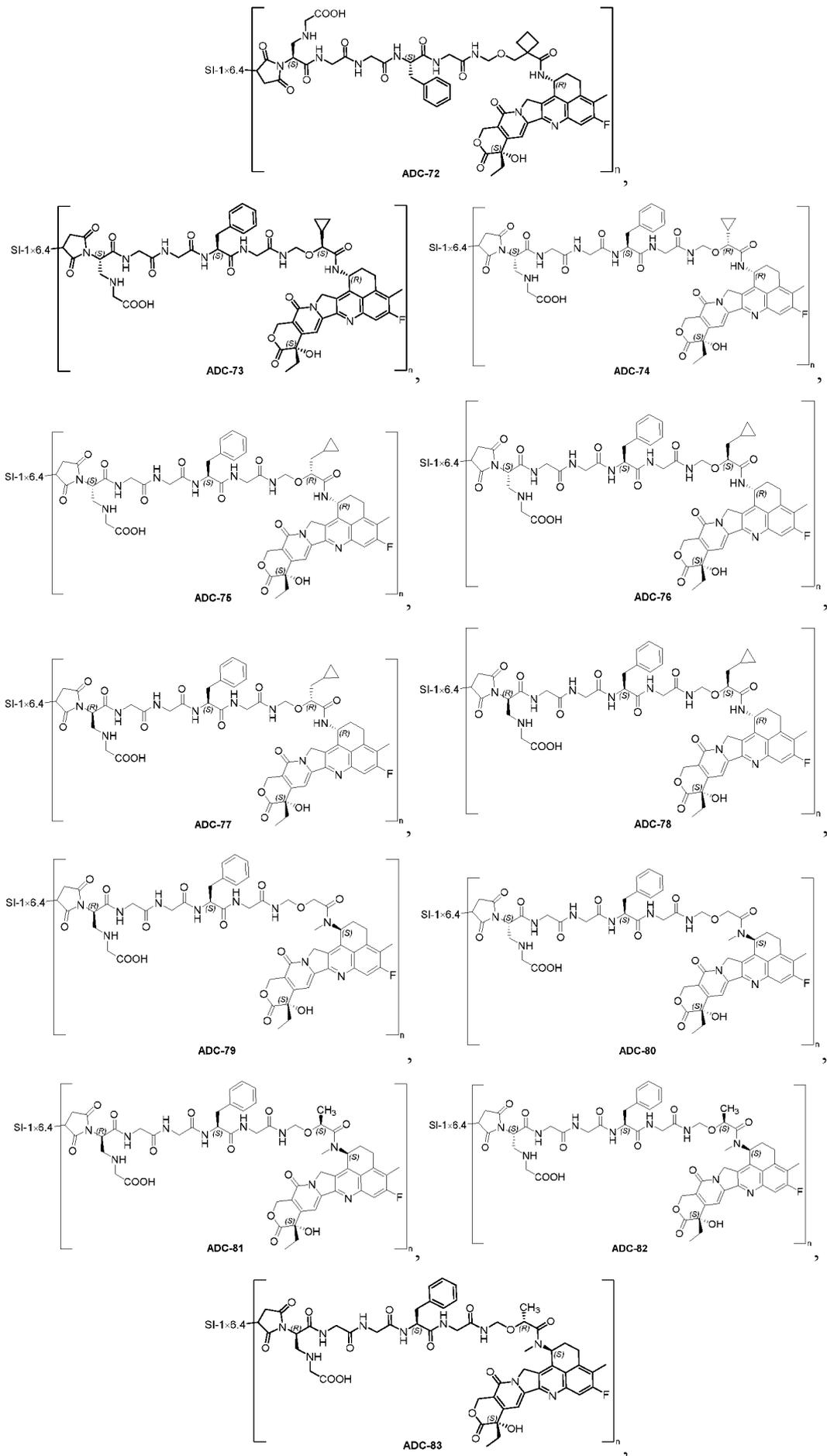


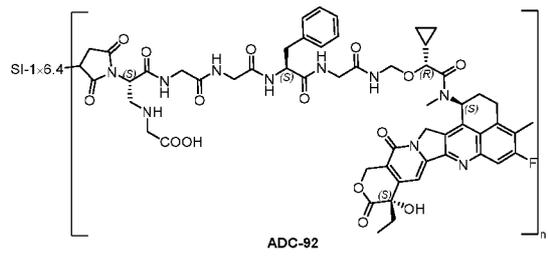
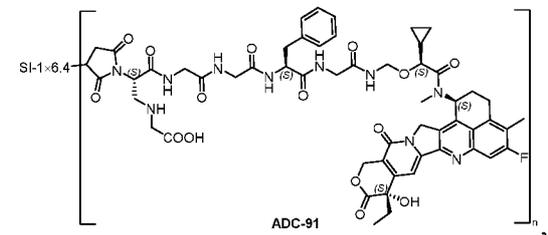
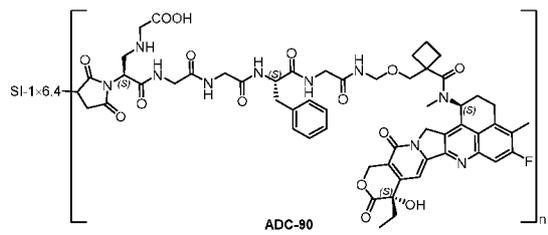
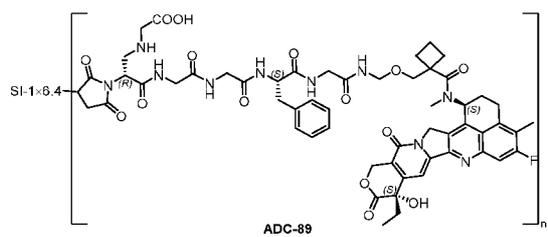
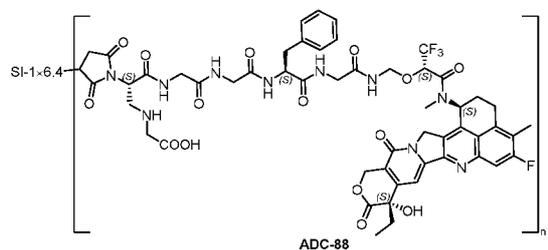
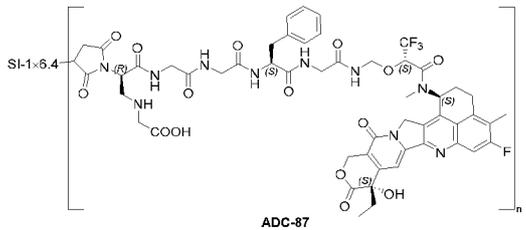
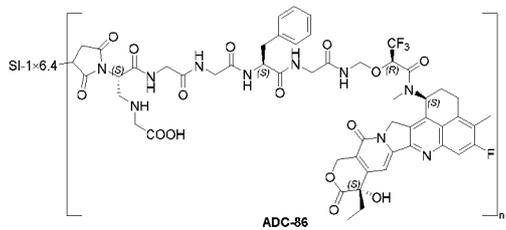
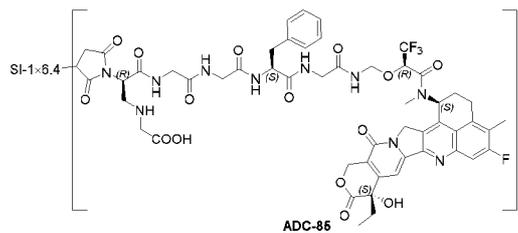
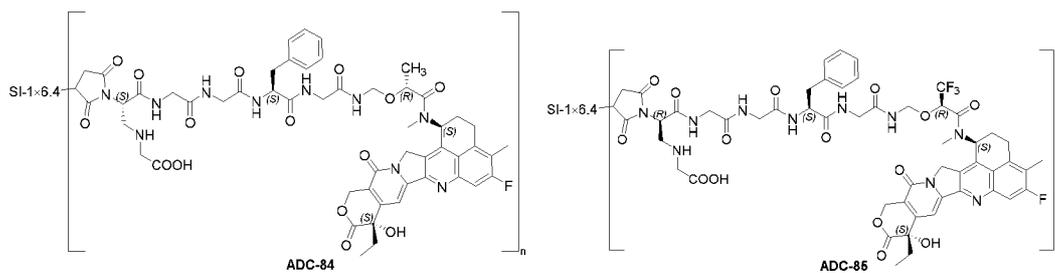


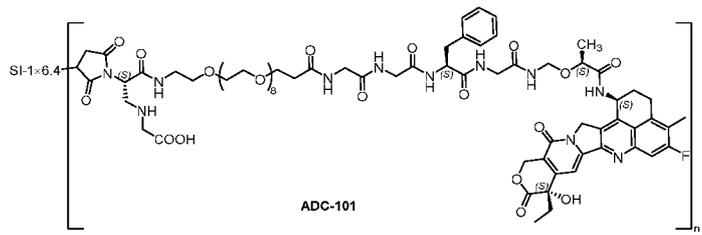
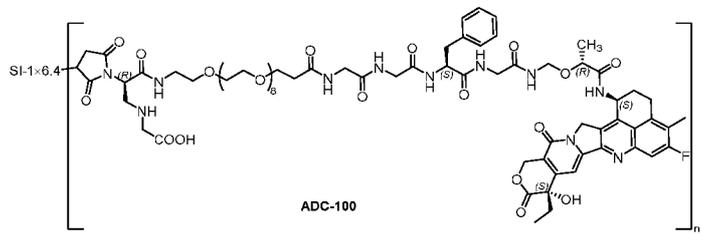
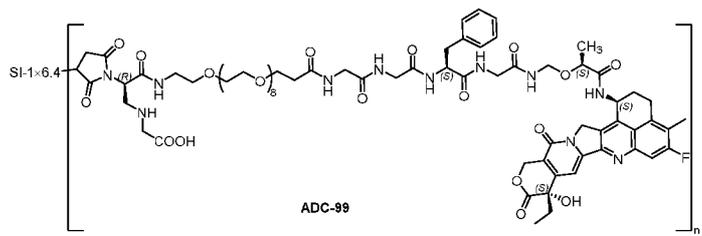
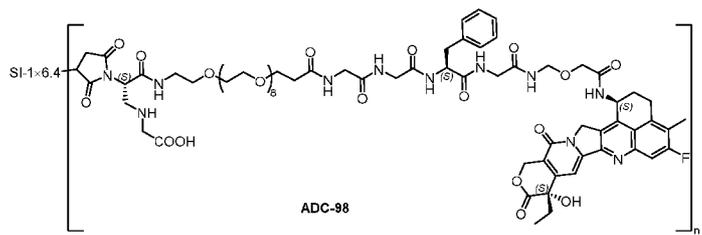
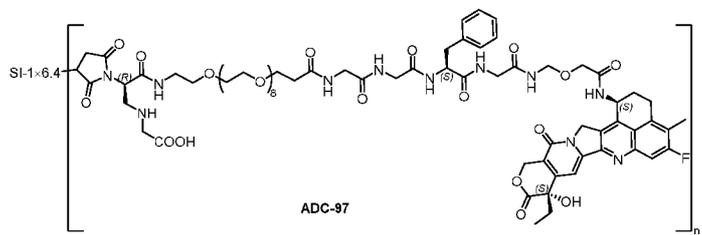
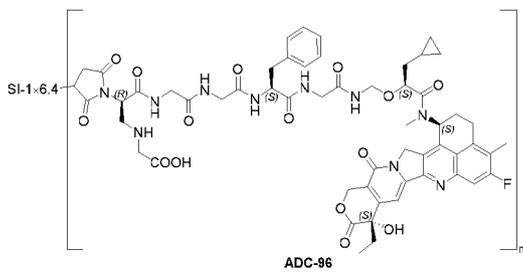
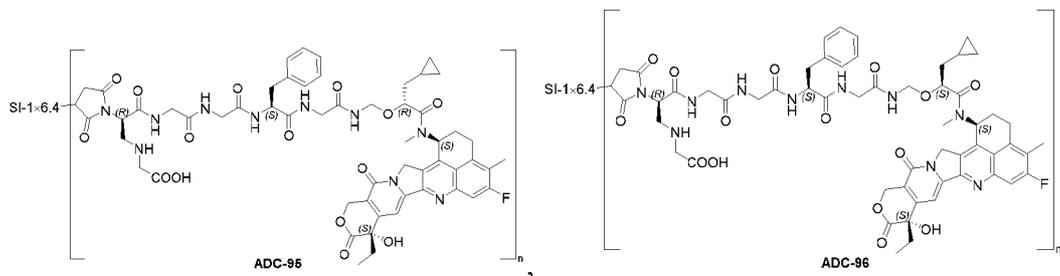
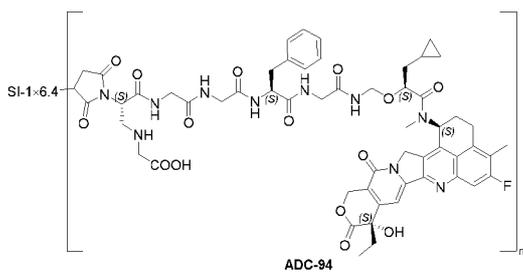
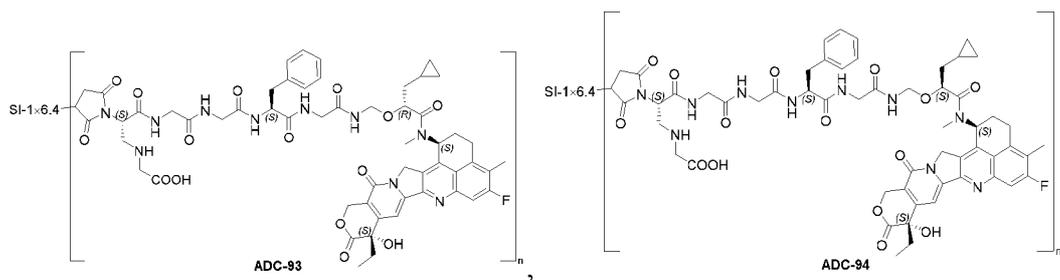


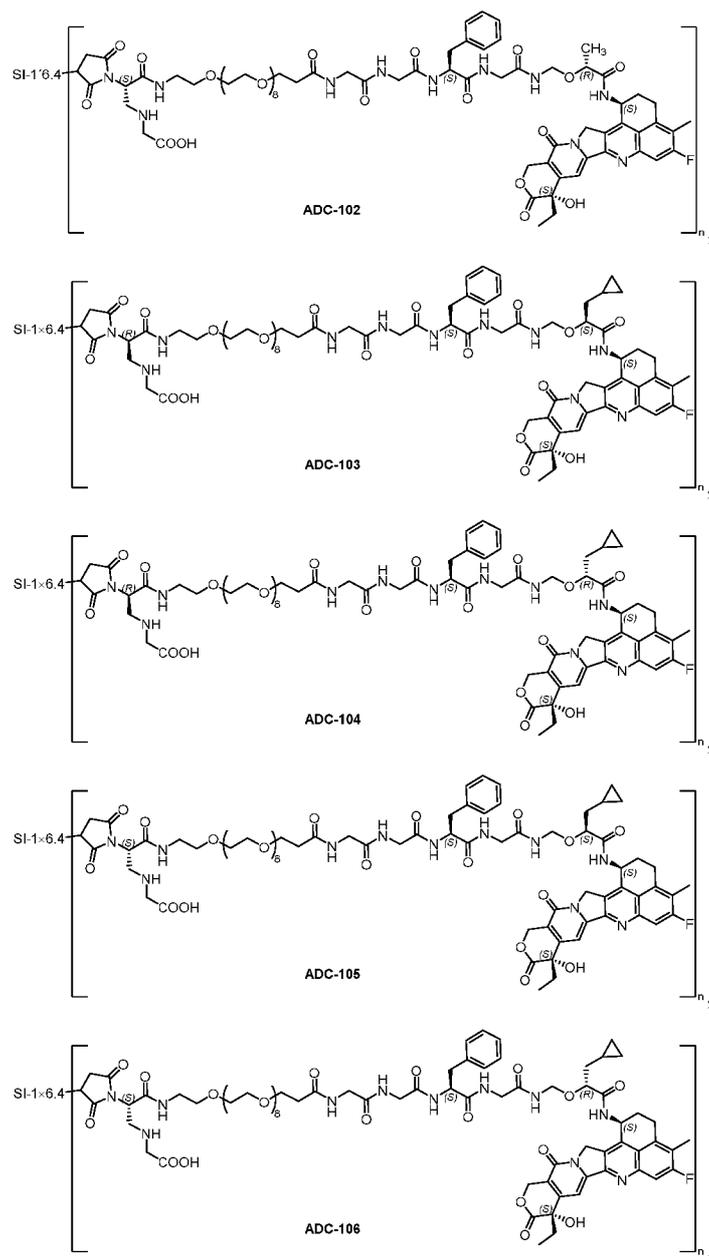










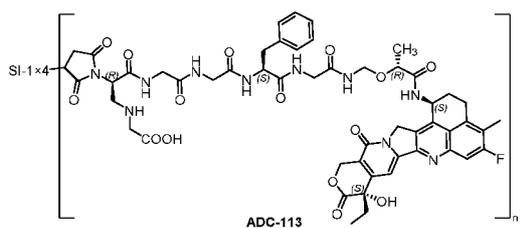
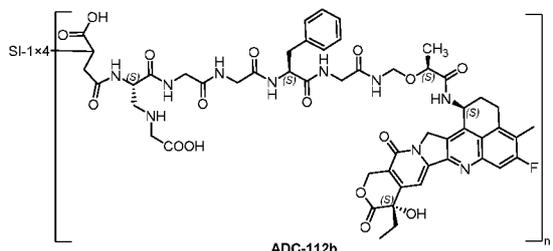
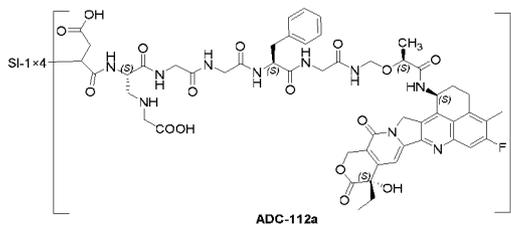
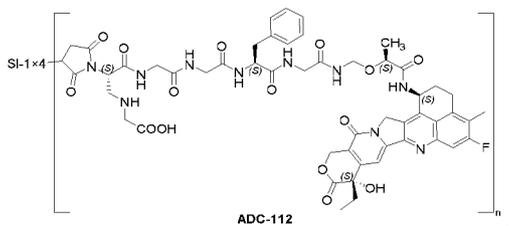
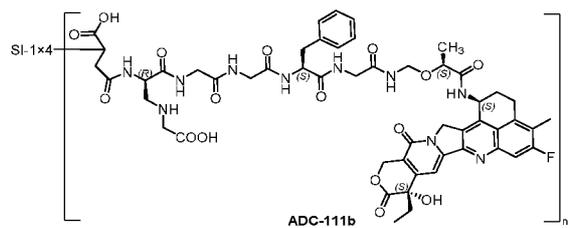
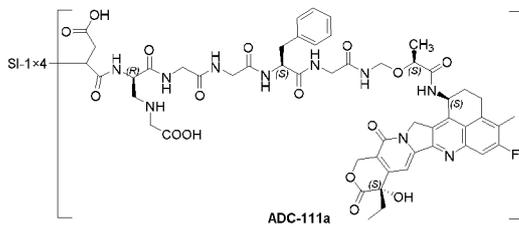
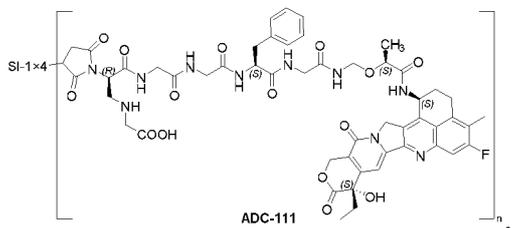
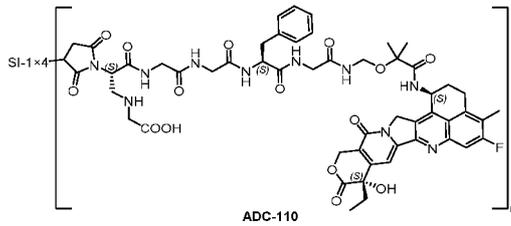
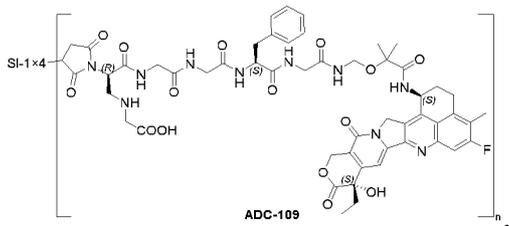
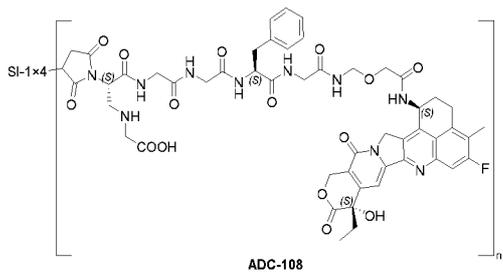
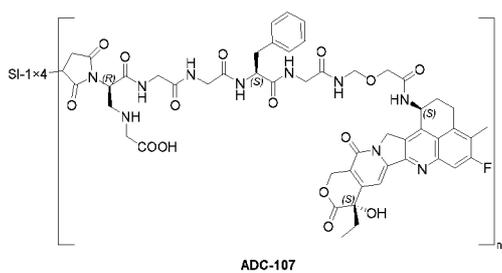


