

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202091161 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.09.09

(51) Int. Cl. *A61K 31/5386* (2006.01)  
*C07D 405/12* (2006.01)  
*C07D 498/18* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.12.11

(54) КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛ ПРОТИВ CD22 С МАЙТАНЗИНОМ, ИХ КОМБИНАЦИИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/597,160

(72) Изобретатель:  
Макларен Энн (US)

(32) 2017.12.11

(33) US

(74) Представитель:  
Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н.  
(RU)

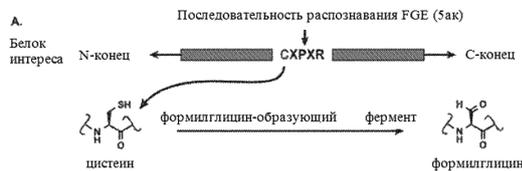
(86) PCT/US2018/064879

(87) WO 2019/118411 2019.06.20

(88) 2020.03.26

(71) Заявитель:  
ТРАЙФЕЙЗ РЕСЕРЧ ЭНД  
ДИВЕЛОПМЕНТ III КОРП. (СА)

(57) Настоящее изобретение относится к способам лечения рака или резистентного рака с помощью комбинации конъюгата антитела к CD22 и майтанзина и одного или нескольких противораковых агентов. Изобретение также охватывает способы сенсibilизации рака такими комбинациями. Также предоставлены фармацевтические композиции, включающие такие комбинации.



202091161

A1

A1

202091161

## КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛ ПРОТИВ CD22 С МАЙТАНСИНОМ, ИХ КОМБИНАЦИИ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

### РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой США № 62/597160, поданной 11 декабря 2017 г., содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

### СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Содержимое текстового файла "TRPS-04001WO\_SeqList\_ST25.txt", созданного 10 декабря 2018 года и имеющего размер 95 КБ, полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

### Введение

В области исследований, относящихся к терапевтическим конъюгатам белка с небольшими молекулами наблюдается значительное продвижение вперед и обеспечение ряда клинически эффективных лекарственных средств с перспективой расширения в ближайшие годы. Терапевтические средства, содержащие белковые конъюгаты, могут обеспечивать несколько преимуществ, например, вследствие специфичности, множественности функций и относительно низкой нецелевой активности, что приводит к меньшему количеству побочных эффектов. Химическая модификация белков может расширить данные преимущества, сделав их более мощными, стабильными или комбинированными.

Ряд стандартных химических превращений обычно применяют для создания и управления посттрансляционными модификациями белков. Существует ряд способов, которыми можно избирательно модифицировать боковые цепи определенных аминокислот. Например, боковые цепи карбоновой кислоты (аспартат и глутамат) могут быть подвергнуты начальной активации водорастворимым карбодиимидным реагентом и последующей реакции с амином. Аналогичным образом, на лизин можно воздействовать с помощью активированных сложных эфиров или изотиоцианатов, а на цистеинтиолы можно воздействовать малеимидами и  $\alpha$ -галогенкарбонилами.

Одним существенным препятствием для создания химически измененного белкового терапевтического средства или реагента является получение белка в биологически активной гомогенной форме. Может быть трудно контролировать конъюгацию лекарственного средства или детектируемой метки с полипептидом, что приводит к гетерогенной смеси конъюгатов, которые различаются по количеству присоединенных молекул лекарственного средства и по положению химической

конъюгации. В некоторых случаях желательно контролировать сайт конъюгации и/или лекарственное средство или детектируемую метку, конъюгированную с полипептидом, применяя инструменты синтетической органической химии, чтобы определять точное и избирательное образование химических связей на полипептиде.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам лечения рака и резистентного рака с помощью конъюгата антитела против CD22 с майтансином в комбинации с одним или более противораковыми агентами. Настоящее изобретение также относится к способам сенсibilизации раковых заболеваний путем лечения такими конъюгатами и противораковыми агентами.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества одного или более противораковых агентов и конъюгата, как определено в настоящем описании.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения резистентного рака у субъекта, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества одного или более противораковых агентов и конъюгата, как определено в настоящем описании.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу сенсibilизации рака у субъекта, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества одного или более противораковых агентов и конъюгата, как определено в настоящем описании.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения рака, содержащая один или более противораковых агентов, конъюгат, как определено в настоящем описании и фармацевтически приемлемый эксципиент. В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции для получения лекарственного средства для лечения рака. В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции для получения лекарственного средства для лечения резистентного рака.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции для получения лекарственного средства для сенсibilизации рака. В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции для лечения рака.

