

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491930 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.09.24

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)  
*A61K 47/10* (2017.01)  
*A61K 47/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2023.02.13

---

(54) ПЭГИЛИРОВАННЫЙ КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛА И ГИДРОКСИЛ-НЕСУЩЕГО  
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

---

(31) PCT/CN2022/076012

(32) 2022.02.11

(33) CN

(86) PCT/CN2023/075676

(87) WO 2023/151679 2023.08.17

(71) Заявитель:

ШЭНЬЧЖЭНЬ ИНДЬЮРИНГ  
БАЙОТЕК, ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:

У Дэчунь, Лю Шуминь, Инь Шуцян,  
Вэнь Юй (CN)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

---

(57) В изобретении представлен конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), в частности, ПЭГилированный конъюгат гидроксил-несущего лекарства с моно- или биспецифическим антителом, приготовленный с использованием сайт-специфической конъюгации для получения гомогенного конъюгата с высокой активностью и низкой токсичностью. Изобретение также относится к способу получения конъюгата гидроксил-несущего лекарства с антителом, к композиции, включающей конъюгат гидроксил-несущего лекарства с антителом, и к его применению при лечении заболеваний.

---

A1

202491930

202491930

A1

## ПЭГИЛИРОВАННЫЙ КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛА И ГИДРОКСИЛ- НЕСУЩЕГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

По настоящей международной патентной заявке испрашивается приоритет для международной патентной заявки № PCT/CN2022/076012, поданной 11 февраля 2022 года, содержание которой включено посредством ссылки во всей полноте для всех целей.

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

Настоящее изобретение относится к конъюгату гидроксил-несущего лекарства с антителом, в частности к мультиспецифическому конъюгату гидроксил-несущего лекарства с антителом, где гидроксильная группа полезной нагрузки используется для связывания лекарственного средства с антителом. В частности, настоящее изобретение относится к ПЭГилированному лекарственному конъюгату с моно- или биспецифическим одноцепочечным антителом длительного действия, полученному путем сайт-специфической конъюгации ПЭГилированного лекарственного конъюгата, в котором гидроксильная группа полезной нагрузки связана с полиэтиленгликольным (ПЭГ) компонентом, с моно- или биспецифическим антителом.

### **Предшествующий уровень техники**

Химиотерапия является одним из основных методов лечения рака и широко используется в клинике, но по-прежнему сохраняются серьезные препятствия, такие как лекарственная устойчивость, системная токсичность и узкое терапевтическое окно.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) - это новый класс таргетных препаратов. До 2021 года Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов одобрило двенадцать ADC (за исключением одного гибридного ADC), и более 100 ADC лекарств-кандидатов исследуются почти в 300 клинических испытаниях (отчет об исследовании Beacon Targeted Therapies, Hanson Wade, Великобритания). На сегодняшний день самой большой проблемой при разработке ADC является необходимость введения дозы, очень близкой к максимально переносимой дозе (MTD), чтобы продемонстрировать эффективность лечения, что приводит к очень узкому терапевтическому окну (Beck, A. *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2017, 16, 315–337; Vankemmelbeke, M. *et al.*, *Ther. Deliv.*, 2016, 7, 141–144; Tolcher, A. W. *et al.*, *Ann. Oncol.*, 2016, 27, 2168–2172). Обнаруженные профили токсичности ADC часто сопоставимы с профилями токсичности стандартных химиотерапевтических препаратов, при этом токсичность, ограничивающая дозу, ассоциируется с цитотоксическими компонентами (Coats, S. *et al. Clin. Cancer Res.*, 2019, 25, 5441–5448). В результате 9 из 12 одобренных

FDA ADC должны иметь предупреждения в черной рамке из-за серьезных побочных эффектов, что ограничивает их применение при различных онкологических показаниях, и более 80 ADC сняты с производства в ходе клинических испытаний.

Кроме того, существуют некоторые присущие токсичные свойства, непосредственно связанные с дизайном и структурой ADC. Например, токсичность ADC может быть результатом нецелевого/неопухолевого связывания с Fc-рецепторами (FcγR) или рецепторами лектина (такими, как рецептор маннозы) на нормальных клетках (Donaghy, H. et al. *mAbs*, 2016, 8, 659-671), что приводит к уничтожению клеток, экспрессирующих FcγR или маннозу, вследствие высвобождения цитотоксической полезной нагрузки внутри клеток (Gorovits, B. et al. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62, 217-223). Другая Fc-зависимая токсичность обусловлена агрегатами ADC, которые могут активировать рецепторы Fcγ на иммунных клетках, интернализироваться с помощью FcγR и, в конечном счете, убивать такие мишень-негативные клетки (Aoyama, M. et al. *Pharmaceutical Research*, 2022, 39, 89-103).

Многие натуральные или синтетические цитотоксические соединения могут быть использованы в качестве полезных компонентов для ADC. Большинство разрабатываемых или одобренных ADC используют amino-несущую полезную нагрузку для формирования стабильной карбаматной связи с саморазрушающимся спейсером, который, в свою очередь, связывается с триггерной молекулой. Образующаяся карбаматная связь может гарантировать сохранение связи полезной нагрузки с антителом во время циркуляции в крови. Однако существует еще один большой класс цитотоксических соединений, из которых единственной доступной функциональной группой для связывания с антителом является гидроксильная группа. Для этого класса гидроксил-несущих соединений при разработке ADC проводится не так много исследований и разработок, как для цитотоксических amino-несущих соединений. Такая же стратегия присоединения amino-несущего соединения к антителу с помощью саморазрушающегося фрагмента, такого как 4-аминофениловый спирт (PAB), для образования стабильной карбаматной связи не может быть реализована для соединений с гидроксильной группой в качестве единственной доступной функциональной группы для связывания, и будет формироваться нестабильная карбонатная связь вместо карбаматной связи, что может привести к преждевременному высвобождению полезной нагрузки.

Препараты с антителами, включая ADC, сталкиваются с несколькими препятствиями, влияющими на внутриопухолевое распространение. Основной способ переноса антител внутри опухолей основан на диффузии, на которую влияют размер антител, аффинность связывания, микроокружение опухоли, васкуляризация и

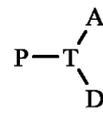
доступность целевого антигена (Xenaki, K. T. et al. *Front Immunol*, 2017, 8, 1287). Большой размер антител или ADC с молекулярной массой около 150 кДа затрудняет экстравазацию из кровеносных сосудов для глубокого проникновения в опухолевую ткань, в то время как фрагменты антител небольшого размера показали значительное увеличение биораспределения в опухоли (Li, Z. et al. *mAbs*, 2016, 8, 113-119). Барьер сайта связывания (BSB) является еще одним препятствием для проникновения антител в опухоль (Miao, L. et al. *ACS Nano*, 2016, 10, 9243-9258). Поскольку высокая аффинность антитела к клеточной мишени является основной причиной возникновения барьера в месте связывания, в ходе исследования была принята стратегия совместного введения неконъюгированного конкурентного антитела с ADC. При использовании этой стратегии было обнаружено, что эффект барьера в месте связывания для ADC снижается, и ADC более равномерно распределяется в солидной опухоли (Evans, R. et al. *Sci Rep.*, 2022, 12, 7677). Однако при таком подходе требуются два препарата, связанных с антителами, что значительно увеличивает стоимость лечения.

Следовательно, существует потребность в новой технологии ADC для решения вышеупомянутых проблем.

### **Изложение сущности изобретения**

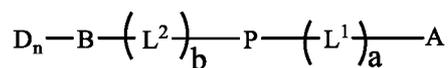
Настоящее изобретение направлено на удовлетворение имеющихся потребностей путем создания модифицированных неиммуногенным полимером конъюгатов гидроксил-несущего лекарственного средства с антителом, полученных путем сайт-специфической конъюгации модифицированного полимером (например, ПЭГилированного) гидроксил-несущего лекарственного конъюгата с фрагментом либо моноспецифического, либо мультиспецифического антитела. Фрагмент антитела может быть одновалентным или поливалентным по отношению к антигенам.

В одном из аспектов изобретения предлагается молекула полимерного



лекарственного конъюгата с антителом формулы Ia. P может быть неиммуногенным полимером. T может быть многофункциональным (например, трифункциональным) низкомолекулярным линкерным компонентом и иметь по меньшей мере одну функциональную группу, которая способна к сайт-специфической конъюгации с моноспецифическим или мультиспецифическим антителом или белком. A может быть любым моноспецифическим или мультиспецифическим антителом или белком. D может быть любой гидроксил-несущей цитотоксической молекулой ( $n \geq 1$ ), и каждый D может быть одинаковым или разным.

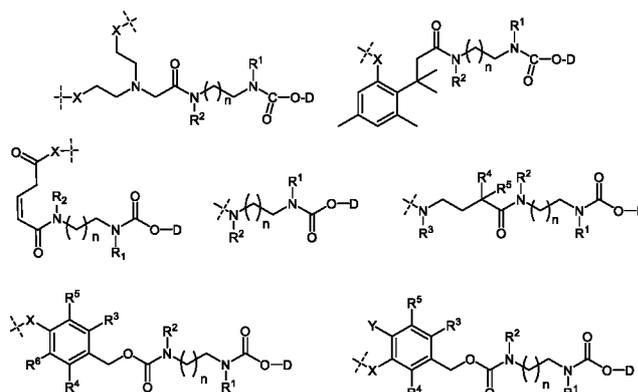




Формула Ic,

где каждая из переменных является такой, как определено в Формуле Ib.

В некоторых вариантах осуществления каждая ветвь В содержит удлиняющий спейсер (необязательный), триггерный компонент, например, аминокислотную последовательность, или дисульфидный компонент, или углеводный компонент, такой как  $\beta$ -глюкуронид или  $\beta$ -галактозид, соединенный с гидроксил-несущим лекарственным средством D через один или несколько саморазрушающихся спейсеров, расщепляемых, например, катепсинами В, плазмином, матриксными металлопротеиназами (ММР), глутатионом, членами семейства тиоредоксинов (WCGH/РСК), тиоредуктазой (Arunachalam, B. *et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 745–750). Примеры одного или нескольких саморазрушающихся спейсеров включают, без ограничения указанными, следующее:



где n равно 1 или 2; Y представляет собой углеводный компонент;  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$  могут представлять собой H, или  $C_{1-10}$  алкил, или  $-(CH_2CH_2-O)_{1-10}-CH_3$ , или любую их комбинацию, а X представляет собой O, S или N. В таких вариантах осуществления D может представлять собой любую малую молекулу, пептид или их производное, содержащее активную функциональную группу –ОН.

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой моноспецифическое антитело, которое является одновалентным или двухвалентным по отношению к антигенам, например, моноспецифическое одноцепочечное антитело, которое является одновалентным или двухвалентным по отношению к антигенам.

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой мультиспецифическое антитело, например, биспецифическое одноцепочечное антитело.

В некоторых вариантах осуществления два связывающих домена биспецифического антитела связываются с двумя одинаковыми молекулами опухоли-

ассоциированного антигена (ТАА), но с двумя разными эпитопами, или связываются с двумя разными молекулами ТАА.

В другом варианте осуществления А представляет собой одноцепочечное анти-PDL1 × анти-CD47 антитело, которое связывается с PDL1 и CD47, экспрессируемыми на раковых клетках.

В другом варианте осуществления А представляет собой одноцепочечное анти-HER2(1) × анти-HER2(2) антитело, которое связывается с HER2, экспрессируемым на раковых клетках.

В еще одном варианте осуществления А представляет собой одноцепочечное анти-cMet(1) × анти-cMet(2) антитело, которое связывается с cMet, экспрессируемым на раковых клетках.

В некоторых вариантах осуществления антитело имеет аминокислотную последовательность, как показано в SEQ ID № 1, SEQ ID № 2, SEQ ID № 3, SEQ ID № 4, SEQ ID № 5 или SEQ ID № 6.

В некоторых вариантах осуществления два связывающих домена одноцепочечных антител соединены посредством линкера, и при этом линкер может содержать фрагмент, такой как цистеин, или неприродный аминокислотный остаток для сайт-специфической конъюгации антитела с L<sup>1</sup>.

В некоторых вариантах осуществления D может быть выбран из любого гидроксил-несущего ДНК-сшивающего агента, ингибитора микротрубочек, алкилятора ДНК, ингибитора топоизомеразы, деструкторов белков, агонистов STING или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления D может быть выбран из Dxd, SN38, калихеамицинов, пирролобензодиазепинов, сибиромидина, томаймицина, дуокармицинов, неотрамицинов, DC-81, псимберина, алкалоида барвинка, лаулималида, таксана, тубулизинов, ризоксина, дискодермолида, таккалонолида А или В, или AF или AJ, таккалонолида AI-эпоксида, эпотилона А и В, паклитаксела, доцетаксела, доксорубицина, камптотецина, тафурамицина А, PNU-159682, унциаламицина, β-аманитина, аматоксинов, тайланстатинов или любых гидроксил-несущих цитотоксических соединений, или их аналогов/производных, или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления D представляет собой SN38 или Dxd (мощный ингибитор топоизомеразы I), или дуокармицин (алкилатор ДНК), или их аналоги/производные, или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления D представляет собой SN38 и соединен с саморазрушающимся спейсером, таким как 4-аминобензиловый спирт (PAB), через -NR<sup>1</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>-NR<sup>2</sup>-(EDA), где n = 1 или 2, R<sup>1</sup> или R<sup>2</sup> могут быть H, низкомолекулярным

алкилом или  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-10}-\text{CH}_3$  (от 1 до 10 единиц ПЭГ); РАВ связан с триггерным компонентом, таким как валин-цитруллин.

В других вариантах осуществления D является Dxd и соединен с саморазрушающимся спейсером, таким как 4-аминобензиловый спирт (РАВ), через  $-\text{NR}^1-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2-\text{NR}^2-(\text{EDA})$ , где  $n = 1$  или  $2$ ,  $\text{R}^1$  или  $\text{R}^2$  могут быть H, низкомолекулярным алкилом или  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-10}-\text{CH}_3$  (от 1 до 10 единиц ПЭГ); РАВ связан с триггерным компонентом, таким как валин-цитруллин.

В другом варианте осуществления D представляет собой дуокармицин DM и соединен с саморазрушающимся спейсером, таким как 4-аминобензиловый спирт (РАВ), через  $-\text{NR}^1-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2-\text{NR}^2-(\text{EDA})$ , где  $n = 1$  или  $2$ ,  $\text{R}^1$  или  $\text{R}^2$  могут быть H, низкомолекулярным алкилом или  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-10}-\text{CH}_3$  (от 1 до 10 единиц ПЭГ); РАВ связан с триггерным компонентом, таким как валин-цитруллин.

В любом из вышеуказанных аспектов и вариантов осуществления неиммуногенный полимер может быть выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), декстранов, углеводных полимеров, полиалкиленоксида, поливиниловых спиртов, гидроксипропилметакриламида (ГПМА) и их сополимера. Предпочтительно неиммуногенным полимером является ПЭГ, такой как разветвленный ПЭГ или линейный ПЭГ, в котором ПЭГ может быть связан с многофункциональным компонентом Т либо постоянной связью, либо расщепляемой связью. Общая молекулярная масса ПЭГ может составлять от 3000 до 100000 Дальтон, например, от 5000 до 80000, от 10000 до 60000, от 10000 до 30000 или от 20000 до 40000 Дальтон, например, приблизительно 10000, 20000, 30000 или 40000 Дальтон.

Функциональная группа для сайт-специфической конъюгации, которая образует связь между  $(\text{L}^1)_a$  и белком А, может быть выбрана из группы, состоящей из тиола, малеимида, 2-пиридилдитио варианта, ароматического сульфона или винилсульфона, акрилата, бром- или йодоацетамида, азиды, алкина, дибензоциклооктила (ДВСО), карбонила, 2-аминобензальдегидной или 2-аминоацетофеноновой группы, гидразида, оксима, ацилтрифторбората калия, О-карбамоилгидроксиламина, транс-циклооктена, тетразина, триарилфосфина, бороновой кислоты, йода и т.п.

В некоторых вариантах осуществления один из  $(\text{L}^1)_a$  может содержать соединение, образованное из азиды и алкина или из малеимида и тиола. В некоторых вариантах осуществления алкин может быть дибензоциклооктилом (ДВСО).

В некоторых вариантах осуществления Т может быть лизином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, серином, тирозином или любыми другими молекулами

с трифункциональными группами, Р может быть ПЭГ, а у может быть равным 1, в то время как алкин может быть дибензоциклооктилом (DBCO).

В некоторых вариантах осуществления А может быть получен из меченого азидом моно- или мультиспецифического антитела или антигенсвязывающего белка, включая фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, нанотело или любой его антигенсвязывающий фрагмент, или их комбинацию, где азид может быть конъюгирован с алкином в соответствующем (L<sub>1</sub>)<sup>a</sup>. В других вариантах осуществления А может быть получен из меченого тиолом моно- или мультиспецифического антитела или антигенсвязывающего белка, включая фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, нанотело или любой его антигенсвязывающий фрагмент, или их комбинацию, где тиол может быть конъюгирован с малеимидом в соответствующем (L<sub>1</sub>)<sup>a</sup>.

Вышеописанный конъюгат антитело-лекарственное средство может быть получен в соответствии со способом, включающим: (i) получение конъюгата лекарственного средства с неиммуногенным полимером с концевой функциональной группой, которая способна к сайт-специфической конъюгации с антителом, белком или его модифицированной формой; и (ii) сайт-специфическую конъюгацию конъюгата лекарственного средства и неиммуногенного полимера с антителом или белком, или его модифицированной структурой с образованием соединения Формулы Ia, Ib или Ic. В некоторых примерах антитело или белок могут быть модифицированы с помощью низкомолекулярного линкера перед конъюгацией.

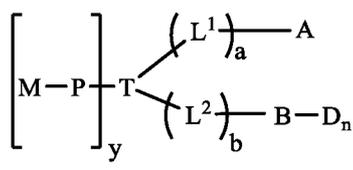
Изобретение также предлагает фармацевтическую композицию, содержащую описанный выше конъюгат гидроксил-несущего лекарства с антителом, например, ПЭГилированный гидроксил-несущий лекарственный конъюгат с моно- или биспецифическим одноцепочечным антителом, который является одновалентным или поливалентным по отношению к антигенам, и фармацевтически приемлемый носитель.

Изобретение также предлагает способ лечения заболевания у нуждающегося в нем субъекта, включающий введение эффективного количества вышеописанного конъюгата гидроксил-несущего лекарства с антителом, например, ПЭГилированного лекарственного конъюгата с моно- или биспецифическим одноцепочечным антителом, который является одновалентным или поливалентным по отношению к антигенам.

Детали одного или нескольких вариантов осуществления изобретения изложены в описании ниже. Другие признаки, задачи и преимущества изобретения будут очевидны из чертежа, описания и формулы изобретения.

В настоящем описании также представлены следующие варианты осуществления.

Вариант осуществления 1. Соединение формулы (Ib)



где

P представляет собой неиммуногенный полимер;

M представляет собой H или концевую кэп-группу, выбранную из C<sub>1-50</sub> алкила и арила, где один или несколько атомов углерода указанного алкила при необходимости замещены гетероатомом;

y представляет собой целое число, выбранное от 1 до 10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

A представляет собой антителио или его антигенсвязывающий фрагмент;

T представляет собой многофункциональный низкомолекулярный линкерный компонент;

каждый из L<sup>1</sup> и L<sup>2</sup> независимо является гетеро- или гомобифункциональным линкером;

каждый из a и b является целым числом, выбранным из диапазона 0-10, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10;

B представляет собой разветвленный линкер, в котором каждая ветвь имеет аминокислотную последовательность, или дисульфидную связь, или углеводный компонент, или расщепляемую связь, связанную с одним или несколькими саморазрушающимися спейсерами, где расщепление аминокислотной последовательности, или дисульфидной связи, или углеводного компонента, или расщепляемой связи ферментом запускает механизм саморазрушения, приводящий к высвобождению гидроксил-несущего D или его производных;

каждый из D независимо представляет собой цитотоксическую гидроксил-несущую малую молекулу или пептид; a n представляет собой целое число, выбранное из 1-25, например, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20, 10-15, 15-25, 15-20 или 20-25, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25.

Вариант осуществления 2. Соединение по варианту осуществления 1, где T представляет собой трифункциональный линкер, полученный из молекулы с тремя функциональными группами, независимо выбранными из гидроксила, амина, гидразинила, азида, алкена, алкина, карбоксила (альдегида, кетона, сложного эфира, карбоновой кислоты, ангидрида, ацилгалогенида), тиола, дисульфида, нитрила, эпоксида,

имины, нитро и галогениды, причем связь между T и  $(L^1)_a$  и связь между T и  $(L^2)_b$  являются одинаковыми или различными.

Вариант осуществления 3. Соединение по варианту 2, где T представляет собой лизин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, серин, тирозин или любые другие циклические или нециклические молекулы с трифункциональными группами или их производное.

Вариант осуществления 4. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-3, в котором одна из функциональных групп на линкерном конце  $(L^1)_a$  способна к сайт-специфической конъюгации с A, и выбрана из группы, состоящей из тиола, малеимида, 2-пиридилдитио варианта, ароматического сульфона или винилсульфона, акрилата, бром- или йодоацетамида, азиды, алкина, дибензоциклооктила (DBCO), карбонила, 2-аминобензальдегидной или 2-аминоацетофеноновой группы, гидразида, оксима, ацилтрифторбората калия, O-карбамоилгидроксиламина, транс-циклооктена, тетразина, триарилфосфина, бороновой кислоты и йода.

Вариант осуществления 5. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-4, где антитело является моноспецифическим или мультиспецифическим полноразмерным антителом, одноцепочечным антителом, нанотелом (однодоменным антителом) или его антигенсвязывающим доменом.

Вариант осуществления 6. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-5, где антитело представляет собой моноспецифическое одноцепочечное антитело.

Вариант осуществления 7. Соединение по варианту осуществления 6, где моноспецифическое одноцепочечное антитело связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (ТАА), таким как Her2, cMet, PDL1 или CD47.

Вариант осуществления 8. Соединение по варианту осуществления 7, где моноспецифическое одноцепочечное антитело имеет два связывающих домена, связывающихся с Her2.

Вариант осуществления 9. Соединение по варианту осуществления 8, где моноспецифическое одноцепочечное антитело имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3.

Вариант осуществления 10. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-5, где антитело представляет собой биспецифическое антитело, например, биспецифическое одноцепочечное антитело.

Вариант осуществления 11. Соединение по варианту осуществления 10, где два связывающих домена биспецифического антитела связываются с одним и тем же опухоль-ассоциированным антигеном (ТАА), связываются с двумя различными ТАА или

связываются с ТАА и антигеном, экспрессируемым на Т-клетках (например, компонентом Т-клеточного рецептора) или НК-клетках.

Вариант осуществления 12. Соединение по варианту осуществления 11, где антитело представляет собой одноцепочечное биспецифическое анти-PDL1 × анти-CD47 антитело, или одноцепочечное биспецифическое анти-HER2(1) × анти-HER2(2) антитело, или одноцепочечное биспецифическое анти-cMet(1) × анти-cMet(2) антитело.

Вариант осуществления 13. Соединение по варианту осуществления 12, где антитело имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID №: 1 or SEQ ID №: 2 or SEQ ID №: 6.

Вариант осуществления 14. Соединение по любому из вариантов осуществления 6-9, где два связывающих домена моноспецифического одноцепочечного антитела связаны посредством линкера, и где линкер содержит компонент, такой как цистеиновый или неприродный аминокислотный остаток, для сайт-специфической конъюгации антитела с  $(L^1)_a$ .

Вариант осуществления 15. Соединение по любому из вариантов осуществления 10-13, где два связывающих домена биспецифического одноцепочечного антитела связаны посредством линкера, и где линкер содержит компонент, такой как цистеиновый или неприродный аминокислотный остаток, для сайт-специфической конъюгации антитела с  $(L^1)_a$ .

Вариант осуществления 16. Соединение по любому из вариантов осуществления 14-15, где неприродный аминокислотный остаток выбран из группы, состоящей из генетически кодируемых алкен-лизинов (таких как N6-(гекс-5-еноил)-L-лизин), 2-амино-8-оксононановой кислоты, m- или p-ацетилфенилаланина, аминокислоты, несущей боковую цепь β-дикетона (такой, как 2-амино-3-(4-(3-оксобутаноил)фенил)пропановая кислота), (S)-2-амино-6-(((1R,2R)-2-азидоциклопентилокси)карбониламино)гексановой кислоты, азидогомоаланина, пирролизинового аналога N6-((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)-L-лизина, (S)-2-амино-6-пент-4-инамидогексановой кислоты, (S)-2-амино-6-((проп-2-инилокси)карбониламино)гексановой кислоты, (S)-2-амино-6-((2-азидоэтокси)карбониламино)гексановой кислоты, p-азидофенилаланина, пара-азидофенилаланина, Nε-акрилоил-1-лизина, Nε-5-норборнен-2-илоксикарбонил-1-лизина, N-ε-(циклоокт-2-ин-1-илокси)карбонил)-L-лизина, N-ε-(2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)этил)карбонил-L-лизина, и генетически кодируемой тетразиновой аминокислоты (такой, как 4-(6-метил-s-тетразин-3-ил)аминофенилаланин).

Вариант осуществления 17. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-16, где D выбран из ДНК-сшивающего агента, ингибитора микротрубочек, алкилятора ДНК, ингибитора топоизомеразы, деструктора белка, агониста STING или их комбинации.

Вариант осуществления 18. Соединение по варианту осуществления 17, где D выбран из Dxd, SN38, калихеамицинов, пирролобензодиазепинов, сибиромидина, томаймицина, дуокармицинов, неотрамицинов, DC-81, псимберина, алкалоида барвинка, лаулималида, таксана, тубулизинов, ризоксина, дискодермолида, таккалонолида А или В, или АF или АJ, таккалонолида АI-эпоксида, эпотилона А и В, паклитаксела, доцетаксела, доксорубицина, камптотецина, тафурамицина А, PNU-159682, унциаламицина, β-аманитина, аматоксинов, тайланстатинов или любых цитотоксических соединений, содержащих гидроксилы, или их аналогов/производных, или их комбинаций.

Вариант осуществления 19. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-18, где неиммуногенным полимером является полиэтиленгликоль (ПЭГ).

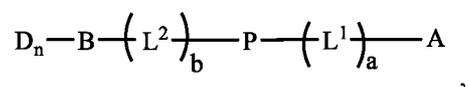
Вариант осуществления 20. Соединение по варианту осуществления 19, где ПЭГ представляет собой линейный ПЭГ или разветвленный ПЭГ.

Вариант осуществления 21. Соединение по любому из вариантов осуществления 19-20, где по меньшей мере один конец полиэтиленгликоля кэпирован метилом или низкомолекулярным алкилом.

Вариант осуществления 22. Соединение по любому из вариантов осуществления 19-21, в котором общая молекулярная масса ПЭГ составляет от 3000 до 100000 Дальтон.

Вариант осуществления 23. Соединение по любому из вариантов осуществления 19-22, в котором ПЭГ связан с трифункциональным или тетрафункциональным или любым другим циклическим или нециклическим многофункциональным компонентом Т (например, лизином) посредством постоянной связи или расщепляемой связи.

Вариант 24. Соединение Формулы (Ic)



где

P представляет собой линейный ПЭГ;

A представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

каждый из  $L^1$  и  $L^2$  независимо является бифункциональным линкером;

каждый из a и b является целым числом, выбранным из диапазона 0-10, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10;

B представляет собой разветвленный линкер, в котором каждая ветвь имеет аминокислотную последовательность, или дисульфидную связь, или углеводный

компонент, или расщепляемую связь, связанную с одним или несколькими саморазрушающимися спейсерами, где расщепление аминокислотной последовательности, или дисульфидной связи, или углеводного компонента осуществляется ферментом, например, катепсинами В, плазмином, матриксными металлопротеиназами (ММР), глутатионом, членами семейства тиоредоксинов (WCGH/РСК), тиоредуктазой запускает механизм саморазрушения для высвобождения D или его производных;

каждый из D независимо является цитотоксической гидроксил-несущей малой молекулой или пептидом;

n представляет собой целое число, выбранное из диапазона 1-25, например, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20, 10-15, 15-25, 15-20 или 20-25, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25.

Вариант осуществления 25. Соединение по варианту осуществления 24, где одна из функциональных групп на линкерном конце (L<sup>1</sup>)<sub>a</sub> способна к сайт-специфической конъюгации с А, и выбрана из группы, состоящей из тиола, малеимида, 2-пиридилдитио варианта, ароматического сульфона или винилсульфона, акрилата, бромо- или йодоацетамида, азида, алкина, дибензоциклооктила (DBCO), карбонила, 2-аминобензальдегидной или 2-аминоацетофеноновой группы, гидразида, оксима, ацилтрифторбората калия, О-карбамоилгидроксиламина, транс-циклооктена, тетразина, триарилфосфина, бороновой кислоты и йода.

Вариант осуществления 26. Соединение по любому из вариантов осуществления 24-25, где антитело является моноспецифическим или мультиспецифическим полноразмерным антителом, одноцепочечным антителом, нанотелом (однодоменным антителом) или его антигенсвязывающим доменом.

Вариант осуществления 27. Соединение по варианту осуществления 26, где антитело представляет собой моноспецифическое одноцепочечное антитело, при необходимости, где моноспецифическое одноцепочечное антитело связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (ТАА), таким как Her2, cMet, PDL1 или CD47.

Вариант осуществления 28. Соединение по варианту осуществления 27, где моноспецифическое одноцепочечное антитело имеет два связывающих домена, связывающихся с Her2.

Вариант осуществления 29. Соединение по варианту осуществления 28, где моноспецифическое одноцепочечное антитело имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID № 3.

Вариант осуществления 30. Соединение по варианту осуществления 26, где антитело представляет собой биспецифическое антитело, например, биспецифическое одноцепочечное антитело.

Вариант осуществления 31. Соединение по варианту осуществления 30, где два связывающих домена биспецифического антитела связываются с одним и тем же опухоль-ассоциированным антигеном (ТАА), связываются с двумя различными ТАА или связываются с ТАА и антигеном, экспрессируемым на Т-клетках (например, компонентом Т-клеточного рецептора) или НК-клетках.

Вариант осуществления 32. Соединение по варианту осуществления 30, где антитело представляет собой одноцепочечное биспецифическое анти-PDL1 × анти-CD47 антитело, или одноцепочечное биспецифическое анти-HER2(1) × анти-HER2(2) антитело, или одноцепочечное биспецифическое анти-cMet(1) × анти-cMet(2) антитело.

Вариант осуществления 33. Соединение по варианту осуществления 32, где антитело имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID №: 1, или SEQ ID №: 2, или SEQ ID №: 6.

Вариант осуществления 34. Соединение по любому из вариантов осуществления 27-29, где два связывающих домена моноспецифического одноцепочечного антитела связаны посредством линкера, и где линкер содержит компонент, такой как цистеиновый или неприродный аминокислотный остаток, для сайт-специфической конъюгации антитела с (L<sup>1</sup>)<sub>a</sub>.

Вариант осуществления 35. Соединение по любому из вариантов осуществления 30-33, где два связывающих домена биспецифического одноцепочечного антитела связаны посредством линкера, и где линкер содержит фрагмент, такой как цистеиновый или неприродный аминокислотный остаток, для сайт-специфической конъюгации антитела с (L<sup>1</sup>)<sub>a</sub>.

Вариант осуществления 36. Соединение по любому из вариантов осуществления 34-35, где неприродный аминокислотный остаток выбран из группы, состоящей из негенетически кодируемых алкен-лизинов (таких как N6-(гекс-5-еноил)-L-лизин), 2-амино-8-оксононановой кислоты, m- или p-ацетилфенилаланина, аминокислоты, несущей боковую цепь β-дикетона (такой, как 2-амино-3-(4-(3-оксобутаноил)фенил)пропановая кислота), (S)-2-амино-6-(((1R,2R)-2-азидоциклопентилокси)карбониламино)гексановой кислоты, азидогомоаланина, пирролизинового аналога N6-((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)-L-лизина, (S)-2-амино-6-пент-4-инамидогексановой кислоты, (S)-2-амино-6-((проп-2-инилокси)карбониламино)гексановой кислоты, (S)-2-амино-6-((2-азидоэтокси)карбониламино)гексановой кислоты, p-азидофенилаланина, пара-

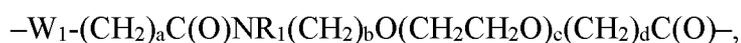
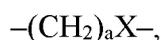
азидофенилаланина, Nε-акрилоил-L-лизина, Nε-5-норборнен-2-илоксикарбонил-L-лизина, N-ε-(циклоокт-2-ин-1-илокси)карбонил-L-лизина, N-ε-(2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)этил)карбонил-L-лизина и генетически кодируемой тетразиновой аминокислоты (такой, как 4-(6-метил-s-тетразин-3-ил)аминофенилаланин).

Вариант осуществления 37. Соединение по любому из вариантов осуществления 24-36, где D выбран из ДНК-сшивающего агента, ингибитора микротрубочек, алкилятора ДНК, ингибитора топоизомеразы, агониста STING, деструктора белка или их комбинации.

Вариант осуществления 38. Соединение по варианту осуществления 37, где гидроксил-несущий D выбран из Dxd, SN38, калихеамицинов, пирролобензодиазепинов, сибиромидина, томаймицина, дуокармицинов, неотрамицинов, DC-81, псимберина, алкалоида барвинка, лаулималида, таксана, тубулизинов, ризоксина, дискодермолида, таккалонолида А или В, или АF или АJ, таккалонолида АИ-эпоксида, эпотилона А и В, паклитаксела, доцетаксела, доксорубицина, камптотецина, тафурамицина А, PNU-159682, унциаламицина, β-аманитина, аматоксинов, тайланстатинов или любых гидроксил-несущих цитотоксических соединений, или их аналогов/производных, или их комбинации.

Вариант осуществления 39. Соединение по любому из вариантов осуществления 24-38, где общая молекулярная масса ПЭГ составляет от 3000 до 100000 Дальтон.

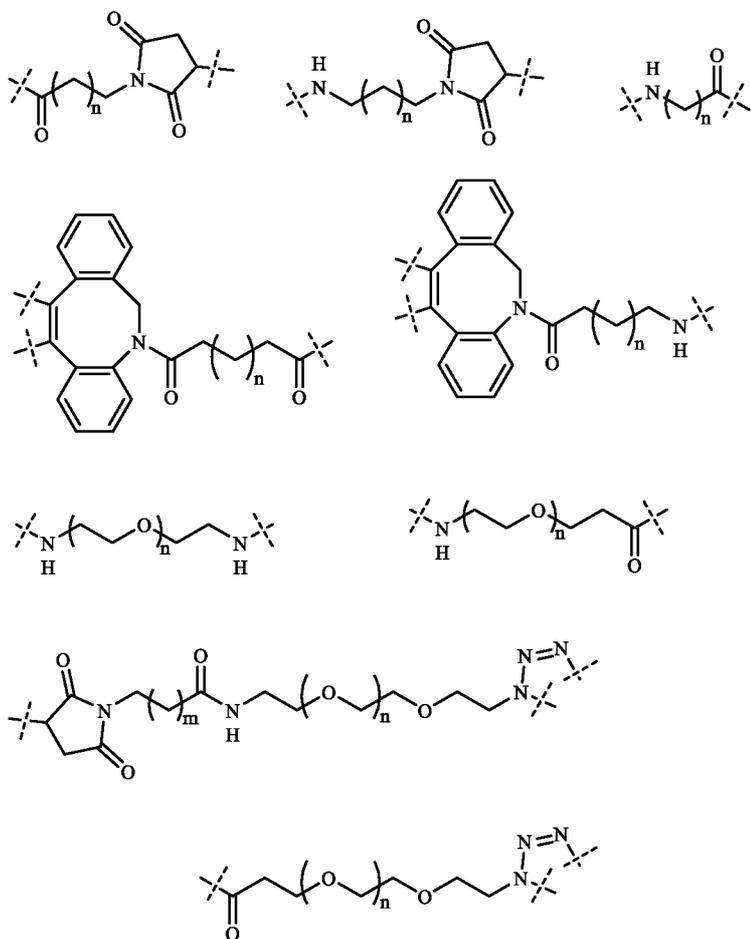
Вариант осуществления 40. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-39, где каждой из L<sup>1</sup> и L<sup>2</sup> независимо выбран из группы, состоящей из:



где каждый из a, b, c, d и e независимо является целым числом, выбранным от 0 до 25, например, 0-20, 0-15, 0-10, 0-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20, 10-15, 15-25, 15-20 или 20-25, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25; каждый из X и Y независимо выбран из C(=O), NR<sub>2</sub>, S, O, N<sub>3</sub>, CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>, компонента на основе DBCO, или отсутствует; каждый из R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> независимо представляет собой водород, C<sub>1-10</sub> алкил или (CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>C(=O); W<sub>1</sub> и/или W<sub>3</sub> получены из компонента на основе малеимида, и W<sub>2</sub> представляет собой триазолил- или тетразолил-

содержащую группу; и гетероциклическая группа выбрана из компонента, полученного из малеимида, или из компонента на основе тетразолила или триазолила.

Вариант осуществления 41. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-39, где каждый из  $L^1$  и  $L^2$  независимо выбран из:



где каждый из  $n$  и  $m$  независимо является целым числом, выбранным от 0 до 20, например, 0-15, 0-10, 0-5, 5-20, 5-15, 5-10, 10-20, 10-15, или 15-20, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

Вариант осуществления 42. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-41, где разветвленный линкер В содержит удлиняющий спейсер (необязательный), триггерный элемент, один или несколько саморазрушающихся спейсеров, или любую их комбинацию, при необходимости, где триггерным элементом является аминокислотная последовательность, или дисульфидная связь, или  $\beta$ -глюкуронидный, или  $\beta$ -галактозидный триггерный компонент, расщепляемый такими ферментами, как катепсин В, плазмин, матриксные металлопротеиназы (ММР),  $\beta$ -глюкуронидазы,  $\beta$ -галактозидазы, глутатион, представители семейства тиоредоксинов (WCGH/РСК) или тиоредуктаза.

Вариант осуществления 43. Соединение по варианту осуществления 42, где разветвленный линкер В выбран из:

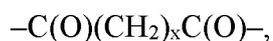
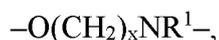


Trp-Cit, D-Phe-Phe-Lys, Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Gly-Phe-Gly or Ala-Leu-Ala-Leu;

РАВ представляет собой парааминобензиловый спирт;

EDA представляет собой  $-\text{NR}^1(\text{CH}_2)_m\text{NR}^2-$ , где  $m$  равно 2 или 3, каждый из  $\text{R}^1$  и  $\text{R}^2$  независимо выбран из H, низкомолекулярного алкила или  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_l-\text{CH}_3$ , где  $l$  представляет собой целое число, выбранное из 1-10;

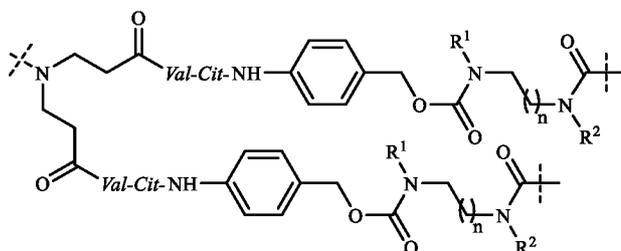
каждый из них представляет собой удлиняющий спейсер, содержащий линкерную цепь, независимо выбранную из:

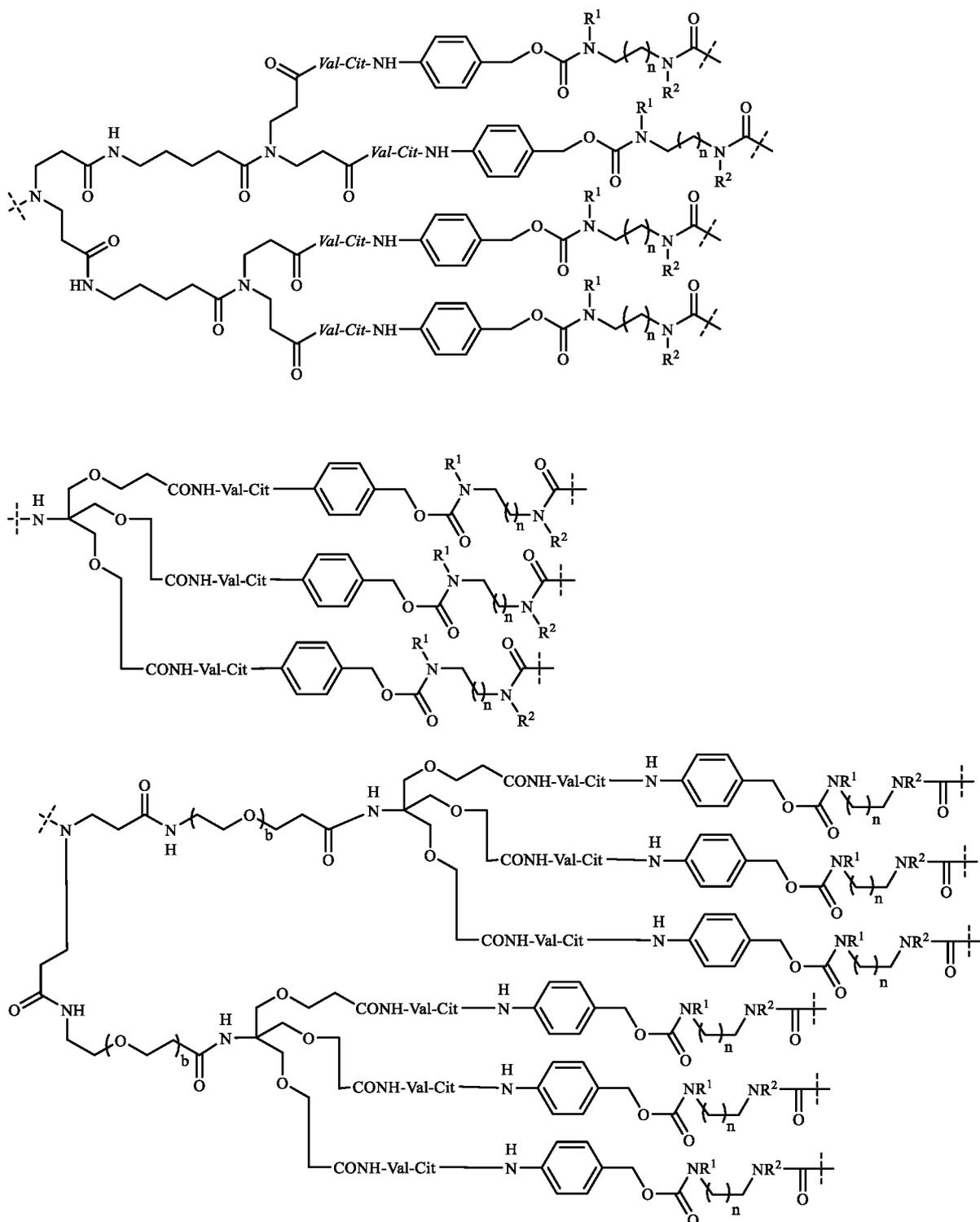


или отсутствует,

где каждый из  $x$ ,  $y$  и  $z$  независимо является целым числом, выбранным от 0 до 25, например, 0-20, 0-15, 0-10, 0-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20, 10-15, 15-25, 15-20 или 20-25, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25; и каждый из  $\text{R}^1$  и  $\text{R}^2$  независимо представляет водород или  $\text{C}_{1-10}$  алкильную группу.

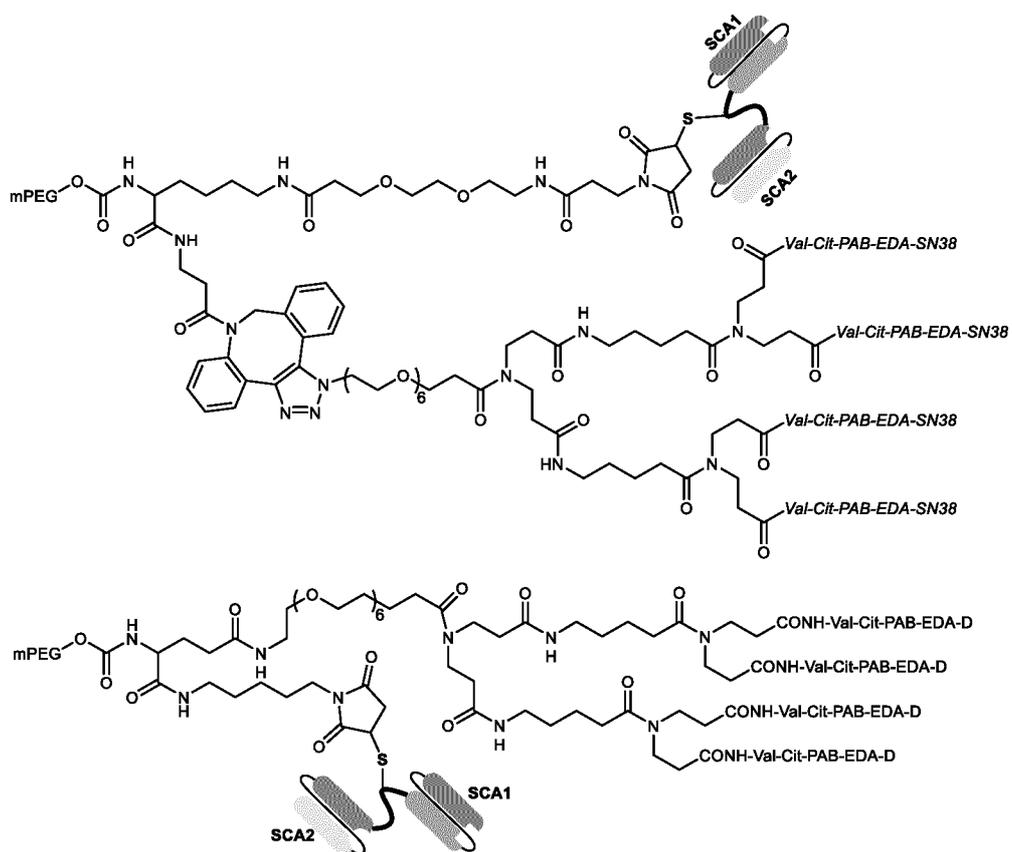
Вариант осуществления 44. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-41, где разветвленный линкер В выбран из:

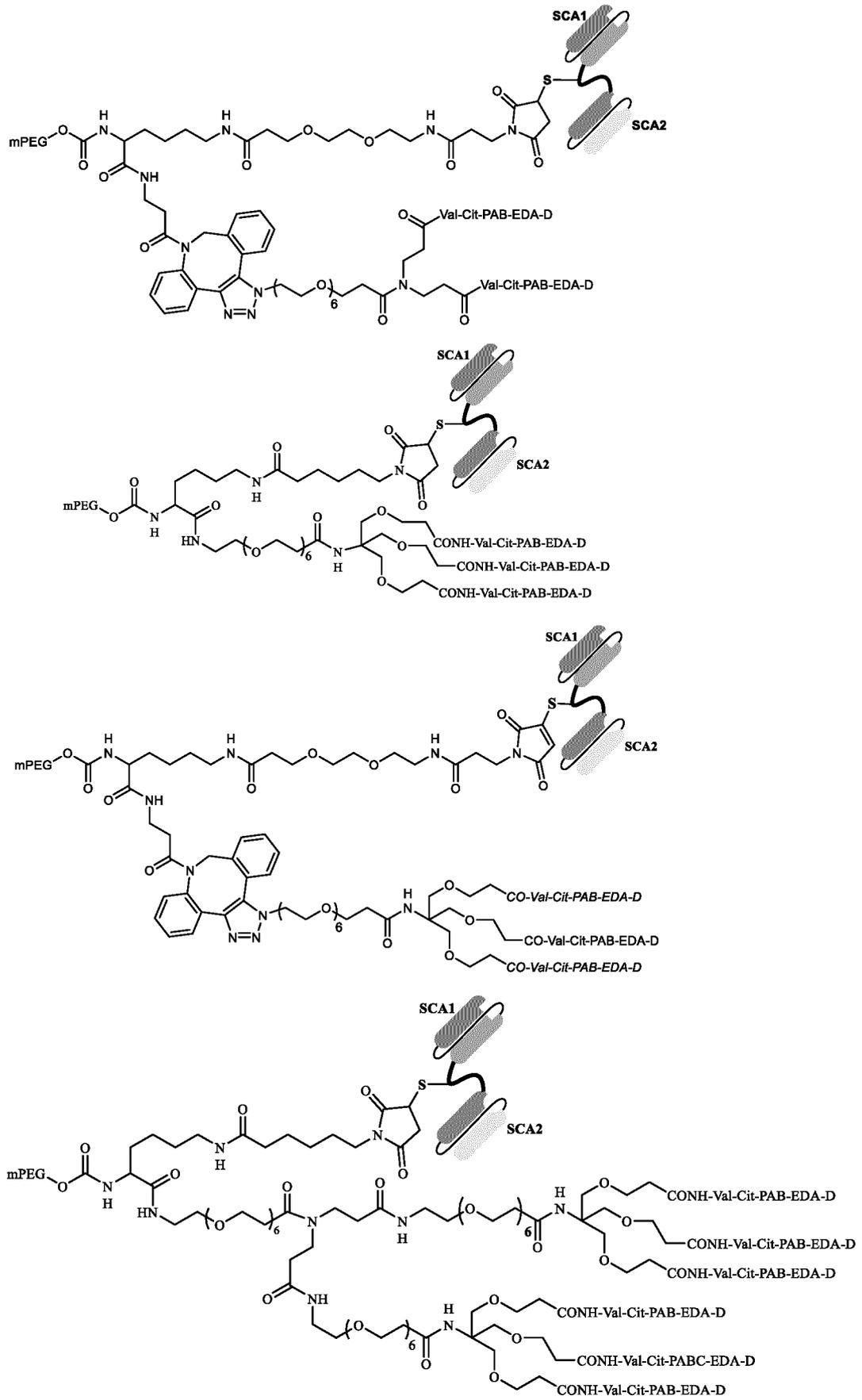




где  $n=1$  или  $2$ ;  $b$  представляет собой целое число, выбранное от 1 до 10; каждый из  $R^1$  и  $R^2$  независимо выбран из H, алкила с низкой молекулярной массой или  $\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_m\text{-CH}_3$ , где  $m = 1-10$ .