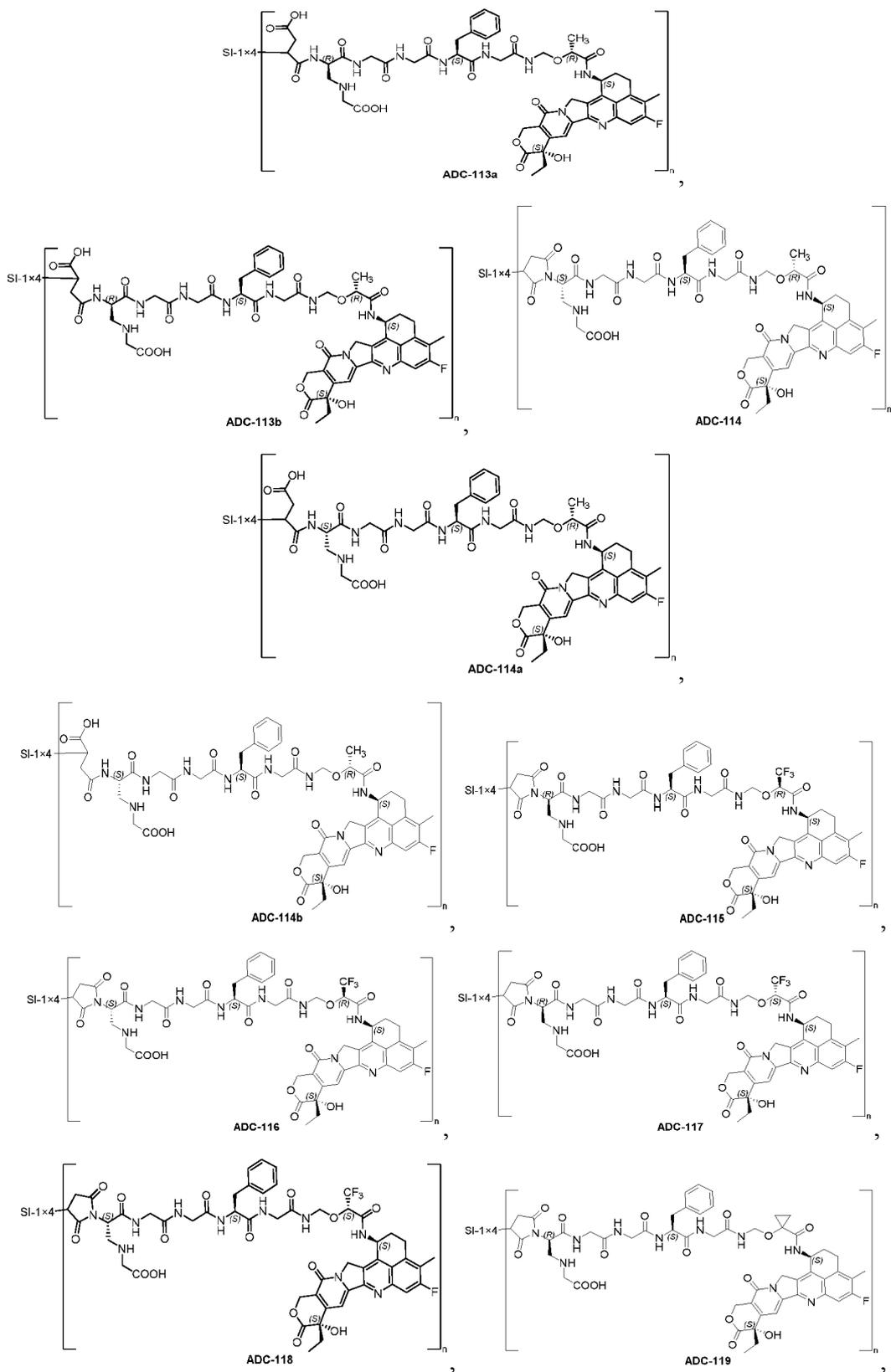
где

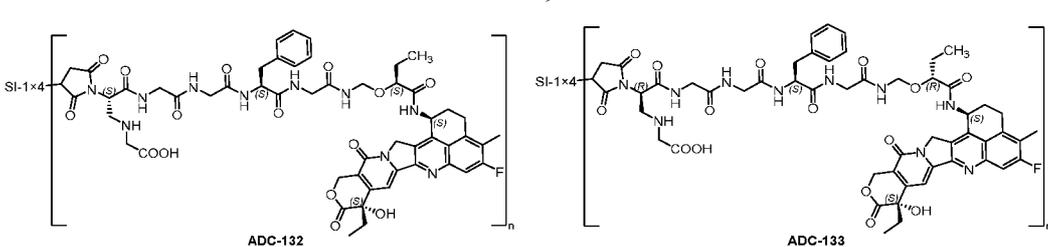
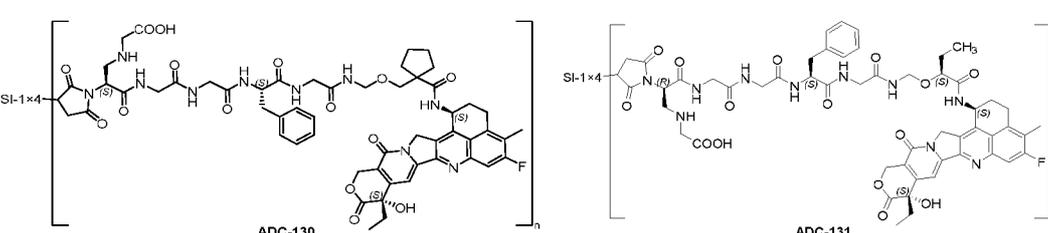
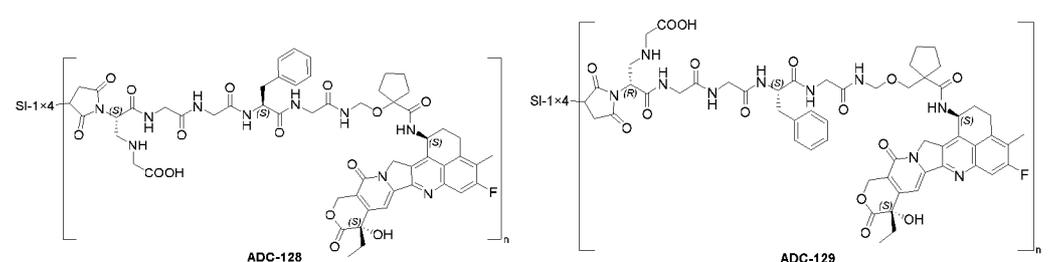
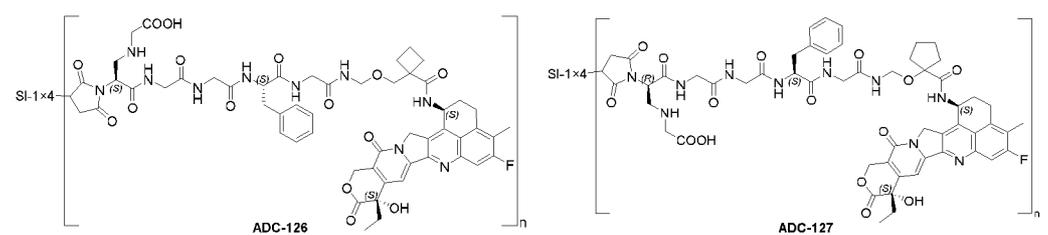
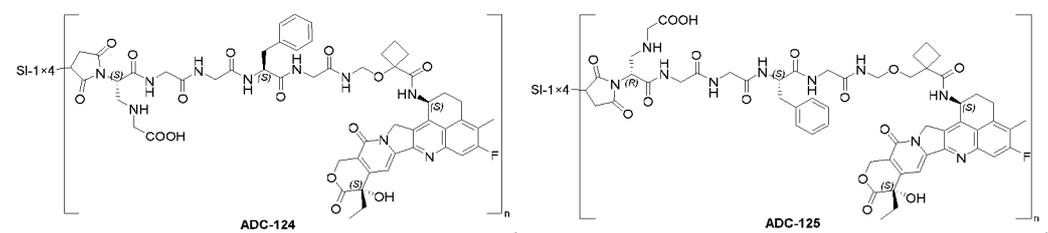
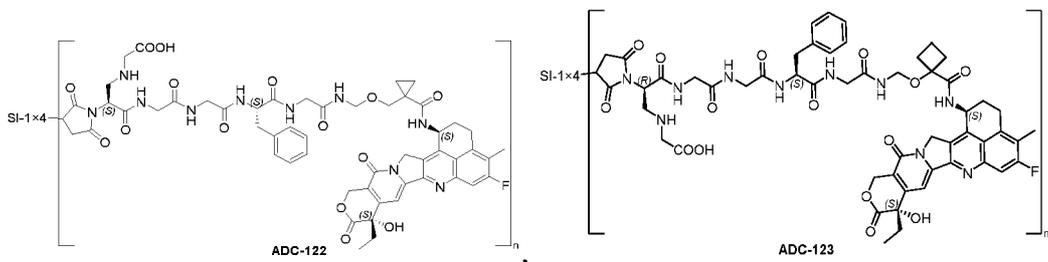
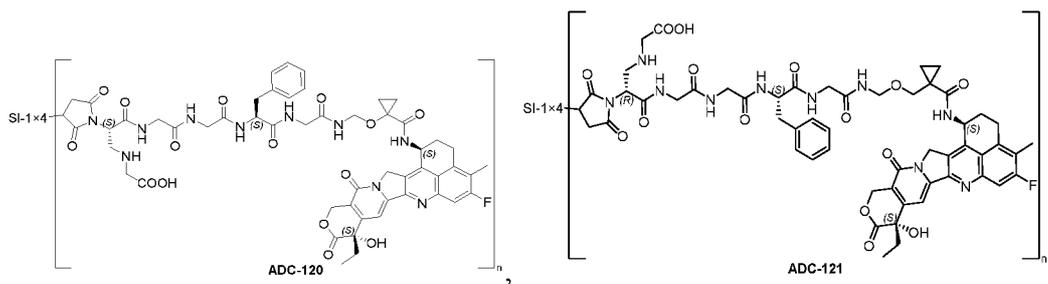
SI-1x6.4 представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые одновременно нацеливаются на EGFR и HER3, предпочтительно описанные в любом из пп. 2-7 и п. 22;

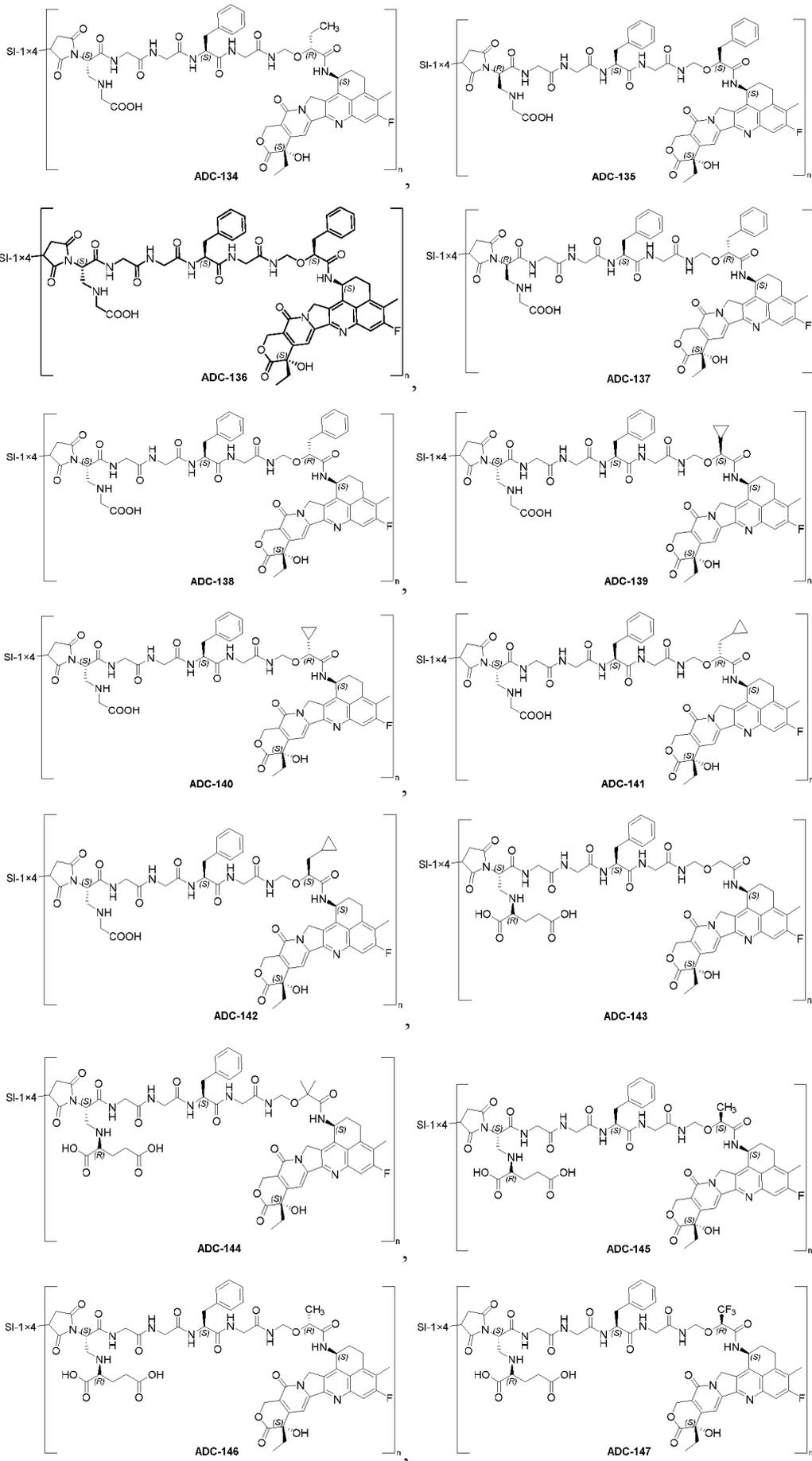
n выбран из целых чисел 1-10.

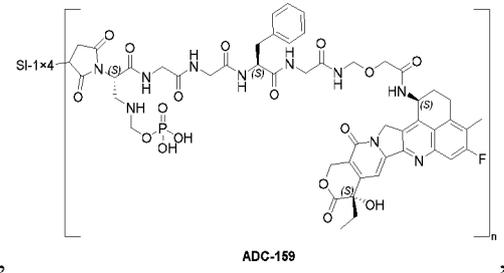
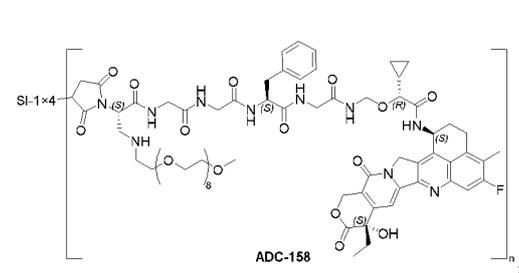
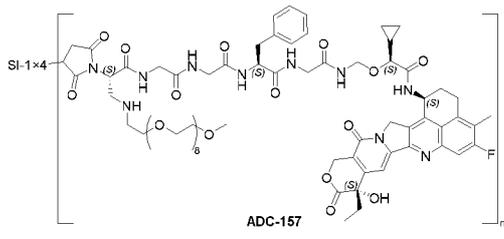
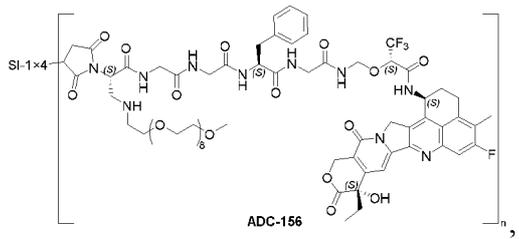
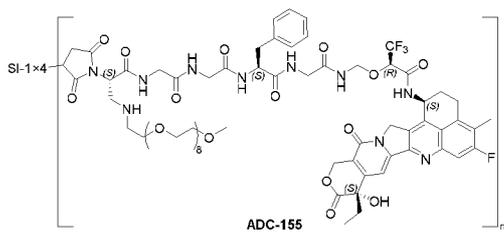
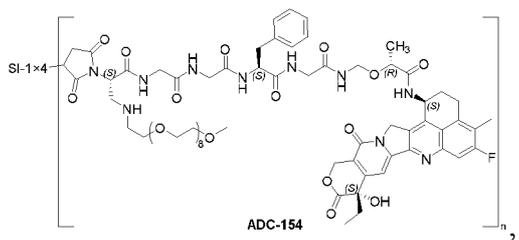
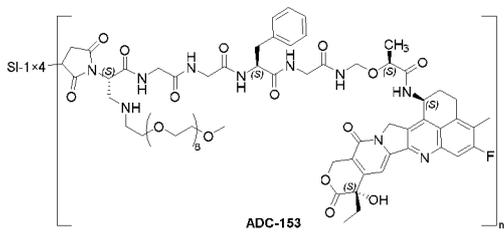
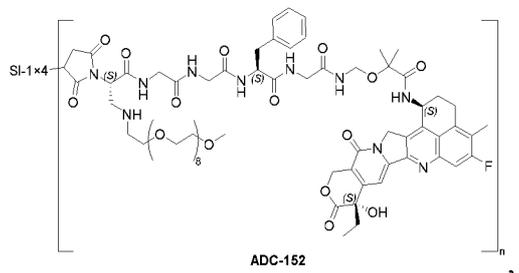
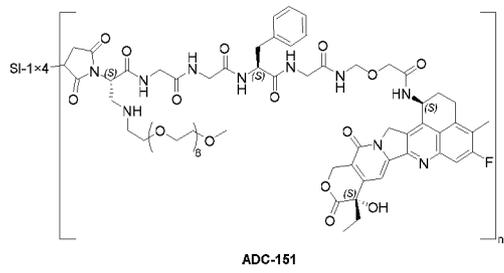
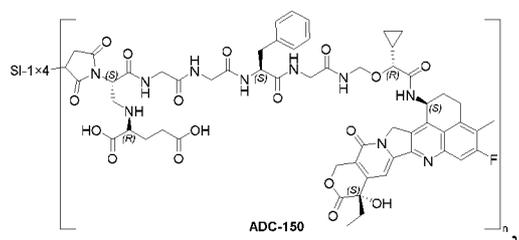
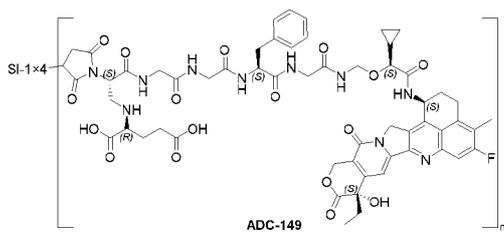
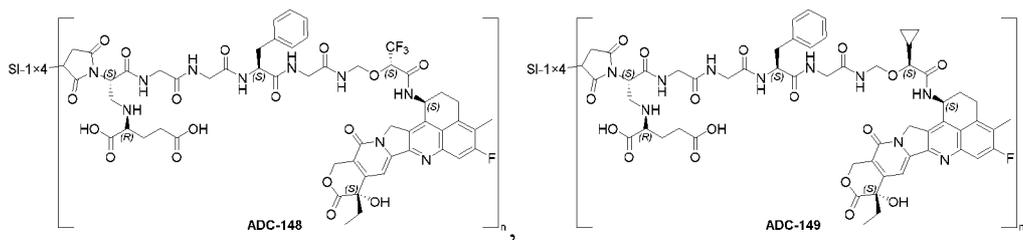
40. Конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-32 или способ по п. 38, где конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват выбраны без ограничения из следующих структур, или структур с сукцинимидным открытым кольцом на их основе, или их изомеров,

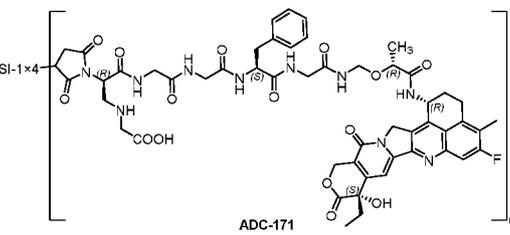
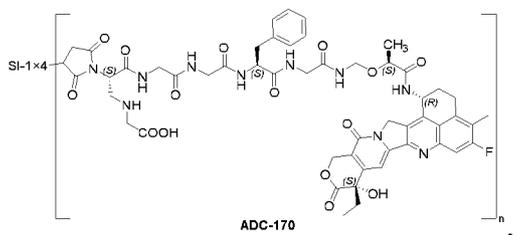
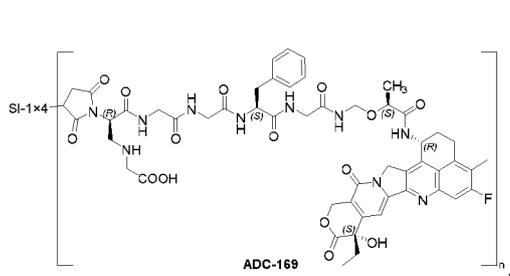
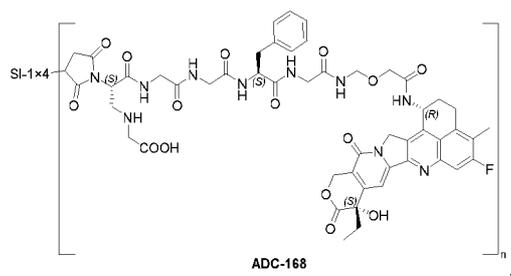
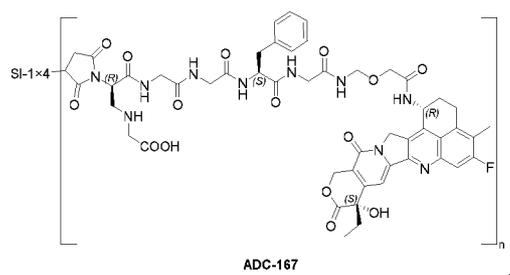
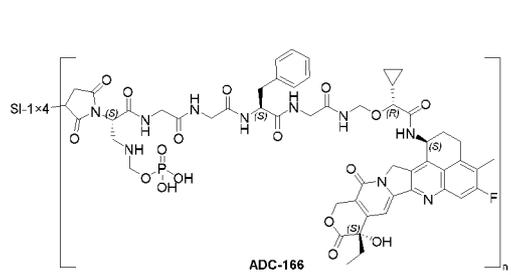
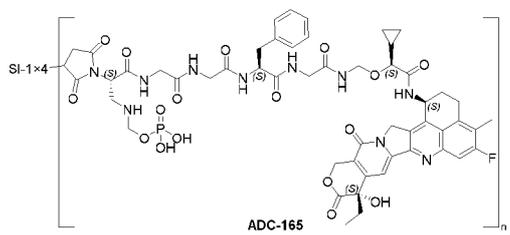
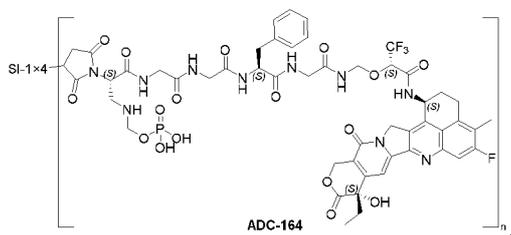
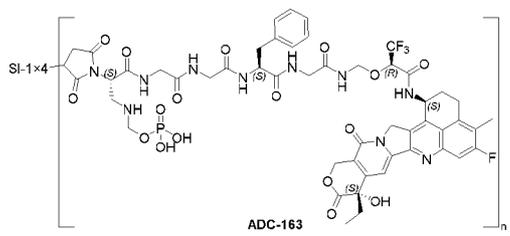
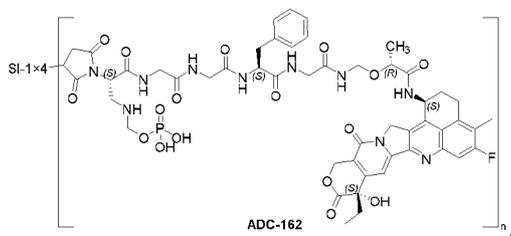
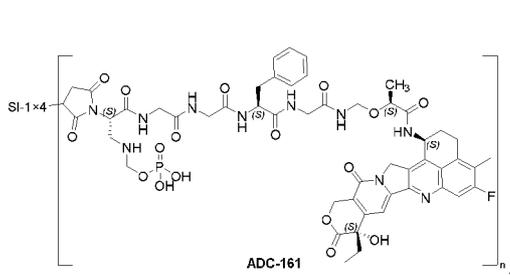
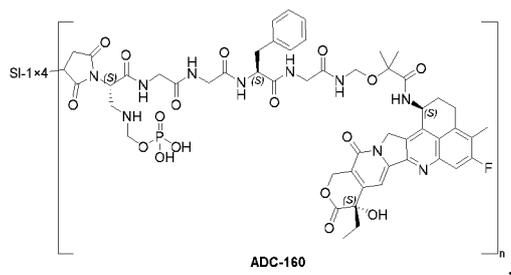


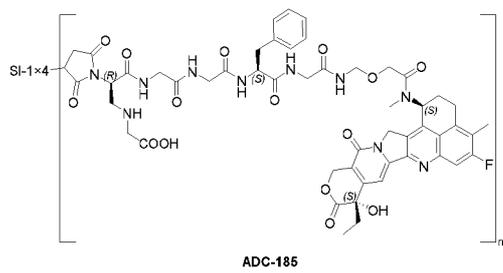
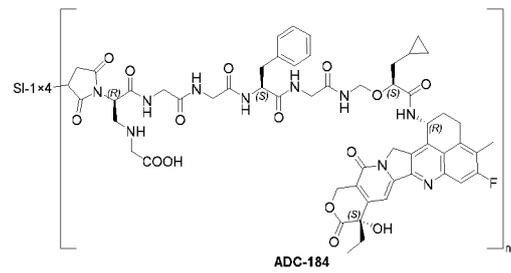
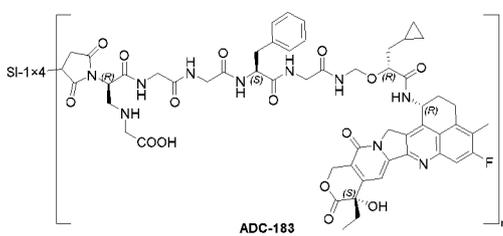
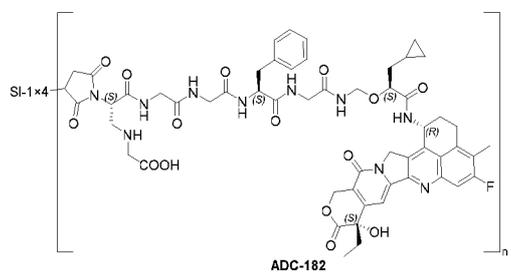
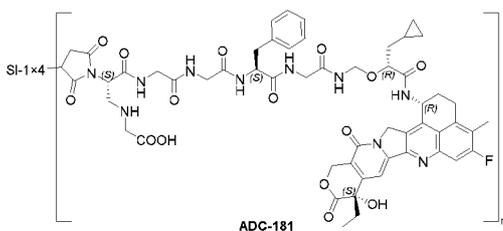
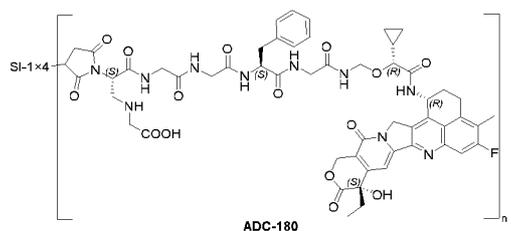
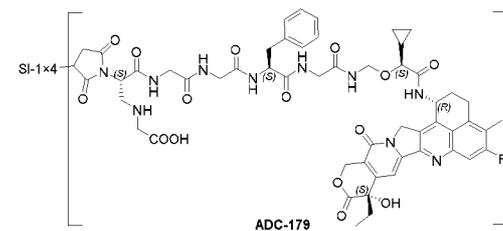
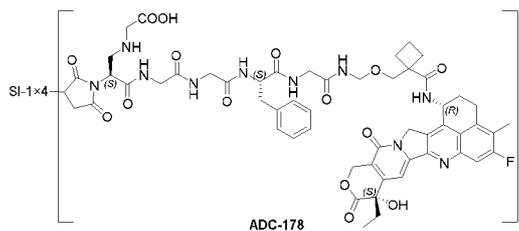
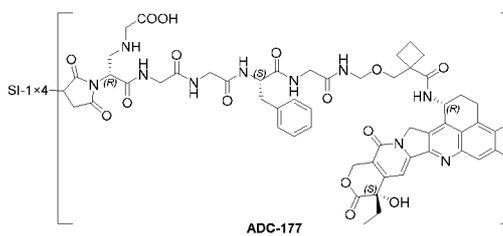
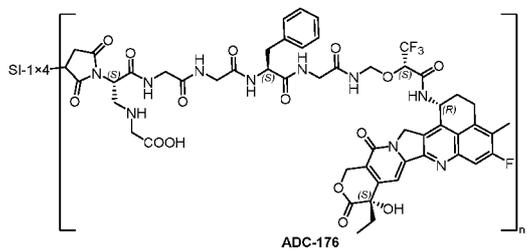
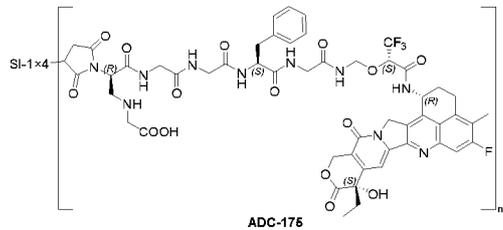
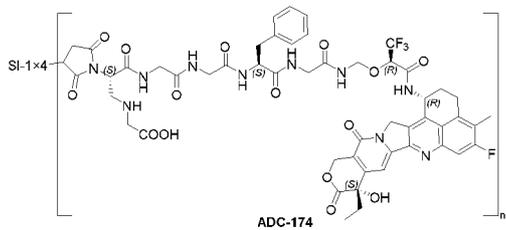
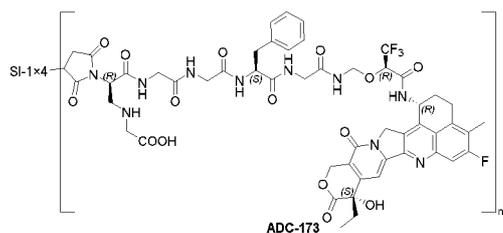
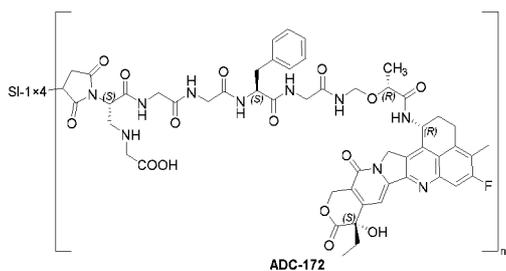


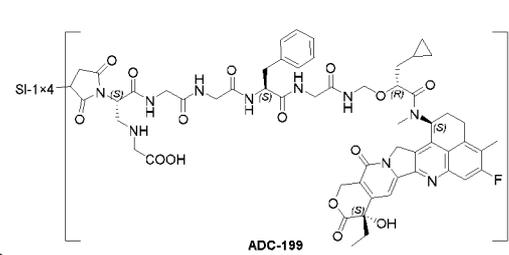
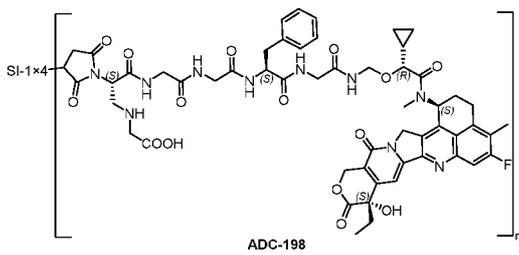
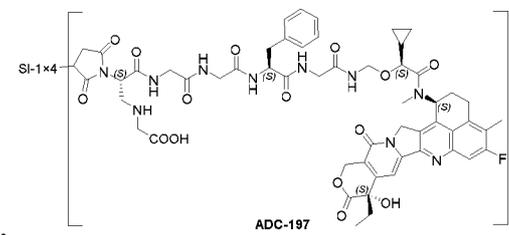
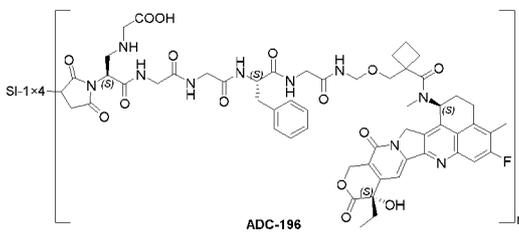
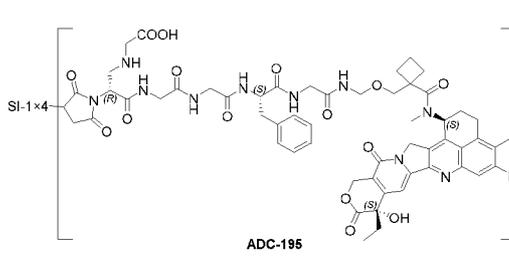
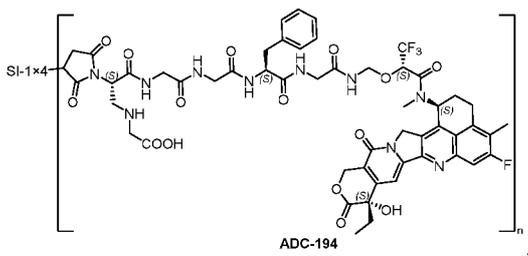
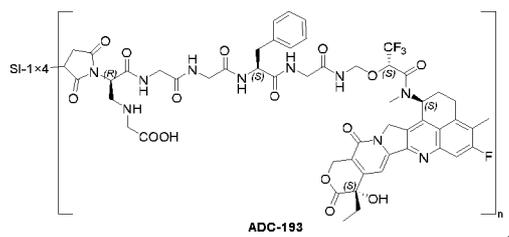
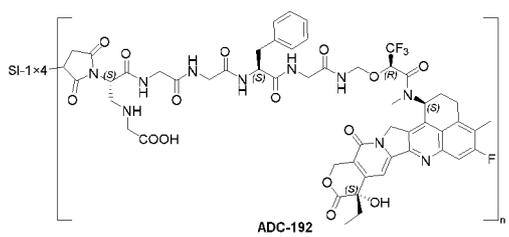
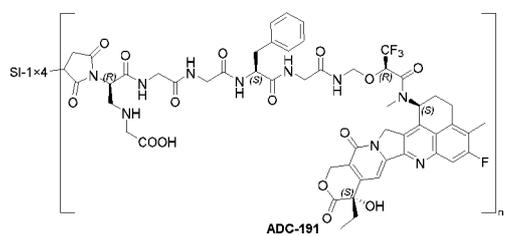
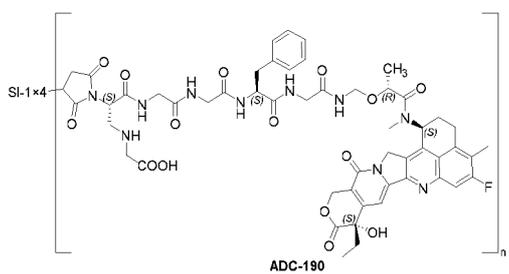
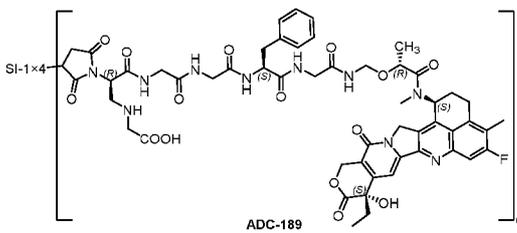
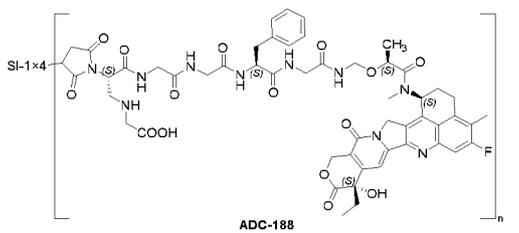
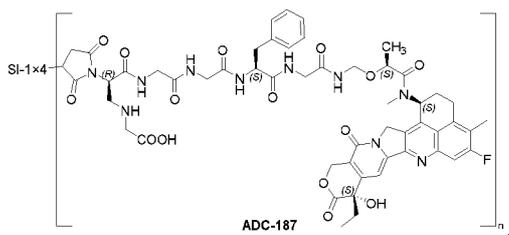
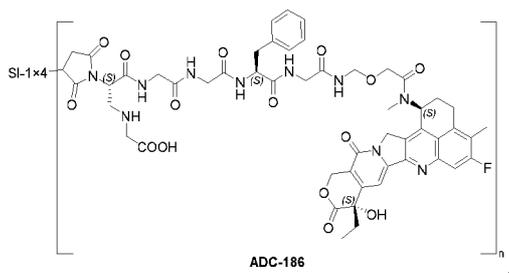


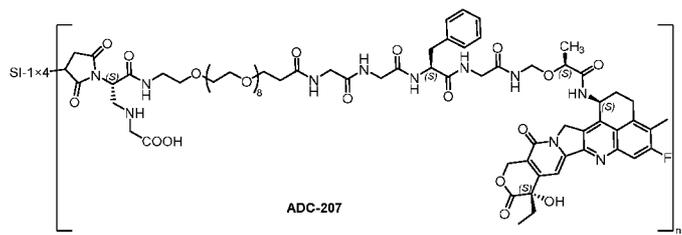
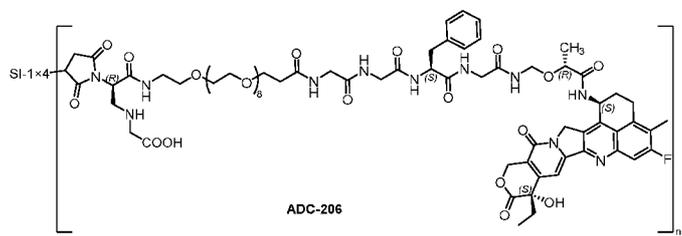
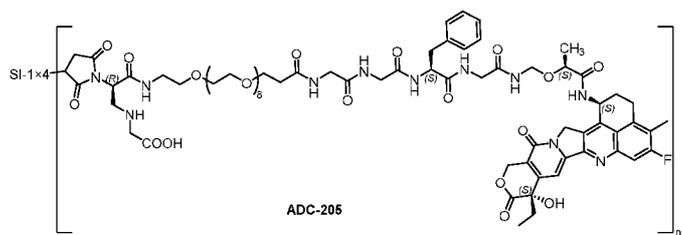
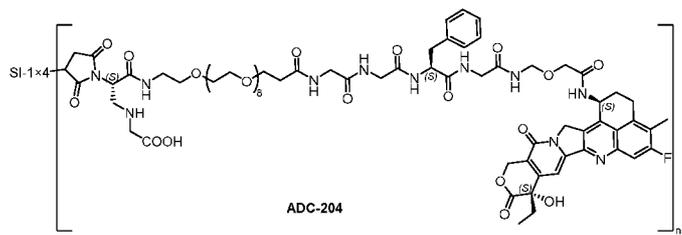
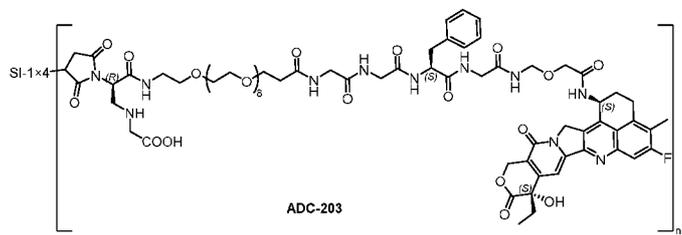
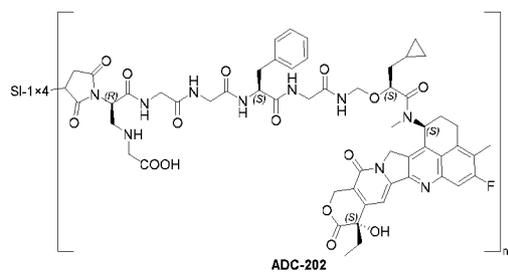
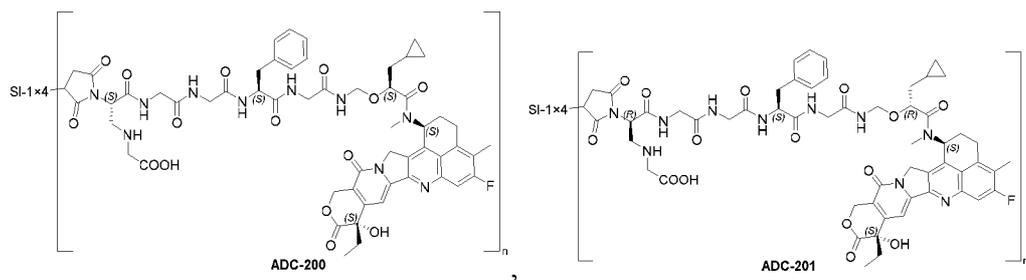