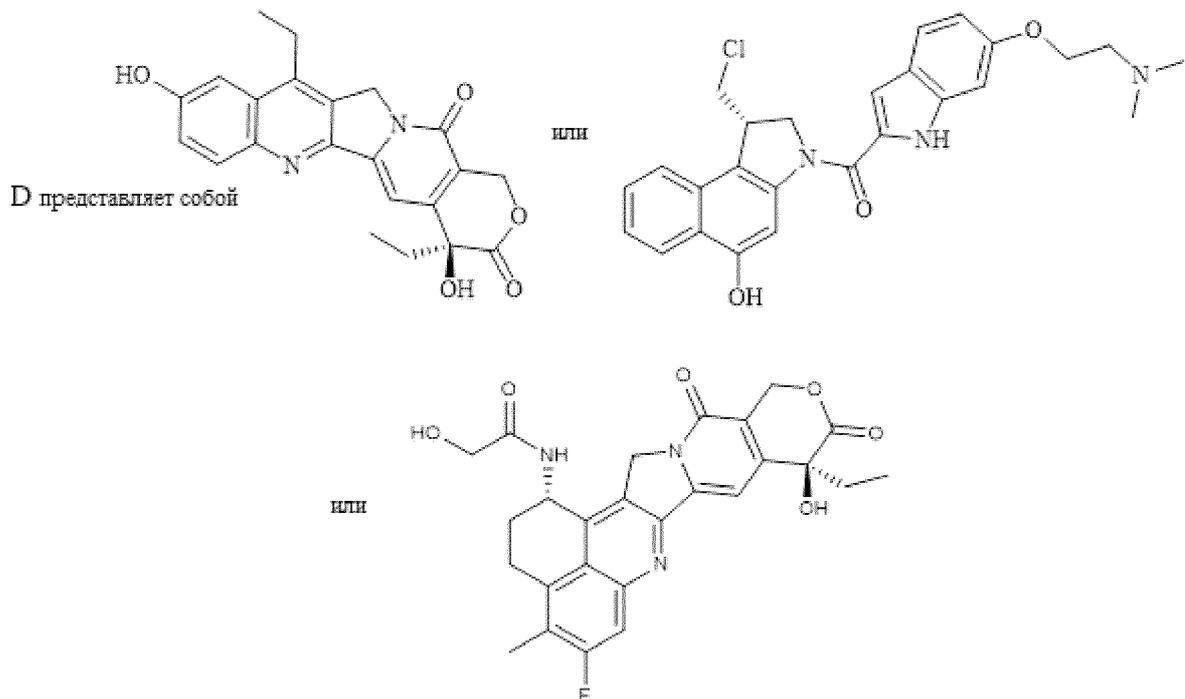
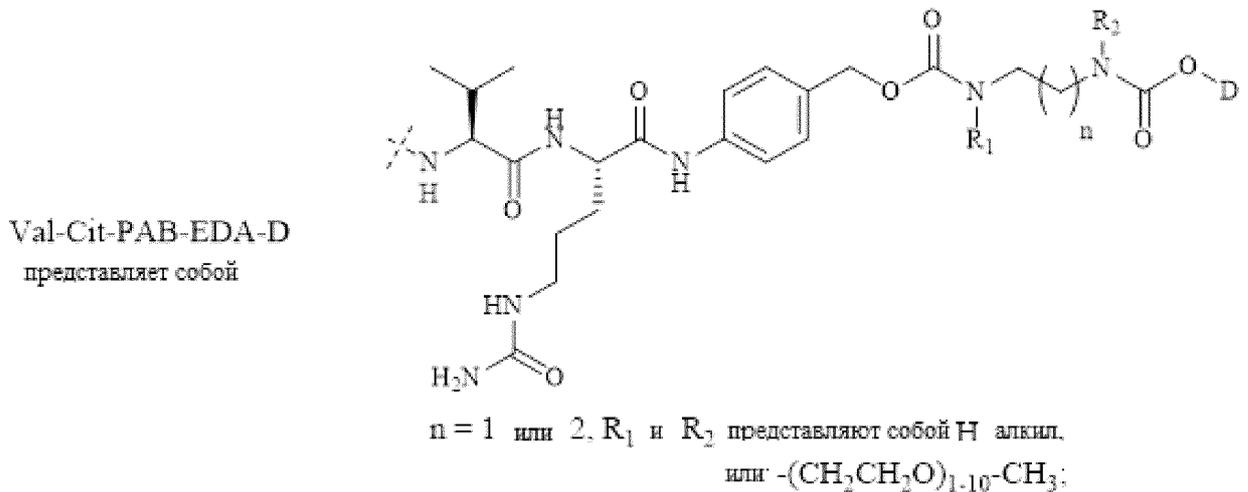
Вариант осуществления 45. Соединение по варианту осуществления 1, выбранное из формулы:



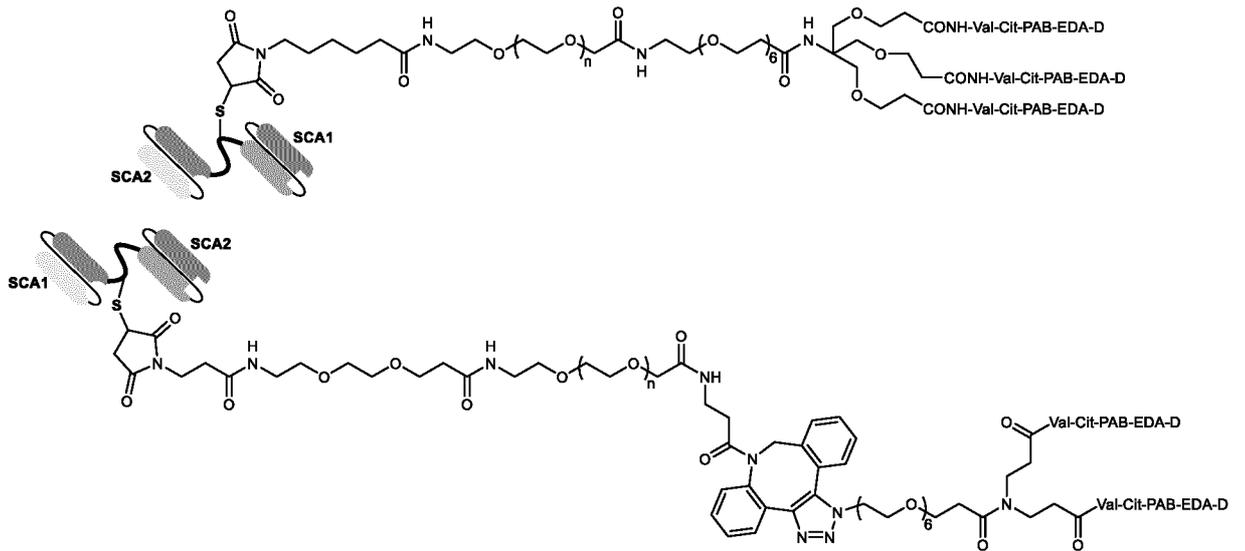


или его фармацевтически приемлемая соль;

где: SCA1 и SCA2 представляют собой одноцепочечные анти-PDL1 и анти-CD47 антитела, или одноцепочечные анти-HER2(1) и анти-HER2(2) антитела, или одноцепочечные анти-cMet(1) и анти-cMet(2) антитела, предпочтительно содержащие аминокислоту, как показано в SEQ ID №: 1 или SEQ ID №: 2, или SEQ ID №: 6; а mPEG имеет общую молекулярную массу от 3000 до 100000 Дальтон, например, 10000-40000 Дальтон;



Вариант осуществления 46. Соединение по варианту осуществления 24, выбранное из формулы:

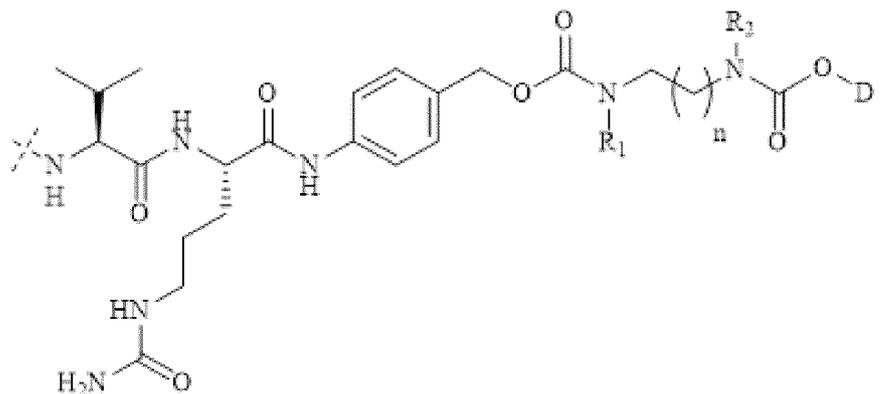


или его фармацевтически приемлемая соль;

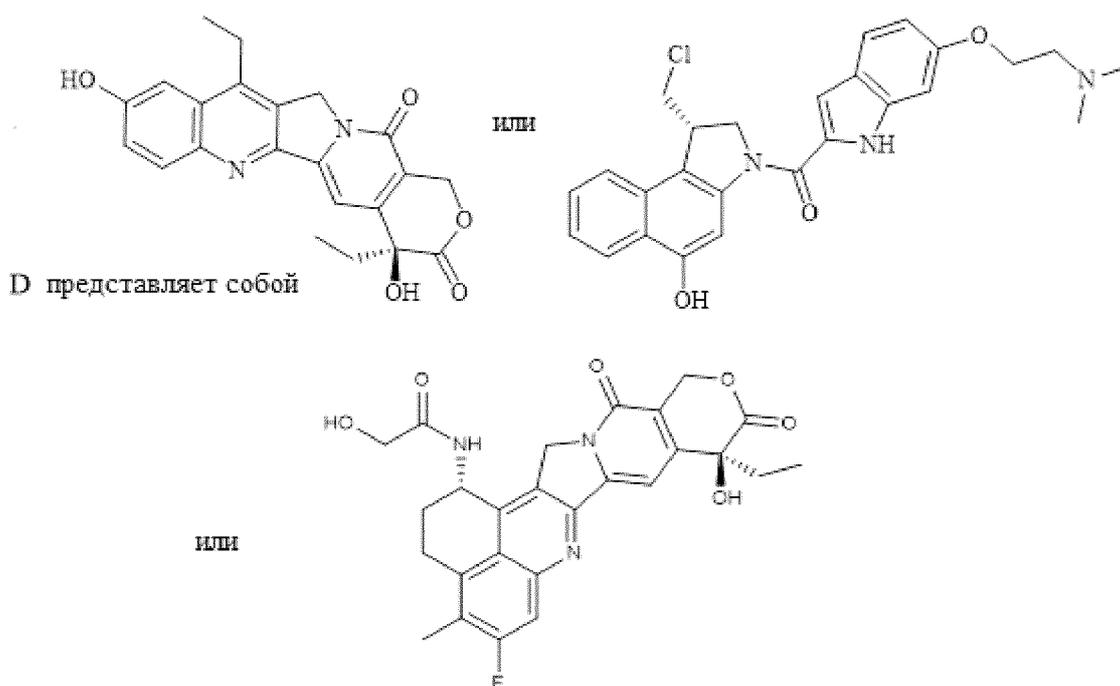
где SCA1 и SCA2 представляют собой одноцепочечное анти-PDL1 и анти-CD47 антитело, или одноцепочечное анти-HER2(1) и анти-HER2(2) антитело, или одноцепочечное анти-cMet(1) и анти-cMet(2) антитело, предпочтительно содержащее аминокислоту, как показано в SEQ ID №: 1 или SEQ ID №: 2 или SEQ ID №: 6;

n представляет собой целое число, выбранное в диапазоне от 110 до 1800, предпочтительно n представляет собой целое число, выбранное в диапазоне от 220 до 910, или предпочтительно, где общая молекулярная масса ПЭГ составляет 10000-40000 Дальтон, например, приблизительно 10000, 20000, 30000 или 40000 Дальтон;

Val-Cit-PAB-EDA-D  
представляет собой



n = 1 или 2. R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> представляют собой H, алкил,  
или -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-10</sub>-CH<sub>3</sub>;



Вариант осуществления 47. Способ получения соединения по любому из вариантов осуществления 1-46, включающий:

a) стадию получения модифицированного неиммуногенным полимером (например, ПЭГилированного) гидроксил-несущего лекарственного конъюгата со свободной функциональной группой для сайт-специфической конъюгации;

b) стадию сайт-специфической конъюгации модифицированного неиммуногенным полимером (например, ПЭГилированного) гидроксил-несущего лекарственного конъюгата с антителом для получения соединения формулы (Ib) или (Ic).

Вариант осуществления 48. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество соединения по любому из вариантов осуществления 1-46 и фармацевтически приемлемую соль, носитель или вспомогательное вещество.

Вариант осуществления 49. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-46 для применения при лечении рака, выбранного из группы, состоящей из неходжкинских лимфом, В-клеточных острых и хронических лимфолейкозов, лимфомы Беркитта, лимфомы Ходжкина, волосатоклеточного лейкоза, острых и хронических миелолейкозов, Т-клеточных лимфом и лейкозов, множественной миеломы, глиомы, макроглобулинемии Вальденстрема, рака молочной железы, рака матки, рака шейки матки, рака яичника, рака предстательной железы, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака толстой кишки, колоректального рака, рака слюнной железы, рака щитовидной железы, рака кожи, рака костей, опухоли головного мозга, рака головы и шеи, и рака эндометрия.

Вариант осуществления 50. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-46 для применения в комбинации с эффективным количеством другого противоопухолевого средства или иммунодепрессанта при лечении рака, выбранного из группы, состоящей из неходжкинских лимфом, В-клеточных острых и хронических лимфолейкозов, лимфомы Беркитта, лимфомы Ходжкина, волосатоклеточного лейкоза, острых и хронических миелолейкозов, Т-клеточных лимфом и лейкозов, множественной миеломы, глиомы, макроглобулинемии Вальденстрема, рака молочной железы, рака матки, рака шейки матки, рака яичника, рака предстательной железы, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака толстой кишки, колоректального рака, рака слюнной железы, рака щитовидной железы, рака кожи, рака костей, опухоли головного мозга, рака головы и шеи, и рака эндометрия.

Вариант осуществления 51. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества соединения по любому из вариантов осуществления 1-46, при этом рак выбран из группы, состоящей из неходжкинских лимфом, В-клеточных острых и хронических лимфолейкозов, лимфомы Беркитта, лимфомы Ходжкина, волосатоклеточного лейкоза, острых и хронических миелолейкозов, Т-клеточных лимфом и лейкозов, множественной миеломы, глиомы, макроглобулинемии Вальденстрема, рака молочной железы, рака матки, рака шейки матки, рака яичника, рака предстательной железы, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака толстой кишки, колоректального рака, рака слюнной железы, рака щитовидной железы, рака кожи, рака костей, опухоли головного мозга, рака головы и шеи, и рака эндометрия.

Вариант осуществления 52. Способ по варианту осуществления 51, где способ дополнительно включает введение субъекту эффективного количества другого противоопухолевого средства или иммунодепрессанта.

Вариант осуществления 53. Применение соединения по любому из вариантов осуществления 1-46 при изготовлении лекарственного средства для лечения рака у субъекта, где рак выбран из группы, состоящей из неходжкинских лимфом, В-клеточных острых и хронических лимфолейкозов, лимфомы Беркитта, лимфомы Ходжкина, волосатоклеточного лейкоза, острых и хронических миелолейкозов, Т-клеточных лимфом и лейкозов, множественной миеломы, глиомы, макроглобулинемии Вальденстрема, рака молочной железы, рака матки, рака шейки матки, рака яичника, рака предстательной железы, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака толстой кишки, колоректального рака, рака слюнной железы, рака

щитовидной железы, рака кожи, рака костей, опухоли головного мозга, рака головы и шеи, и рака эндометрия.

Вариант осуществления 54. Применение по варианту осуществления 53, где соединение комбинируют с другим противоопухолевым средством или иммунодепрессантом.

Вариант осуществления 55. Применение соединения по любому из вариантов осуществления 1-46 и другого противоопухолевого агента или иммунодепрессанта при изготовлении лекарственного средства для лечения рака у субъекта, где рак выбран из группы, состоящей из неходжкинских лимфом, В-клеточных острых и хронических лимфолейкозов, лимфомы Беркитта, лимфомы Ходжкина, волосатоклеточного лейкоза, острых и хронических миелолейкозов, Т-клеточных лимфом и лейкозов, множественной миеломы, глиомы, макроглобулинемии Вальденстрема, рака молочной железы, рака матки, рака шейки матки, рака яичника, рака предстательной железы, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака толстой кишки, колоректального рака, рака слюнной железы, рака щитовидной железы, рака кожи, рака костей, опухоли головного мозга, рака головы и шеи, и рака эндометрия.

#### **Описание чертежей**

Фиг. 1 кратко иллюстрирует схему реакции получения соединения Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP (5), описанного в Примере 1.

Фиг. 2 кратко иллюстрирует схему реакции получения соединения Val-Cit-PAB-DEA-SN38 (10), описанного в Примере 1.

Фиг. 3 кратко иллюстрирует альтернативную схему реакции получения соединения Val-Cit-PAB-DEA-SN38 (10), описанного в примере 1.

Фиг. 4 кратко иллюстрирует схему реакции получения разветвленного промежуточного соединения 16, описанного в Примере 1.

Фиг. 5 кратко иллюстрирует схему реакции получения соединения 30kmPEG-Lys(Mal)-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (22), описанного в Примере 1.

Фиг. 6 кратко иллюстрирует схему реакции получения соединения 30kmPEG-Lys(Mal)-6(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (28) в Примере 2.

Фиг. 7 кратко иллюстрирует схему реакции получения соединения Val-Cit-PAB-DEA-Duo-DM (33) в Примере 3.

Фиг. 8 кратко иллюстрирует схему реакции получения разветвленного промежуточного соединения (40) в Примере 3.

Фиг. 9 кратко иллюстрирует альтернативную схему реакции получения разветвленного промежуточного соединения (40) в Примере 3.

Фиг. 10 кратко иллюстрирует схему реакции получения соединения 20kmPEG-Glu(Mal)-4(Val-Cit-PAB-DEA-Duo-DM) (46) в Примере 3.

Фиг. 11 кратко иллюстрирует схему реакции получения разветвленного промежуточного соединения (48) в Примере 4.

Фиг. 12 кратко иллюстрирует схему реакции получения соединения Mal-20kPEG-3(Val-Cit-PAB-DEA-Duo-DM) (51) в Примере 4.

Фиг. 13 кратко иллюстрирует схему реакции получения соединения 30kmPEG-(SCAPDL1xSCACD47)-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (53) в Примере 6.

Фиг. 14 кратко иллюстрирует схему реакции получения соединения 30kmPEG-(SCAPDL1xSCACD47)-6(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (54) в Примере 7.

Фиг. 15 кратко иллюстрирует схему реакции получения соединения 20kmPEG-(SCAPDL1xSCACD47)-4(Val-Cit-PAB-DEA-Duo-DM) (55) в Примере 8.

Фиг. 16 кратко иллюстрирует схему реакции получения соединения SCAPDL1xSCACD47-20kPEG-3(Val-Cit-PAB-DEA-Duo-DM) (56) в Примере 9.

Фиг. 17 кратко иллюстрирует схему реакции получения разветвленного промежуточного соединения (58) в Примере 10.

Фиг. 18 кратко иллюстрирует схему реакции получения разветвленного промежуточного соединения N3-PEG6-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (62) в Примере 11.

Фиг. 19 кратко иллюстрирует схему реакции получения разветвленного промежуточного соединения N3-PEG6-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (65) и N3-PEG6-4(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (66) в Примере 12.

Фиг. 20 кратко иллюстрирует схему реакции получения 30kmPEG-Lys(PEG2-Mal)-DBCO (68) в Примере 13.

Фиг. 21 кратко иллюстрирует схему реакции получения 30kmPEG-Lys(PEG2-Mal)-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (69) в Примере 14.

Фиг. 22 кратко иллюстрирует схему реакции получения 30kmPEG-Lys(PEG2-Mal)-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (70) в Примере 15.

Фиг. 23 кратко иллюстрирует схему реакции получения 30kmPEG-Lys(PEG2-Mal)-4(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (71) в Примере 16.

Фиг. 24 кратко иллюстрирует схему реакции получения 20kmPEG-Lys(PEG2-Mal)-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (73) в Примере 17.

Фиг. 25 кратко иллюстрирует схему реакции получения Mal-PEG2-20kPEG-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (76) в Примере 18.

Фиг. 26 кратко иллюстрирует схему реакции получения Val-Cit-PAB-DEA-Dxd (81) в Примере 19.

Фиг. 27 кратко иллюстрирует схему реакции получения 20kmPEG-Lys(PEG2-Mal)-2(Val-Cit-PAB-DEA-Dxd) (83) в Примере 20.

Фиг. 28 кратко иллюстрирует схему реакции получения 30kmPEG(SCAHer2xSCAHer2)-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (86) в Примере 23.

Фиг. 29 кратко иллюстрирует схему реакции получения 30kmPEG(SCAPDL1xSCACD47)-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (87) в Примере 24.

Фиг. 30 кратко иллюстрирует схему реакции получения 30kmPEG(SCAHer2xSCAHer2)-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (88) в Примере 25.

Фиг. 31 кратко иллюстрирует схему реакции получения 30kmPEG(SCAPDL1xSCACD47)-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (89) в Примере 26.

Фиг. 32 кратко иллюстрирует схему реакции получения 30kmPEG(SCAPDL1xSCACD47)-4(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (90) в Примере 27.

Фиг. 33 кратко иллюстрирует схему реакции получения 20kmPEG(SCAPDL1xSCACD47)-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (91) в Примере 28.

Фиг. 34 кратко иллюстрирует схему реакции получения SCAPDL1xSCACD47-20kPEG-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (92) в Примере 29.

Фиг. 35 кратко иллюстрирует схему реакции получения 30kmPEG(SCAPDL1xSCACD47)-2(Val-Cit-PAB-DEA-Dxd) (93) в Примере 30.

Фиг. 36 кратко иллюстрирует схему реакции получения 30kmPEG(SCAc-MetxSCAc-Met)-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (94) в Примере 31.

Фиг. 37 иллюстрирует цитотоксичность соединения 86 и соединения 88 *in vitro* по отношению к линии опухолевых клеток в Примере 32.

Фиг. 38 иллюстрирует цитотоксичность *in vitro* соединений 87, 89, 90, 91 и 92 по отношению к линии опухолевых клеток в Примере 33.

Фиг. 39 иллюстрирует цитотоксичность *in vitro* соединения 93 по отношению к линии опухолевых клеток в Примере 34.

Фиг. 40 иллюстрирует цитотоксичность соединения 94 *in vitro* по отношению к линии опухолевых клеток в Примере 35.

### **Подробное описание изобретения**

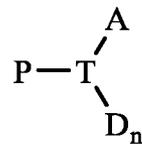
В настоящем изобретении предложены ПЭГилированные конъюгаты гидроксил-несущих лекарственных средств и моно- или мультиспецифических антител, в которых гидроксильная группа полезной нагрузки вступает в реакцию, связывая полезную нагрузку с антителом. С помощью этого изобретения можно получить ADC с гидроксил-несущими цитотоксическими нагрузками, которые стабильны во время циркуляции крови

до достижения мишени, так что полезные нагрузки могут интернализироваться и высвободиться внутри клеток-мишеней для уничтожения клеток-мишеней.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает новый формат структуры антител в виде ПЭГилированного конъюгата гидроксил-несущего лекарства с моно- или биспецифическими одноцепочечными антителами, который не только не проявляет токсичности, опосредованной компонентом Fc антител на основе IgG, по отношению к мегакариоцитам или другим нормальным клеткам, и увеличивает терапевтический интервал, но также усиливает противоопухолевый эффект конъюгата с повышенной пенетрацией в опухоль, интернализацией и лизосомальным переносом. Соответственно, это изобретение расширяет существующие технологии ADC, позволяя использовать огромное количество цитотоксических гидроксил-несущих соединений в качестве полезной нагрузки ADC, и улучшает современную терапию рака для лечения солидных опухолей.

#### IV. Конъюгат

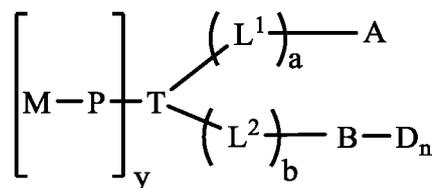
В одном аспекте изобретения представлены соединения формулы (Ia):



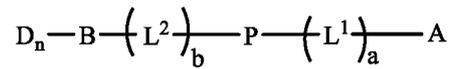
Формула (Ia).

В соединении P может быть неиммуногенным полимером. T может быть многофункциональным компонентом, таким как трифункциональный низкомолекулярный линкерный компонент, и имеет по меньшей мере одну функциональную группу, которая способна к сайт-специфической конъюгации с антителом или белком. A может быть любым моноспецифическим или мультиспецифическим антителом или белком, таким как полноразмерное антитело, одноцепочечное антитело, нанотело или любой его антигенсвязывающий фрагмент, или их комбинация. D может представлять собой любую гидроксил-несущую малую цитотоксическую молекулу или пептид ( $n = 1-25$ ), и каждый D может быть одинаковым или разным.

В частности, в одном из аспектов изобретения предлагается конъюгат Формулы Ib или Ic:



Формула Ib



## Формула Ic

В конъюгате Формулы Ib или Формулы Ic P может представлять собой неиммуногенный полимер, такой как ПЭГ;

M может представлять собой H или концевую кэп-группу, выбранную из C<sub>1-50</sub> алкила и арила, где один или несколько атомов углерода указанного алкила при необходимости замещены гетероатомом;

у может быть целым числом, выбранным из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10;

T может быть фрагментом, имеющим две или более функциональных группы, при этом связь между T и (L<sup>1</sup>)<sub>a</sub> и связь между T и (L<sup>2</sup>)<sub>b</sub> могут быть одинаковыми или разными; каждый из L<sup>1</sup> и L<sup>2</sup> может независимо представлять собой бифункциональный линкер;

каждый из a и b может быть целым числом, выбранным из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10;

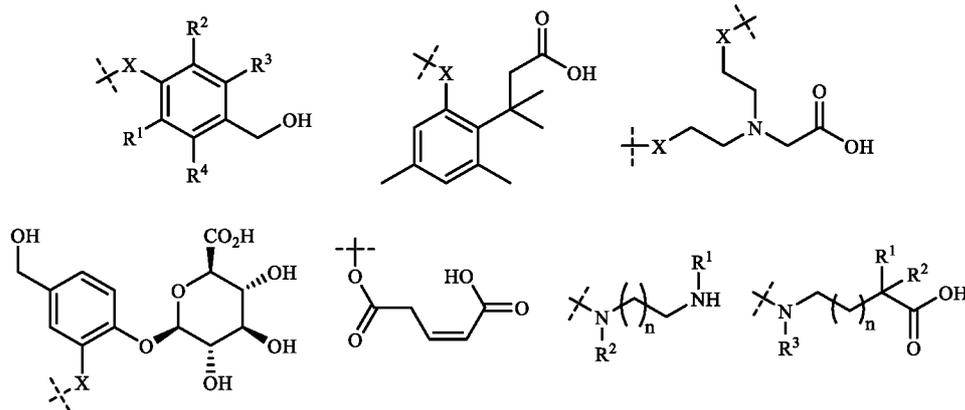
B может быть разветвленным линкером, где каждая ветвь может содержать удлиняющий спейсер (необязательный), триггерный элемент, один или несколько саморазрушающихся спейсеров или любую их комбинацию, где триггерным элементом может быть аминокислотная последовательность или β-глюкуронидный или β-галактозидный триггерный компонент, расщепляемый ферментом, таким как катепсин В, плазмин, матриксные металлопротеиназы (ММР), β-глюкуронидазы или β-галактозидазы; рН-зависимый линкер, который может инициировать высвобождение гидроксил-несущего лекарственного средства D или его производных в кислых условиях рН, или линкер с дисульфидной связью, который может инициировать высвобождение гидроксил-несущего лекарственного средства D или его производных глутатионом, членами семейства тиоредоксинов (WCGH/РСК) или тиоредуктазой.

A может быть любым моноспецифическим или мультиспецифическим антителом или антигенсвязывающим белком, включая фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, нанотело (однодоменное антитело) или любой антигенсвязывающий фрагмент, который является одновалентным или поливалентным для антигенов;

D может представлять собой любую гидроксил-несущую цитотоксическую малую молекулу, или пептид, или их производное, и может высвобождаться из B либо путем ферментативного расщепления и/или саморазрушения, либо путем гидролиза, индуцированного рН; каждый гидроксил-несущий D может быть одинаковым или отличаться;

n может быть целым числом, выбранным из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 и 25.

В некоторых вариантах осуществления каждая ветвь В содержит триггерный компонент, например, аминокислотную последовательность, или дисульфидный компонент, или  $\beta$ -глюкуронид, или  $\beta$ -галактозид, соединенный с гидроксил-несущим лекарственным средством D через один или несколько саморазрушающихся спейсеров. Примеры саморазрушающихся спейсеров включают, без ограничения указанными, следующие:



где X= O или NH или S, n = 1 или 2, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> может быть H, C<sub>1-10</sub> алкилом или  $-(CH_2CH_2O)_m-CH_3$ , где m представляет собой целое число от 1 до 10.

В некоторых вариантах осуществления каждая ветвь В может содержать линкер с дисульфидной связью, который может инициировать высвобождение гидроксил-несущего лекарственного средства D или его производных в месте опухоли и/или внутри опухолевой клетки путем ферментативного расщепления, например, глутатионом, членами семейства тиоредоксинов (WCGH/PCK) или тиоредуктазой, с помощью одного или нескольких последующих механизмов саморазрушения.

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой одноцепочечное биспецифическое антитело, которое способно связываться с двумя различными антигенами, такими как PDL1 и CD47 (SCAPDL1 $\times$ SCACD47).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность SCAPDL1XSCACD47 может представлять собой:

```
DIVMTQSPLSLPVTPEPA SISCRSSQSIVYSNGNT YLGWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSG
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYTFGQGTKLEIKGGSGGGSGG
SGGSGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGT
IYPGNDSDSYNQKFKDRVTITADTSASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARGGYRAMDYWG
QGTLVTVSSGCGGSSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRA SQDVSTA VAWYQQKPG
KAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCCQQYLYHPATFGQGT
KVEIKGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGLRLSCAA SGFTFSDSWIHVWR
QAPGKGLEWVA WISPYGGSTYYADSVKGRFTISADT SKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYC
ARRHWPGGFYWGQGLVTHHHHHH (SEQ ID No. 1).
```

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой одноцепочечное биспецифическое антитело, которое способно связываться с двумя различными эпитопами двух антигенов Her2, таких как SCAHer2(1)×SCAHer2(2).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность SCAHer2(1)×SCAHer2(2) может представлять собой:

DIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCKASQDVSIGVAWYQKPGKAPKLLIYSA SYRYTGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTGGSGGSGGSGG  
SGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPN  
SGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQG  
TLVTVSSGCGSGGSGGSGGSGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFNIKDTYIHWV  
RQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY  
CSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSGSGGSGGSGGSGGDIQMTQSPSSLSASV GDR  
VTITCRASQDVNTAVAWYQKPGKAPKLLIYSA SFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISL  
QPEDFATYYCQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTNNNNNN (SEQ ID No. 2)

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой одноцепочечное моноспецифическое антитело, которое способно связываться с двумя одинаковыми эпитопами на двух антигенах Her2, таких как SCAHer2(1)×SCAHer2(1).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность SCAHer2(1)×SCAHer2(1) может представлять собой:

DIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCRASQDVNTAVAWYQKPGKAPKLLIYSA SFLYSGVP  
SRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTGGSGGSGGSGG  
SGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTN  
GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWG  
QGT LVTVSSGCGSGGSGGSGGSGGDIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCRASQDVNTAVAW  
YQKPGKAPKLLIYSA SFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYTTPP  
TFGQGTKVEIKRTGGSGGSGGSGGSGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFNIKDT  
YIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED  
TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSHHHHHH (SEQ ID No. 3)

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой одноцепочечное биспецифическое антитело, которое способно связываться с двумя различными антигенами, такими как Her2 и Her3 (SCAHer2×SCAHer3).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность SCAHer2IVxSCAHer3 может представлять собой:

DIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCRASQDVNTAVAWYQKPGKAPKLLIYSA SFLYSGVP  
SRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTGGSGGSGGSGG  
SGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTN  
GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWG  
QGT LVTVSSGCGSGGSGGSGGSGGQVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYY  
WSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNTNPSLKSRTISVETSKNQFSLKLSVTAADTAVY  
YCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSSGSGGSGGSGGSGGDIEMTQSPDSLAVSLGERA  
TINCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL  
TISLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKHHHHHH (SEQ ID No. 4)

В некоторых вариантах осуществления А представляет собой одноцепочечное биспецифическое антитело, которое способно связываться с двумя различными антигенами, такими как Met1 и Met2 (SCAc-Met1×SCAc-Met2).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность SCAc-Met1×SCAc-Met2 может представлять собой:

DIQMTQSPSSLSASV GDRVITIT CSVSSSVSSIYLHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPS  
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCIQYSGYPLTFGGGTKVEIKGGSGSGSGSGSGG  
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMHVWRQAPGQGLEWMGRVNPNR  
GGTTYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARTNWLWDYWGQGTITV  
VSGCGSGSGSGSGSGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTAYTMHWVRQA  
PGQGLEWMGWIKPNGLANYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELRSLRSDDTAVYYCA  
RSEITTEFDYWGQGLVTVSSGGSGSGSGSGSGGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKS  
SESVDSYANSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASTRSGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAE  
DVAVYYCQSKEDPLTFGGGTKVEIKRHHHHHH (SEQ ID No. 5).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность SCAc-Met(1)×SCAc-Met(2) может представлять собой:

DIMMSQSPSSLTVSVGEKVTVSCKSSQSLLYTSSQKNYLA WYQQKPGQSPKLLIYWAST  
RESGVDPDRFTGSGSGIDFTLTITTSVKADDLAVYYCQQYYAYPWTFGGGTKLEIKGGSGG  
SGSGSGSGGQVQLQQSGPELVRPGASVKMSCRASGYTFTSYWLHWVKQRPGQGLEWI  
GMIDPSNSDIRFNPFDKA TLNVDRSSNTAYMLLSLTSADSAVYYCA TYGSYVSPLD  
YWGQGTSTVTVSSGCGSGSGSGSGSGGQVQLVESGPGLVKPSQTLSTCAVSGGSITIN  
YYYWSWIRQSPGKGLEWMGVIA YDGSIDYSPSLKSRTSISRDTSKNQFSLQLSSVTPEDT  
AVYYCARDVRVIA TGWA TANALDAWGQGLVTVSSGGSGSGSGSGSGGQSVLTQPP  
SVSGSPGKTVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQQPLPGTAPKLLIFAVSYRASGIPDRFSGSK  
SGNTAFLTISGLQSEADYYCAS YRSSNNA AVFGGGTHLTVLHHHHHH (SEQ ID No.  
6).

В некоторых вариантах осуществления гидроксил-несущее лекарство D может высвободиться либо в месте опухоли, либо внутри опухолевых клеток, либо за счет ферментативного запуска, либо за счет гидролиза, вызванного рН, с последующим одним или несколькими механизмами саморазрушения.

В некоторых вариантах осуществления гидроксил-несущее лекарство D может быть выбрано из любого ДНК-сшивающего агента, ингибитора микротрубочек, алкилятора ДНК, ингибитора топоизомеразы, деструктора белка, агониста STING или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления гидроксил-несущее лекарство D может быть выбрано из Dxd, SN38, калихеамицинов, пирролобензодиазепинов, сибиромидина, томаимицина, дуокармицинов, неотрамицинов, DC-81, псимберина, алкалоида барвинка, лаулималида, таксана, тубулизинов, ризоксина, дискодермолида, таккалонолида А или В, или АF или АJ, таккалонолида АI-эпоксида, эпотилона А и В, паклитаксела, доцетаксела, доксорубицина, камптотецина, тафурамицина А, PNU-159682, унциаламицина, β-

аманитина, аматоксинов, тайланстатинов или любых гидроксил-несущих цитотоксических соединений, или их аналогов/производных, или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления D представляет собой SN38, или Dxd (мощный ингибитор топоизомеразы I), или дуокармицин (алкилатор ДНК), или их аналоги/производные, или их комбинацию.

В других вариантах осуществления гидроксил-несущее лекарство D связано с двойным саморазрушающимся спейсером, таким как этилендиамин (EDA) или его производные, и 4-аминобензиловым спиртом (PAB), который, в свою очередь, связан с триггерным фрагментом, таким как валин-цитруллин, Val-Cit-PAB-EDA-D.

В одном аспекте настоящего изобретения предложены способы получения ПЭГилированного гидроксил-несущего лекарственного конъюгата, который способен к сайт-специфической конъюгации с белком или антителом, таким как фрагмент антитела или одноцепочечное моно- или мультиспецифическое антитело. В другом аспекте настоящего изобретения предлагаются способы получения гидроксил-несущего лекарственного конъюгата с ПЭГилированным одноцепочечным биспецифическим антителом.

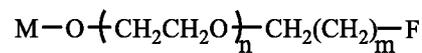
Для синтеза ПЭГилированного конъюгата гидроксил-несущего лекарства с одноцепочечным биспецифическим антителом можно синтезировать кодирующую последовательность или вектор, несущий кодирующую последовательность моноспецифического одноцепочечного антитела с валентностью от 1 до 5 или одноцепочечного биспецифического антитела, и ввести их, например, в системы экспрессии СНО. Белки могут быть экспрессированы и очищены, как описано ранее (WO2018075308).

Для синтеза ПЭГилированного конъюгата гидроксил-несущего лекарства с боковой цепью, которая имеет функциональную группу для сайт-специфической конъюгации, концевая функциональная группа ПЭГ, такая как гидроксильная или карбоксильная группа и т.п., может быть активирована и конъюгирована с трифункциональным низкомолекулярным компонентом, таким как Вос или Fmoc-защищенный лизин, с образованием концевого разветвленного гетеробифункционального ПЭГ с последующим удалением защитной группы. ПЭГилированное соединение после снятия защиты может быть соединено с низкомолекулярным линкером, который имеет функциональную группу для сайт-специфической конъюгации, такую как малеимид или DBCO, с образованием PEG-Lys(Mal)-ОН или PEG-Lys(DBCO)-ОН. PEG-Lys(Mal)-ОН или PEG-Lys(DBCO)-ОН затем может быть соединен с разветвленным компонентом, где каждая ветвь связана с гидроксил-несущим лекарственным средством D, например SN38, через триггерный

элемент и двойную саморазрушающийся спейсер с образованием ПЭГилированного гидроксил-несущего лекарственного конъюгата, такого как PEG-lys(Mal)-B(Val-Cit-PAB-EDA-SN38)<sub>n</sub> или PEG-lys(DBCO)-B(Val-Cit-PAB-EDA-SN38)<sub>n</sub>, где n представляет собой целое число от 1 до 20, например, 4. Заключительной стадией синтеза является сайт-специфическая конъюгация ПЭГилированного гидроксил-несущего лекарственного конъюгата с одноцепочечным моноспецифическим или биспецифическим антителом, меченным тиолом или азидом, с образованием соединения Формулы Ia и Ib. Альтернативно, ПЭГилированный гидроксил-несущий лекарственный конъюгат Mal-PEG-B(Val-Cit-PAB-EDA-SN38)<sub>n</sub> или DBCO-PEG-B(Val-Cit-PAB-EDA-SN38)<sub>n</sub>, где n представляет собой целое число, например, 4, может быть синтезирован из коммерческого гетеробифункционального ПЭГ с использованием аналогичных процедур и сайт-специфической конъюгации ПЭГилированного гидроксил-несущего лекарственного конъюгата с одноцепочечным биспецифическим антителом, меченным тиолом или азидом, с образованием соединения Формулы Ic.

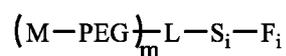
## II. Полиэтиленгликольный (ПЭГ) компонент

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения линейный ПЭГ может иметь формулу:



В формуле n может быть целым числом от 1 до примерно 2300, что предпочтительно позволяет получить полимер с общей молекулярной массой от 3000 до 100000 Дальтон или, при необходимости, более. M может представлять собой H, метил или другой низкомолекулярный алкил. Неограничивающие примеры M включают H, метил, этил, изопропил, пропил, бутил или F<sub>1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>CH<sub>2</sub>, где F и F<sub>1</sub> могут независимо представлять собой концевую функциональную группу, такую как гидроксильная, карбоксильная, тиольная, галогенидная, аминогруппа и т.п., которая может быть функционализована, активирована и/или конъюгирована с низкомолекулярным спейсером или линкером. Q и m могут быть любыми целыми числами от 0 до 10.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения способ также может быть осуществлен с альтернативным разветвленным ПЭГ. Разветвленный ПЭГ может иметь формулу:



В этой формуле ПЭГ представляет собой полиэтиленгликоль. M может быть целым числом от 2 до 10, что предпочтительно позволяет получить разветвленный ПЭГ с общей молекулярной массой от 3000 до 100000 Дальтон или, при необходимости, более. M

может быть метилом или другим низкомолекулярным алкилом. L может быть функциональным связующим компонентом, к которому присоединены два или более ПЭГ. Неограничивающими примерами такого связующего компонента являются: любые аминокислоты, такие как глицин, аланин, лизин или 1,3-диамино-2-пропанол, триэтаноламин, любые 5- или 6-членные ароматические или алифатические кольца, с более чем двумя присоединенными функциональными группами. S представляет собой любой нерасщепляемый спейсер. F может быть концевой функциональной группой, такой как гидроксильная, карбоксильная, тиольная, амино группа. I равен 0 или 1. Когда I равен 0, формула представляет собой:



где: все переменные PEG, m, M или L имеют те же определения, что и выше.

Способ по настоящему изобретению также может быть осуществлен с использованием альтернативных полимерных веществ, таких как декстраны, углеводные полимеры, полиалкиленоксид, поливиниловые спирты или другие подобные неиммуногенные полимеры, концевые группы которых могут быть функционализированы или активированы. Приведенный выше перечень является лишь иллюстративным и не предназначен для ограничения типа неантигенного полимера, пригодного для использования в настоящей заявке.

### III. Трифункциональный линкер T

T представляет собой трифункциональный линкер, соединяющийся с P,  $(L^1)^a$  и  $(L^2)^b$ . T может быть получен из молекул с любой комбинацией трех функциональных групп, неограничивающие примеры которых включают гидроксил, amino, гидразинил, азид, алкен, алкин, карбоксил (альдегид, кетон, сложный эфир, карбоновую кислоту, ангидрид, ацилгалогенид), тиол, дисульфид, нитрил, эпоксид, имин, нитро и галогенид. Функциональные группы в трифункциональном линкере могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления одна или две функциональные группы могут быть защищены для достижения избирательной конъюгации с другими участниками реакции. В данной области техники известны различные защитные группы, включая, например, те, которые представлены в *Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York)*. Функциональная группа также может быть преобразована в другие группы до или после реакции между T и другим участником реакции. Например, гидроксильная группа может быть преобразована в мезилатную или тозилатную группу. Галогенид может быть заменен азидо группой. Кислотная функциональная группа T может быть преобразована в алкиновую функциональную группу путем соединения с аминогруппой, несущей концевой алкин.

В примерных вариантах осуществления Т получают из 1,3-диамино-2-пропанола, триэтанолamina, лизина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, серина или тирозина. Одна или несколько функциональных групп в этих молекулах могут быть защищены для проведения селективных реакций. В некоторых вариантах осуществления Т получают из Вос-защищенного лизина.

#### IV. Бифункциональный линкер L<sup>1</sup> и L<sup>2</sup>

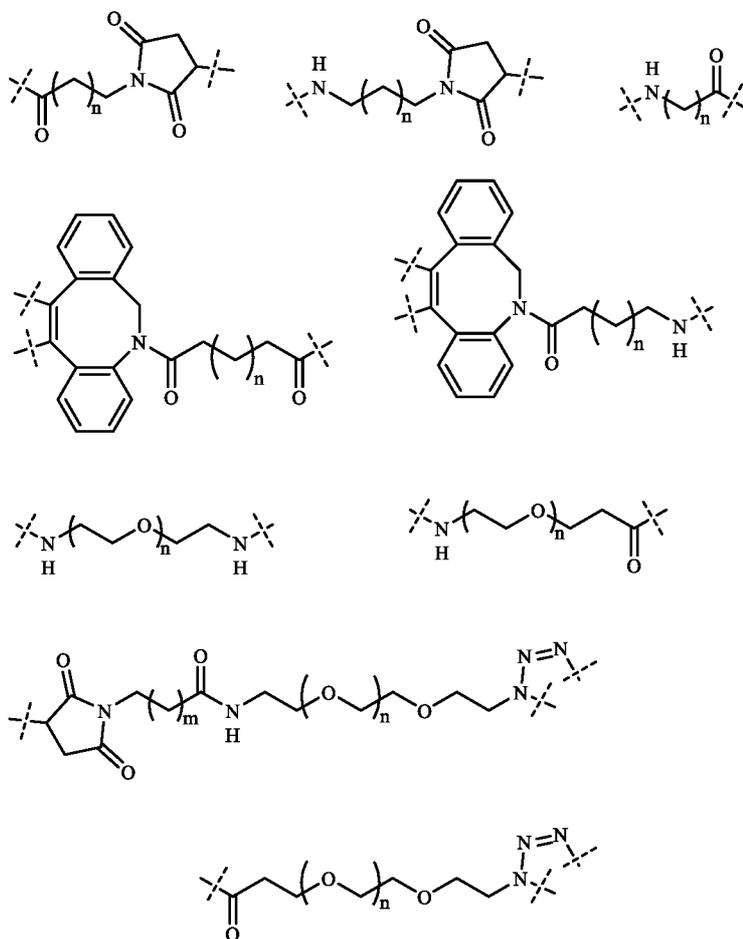
Оба линкера L<sup>1</sup> и L<sup>2</sup> содержат линкерные цепи, которые могут быть независимо выбраны из:

- (CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>XY(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>–,
- X(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>c</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>Y–,
- (CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-гетероциклил–,
- (CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>X–,
- X(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>Y–,
- W<sub>1</sub>–(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>C(O)NR<sub>1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>c</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>X–,
- X(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>b</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>W<sub>2</sub>C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>Y–,
- W<sub>3</sub>–(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>C(O)NR<sub>1</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>c</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>W<sub>2</sub>C(O)(CH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>X–,

где a, b, c, d и e являются целыми числами, независимо выбранными от 0 до 25, например 0-20, 0-15, 0-10, 0-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20, 10-15, 15-25, 15-20 или 20-25, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25; каждый из X и Y независимо выбран из C(=O), NR<sub>2</sub>, S, O, CR<sub>3</sub>R<sub>4</sub> или отсутствует; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> и R<sub>4</sub> независимо представляют собой водород, C<sub>1-10</sub> алкил или (CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>C(=O); W<sub>1</sub> и/или W<sub>3</sub> получены из компонента на основе малеимида, а W<sub>2</sub> представляет собой группу, содержащую триазолил или тетразолил; гетероциклильная группа выбрана из компонента, полученного из малеимида, или из компонента на основе тетразолила или триазолила. Неограничивающие примеры компонента на основе малеимида включают N-сукцинимидил-4-(малеимидометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат) (LC-SMCC), к-малеимидоундекановой кислоты N-сукцинимидиловый эфир (KMUA), γ-малеимидомасляной кислоты N-сукцинимидиловый эфир (GMBS), ε-малеимидкапроновой кислоты N-гидроксисукцинимидный эфир (EMCS), m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир (MBS), N-(α-малеимидацетокси)-сукцинимидный эфир (AMAS), сукцинимидил-6-(β-малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH), N-сукцинимидил 4-(p-малеимидафенил)-бутират (SMPB) и N-(p-малеимидафенил)изоцианат (PMPI). Альтернативно, гетероциклильная связующая группа линкера может быть

тетразолильной или триазолильной, которые образуются в результате конъюгации различных линкерных компонентов, таких как DBCO и азид.

В некоторых примерных вариантах осуществления  $(L^1)_a$  и  $(L^2)_b$  могут быть выбраны из:



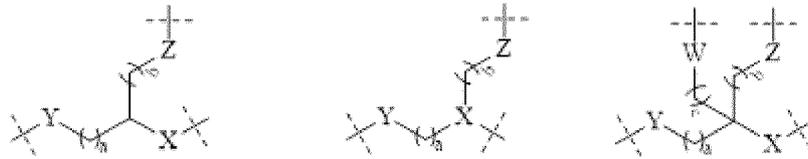
где  $n$  и  $m$  являются целыми числами и независимо выбраны в диапазоне от 0 до 20.

В некоторых других неограничивающих примерах осуществления каждый линкерный элемент также может быть получен из компонента на основе галогенацетила, выбранного из N-сукцинимидил-4-(иодацетил)-аминобензоата (SIAB), N-сукцинимидил йодацетата (SIA), N-сукцинимидил бромацетата (SBA) или N-сукцинимидил 3-(бромацетамидо)пропионата (SBAP).

#### V. Разветвленный линкер В

Разветвленный линкер В может содержать разветвленный элемент, удлиняющий спейсер (при необходимости), триггерный элемент, один или несколько саморазрушающихся спейсеров или любую их комбинацию.

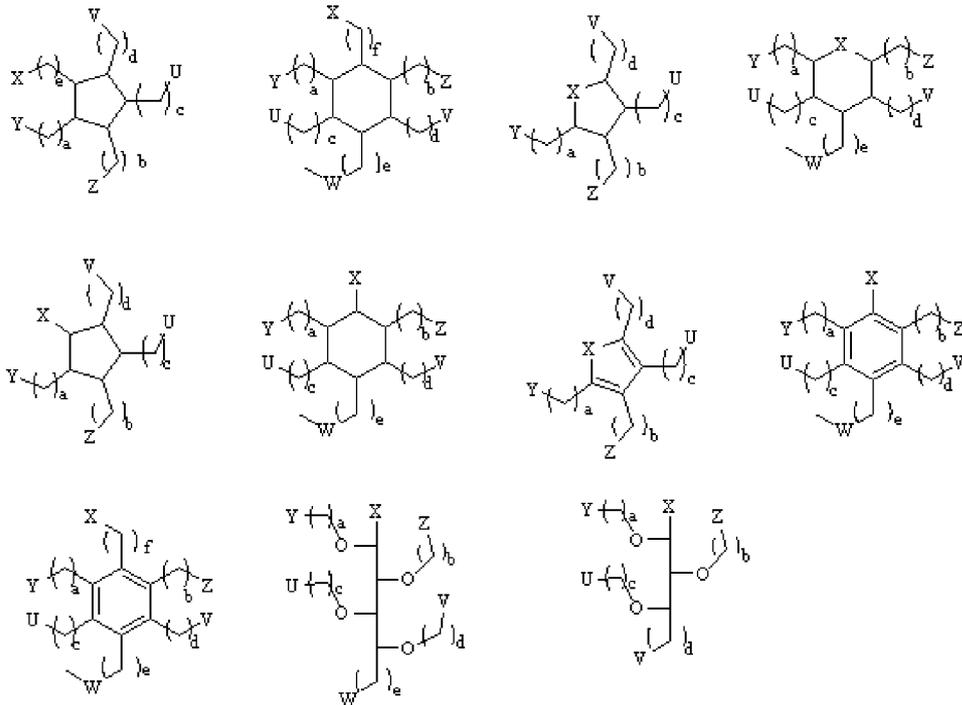
В некоторых вариантах осуществления разветвленный элемент содержит структуры, которые могут быть независимо выбраны из:



1. X, Y, Z или W = NR<sup>1</sup>, NR<sup>2</sup>, C(=O), O, N или отсутствует, где R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо представляют собой водород или C<sub>1-10</sub> алкильную группу;

2. a, b, c представляют собой целое число от 0 до 10.

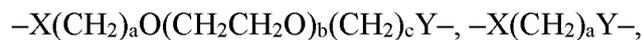
В других вариантах осуществления разветвленный элемент содержит структуры, которые могут быть независимо выбраны из:



1. X, Y, Z, U, V, W = C(O), NR<sup>1</sup>, NR<sup>2</sup>, O, N или отсутствует, где R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо представляют собой водород или C<sub>1-10</sub> алкильную группу;

2. a, b, c, d, e = 0-10.

В некоторых вариантах осуществления удлиняющий спейсер в каждой ветви содержит линкерные цепи, которые могут быть независимо выбраны из:



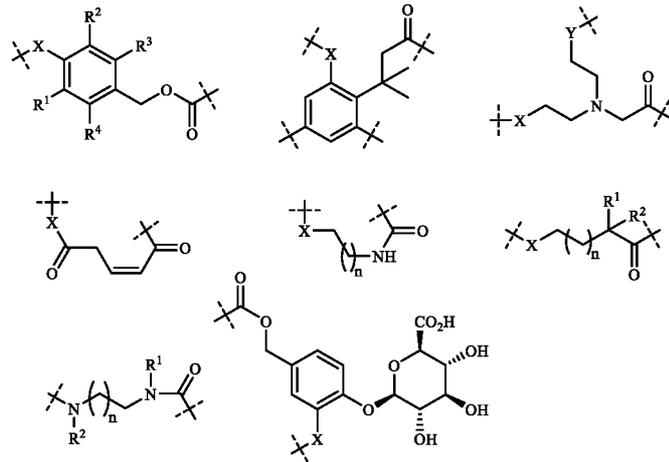
или любой их комбинации, где каждый из a, b и c представляет собой целое число, выбранное от 0 до 25, включая все субъединицы; X и Y могут быть выбраны независимо из NR<sup>1</sup>, NR<sup>2</sup>, C(O), O или нуля, где R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо представляют собой водород или C<sub>1-10</sub> алкильную группу.

В некоторых вариантах осуществления разветвленный элемент (например, с двумя ветвями) с удлиняющими спейсерами или без них может быть соединен двумя или более

разветвленными элементами (например, с двумя ветвями), образуя разветвленный элемент с четырьмя ветвями.

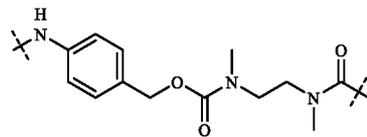
В других вариантах осуществления триггерный элемент содержит любую аминокислотную последовательность, или любой углеводный компонент, или дисульфидную связь, или рН-зависимую связь, или любую расщепляемую связь, которая может быть расщеплена ферментативно или химически.

В некоторых вариантах осуществления саморазрушаемый линкер содержит структуры, которые могут быть выбраны из:

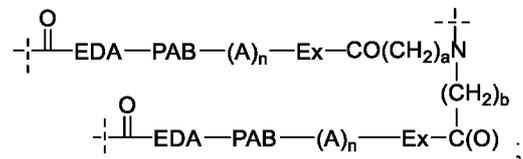


где  $n$  равно 1 или 2;  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  и  $R^4$  независимо представляют собой водород,  $C_{1-10}$  алкил или  $-(CH_2CH_2O)_mCH_3$ , где  $m = 1-10$ ;  $X$  и  $Y$  могут представлять собой  $NH$ ,  $O$  или  $S$ .

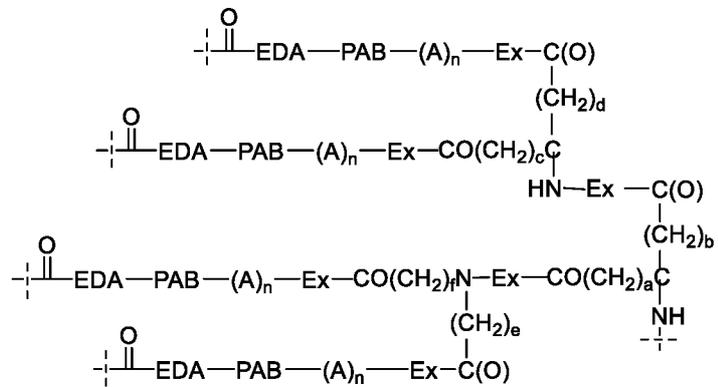
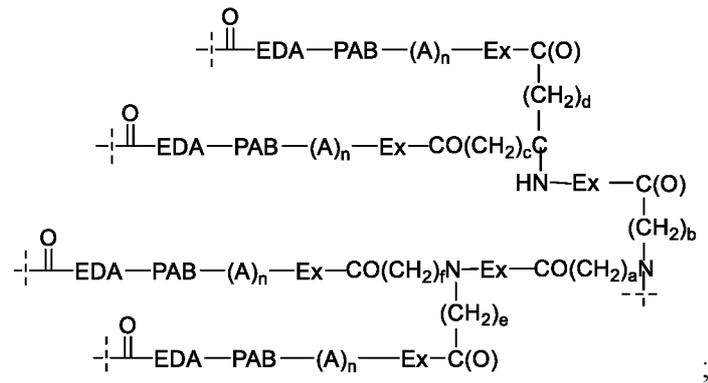
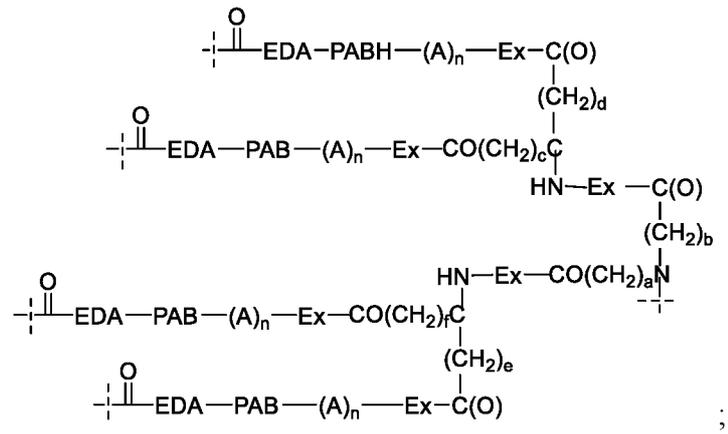
В одном варианте осуществления два саморазрушающихся линкера могут быть соединены друг с другом, например

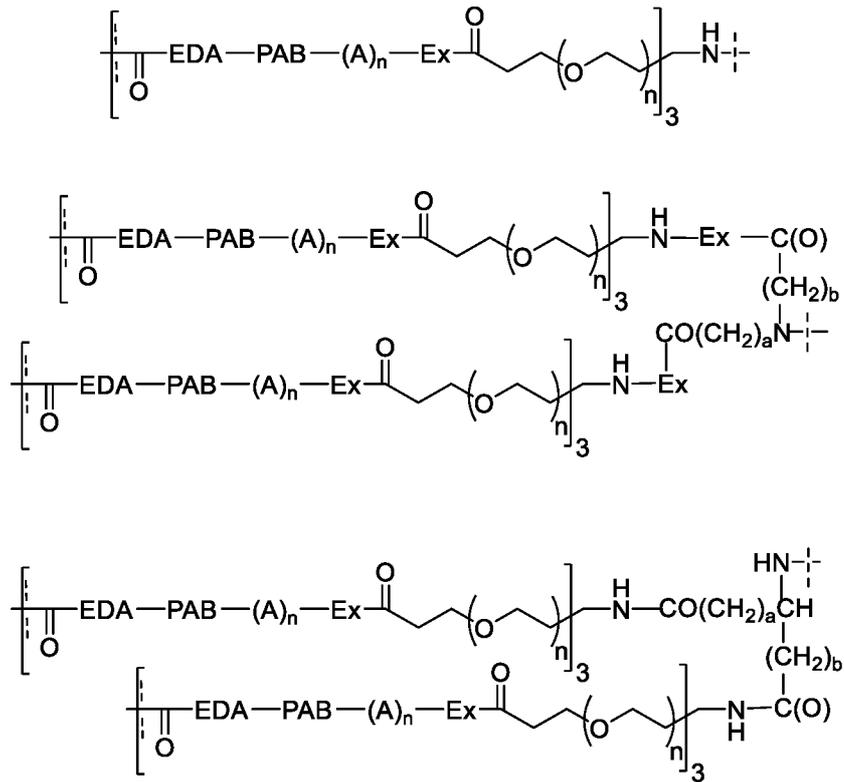


В некоторых вариантах осуществления разветвленный линкер В может быть выбран из:









где:

каждый из a, b, c, d, e и f независимо друг от друга является целым числом, выбранным из 1-25;

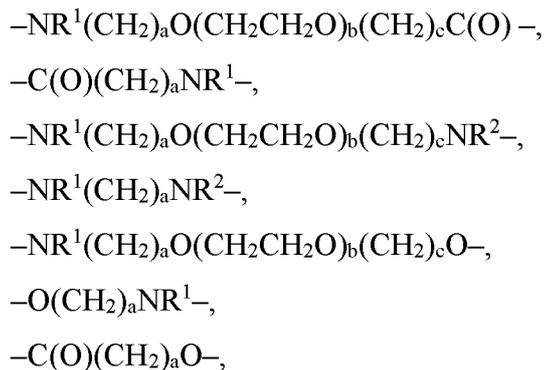
n представляет собой целое число, выбранное из 1-10;

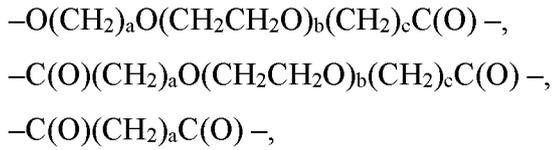
(A)<sub>n</sub> представляет собой триггерный элемент из аминокислотной последовательности, каждый A является независимой аминокислотой, а n представляет собой любое целое число от 1 до 25;

PAB представляет собой 4-аминобензиловый спирт;

EDA представляет собой  $\text{HNR}^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHR}^2$  или  $\text{HNR}^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHR}^2$ , где  $\text{R}^1$  и  $\text{R}^2$  независимо представляют собой водород,  $\text{C}_{1-10}$  алкильную группу или  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3$ , где m является любым целым числом от 1 до 10;

Ex представляет собой удлиняющий спейсер, который содержит линкерные цепи, которые могут быть независимо выбраны из:





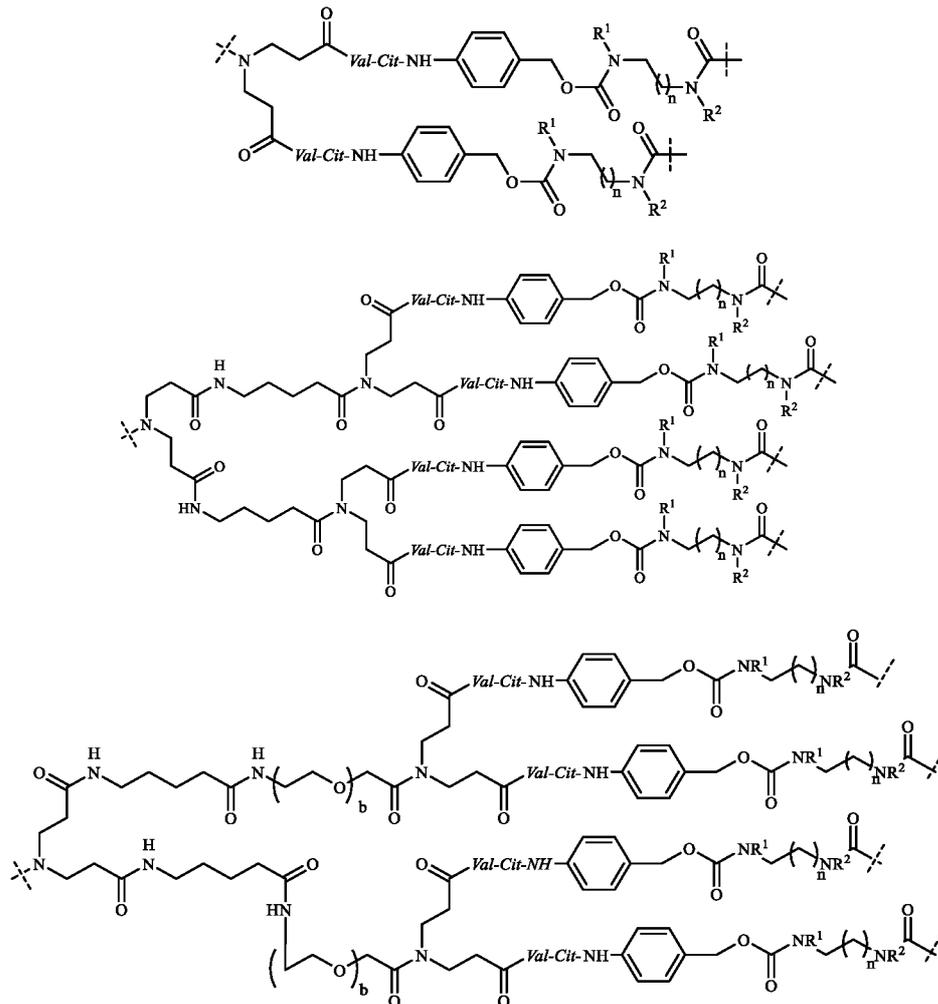
или отсутствуют;

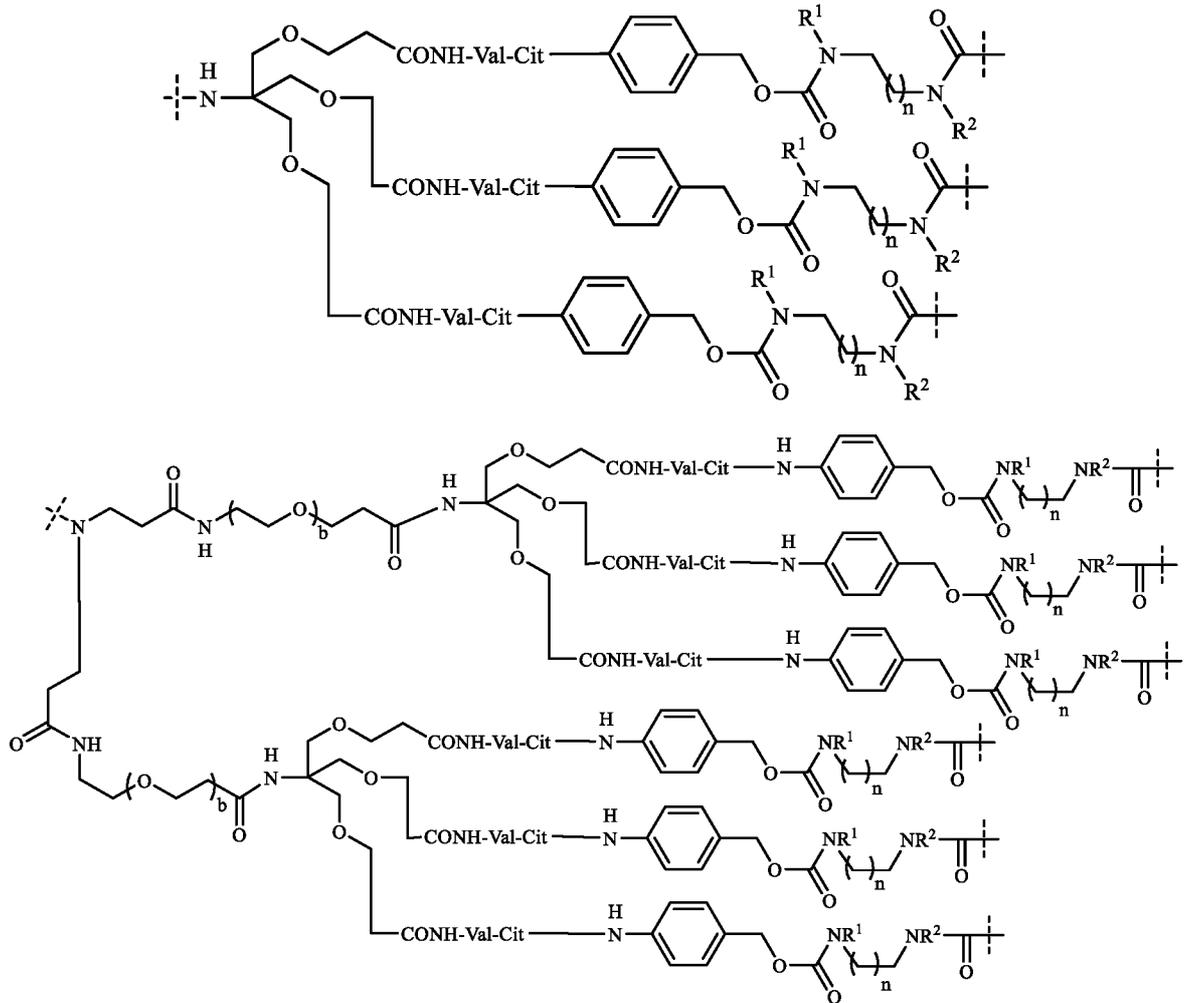
где каждый  $a$ ,  $b$  и  $c$  представляет собой целое число, выбранное от 0 до 25, включая все субъединицы; а  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляют водород или  $C_{1-10}$  алкильную группу.

В некоторых других вариантах осуществления триггерным элементом из аминокислотной последовательности может быть Val-Cit, Val-Ala, Val-Lys, Phe-Lys, Phe-Cit, Phe-Arg, Phe-Ala, Ala-Lys, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, D-Phe-Phe-Lys, Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly, or Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Gly-Phe-Gly.

В предпочтительных вариантах осуществления аминокислотной последовательностью может быть Val-Cit, Phe-Lys или Val-Lys.

В некоторых примерах осуществления разветвленный линкер В может быть выбран из:





где  $n = 1$  или  $2$ ;  $b$  представляет собой целое число, выбранное из 1-10; каждый из  $R^1$  и  $R^2$  независимо выбран из H, низкомолекулярного алкила или низкомолекулярного PEG  $[-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_3$ , где  $m = 1-10$ ].

## VI. Связующая группа

Различные компоненты конъюгатов по настоящему изобретению могут быть соединены различными химическими связями. Примеры включают, среди прочего, амид, сложный эфир, дисульфид, простой эфир, amino, карбамат, гидразин, тиоэфир и карбонат. Например, концевая гидроксильная группа ПЭГ компонента (P) может быть активирована и затем соединена с лизином (T) для обеспечения необходимой точки соединения между P и T. Формулы Ia или Ib. Связующая группа между T и  $(L^1)_a$ , или между T и  $(L^2)_b$ , или между  $(L^2)_b$  и B может быть амидом, образующимся в результате реакции между аминогруппой линкера  $(L^2)_b$  и карбоксильной группой лизина (T), или между карбоксильной группой  $(L^2)_b$  и аминогруппой T, или между карбоксильной группой  $(L^2)_b$  и аминогруппой B. В зависимости от необходимых характеристик конъюгата, подходящие связующие группы могут быть также включены между компонентом антитела (A) и

смежным линкером L<sup>1</sup>, или между любыми двумя аминокислотами, или между аминокислотой и пара-аминобензиловым спиртом, или между пара-аминобензиловым спиртом и N,N'-диметилэтилендиамином или его производными.

В некоторых вариантах осуществления связующая группа между различными компонентами конъюгатов может быть получена в результате соединения пары функциональных групп, которые обладают присущей им химической аффинностью или селективностью друг к другу. Эти типы сцепления или образования колец позволяют осуществлять сайт-специфическую конъюгацию для введения компонента белка или антитела к ПЭГилованному компоненту. Неограничивающие примеры этих функциональных групп, которые приводят к сайт-специфической конъюгации, включают тиол, малеимид, 2'-пиридилдитио вариант, ароматический или виниловый сульфен, акрилат, бром- или иодацетамид, азид, алкин, дибензоциклооктил (DBCO), карбонил, 2-аминобензальдегидную или 2-аминоацетофеноновую группу, гидразид, оксим, ацилтрифторборат калия, O-карбамоилгидроксиламин, транс-циклооктен, тетразин и триарилфосфин, бороновую кислоту, алкин.

#### **VII. Цитотоксическое соединение D**

В некоторых вариантах осуществления D может представлять собой любые гидроксил-несущие соединения, включая, среди прочего, алкалоид барвинка, лаулималид, колхицин, тубулизины, криптофицины, гемиастерлин, цемадотин, ризоксин, дискодермолид, таккалонолид A или B, или AF или AJ, таккалонолид AI-эпоксид, CA-4, эпотилон A и B, таксан, паклитаксел, доцетаксел, эпотилон, iSGD-1882, центанамицин, PNU-159682, унциаламицин, димеры индолинобензодиазепина, β-аманитин, аматоксины, тайланстатины, антрациклин, дауномицин, ларотаксел, тесетаксел, ортатаксел, CC-1065, Dxd, SN38, топотекан, CPT-11, камптотецин, рубитекан, бриостатин, каллистатин, бизелезин, дуокармицин, элеутеробин, панкреатистатин, саркодиктин, спонгистатин, эстрамустин, преднимустин, хлорозотоцин, ранимустин, калихеамицин, динемистин, эсперамицин, хромофор неокарциностатина, аклациномизины, азитромицин, блеомицины, каминомицин, карцинофилин, хромомицины, даунорубицин, деторубицин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, микофеноловая кислота, ногаламицин, пепломицин, пурумицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, флударабин, анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин (цитозин арабинозид, ага-C), гемцитабин, капецитабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, калустерон, эпителиостанол, трилостан, эллиптиния ацетат, майтанзиноиды, ансамитоцины, митоксантрон, мопидамол, пентостатин, пирарубицин, этопозид, подофиллотоксин, ризоксин, теназоновую кислоту,

микотоксин Т-2, верракурин А, роридин А, ангвидин, виндезин, манномустин, митобронитол, митолактол, винбластин, митоксантрон, винкристин, винорелбин, тенипозид, кселода, ралоксифен, 4-гидрокситамоксифен, эстрадиол, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон, бикалутамид, лейпролид, гозерелин или их фармацевтически приемлемые соли, кислоты или их производные, или их комбинацию.

### **VIII. Антитело и мишень**

Известен ряд терапевтических антител против молекул клеточной поверхности и/или их лигандов. Эти антитела могут быть использованы для выбора и создания специально разработанного связывающего компонента для специфического распознавания в мультиспецифическом ПЭГилированном конъюгате гидроксил-несущего лекарства с антителом. Примеры включают Монжуви/Тафазитамаб (CD19), Ритуксан/Мабтера/Ритуксимаб (CD20), Н7/Окрелизумаб (CD20), Зевалин/Ибризумаб (CD20), Арзерра/Офатумумаб (CD20), HLL2/Эпратузумаб, Инотузумаб (CD22), Зенапакс/Даклизумаб, Симулект/Базиликсимаб (CD25), Герцептин/Трастузумаб, Пертузумаб (Her2), Милотарг/Гемтузумаб (CD33), Раптива/Эфализумаб (Cd11a), Эрбитукс/Цетуксимаб (EGFR, рецептор эпидермального фактора роста), IMC-1121B (рецептор VEGF 2), Тисабри/Натализумаб ( $\alpha$ 4-субъединица интегринов  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 и  $\alpha$ 4 $\beta$ 7), РеоПро/Абциксимаб. (GPIIb-GPIIa и  $\alpha$ v $\beta$ 3-интегрин), Ортоклон ОКТ3/Муромонаб-CD3 (CD3), Бенлиста/Белимумаб (BAFF), Толеркс/Отеликсимаб (CD3), Солирис/Экулизумаб (белок комплемента C5), Актемра/Тоцилизумаб (IL-6R), Панорекс/Эдреколомаб (EpcAM, молекула адгезии эпителиальных клеток), СЕА-САМ5/Лабетузумаб (CD66/СЕА, карциноэмбриональный антиген), Тецентрик/атезолизумаб (анти-PDL1), Имфинзи/дурвалумаб (анти-PDL1), СТ-11 (PD-1, рецептор, ингибирующий программируемую гибель Т-клеток, CD-d279), H224G11 (рецептор с-Met), SAR3419 (CD19), IMC-A12/Циксутумумаб (IGF-1R, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1), MEDI-575 (PDGF-R, рецептор тромбоцитарного фактора роста), CP-675, 206/Тремелимумаб (цитотоксический антиген 4 Т-лимфоцитов), RO5323441 (фактор роста плаценты или PGF), HGS1012/Мапатумумаб (TRAIL-R1), SGN-70 (CD70), Ведотин (SGN-35)/Брентуксимаб (CD30) и ARH460-16-2 (CD44).

Известен ряд маркеров клеточной поверхности и их лигандов. Например, сообщалось, что раковые клетки экспрессируют по меньшей мере один из следующих маркеров клеточной поверхности и/или лигандов, включая, среди прочего, карбоангидразу IX,  $\alpha$ -фетопротеин,  $\alpha$ -актинин-4, А3 (антиген, специфичный для антитела А33), АРТ-4, В7, Ва-733, BAGE, ВгЕ3-антиген, СА125, CAMEL, САР-1, CASP-8/m, CCCL19, CCCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CDS, CD8, CD1-1A, CD14, CD15, CD16,

CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD45, CD46, CD47, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CDC27, CDK-4/m, CDKN2A, CXCR4, CXCR7, CXCL12, HIF-1- $\alpha$ , лиганд программируемой смерти 1/2 (PD-L1, PD-L2 или CD274 и CD273), специфический для толстой кишки антиген-р (CSA $\rho$ ), CEA (CEACAM5), CEACAM6, c-met, DAM, EGFR, EGFRvIII, EGP-1, EGP-2, ELF2-M, Ep-CAM, Flt-1, Flt-3, фолатный рецептор, антиген G250, GAGE, GROB, HLA-DR, HM1.24, хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) и его субъединицы, HER2/neu, HMGB-1, фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1), HSP70-2M, HST-2 или 1a, IGF-1R, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-2, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), KC4-антиген, KS-1-антиген, KS 1-4, Le-Y, LDR/FUT, фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF), MAGE, MAGE-3, MART-1, MART-2, NY-ESO-1, TRAG-3, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, MIF, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, MUM-1/2, MUM-3, NCA66, NCA95, NCA90, муцин рака поджелудочной железы, плацентарный фактор роста, p53, PLAGL2, простатическую кислую фосфатазу, PSA, PRAME, PSMA, PIGF, ILGF, ILGF-1R, IL-6, IL-25, RS5, RANTES, T101, SAGE, 5100, сурвивин, сурвивин-2B, TAC, TAG-72, тенасцин, рецепторы TRAIL, TNF- $\alpha$ , Tn-антиген, антигены Томсена-Фриденрайха, антигены некроза опухоли, VEGFR, фибронектин ED-B, WT-1, 17-1A-антиген, факторы комплемента C3, C3a, C3b, C5a, C5, маркер ангиогенеза, bcl-2, bcl-6, Kras, c-Met, онкогенный маркер и онкогенный продукт (Sensi, M. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12, 5023–5032; Parmiani, G. *et al.*, *J. Immunol.*, 2007, 178, 1975–1979; Castelli, C. *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 2005, 54, 187–207). Таким образом, антитела, распознающие такие специфические рецепторы клеточной поверхности или их лиганды, могут быть использованы для специфического и избирательного распознавания связывающих фрагментов в мультиспецифическом ADC по настоящему изобретению, нацеливаясь на ряд маркеров клеточной поверхности или лигандов, которые ассоциированы с заболеванием, и связываясь с ними. Антитела против вышеупомянутых антигенов могут быть использованы в качестве связывающего домена или компонентов для получения моно- или мультиспецифического ПЭГилированного конъюгата гидроксил-несущего лекарства с антителами по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления для лечения рака/опухолей используют моно- или мультиспецифические ПЭГилированные конъюгаты гидроксил-несущего лекарства с антителами для воздействия на ассоциированные с опухолью антигены (ТАА), о которых сообщается в Herberman, "Immunodiagnosis of Cancer", in Fleisher ed., "The Clinical Biochemistry of Cancer", page 347 (American Association of Clinical Chemists, 1979)

и в US4150149; US4361544; US4444744. Сообщения об антигенах, ассоциированных с опухолью, также можно найти в Mizukami, Y. *et al. Nature Med.*, 2005, 11, 992–997; Hatfield, K. J. *et al., Curr. Cancer Drug Tar.*, 2005, 5, 229–248; Vallbohmer, D. *et al., J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 3536–3544; и Ren, Y. *et al., Ann. Surg.* 2005, 242, 55–63, каждый из которых включен в настоящий документ в виде ссылки на указанные ТАА. Если заболевание включает лимфому, лейкоз или аутоиммунное расстройство, целевые антигены могут быть выбраны из группы, состоящей из CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD47, CD54, CD67, CD74, CD79a, CD80, CD126, CD138, CD154, CD273 (PD-L2), CD274 (PD-L1), CXCR4, B7, MUC1 или 1a, HM1.24, HLA-DR, тенаascin, VEGF, PIGF, ED-B-фибронектин, онкоген, онкогенный продукт (например, c-Met или PLAGL2), CD66a-d, антигены некроза, IL-2, T101, TAG, IL-6, MIF, TRAIL-R1 (DR4) и TRAIL-R2 (DR5).

Различные биспецифические ПЭГилированные конъюгаты гидроксил-несущего лекарства с антителами могут быть изготовлены против двух различных мишеней. Примеры пар антигенов включают CD19/CD3, BCMA/CD3, различные антигены семейства HER в комбинации (EGFR, HER2, HER3), IL17RA/IL7R, IL-6/IL-23, IL-1-β/IL-8, IL-6 или IL-6R/IL-21 или IL-21R, ANG2/VEGF, VEGF/PDGFR-β, VEGF 2/CD3, PSMA/CD3, EPCAM/CD3, комбинации антигенов, выбранных из группы, состоящей из VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, FLT3, c-FMS/CSF1R, RET, c-Met, EGFR, Her2/neu, HER3, HER4, IGFR, PDGFR, c-KIT, BCR, интегрин и MMP, с водорастворимым лигандом выбирают из группы, состоящей из VEGF, EGF, PIGF, PDGF, HGF и ангиопоэтина, ERBB-3/c-Met, ERBB-2/c-Met, рецептора EGF 1/CD3, EGFR/HER3, PSCA/CD3, c-Met/CD3, эндосиалина/CD3, EPCAM/CD3, IGF-1R/CD3, FAPALPHA/CD3, EGFR/IGF-1R, IL 17A/F, рецептора EGF 1/CD3 и CD19/CD16. Дополнительные примеры биспецифических ADC могут обладать (i) первой специфичностью, направленной на гликоэпитоп антигена, выбранного из группы, состоящей из х-структур Льюиса, b-структур Льюиса и у-структур Льюиса, Globo-H-структур, KH1, Tn-антигена, TF-антигена и углеводных структур муцинов, CD44, гликолипидов и гликофинголипидов, таких как Gg3, Gb3, GD3, GD2, Gb5, Gm1, Gm2 и сиалилтетраозилцерамида; и (ii) второй специфичностью, направленной на ErbB рецепторную тирозинкиназу, выбранную из группы, состоящей из EGFR, HER2, HER3 и HER4. GD2 в сочетании со вторым участком связывания антигена ассоциирован с иммунологической клеткой, выбранной из группы, состоящей из Т-лимфоцитов, НК-клеток, В-лимфоцитов, дендритных клеток, моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, мезенхимальных стволовых клеток, нервных стволовых клеток.

Моноспецифическое или биспецифическое антитело может быть объединено с другим моноспецифическим или биспецифическим антителом с использованием способа, раскрытого в настоящей заявке, для получения мультиспецифических ПЭГилированных ADC, при этом можно ожидать аддитивного/синергетического эффекта по сравнению с ADC с одной направленностью.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифические ПЭГилированные ADC по настоящему изобретению получают с использованием пар антител, которые специфически взаимодействуют и проявляют поддающуюся измерению аффинность к следующим парам мишеней.

Мишени фрагментов одноцепочечных антител	Механизмы действия	Заболевания (или здоровые добровольцы)
CD3, EpcAM	Переориентация Т-клеток на опухоль, Fc-опосредованные эффекторные функции	Злокачественные асциты при EpcAM-позитивных опухолях, солидная опухоль
CD3, Her2	Переориентация Т-клеток на опухоль	Метастатический рак молочной железы, солидные опухоли на поздних стадиях
CD3, CD19	Переориентация Т-клеток на опухоль	ОЛЛ из предшественников В-клеток, ОЛЛ, ДВККЛ, неходжкинская лимфома
CD3, CEA	Переориентация Т-клеток на опухоль	Гастроинтестинальная аденокарцинома
CD3, PSMA	Переориентация Т-клеток на опухоль	Рак простаты
CD3, CD123	Переориентация Т-клеток на опухоль	ОМЛ
CD3, gpA33	Переориентация Т-клеток на опухоль	Колоректальный рак
CD30, CD16A	Переориентация НК-клеток на опухолевые клетки	Лимфома Ходжкина
CD3, GD2	Переориентация Т-клеток на опухоль	Нейробластома и остеосаркома
CD3, EGFR	Аутологичные активированные Т-клетки на EGFR-позитивную опухоль	Легочные и другие солидные опухоли, рак толстой кишки и поджелудочной железы
CD28, MAPG	Переориентация Т-клеток на опухоль	Метастатическая меланома
CD3, пептид МНС	Переориентация Т-клеток на опухоль	Метастатическая меланома
CD19, CD22	Таргетинг белкового токсина на опухоль	В-клеточный лейкоз или лимфома
EGFR, HER3	Блокада 2 рецепторов, АЗКЦ	Рак головы и шеи Колоректальный рак
EGFR, c-Met	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
EGFR, 5T4	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
EGFR, Trop2	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или

Мишени фрагментов одноцепочечных антител	Механизмы действия	Заболевания (или здоровые добровольцы)
		метастатический рак
EGFR, CD73	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
EGFR, Нектин4	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
EGFR, Cripto 1	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
cMet, 5T4	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
cMet, Trop2	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
cMet, нектин4	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
cMet, Cripto 1	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
cMet, Her3	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
cMet, CEA	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
cMet, CD73	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
5T4, CEA	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
5T4, Trop2	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
5T4, Cripto 1	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
5T4, нектин4	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
5T4, CEA	Блокада 2 рецепторов	Распространенный или метастатический рак
HER2, HER2	Блокада 2 одинаковых или различных рецепторов	Рак желудка и пищевода Рак молочной железы
HER2, HER3	Блокада 2 рецепторов	Рак желудка и пищевода Рак молочной железы
IGF-1R, HER3	Блокада 2 рецепторов	Распространенные солидные опухоли
Ang2, VEGF A	Блокада 2 проангиогенных рецепторов	Солидные опухоли, влажная ВМД
CEA, HSG	Предварительный таргетинг опухоли для ПЭТ или радио-визуализации	Рак толстой кишки, рак молочной железы, рак легкого
IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$	Блокада 2 провоспалительных цитокинов	Остеоартрит
TNF, IL-17A	Блокада 2 провоспалительных цитокинов	Ревматоидный артрит, вульгарный псориаз
IL-13, IL-4	Блокада 2 провоспалительных	Идиопатический легочный

Мишени фрагментов одноцепочечных антител	Механизмы действия	Заболевания (или здоровые добровольцы)
	цитокинов	фиброз
IL-13, IL-4	Блокада 2 провоспалительных цитокинов	(Здоровые добровольцы)
TNF, HSA	Блокада провоспалительного цитокина, связывание с HSA для увеличения полужизни	Ревматоидный артрит
IL-17A/F, HSA	Блокада 2 провоспалительных цитокинов, связывание с HSA для увеличения полужизни	(Здоровые добровольцы)
IL-6R, HSA	Блокада провоспалительного цитокина, связывание с HSA для увеличения полужизни	Ревматоидный артрит
RANKL, HSA	Блокада резорбции кости, связывание с HSA для увеличения полужизни	Постменопаузальный остеопороз
Фактор IXa, фактор X	Коагуляция плазмы	Гемофилия
IL-6R, HSA	Блокада провоспалительного цитокина, связывание с HSA для увеличения полужизни	Ревматоидный артрит
RANKL, HSA	Блокада резорбции кости, связывание с HSA для увеличения полужизни	Постменопаузальный остеопороз
Фактор IXa, Фактор X	Коагуляция плазмы	Гемофилия

В одном варианте осуществления ПЭГилированный биспецифический ADC содержит биспецифическое одноцепочечное антитело, где два связывающих домена биспецифического одноцепочечного антитела соединены посредством пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит компонент, такой как цистеин или неприродный аминокислотный остаток, который может быть использован для сайт-специфической конъюгации антитела с неиммуногенным полимерным гидроксил-несущим лекарственным конъюгатом, например, ПЭГилированным гидроксил-несущим лекарственным конъюгатом. В некоторых других вариантах осуществления один или оба из двух связывающих доменов биспецифического одноцепочечного антитела содержат цистеин или неприродный аминокислотный остаток, которые могут быть использованы для сайт-специфической конъюгации антитела с неиммуногенным полимерным гидроксил-несущим лекарственным конъюгатом, например, ПЭГилированным гидроксил-несущим лекарственным конъюгатом.

В предпочтительном варианте осуществления ПЭГилированный биспецифический гидроксил-несущий лекарственный конъюгат представляет собой конъюгат двух антител или антигенсвязывающих фрагментов (таких как Fab, scFv, нанотела и т.п.), которые специфически взаимодействуют и проявляют поддающуюся измерению аффинность к двум различным эпитопам Her2.

### IX. Синтез

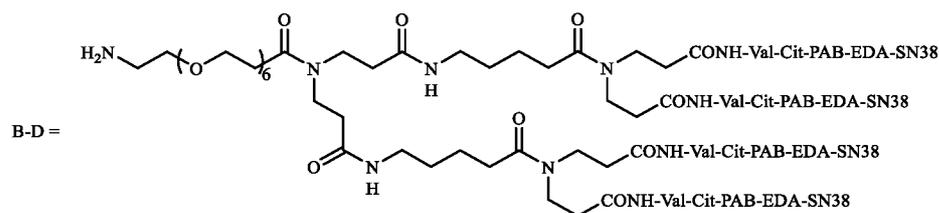
После выбора необходимого размера и формы ПЭГ концевая функциональная группа ПЭГ, такая как гидроксильная, карбоксильная группы и т.п., может быть преобразована в концевые разветвленные гетеробифункциональные группы с использованием любого известного в данной области техники способа (WO2018075308). В общих чертах, концевой гетеробифункциональный ПЭГ с разветвленным концом может быть получен путем активации концевой гидроксильной или карбоксильной группы ПЭГ N-гидроксисукцинимидом с использованием реагентов, таких как ди(N-сукцинимидил) карбонат (DSC), трифосген и т.п., в случае концевой гидроксильной группы, или с использованием связующих реагентов, таких как N,N-диизопропилкарбодиимид (DIPC), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) и т.п. в случае концевой карбоксильной группы в присутствии основания, такого как 4-диметиламинопиридин (DMAP), пиридин и т.п., для образования активированного ПЭГ.

Затем активированный ПЭГ может взаимодействовать с многофункциональной малой молекулой, такой как производное лизина H-Lys(Woc)-OH, в присутствии основания, такого как диизопропиламин (DIPEA), с образованием концевого разветвленного гетеробифункционального ПЭГ со свободной карбоксильной группой и защищенной Woc аминок группой PEG-Lys(Woc)-COOH. Как будет понятно специалистам в данной области техники, другие концевые функциональные группы ПЭГ, такие как галогенидная, амино, тиоловая группа и т.п., и другие трифункциональные малые молекулы, содержащие любую комбинацию из трех функциональных групп из перечня – NH<sub>2</sub>, –NHNH<sub>2</sub>, –COOH, –OH, –C(O)X (X = галогениды), –N=C=O, –SH, ангидрид, галогениды, малеимидо, C=C, C≡C и т.п. или их защищенный вариант могут быть использованы в качестве альтернатив для той же цели, если это необходимо.

Удаление Woc с помощью TFA с последующей реакцией с малеимидным спейсером, таким как NHS-PEG<sub>2</sub>-малеимид, приводит к образованию PEG-Lys(Mal)-COOH.

Отдельно цитотоксический препарат (например, SN38), связанный с триггером (например, Val-Cit) с помощью двух саморазрушающихся спейсеров (например, PAB-

EDA), соединяют с ответвлением с удлинителем со связывающим реагентом, таким как EDCI/HOBt, для получения соединения B-D: например,



Целевой продукт может быть получен путем соединения PEG-Lys(Mal)-COOH с B-D с помощью связующего реагента, такого как DCC, с образованием ПЭГилированного лекарственного конъюгата PEG-Lys(Mal)-4(Val-Cit-PAB-EDA-SN38).

Моноспецифические антитела, которые являются бивалентными для антигенов, или биспецифические антитела, такие как SCAHer2IхSCAHer2IV, могут быть получены путем генетических манипуляций с системами экспрессии. Например, ДНК, кодирующая биспецифический scFv, может быть синтезирована и введена в систему экспрессии (например, в клетки CHO). Затем интересующий белок экспрессируют и очищают с помощью хроматографических технологий.

Для получения ПЭГилированного конъюгата гидроксил-несущего лекарства с одноцепочечным антителом, можно провести специфическое взаимодействие ПЭГилированного гидроксил-несущего лекарственного конъюгата с функциональной группой малеимида или DBCO со свободной тиоловой или азидной функциональной группой бифункционального антитела [такого как SCAPDL1хSCACD47 или SCAHer2(1)хSCAHer2(2) или SCAcMet(1)хсMet(2)], которую вводят либо генетически, либо путем дериватизации белка, для формирования PEG-Lys(SCAPDL1хSCACD47)-4(Val-Cit-PAB-EDA-SN38) или PEG-Lys(SCAHer2(1)хSCAHer2(2))-4(Val-Cit-PAB-EDA-SN38) или PEG-Lys(SCAcMet(1)хSCAcMet(2))-4(Val-Cit-PAB-EDA-SN38).

ПЭГилированный мультиспецифический конъюгат гидроксил-несущего лекарства с антителом может быть получен аналогичным образом с использованием мультиспецифического антитела вместо моно- или биспецифического антитела.

В дополнение к паре групп сайт-специфической конъюгации тиол/малеимид или DBCO/азид, приведенной в качестве примера в настоящем изобретении, как это будет понятно специалистам в данной области техники, известны другие пары групп сайт-специфической конъюгации, такие как пара транс-циклооктены/тетразины; карбонил/гидразид; карбонил/оксим; пара сшивающих реагентов Сузуки-Мияура; пара реагентов для связывания Соногашира; пара реагентов для лигирования Штаудингера; пара реагентов для присоединения Кневенагеля-Михаэля, пара активный амин/акрилат и т.п. могут быть разработаны аналогичным образом и использованы в качестве альтернатив

для той же цели, если это необходимо. Приведенный выше список пар групп для сайт-специфической конъюгации является просто иллюстративным и не предназначен для ограничения типа пар групп сайт-специфической конъюгации, подходящих для использования в настоящей заявке.

### **Х. Композиции**

Настоящее изобретение также предлагает композицию, например, фармацевтическую композицию, содержащую соединение по настоящему изобретению, приготовленную вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Например, фармацевтическая композиция по изобретению может содержать соединение (например, ПЭГилированный биспецифический конъюгат гидроксил-несущего лекарства с антителом), которое связывается с двумя различными эпитопами рецептора Her2.

Терапевтические препараты по настоящему изобретению могут быть получены путем смешивания моно- или мультиспецифической молекулы лекарственного конъюгата, имеющего необходимую степень чистоты, с необязательными физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и содержат буферные вещества, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензил аммоний хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид; бензетония хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и m-крезол); низкомолекулярные белки, такие как сывороточный альбумин, желатин, или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; противоионы, образующие соли, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, Pluronic, или ПЭГ.

Препарат может также содержать более одного активного соединения, если это необходимо для лечения конкретного заболевания, предпочтительно с взаимодополняющими активностями, которые не оказывают отрицательного влияния друг на друга. Например, лекарственный препарат может дополнительно содержать другое антитело или мультиспецифическое антитело, цитотоксический агент,

химиотерапевтический агент или ADC. Такие молекулы надлежащим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для поставленной цели.

Фармацевтические композиции по изобретению можно применять в составе комбинированной терапии, то есть в сочетании с другими средствами. Ниже более подробно описаны примеры терапевтических средств, которые могут быть использованы в составе комбинированной терапии.

Препараты, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко достигается путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем добавления активного вещества в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизующей микрофильтрацией. Как правило, дисперсии готовят путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любого дополнительного необходимого ингредиента из его предварительно подвергнутого стерилизующей фильтрации раствора.

## **XI. Дозировка**

Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом-носителем для получения единой лекарственной формы, будет варьировать в зависимости от субъекта, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом-носителем для получения одной лекарственной формы, как правило, представляет собой то количество композиции, которое оказывает терапевтический эффект. Как правило, из ста процентов это количество будет составлять от примерно 0,01% до примерно 99% активного ингредиента, предпочтительно от примерно 0,1% до примерно 70%, наиболее предпочтительно от примерно 1% до примерно 50% активного ингредиента в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Режимы дозирования корректируют таким образом, чтобы обеспечить оптимальный необходимый эффект (например, терапевтический ответ). Например, может быть введен один болюс, может быть введено несколько разделенных доз с течением времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Особо предпочтительно составлять

композиции для парентерального введения в виде дозированных единиц для простоты введения и однородности дозировки. Форма дозированных единиц, используемая в настоящей заявке, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения необходимого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Технические требования к дозированным формам по изобретению продиктованы и непосредственно зависят от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и (b) ограничений, присущих уровню техники приготовления такого активного соединения с учетом индивидуальной чувствительности.