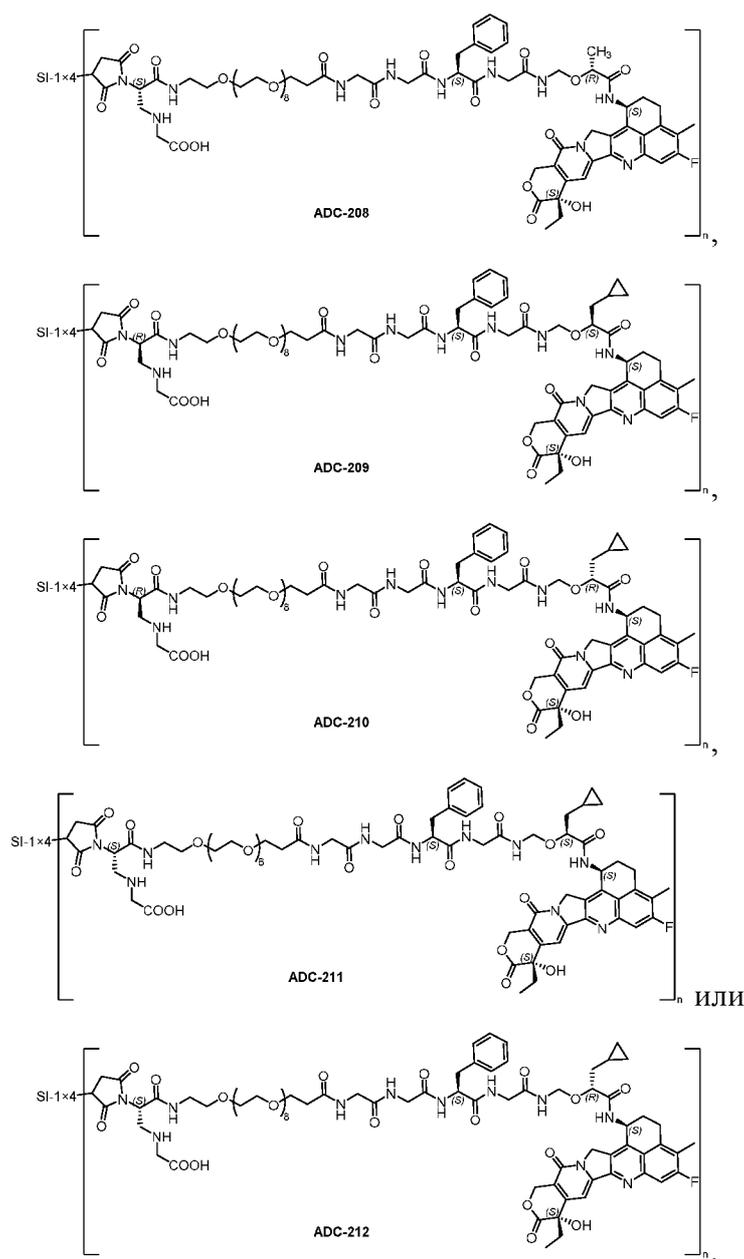










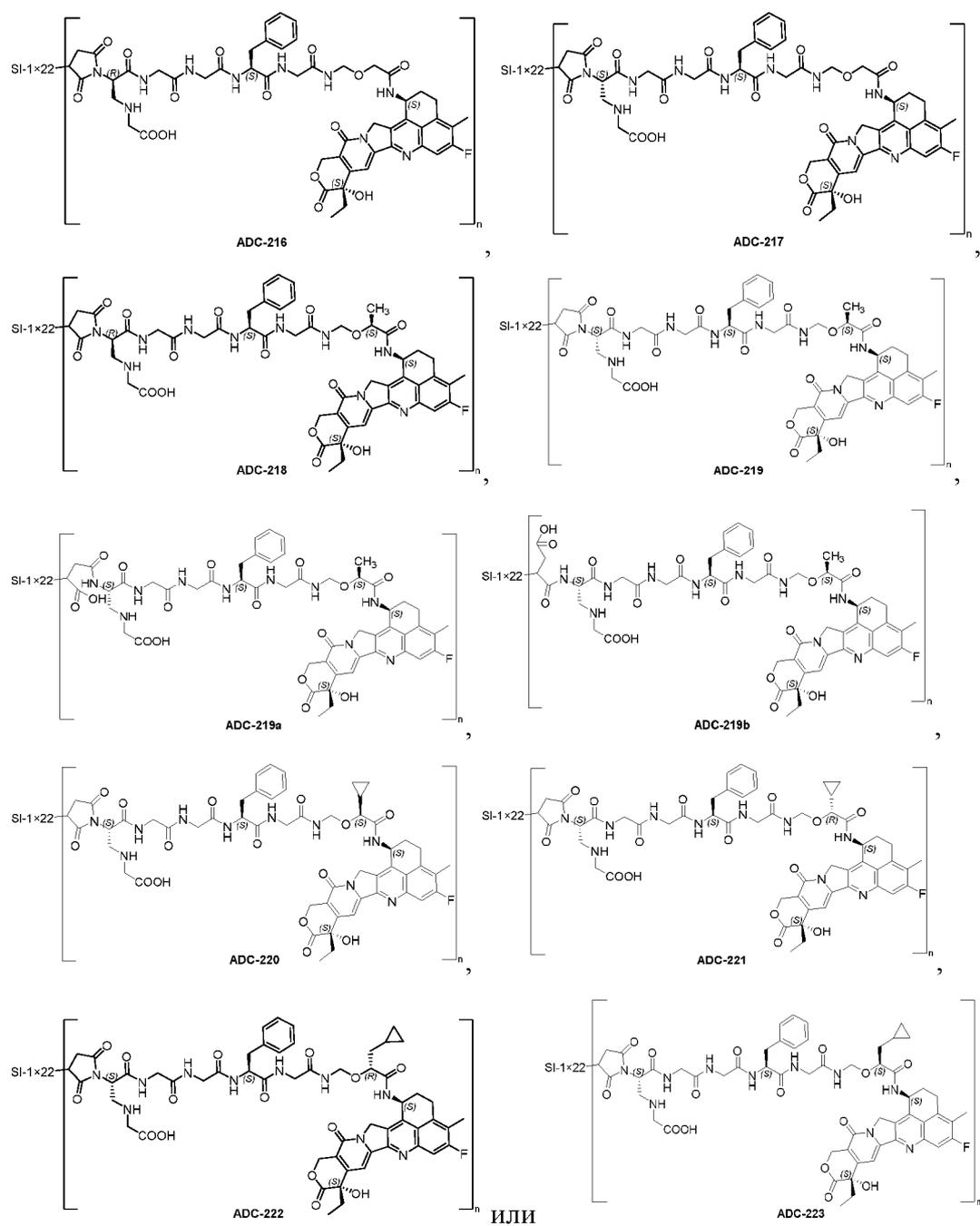


где

SI-1x4 представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые одновременно нацеливаются на EGFR и HER3, предпочтительно описанные в любом из пп. 2-3, 8-11 и п. 22;

n выбран из целых чисел 1-10.

41. Конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-32 или способ по п. 38, где конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват выбраны без ограничения из следующих структур, или структур с сукцинимидным открытым кольцом на их основе, или их изомеров,



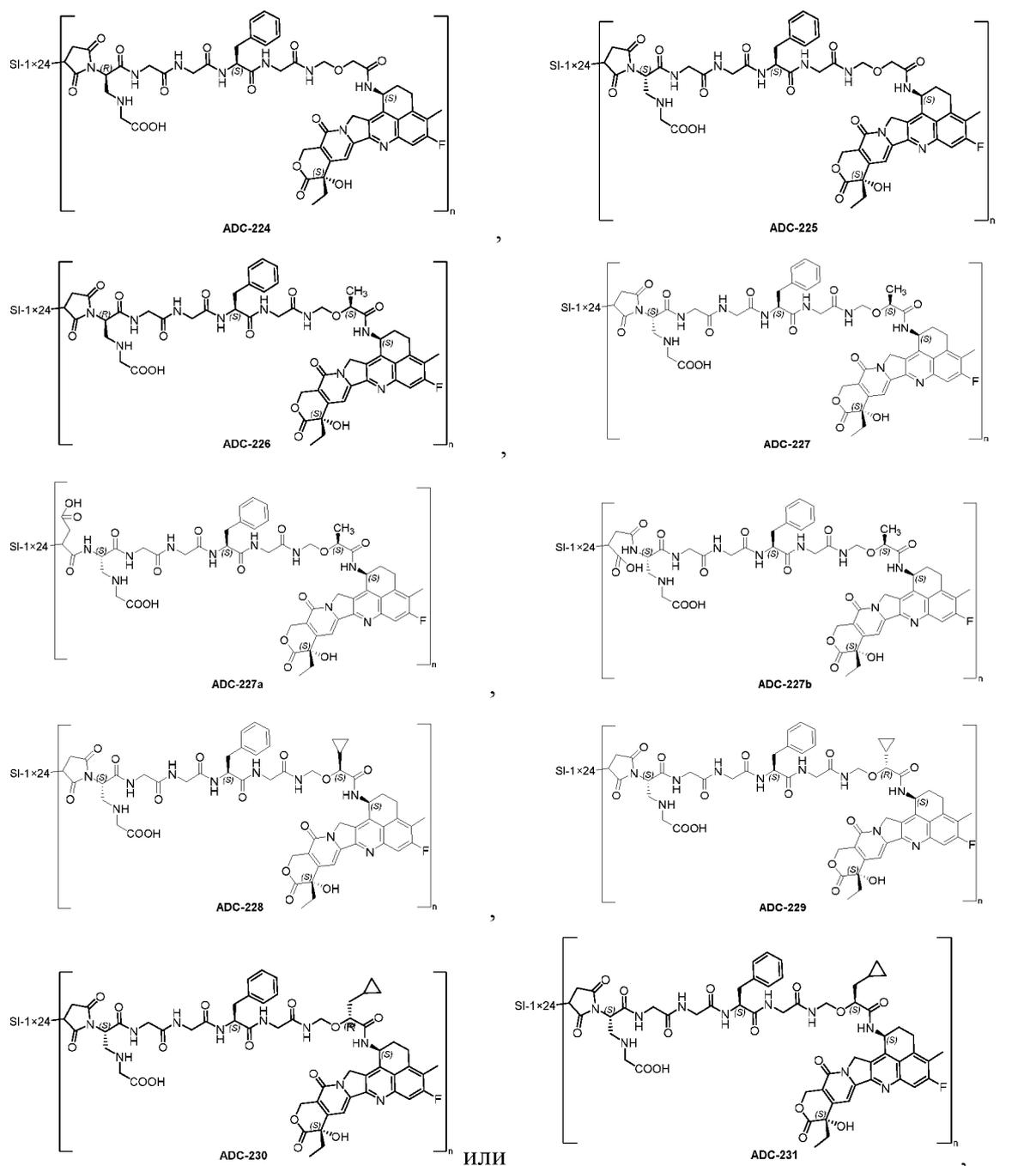
где

SI-1x22 представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые одновременно нацеливаются на EGFR и HER3, предпочтительно описанные в любом из пп. 2-3, 4, 12-14 и п. 22;

n выбран из целых чисел 1-10.

42. Конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-32 или способ по п. 38, где конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват выбраны без ограничения из следующих структур, или структур с

сукцинимидным открытым кольцом на их основе, или их изомеров,



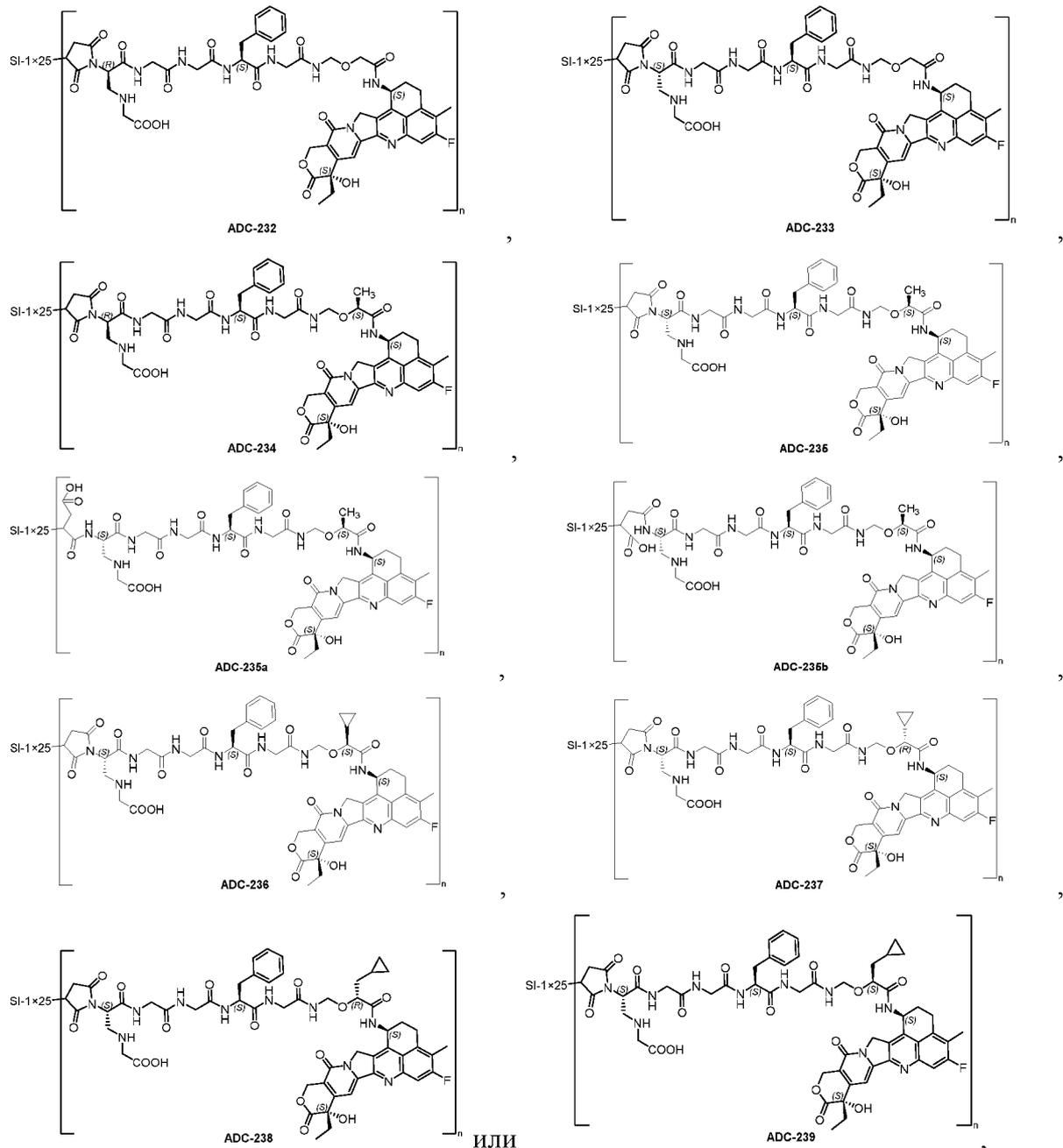
где

SI-1x24 представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые одновременно нацеливаются на EGFR и HER3, предпочтительно описанные в любом из пп. 2-5, 15, 16 и п. 22;

n выбран из целых чисел 1-10.

43. Конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-32 или способ по п. 38, где конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или

сольват выбраны без ограничения из следующих структур, или структур с сукцинимидным открытым кольцом на их основе, или их изомеров,



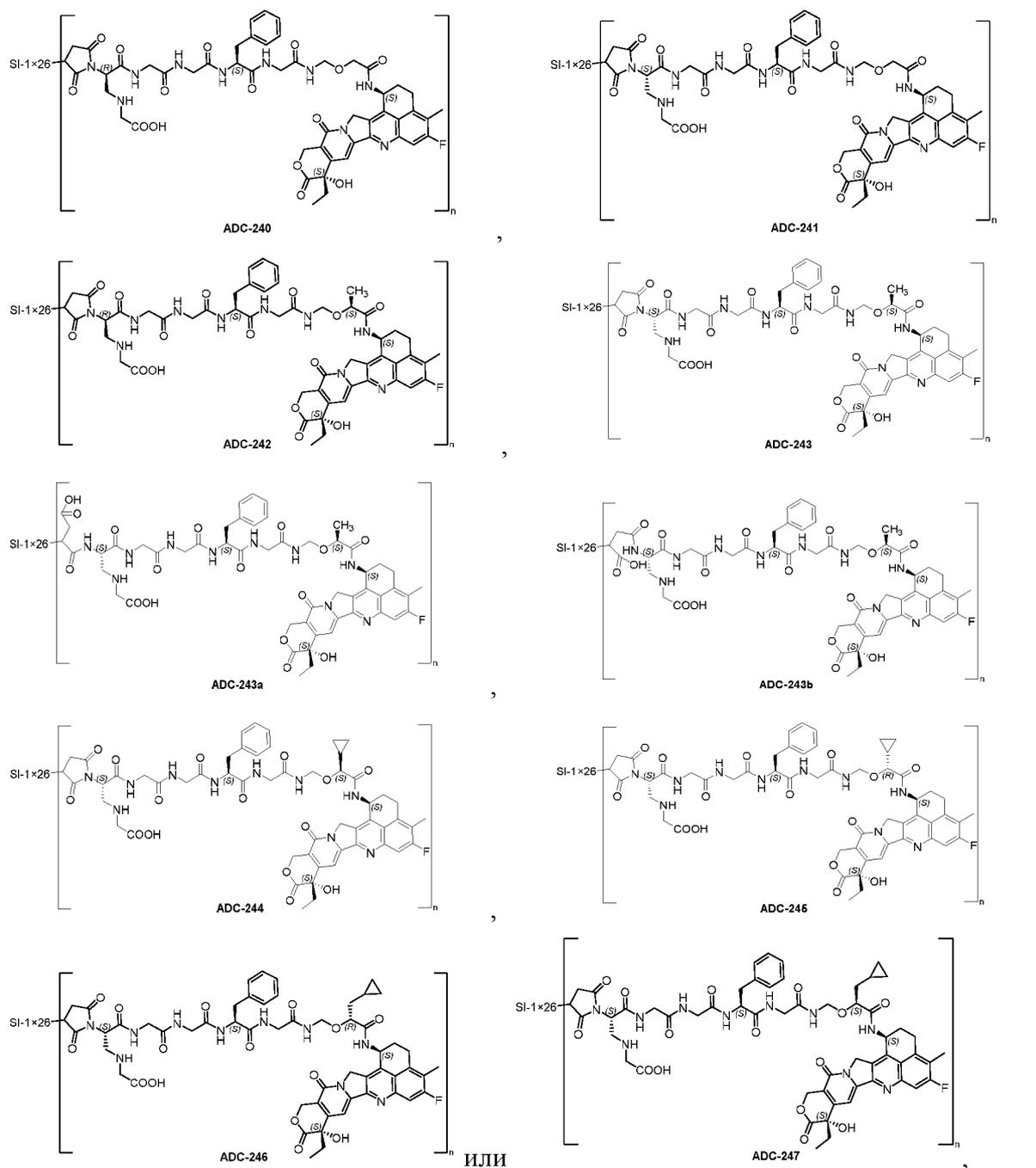
где

SI-1x25 представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые одновременно нацеливаются на EGFR и HER3, предпочтительно описанные в любом из пп. 2-3, 4, 12, 17, 18 и п. 22;

n выбран из целых чисел 1-10.

44. Конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-32 или способ по п. 38, где конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или

сольват выбраны без ограничения из следующих структур, или структур с сукцинимидным открытым кольцом на их основе, или их изомеров,



где

SI-1x26 представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые одновременно нацеливаются на EGFR и HER3, предпочтительно описанные в любом из пп. 2-3, 8, 19-21 и п. 22;

n выбран из целых чисел 1-10.

45. Конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-32 или пп. 39-44 или соединение

линкер-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 33-37, где фармацевтически приемлемая соль предусматривает соль натрия, соль калия, соль кальция или соль магния, образованные с кислотной функциональной группой в структурной формуле, и ацетат, трифторацетат, цитрат, оксалат, тартрат, малат, нитрат, хлорид, бромид, йодид, сульфат, бисульфат, фосфат, лактат, олеат, аскорбат, салицилат, формиат, глутамат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат или п-толуолсульфонат, образованные с основной функциональной группой в структуре.

46. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-32 или пп. 39-44 или соединение линкер-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 33-37 и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

47. Фармацевтический препарат, содержащий конъюгат лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 1-32 или пп. 39-44 или соединение линкер-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемые соль или сольват по любому из пп. 33-37.

48. Применение конъюгата лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата по любому из пп. 1-32 или пп. 39-44, или соединения линкер-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата по любому из пп. 33-37, или фармацевтической композиции по п. 46 и/или фармацевтического препарата по п. 47 в получении лекарственного средства для лечения или предупреждения рака или опухолей;

в качестве альтернативы применение конъюгата лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата по любому из пп. 1-32 или пп. 39-44, или соединения линкер-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата по любому из пп. 33-37, или фармацевтической композиции по п. 46 и/или фармацевтического препарата по п. 47 для лечения или предупреждения рака или опухолей;

предпочтительно при раке или опухоли экспрессируются EGFR и/или HER3;

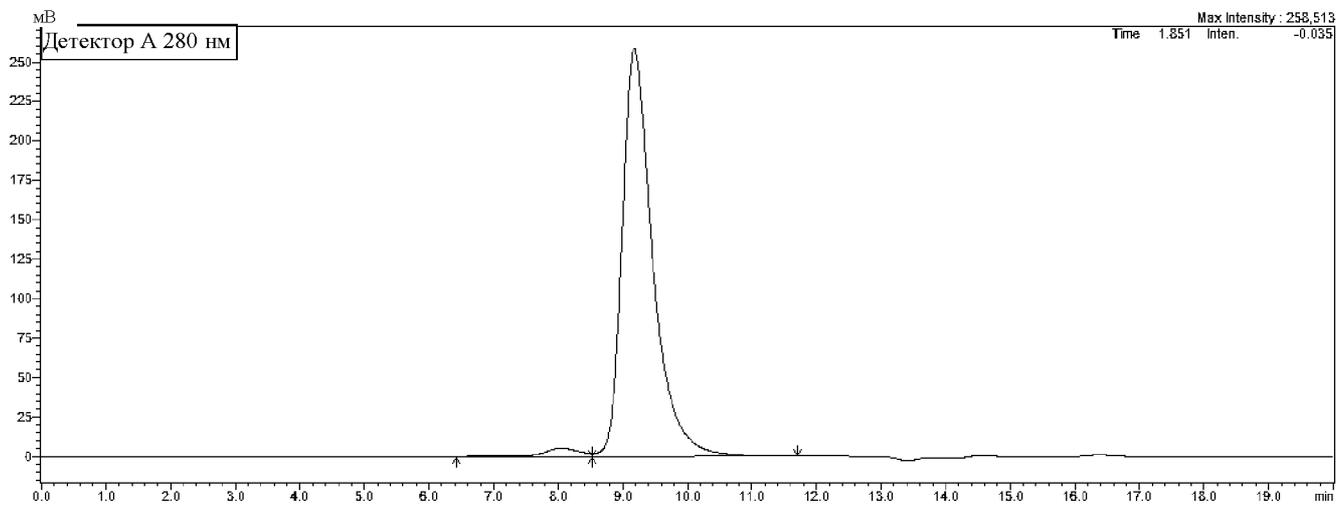
более предпочтительно рак или опухоль выбраны из аденокарциномы, рака яичника, рака шейки матки, рака матки, рака предстательной железы, рака почки, рака уретры, рака мочевого пузыря, рака печени, рака желудка, рака эндометрия, рака слюнной железы, рака пищевода, рака легкого, рака толстой кишки, ректального рака,

колоректального рака, рака кости, рака кожи, рака щитовидной железы, рака поджелудочной железы, меланомы, глиомы, нейробластомы, мультиформной глиобластомы, саркомы, лимфомы и лейкоза, а также других солидных опухолей или гемобластозов.