Для введения ПЭГилированного моно- или мультиспецифического гидроксил-несущего лекарственного конъюгата по настоящему изобретению доза составляет от примерно 0,0001 до 100 мг/кг, а чаще от 0,01 до 50 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозы могут составлять 0,1 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела, 10 мг/кг массы тела или 15 мг/кг массы тела, или находиться в диапазоне 1-15 мг/кг. Примерный режим лечения предусматривает введение ежедневно, один раз через день, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в месяц, один раз в 3 месяца или один раз в 6 месяцев. Предпочтительные режимы дозирования ПЭГилированного моно- или мультиспецифического гидроксил-несущего лекарственного конъюгата по изобретению включают внутривенное введение 1 мг/кг массы тела или 3 мг/кг массы тела, при этом моно- или мультиспецифический конъюгат лекарственного средства вводят с использованием одного из следующих режимов дозирования: (i) каждые три недели по шесть доз, затем по одной дозе в месяц; (ii) по одной дозе каждые три недели; (iii) 3 мг/кг массы тела однократно, затем по 1 мг/кг массы тела каждые три недели.

Дозировка и частота применения варьируют в зависимости от периода полувыведения моно- или мультиспецифического лекарственного конъюгата у пациента. Как правило, антитела человека имеют самый длительный период полувыведения, за ними следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и не-человеческие антитела. Дозировка и частота применения могут варьировать в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактическом применении относительно низкую дозу вводят с относительно редкими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца своей жизни. В терапевтических целях иногда требуется применение относительно

высоких доз с относительно короткими интервалами до тех пор, пока прогрессирование заболевания не уменьшится или не прекратится, и предпочтительно до тех пор, пока у пациента не проявится частичное или полное облегчение симптомов заболевания. После этого пациенту может быть назначен профилактический режим.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьировать таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения необходимого терапевтического эффекта для конкретного пациента, композиции и способа введения, не являющихся токсичными для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретных применяемых композиций по настоящему изобретению, способ введения, время введения, скорость выведения конкретного применяемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в сочетании с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, массу тела, самочувствие, общее состояние здоровья и предшествующую историю болезни пациента, проходящего лечение, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

«Терапевтически эффективная доза» ПЭГилированного моно- или мультиспецифического гидроксил-несущего лекарственного конъюгата по изобретению предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, к повышению частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания, или к профилактике ухудшения или инвалидности в результате заболевания. Например, для лечения опухолей «терапевтически эффективная доза» предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли, или метастазы по меньшей мере примерно на 10%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60%, и еще более предпочтительно по меньшей мере на 80% по сравнению с не получавшими лечения субъектами. Способность агента или соединения ингибировать рост опухоли можно оценить на модельной системе у животных, прогнозирующей эффективность для человеческих опухолей. Альтернативно, это свойство композиции можно оценить путем испытания способности соединения к ингибированию *in vitro* с помощью анализов, известных специалистам в данной области техники. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может уменьшить размер опухоли, метастазирование или иным образом облегчить симптомы у субъекта. Любой специалист в данной области техники сможет определить такие количества, основываясь на таких

факторах, как рост пациента, тяжесть симптомов у пациента и выбранный конкретный состав или способ введения.

## **ХII. Применение**

Композиция по изобретению может быть введена одним или несколькими путями введения с использованием одного или нескольких из множества способов, известных в данной области техники. Как будет понятно специалисту в данной области техники, способ и/или дозировка введения будут варьировать в зависимости от необходимых результатов. Предпочтительные пути введения ПЭГилированного моно- или мультиспецифического гидроксил-несущего лекарственного конъюгата по изобретению включают внутривенное, внутримышечное, внутрикожное, интраперитонеальное, подкожное, спинномозговое или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Фраза «парентеральное введение», используемая в настоящей заявке, означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включает, без ограничения указанными, внутривенные, внутримышечные, внутриаартериальные, интратекальные, внутрикапсульные, интраорбитальные, внутрисердечные, внутрикожные, интраперитонеальные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, интраспинальные, эпидуральные и интратеральные инъекции и инфузии. Альтернативно, моно- или мультиспецифический лекарственный конъюгат по изобретению может быть введен не-парентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или через слизистую оболочку, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения могут быть приготовлены с использованием носителей, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, таких как препараты с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэферы и полимолочная кислота. Многие способы приготовления таких лекарственных форм запатентованы или общеизвестны специалистам в данной области техники. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции можно вводить с помощью известных в данной области техники медицинских устройств. Например, терапевтическую композицию по изобретению можно вводить с помощью устройства для подкожных инъекций без иглы, такого как устройства, описанные в US 5399163, US 5383851, US 5312335, US 5064413, US

4941880, US 4790824 и US 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей, применимых в настоящем изобретении, включают имплантаты, описанные в патентах США 4487603, 4486194, 4447233, 4447224, 4439196 и 4475196. Эти патенты включены в настоящий документ посредством ссылок. Специалистам в данной области техники известны многие другие подобные имплантаты, системы доставки и модули.

### **XIII. Лечение**

Описанный в настоящей заявке ПЭГилированный моно- или мультиспецифический гидроксил-несущий лекарственный конъюгат может быть использован при получении лекарственных средств для лечения онкологических заболеваний, сердечно-сосудистых заболеваний, инфекционных заболеваний, воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, метаболических (например, эндокринных) заболеваний или неврологических (например, нейродегенеративных) заболеваний. Типичными неограничивающими примерами этих заболеваний являются болезнь Альцгеймера, неходжкинские лимфомы, В-клеточные острые и хронические лимфолейкозы, лимфома Беркитта, лимфома Ходжкина, волосатоклеточный лейкоз, острые и хронические миелолейкозы, Т-клеточные лимфомы и лейкозы, множественная миелома, глиома, макроглобулинемия Вальденстрема, карциномы (такие как карциномы полости рта, желудочно-кишечного тракта, толстой кишки, желудка, легочных путей, легких, молочной железы, яичников, предстательной железы, матки, эндометрия, шейки матки, мочевого пузыря, поджелудочной железы, костей, печени, желчного пузыря, почек, кожи и яичек), меланомы, саркомы, глиомы и рак кожи, острая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, хроническая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, дерматомиозит, хорея Сиденгама, миастения, системная красная волчанка, волчаночный нефрит, ревматическая лихорадка, полигландулярные синдромы, буллезный пемфигоид, сахарный диабет, пурпура Геноха-Шенлейна, постстрептококковый нефрит, узловатая эритема, артериит Такаюсу, болезнь Аддисона, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, саркоидоз, язвенный колит, мультиформная эритема, IgA нефропатия, узелковый полиартериит, анкилозирующий спондилоартрит, синдром Гудпасчера, облитерирующий тромбангит, синдром Шегрена, первичный билиарный цирроз печени, тиреоидит Хашимото, тиреотоксикоз, склеродермия, хронический активный гепатит, полимиозит/дерматомиозит, полихондрит, вульгарная пузырчатка, гранулематоз Вегенера, мембранозная нефропатия, боковой амиотрофический склероз, спинная сухотка, гигантоклеточный артериит/полимиалгия, пернициозная анемия, быстро прогрессирующий гломерулонефрит, псориаз, или фиброзирующий альвеолит.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к лечению субъекта *in vivo* с использованием вышеописанного ПЭГилированного моно- или мультиспецифического гидроксил-несущего лекарственного конъюгата, который ингибирует рост и/или метастазирование раковых опухолей. В одном варианте осуществления изобретения предлагается способ ингибирования роста и/или ограничения метастатического распространения опухолевых клеток у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата лекарственного средства с моно- или мультиспецифической молекулой.

Неограничивающие примеры предпочтительных видов рака для лечения включают хронический или острый лейкоз, включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфоцитарную лимфому, рак молочной железы, рак яичника, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому), рак почки (например, светлоклеточную карциному), рак предстательной железы (например, гормонально-резистентную аденокарциному предстательной железы), рак толстой кишки и рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого). Кроме того, изобретение включает рефрактерные или рецидивирующие злокачественные новообразования, рост которых может быть ингибирован с использованием антител по изобретению. Примеры других видов рака, которые можно лечить с использованием способов по изобретению, включают рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или интраокулярную злокачественную меланому, рак матки, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак яичка, рак матки, карциному маточных труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягких тканей, рак мочеиспускательного канала, рак полового члена, солидные опухоли детского возраста, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль спинного мозга, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, рак, вызванный воздействием окружающей среды, включая рак, вызванный асбестом, и комбинации указанных видов рака.

Используемый в настоящей заявке термин «субъект» предназначен для обозначения людей и животных, не относящихся к человеку. Животные, не относящиеся к человеку, включают всех позвоночных, например, млекопитающих и не-млекопитающих,

таких как приматы, не относящиеся к человеку, овцы, собаки, кошки, коровы, лошади, куры, амфибии и рептилии, хотя предпочтение отдается млекопитающим, таким как приматы, не относящиеся к человеку, овцы, собаки, кошки, коровы и лошади. Предпочтительными субъектами являются пациенты-люди, нуждающиеся в усилении иммунного ответа. Способы особенно подходят для лечения пациентов-людей, страдающих расстройством, которое можно лечить путем усиления иммунного ответа.

Описанное выше лечение также может сочетаться со стандартными методами лечения рака. Например, его можно эффективно сочетать с химиотерапевтическими режимами. В этих случаях может оказаться возможным снизить дозу вводимого химиотерапевтического реагента (Mokyr, M. et al. *Cancer Res.*, 1998, 58, 5301-5304).

Другие антитела, которые могут быть использованы для активации иммунной реакции организма, могут быть использованы с ПЭГилированными моно- или мультиспецифическими гидроксил-несущими лекарственными конъюгатами по настоящему изобретению. К ним относятся молекулы, нацеленные на поверхность дендритных клеток, которые активируют функцию DC и презентацию антигена. Например, антитела против CD40 способны эффективно заменять активность Т-хелперных клеток (Ridge, J. и др., *Nature*, 1998, 393, 474-478) и могут быть использованы в сочетании с конъюгатом с моно- или мультиспецифическим лекарственным средством по настоящему изобретению (Ito, N. и др., *Immunobiology*, 2000, 201, 527-540). Аналогичным образом, антитела, нацеленные на костимулирующие молекулы Т-клеток, такие как CTLA-4 (US5811097), CD28 (Haan, J. et al., *Immunol. Lett.*, 2014, 162, 103-112), OX-40 (Weinberg, A. et al., *J. Immunol.*, 2000, 164, 2160-2169), 4-1BB (Melero, I. et al., *Nature Med.*, 1997, 3, 682-685), и ICOS (Hutloff, A. et al., *Nature*, 1999, 397, 262-266), или антитела, нацеленные на PD-1 (US8008449) и PD-L1 (US7943743; US8168179), также могут обеспечивать повышенные уровни активации Т-клеток. В другом примере моно- или мультиспецифический лекарственный конъюгат по настоящему изобретению может быть использован в сочетании с противоопухолевыми антителами, такими как Ритуксан (ритуксимаб), Герцептин (трастузумаб), Бексар (тозитумомаб), Зевалин (ибритумомаб), Кампат (алемтузумаб), Лимфоцид (эпртузумаб), Авастин (бевацизумаб), и Тарцева (эрлотиниб), и тому подобное.

### **Определения терминов**

Используемый в настоящей заявке термин «алкил» относится к углеводородной цепи, длина которой обычно составляет от 1 до 25 атомов. Такие углеводородные цепи предпочтительно, но не обязательно являются насыщенными и могут быть разветвленными или прямыми, хотя обычно предпочтение отдается прямой цепи. Термин

C<sub>1-10</sub> алкил включает алкильные группы с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 атомами углерода. Аналогично, C<sub>1-25</sub> алкил включает все алкилы с числом атомов углерода от 1 до 25. Примерные алкильные группы включают метил, этил, изопропил, n-бутил, n-пентил, 2-метил-1-бутил, 3-пентил, 3-метил-3-пентил и т.п. Используемый здесь термин «алкил» включает циклоалкил, когда речь идет о трех или более атомах углерода. Если не указано иное, алкил может быть замещенным или незамещенным.

Используемый в настоящей заявке термин «функциональная группа» относится к группе, которая может быть использована в обычных условиях органического синтеза для образования ковалентной связи между объектом, к которому она присоединена, и другим объектом, который обычно несет дополнительную функциональную группу. «Бифункциональный линкер» относится к линкеру с двумя функциональными группами, которые могут формировать две связи с другими частями конъюгата.

Используемый в настоящей заявке термин «производное» относится к химически модифицированному соединению с дополнительным структурным компонентом с целью введения новой функциональной группы или настройки свойств исходного соединения.

Используемый в настоящей заявке термин «защитная группа» относится к компоненту, который предотвращает или блокирует реакцию конкретной химически активной функциональной группы в молекуле при определенных условиях реакции. Различные защитные группы хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в T. W. Greene and G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, Wiley, New York, 1999, и в P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, Third Ed., Thieme Chemistry, 2003, и в ссылках, приведенных в них.

Используемый в настоящей заявке термин «ПЭГ» относится к полиэтиленгликолю. Полиэтиленгликоли, используемые в настоящем изобретении, обычно содержат структуру  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ . ПЭГи могут иметь различные молекулярные массы, структуры или геометрию. ПЭГ-группа может содержать кэп-группу, которая с трудом подвергается химическому превращению в обычных условиях реакции синтеза. Примеры кэп-групп включают  $-\text{OC}_{1-25}$  алкил или -ОАрил.

Используемый в настоящей заявке термин «ПЭГилат» относится к химической модификации полиэтиленгликолем.

Используемый в настоящей заявке термин «линкер» относится к атому или совокупности атомов, используемых для связывания взаимосвязанных фрагментов, таких как антители и цитотоксическое лекарственное средство. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Получение различных линкеров для конъюгатов описано в литературе, включая, например, Goldmacher et al., *Antibody-drug Conjugates and*

Immunotoxins: From Pre-clinical Development to Therapeutic Applications, Chapter 7, in Linker Technology and Impact of Linker Design on ADC properties, Edited by Phillips GL; Ed. Springer Science and Business Media, New York (2013). Расщепляемые линкеры включают группы или компоненты, которые могут быть расщеплены при определенных биологических или химических условиях. Примеры включают ферментативно расщепляемую аминокислотную последовательность валин-цитруллин, дисульфидные линкеры, элиминацию 1,4- или 1,6-бензила, расщепляемую систему с триметиловым замком, саморасщепляющуюся систему на основе бицина, кислотоустойчивые силилэфирные линкеры и фотолабильные линкеры.

Используемый в настоящей заявке термин «связующая группа» или «связывание» относится к функциональной группе или компоненту, соединяющему различные компоненты соединения или конъюгата. Примеры связующей группы включают, среди прочего, амид, сложный эфир, карбамат, простой эфир, тиоэфир, дисульфид, гидразон, оксим и семикарбазид, карбодимид, кислотно-лабильную группу, фотолабильную группу, пептидазно-лабильную группу и эстеразно-лабильную группу. Например, линкерная часть и полимерная часть могут быть соединены друг с другом посредством амидной или карбаматной связующей группы.

Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо для описания расположения аминокислотных остатков в полимере. Пептид, полипептид или белок может состоять из стандартных 20 натуральных аминокислот в дополнение к редким аминокислотам и синтетическим аналогам аминокислот. Они могут представлять собой любую цепочку аминокислот, независимо от длины или посттрансляционной модификации (например, гликозилирования или фосфорилирования).

«Рекомбинантный» пептид, полипептид или белок относится к пептиду, полипептиду или белку, полученному методами рекомбинантной ДНК, т.е. полученному из клеток, трансформированных экзогенной ДНК-конструкцией, кодирующей необходимый пептид. «Синтетический» пептид, полипептид или белок относится к пептиду, полипептиду или белку, полученному химическим синтезом. Термин «рекомбинантный», когда он используется применительно, например, к клетке, нуклеиновой кислоте, белку или вектору, указывает на то, что клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были модифицированы введением гетерологичной нуклеиновой кислоты или белка, или изменением нативной нуклеиновой кислоты или белка, или что клетка является производной от клетки, модифицированной таким образом. В рамках данного изобретения представлены гибридные белки, содержащие одну или

несколько из вышеупомянутых последовательностей и гетерологичную последовательность. Гетерологичный полипептид, нуклеиновая кислота или ген являются теми, которые происходят от чужеродного вида или, если они происходят от того же вида, существенно модифицированы по сравнению со своей первоначальной формой. Два гибридных домена или последовательности являются гетерологичными друг другу, если они не находятся рядом друг с другом в натуральном белке или нуклеиновой кислоте.

«Изолированный» пептид, полипептид или белок относится к пептиду, полипептиду или белку, который был отделен от других белков, липидов и нуклеиновых кислот, с которыми он естественным образом связан. Содержание полипептида/белка может составлять по меньшей мере 10% (т.е. любое процентное соотношение между 10% и 100%, например, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70 %, 80%, 85%, 90%, 95%, и 99%) в пересчете на сухую массу очищенного препарата. Чистоту можно измерить любым подходящим стандартным методом, например, с помощью колоночной хроматографии, электрофореза в полиакриламидном геле или анализа ВЭЖХ. Изолированный полипептид/белок, описанный в изобретении, может быть очищен из природного источника, получен методами рекомбинантной ДНК или химическими методами.

«Антиген» относится к веществу, которое вызывает иммунологическую реакцию или связывается с продуктами этой реакции. Термин «эпитоп» относится к области антигена, с которой связывается антитело или Т-клетка.

Термин «антитело», как указано в настоящей заявке, включает целые антитела и любой антигенсвязывающий фрагмент или их отдельные цепи. Целые антитела представляют собой гликопротеины, содержащие по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL), причем константная область легкой цепи состоит из одного домена. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), с вкраплениями более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждый VH и VL состоят из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. CDR и FR вариабельной области тяжелой цепи представляют собой HF1, HCDR1, HFR2, HCDR2, HFR3, HCDR3, HFR4. CDR и FR вариабельной области легкой цепи представляют собой LF1, LCDR1, LFR2, LCDR2, LFR3, LCDR3, LFR4. Вариабельные

области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Используемый в настоящей заявке термин «фрагменты антител» может включать часть интактного антитела, обычно содержащую антигенсвязывающую и/или переменную область интактного антитела и/или Fc-область антитела, которая сохраняет связывающую способность FcR. Примеры фрагментов антител включают линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител; нанотела; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Используемый в настоящей заявке термин «антигенсвязывающий фрагмент или часть» антитела (или просто «фрагмент или часть антитела») относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающую функцию антитела могут выполнять фрагменты полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающий фрагмент или часть» антитела, включают (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  и  $C_{H1}$ ; (ii) фрагмент  $F(ab')_2$ , двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fab', который по существу является Fab с частью шарнирной области; (iv) фрагмент Fd, состоящий из  $V_H$  и  $C_{H1}$  доменов; (v) фрагмент Fv, состоящий из  $V_L$  и  $V_H$  доменов одного плеча антитела; (vi) dAb, который состоит из  $V_H$  домена; (vii) изолированную гиперпеременную область (CDR); и (viii) нанотело, переменную область тяжелой цепи, содержащую один переменный домен и два константных домена. Более того, хотя два домена фрагмента Fv,  $V_L$  и  $V_H$ , кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с помощью рекомбинантных методов с помощью синтетического линкера, который позволяет получить их в виде единой белковой цепи, в которой участки  $V_L$  и  $V_H$  соединяются, образуя одновалентные молекулы (известные как как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird, R. E. *et al.*, *Science*, 1988, 242, 423–426; and Huston, J. S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 5879–5883. Предполагается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином «антигенсвязывающий фрагмент или часть» антитела. Эти фрагменты антител получают с использованием обычных методов, известных специалистам в данной области техники, и эти фрагменты проверяют на пригодность таким же образом, как и интактные антитела.

Используемый в настоящей заявке термин «Fc-фрагмент» или «Fc-область» применяется для определения С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина.

Используемый в настоящей заявке термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью и направлены против одного антигенного участка. Кроме того, в отличие от обычных препаратов (поликлональных) антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты антигена. Модификатор «моноклональный» указывает на характер антитела, получаемого из по существу однородной популяции антител, и не должен рассматриваться как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, которые будут использоваться в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены гибридным способом, впервые описанным Kohler and Milstein (Kohler, G. *et al.*, *Nature*, 1975, 256, 495–497), который приведен здесь в качестве ссылки, или могут быть получены методами рекомбинантной ДНК (US4816567), который включен в настоящую заявку в виде ссылки. Моноклональные антитела также могут быть выделены из библиотек фаговых антител с использованием методов, описанных Clackson T. *et al.*, *Nature*, 1991, 352, 624–628 and Marks J. D. *et al.*, *J Mol Biol*, 1991, 222, 581–597, например, каждый из которых включен в настоящую заявку в виде ссылки.

Моноклональные антитела здесь, в частности, включают «химерные» антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи (цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител, при условии, что они проявляют необходимую биологическую активность (см. US4816567; Morrison, S. L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 6851–6855; Neuberger, M. S. *et al.*, *Nature*, 1984, 312, 604–608; Takeda, S. *et al.*, *Nature*, 1985, 314, 452–454; PCT/GB8500392, каждый из которых включен в настоящую заявку в виде ссылки).

«Гуманизированные» формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную

последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. По большей части гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антитела-реципиенты), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены остатками из гипервариабельной области нечеловеческого вида (антитела-доноры), такого как мышь, крыса, кролик или нечеловеческий примат, обладающими необходимой специфичностью, аффинностью и емкостью. В некоторых случаях остатки Fv каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина заменяются соответствующими нечеловеческими остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которых нет ни в антителах реципиента, ни в антителах донора. Эти модификации вносят для дальнейшего улучшения характеристик антител. В общем, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а обычно из двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют таковым в иммуноглобулине, отличном от человеческого, и все или по существу все остатки FR являются таковыми в последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело при необходимости также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно области человеческого иммуноглобулина. Более подробную информацию можно найти в Jones, P. T. *et al.*, *Nature*, 1986, 321, 522–525; Riechmann, L. *et al.*, *Nature*, 1988, 332, 323–329; Presta, L. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1992, 2, 593–596; US5225539, каждый из которых включен в настоящую заявку в виде ссылки.

«Человеческие антитела» относятся к любому антителу с полностью человеческими последовательностями, например, которое может быть получено из гибридомы человека, библиотеки фаговых дисплеев человека или трансгенной мыши, экспрессирующей последовательности человеческих антител.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к комбинации активного агента с носителем, инертным или активным, что делает композицию особенно подходящей для диагностического или терапевтического применения *in vivo* или *ex vivo*.

Используемый в настоящей заявке термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, замедляющие абсорбцию, и т.п., которые являются физиологически совместимыми. «Фармацевтически приемлемый носитель» после применения у субъекта не вызывает нежелательных физиологических эффектов. Носитель в фармацевтической композиции должен быть «приемлемым» также в том смысле, что он совместим с активным ингредиентом и может быть способен стабилизировать его. Один или несколько

солубилизирующих агентов могут быть использованы в качестве фармацевтических носителей для доставки активного агента. Примеры фармацевтически приемлемого носителя включают, среди прочего, биосовместимые носители, вспомогательные вещества, добавки и разбавители для получения композиции, пригодной для использования в качестве лекарственной формы. Примеры других носителей включают коллоидный оксид кремния, стеарат магния, целлюлозу и лаурилсульфат натрия. В издании Remington Pharmaceutical Sciences описаны дополнительные подходящие фармацевтические носители и разбавители, а также фармацевтические принадлежности, необходимые для их использования. Предпочтительно носитель пригоден для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). Терапевтические соединения могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. «Фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, которая сохраняет необходимую биологическую активность исходного соединения и не оказывает каких-либо нежелательных токсикологических эффектов (см., например, Berge, S. M. *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1997, 66,1-19).

Используемый в настоящей заявке термин «лечение» относится к применению соединения или агента у субъекта, который имеет расстройство или подвержен риску развития расстройства, с целью излечения, улучшения, облегчения, выправления, отсрочки возникновения, предотвращения или смягчения симптомов расстройства, патологического состояния, вторичного по отношению к расстройству, или предрасположенности к этому расстройству.

«Эффективное количество» относится к количеству активного соединения/агента, которое требуется для достижения терапевтического эффекта у субъекта, проходящего лечение. Как признают специалисты в данной области техники, эффективные дозы будут варьировать в зависимости от типов подвергаемых лечению состояний, способа введения, использования вспомогательных веществ и возможности совместного применения с другими терапевтическими средствами. Терапевтически эффективным количеством комбинации для лечения опухолевого заболевания является количество, которое вызывает, например, уменьшение размера опухоли, уменьшение количества опухолевых очагов или замедление роста опухоли по сравнению с животными, не получавшими лечения.

Как описано в настоящей заявке, предусмотрено несколько диапазонов значений. Понятно, что каждое промежуточное значение, с точностью до десятой доли единицы нижнего предела, если контекст явно не диктует иное, между верхним и нижним

пределами этого диапазона также конкретно раскрывается. Каждый меньший диапазон между любым заявленным значением или промежуточным значением в заявленном диапазоне и любым другим заявленным или промежуточным значением в этом заявленном диапазоне охватывается изобретением. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться или исключаться из диапазона, и каждый диапазон, в котором любой из этих диапазонов, ни один из них, или оба предела не включены в меньшие диапазоны, также охватывается изобретением, при условии соблюдения любого конкретно исключенного предела в указанном диапазоне. Там, где указанный диапазон включает один или оба из указанных пределов, в изобретение также включены диапазоны, исключающие один или оба из этих включенных пределов.

Термин «примерно» обычно относится к плюс-минус 10% от указанного числа. Например, «приблизительно 10%» может указывать на диапазон от 9% до 11%, а «приблизительно 1» может означать от 0,9 до 1,1. Другие значения «примерно» могут быть очевидны из контекста, такие как округление, так что, например, «приблизительно 1» также может означать от 0,5 до 1,4.

### **ПРИМЕРЫ**

Приведенные ниже примеры служат для дальнейшего ознакомления с изобретением, но никоим образом не предназначены для ограничения реальной сферы применения изобретения.

#### **Пример 1. Получение 30k<sub>m</sub>PEG-Lys(Mal)-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38)**

##### **Получение Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP (Соединение 5, Фиг.1)**

**Fmoc-Val-OSu (2):** Fmoc-Val-OH (20,3 г; 60,0 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (NHS; 9,0 г; 78,0 ммоль) растворяли в смеси CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (120 мл) и THF (40 мл). Отдельно EDCI (13,8 г; 72,0 ммоль) растворяли в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 мл) и охлаждали до 0-5°C. Затем к раствору EDCI добавляли раствор Fmoc-Val-OH и NHS. Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали при комнатной температуре до завершения реакции. Затем реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении и дважды подвергали азеотропной дистилляции с использованием THF (100 мл). Концентрированный остаток растворяли с помощью THF (800 мл) и фильтровали для удаления EDU. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении и повторно перемешивали с n-гептаном (800 мл) при температуре 5-10°C в течение 12 часов. Твердые частицы отделяли фильтрацией, промывали и сушили под вакуумом с получением Fmoc-Val-OSu (2) (23,8 г; 91%) в виде белого порошка. HRMS (ESI): расч. для C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 459,1532; найдено 459,1523.

**Fmoc-Val-Cit (3):** Fmoc-Val-OSu (2) (9,8 г; 22,5 ммоль) растворяли в DME (150 мл) при комнатной температуре. Отдельно растворяли бикарбонат натрия (2,1 г; 24,7 ммоль) в воде (150 мл) комнатной температуры с последующим добавлением L-цитруллина (4,3 г; 24,7 ммоль) для получения однородного прозрачного раствора. Полученный раствор L-цитруллина затем добавляли к раствору Fmoc-Val-OSu с последующим добавлением THF (75 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. После завершения реакции смесь подкисляли 15%-ной лимонной кислотой (200 мл), затем концентрировали под вакуумом. Смесь суспендировали в воде (500 мл) и полученную смесь перемешивали в течение 2 часов с последующей фильтрацией и сушкой под вакуумом. Высушенные твердые вещества повторно суспендировали в метил-трет-бутиловом эфире (500 мл) и перемешивали в течение 12 часов. Суспензию отделяли фильтрацией и промывали. Выделенные твердые вещества сушили под вакуумом с получением Fmoc-Val-Cit (3) (6,8 г; 61%) в виде белого порошка. HRMS (ESI): расч. для  $C_{26}H_{33}N_4O_6$   $[M+H]^+$  497,24004 найдено 497,2388.

**Fmoc-Val-Cit-PAВ-OH (4):** EEDQ (4,95 г; 20,0 ммоль) добавляли к раствору соединения 3 (4,96 г; 10,0 ммоль) и 4-аминобензилового спирта (2,46 г; 20,0 ммоль) в растворах  $CH_2Cl_2$  (350 мл) и MeOH (150 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов. Добавляли дополнительный EEDQ (2,5 г; 10,0 ммоль) и перемешивали еще 24 часа. После завершения реакции растворитель удаляли при пониженном давлении, а полученный остаток повторно разбавляли метил-трет-бутиловым эфиром (800 мл) в течение 12 часов. Твердые частицы отделяли фильтрацией, промывали и сушили под вакуумом с получением соединения 4 (4,1 г; 69%) в виде белого порошка. HRMS (ESI): расч. для  $C_{33}H_{40}N_5O_6$   $[M+H]^+$  602,2979; найдено 602,2969.

**Fmoc-Val-Cit-PAВ-PNP (5):** DIPEA (2,5 мл; 15,0 ммоль) добавляли к раствору соединения 4 (5,2 г; 8,6 ммоль) и бис(4-нитрофенил)карбоната (4,9 г; 16,1 ммоль) в DMF (52 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 часов. После завершения реакции продукт осаждали из реакционной смеси путем добавления безводного этилацетата (250 мл) и метил-трет-бутилового эфира (250 мл). Полученную суспензию перемешивали и охлаждали до 0°C. После 30-минутного перемешивания при 0°C твердые частицы отделяли фильтрацией с последующей промывкой и сушкой под вакуумом с получением Fmoc-Val-Cit-PAВ-PNP (5) (4,7 г; 72%) в виде бледно-желтого порошка. HRMS (ESI) расч. для  $C_{40}H_{43}N_6O_{10}$   $[M+H]^+$  767,3041; найдено 767,3045.

#### **Получение Val-Cit-PAВ-DEA-SN38 (соединение 10)**

##### **Схема реакции А (Фиг.2)**

**Вос-DEA-SN38 (7):** Раствор SN-38 (3,9 г; 10 ммоль) в безводном THF (100 мл) охлаждали до 0°C в атмосфере азота, после чего добавляли 4-нитрофенилхлорформиат (2,7 г; 13,4 ммоль) и Et<sub>3</sub>N (7,0 мл; 50 ммоль). Смесь перемешивали при 0°C в течение 1,5 часов. Добавляли Вос-DEA (6) (9,4 г; 50 ммоль) и перемешивали еще 1 час. Реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры. После завершения реакции реакционную смесь концентрировали, а неочищенный продукт очищали методом колоночной хроматографии с получением соединения 7.

**DEA-SN38 (8):** Раствор соединения 7 (0,99 г; 1,63 ммоль) в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл) охлаждали до 0°C, после чего добавляли TFA (3 мл). Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 часа, затем добавляли CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл). Разбавленную смесь концентрировали до получения неочищенного продукта 8.

**Fmoc-Val-Cit-PAB-DEA-SN38 (9):** Соединение 8 (1,4 г; 2,8 ммоль) и Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP (5) (2,8 г; 3,6 ммоль) растворяли в DMF (20 мл). Затем добавляли HOBT (0,75 г; 5,6 ммоль) и пиридин (1,7 мл) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 24 часов. После завершения реакции реакционную смесь охлаждали до 0°C и добавляли метил-трет-бутиловый эфир (180 мл). Полученную суспензию перемешивали в течение 3-5 часов и фильтровали. Выделенные твердые частицы промывали и сушили под вакуумом. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией для получения соединения 9.

**Val-Cit-PAB-DEA-SN38 (10):** Соединение 9 (2,5 г; 2,2 ммоль) суспендировали в безводном DMF (40 мл) и полученную суспензию перемешивали при комнатной температуре до образования однородной суспензии. Затем добавляли диэтиламин (10 мл) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 3 часов. После завершения реакции в течение 60 минут добавляли метил-трет-бутиловый эфир (100 мл) и этилацетат (50 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 4 часов при температуре 0°C. Твердые частицы отделяли фильтрацией и сушили под вакуумом с получением соединения 10.

### **Схема реакции В (Фиг.3)**

**Вос-DEA-SN38 (7):** Раствор SN-38 (11,8 г; 30 ммоль) и DIPEA (18,3 мл; 105 ммоль) в безводном CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 мл) охлаждали до 0°C в атмосфере азота, после чего добавляли 4-нитрофенилхлорформиат (19,3 г; 960 г ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. После завершения реакции растворитель удаляли при пониженном давлении, а полученный остаток повторно перемешивали в метил-трет-бутиловом эфире (600 мл) в течение 1 часа. Твердые вещества отделяли фильтрацией,

промывали и сушили под вакуумом с получением соединения PNP-SN38 (16 г; 96%) порошка бледно-желтого цвета. MS (ESI)  $m/z$   $[M+H]^+$  558,29.

Соединение 6 (5,31 г; 27,0 ммоль) и PNP-SN38 (5,02 г; 9,0 ммоль) солюбилизировали в DMF (50 мл). Затем добавляли HOBt (2,43 г; 18,0 ммоль) и пиридин (4,51 мл) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 24 часов до завершения реакции. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и добавляли к метил-трет-бутиловому эфиру (90 мл). Полученную суспензию перемешивали в течение 3-5 часов, фильтровали, промывали и сушили под вакуумом. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии с получением соединения 7 (4,5 г; 82%) в виде бледно-желтого порошка. MS (ESI)  $m/z$   $[M+H]^+$  607,30,  $[M+Na]^+$  629,30.

**DEA-SN38 (8):** Раствор соединения 7 (3,03 г; 5,0 ммоль) в  $CH_2Cl_2$  (20 мл) перемешивали при комнатной температуре, добавляли по каплям TFA (4 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 0,5 часов, растворитель удаляли под вакуумом. Остаток обрабатывали метил-трет-бутиловым эфиром (60 мл), полученную суспензию перемешивали в течение 1 часа, фильтровали, промывали и сушили до получения чистого соединения 8 (2,42 г; 96%) в виде бледно-желтого твердого вещества. MS (ESI)  $m/z$   $[M+Na]^+$  529,25.

**Fmoc-Val-Cit-PAB-DEA-SN38 (9):** Соединение 8 (1,82 г; 3,6 ммоль) и Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP (5) (2,3 г; 3,0 ммоль) растворяли в DMF (20 мкл). Затем добавляли HOBt (0,81 г; 6,0 ммоль) и пиридин (1,9 мл), и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 24 часов. После завершения реакции реакционную смесь охлаждали до 0°C и добавляли метил-трет-бутиловый эфир (150 мл). Полученную суспензию перемешивали в течение 1 часа и фильтровали. Выделенные твердые частицы промывали и сушили под вакуумом. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной очистки с получением соединения 9 (2,9 г; 86%) в виде белого твердого вещества. MS (ESI)  $m/z$   $[M+H]^+$  1134,57;  $[M+Na]^+$  1156,47.

**Val-Cit-PAB-DEA-SN38 (10):** Соединение 9 (2,5 г; 2,2 ммоль) суспендировали в безводном DMF (40 мл), и полученную суспензию перемешивали при комнатной температуре до образования однородной суспензии. Затем добавляли диэтиламин (10 мл) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 1 часа. После завершения реакции в течение 60 минут добавляли метил-трет-бутиловый эфир (100 мл) и этилацетат (50 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 4 часов при температуре 0°C. Твердые вещества отделяли фильтрацией и сушили под вакуумом с получением соединения 10 (2,0 г; 97%) в виде бледно-желтого порошка. MS (ESI)  $m/z$   $[M+H]^+$  912,53;  $[M+Na]^+$  934,43.

**Получение разветвленного промежуточного продукта NH<sub>2</sub>-PEG<sub>6</sub>-3(Val-Cit-PAV-DEA-SN38) (Соединение 16, Фиг.4)**

**Соединение 12:**

**Схема реакции А:** Соединение 11 (1,21 г; 10,0 ммоль), разведенное в 2,0 мл DMSO из только что открытого флакона, охлаждали до 15°C в атмосфере азота. При перемешивании добавляли 0,2 мл 5,0 М NaOH, затем по каплям добавляли трет-бутилакрилат (5,0 мл; 34 ммоль) (Примечание: Для этой реакции оптимальна смесь растворителей, содержащая 5-10% воды в DMSO). Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и оставляли перемешиваться на 24 часа. На этом этапе избыток реагента и растворителя удаляли под вакуумом при комнатной температуре, а остаток очищали методом колоночной хроматографии с получением соединения 12.

**Схема реакции В:** Соединение 11 (2,43 г; 20,0 ммоль), растворенное в 6,0 мл DMSO из только что открытого флакона, охлаждали до 15°C в атмосфере аргона. При перемешивании добавляли 0,6 мл 5,0 М NaOH с последующим введением трет-бутилакрилата (8,72 г; 68 ммоль) по каплям. Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и оставляли перемешиваться на 24 часа. На этом этапе избыток реагента и растворителя удаляли под вакуумом при комнатной температуре, а остаток очищали методом колоночной хроматографии с получением соединения 12 (4,2 г; 43%) в виде бесцветного масла. MS (ESI) m/z [M+H]<sup>+</sup> 506,35; [M+Na]<sup>+</sup> 528,40.

Соединение 13: К перемешиваемому раствору FmocNH-PEG<sub>6</sub>-COOH (1,15 г; 2,0 ммоль) в смеси сухого CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 мл) и DMF (20 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 12 (1,5 г; 2,2 ммоль), EDCI (575 мг; 3,0 ммоль) и HOBT (80 мг; 0,6 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока не наблюдали полное превращение с помощью ВЭЖХ. После завершения реакции смесь концентрировали под вакуумом. Неочищенную реакционную смесь очищали с помощью хроматографии на силикагеле для получения продукта 13.

**Соединение 14:** Соединение 13 (1,25 г; 1,0 ммоль) растворяли в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл) с последующим добавлением TFA (3,0 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Растворитель удаляли под вакуумом при температуре <35°C, насколько возможно. Остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле для получения продукта 14.

**Соединение 15:** К перемешиваемому раствору соединения 14 (865 мг; 0,8 ммоль) в смеси сухого CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл) и DMF (10 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 10 (2,4 г; 2,64 ммоль), EDCI (863 мг; 4,5 ммоль) и HOBT (108 мг; 0,8 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока не

наблюдали полное превращение с помощью ВЭЖХ. После завершения реакции смесь концентрировали под вакуумом. Неочищенную реакционную смесь очищали с помощью хроматографии на силикагеле для получения продукта 15.

**Соединение 16:** диэтиламин (2,0 мл) добавляли к раствору 15 (0,41 г; 0,11 ммоль) в DMF (5 мл) и оставляли реакцию протекать при комнатной температуре в течение 2 часов. После проведения реакции реакционную смесь концентрировали под вакуумом, а остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ с использованием колонки Welch Ultimate XB-C18 с получением продукта 16.

**Получение 30kmPEG-Lys(Mal)-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (соединение 22, Фиг.5)**

**Соединение 18:** H-Lys (вос)-ОН (369 мг; 1,5 ммоль) добавляли в безводный DMF (100 мл) с последующим добавлением DIPEA (0,83 мл; 5,0 ммоль), соединения 30kmPEG-NHS (17) (15 г; 0,5 ммоль) и безводного  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 мл). Смесь перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре в течение ночи. Нерастворимые вещества отделяли фильтрацией. Растворитель удаляли, а остаток перекристаллизовывали из  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /метил-трет-бутилового эфира (45 мл/300 мл). Выделенные твердые вещества перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (30 мл/450 мл). Продукт сушили при 40°C в течение 4 часов в вакууме до получения продукта 18 (13,6 г; 91%) в виде белого порошка.

**Соединение 19:** Соединение 18 (5,7 г; 0,19 ммоль) растворяли в безводном  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (57 мл) с последующим добавлением TFA (29,5 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Растворитель удаляли под вакуумом при температуре <35°C, насколько возможно. Остаток дважды перекристаллизовывали из  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /метил-трет-бутилового эфира (14,5 мл/115 мл). Выделенный продукт сушили в вакууме при 40°C с получением продукта 19 (4,7 г; 84%) в виде белого порошка.

**Соединение 21:** К перемешиваемому раствору соединения 19 (5,5 г; 0,18 ммоль) в безводном растворе  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (55 мл) при 0°C добавляли DIPEA (473 мг; 3,6 ммоль), а затем 5-малеимидовалериановую кислоту-NHS (20) (138 мг; 0,47 ммоль). Смесь перемешивали при температуре 0°C в течение 1,5 часов, затем давали медленно нагреться от 0°C до комнатной температуры. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение ночи. Растворитель удаляли, а остаток перекристаллизовывали из  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /метил-трет-бутилового эфира (13,8 мл/110 мл). Выделенные твердые вещества перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (11 мл/165 мл). Остаток сушили под вакуумом с получением продукта 21 (5,0 г; 90%) в виде белого порошка.

**Соединение 22:** К перемешиваемому раствору соединения 21 (6,0 г; 0,2 ммоль) в безводном  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (60 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 16 (2,1 г; 0,6 ммоль), EDCI (230 мг; 1,2 ммоль) и HOBT (243 мг; 1,8 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока с помощью ВЭЖХ не наблюдали полное превращение. Растворитель удаляли, а остаток перекристаллизовывали из  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /метил-трет-бутилового эфира (18 мл/120 мл). Выделенные твердые вещества снова перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (12 мл/180 мл). Продукт сушили при 40°C в течение 4 часов в вакууме до получения продукта 22.

**Пример 2. Приготовление 30kmPEG-Lys(Mal)-6(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (соединение 28, Фиг.6)**

**Соединение 24:** К раствору соединения FmocNH-PEG6-COOH (1,15 г; 2,0 ммоль) в безводном  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли ди-трет-бутил 3,3'-азандиилдипропаноат (23) (0,64 мл; 2,2 ммоль), EDCI (0,58 г, 3,0 ммоль) и HOBT (54 мг; 0,4 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока с помощью ТСХ не наблюдали полное превращение. После завершения реакции смесь экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 мл  $\times$  2). Органический слой промывали рассолом (20 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали под вакуумом. Неочищенную реакционную смесь очищали с помощью хроматографии на силикагеле с получением продукта 24.

**Соединение 25:** Соединение 24 (0,39 г; 0,47 ммоль) растворяли в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4,0 мл) с последующим добавлением TFA (2,0 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Растворитель удаляли под вакуумом при температуре <35°C, насколько возможно. Остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле для получения продукта 25.

**Соединение 26:** К перемешиваемому раствору соединения 25 (1,08 г; 1,5 ммоль) в смеси сухого  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 мл) и DMF (20 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 16 (11,7 г; 3,3 ммоль), EDCI (767 мг; 4,0 ммоль) и HOBT (108 мг; 0,8 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока с помощью ВЭЖХ не наблюдали полное превращение. После завершения реакции смесь концентрировали под вакуумом. Неочищенную реакционную смесь очищали с помощью хроматографии на силикагеле для получения продукта 26.

**Соединение 27:** диэтиламин (5,0 мл) добавляли к раствору 26 (2,4 г; 0,31 ммоль) в DMF (20 мл), и реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 часов. После реакции смесь концентрировали под вакуумом, а остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ с использованием колонки Welch Ultimate XB-C18 с получением продукта 27.

**Соединение 28:** К перемешиваемому раствору соединения 21 (6,0 г; 0,2 ммоль) в безводном  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (60 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 27 (4,5 г; 0,6 ммоль), EDCI (230 мг; 1,2 ммоль) и HOBT (243 мг; 1,8 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока с помощью ВЭЖХ не наблюдали полное превращение. Растворитель удаляли, а остаток перекристаллизовывали из  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /метил-трет-бутилового эфира (18 мл/120 мл). Выделенные твердые вещества снова перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (12 мл/180 мл). Продукт сушили при  $40^\circ\text{C}$  в течение 4 часов в вакууме до получения продукта 28.

### **Пример 3. Получение 20kmPEG-Glu(Mal)-4(Val-Cit-PAB-DEA-Duo-DM)**

#### **Получение Val-Cit-PAB-DEA-Duo-DM (соединение 33, Фиг.7)**

**WocDEA-Duo-DM (30):** Раствор дуокармицина DM (29) (4,6 г; 10 ммоль) в безводном THF (100 мл) охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  в атмосфере азота, после чего добавляли 4-нитрофенилхлорформиат (2,7 г; 13,4 ммоль) и  $\text{Et}_3\text{N}$  (7,0 мл; 50 ммоль). Смесь перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 1,5 часов. Добавляли соединение Woc-DEA (6) (9,4 г; 50 ммоль) и смесь перемешивали еще 1 час. Реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и затем концентрировали. Неочищенную реакционную смесь очищали с помощью хроматографии на силикагеле с получением продукта 30.

**DEA-Duo-DM (31):** Раствор соединения 30 (1,1 г; 1,62 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 мл) охлаждали до  $0^\circ\text{C}$ , после чего добавляли TFA (3 мл). Смесь перемешивали при  $0^\circ\text{C}$  в течение 1 часа и разбавляли  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 мл). Разбавленный раствор концентрировали под вакуумом до получения неочищенного соединения 31.

**Fmoc-Val-Cit-PAB-DEA-Duo-DM (32):** Соединение 31 (1,6 г; 2,8 ммоль) и Fmoc-Val-Cit-PAB-PNP (5) (2,8 г; 3,6 ммоль) растворяли в DMF (20 мкл). Затем добавляли HOBT (0,75 г; 5,6 ммоль) и пиридин (1,7 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов. После завершения реакции реакционную смесь охлаждали до  $0^\circ\text{C}$ . Добавляли метил-трет-бутиловый эфир (180 мл). Полученную суспензию перемешивали в течение 3-5 часов и фильтровали. Твердые частицы промывали и сушили под вакуумом. Неочищенный продукт был очищен с помощью хроматографии на силикагеле для получения продукта 32.

**Val-Cit-PAB-DEA-Duo-DM (33):** Соединение 32 (2,0 г; 1,7 ммоль) суспендировали в безводном DMF (40 мл) и полученную суспензию перемешивали при комнатной температуре до образования однородной суспензии. Затем добавляли диэтиламин (10 мл) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 3 часов. После завершения реакции в течение 60 минут добавляли метил-трет-бутиловый эфир (100 мл) и этилацетат (50 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 4 часов при температуре

0°C. Твердые частицы отделяли фильтрацией и сушили под вакуумом с получением соединения 33.

**Получение разветвленного промежуточного продукта NH<sub>2</sub>-PEG6-4(Val-Cit-PAV-DEA-Duo-DM) (соединение 40)**

**Схема реакции А (Фиг.8)**

Соединение 35: К раствору соединения 34 (0,68 г; 2,0 ммоль) в безводном CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли ди-трет-бутил-3,3'-азандиилдипропаноат (23) (0,64 мл; 2,2 ммоль), EDCI (0,58 г; 3,0 ммоль) и HOBT (54 мг; 0,4 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока с помощью ТСХ не наблюдали полное превращение. После завершения реакции смесь экстрагировали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 мл × 2), а объединенный органический слой промывали рассолом (20 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали под вакуумом. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле для получения продукта 35.

**Соединение 36:** Соединение 35 (0,5 г; 0,84 ммоль) растворяли в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6,0 мл) с последующим добавлением TFA (3,0 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Растворитель удаляли, насколько это возможно, под вакуумом при температуре <35 °C. Остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле для получения продукта 36.

**Соединение 37:** К раствору соединения 36 (964 мг, 2,0 ммоль) в смеси сухого CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 мл) и DMF (8 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли Val-Cit-PAV-DEA-Duo-DM (33) (4,3 г; 4,4 ммоль), EDCI (575 мг; 3,0 ммоль) и HOBT (135 мг; 1,0 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. После завершения реакции смесь концентрировали под вакуумом. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле для получения продукта 37.

**Соединение 38:** Диэтиламин (2,0 мл) добавляли к раствору соединения 37 (0,5 г) в DMF (5,0 мл), и реакции давали протекать при комнатной температуре в течение 2 часов. После реакции реакционную смесь концентрировали под вакуумом, а остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ с использованием колонки Welch Ultimate XB-C18 с получением продукта 38.

**Соединение 39:** К перемешиваемому раствору соединения 25 (546 мг; 0,76 ммоль) в безводном CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 мл) и DMF (20 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 38 (3,7 г; 1,7 ммоль), EDCI (430 мг; 2,3 ммоль) и HOBT (40 мг; 0,3 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. После завершения реакции смесь

концентрировали под вакуумом. Неочищенную реакционную смесь очищали с помощью хроматографии на силикагеле для получения продукта 39.

**Соединение 40:** диэтиламин (2,0 мл) добавляли к раствору соединения 39 (0,51 г; 0,1 ммоль) в DMF (5 мл), и реакции давали протекать при комнатной температуре в течение 2 часов. После проведения реакции реакционную смесь концентрировали под вакуумом, а остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ с использованием колонки Welch Ultimate XB-C18 с получением продукта 40.

#### **Схема реакции В (Фиг.9)**

**Соединение 35:** К раствору соединения 34 (0,62 г; 2,0 ммоль) в безводном  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли ди-трет-бутил 3,3'-азандиилдипропаноат (23) (0,62 мл; 2,2 ммоль), EDCI (0,58 г; 3,0 ммоль) и HOBt (54 мг; 0,4 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока с помощью ТСХ не наблюдали полное превращение. После завершения реакции смесь экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 мл  $\times$  2), а объединенный органический слой промывали рассолом (20 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали под вакуумом. Неочищенный продукт был очищен с помощью хроматографии на силикагеле с получением продукта 35 (1,1 г; 96%) в виде бесцветного масла. HRMS (ESI) расч. для  $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  567,3070; найдено 567,3062.

**Соединение 36:** Соединение 35 (0,5 г; 0,84 ммоль) растворяли в муравьиной кислоте (3,0 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Растворитель удаляли под вакуумом при температуре  $<35^\circ\text{C}$ , насколько возможно. Остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле с получением продукта 36 (1,5 г; 94%) в виде бесцветного масла. HRMS (ESI) расч. для  $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  455,1818; найдено 455,1824.

**Соединение 37:** К раствору соединения 36 (964 мг; 2,0 ммоль) в смеси безводного  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 мл) и DMF (8 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли Val-Cit-PAV-DEA-Duo-DM (33) (4,3 г; 4,4 ммоль), EDCI (575 мг; 3,0 ммоль) и HOBt (135 мг; 1,0 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. После завершения реакции смесь концентрировали под вакуумом. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле с получением продукта 37.

**Соединение 38:** Диэтиламин (2,0 мл) добавляли к раствору соединения 37 (0,5 г) в DMF (5,0 мл), и реакции давали протекать при комнатной температуре в течение 2 часов. После реакции реакционную смесь концентрировали под вакуумом, а остаток очищали с

помощью препаративной ВЭЖХ с использованием колонки Welch Ultimate ХВ-С18 с получением продукта 38.

**Соединение 39:** К перемешиваемому раствору соединения 25 (546 мг; 0,76 ммоль) в безводном  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 мл) и DMF (20 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 38 (3,7 г; 1,7 ммоль), EDCI (430 мг, 2,3 ммоль) и HOBT (40 мг; 0,3 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока с помощью ВЭЖХ не было подтверждено полное превращение. После завершения реакции смесь концентрировали под вакуумом. Неочищенный продукт очищали с помощью хроматографии на силикагеле с получением продукта 39.

**Соединение 40:** диэтиламин (2,0 мл) добавляли к раствору 39 (0,51 г; 0,1 ммоль) в DMF (5 мл), и реакции давали протекать при комнатной температуре в течение 2 часов. После проведения реакции реакцию смесь концентрировали под вакуумом, а остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ с использованием колонки Welch Ultimate ХВ-С18 с получением продукта 40.

**Получение 20kmPEG-Glu(Mal)-4(Val-Cit-PAВ-DEA-Duo-DM) (соединение 46, Фиг. 10)**

**Соединение 42:** Н-Glu (OtBu)-ОН (305 мг; 1,5 ммоль) добавляли в безводный DMF (67 мл) с последующим добавлением DIPEA (0,83 мл; 5,0 ммоль), соединения 20kmPEG-NHS (41) (10 г; 0,5 ммоль) и безводного  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 мл). Смесь перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре в течение ночи. Растворитель удаляли, а остаток перекристаллизовывали из  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /метил-трет-бутилового эфира (30 мл/200 мл). Выделенные твердые вещества снова перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (20 мл/300 мл). Продукт сушили при 40°C в течение 4 часов в вакууме до получения продукта 42 в виде белого порошка.

**Соединение 44:** К перемешиваемому раствору соединения 42 (2,0 г; 0,1 ммоль) в безводном  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 43 (66 мг; 0,3 ммоль), EDCI (115 мг; 0,6 ммоль) и HOBT (122 мг; 0,9 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. Растворитель удаляли, а остаток перекристаллизовывали из  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /метил-трет-бутилового эфира (5 мл/40 мл). Выделенные твердые вещества были повторно перекристаллизованы из MeCN/2-пропанола (4 мл/60 мл). Продукт сушили при 40°C в течение 4 часов в вакууме до получения продукта 44 в виде белого порошка.

**Соединение 45:** Соединение 44 (5,8 г; 0,29 ммоль) растворяли в безводном  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (58 мл). Добавляли TFA (29 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в

течение 1 часа. Растворитель удаляли под вакуумом при температуре  $<35^{\circ}\text{C}$ , насколько возможно. Остаток дважды перекристаллизовывали из  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /метил-трет-бутилового эфира (14,5 мл/115 мл). Выделенный продукт сушили в вакууме при температуре  $40^{\circ}\text{C}$  с получением продукта 45 в виде белого порошка.

**Соединение 46:** К перемешиваемому раствору соединения 45 (6,0 г; 0,3 ммоль) в безводном  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (60 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 40 (4,4 г; 0,9 ммоль), EDCI (345 мг; 1,8 ммоль) и HOBT (365 мг; 2,7 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. Растворитель удаляли, а остаток перекристаллизовывали из  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /метил-трет-бутилового эфира (18 мл/120 мл). Выделенные твердые вещества снова перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (12 мл/180 мл). Продукт сушили при  $40^{\circ}\text{C}$  в течение 4 часов в вакууме для получения соединения 46.

#### **Пример 4. Получение Mal-20kPEG-3(Val-Cit-PAB-DEA-Duo-DM)**

**Получение разветвленного промежуточного продукта  $\text{NH}_2$ -PEG<sub>6</sub>-3(Val-Cit-PAB-DEA-Duo-DM) (соединение 48, Фиг.11)**

**Соединение 47:** К перемешиваемому раствору соединения 14 (865 мг; 0,8 ммоль) в смеси безводного  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 мл) и DMF (10 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 33 (2,6 г; 2,64 ммоль), EDCI (863 мг; 4,5 ммоль) и HOBT (108 мг; 0,8 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. После завершения реакции смесь концентрировали под вакуумом. Неочищенную реакционную смесь очищали с помощью хроматографии на силикагеле для получения продукта 47.

**Соединение 48:** Диэтиламин (2,0 мл) добавляли к раствору соединения 47 (0,48 г; 0,12 ммоль) в DMF (5,0 мл), и реакцию выдерживали при комнатной температуре в течение 2 часов. После реакции реакционную смесь концентрировали под вакуумом, а остаток очищали с помощью препаративной ВЭЖХ с использованием колонки Welch Ultimate XB-C18 с получением продукта 48.

#### **Получение Mal-20kPEG-3 (Val-Cit-PAB-DEA-Duo-DM) (соединение 51, Фиг.12)**

**Соединение 50:** амин-PEG20k-CO<sub>2</sub>H (49) (1,0 г; 0,05 ммоль) растворяли в безводном  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 мл) при  $0^{\circ}\text{C}$ . Добавляли DIPEA (83 мкл; 0,5 ммоль), затем соединение 20 (46 мг; 0,15 ммоль). Смесь перемешивали при температуре  $0^{\circ}\text{C}$  в течение 1,5 часов. После реакции раствору давали медленно нагреться от  $0^{\circ}\text{C}$  до комнатной температуры, а затем перемешивали в атмосфере аргона в течение ночи. Растворитель удаляли, а остаток перекристаллизовывали из  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /метил-трет-бутилового эфира (2,5

мл/20 мл). Выделенные твердые вещества снова перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (2 мл/30 мл). Остаток сушили под вакуумом с получением продукта 50.

**Соединение 51:** К перемешиваемому раствору соединения 50 (6,0 г; 0,2 ммоль) в безводном CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 мл) при комнатной температуре в среде аргона добавляли соединение 48 (2,1 г; 0,6 ммоль), EDCI (230 мг; 1,2 ммоль) и HOBT (243 мг; 1,8 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. Растворитель удаляли, а остаток перекристаллизовывали из CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/метил-трет-бутилового эфира (18 мл/120 мл). Выделенные твердые вещества снова перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (12 мл/180 мл). Продукт сушили при 40°C в течение 4 часов в вакууме до получения продукта 51.

#### **Пример 5. Получение SCAPDL1xSCACD47 (соединение 52)**

Биспецифические одноцепочечные антитела (SCA) против PDL1 и CD47 (SCAPDL1xSCACD47) были получены с помощью технологии рекомбинантной ДНК в клетках млекопитающих (например, CHO с использованием EasySelect™) или дрожжей (например, набора для экспрессии *Pichia pastori*, содержащий вектор pPICZ). Для облегчения последующей конъюгации с помощью технологии рекомбинантной ДНК в линкер между двумя SCA PDL1 и CD47 была введена функциональная тиоловая группа для сайт-специфической конъюгации. Последовательности ДНК SCAPDL1×SCACD47, соответствующие аминокислотной последовательности, приведенной ниже (SEQ ID № 1) были синтезированы и клонированы в экспрессирующие векторы и трансформированы в клетках-хозяевах. После экспрессии клеток надосадочную жидкость культуральной среды для клеток-хозяев, экспрессирующих SCAPDL1×SCACD47, собирали после центрифугирования и помещали в колонку, нагруженную Ni (2,6 см × 13 см) (кат.№ AA207311, BestChrome, Шанхай, Китай), предварительно уравновешенную 50 мМ фосфатом натрия, 100 мМ NaCl, pH 7,0. Белок элюировали буфером, состоящим из 50 мМ фосфата натрия, 250 мМ имидазола, 100 мМ NaCl, pH 7,0, и фракционировали в пробирки объемом 15 мл. Захваченный белок дополнительно очищали с помощью колонки CartoL (Кат.№ 17-5478-02, GE Healthcare, Нью-Джерси) (1,6 × 8 см), которую предварительно уравновешивали 50 мМ фосфатом натрия и 100 мМ NaCl (pH 7,0). Белок элюировали 75 мМ уксусной кислотой (pH 3,0) с получением продукта 52.

#### **Аминокислотная последовательность SCAPDL1×SCACD47(SEQ ID № 1):**

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSIVYSNGNTYLGWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF  
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGQGTKLEIKGGSGGS  
 GSGSGSGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYSNMMHWVRQAPGQRLEW  
 MGTIYPGNDTTSYNQKFKDRVTITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAM  
 DYWGQGTLLVTVSSGCGGSSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW  
 YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHP  
 ATFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS  
 DSWIHWRQAPGKLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL  
 RAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLVTHHHHHH.

**Пример 6. Получение 30kmPEG(SCAPDL1xSCACD47)-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (Соединение 53, Фиг.13)**

Значение pH раствора белка 52 довели до pH 6,8 с помощью исходного раствора фосфата натрия с pH 4,12, содержащего 500 мМ фосфата натрия, с последующим восстановлением 3,5 мМ ТСЕР-НСI при комнатной температуре в течение 30 минут. Восстановленный белок довели до 5 мг/мл. Пэгилирование SCAPDL1xSCACD47 проводили при комнатной температуре в течение 3 часов при pH 6,8 с использованием от 5 до 10 эквивалентов соединения 22 [30kmPEG-Lys(Mal)-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38)]. Реакцию останавливали 10 мМ L-цистина при комнатной температуре в течение 10 минут. Конечный продукт 53 [30kmPEG(SCAPDL1xSCACD47)-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38)] очищали на колонке для катионообменной хроматографии (СМ Fast Flow) при pH 6,5 в 20 мМ фосфатном буфере. Целевое соединение 53 было подтверждено с помощью ВЭЖХ и клеточного анализа активности.

**Пример 7. Получение 30kmPEG-(SCAPDL1xSCACD47)-6(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (Соединение 54, Фиг.14)**

**Соединение 54** получают путем конъюгации соединения 28 [30kmPEG-Lys(Mal)-6(Val-Cit-PAB-DEA-SN38)] с белком 52 с использованием процедур, аналогичных процедурам получения соединения 53.

**Пример 8. Получение 20kmPEG-(SCAPDL1xSCACD47)-4(Val-Cit-PAB-DEA-Duo-DM) (Соединение 55, Фиг.15)**

**Соединение 55** получают путем конъюгации соединения 46 [20kmPEG-Glu(Mal)-4(Val-Cit-PAB-DEA-Duo-DM)] с белком 52 с использованием процедур, аналогичных процедурам получения соединения 53.

**Пример 9. Получение SCAPDL1xSCACD47-20kPEG-3(Val-Cit-PAB-DEA-Duo-DM) (Соединение 56, Фиг.16)**

**Соединение 56** получают путем конъюгации соединения 51 [Mal-20kPEG-3(Val-Cit-PAB-DEA-Duo-DM)] с белком 52 с использованием процедур, аналогичных процедурам получения соединения 53.

**Пример 10. Получение разветвленного промежуточного продукта NH<sub>2</sub>-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (соединение 58, Фиг.17)**

**Соединение 57:** К перемешиваемому раствору соединения 36 (0,75 г; 1,55 ммоль) в безводном DMF (30 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли Val-Cit-PAB-DEA-SN38 (10) (3,1 г; 3,42 ммоль), EDCI (0,89 г; 4,66 ммоль) и HOBt (0,21 г; 1,55 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока с помощью ТСХ не наблюдали полное превращение. После завершения реакции смесь концентрировали в вакууме. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и добавляли метил-трет-бутиловый эфир (90 мл). Полученную суспензию перемешивали в течение 1 часа, фильтровали, промывали и сушили под вакуумом. Неочищенный продукт был очищен с помощью хроматографии на силикагеле с получением соединения 57 (2,4 г, 68%) в виде белого твердого вещества. MS (ESI) m/z [M+2H]<sup>2+</sup> 1135,82.

**Соединение 58:** Диэтиламин (4,0 мл) добавляли к раствору соединения 57 (1,2 г) в DMF (12 мл), затем реакции давали протекать при комнатной температуре в течение 40 минут. Реакционную смесь концентрировали в вакууме, а полученный остаток растворяли в метил-трет-бутиловом эфире (90 мл) в течение 2 часов. Твердые вещества отделяли фильтрацией, промывали и сушили под вакуумом с получением соединения 58 (1,0 г; 93%) в виде бледно-желтого порошка. MS (ESI) m/z [M+2H]<sup>2+</sup> 1024,67; [M+2Na]<sup>2+</sup> 1046,63.

**Пример 11. Получение разветвленного промежуточного продукта N<sub>3</sub>-PEG<sub>6</sub>-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (соединение 62, Фиг.18)**

**Соединение 60:** К раствору соединения 12 (1,5 г; 2,9 ммоль) в безводном CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение N<sub>3</sub>-PEG<sub>6</sub>-CO<sub>2</sub>H (59) (1,0 г; 2,64 ммоль), EDCI (0,76 г; 4,0 ммоль) и HOBt (110 мг; 0,8 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ТСХ. После завершения реакции смесь экстрагировали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 мл × 2), а органический слой промывали рассолом (20 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме. Неочищенную реакционную смесь очищали на колонке с силикагелем с получением продукта 60 (2,0 г; 88%) в виде бесцветного масла. HRMS (ESI) расч. для C<sub>32</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 567,3070; найдено 567,3062. MS (ESI) m/z [M+H]<sup>+</sup> 867,55; [M+Na]<sup>+</sup> 889,40.

**Соединение 61:** Соединение 60 (2,0 г; 3,1 ммоль) растворяли в муравьиной кислоте (30 мл), смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов.

Растворитель удаляли под вакуумом при температуре  $<35^{\circ}\text{C}$ , насколько возможно. Остаток очищали на колонке с силикагелем с получением продукта 61 (1,5 г; 98%) в виде бесцветного масла. MS (ESI)  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^{+}$  699,24;  $[\text{M}+\text{Na}]^{+}$  721,34.

**Соединение 62:** К перемешиваемому раствору соединения 61 (0,6 г; 0,86 ммоль) в безводном DMF (25 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли Val-Cit-PAB-DEA-SN38 (10) (2,6 г; 2,8 ммоль), EDCI (0,74 г; 3,86 ммоль) и HOBt (0,12 г; 0,86 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. После завершения реакции смесь концентрировали под вакуумом. Реакционную смесь охлаждали до  $0^{\circ}\text{C}$  и добавляли к ней метил-трет-бутиловый эфир (120 мл). Полученную суспензию перемешивали в течение 1 часа, фильтровали, промывали и сушили под вакуумом. Неочищенный продукт очищали на колонке с силикагелем для получения соединения 62 (1,7 г; 60%) в виде белого твердого вещества. MS (ESI)  $m/z$   $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$  1127,53;  $[\text{M}+3\text{Na}]^{3+}$  1149,58.

**Пример 12. Получение разветвленного соединения 65 [N<sub>3</sub>-PEG<sub>6</sub>-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38)] и 66 [N<sub>3</sub>-PEG<sub>6</sub>-4(Val-Cit-PAB-DEA-SN38)] (Фиг.19)**

**Соединение 63:** К раствору соединения 59 (0,76 г; 2,0 ммоль) в безводном  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли ди-трет-бутил 3,3'-азандиилдипропаноат (23) (0,64 мл; 2,2 ммоль), EDCI (0,58 г; 3,0 ммоль) и HOBt (54 мг; 0,4 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ТСХ. После завершения реакции смесь экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 мл  $\times$  2), а органический слой промывали рассолом (20 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали под вакуумом. Неочищенную реакционную смесь очищали на колонке с силикагелем с получением продукта 63 (1,2 г; 99%) в виде бесцветного масла. HRMS (ESI) расч. для  $\text{C}_{29}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_{11}$   $[\text{M}+\text{H}]^{+}$  635,3867; найдено 635,3860.

**Соединение 64:** Соединение 63 (0,87 г; 1,37 ммоль) растворяли в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 мл) с последующим добавлением TFA (4,0 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Растворитель удаляли под вакуумом, насколько это было возможно, при температуре  $<35^{\circ}\text{C}$ . Остаток очищали на колонке с силикагелем до получения продукта 64 (0,62 г; 86%) в виде бесцветного масла. HRMS (ESI) расч. для  $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_{11}$   $[\text{M}+\text{H}]^{+}$  523,2615; найдено 523,2607.

**Соединение 65:** К перемешиваемому раствору соединения 64 (0,6 г; 1,15 ммоль) в безводном DMF (20 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли Val-Cit-PAB-DEA-SN38 (10) (2,3 г; 2,5 ммоль), EDCI (0,66 г; 3,5 ммоль) и HOBt (90 мг; 0,7 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное

превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. После завершения реакции смесь концентрировали под вакуумом. Реакционную смесь охлаждали до 0°C и добавляли к ней метил-трет-бутиловый эфир (100 мл). Полученную суспензию перемешивали в течение 1 часа, фильтровали, промывали и сушили под вакуумом. Неочищенный продукт очищали на колонке с силикагелем для получения соединения 65 (1,2 г; 45%) в виде белого твердого вещества. MS (ESI)  $m/z$   $[M+2H]^{2+}$  1155,92;  $[M+2Na]^{2+}$  1177,87.

**Соединение 66:** К перемешиваемому раствору соединения 64 (43 мг; 0,08 ммоль) в смеси безводного  $CH_2Cl_2$  (2 мл) и DMF (2 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 58 (0,42 г; 0,21 ммоль), EDCI (47 мг; 0,25 ммоль) и HOBT (5,4 мг; 0,04 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. После завершения реакции смесь концентрировали под вакуумом. Неочищенную реакционную смесь очищали с помощью препаративной ВЭЖХ с использованием колонки Welch Ultimate XB-C18 (элюенты: A= 0,1% TFA в воде, B= MeCN) с получением продукта 66 (230 мг; 61%) в виде бледно-желтого твердого вещества. MS (ESI)  $m/z$   $[M+3H]^{3+}$  1528,62;  $[M+4H]^{4+}$  1146,87.

**Пример 13. Получение 30kmPEG-Lys(PEG<sub>2</sub>-Mal)-DBCO (соединение 68, Фиг.20)**

**Соединение 67:** К перемешиваемому раствору соединения 19 (5,5 г; 0,18 ммоль) в безводном  $CH_2Cl_2$  (55 мл) при 0°C добавляли DIPEA (473 мг; 3,6 ммоль) с последующим добавлением NHS-PEG<sub>2</sub>-Mal (0,2 г; 0,47 ммоль). Смесь перемешивали при температуре 0°C в течение 1,5 часов, затем раствору давали медленно нагреться от 0°C до комнатной температуры, а затем перемешивали в атмосфере аргона в течение ночи. Растворитель удаляли, а остаток перекристаллизовывали из  $CH_2Cl_2$ /метил-трет-бутилового эфира (13,8 мл/110 мл). Выделенные твердые вещества снова перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (11 мл/165 мл). Остаток сушили под вакуумом с получением продукта 67 (5,0 г; 90%) в виде белого порошка.

**Соединение 68:** К перемешиваемому раствору соединения 67 (3,0 г; 0,1 ммоль) в безводном растворе  $CH_2Cl_2$  (30 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли DBCO-NH<sub>2</sub> (83 мг; 0,3 ммоль), EDCI (115 мг; 0,6 ммоль) и HOBT (122 мг; 0,9 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. Растворитель удаляли, а остаток перекристаллизовывали из  $CH_2Cl_2$ /метил-трет-бутилового эфира (5 мл/40 мл). Выделенные твердые вещества снова перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (4 мл/60 мл). Продукт сушили при 40°C в течение 4 часов в вакууме, чтобы получить 68 г продукта (2,7 г; 89%) в виде белого порошка.

**Пример 14. Получение 30kmPEG-Lys(PEG<sub>2</sub>-Mal)-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (соединение 69, Фиг.21)**

**Соединение 69:** К перемешиваемому раствору соединения 67 (0,9 г; 0,03 ммоль) в смеси DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 мл/50 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 58 (0,16 г; 0,08 ммоль), EDCI (35 мг; 0,18 ммоль) и HOBt (37 мг; 0,27 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. Растворитель удаляли, а остаток перекристаллизовывали из CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/метил-трет-бутилового эфира (2,5 мл/20 мл). Выделенные твердые вещества снова перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (2 мл/30 мл). Продукт сушили при 40°C в течение 4 часов в вакууме до получения продукта массой 69 г (0,7 г; 80%) в виде белого порошка. MS (MALDI-TOF) *m/z* 32065.3 Да.

**Пример 15. Получение 30kmPEG-Lys(PEG<sub>2</sub>-Mal)-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (соединение 70, Фиг.22)**

**Соединение 70:** К перемешиваемому раствору соединения 68 (1,5 г; 0,05 ммоль) в безводном CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл) и MeOH (10 мл) добавляли соединение 62 (0,5 г; 0,15 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. Растворитель удаляли, а остаток дважды перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (3 мл/45 мл). Остаток сушили под вакуумом с получением продукта 70 (1,1 г; 73%) в виде белого порошка.

**Пример 16. Получение 30kmPEG-Lys(PEG<sub>2</sub>-Mal)-4(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (соединение 71, Фиг.23)**

**Соединение 71:** К перемешиваемому раствору соединения 68 (1,2 г; 0,04 ммоль) в безводном CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 мл) и MeOH (8 мл) добавляли соединение 66 (0,37 г; 0,08 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. Растворитель удаляли, а остаток дважды перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (3 мл/45 мл). Остаток сушили под вакуумом с получением продукта 71 (0,91 г; 73%) в виде белого порошка.

**Пример 17. Получение 20kmPEG-Lys(PEG<sub>2</sub>-Mal)-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (соединение 73, Фиг.24)**

**Соединение 73:** К перемешиваемому раствору соединения 72 (2,0 г; 0,1 ммоль) (для получения соединения 72 см. процедуру получения соединения 68) в безводном растворе CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 65. Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. Растворитель удаляли, а остаток дважды перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (4 мл/60 мл). Продукт сушили при

40°C в течение 4 часов в вакууме до получения 73% продукта (1,6 г; 82%) в виде белого порошка.

**Пример 18. Получение Mal-PEG<sub>2</sub>-20kPEG-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (соединение 76, Фиг.25)**

**Соединение 74:** К перемешиваемому раствору амина-PEG20k-CO<sub>2</sub>H (49) (1,0 г; 0,05 ммоль) в безводном CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 мл) при 0°C добавляли DIPEA (83 мкл; 0,5 ммоль) с последующим добавлением NHS-PEG2-Mal (64 мг; 0,15 ммоль). Смесь перемешивали при температуре 0°C в течение 1,5 часов, затем раствору давали медленно нагреться от 0°C до комнатной температуры, а затем перемешивали в атмосфере аргона в течение ночи. Растворитель удаляли, а остаток перекристаллизовывали из CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/метил-трет-бутилового эфира (2,5 мл/20 мл). Выделенные твердые вещества снова перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (2 мл/30 мл). Остаток сушили под вакуумом с получением продукта 74 (0,92 г; 92%) в виде белого порошка.

**Соединение 75:** К перемешиваемому раствору соединения 74 (0,9 г; 0,045 ммоль) в безводном растворе CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли DBCO-NH<sub>2</sub> (37 мг; 0,14 ммоль), EDCI (52 мг; 0,27 ммоль) и HOBT (55 мг; 0,41 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. Растворитель удаляли, а остаток перекристаллизовывали из CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/метил-трет-бутилового эфира (2,5 мл/20 мл). Выделенные твердые вещества снова перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (2 мл/30 мл). Продукт сушили при 40°C в течение 4 часов в вакууме до получения 75% продукта (0,77 г; 86%) в виде белого порошка.

**Соединение 76:** К перемешиваемому раствору соединения 75 (0,7 г; 0,035 ммоль) в безводном CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 мл) и MeOH (8 мл) добавляли соединение 65 (0,17 г; 0,08 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи до тех пор, пока с помощью ВЭЖХ не было обнаружено полное превращение. Растворитель удаляли, а остаток дважды перекристаллизовывали из MeCN/2-пропанола (2 мл/30 мл). Остаток сушили под вакуумом с получением продукта 76 (0,57 г; 81%) в виде белого порошка.

**Пример 19. Получение Val-Cit-PAB-DEA-Dxd (соединение 81, Фиг.26)**

**Соединение 77:** Трет-бутил 2-гидроксиацетат (2,0 г; 15,0 ммоль) добавляли в смесь бис(4-нитрофенил) карбоната (4,6 г; 15,0 ммоль) и триэтиламина (5,2 мл; 37,5 ммоль) в 75 мл DMF при 0°C. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, затем в раствор добавили соединение 6 (1,7 г; 9,0 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре еще 2 часа. Продукт экстрагировали с помощью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 мл × 3), органический слой промывали водой, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали.

Неочищенный продукт был очищен методом колоночной хроматографии с получением соединения 77 (2,4 г; 76%) в виде бесцветного масла. MS (ESI)  $m/z$   $[M+Na]^+$  369,25.

**Соединение 78:** К раствору соединения 77 (2,2 г; 6,3 ммоль) в безводном  $CH_2Cl_2$  (20 мл) добавляли TFA (4,5 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Растворитель удаляли, насколько это было возможно, под вакуумом при температуре  $<35^\circ C$ . Остаток перекристаллизовывали из гексана (45 мл). Выделенный продукт сушили под вакуумом с получением продукта 78 (1,6 г; 89%) в виде белого твердого вещества. MS (ESI)  $m/z$   $[M+H]^+$  191,30.

**Соединение 79:** Соединение 78 (3,3 г; 11,6 ммоль) и соединение 5 (3,6 г; 4,6 ммоль) растворяли в DMF (50 мл). Затем добавляли HOBt (1,2 г; 9,2 ммоль) и пиридин (2,5 мл), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов до завершения реакции. Реакционную смесь охлаждали до  $0^\circ C$  и добавляли к метил-трет-бутиловому эфиру (80 мл). Полученную суспензию перемешивали в течение 1 часа, фильтровали, промывали и сушили под вакуумом. Неочищенный продукт был очищен с помощью колоночной хроматографии с получением соединения 79 (2,9 г; 85%) в виде бледно-желтого порошка. MS (ESI)  $m/z$   $[M+Na]^+$  840,43.

**Соединение 80:** К перемешиваемому раствору экзатекана мезилата (0,92 г; 1,7 ммоль) и триэтиламина (0,5 мл; 3,5 ммоль) в безводном DMF (30 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 79 (1,4 г; 1,7 ммоль) и HATU (0,83 г; 2,2 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. Смесь концентрировали под вакуумом, а остаток очищали на колонке с силикагелем для получения соединения 80 (1,0 г; 78%) в виде белого твердого вещества. MS (ESI)  $m/z$   $[M+H]^+$  1135,53;  $[M+Na]^+$  1157,43.

**Соединение 81:** диэтиламин (6,0 мл) добавляли к раствору соединения 80 (2,5 г) в DMF (30 мл), затем реакции давали протекать при комнатной температуре в течение 50 минут. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом, а полученный остаток настаивали в метил-трет-бутиловом эфире (90 мл) в течение 2 часов. Твердые частицы отделяли фильтрацией, промывали и сушили под вакуумом. Неочищенный продукт очищали на колонке с силикагелем с получением соединения 81 (1,6 г; 73%) в виде белого твердого вещества. MS (ESI)  $m/z$   $[M+H]^+$  1013,63;  $[M+Na]^+$  1035,58.

**Пример 20. Получение 20kmPEG-Lys(PEG<sub>2</sub>-Mal)-2(Val-Cit-PAB-DEA-Dxd) (соединение 83, Фиг.27)**

**Соединение 82:** К перемешиваемому раствору соединения 64 (80 мг; 0,15 ммоль) в  $CH_2Cl_2$ /DMF (5 мл/5 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли Val-Cit-PAB-DEA-Dxd (81) (334 мг; 0,33 ммоль), EDCI (92 мг; 0,48 ммоль) и HOBt (20 мг; 0,15

ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. После завершения реакции смесь концентрировали под вакуумом. Остаток перекристаллизовывали из  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /метил-трет-бутилового эфира с получением соединения 82 (360 мг; 93%) в виде белого твердого вещества. МС (ESI)  $m/z$   $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  1257,83,  $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$  1279,88.

**Соединение 83:** К перемешиваемому раствору соединения 68 (1,8 г; 0,06 ммоль) в безводном  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 мл) и MeOH (8 мл) добавляли соединение 82 (350 мг; 0,14 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи до тех пор, пока полное превращение не было подтверждено методом ВЭЖХ. Растворитель удаляли, а остаток дважды перекристаллизовывали из MeOH/2-пропанола (5 мл/40 мл). Остаток сушили под вакуумом с получением продукта 83 (1,5 г; 81%) в виде белого порошка.

**Пример 21. Получение SCAHer2(1)xSCAHer2(2) (соединение 84).**

**Соединение 84:** Аналогичные процедуры для получения соединения 52 были использованы для получения соединения 84. Аминокислотная последовательность SCAHer2(1) x SCAHer2(2) (SEQ ID № 2) представляет собой:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS  
RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTGGSGGSGGSGG  
SGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNP  
SGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQG  
TLVTVSSGCGSGGSGGSGGSGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWV  
RQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY  
CSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSGGSGGSGGSGGSGGDIQMTQSPSSLSASVGDR  
VITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL  
QPEDFATYYCQHYYTTPPTFGQGTKVEIKRTHHHHHH

**Пример 22. Получение SCAc-Met(1)xSCAc-Met(2) (соединение 85)**

**Соединение 85:** Процедуры, аналогичные процедурам для получения соединения 52, были использованы для получения соединения 85. Аминокислотная последовательность SCAc-Met(1)xSCAc-Met(2) (SEQ ID № 6) представляет собой:

DIMMSQSPSSLTVSVGEKVTVSCKSSQSLLYTSSQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAST  
RESGVPDRFTGSGSGTDFLTITSVKADDLAVYYCQQYYAYPWTFGGGTKLEIKGGSGG  
SGGSGGSGGQVQLQSGPELVKPGASVKMSCRASGYTFTSYWLHWKQRPQGGLWV  
GMIDPSNSDTRFNPVFKDKATLVNDRSSNTAYMLLSSLTSAVYYCATYGSYVSPLD  
YWGQGTSTVTVSSGCGSGGSGGSGGSGGQVQLVESGPGLVKPSQTLSTCAVSGGSITN  
YYYWSWIRQSPGKGLEWMGVIAIDGSTDYSPSLKSRYSISRDTSKNQFSLQLSSVTPEDT  
AVYYCARDVRIATGWATANALDAWGQGLVTVSSGGSGGSGGSGGSGGQSVLTQPP  
SVSGSPGKTVTISCAGTSSDVGYGNYVSWYQQLPGTAPKLLIFAVSYRASGIPDRFSGSK  
SGNTAFLTISGLQSEDEADYYCASYRSSNNAAVFGGGTHLTVLHHHHH

**Пример 23. Получение 30kmPEG(SCAHer2(1)xSCAHer2(2))-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (Соединение 86, Фиг.28)**

Белок SCANer2(1)xSCANer2(2) (84) (20 мг) обрабатывали 2 мМ восстановителем ТСЕР в PBS-буфере (рН = 7,4) при комнатной температуре в течение 30 минут перед регулировкой рН исходным раствором с рН = 4,12 в 500 мМ натрий фосфатном буфере. Перед пэгилированием обработанный белок концентрировали до 5 мг/мл. Пэгилирование SCANer2(1)xSCANer2(2) проводили при комнатной температуре в течение 3 часов с использованием 2-3 эквивалентов соединения 69. Реакцию останавливали 10 мМ L-цистина при комнатной температуре в течение 10 минут. Конечное соединение 86 очищали гидроксипатитом НА (TOSOH) при рН 6,8 в 20 мМ натрий-фосфатном буфере. Целевое соединение 86 было подтверждено с помощью SEC-ВЭЖХ и анализа клеточной активности.

**Пример 24. Получение 30kmPEG(SCAPDL1xSCACD47)-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (Соединение 87, Фиг.29)**

Соединение 87 было получено путем конъюгации соединения 69 [30kmPEG-Lys(PEG2-Mal)-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38)] с белком 52 с использованием тех же процедур, что и для получения соединения 86.

**Пример 25. Получение 30kmPEG(SCANer2(1)xSCANer2(2))-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (Соединение 88, Фиг.30)**

Соединение 88 было получено путем конъюгации соединения 70 [30kmPEG-Lys(PEG2-Mal)-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38)] с белком 84 с использованием тех же процедур, что и для получения соединения 86.

**Пример 26. Получение 30kmPEG(SCAPDL1xSCACD47)-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (Соединение 89, Фиг.31)**

Соединение 89 было получено путем конъюгации соединения 70 [30kmPEG-Lys(PEG2-Mal)-3(Val-Cit-PAB-DEA-SN38)] с белком 52 с использованием тех же процедур, что и для получения соединения 86.

**Пример 27. Получение 30kmPEG(SCAPDL1xSCACD47)-4(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (соединение 90, Фиг.32)**

Соединение 90 было получено путем конъюгации соединения 71 [30kmPEG-Lys(PEG2-Mal)-4(Val-Cit-PAB-DEA-SN38)] с белком 52 с использованием тех же процедур, что и для получения соединения 86.

**Пример 28. Получение 20kmPEG(SCAPDL1xSCACD47)-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (соединение 91, Фиг.33)**

Соединение 91 было получено путем конъюгации соединения 73 [20kmPEG-Lys(PEG2-Mal)-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38)] с белком 52 с использованием тех же процедур, что и для получения соединения 86.

**Пример 29. Получение SCAPDL1xSCACD47-20kPEG-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (соединение 92, Фиг.34).**

Соединение 92 было получено путем конъюгации соединения 76 [(PEG2-Mal)-20kPEG-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38)] с белком 52 с использованием процедур, аналогичных процедурам для получения соединения 86.

**Пример 30. Получение 30kmPEG(SCAPDL1xSCACD47)-2(Val-Cit-PAB-DEA-Dxd) (соединение 93, Фиг.35)**

Соединение 93 было получено путем конъюгации соединения 83 [30kmPEG-Lys(PEG2-Mal)-2(Val-Cit-PAB-DEA-Dxd)] с белком 52 с использованием тех же процедур, что и для получения соединения 86.

**Пример 31. Получение 30kmPEG(SCAc-Met(1)xSCAc-Met(1))-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38) (соединение 94, Фиг.36)**

Соединение 94 было получено путем конъюгации соединения 69 [30kmPEG-Lys(PEG2-Mal)-2(Val-Cit-PAB-DEA-SN38)] с белком 85 с использованием тех же процедур, что и для получения соединения 86.

**Пример 32. Цитотоксичность соединения 86 и соединения 88 *in vitro* по отношению к линии опухолевых клеток (Фиг.37)**

Для подтверждения цитотоксической активности была выбрана опухолевая клеточная линия ВхРС-3, позитивная по экспрессии HER2, для анализа жизнеспособности *in vitro*. Клетки высевали в 96-луночный планшет из расчета  $3 \times 10^5$  клеток на лунку и обрабатывали указанными дозами соединения 86 и соединения 88. Жизнеспособность клеток определяли с помощью набора для подсчета клеток-8 (ССК-8) в соответствии с инструкциями производителя. Ингибирование пролиферации клеток рассчитывали по следующему уравнению: % цитотоксичности =  $(1 - \text{ОП образца} / \text{ОП контроля}) \times 100\%$ . Данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и представляли в виде процента подавления роста по сравнению с необработанным контролем. Результаты показаны на Фигуре 37.

**Пример 33. Цитотоксичность соединений 87, 89, 90, 91 и 92 *in vitro* по отношению к линиям опухолевых клеток (Фиг.38)**

Для подтверждения цитотоксической активности был отобран набор линий опухолевых клеток, положительных по экспрессии CD47/PD-L1, ВхРС-3, NS1H661, NS1H520 и HS746, для анализа жизнеспособности *in vitro*. Клетки высевали в 96-луночный планшет из расчета  $3 \times 10^5$  клеток на лунку и обрабатывали указанными дозами соединений 87, 89, 90, 91 и 92. Жизнеспособность клеток определяли с помощью набора для подсчета клеток-8 (ССК-8) в соответствии с инструкциями производителя.

Ингибирование пролиферации клеток рассчитывали по следующему уравнению: % цитотоксичности =  $(1 - \text{ОП образца} / \text{ОП контроля}) \times 100\%$ . Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и представлены в виде процента ингибирования роста по сравнению с необработанным контролем. Результаты представлены на Фигуре 38.

**Пример 34. Цитотоксичность соединения 93 *in vitro* по отношению к линии опухолевых клеток (Фиг.39).**

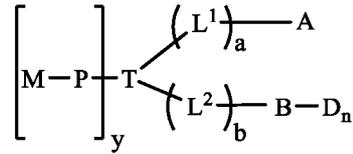
Для проверки цитотоксической активности набор позитивных по экспрессии CD47/PD-L1 опухолевых клеток линий ВхРС-3, NCIH661, HS746T, U87.MG, T74D и Calu6 был отобран для анализа жизнеспособности *in vitro*. Клетки высевали в 96-луночный планшет из расчета  $3 \times 10^5$  клеток на лунку и обрабатывали указанными дозами соединения 93. Жизнеспособность клеток определяли с помощью набора для подсчета клеток-8 (ССК-8) в соответствии с инструкциями производителя. Ингибирование пролиферации клеток рассчитывали по следующему уравнению: % цитотоксичности =  $(1 - \text{ОП образца} / \text{ОП контроля}) \times 100\%$ . Данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и представляли в виде процента ингибирования роста по сравнению с необработанным контролем. Результаты представлены на Фиг.39.

**Пример 35. Цитотоксичность соединения 94 *in vitro* по отношению к линиям опухолевых клеток (Фиг.40).**

Для подтверждения цитотоксической активности была выбрана линия опухолевых клеток ВхРС-3, позитивных по экспрессии с-MET, для анализа жизнеспособности *in vitro*. Клетки высевали в 96-луночный планшет из расчета  $3 \times 10^5$  клеток на лунку и обрабатывали указанными дозами соединения 94. Жизнеспособность клеток определяли с помощью набора для подсчета клеток-8 (ССК-8) в соответствии с инструкциями производителя. Ингибирование пролиферации клеток рассчитывали по следующему уравнению: % цитотоксичности =  $(1 - \text{ОП образца} / \text{ОП контроля}) \times 100\%$ . Данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и представляли в виде процента ингибирования роста по сравнению с необработанным контролем. Результаты представлены на Фиг.40.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

#### 1. Соединение формулы (Ib)



где:

P представляет собой неиммуногенный полимер;

M представляет собой H или концевую кэп-группу, выбранную из C<sub>1-50</sub> алкила и арила, в которой один или несколько атомов углерода указанного алкила при необходимости замещены гетероатомом;

y представляет собой целое число, выбранное в диапазоне от 1 до 10;

A представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

T представляет собой многофункциональный низкомолекулярный линкерный компонент;

каждый из L<sup>1</sup> и L<sup>2</sup> независимо представляет собой гетеро- или гомобифункциональный линкер;

каждый из a и b представляет собой целое число, выбранное из 0-10;

V представляет собой разветвленный линкер, в котором каждая ветвь имеет аминокислотную последовательность, или углеводный компонент, или дисульфидную связь, связанную с одним или несколькими саморазрушающимися спейсерами, где расщепление аминокислотной последовательности, или углеводного компонента, или дисульфидной связи ферментом запускает механизм саморазрушения с высвобождением гидроксил-несущего лекарственного средства D, или каждая ветвь имеет расщепляемую связь, где расщепление расщепляемой связи высвобождает гидроксил-несущее лекарственное средство D;

каждый из D независимо представляет собой цитотоксическую гидроксил-несущую малую молекулу или пептид, где гидроксильная группа D связана с V; и

n представляет собой целое число, выбранное в диапазоне от 1 до 25.

2. Соединение по п.1, где T представляет собой трифункциональный линкер, полученный из молекулы с тремя функциональными группами, независимо выбранными из гидроксила, амина, гидразинила, азида, алкена, алкина, карбоксила (альдегида, кетона, сложного эфира, карбоновой кислоты, ангидрида, ацилгалогенида), тиола, дисульфида, нитрила, эпоксида, имида, нитро и галогенида, причем связь между T и (L<sup>1</sup>)<sub>a</sub> и связь между T и (L<sup>2</sup>)<sub>b</sub> являются одинаковыми или различными.

3. Соединение по п.2, где T представляет собой 1,3-диамино-2-пропанол, триэтанолламин, лизин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, серин или тирозин.

4. Соединение по любому из пп.1-3, в котором одна из функциональных групп на линкерном конце (L<sup>1</sup>)<sub>a</sub> способна к сайт-специфической конъюгации с A и выбрана из группы, состоящей из тиола, малеимида, 2-пиридилдитио варианта, ароматического сульфона или винилсульфона, акрилата, бром- или иодацетамида, азида, алкина, дибензоциклооктила (DBCO), карбонила, 2-амино-бензальдегидной или 2-аминоацетофеноновой группы, гидразида, оксима, ацилтрифторбората калия, O-карбамоилгидроксиламина, транс-циклооктена, тетрамина, триарилфосфина, бороновой кислоты и йода.

5. Соединение по любому из пп.1-4, где антитело является моноспецифическим или мультиспецифическим полноразмерным антителом, моноспецифическим или мультиспецифическим одноцепочечным антителом, моноспецифическим или мультиспецифическим нанотелом (однодоменным антителом), или его моноспецифическим или мультиспецифическим антигенсвязывающим доменом.

6. Соединение по любому из пп.1-5, где антитело представляет собой моноспецифическое одноцепочечное антитело.

7. Соединение по п.6, где моноспецифическое одноцепочечное антитело связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA), таким как Her2, cMet, PDL1 или CD47.

8. Соединение по п.7, где моноспецифическое одноцепочечное антитело имеет два связывающих домена, связывающихся с Her2.

9. Соединение по п.8, где моноспецифическое одноцепочечное антитело имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID № 3.

10. Соединение по любому из пп.1-5, где антитело представляет собой биспецифическое антитело, например, биспецифическое одноцепочечное антитело.

11. Соединение по п.10, где два связывающих домена биспецифического антитела связываются с одним и тем же опухоль-ассоциированным антигеном (TAA), связываются с двумя различными TAA, или связываются с TAA и антигеном, экспрессируемым на T-клетках (например, компонентом T-клеточного рецептора) или NK-клетках.

12. Соединение по п.11, где антитело представляет собой анти-PDL1 × анти-CD47 одноцепочечное биспецифическое антитело.

13. Соединение по п.12, где антитело имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID № 1.

14. Соединение по п.11, где антитело представляет собой анти-HER2(1) × анти-HER(2) одноцепочечное биспецифическое антитело.

15. Соединение по п.14, где антитело имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID № 2.

16. Соединение по п.11, где антитело представляет собой анти-cMet(1) × анти-cMet(2) одноцепочечное биспецифическое антитело.

17. Соединение по п.16, где антитело имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID № 6.

18. Соединение по любому из пп.6-9, где два связывающих домена моноспецифического одноцепочечного антитела связаны посредством пептидного линкера, и где линкер содержит цистеин или неприродный аминокислотный остаток для сайт-специфической конъюгации антитела с  $(L^1)_a$ .

19. Соединение по любому из пп.10-17, где два связывающих домена биспецифического одноцепочечного антитела связаны посредством пептидного линкера, и где линкер содержит цистеин или неприродный аминокислотный остаток для сайт-специфической конъюгации антитела с  $(L^1)_a$ .

20. Соединение по п.18 или п.19, где неприродный аминокислотный остаток выбран из группы, состоящей из генетически кодируемых алкенилизинов (таких как N6-(гекс-5-еноил)-L-лизин), 2-амино-8-оксононановой кислоты, m- или p-ацетилфенилаланина, аминокислоты, несущей боковую цепь β-дикетона (такой как 2-амино-3-(4-(3-оксобутаноил)фенил)пропановая кислота), (S)-2-амино-6-(((1R,2R)-2-азидоциклопентилокси)карбониламино)гексановой кислоты, азидогемоаланина, пирролизинового аналога N6-((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)-L-лизина, (S)-2-амино-6-пент-4-инамидогексановой кислоты, (S)-2-амино-6-((проп-2-инилокси)карбониламино)гексановой кислоты, (S)-2-амино-6-((2-азидоэтокси)карбониламино)гексановой кислоты, p-азидофенилаланина, пара-азидофенилаланина, Nε-акрилоил-1-лизина, Nε-5-норборнен-2-илоксикарбонил-1-лизина, N-ε-(циклоокт-2-ин-1-илокси)карбонил)-L-лизина, N-ε-(2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)этил)карбонил-L-лизина и генетически кодируемой тетразиновой аминокислоты (такой, как 4-(6-метил-s-тетразин-3-ил)аминофенилаланин).

21. Соединение по любому из пп.1-20, где гидроксил-несущее лекарственное средство D выбрано ДНК-сшивающего агента, ингибитора микротрубочек, алкилятора ДНК, ингибитора топоизомеразы, деструктора белка, агониста STING или их комбинации.

22. Соединение по п.21, где гидроксил-несущее лекарственное средство D выбрано из алкалоида барвинка, лаулималида, колхицина, тубулизинов, криптофицинов,

гемиастерлина, цемадотина, ризоксина, дискодермолида, таккалонолида А или В, или АF или АJ, таккалонолида АI-эпоксида, СА-4, эпотилона А и В, таксана, паклитаксела, доцетаксела, эпотилона, iSGD-1882, центанамицина, PNU-159682, унциаламицина, димеров индолинобензодиазепина,  $\beta$ -аманитина, аматоксинов, тайланстатинов, калихеамицина, антрациклина, дауномицина, ларотаксела, тесетаксела, ортатаксела, СС-1065, Dxd, SN38, топотекана, СРТ-11, камптотецина, рубитекана, бриостатина, каллистатина, бизелезина, дуокармицина, элеутеробина, панкреатистатина, саркодиктина, спонгистатина, эстрамустина, преднимустина, хлорозотоцина, ранимустина, калихеамицина, динемидина, эсперамицина, хромофора неокарциностатина, аклациномизинов, азитромицина, блеомицинов, каминомицина, карцинофилина, хромомицинов, даунорубицина, деторубицина, доксорубицина, эпирубицина, эзорубицина, идарубицина, марцелломицина, микофеноловой кислоты, ногаламицина, пепломицина, пурамицина, квеламицина, родорубицина, стрептонирина, стрептозоцина, туберцидина, убенимекса, зиностатина, флударабина, анцитабина, азацитидина, 6-азауридина, кармофура, цитарабина (цитозина арабинозида, ага-С), гемцитабина, капецитабина, дидезоксиуридина, доксифлуридина, эноцитабина, флоксуридина, калустерона, эпитиостанола, трилостана, эллиптиния ацетата, майтанзиноидов, ансамитоцинов, митоксантрона, мопидамола, пентостатина, пирарубицина, этопозида, подофиллотоксина, ризоксина, тенуазоновой кислоты, микотоксина Т-2, верракурина А, роридина А, ангвидина, виндезина, манномустина, митобронитола, митолактола, винбластина, митоксантрона, винкристина, винорелбина, тенипозида, кселода, ралоксифена, 4-гидрокситамоксифена, эстрадиола, триоксифена, кеоксифена, LY117018, онапристона, бикалутамида, лейпролида, гозерелина, или их фармацевтически приемлемых солей, кислот или их производных, или их комбинации.