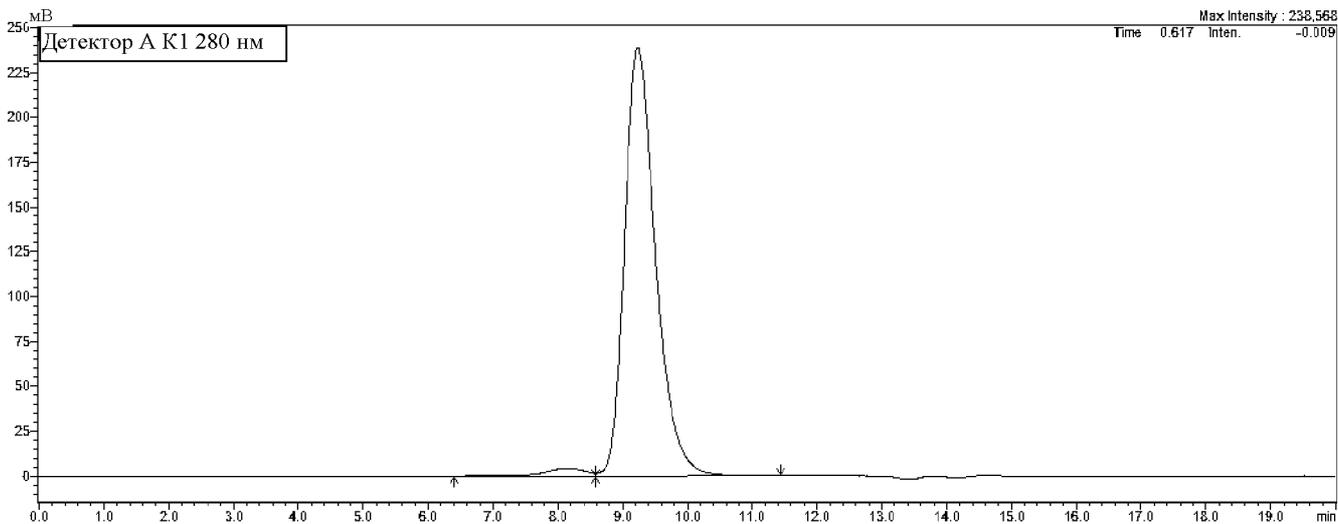
49. Способ лечения или предупреждения рака или опухолей, причем способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, профилактически или терапевтически эффективного количества конъюгата лиганд-производное камптотецина или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата по любому из пп. 1-32 или пп. 39-44, или соединения линкер-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемых соли или сольвата по любому из пп. 33-37, или фармацевтической композиции по п. 46 и/или фармацевтического препарата по п. 47;

предпочтительно при раке или опухоли экспрессируются EGFR и/или HER3;

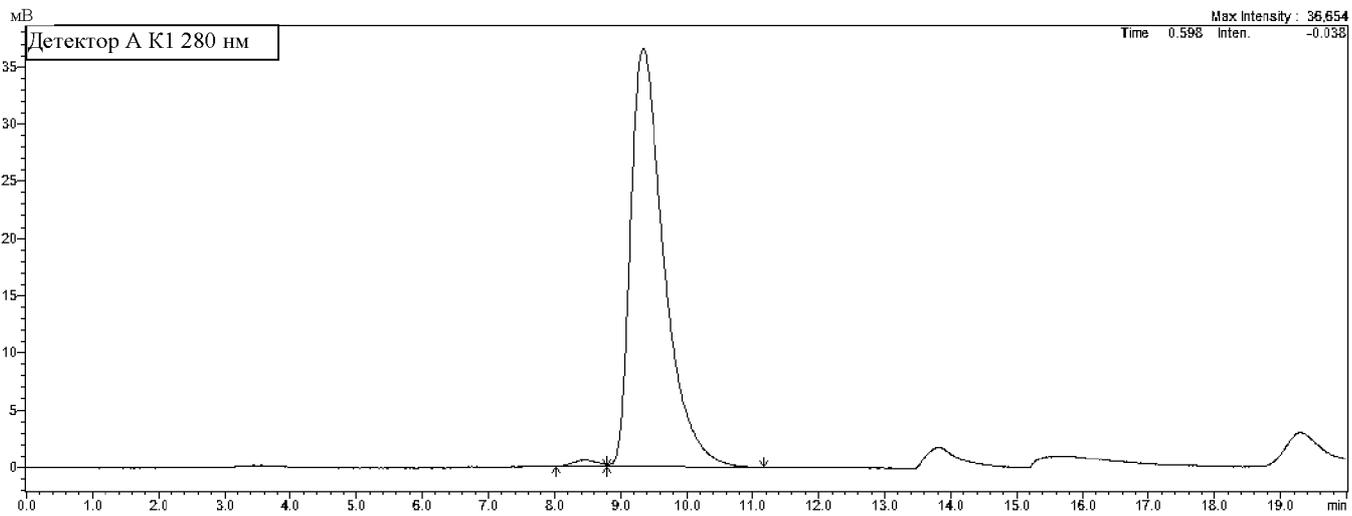
более предпочтительно рак или опухоль выбраны из аденокарциномы, рака яичника, рака шейки матки, рака матки, рака предстательной железы, рака почки, рака уретры, рака мочевого пузыря, рака печени, рака желудка, рака эндометрия, рака слюнной железы, рака пищевода, рака легкого, рака толстой кишки, ректального рака, колоректального рака, рака кости, рака кожи, рака щитовидной железы, рака поджелудочной железы, меланомы, глиомы, нейробластомы, мультиформной глиобластомы, саркомы, лимфомы и лейкоза, а также других солидных опухолей или гемобластозов.