23. Соединение по п.21, где D выбран из дуокармицина, Dxd, SN38, топотекана, СРТ-11, камптотецина, рубитекана или их производного, или их комбинации.

24. Соединение по любому из пп.1-23, где неиммуногенным полимером является полиэтиленгликоль (ПЭГ).

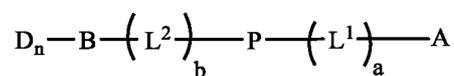
25. Соединение по п.24, где ПЭГ представляет собой линейный ПЭГ или разветвленный ПЭГ.

26. Соединение по п.24 или п.25, где по меньшей мере один конец ПЭГ кэпирован метилом или низкомолекулярным алкилом.

27. Соединение по любому из пп.24-26, где общая молекулярная масса ПЭГ составляет от 3000 до 100000.

28. Соединение по любому из пп.24-27, где ПЭГ связан с трифункциональным или тетрафункциональным или любым другим циклическим или нециклическим многофункциональным компонентом Т (например, лизином) посредством постоянной связи или расщепляемой связи.

29. Соединение Формулы (Ic)



где

P представляет собой линейный ПЭГ;

A представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

каждый из  $L^1$  и  $L^2$  независимо является бифункциональным линкером;

каждый из a и b является целым числом, выбранным из диапазона 0-10;

B представляет собой разветвленный линкер, в котором каждая ветвь имеет аминокислотную последовательность, или углеводный компонент, или дисульфидную связь, связанную с одним или несколькими саморазрушающимися спейсерами, где расщепление аминокислотной последовательности, или углеводного компонента, или дисульфидной связи ферментом запускает механизм саморазрушения для высвобождения гидроксил-несущего лекарственного средства D, или каждая ветвь имеет расщепляемую связь, при этом расщепление расщепляемой связи высвобождает гидроксил-несущее лекарственное средство D или его производное;

каждый из D независимо представляет собой цитотоксическую гидроксил-несущую малую молекулу или пептид, где гидроксильная группа D связана с B;

n представляет собой целое число, выбранное в диапазоне от 1 до 25.

30. Соединение по п.29, где функциональная группа на линкерном конце  $(L^1)_a$  способна к сайт-специфической конъюгации с A и выбрана из группы, состоящей из тиола, малеимида, 2-пиридилдитио варианта, ароматического сульфона или винилсульфона, акрилата, бромо- или йодоацетамида, азида, алкина, дибензоциклооктила (DBCO), карбонила, 2-аминобензальдегидной или 2-аминоацетофеноновой группы, гидразида, оксима, ацилтрифторбората калия, O-карбамоилгидроксиламина, транс-циклооктена, тетразина, триарилфосфина, бороновой кислоты и йода.

31. Соединение по п.29 или п.30, где антитело является моноспецифическим или мультиспецифическим полноразмерным антителом, моноспецифическим или мультиспецифическим одноцепочечным антителом, моноспецифическим или мультиспецифическим нанотелом (однодоменным антителом), или его моноспецифическим или мультиспецифическим антигенсвязывающим доменом.

32. Соединение по п.31, где антитело представляет собой моноспецифическое одноцепочечное антитело, при необходимости, где моноспецифическое одноцепочечное антитело связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (ТАА), таким как Her2, cMet, PDL1 или CD47.

33. Соединение по п.32, где моноспецифическое одноцепочечное антитело имеет два связывающих домена, связывающихся с Her2.

34. Соединение по п.33, в котором моноспецифическое одноцепочечное антитело имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID № 3.

35. Соединение по п.31, где антитело представляет собой биспецифическое антитело, например, биспецифическое одноцепочечное антитело.

36. Соединение по п.35, где два связывающих домена биспецифического антитела связываются с одним и тем же опухоль-ассоциированным антигеном (ТАА), связываются с двумя различными ТАА или связываются с ТАА и антигеном, экспрессируемым на Т-клетках (например, компонентом Т-клеточного рецептора) или NK-клетках.

37. Соединение по п.36, где антитело представляет собой анти-PDL1 × анти-CD47 одноцепочечное биспецифическое антитело.

38. Соединение по п.37, где антитело имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID № 1.

39. Соединение по п.36, где антитело представляет собой анти-HER2(1) × анти-HER2(2) одноцепочечное биспецифическое антитело.

40. Соединение по п.39, где антитело имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID № 2.

41. Соединение по п.36, где антитело представляет собой анти-cMet(1) × анти-cMet(2) одноцепочечное биспецифическое антитело.

42. Соединение по п.41, где антитело имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID № 6.

43. Соединение по любому из пп.33-34, где два связывающих домена моноспецифического одноцепочечного антитела связаны посредством пептидного линкера, и где линкер содержит цистеин или неприродный аминокислотный остаток для сайт-специфической конъюгации антитела с  $(L^1)_a$ .

44. Соединение по любому из пп.37-42, где два связывающих домена биспецифического одноцепочечного антитела связаны посредством пептидного линкера, и где линкер содержит цистеин или неприродный аминокислотный остаток для сайт-специфической конъюгации антитела с  $(L^1)_a$ .

45. Соединение по п.43 или п.44, где неприродный аминокислотный остаток выбран из группы, состоящей из генетически кодируемых алкенлизинов (таких, как N6-(гекс-5-еноил)-L-лизин), 2-амино-8-оксононановой кислоты, m- или p-ацетилфенилаланина, аминокислоты, несущая боковую цепь β-дикетона (такой, как 2-амино-3-(4-(3-оксобутаноил)фенил)пропановая кислота), (S)-2-амино-6-(((1R,2R)-2-азидоциклопентилокси)карбониламино)гексановой кислоты, азидогомоаланина, пирролизинowego аналога N6-((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)-L-лизина, (S)-2-амино-6-пент-4-инамидогексановой кислоты, (S)-2-амино-6-((проп-2-инилокси)карбониламино)гексановой кислоты, (S)-2-амино-6-((2-азидоэтокси)карбониламино)гексановой кислоты, p-азидофенилаланина, пара-азидофенилаланина, Nε-акрилоил-1-лизина, Nε-5-норборнен-2-илоксикарбонил-1-лизина, N-ε-(циклоокт-2-ин-1-илокси)карбонил)-L-лизина, N-ε-(2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)этил)карбонил-L-лизина, и генетически кодируемой тетразиновой аминокислоты (такой как 4-(6-метил-s-тетразин-3-ил)аминофенилаланин).

46. Соединение по любому из пп.33-45, где гидроксил-несущее лекарственное средство D выбрано из ДНК-сшивающего агента, ингибитора микротрубочек, алкилатора ДНК, ингибитора топоизомеразы, деструктора белка, агониста STING или их комбинации.

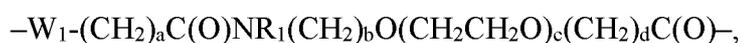
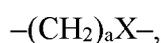
47. Соединение по п.46, где D выбран из алкалоида барвинка, лаулималида, колхицина, тубулизинов, криптофицинов, гемиастерлина, цемадотина, ризоксина, дискодермолида, таккалонолида А или В, или АF или АJ, таккалонолида А-эпоксида, СА-4, эпотилона А и В, таксана, паклитаксела, доцетаксела, эпотилона, iSGD-1882, центанамицина, PNU-159682, унциаламицина, димеров индолинобензодиазепина, β-аманитина, аматоксинов, тайланстатинов, калихеамицина, антрациклина, дауномицина, ларотаксела, тесетаксела, ортатаксела, СС-1065, Dxd, SN38, топотекана, СРТ-11, камптотецина, рубитекана, бриостатина, каллистатина, бизелезина, дуокармицина, элеутеробина, панкратистатина, саркодиктина, спонгистатина, эстрамустина, преднимустина, хлорозотоцина, ранимустина, калихеамицина, динемиицина, эсперамицина, хромофора неокарцинонстатина, аклациномизинов, азитромицина, блеомицинов, каминомицина, карцинофилина, хромомицинов, даунорубицина, деторубицина, доксорубицина, эпирубицина, эзорубицина, идарубицина, марцелломицина, микофеноловой кислоты, ногаламицина, пепломицина, пурамицина, квеламицина, родорубицина, стрептонирина, стрептозоцина, туберцидина, убенимекса, зиностатина, флударабина, анцитабина, азацитидина, б-азауридина, кармофура, цитарабина (цитозина арабинозида, ara-C), гемцитабина, капецитабина, дидезоксиуридина, доксифлуридина, эноцитабина, флоксуридина, калустерона,

эпитиостанола, трилостана, эллиптиния ацетата, майтанзиноидов, ансамитоцинов, митоксантрона, мопидамола, пентостатина, пирарубицина, этопозида, подофиллотоксина, ризоксина, тенуазоновой кислоты, микотоксина Т-2, верракурина А, роридина А, ангвидина, виндезина, манномустина, митобронитола, митолактола, винбластина, митоксантрона, винкристина, винорелбина, тенипозида, кселода, ралоксифена, 4-гидрокситамоксифена, эстрадиола, триоксифена, кеоксифена, LY117018, онапристона, бикалутамида, лейпролида, гозерелина или их фармацевтически приемлемых солей, кислот или их производных, или их комбинации.

48. Соединение по п.46, где D выбран из дуокармицина, Dxd, SN38, топотекана, СРТ-11, камптотецина, рубитекана или их производного, или их комбинации.

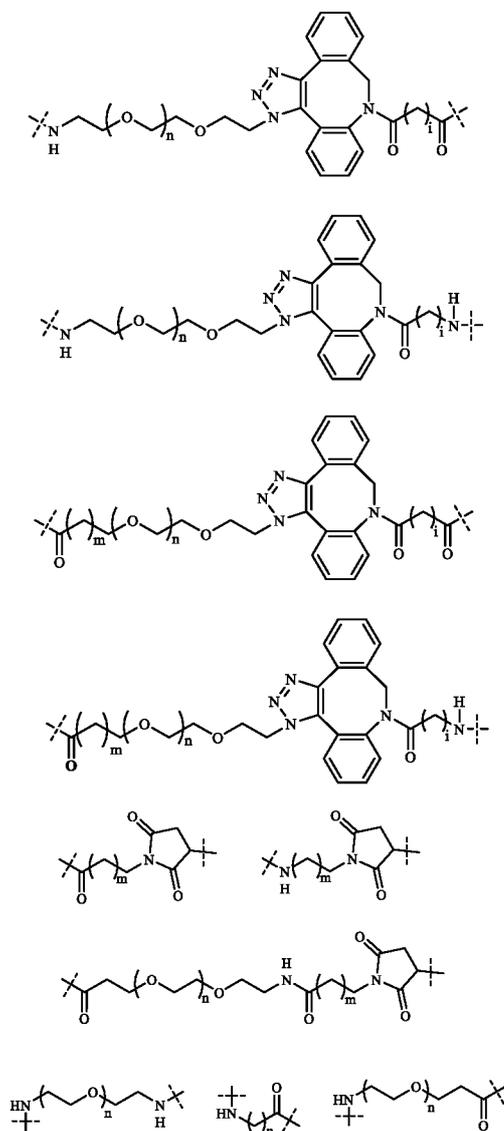
49. Соединение по любому из пп.33-48, где общая молекулярная масса ПЭГ составляет от 3000 до 100000 Дальтон.

50. Соединение по любому из пп.1-49, где каждый из  $L^1$  и  $L^2$  независимо выбран из группы, состоящей из:



где каждый из a, b, c, d и e независимо является целым числом, выбранным от 0 до 25; каждый из X и Y независимо выбран из C(=O),  $NR_2$ , S, O, N3,  $CR_3R_4$ , компонента на основе DBCO, или отсутствует; каждый из  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляет собой водород,  $C_{1-10}$  алкил или  $(CH_2)_{1-10}C(=O)$ ;  $W_1$  и/или  $W_3$  получен из компонента на основе малеимида, а  $W_2$  представляет собой триазилил- или тетразолил-содержащую группу; а гетероциклильная группа выбрана из компонента, полученного из малеимида или из компонента на основе тетразолила или на основе триазолила.

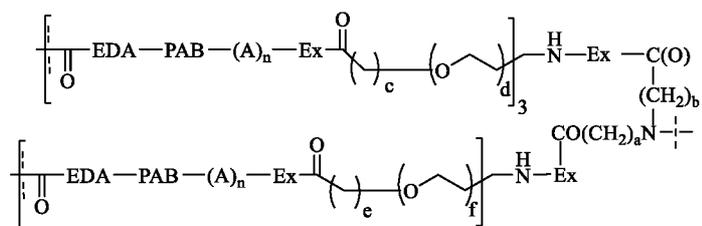
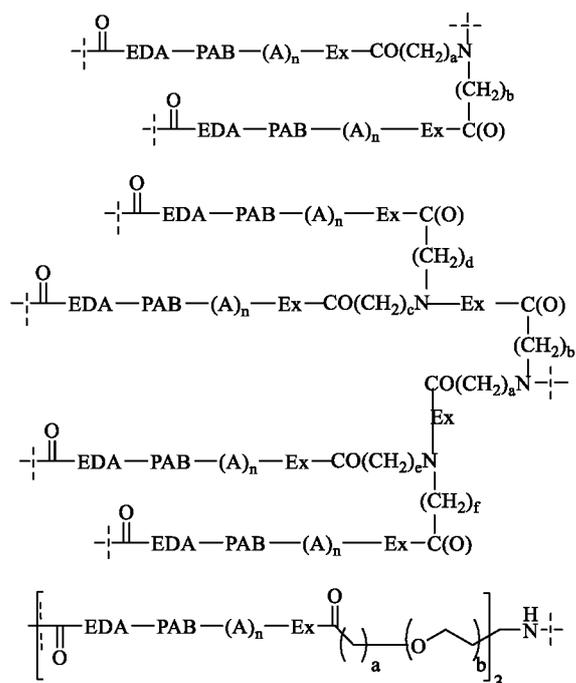
51. Соединение по любому из пп.1-49, где каждый из  $(L^1)_a$  и  $(L^2)_b$  независимо выбран из:



где каждый из  $i$ ,  $m$  и  $n$  независимо представляет собой целое число, выбранное из 0-20.

52. Соединение по любому из пп.1-51, где разветвленный линкер В содержит удлиняющий спейсер (необязательно), триггерный элемент, один или несколько саморазрушающихся спейсеров или любую их комбинацию, где триггерным элементом является аминокислотная последовательность или  $\beta$ -глюкуронидный или  $\beta$ -галактозидный триггерный компонент, расщепляемый такими ферментами, как катепсин В, плазмин, матриксные металлопротеиназы (ММП),  $\beta$ -глюкуронидазы,  $\beta$ -галактозидазы; рН-зависимый линкер, который может высвобождать гидроксил-несущее лекарство D или его производные в кислых условиях рН, или линкер с дисульфидной связью, который может инициировать высвобождение гидроксил-несущего лекарства D или его производных глутатионом, членами семейства тиоредоксинов (WCGH/РСК) или тиоредуктазой.

53. Соединение по п.52, в котором разветвленный линкер В выбран из:



где:

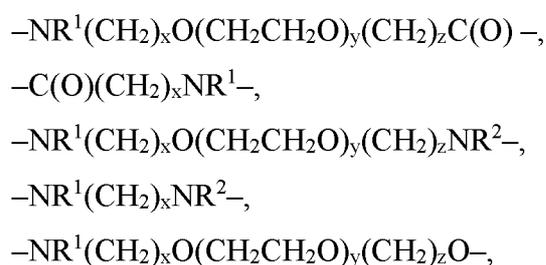
каждый из a, b, c, d, e и f независимо является целым числом, выбранным из 1-25;

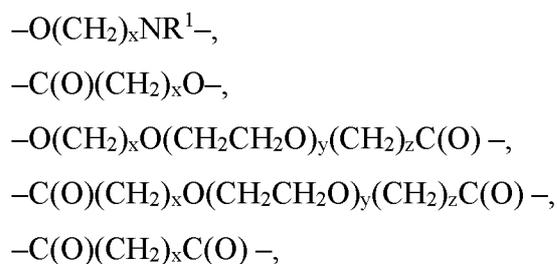
(A)<sub>n</sub> является триггерным элементом из аминокислотной последовательности, такой как Val-Cit, Val-Ala, Val-Lys, Phe-Lys, Phe-Cit, Phe-Arg, Phe-Ala, Ala-Lys, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, D-Phe-Phe-Lys, Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Gly-Phe-Gly или Ala-Leu-Ala-Leu;

PAB представляет собой пара-аминобензиловый спирт;

EDA представляет собой  $-\text{NR}^1(\text{CH}_2)_m\text{NR}^2-$ , где m равно 2 или 3, каждый из R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо выбран из H, низкомолекулярного алкила или  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_l-\text{CH}_3$ , где l представляет собой целое число, выбранное из 1-10;

каждый из Ex представляет собой удлиняющий линкер, содержащий линкерную цепь, которая независимо выбрана из:

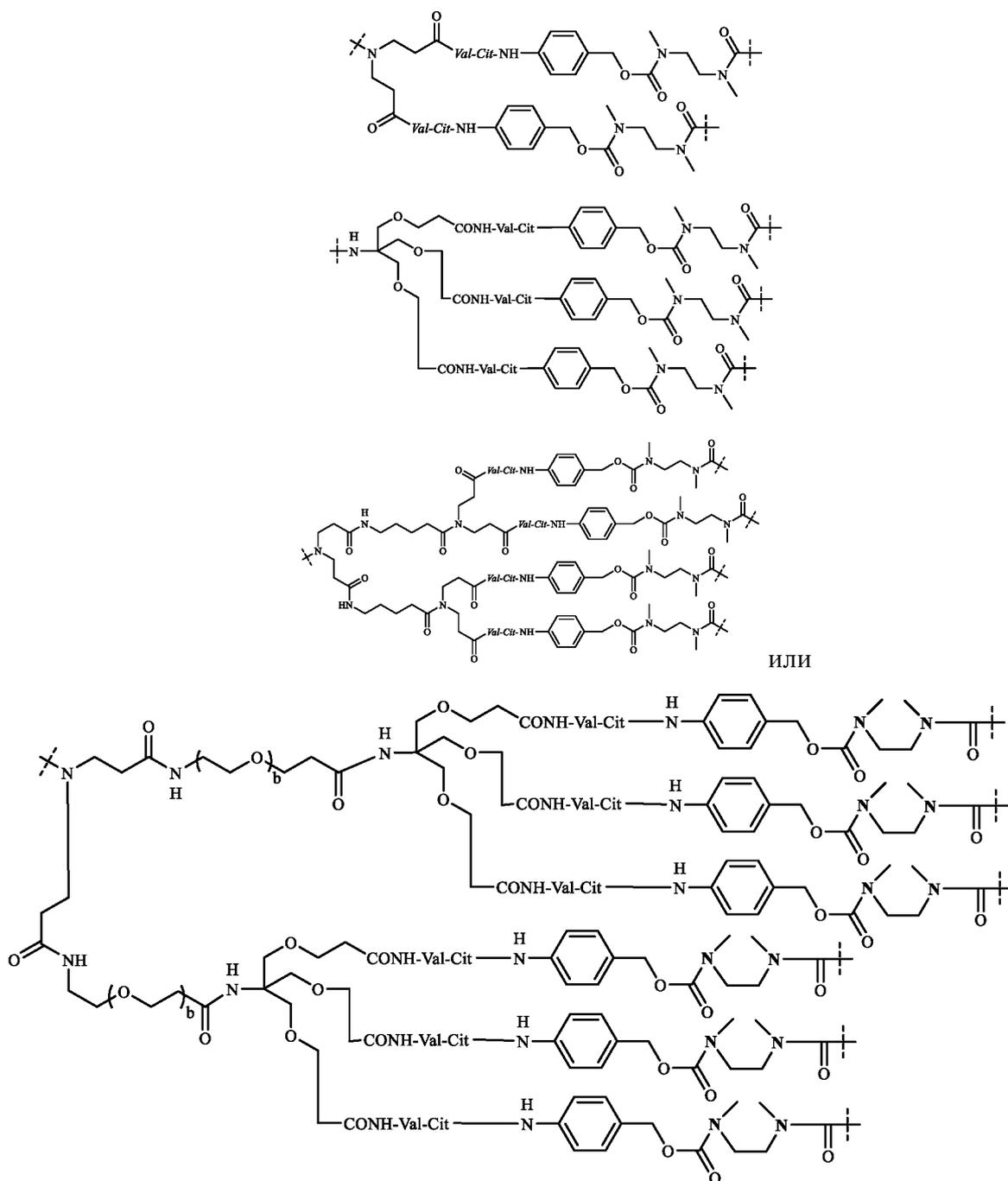




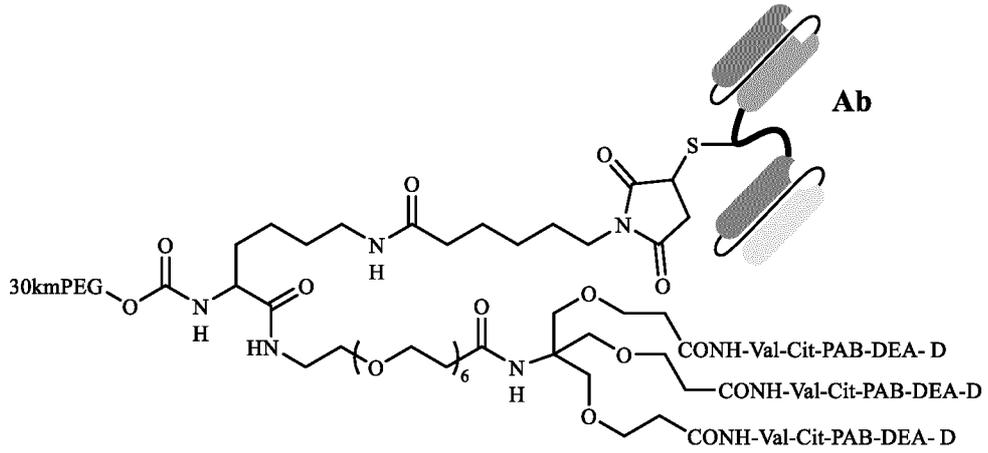
или отсутствует,

где каждый из  $x$ ,  $y$  и  $z$  независимо друг от друга является целым числом, выбранным от 0 до 25; и каждый из  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляет собой водород или  $C_{1-10}$  алкильную группу.

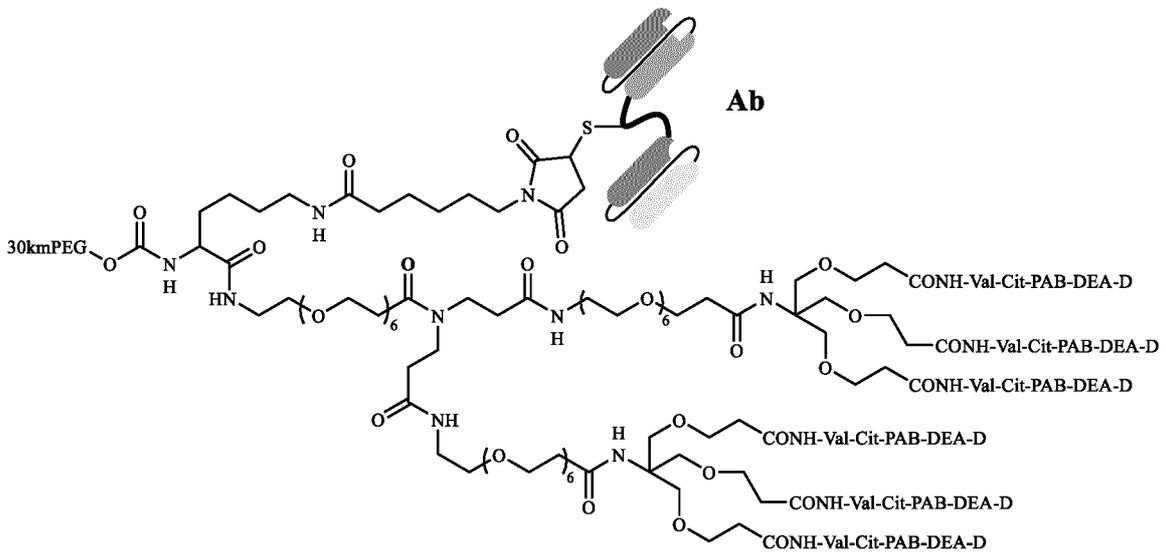
54. Соединение по любому из пп.1-51, где разветвленный линкер В выбран из:



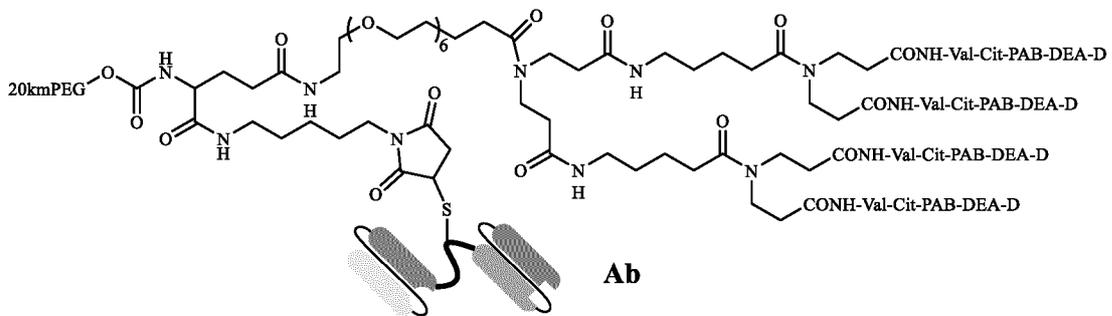
55. Соединение по п.1, выбранное из формулы:



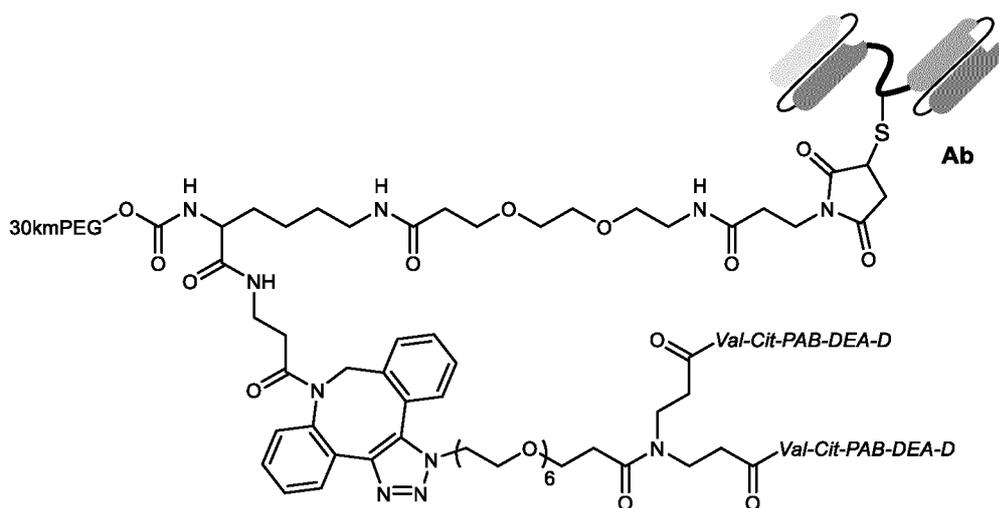
ИЛИ



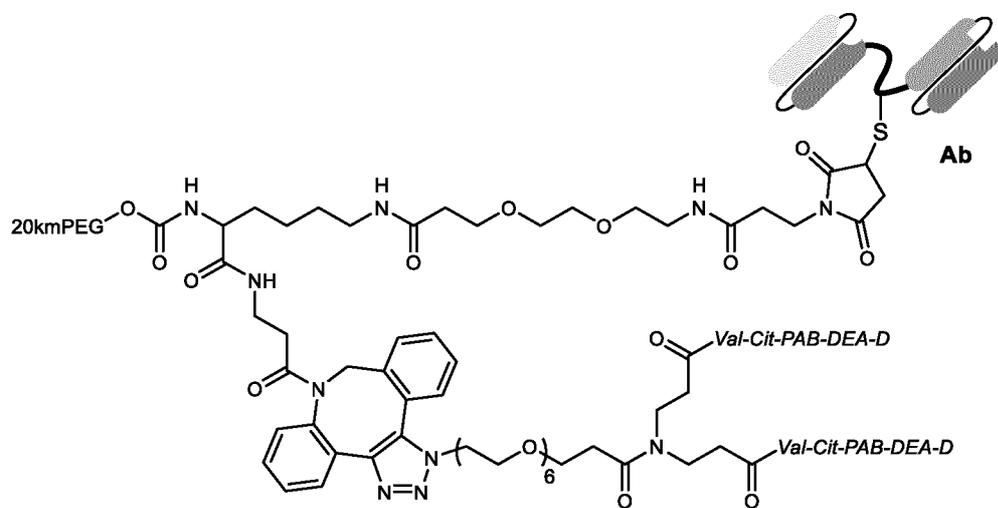
ИЛИ



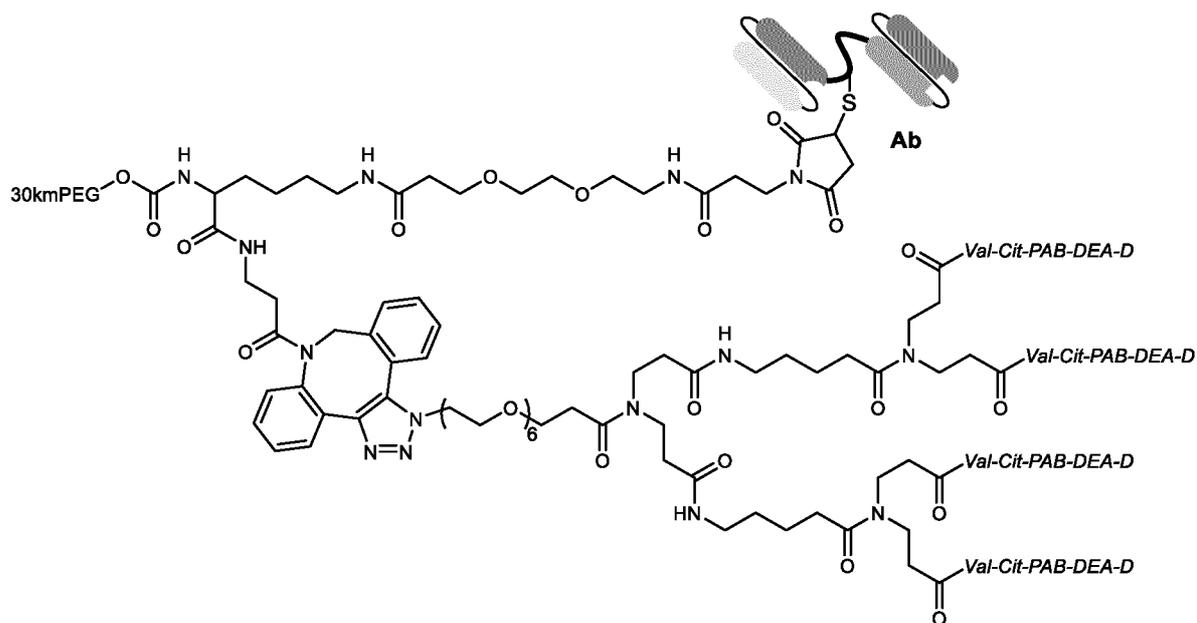
ИЛИ



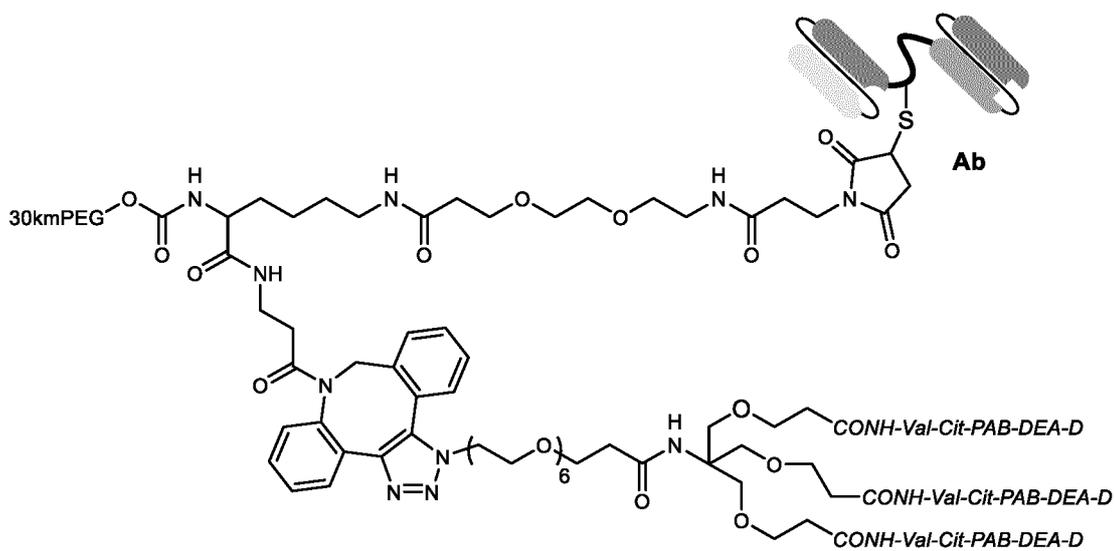
ИЛИ



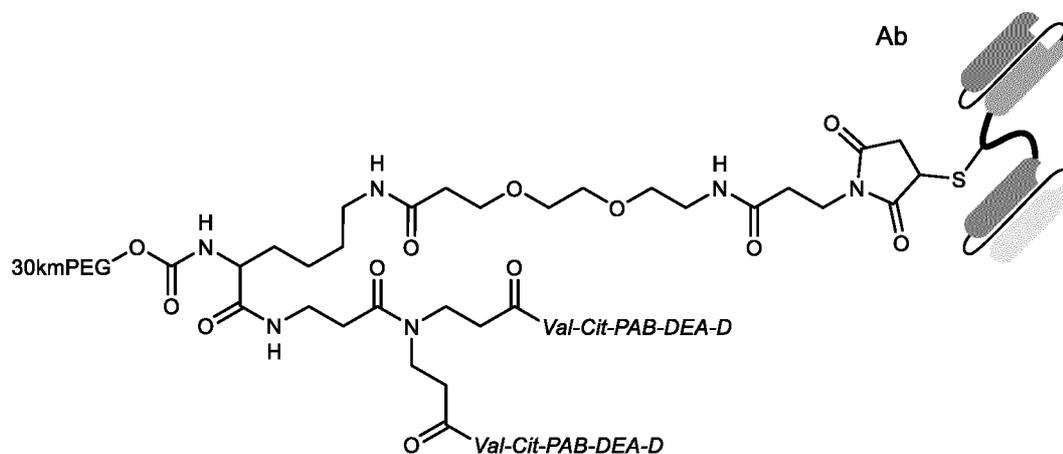
ИЛИ



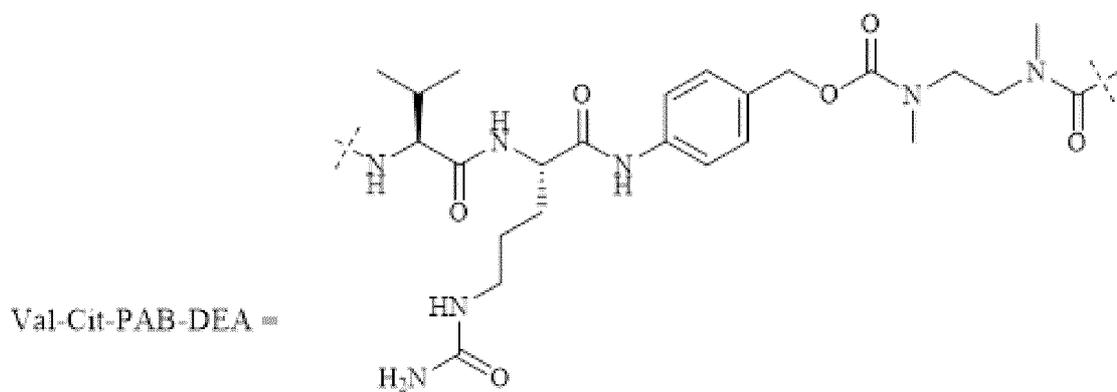
ИЛИ

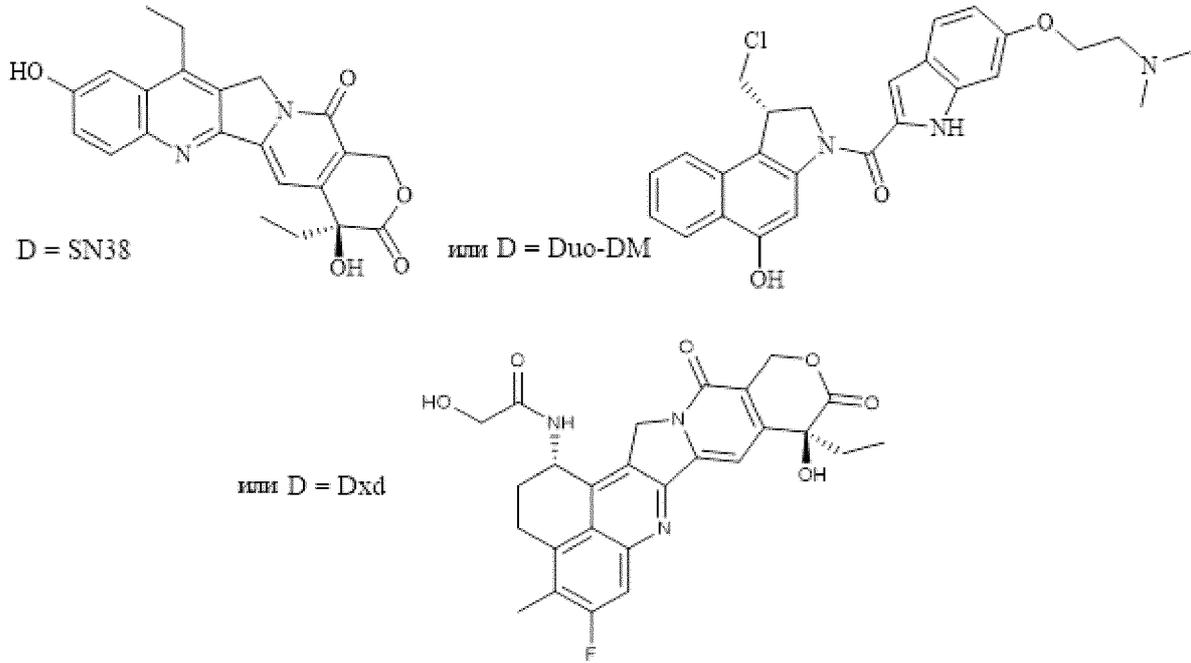


ИЛИ



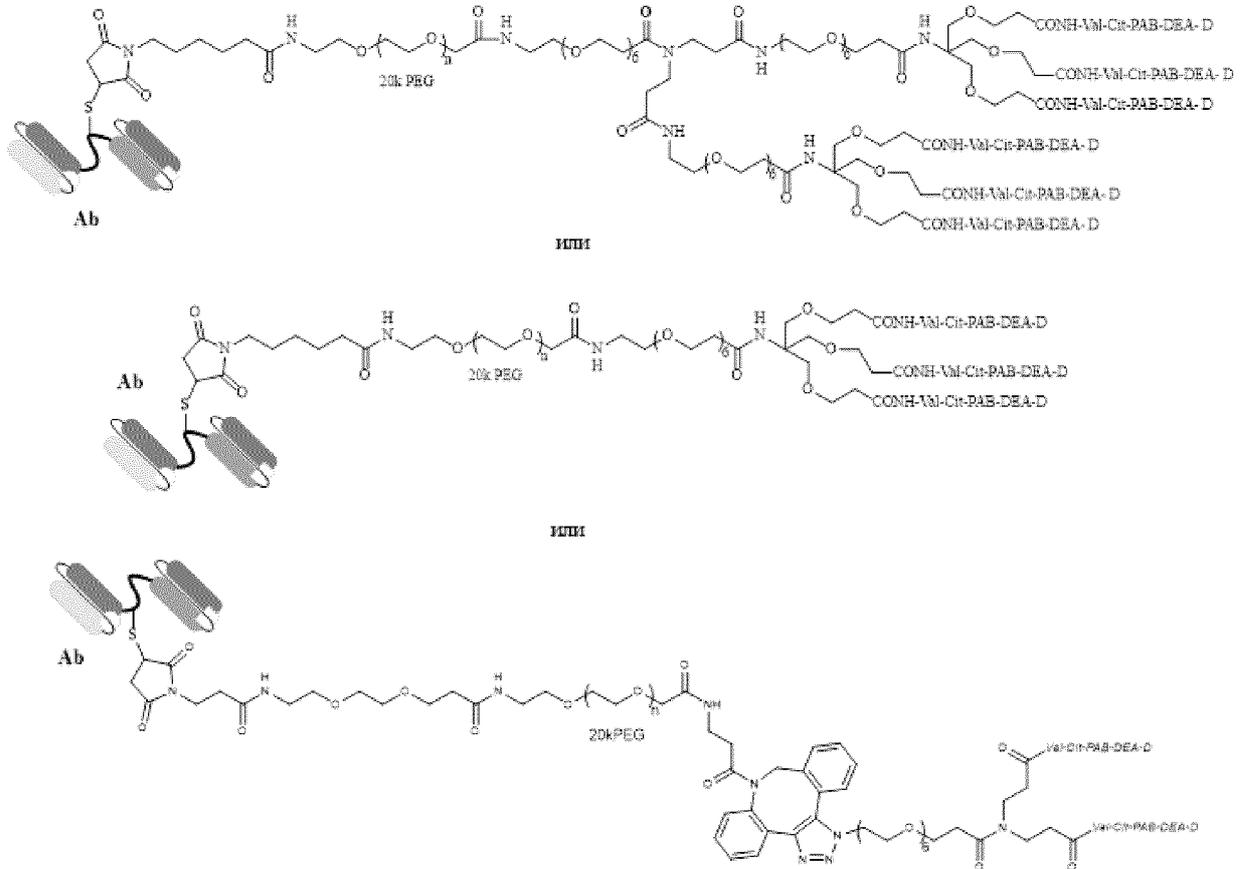
или его фармацевтически приемлемая соль;  
 где Ab представляет собой биспецифическое антитело, нацеленное на PDL1/CD47,  
 или HER2(1)/HER2(2), или cMet(1)/cMet(2), или его антигенсвязывающий фрагмент,





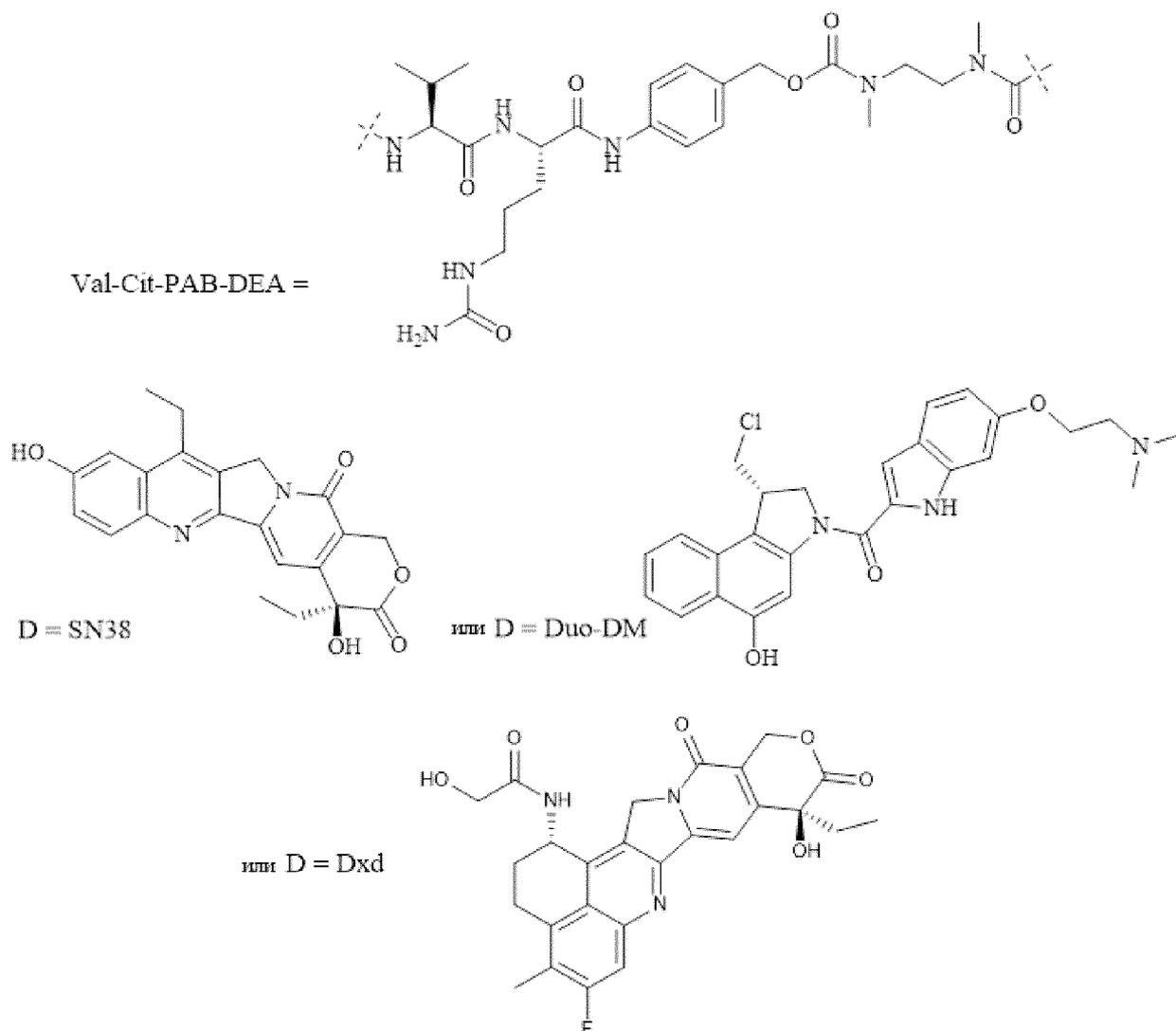
56. Соединение по п.55, где антитело имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID № 1, или в SEQ ID № 2, или в SEQ ID № 6.

57. Соединение по п.29, выбранное из формулы:



или его фармацевтически приемлемая соль;

где Ab представляет собой биспецифическое антитело, нацеленное на PDL1/CD47, или HER2(1)/HER2(2), или cMet(1)/cMet(2), или его антигенсвязывающий фрагмент,



58. Соединение по п.49, где антитело имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID № 1, SEQ ID № 2 или SEQ ID № 6.

59. Способ получения соединения по любому из пп.1-58, включающий:

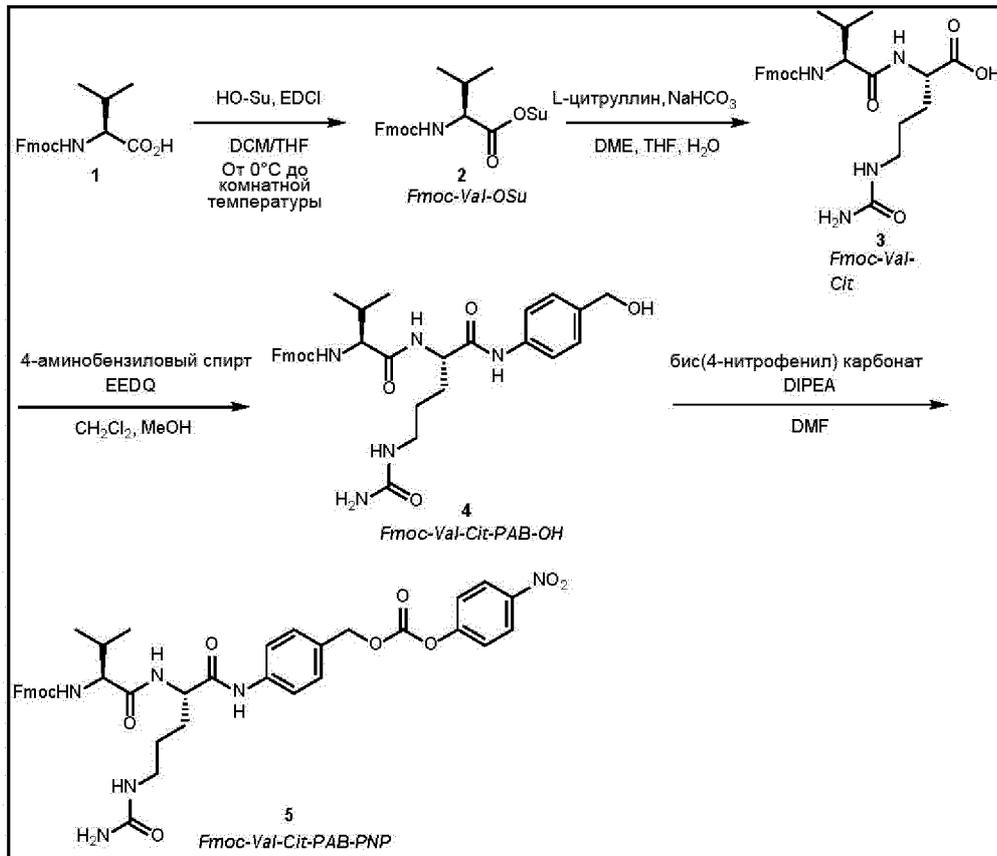
а) стадию получения неиммуногенного модифицированного (например, ПЭГилированного) гидроксил-несущего лекарственного конъюгата со свободной функциональной группой для сайт-специфической конъюгации;

б) стадию сайт-специфической конъюгации неиммуногенного модифицированного (например, ПЭГилированного) гидроксил-несущего лекарственного конъюгата с антителом для получения соединения Формулы (Ib) или (Ic).

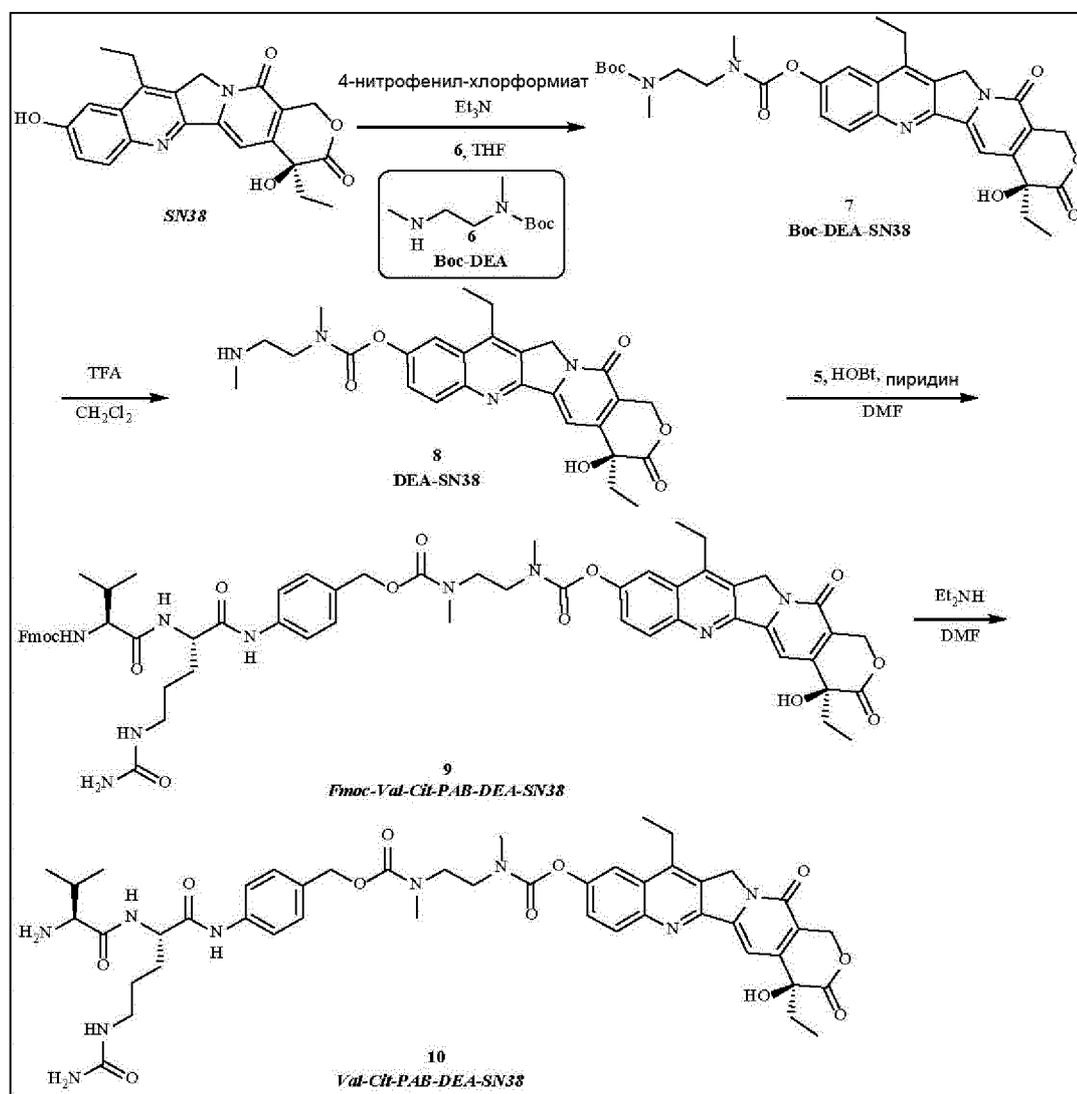
60. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество соединения по любому из пп.1-58 и фармацевтически приемлемую соль, носитель или вспомогательное вещество.

61. Соединение по любому из пп.1-58 для применения при лечении рака, выбранного из группы, состоящей из неходжкинских лимфом, В-клеточных острых и хронических лимфолейкозов, лимфомы Беркитта, лимфомы Ходжкина, волосатоклеточного лейкоза, острых и хронических миелолейкозов, Т-клеточных лимфом и лейкозов, множественной миеломы, глиомы, макроглобулинемии Вальденстрема, рака молочной железы, рака матки, рака шейки матки, рака яичника, рака предстательной железы, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака толстой кишки, колоректального рака, рака слюнной железы, рака щитовидной железы, рака кожи, рака костей, опухоли головного мозга, рака головы и шеи, а также рака эндометрия.

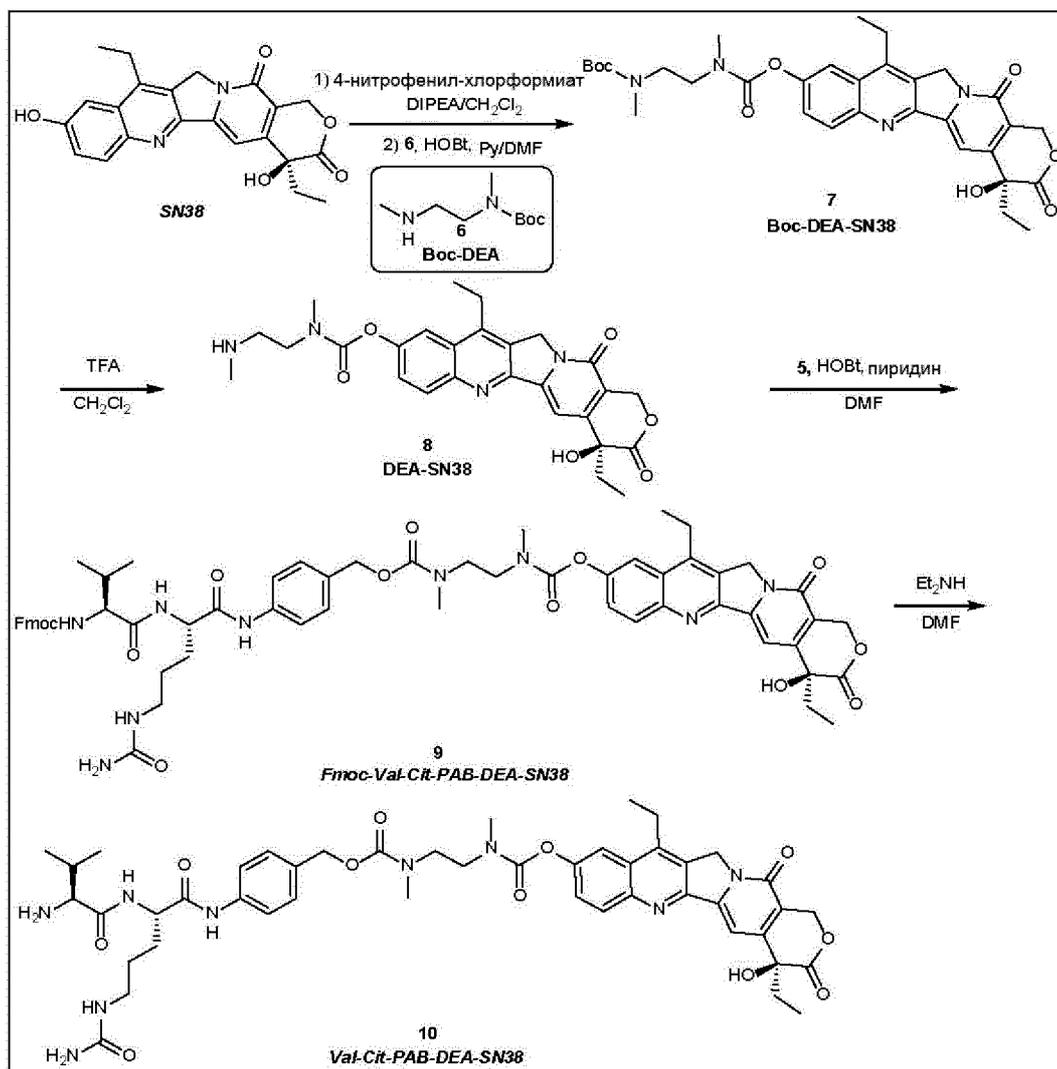
62. Соединение по любому из пп.1-58 для применения в комбинации с эффективным количеством другого противоопухолевого агента или иммунодепрессанта при лечении рака, выбранного из группы, состоящей из неходжкинских лимфом, В-клеточных острых и хронических лимфолейкозов, лимфомы Беркитта, лимфомы Ходжкина, волосатоклеточного лейкоза, острых и хронических миелолейкозов, Т-клеточных лимфом и лейкозов, множественной миеломы, глиомы, макроглобулинемии Вальденстрема, рака молочной железы, рака матки, рака шейки матки, рака яичника, рака предстательной железы, рака легкого, рака поджелудочной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака толстой кишки, колоректального рака, рака слюнной железы, рака щитовидной железы, рака кожи, рака костей, опухоли головного мозга и рака эндометрия.