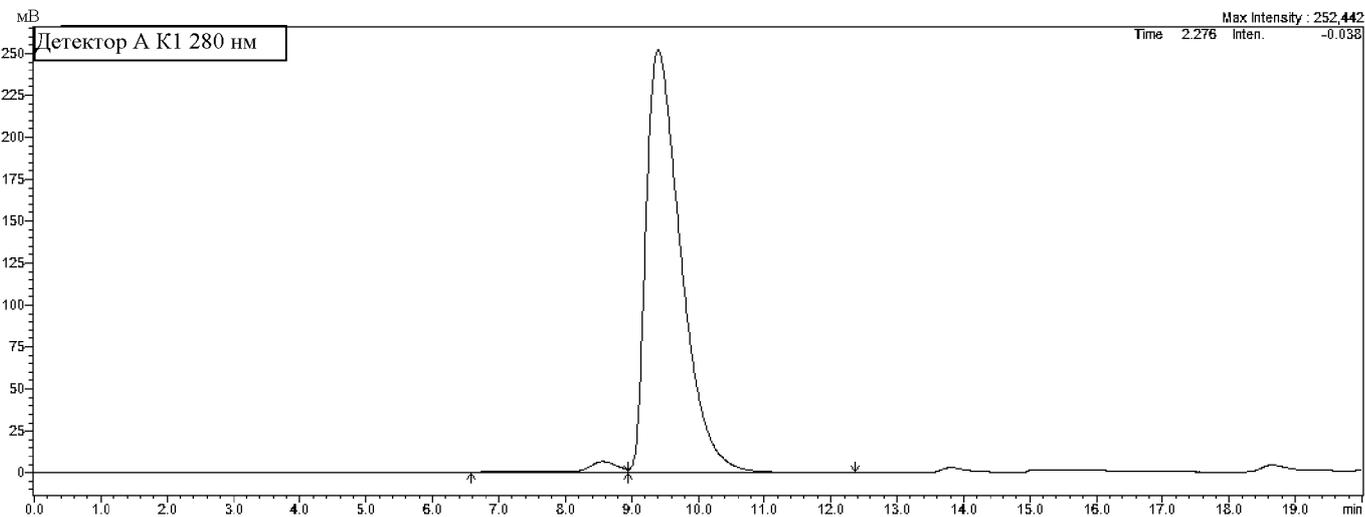
Фиг. 1А



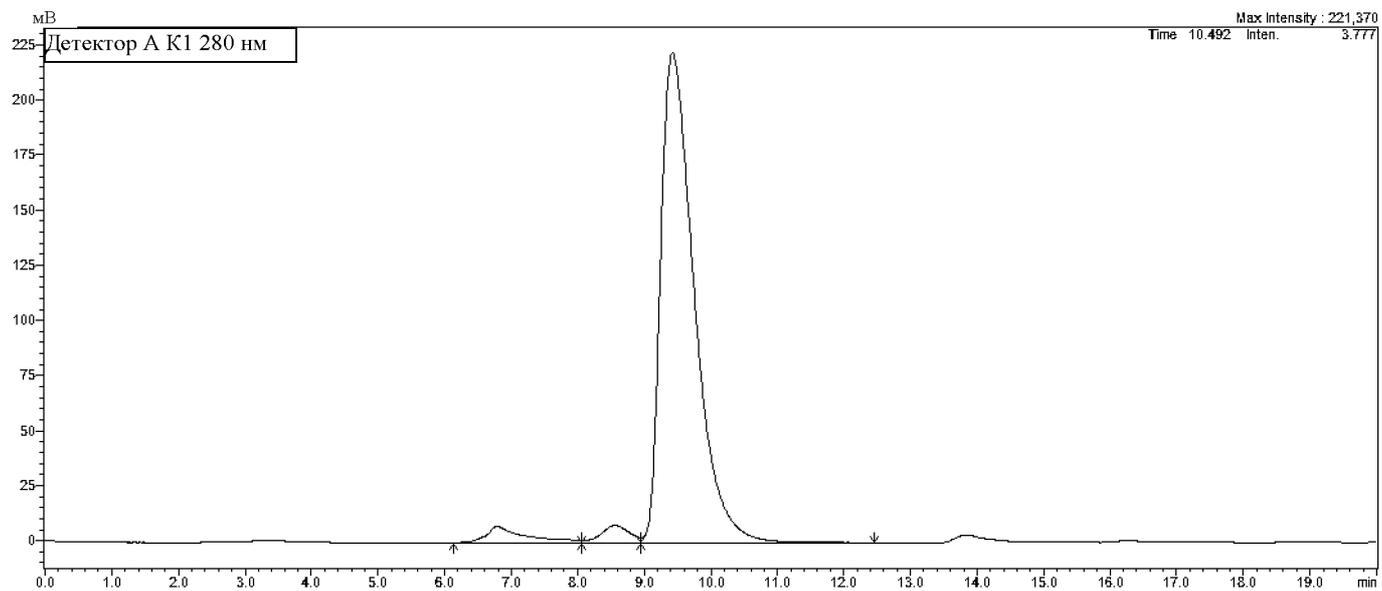
Фиг. 1В



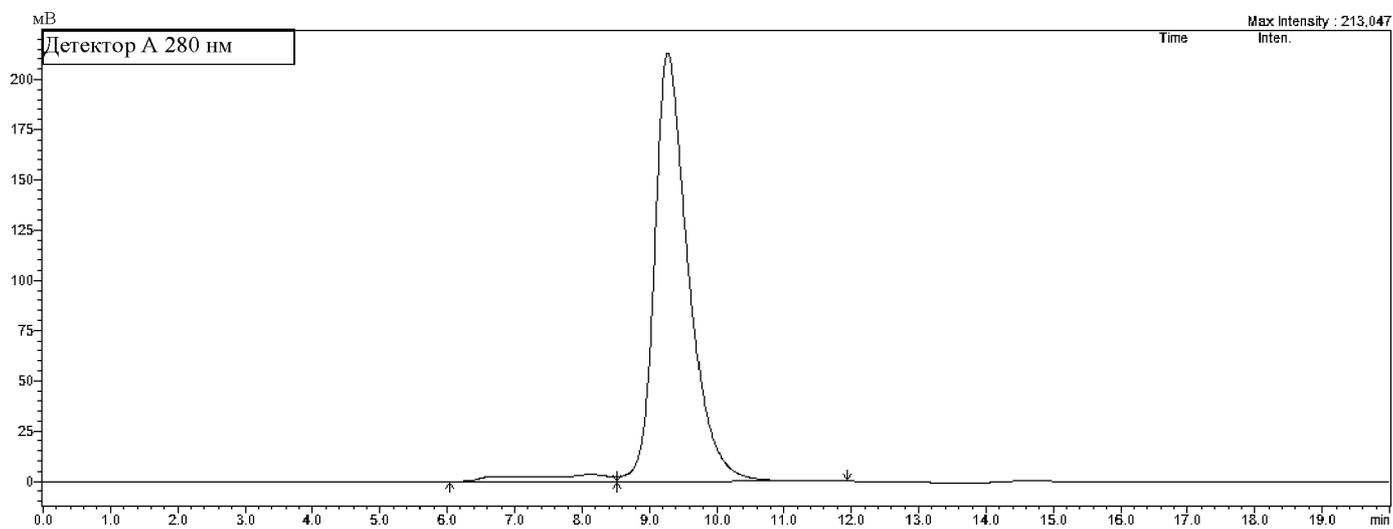
Фиг. 1С



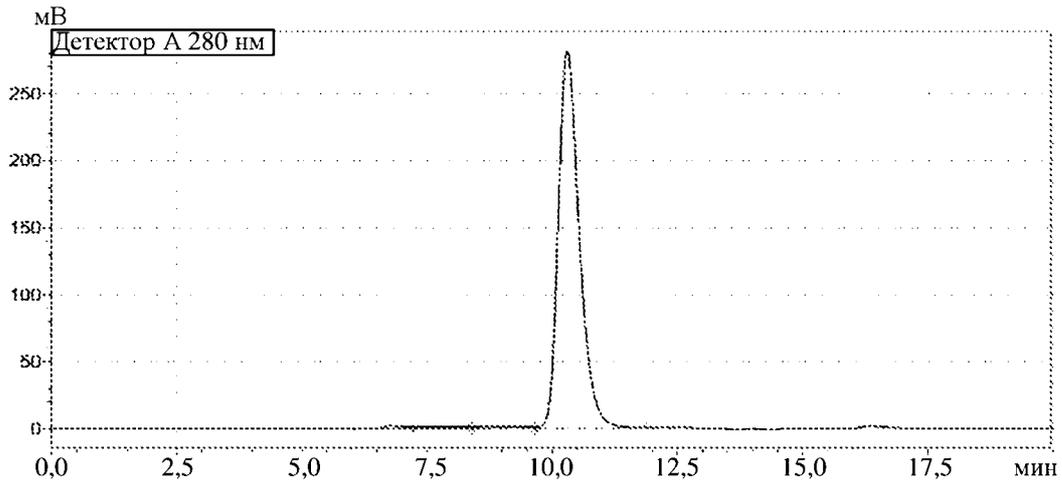
Фиг. 1D



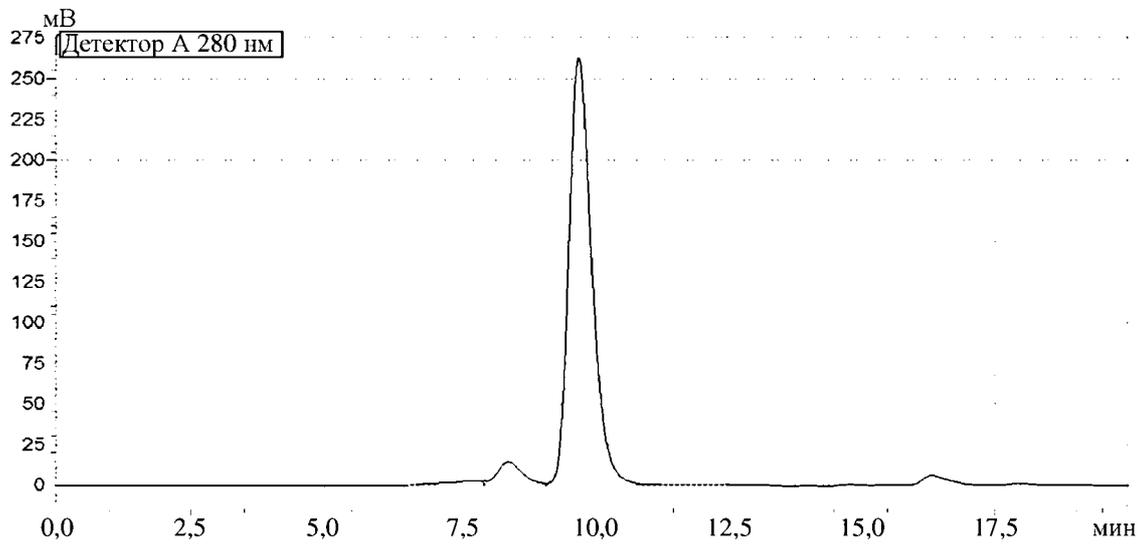
Фиг. 1Е



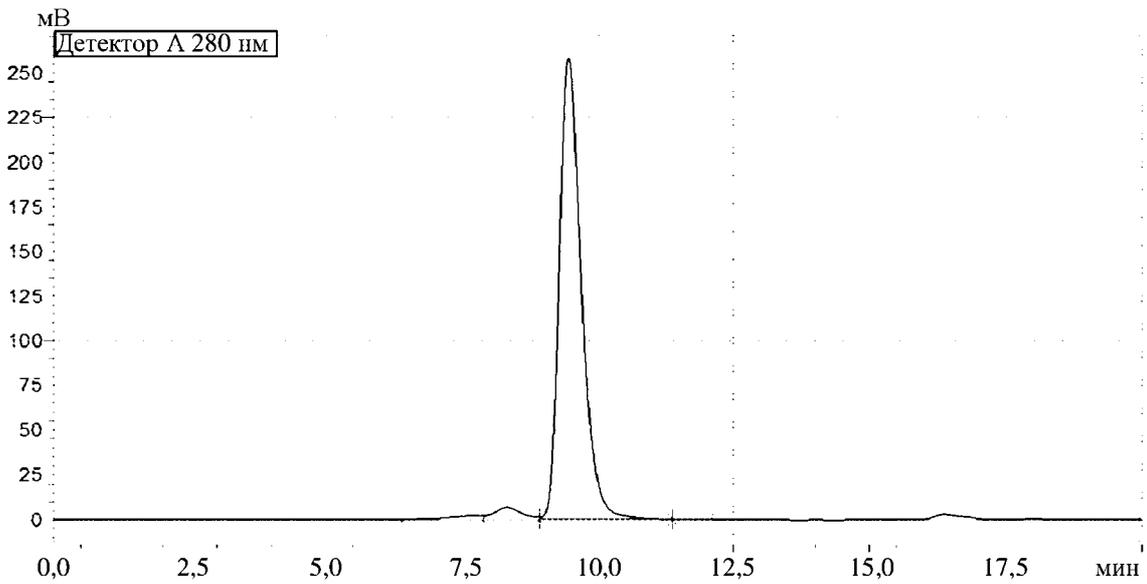
Фиг. 1F



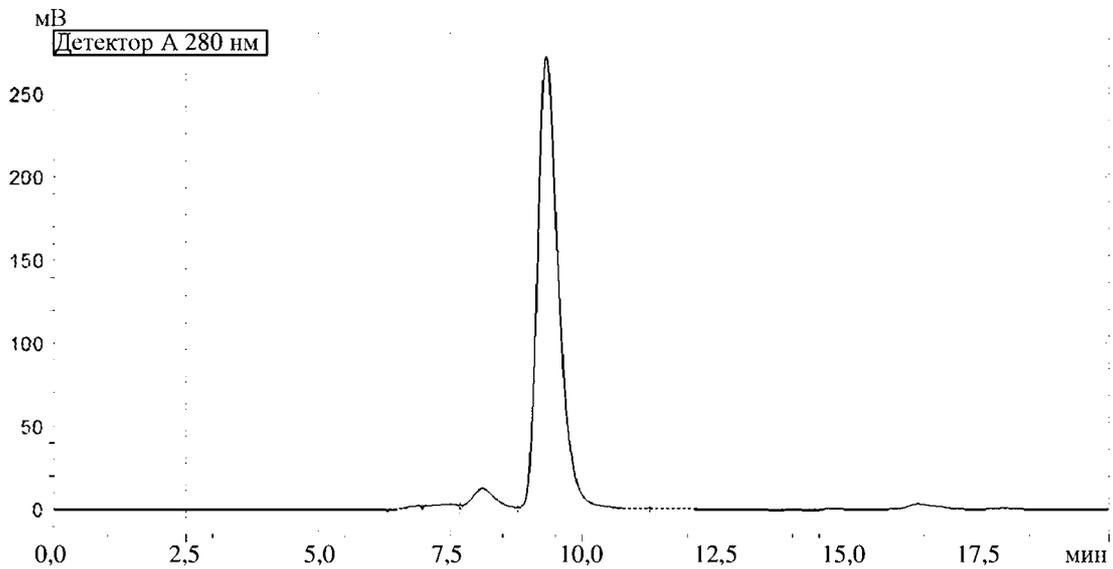
Фиг. 1G



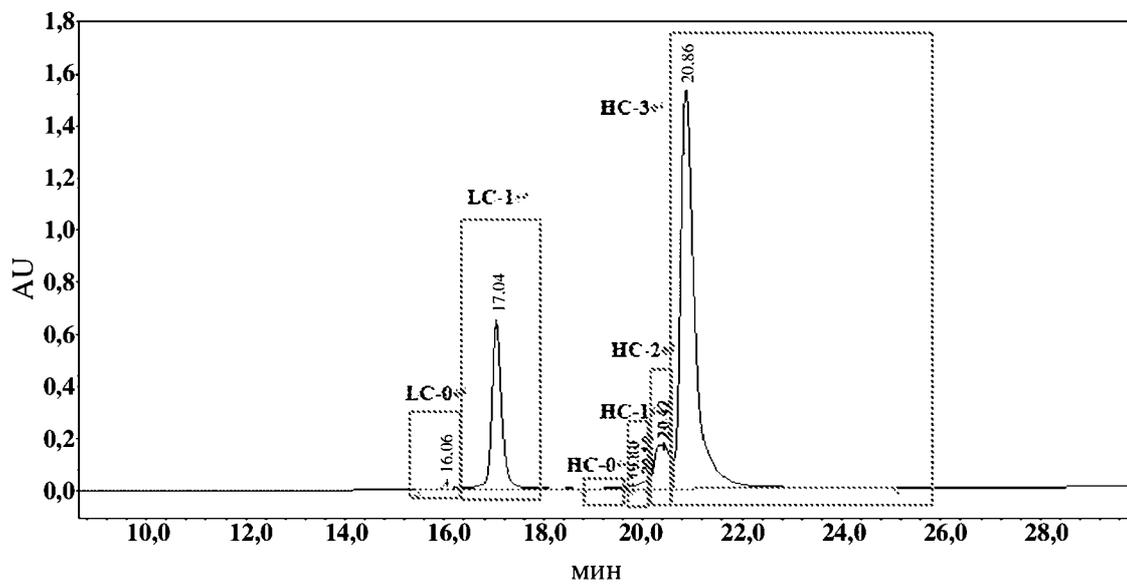
Фиг. 1H



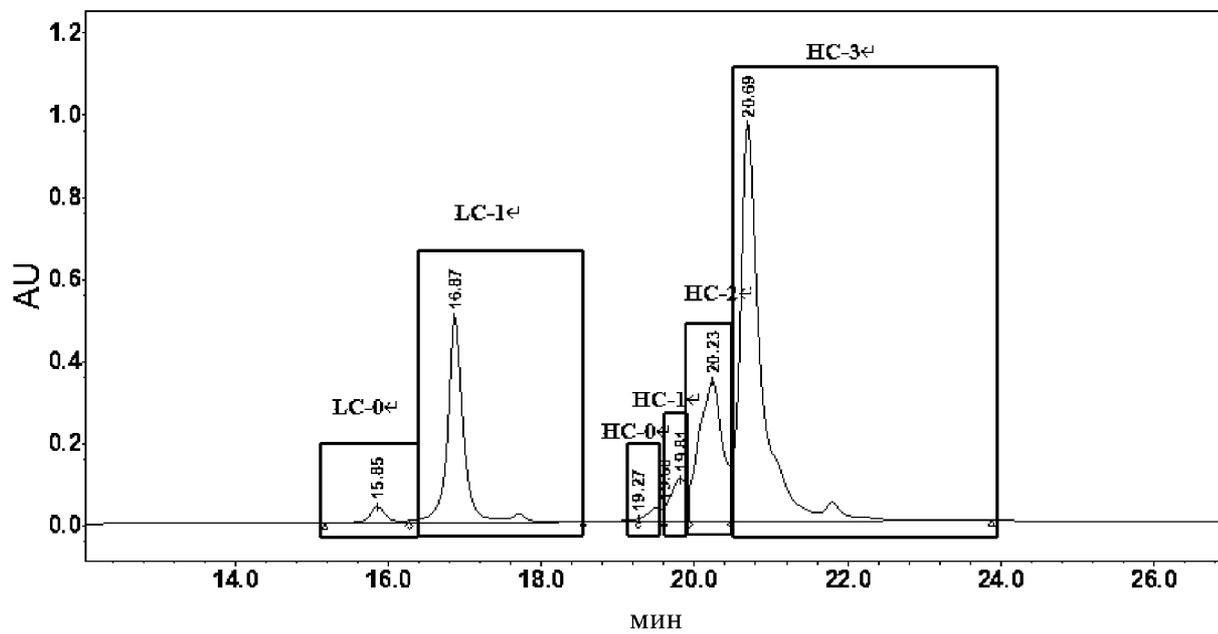
Фиг. 1I



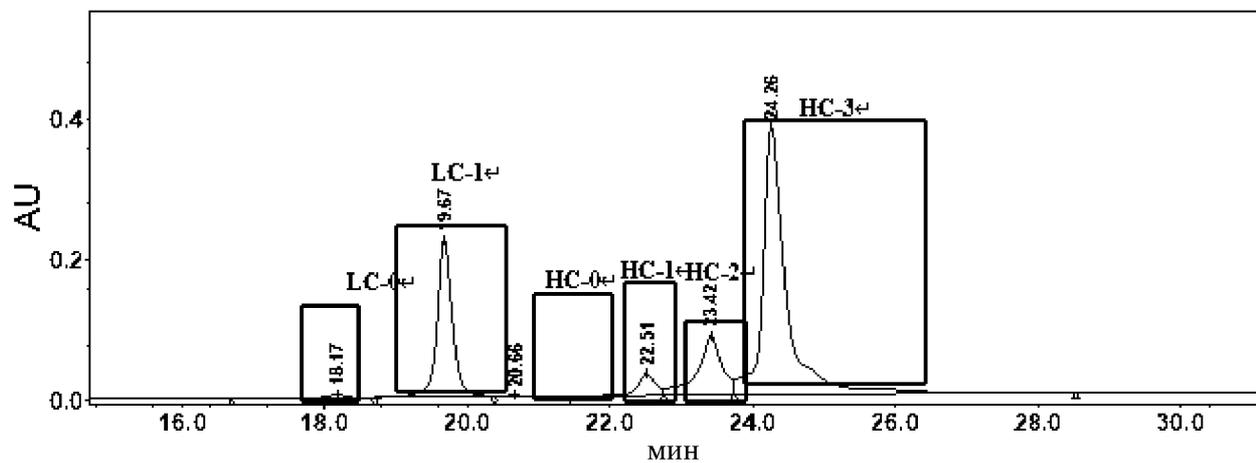
Фиг. 1J



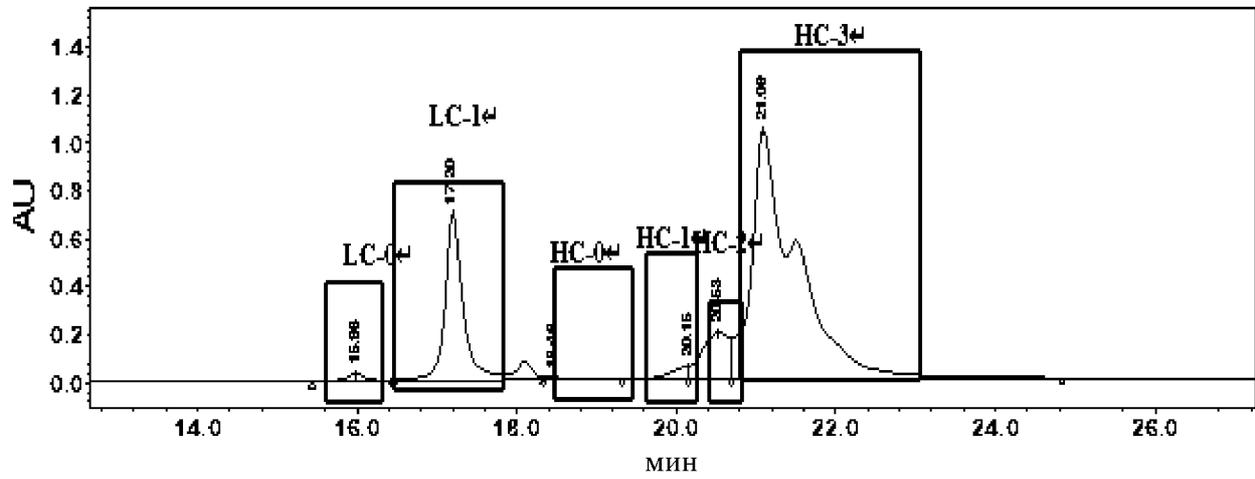
Фиг. 2А



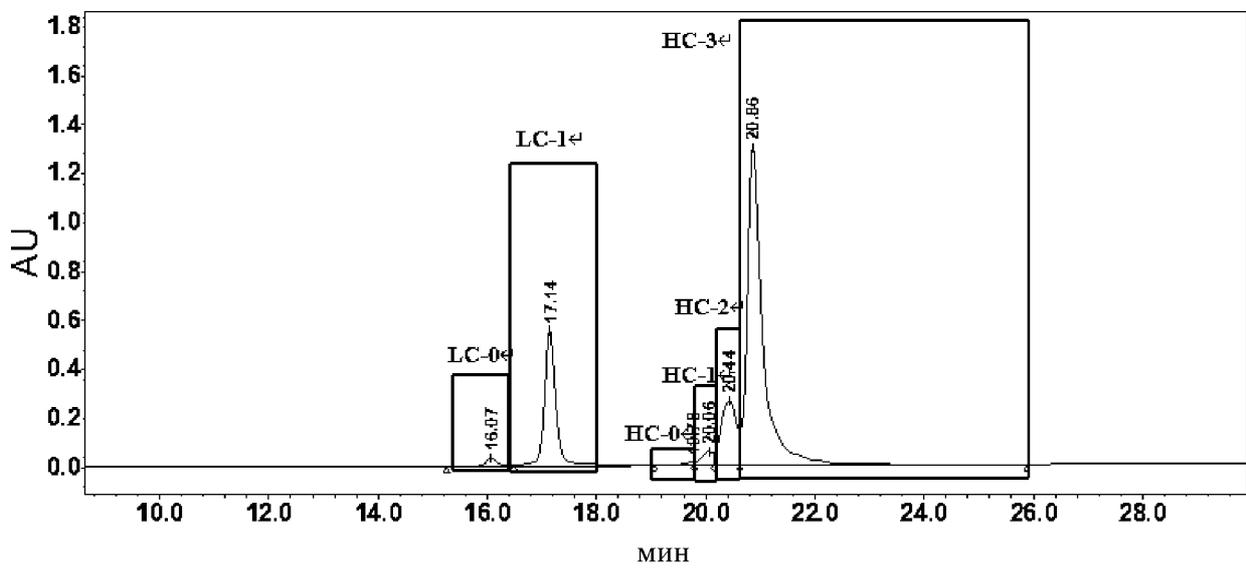
Фиг. 2В



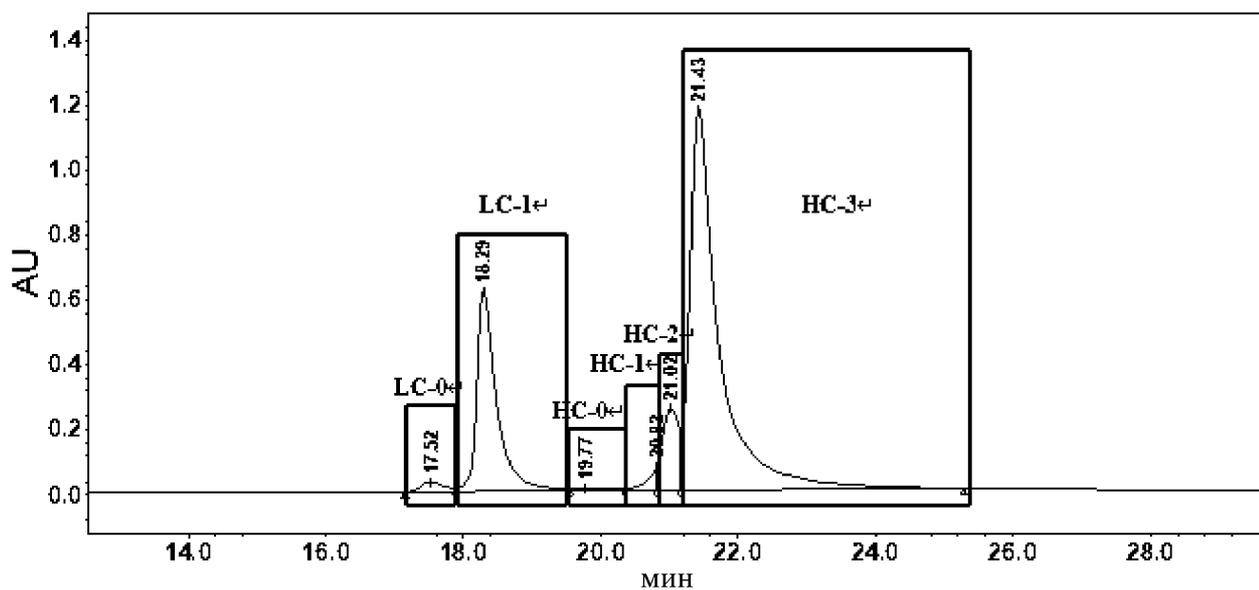
Фиг. 2С



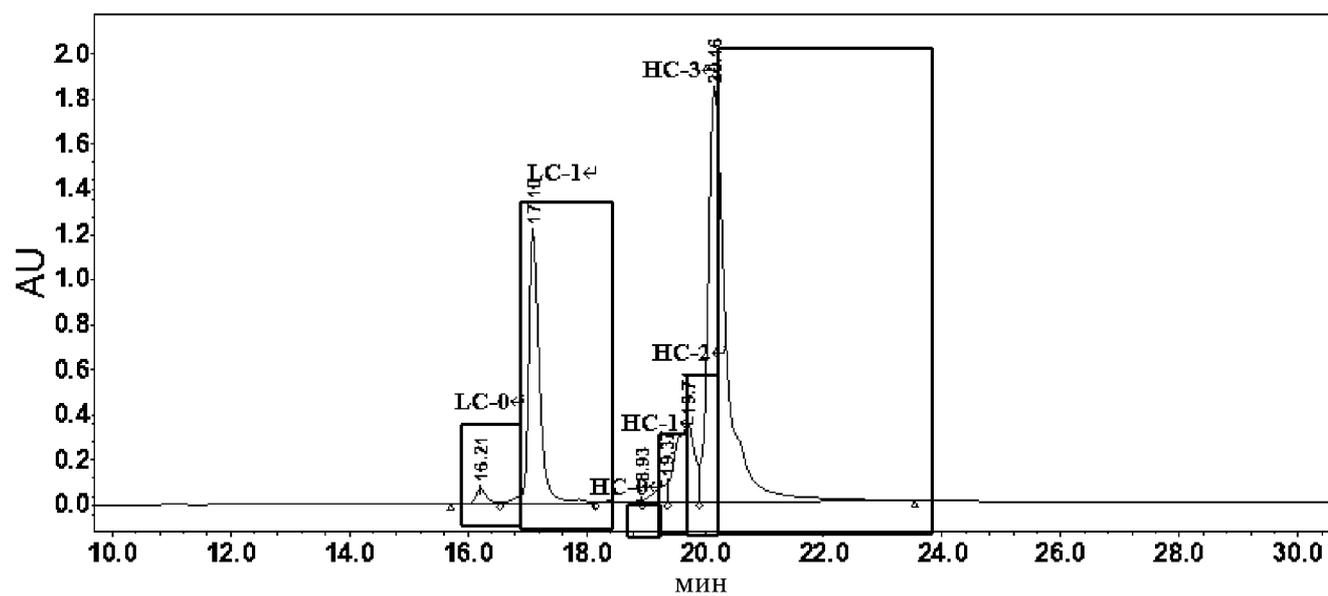
Фиг. 2D



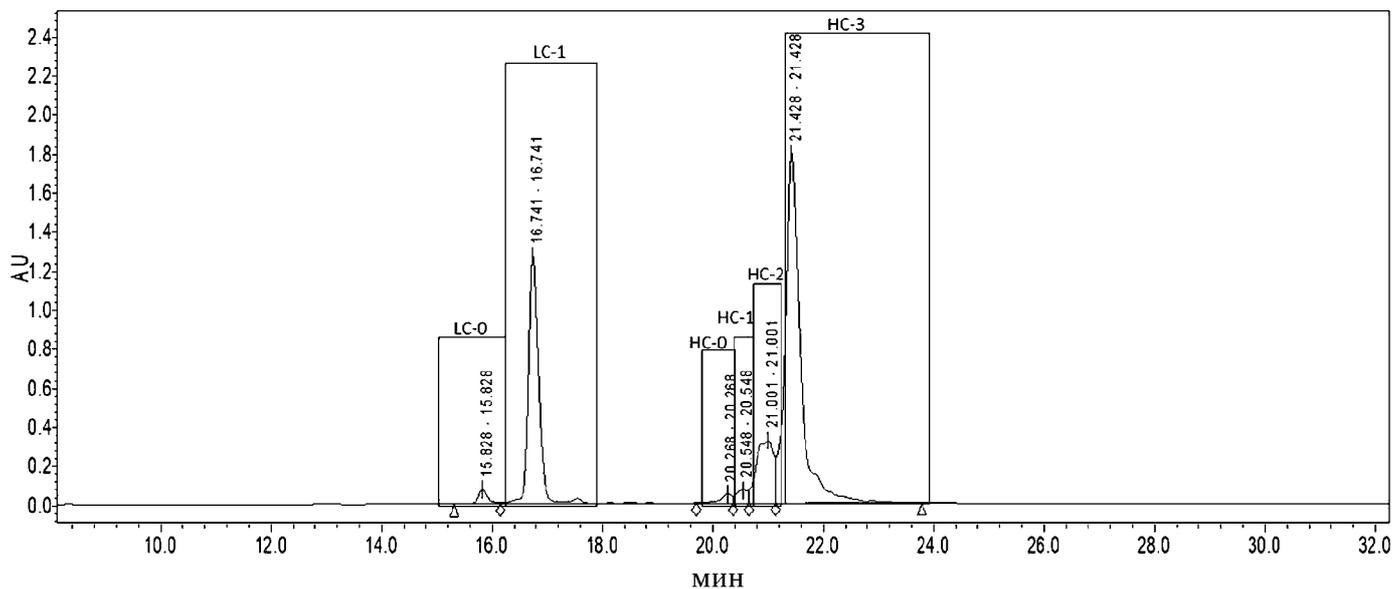
Фиг. 2E



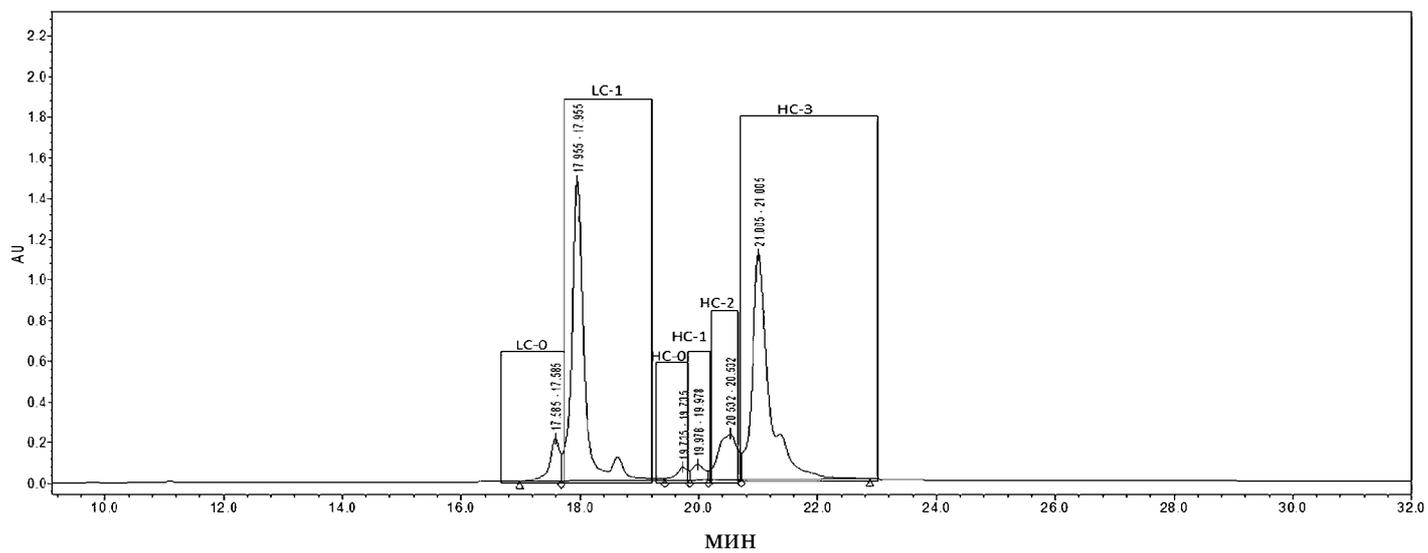
Фиг. 2F



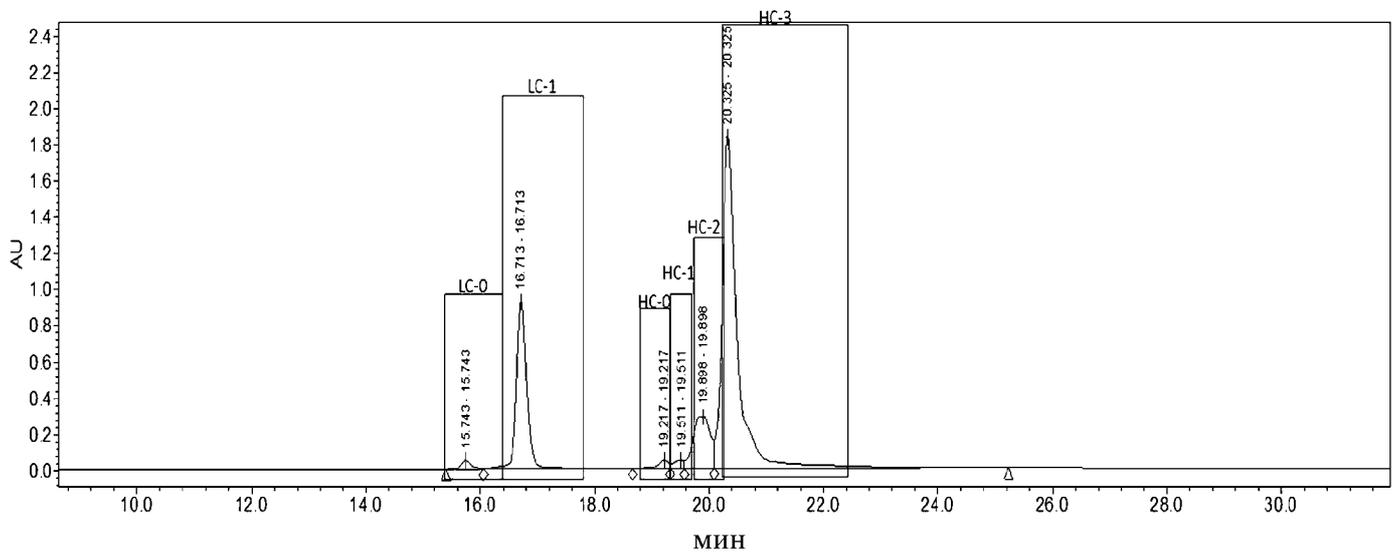
Фиг. 2G



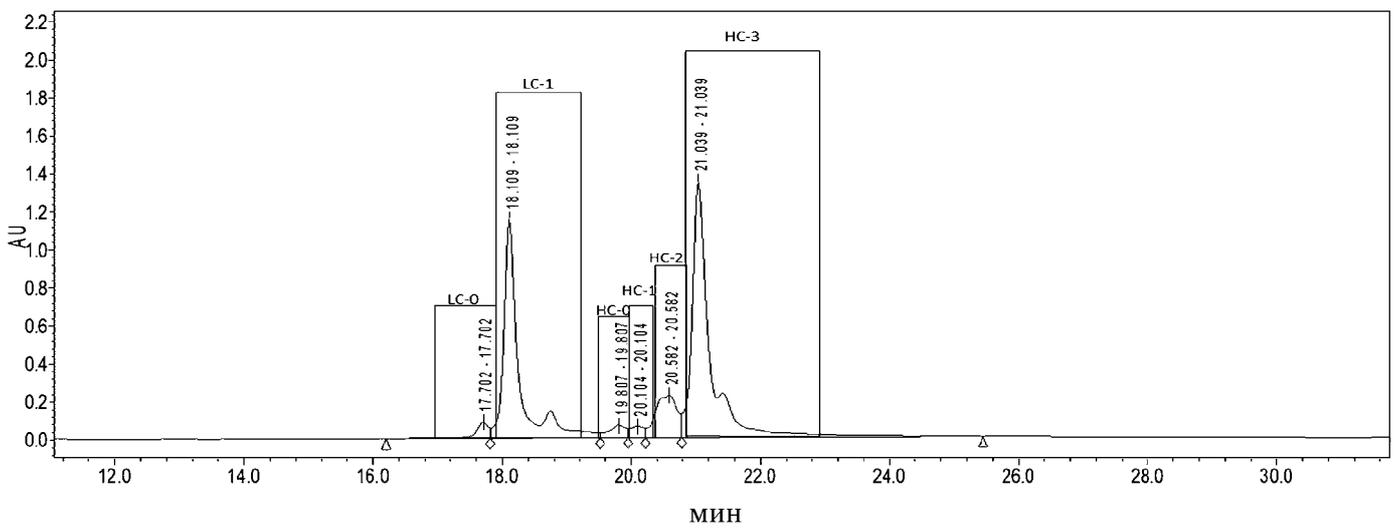
Фиг. 2Н



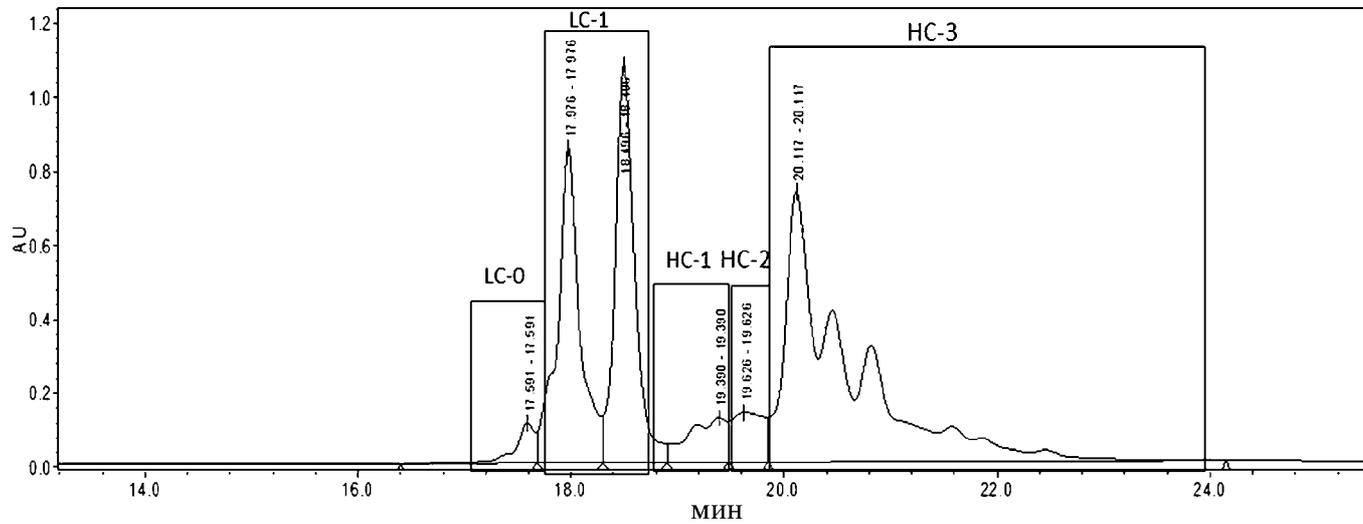
Фиг. 2И



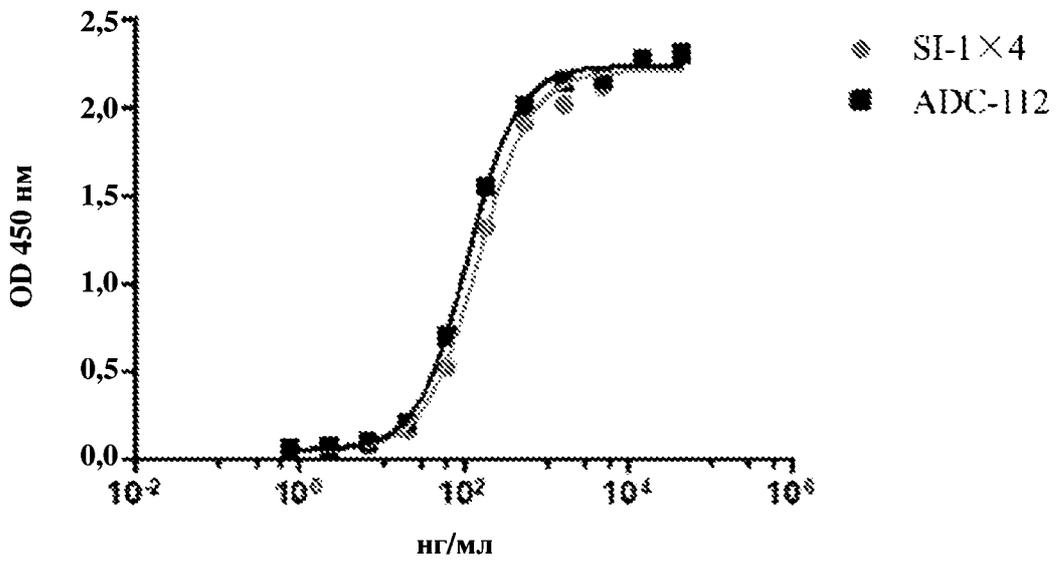
Фиг. 2J



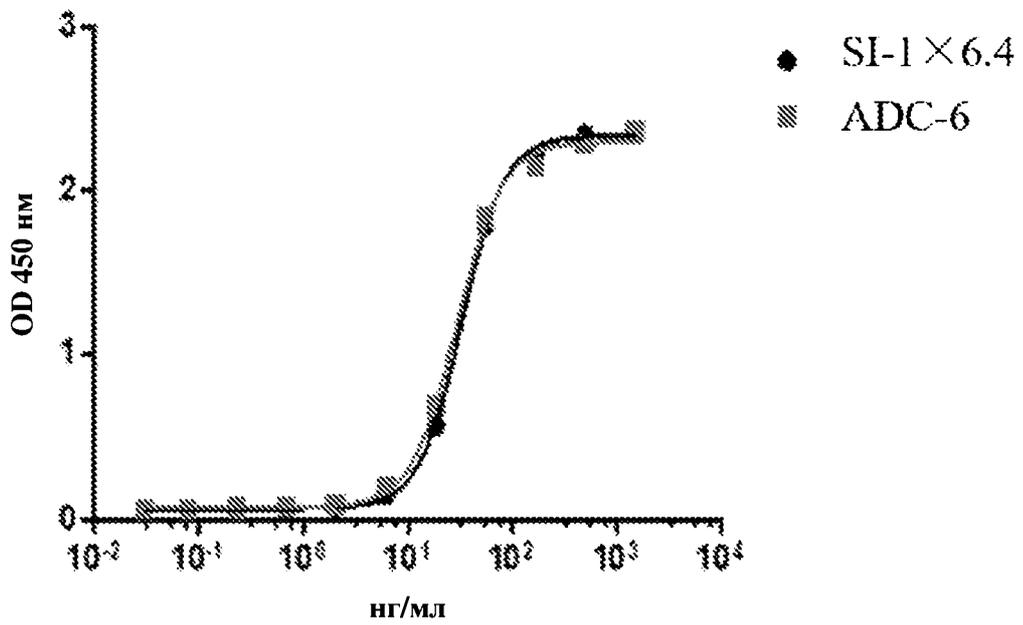
Фиг. 2K



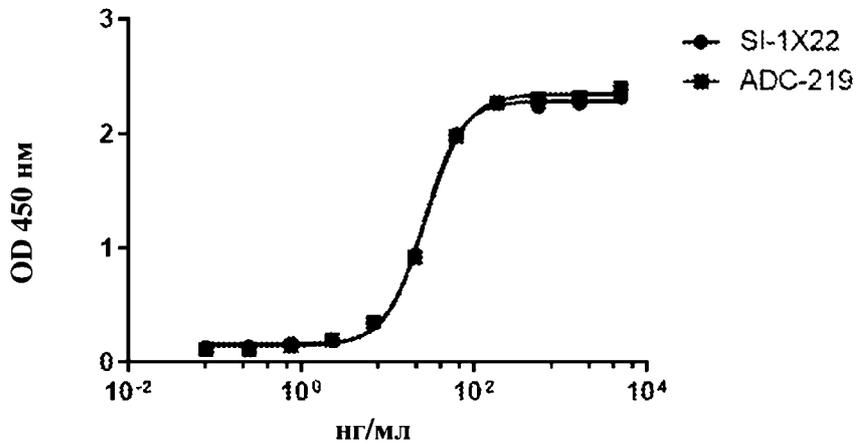
Фиг. 2L



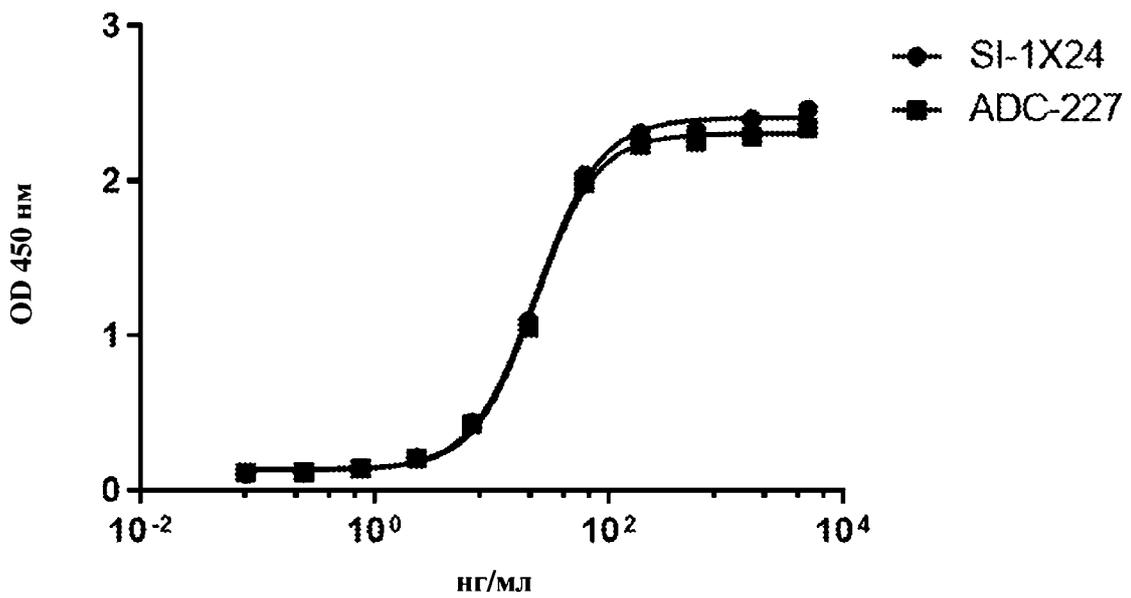
Фиг. 3А



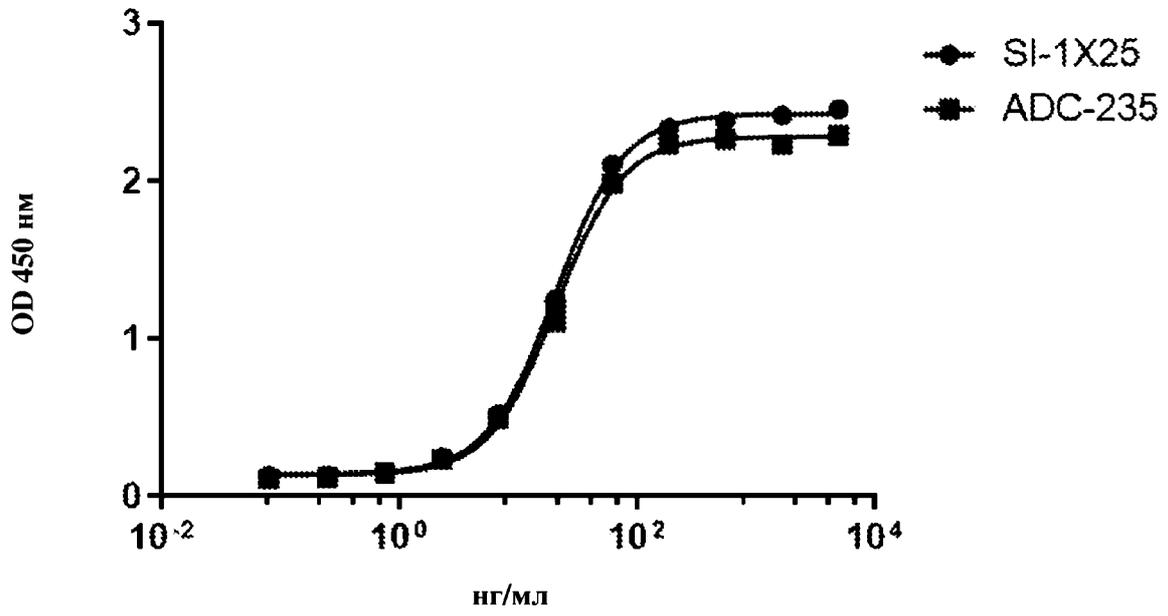
Фиг. 3В



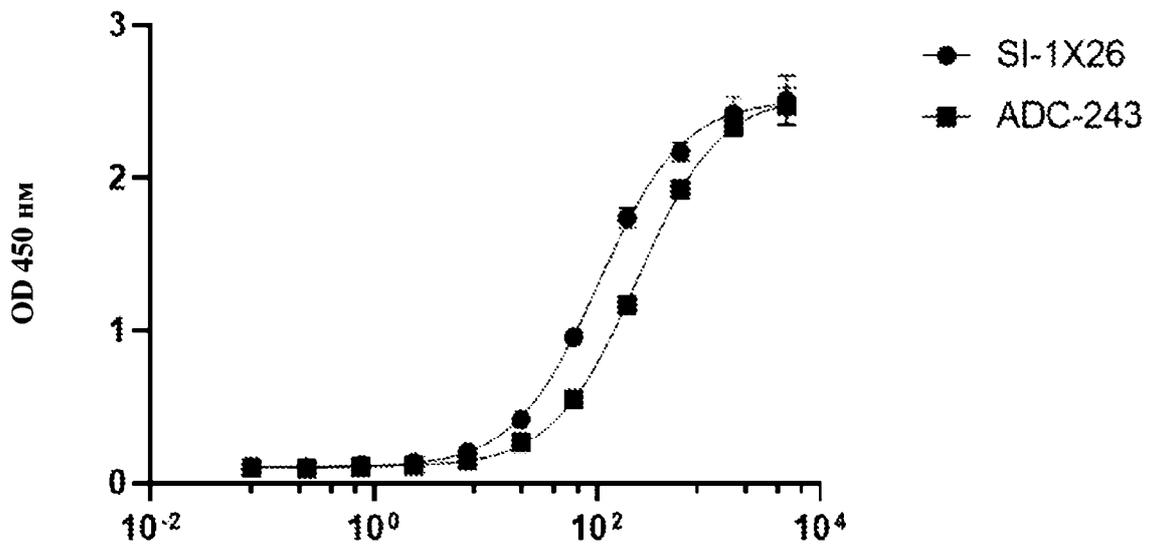
Фиг. 3С



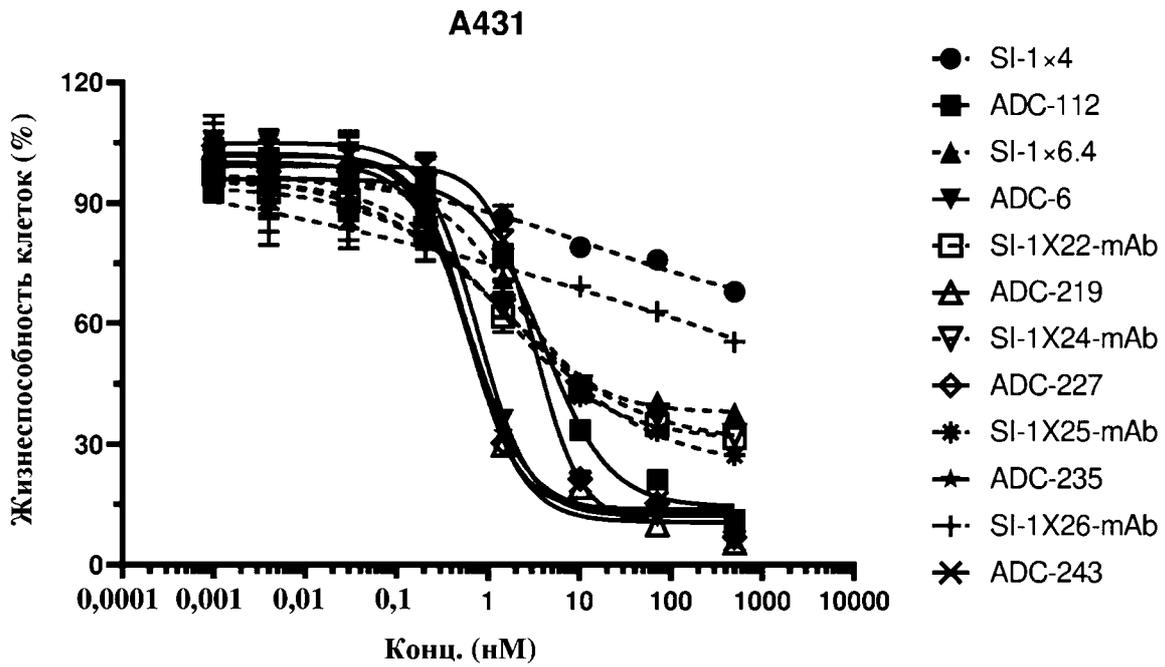
Фиг. 3D



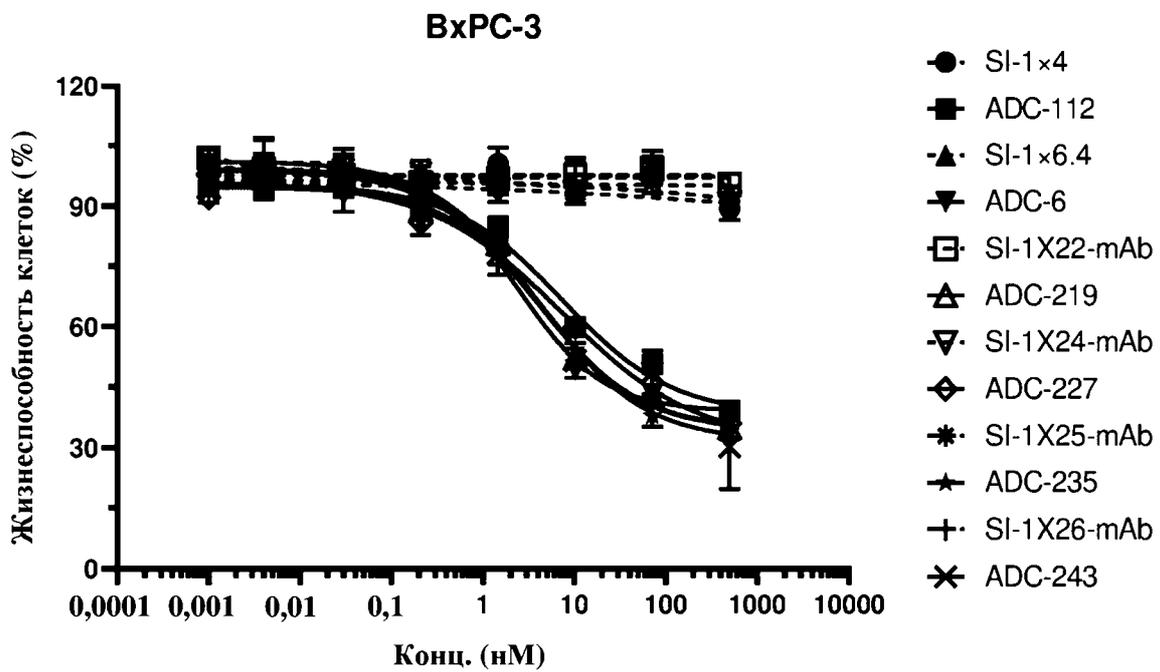