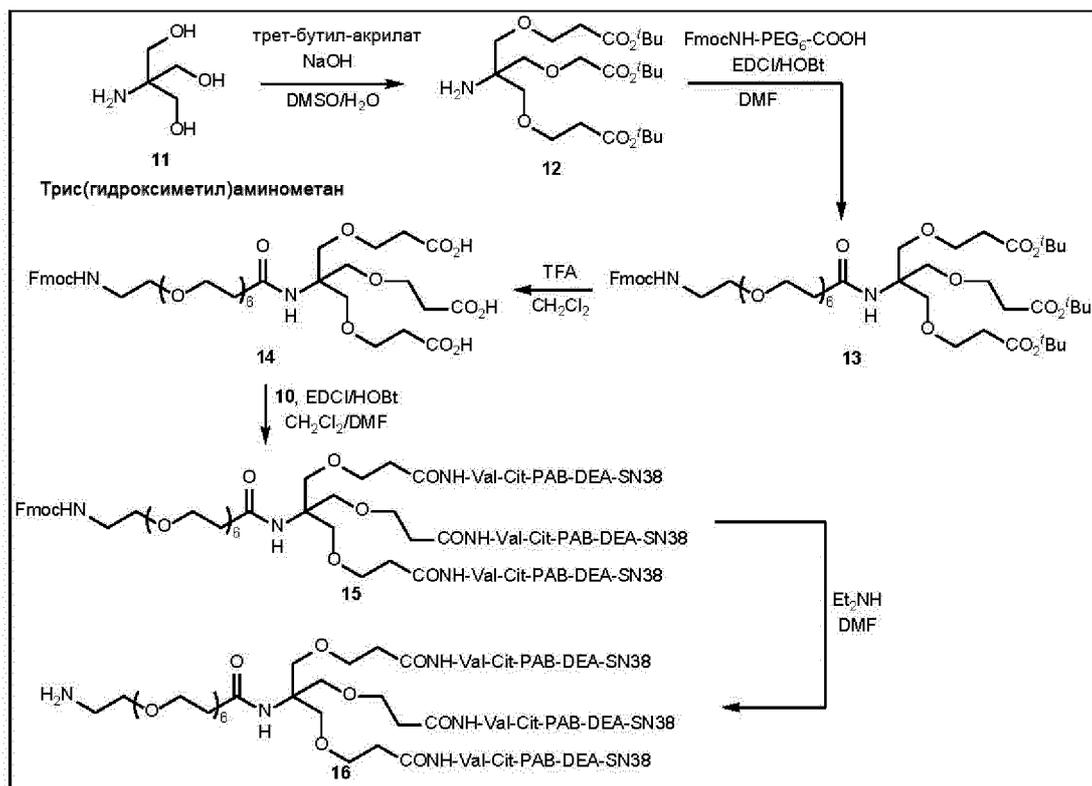
ФИГ. 1



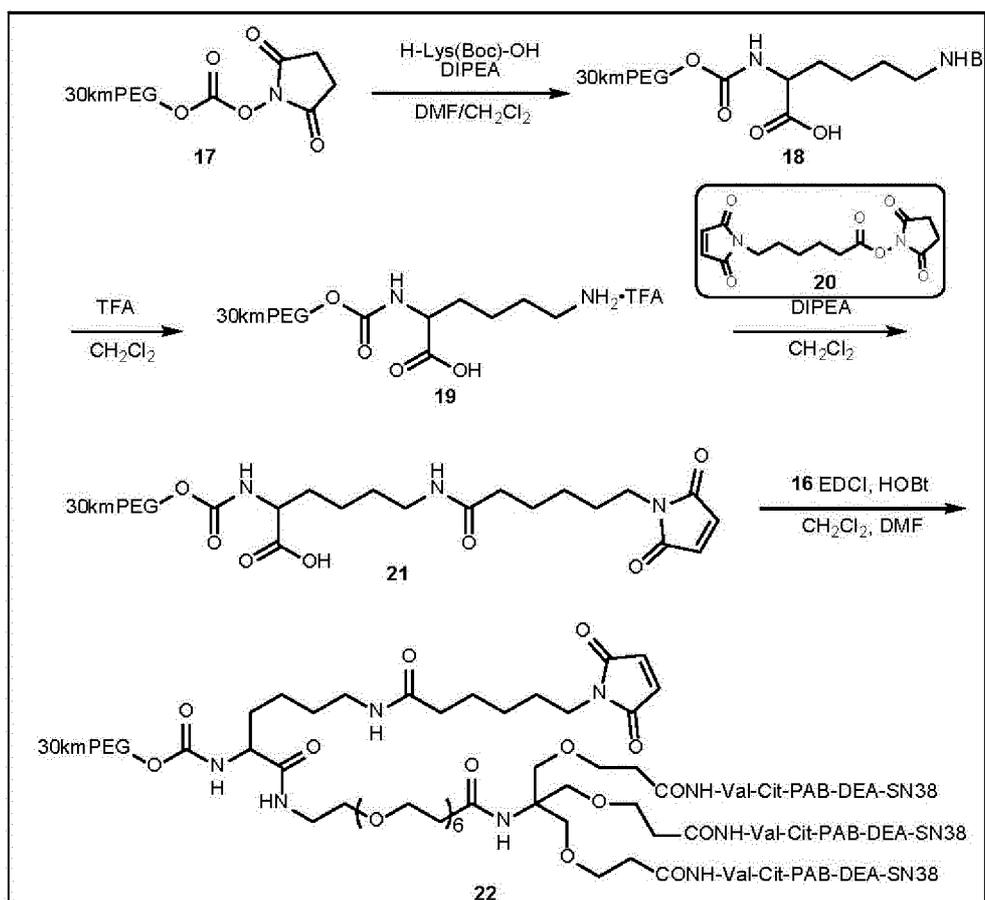
Фиг. 2



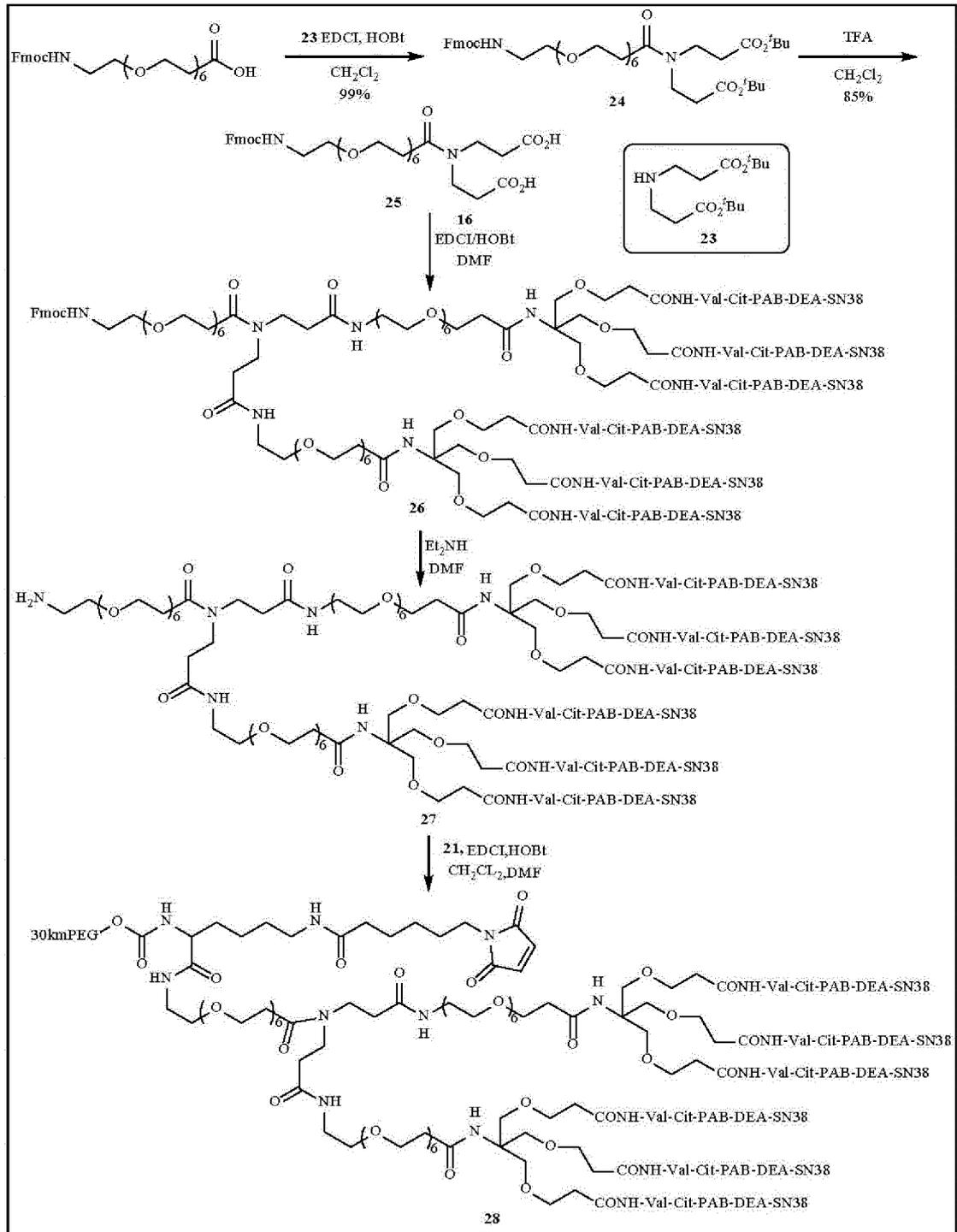
ФИГ. 3



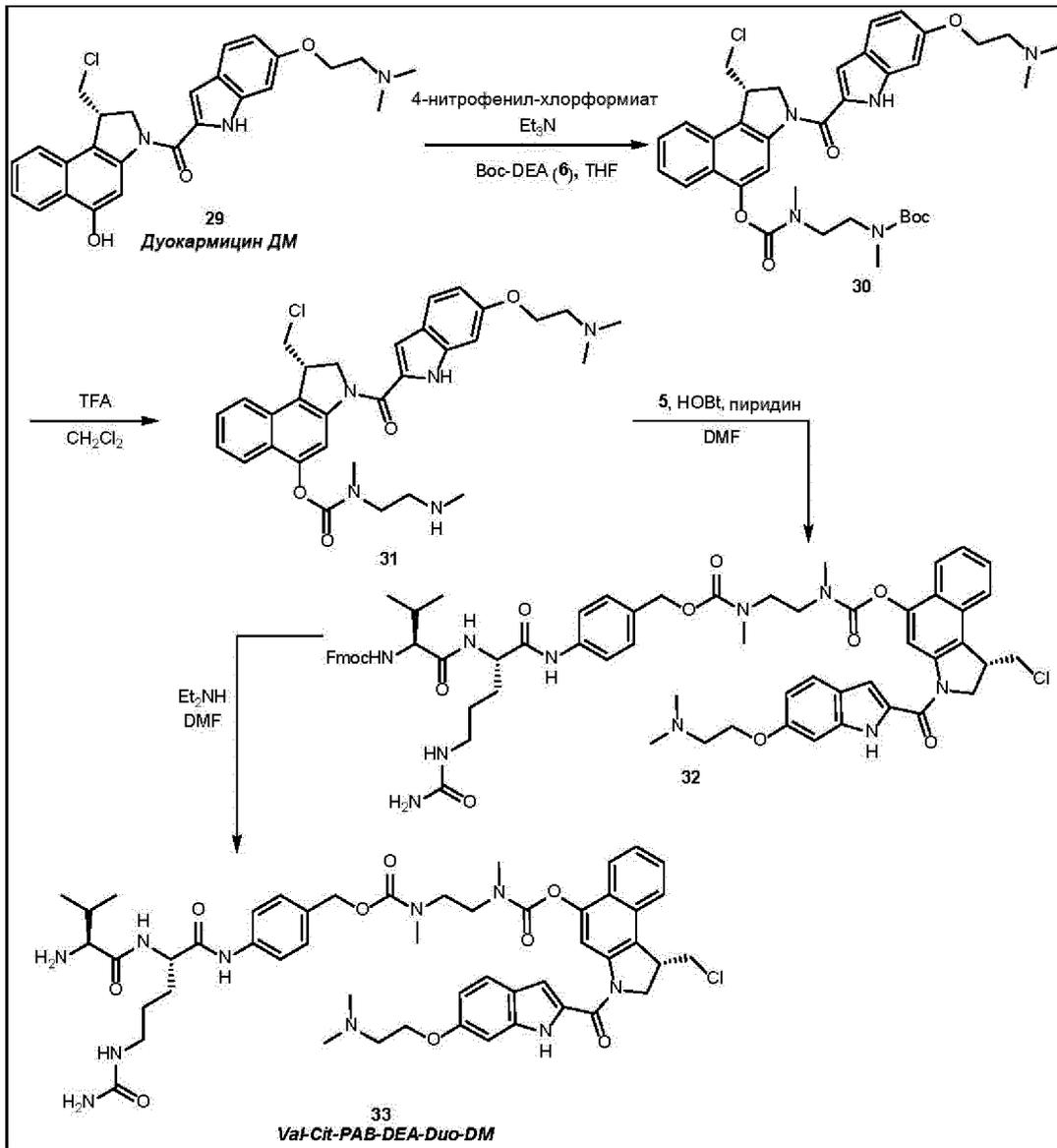
Фиг. 4



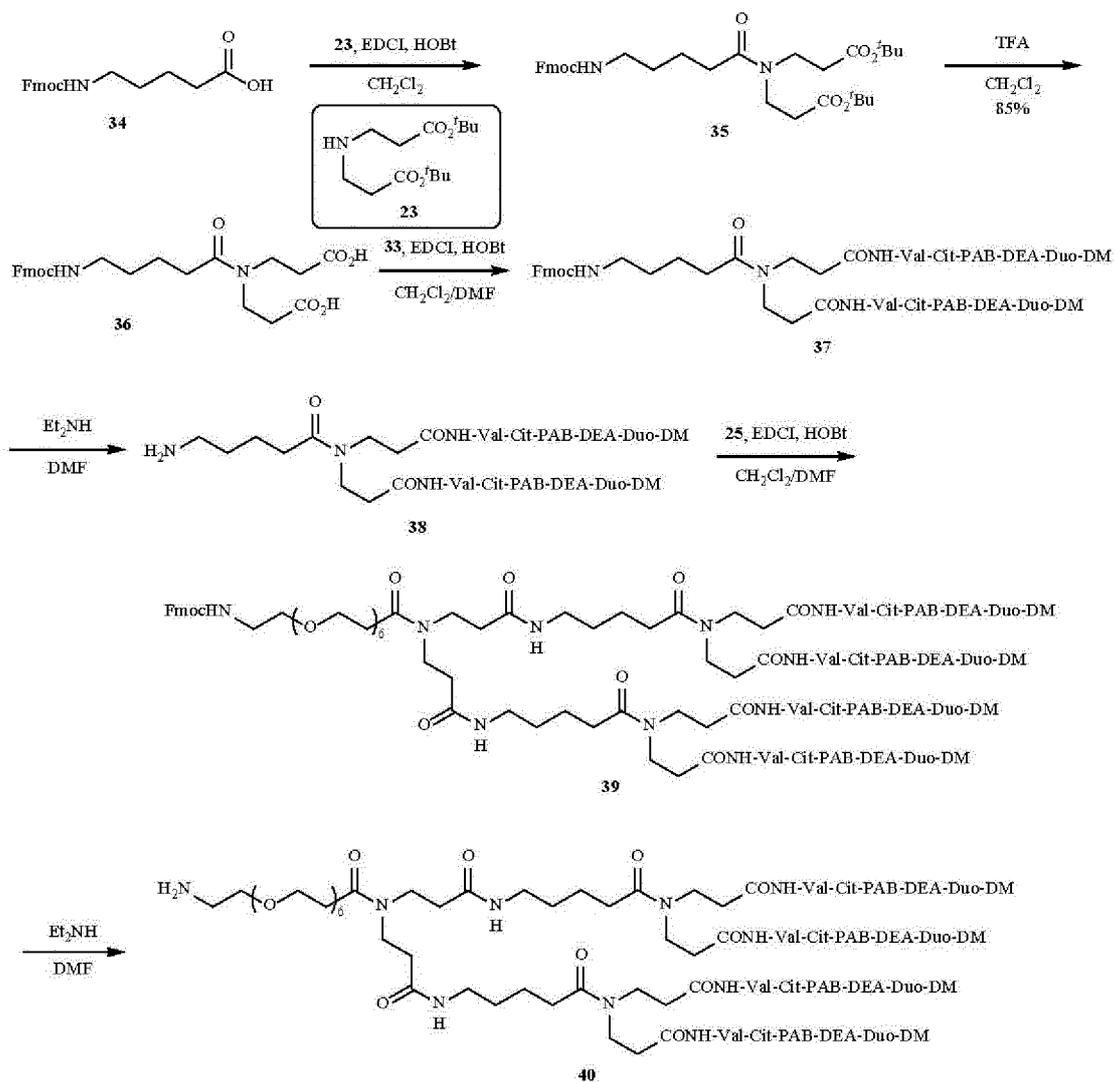
Фиг. 5



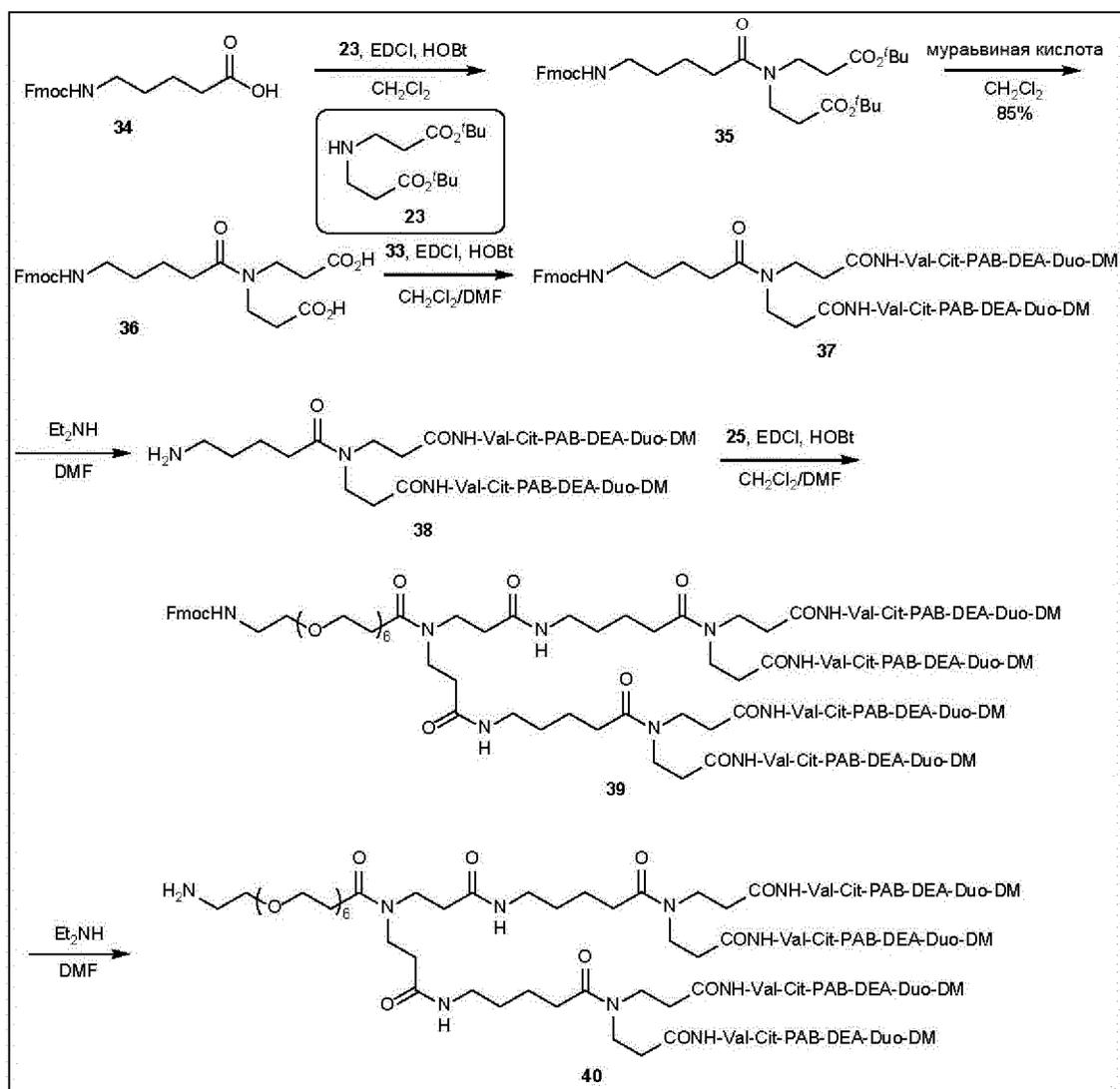
Фиг. 6



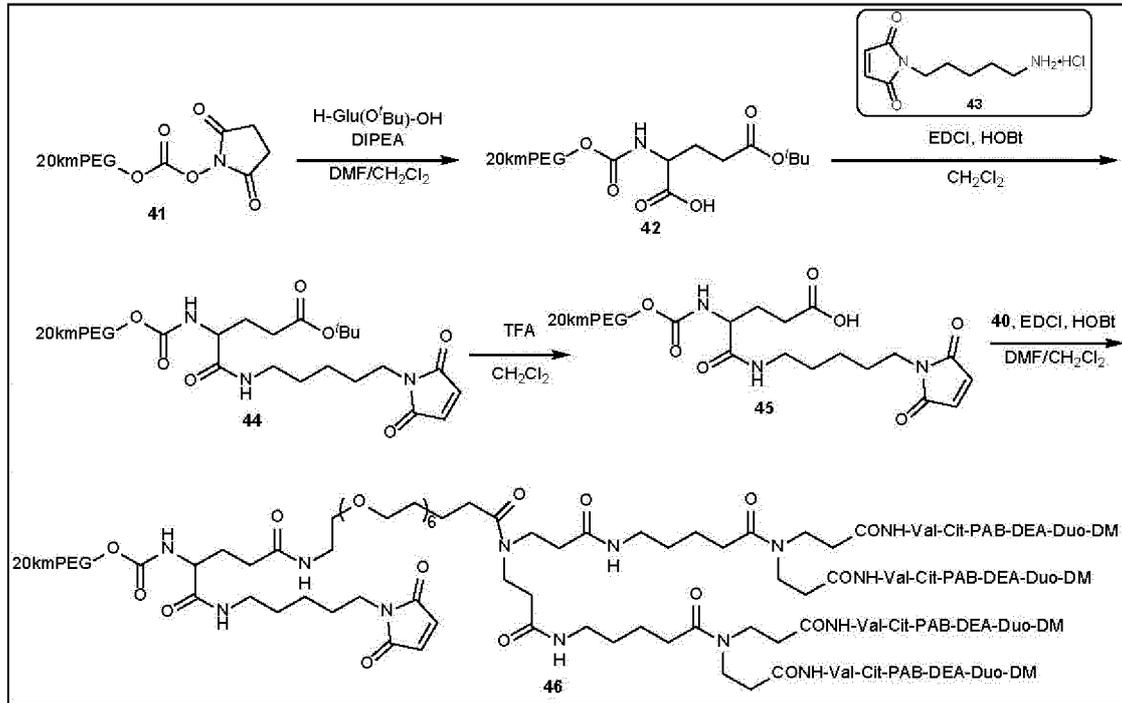
ФИГ. 7



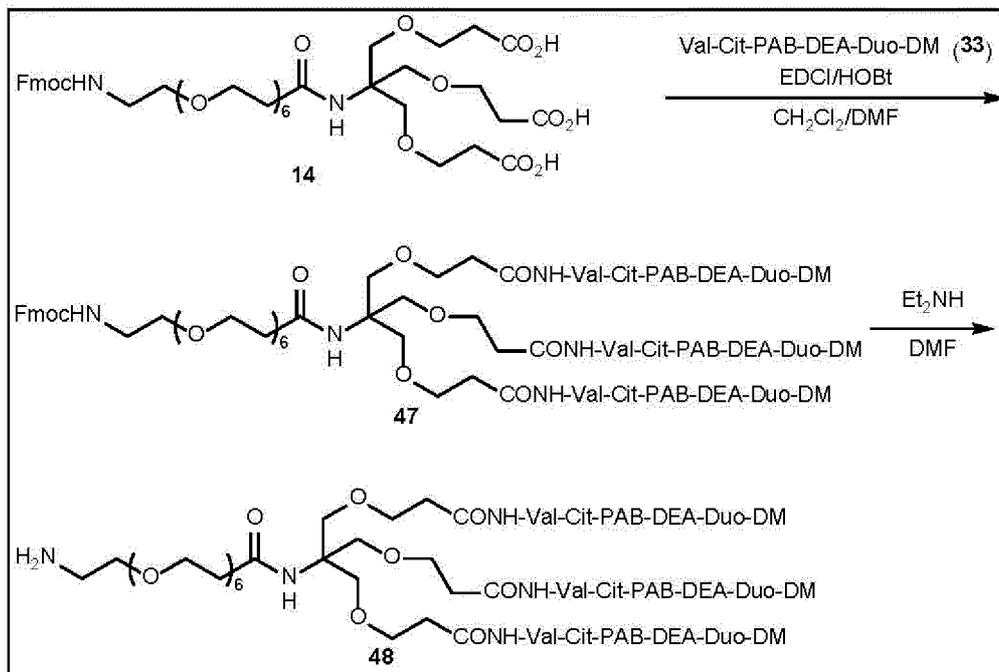
Фиг. 8



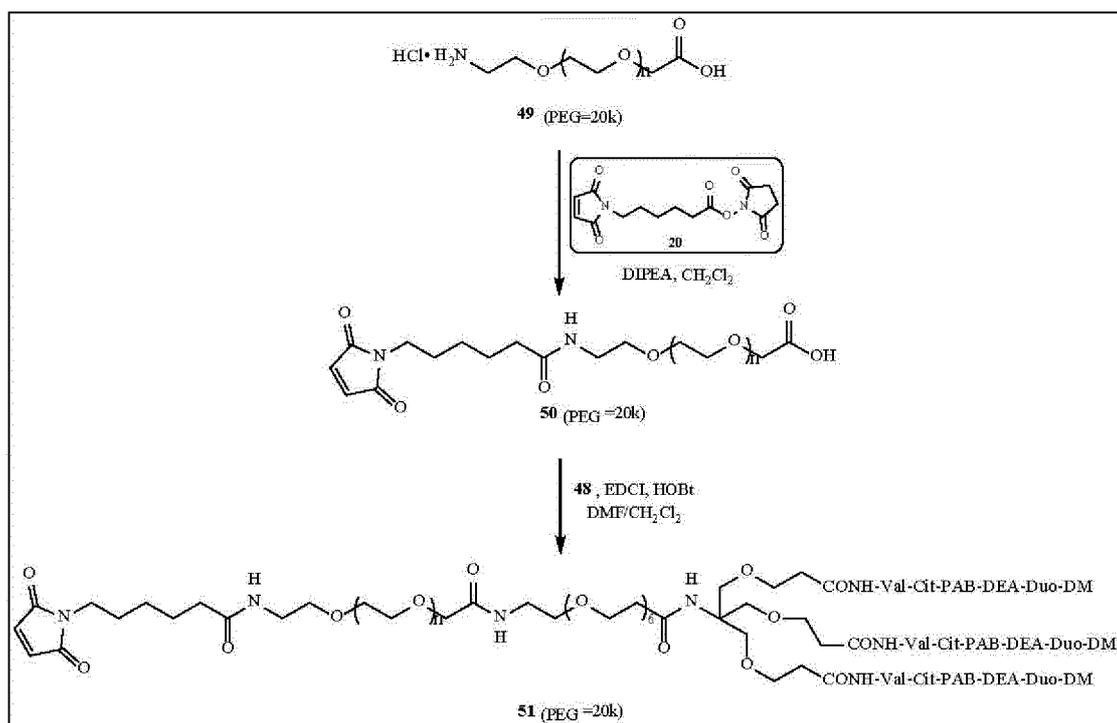
Фиг. 9



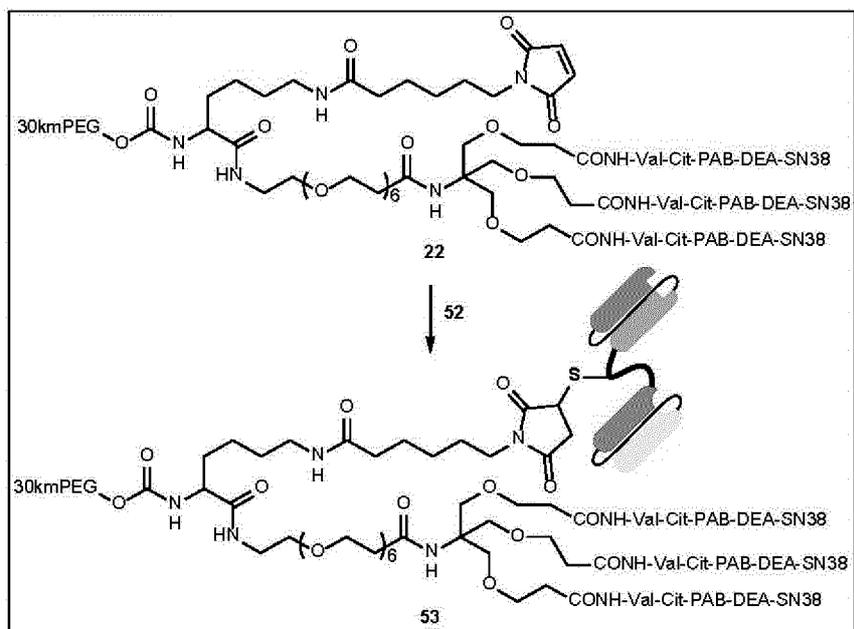
Фиг. 10



Фиг. 11

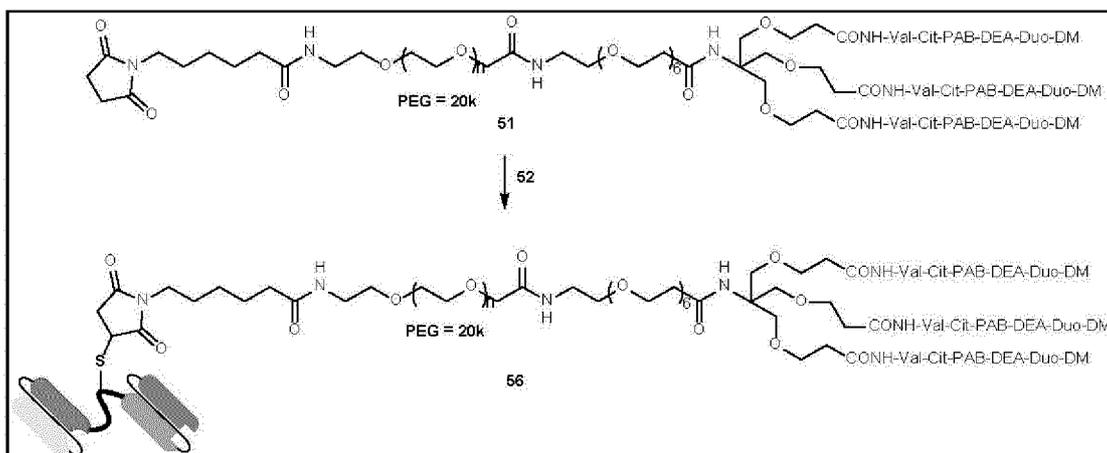


Фиг. 12

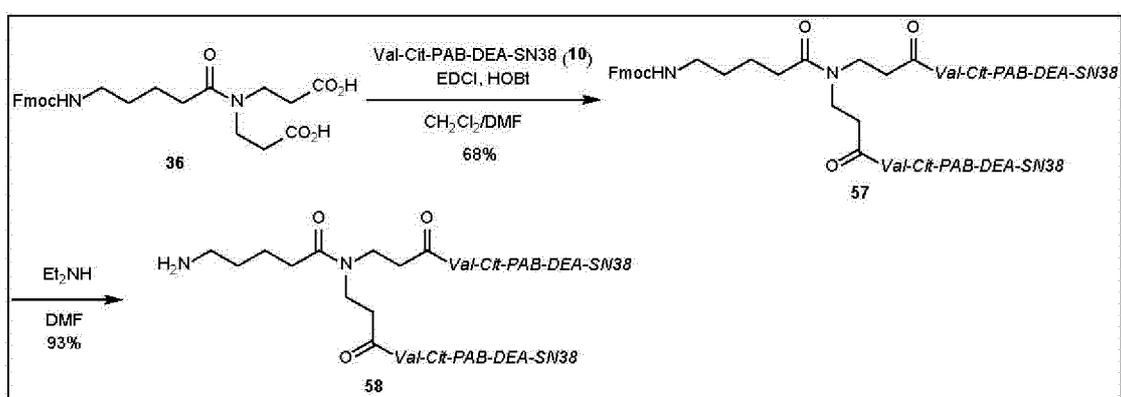


Фиг. 13

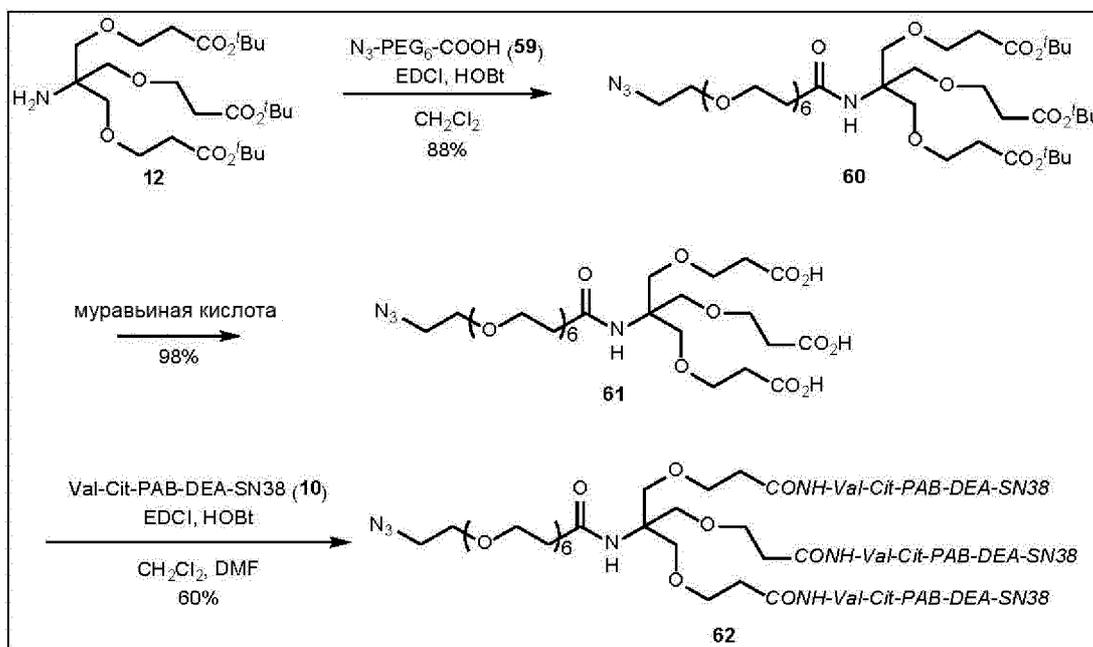




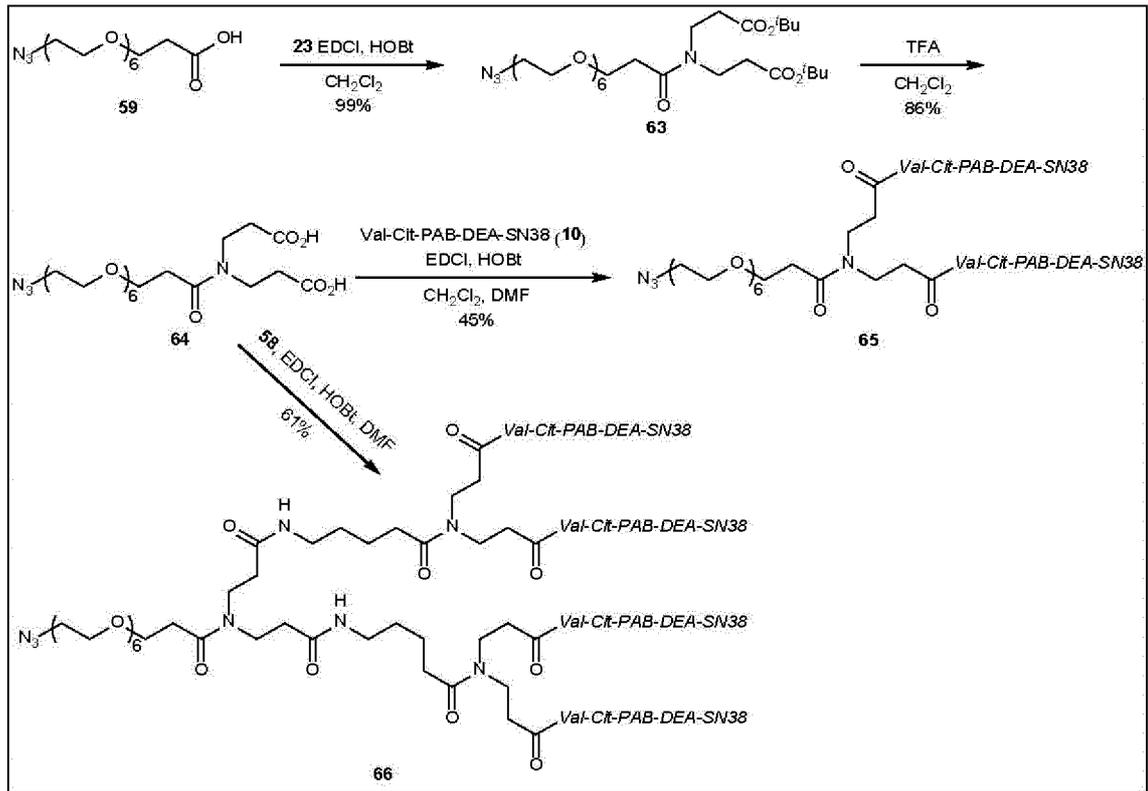
Фиг. 16



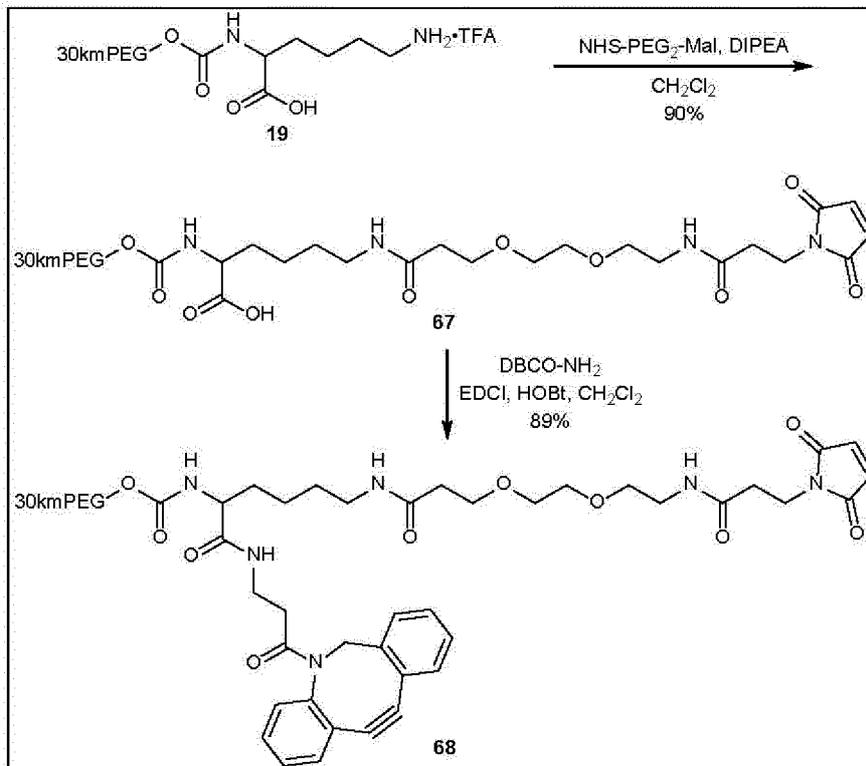
Фиг. 17



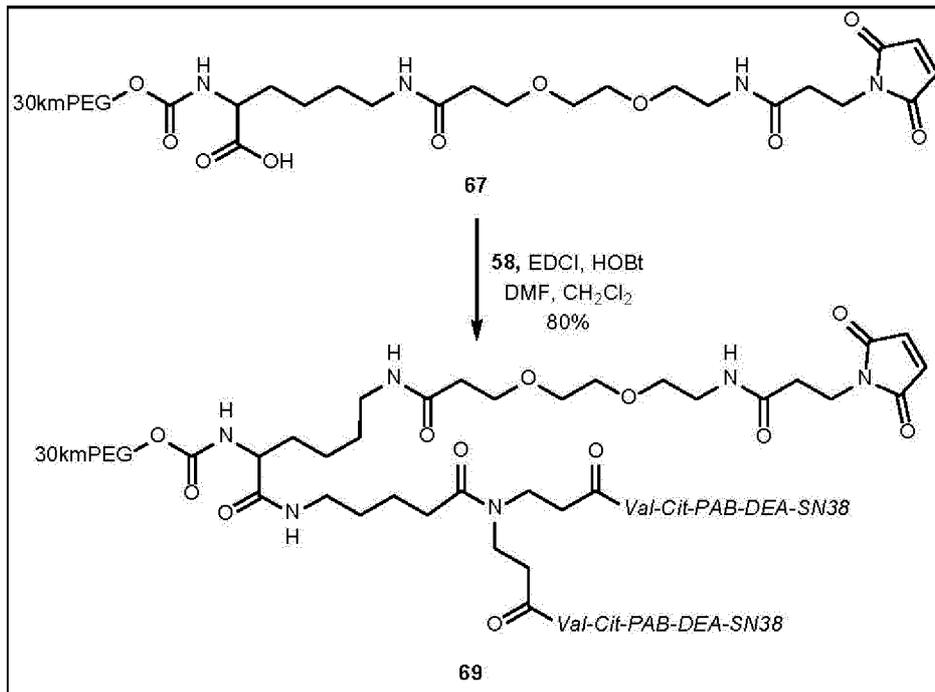
Фиг. 18



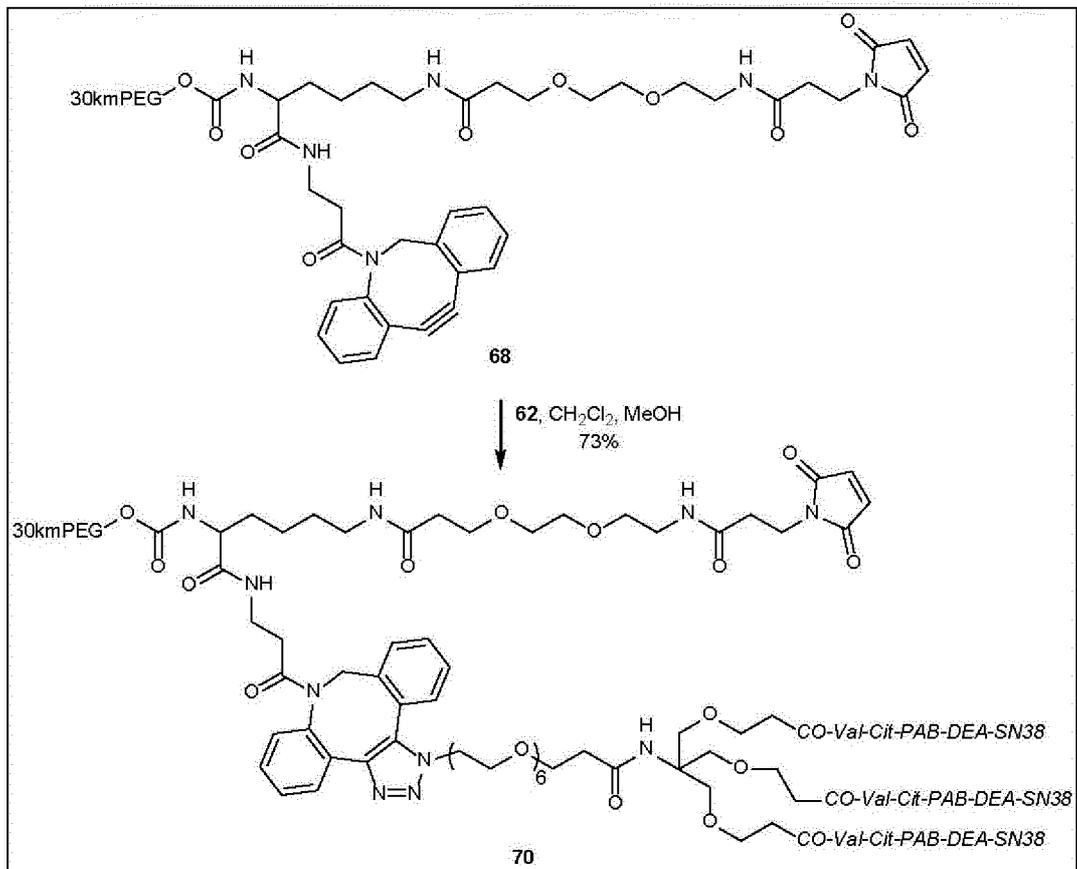
Фиг. 19



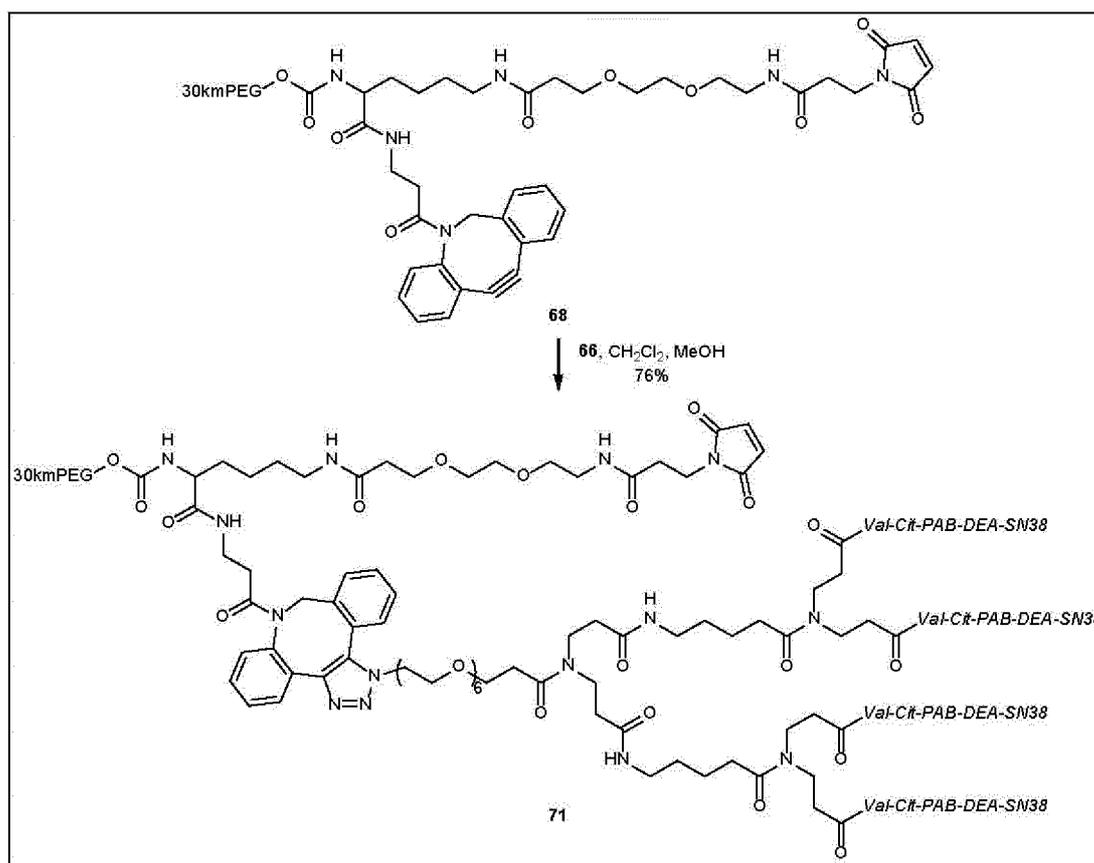
Фиг. 20



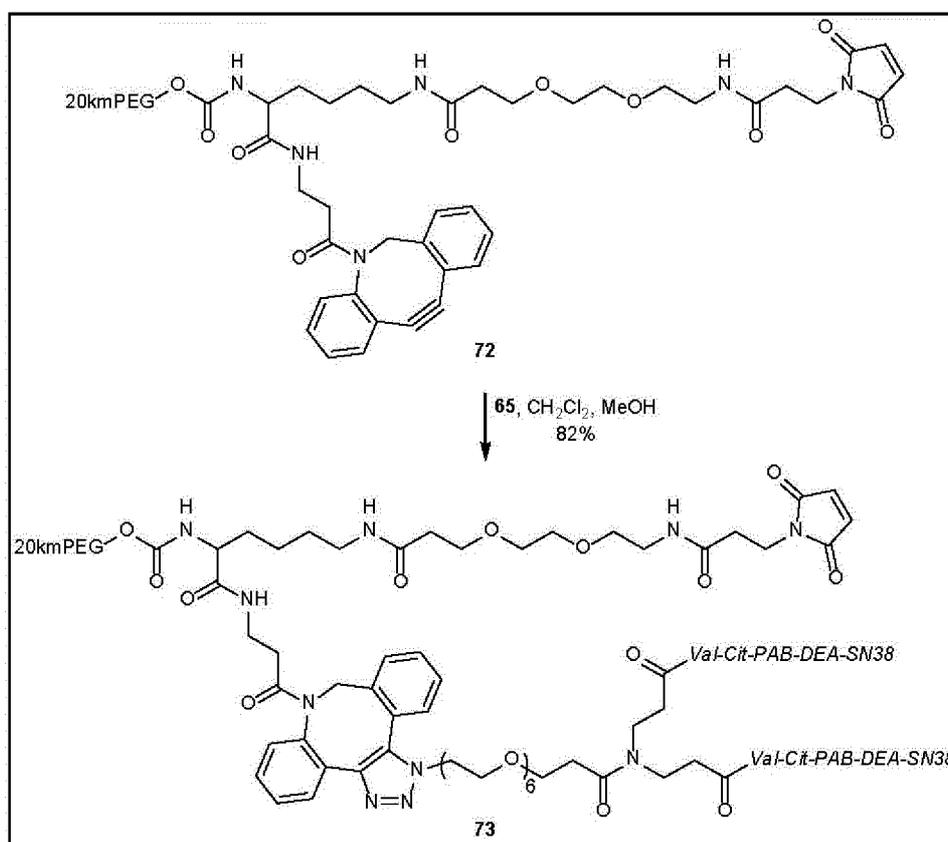
Фиг. 21



Фиг. 22

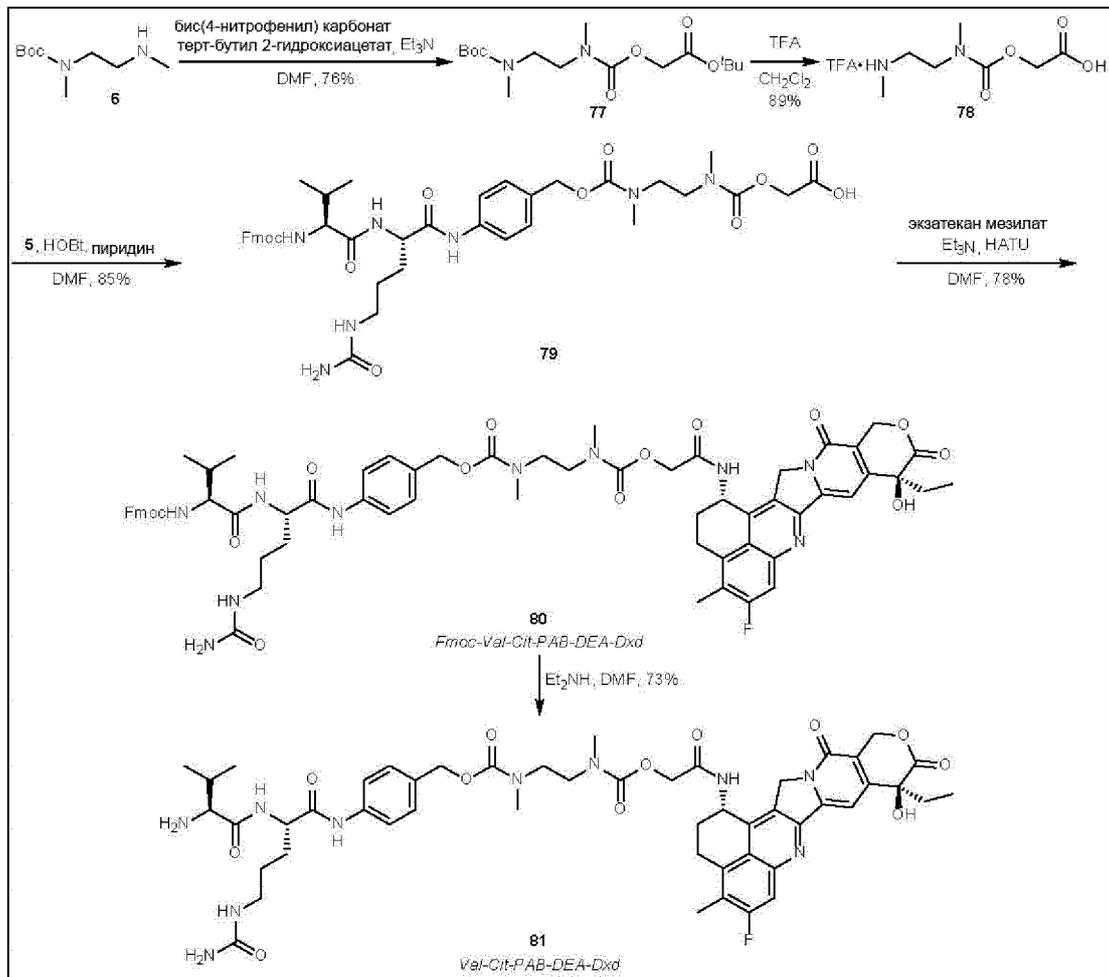


Фиг. 23

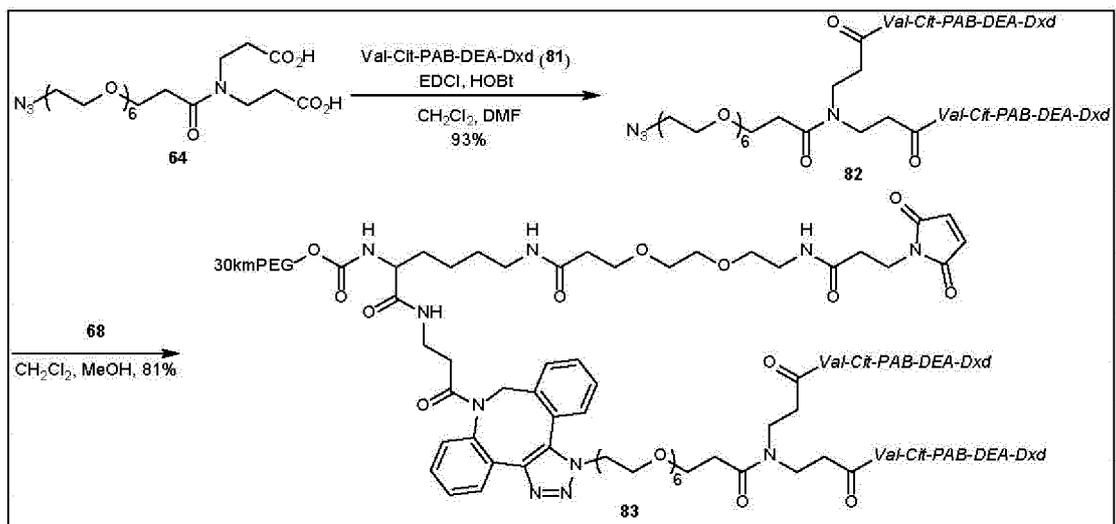


Фиг. 24

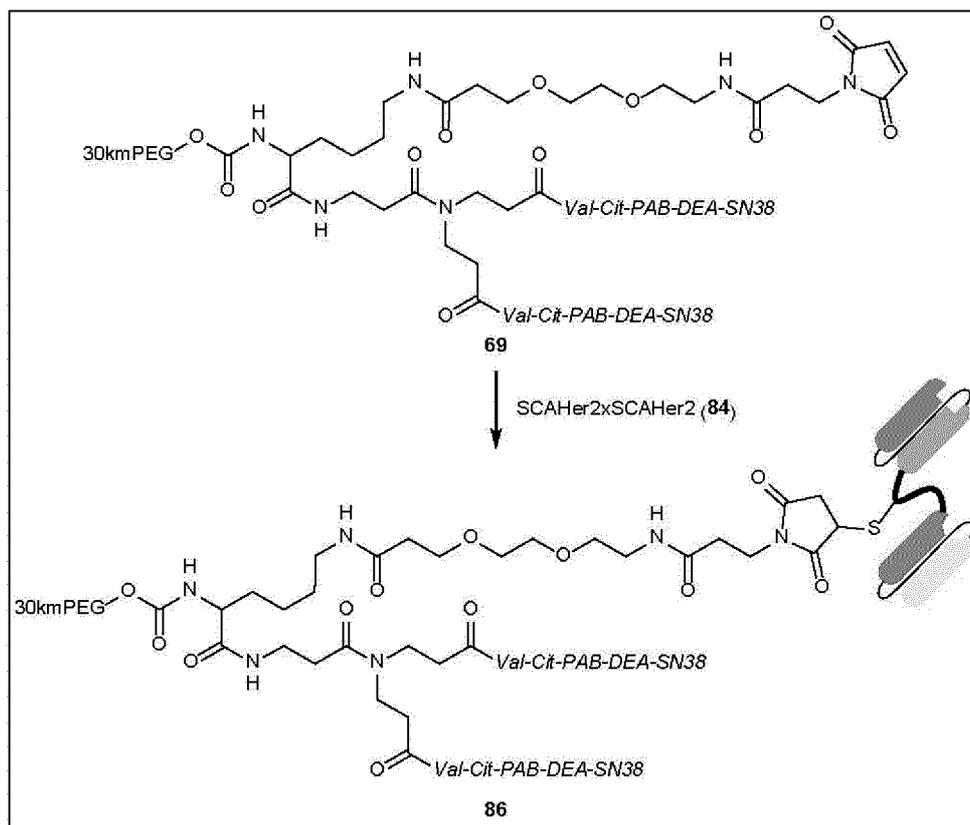




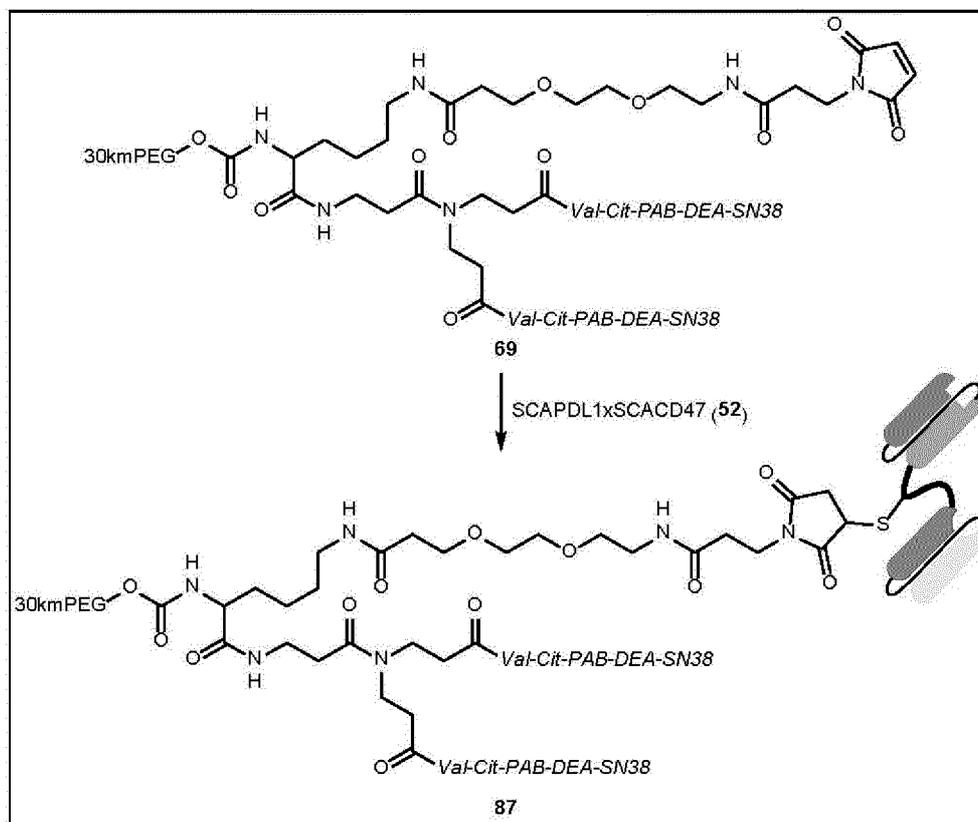
ФИГ. 26



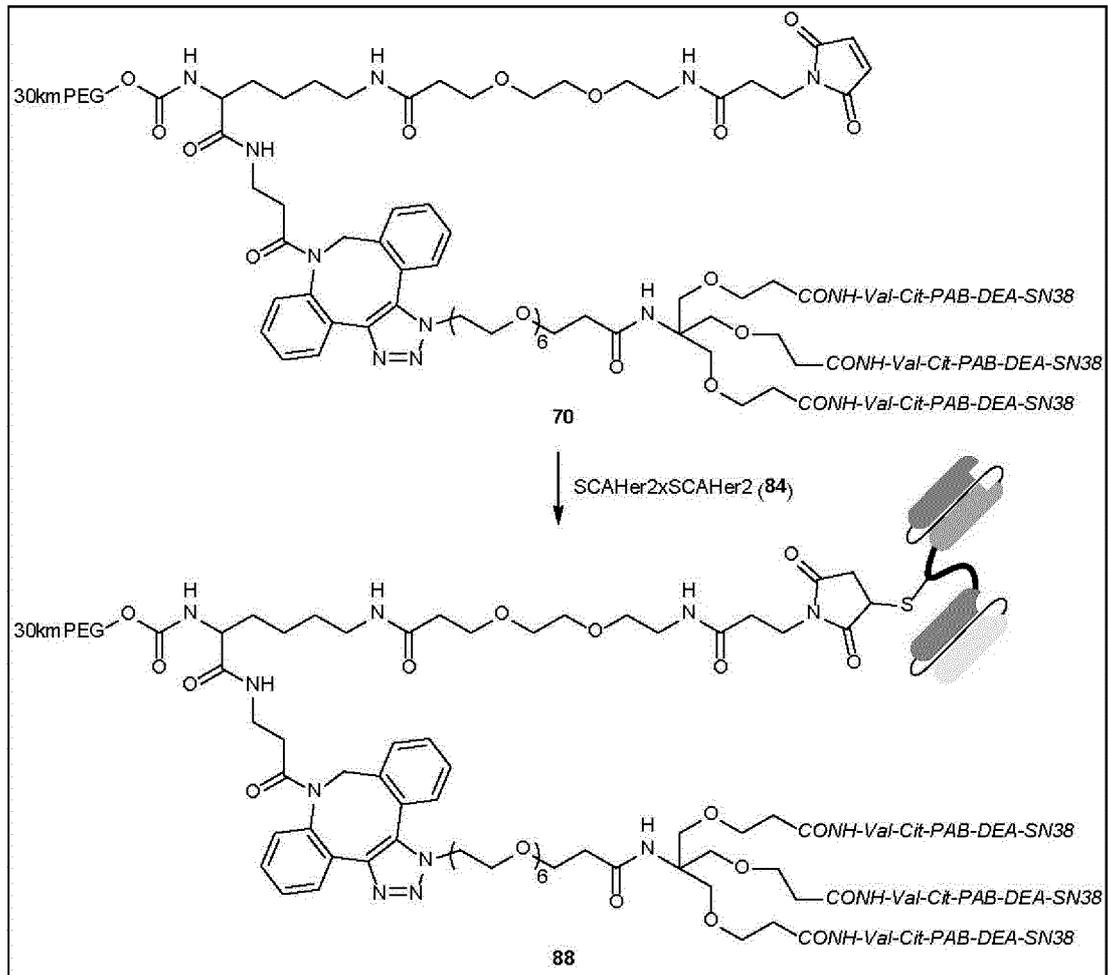
ФИГ. 27



Фиг. 28

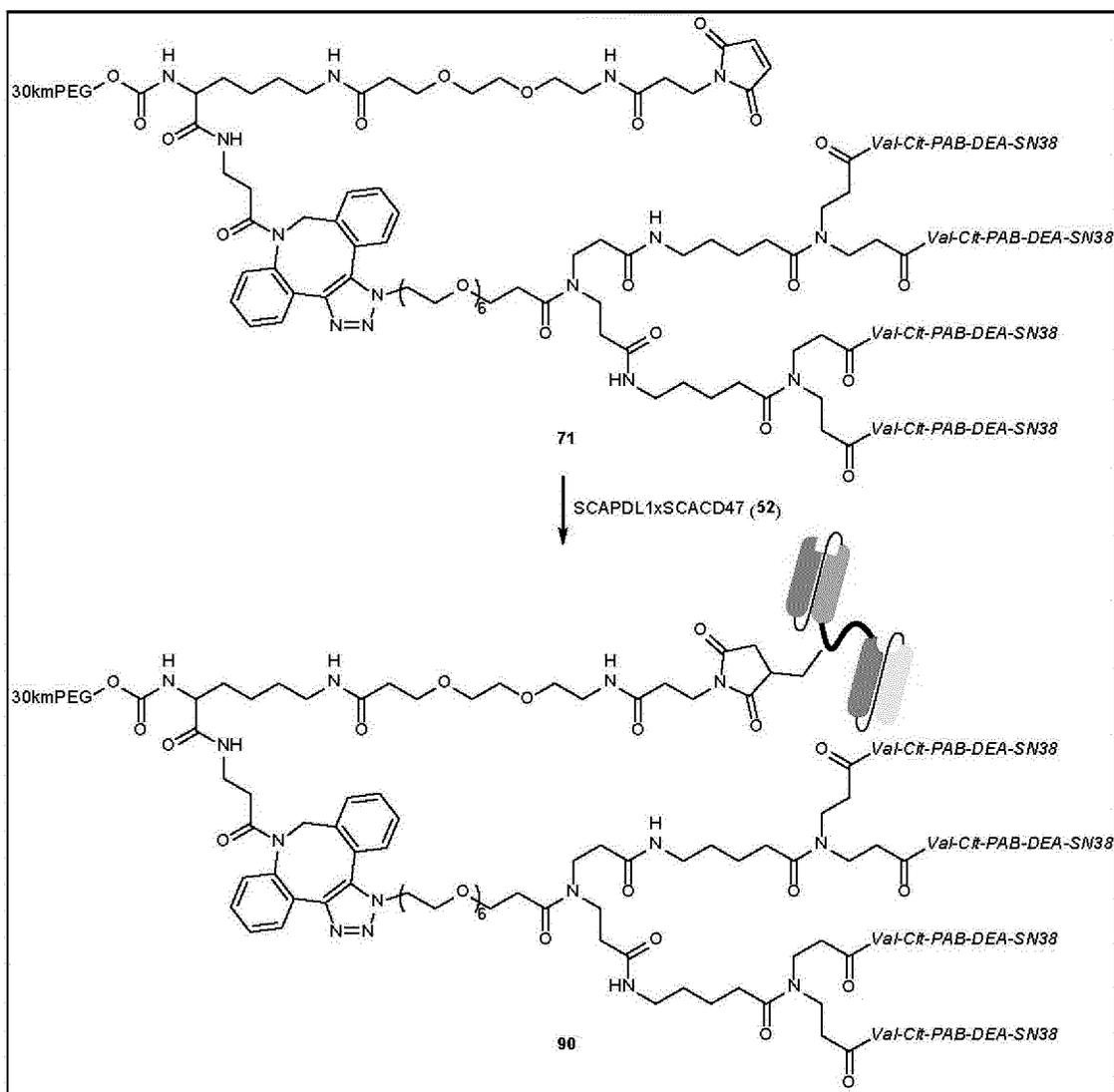


Фиг. 29

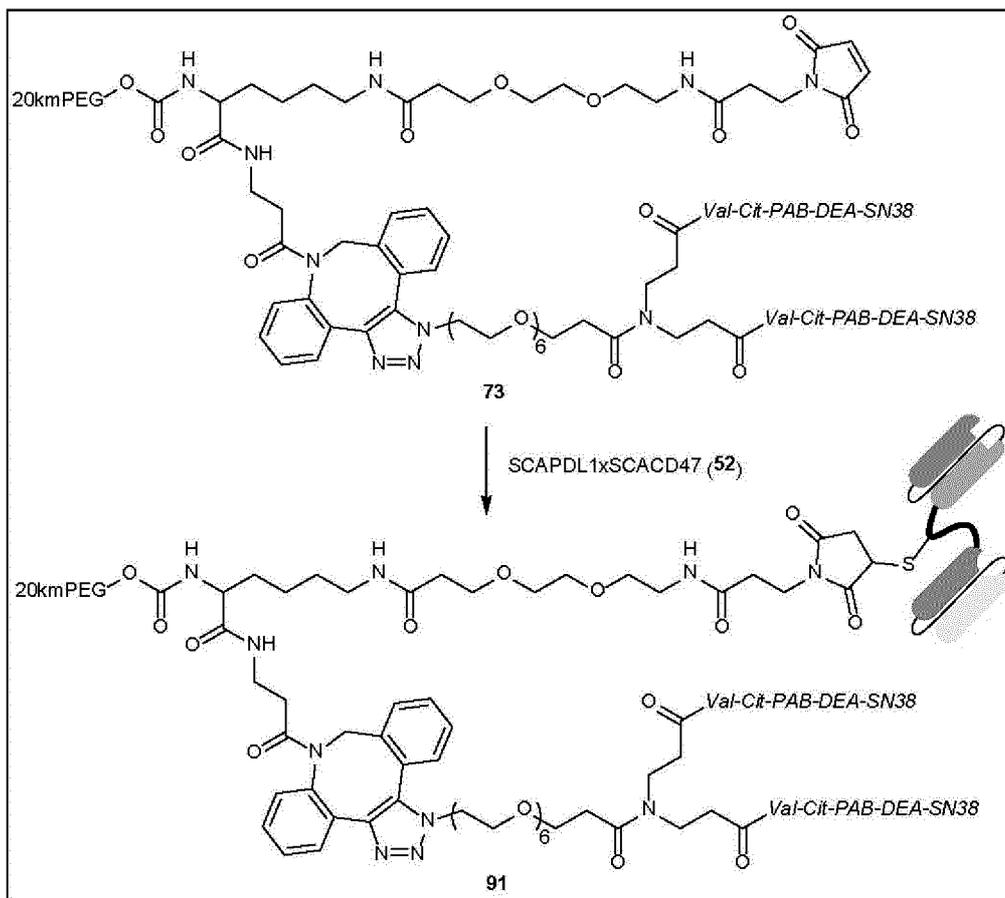


Фиг. 30

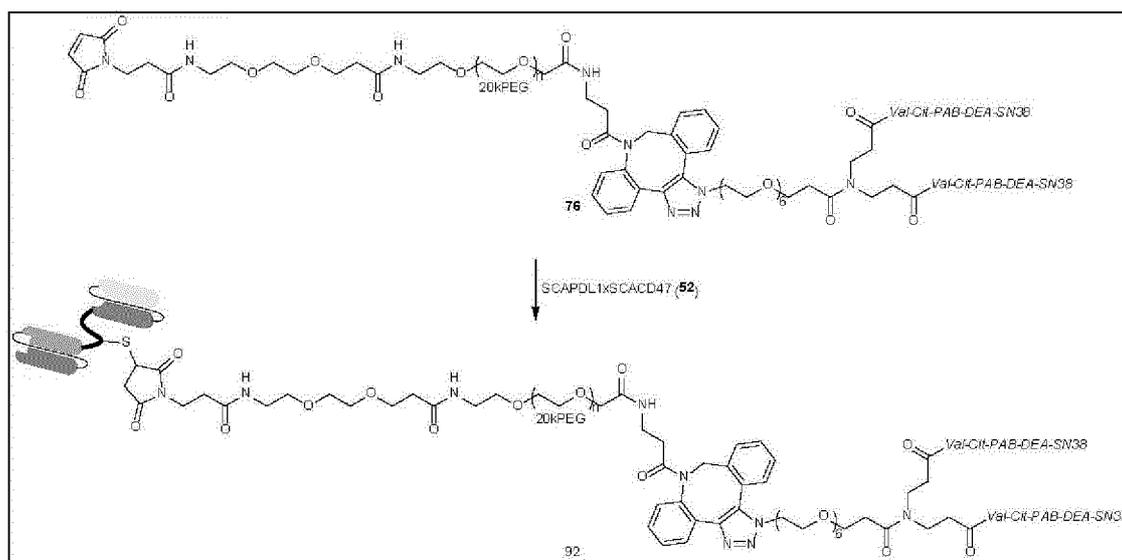




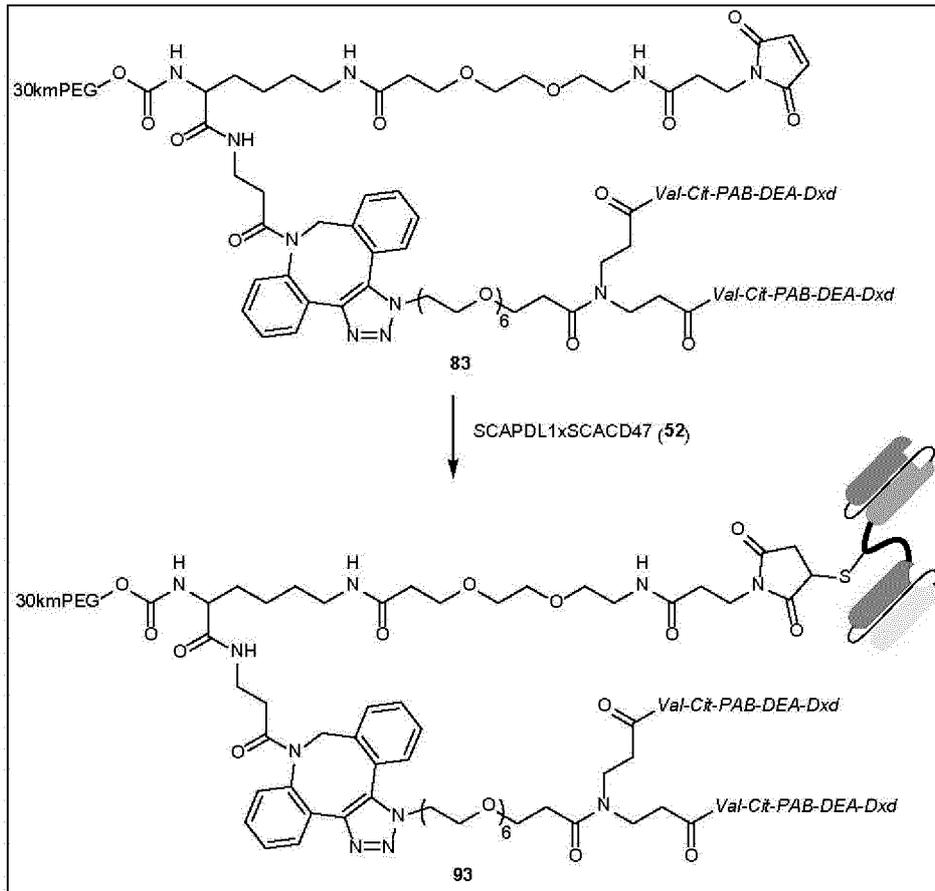
Фиг. 32



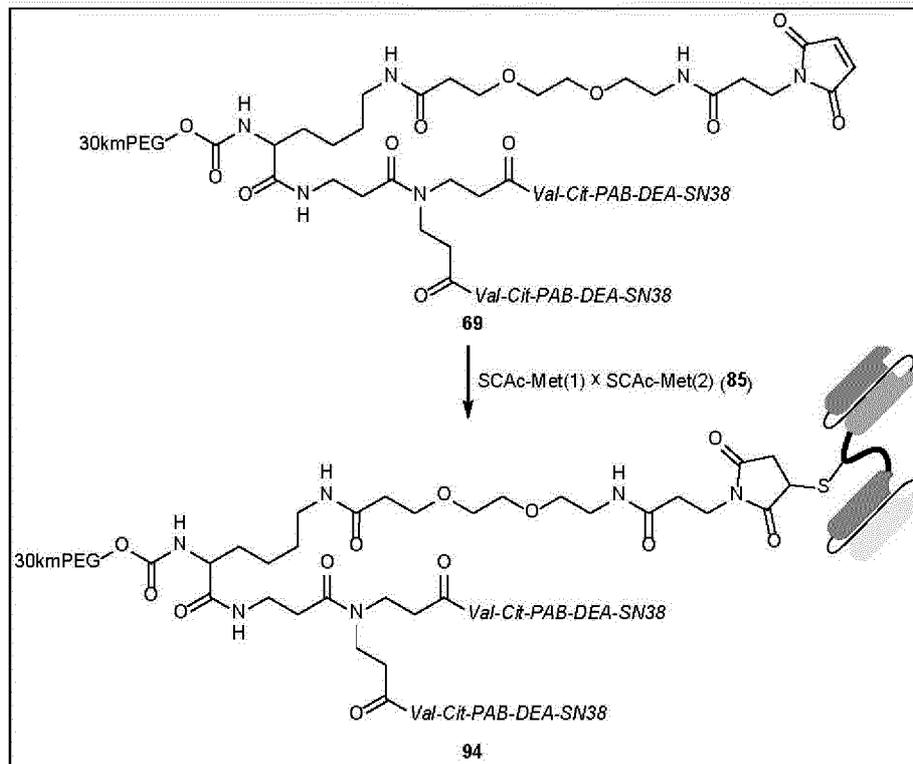
Фиг. 33



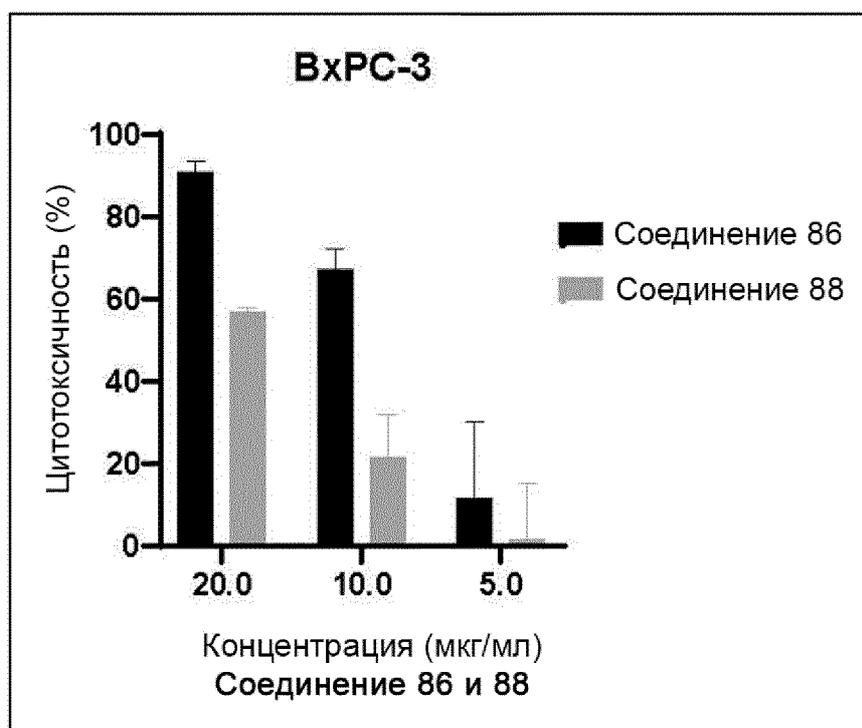
Фиг. 34



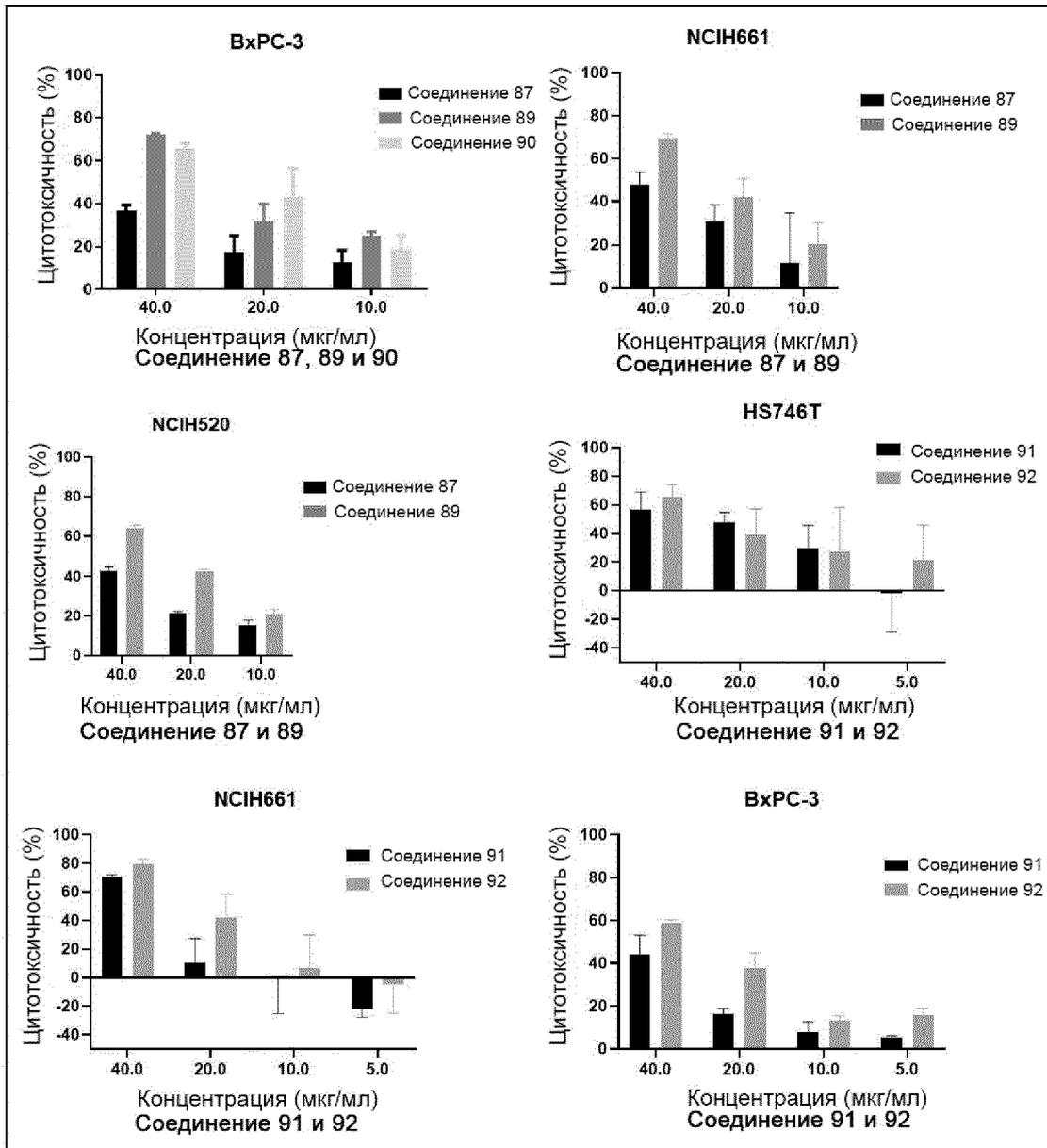
ФИГ. 35



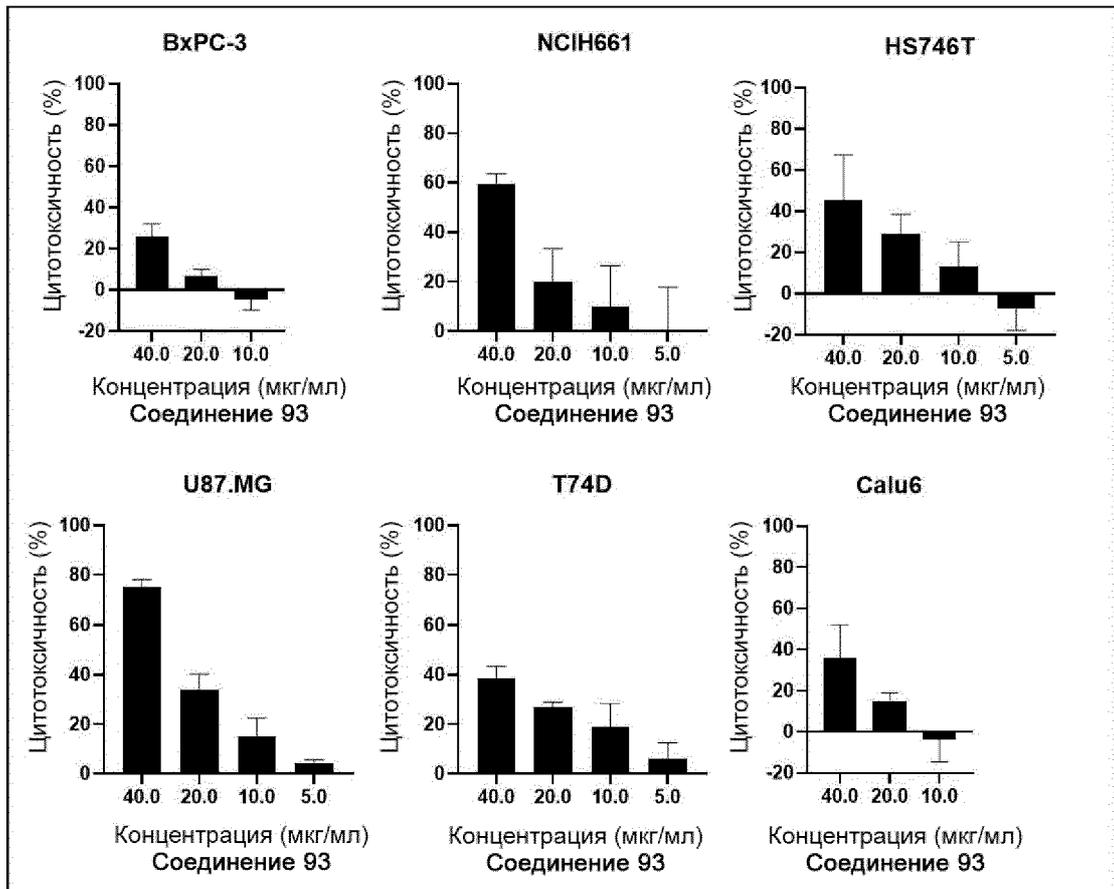
ФИГ. 36



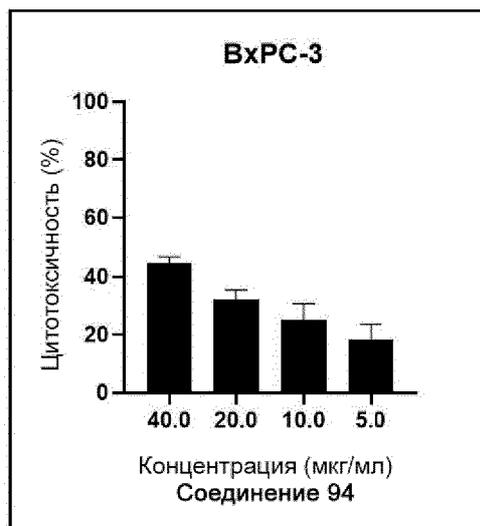
Фиг. 37



Фиг. 38



Фиг. 39



Фиг. 40