Фиг. 3Е



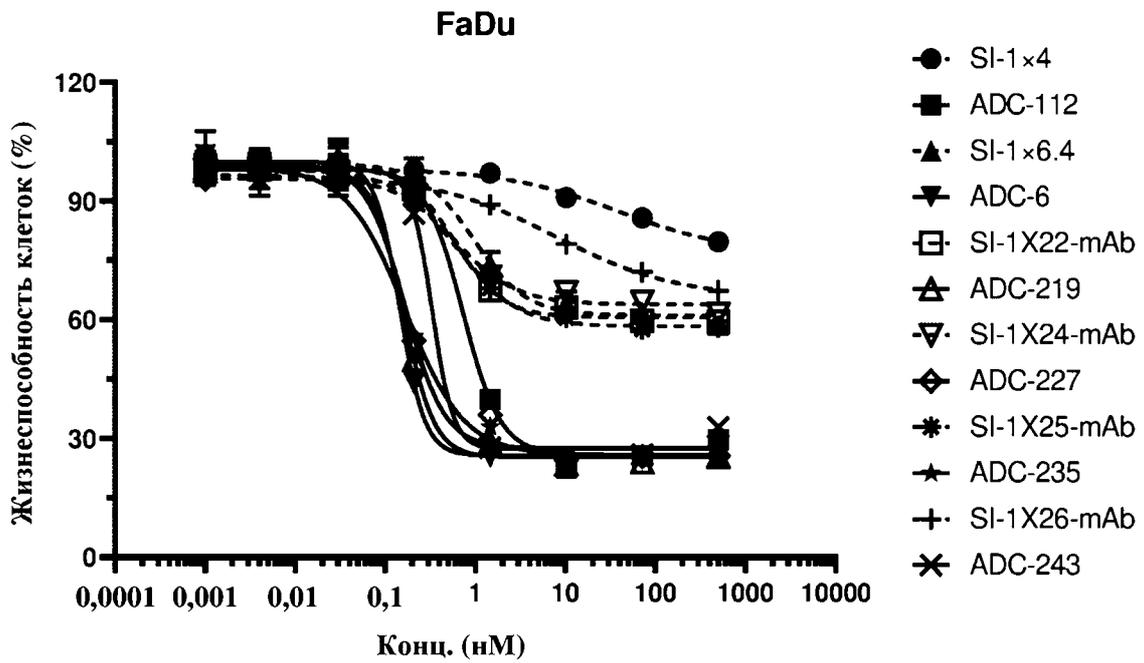
Фиг. 3F



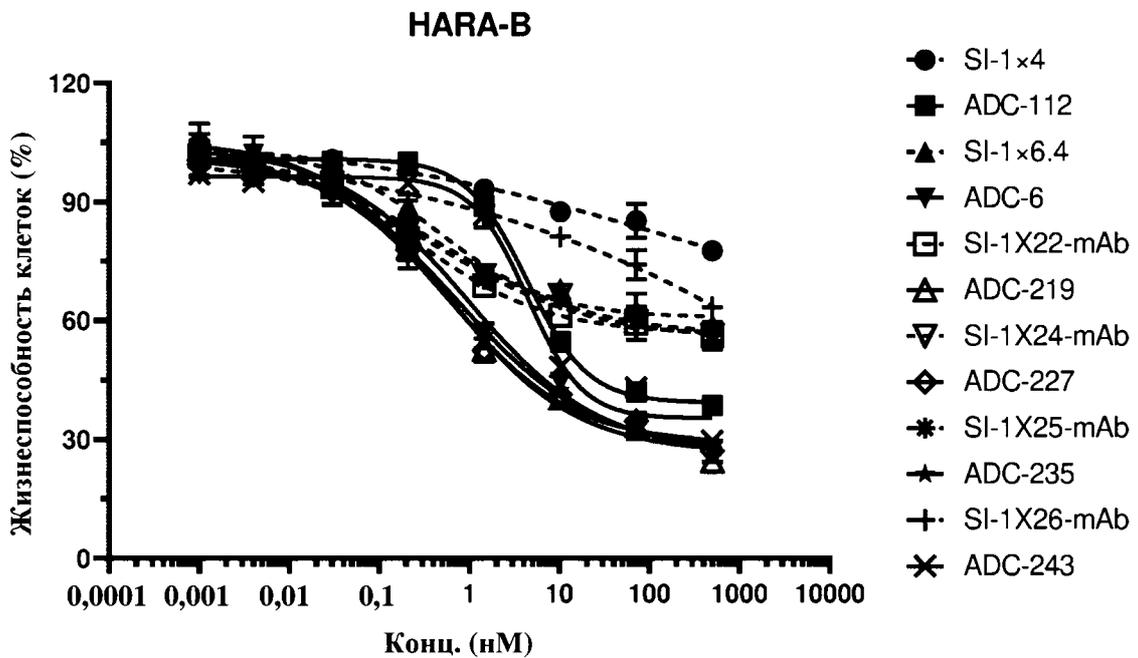
Фиг. 4А



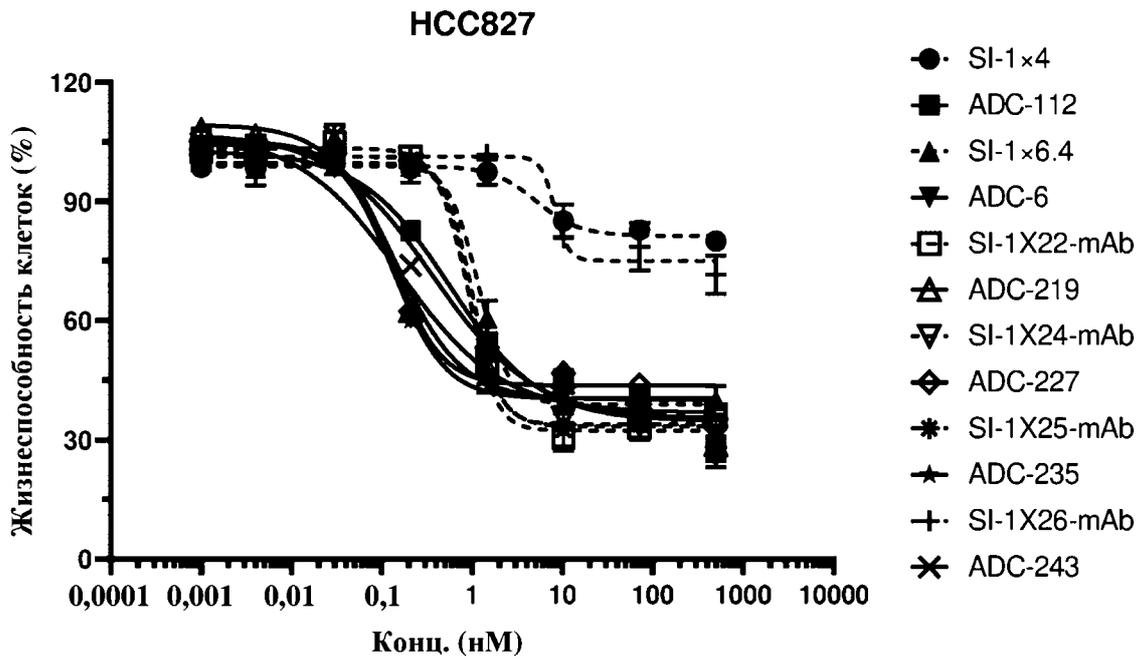
Фиг. 4В



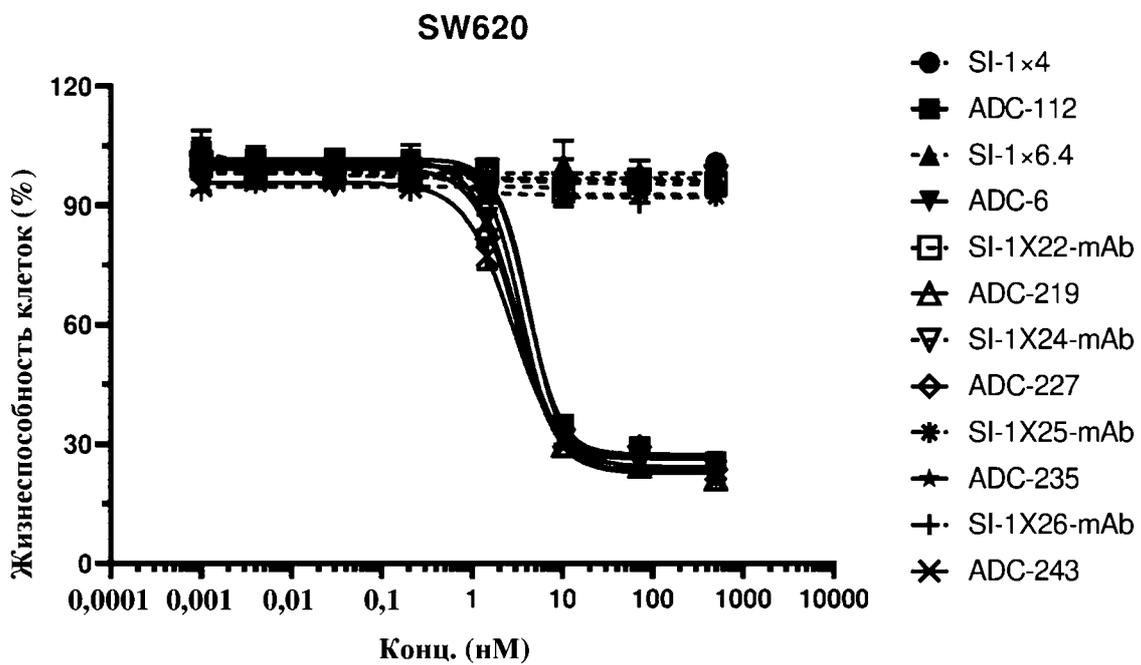
Фиг. 4С



Фиг. 4D

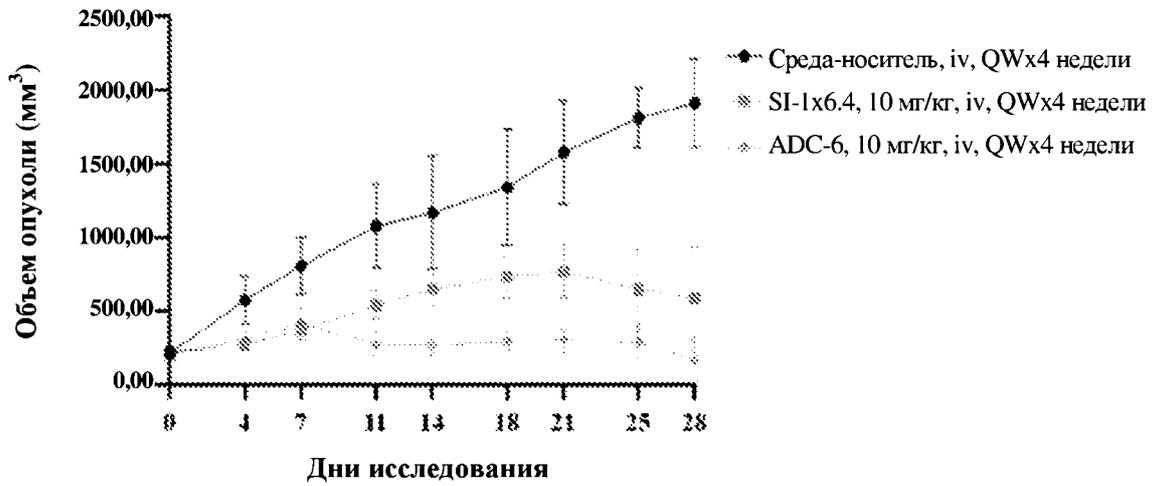


Фиг. 4E



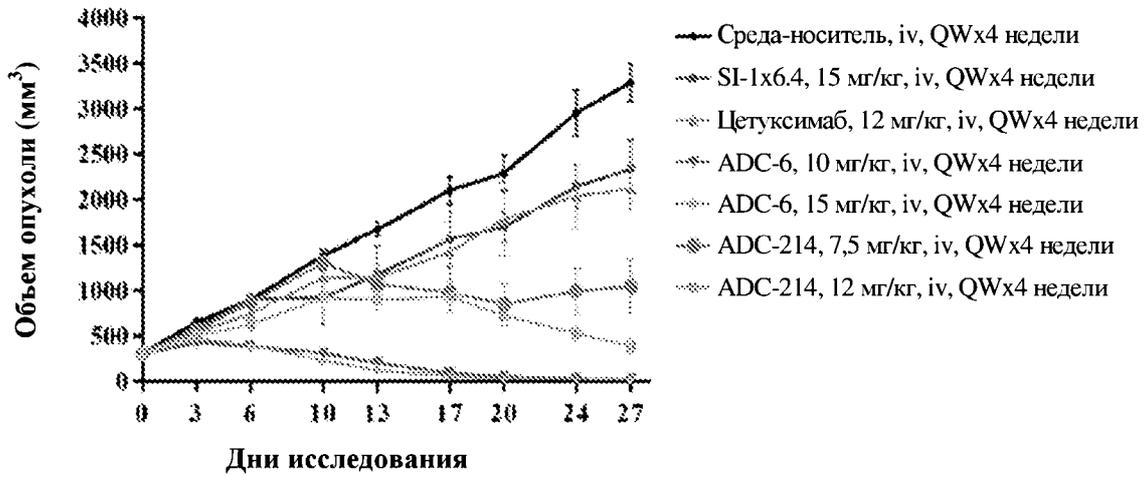
Фиг. 4F

**Одиночная опухоль A431**



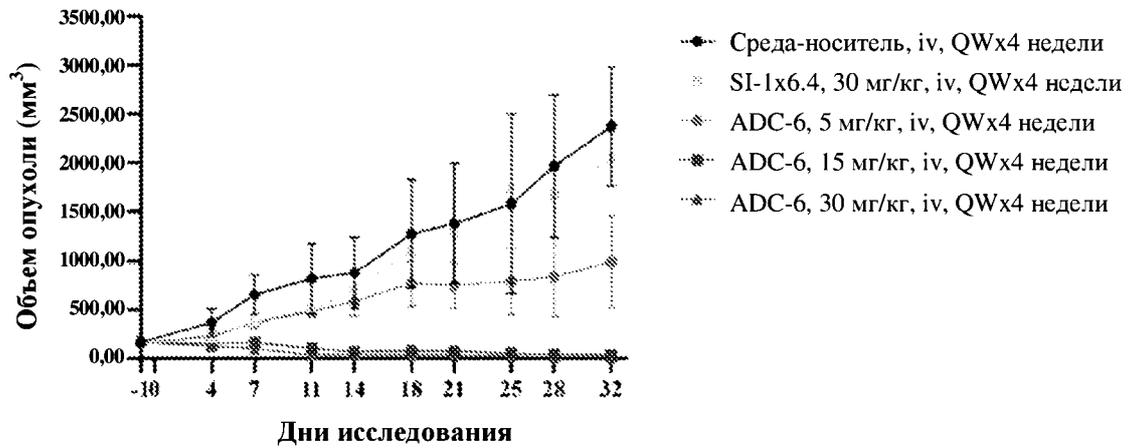
Фиг. 5А

**Одиночная опухоль SW620**

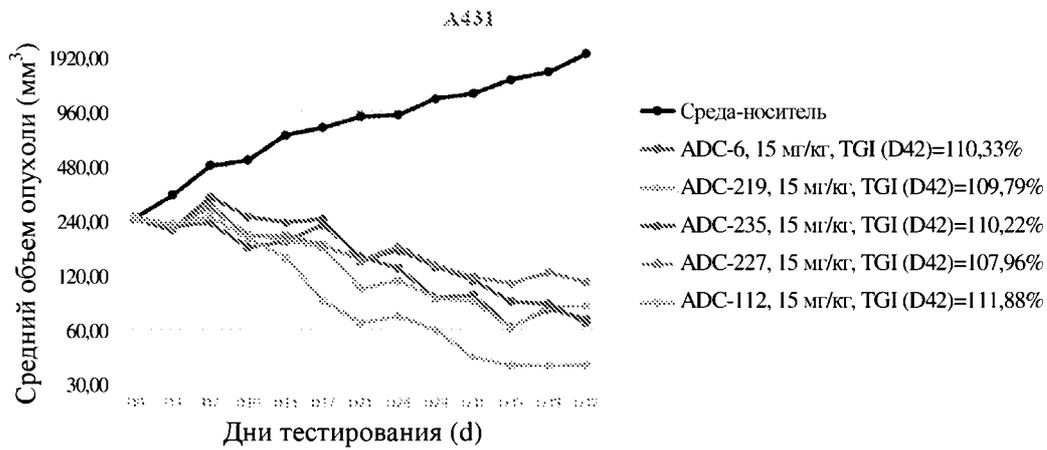


Фиг. 5В

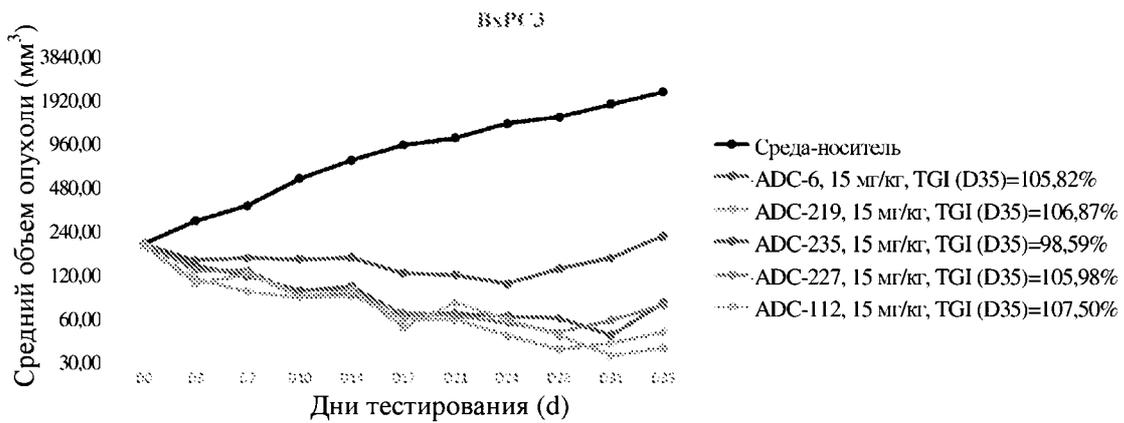
Гетерогенная опухоль A431 + SW620



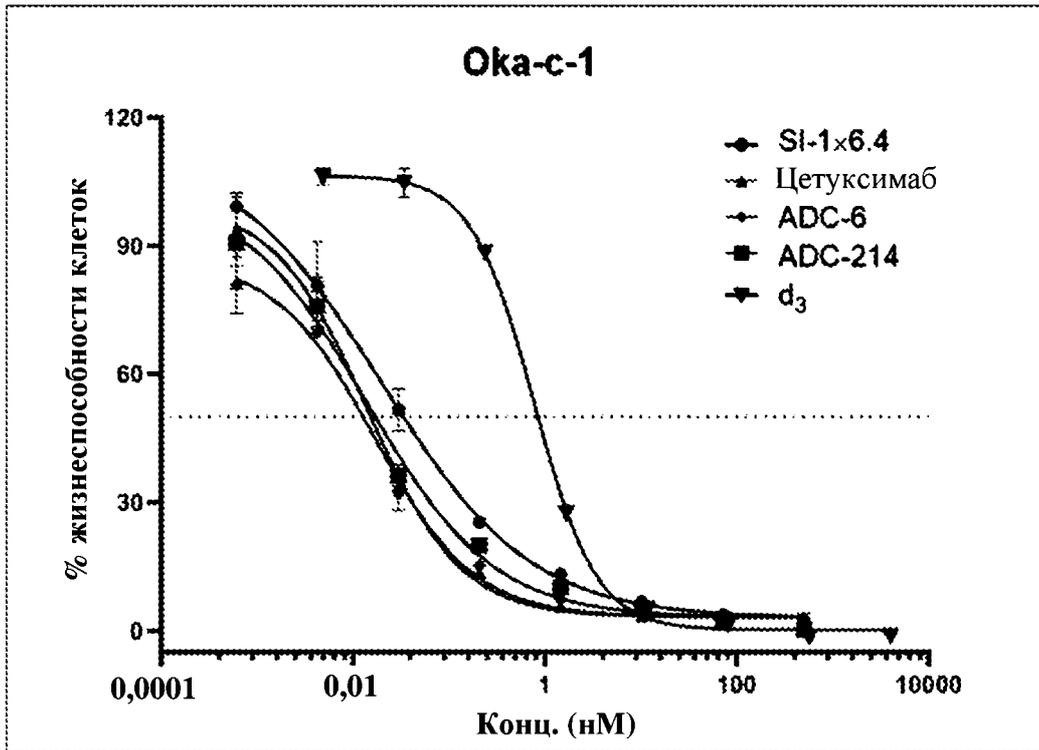
Фиг. 5С



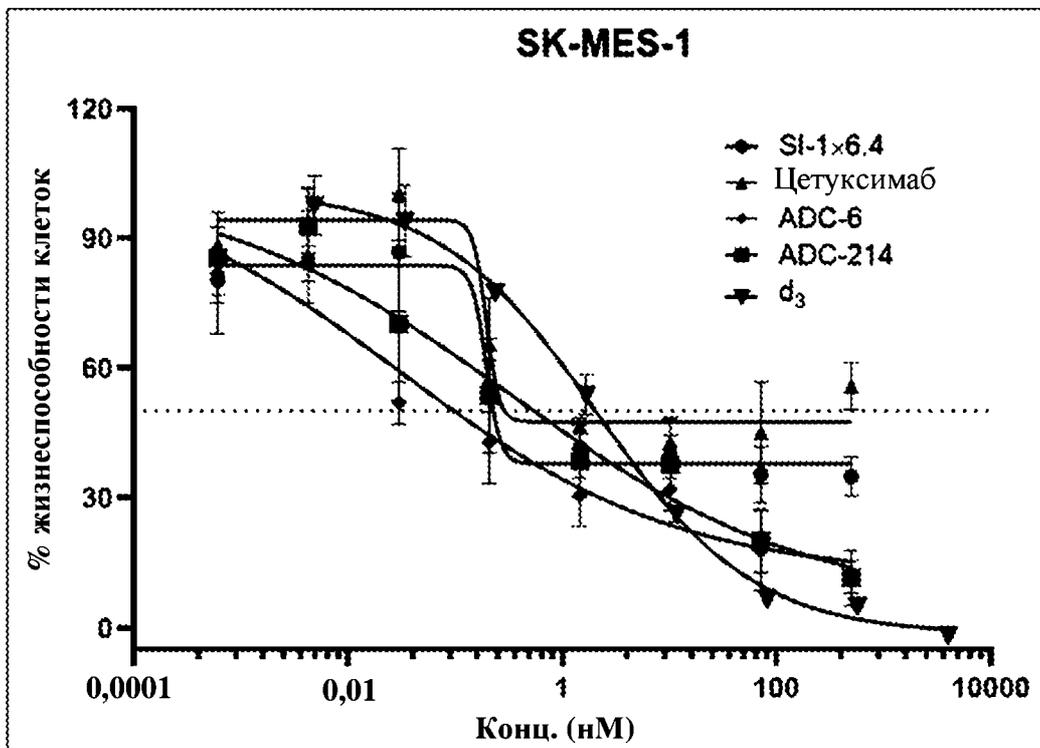
Фиг. 6А



Фиг. 6В



Фиг. 7А



Фиг. 7В