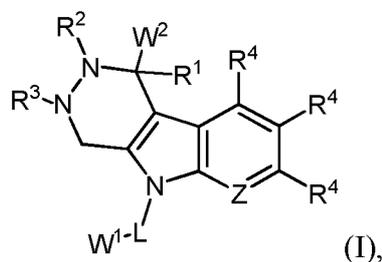
В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции для лечения резистентного рака. В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции для сенсбилизации рака.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения резистентного рака у субъекта, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества конъюгата, как определено в настоящем описании.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению комбинации, содержащей один или более противораковых агентов и конъюгат, как определено в настоящем описании, для получения лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению комбинации, содержащей один или более противораковых агентов и конъюгат, как определено в настоящем описании, для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, конъюгат содержит по меньшей мере один модифицированный аминокислотный остаток формулы (I):



где:

Z представляет собой CR<sup>4</sup> или N,

R<sup>1</sup> выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> каждый независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амина, замещенного амина, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминацила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила,

гетероциклила и замещенного гетероциклила, или  $R^2$  и  $R^3$  необязательно циклически связаны с образованием 5- или 6-членного гетероциклила,

каждый  $R^4$  независимо выбран из водорода, галогена, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, amino, замещенного amino, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

L представляет собой линкер, содержащий  $-(T^1-V^1)_a-(T^2-V^2)_b-(T^3-V^3)_c-(T^4-V^4)_d$ , где a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d составляет от 1 до 4,

$T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  каждый независимо выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила,  $(ЭДА)_w$  (этилендиаминовый фрагмент),  $(ПЭГ)_n$  (полиэтиленгликоль),  $(АК)_p$  (аминокислотный остаток),  $-(CR^{13}OH)_h$ , пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, гидразина, дисульфида и сложного эфира, где ЭДА представляет собой этилендиаминовый фрагмент, ПЭГ представляет собой полиэтиленгликоль или модифицированный полиэтиленгликоль, и АК представляет собой аминокислотный остаток, где w представляет собой целое число от 1 до 20, n представляет собой целое число от 1 до 30, p представляет собой целое число от 1 до 20 и h представляет собой целое число от 1 до 12,

$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  каждый независимо выбран из группы, состоящей из ковалентной связи,  $-CO-$ ,  $-NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}(CH_2)_q-$ ,  $-NR^{15}(C_6H_4)-$ ,  $-CONR^{15}-$ ,  $-NR^{15}CO-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO_2NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}SO_2-$  и  $-P(O)OH-$ , где q представляет собой целое число от 1 до 6,

каждый  $R^{13}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила,

каждый  $R^{15}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

$W^1$  представляет собой майтансиноид, и

$W^2$  представляет собой антитело против CD22.

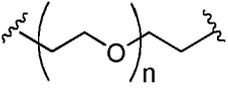
В некоторых вариантах осуществления

$T^1$  выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила и замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила,

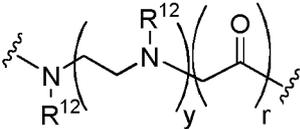
$T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  каждый независимо выбран из  $(\text{ЭДА})_w$ ,  $(\text{ПЭГ})_n$ ,  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила,  $(\text{АК})_p$ ,  $-(\text{CR}^{13}\text{ОН})_h$ , пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, гидразина и сложного эфира, и

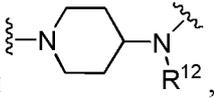
$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  каждый независимо выбран из группы, состоящей из ковалентной связи,  $-\text{CO}-$ ,  $-\text{NR}^{15}-$ ,  $-\text{NR}^{15}(\text{CH}_2)_q-$ ,  $-\text{NR}^{15}(\text{C}_6\text{H}_4)-$ ,  $-\text{CONR}^{15}-$ ,  $-\text{NR}^{15}\text{CO}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{S}(\text{O})-$ ,  $-\text{SO}_2-$ ,  $-\text{SO}_2\text{NR}^{15}-$ ,  $-\text{NR}^{15}\text{SO}_2-$  и  $-\text{P}(\text{O})\text{OH}-$ ,

где:

$(\text{ПЭГ})_n$  представляет собой , где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 30,

ЭДА представляет собой этилендиаминовый фрагмент, имеющий следующую

структуру: , где  $y$  представляет собой целое число от 1 до 6 и  $r$  равен 0 или 1,

пиперидин-4-амино представляет собой ,

каждый  $R^{12}$  и  $R^{15}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, полиэтиленгликолевого фрагмента, арила и замещенного арила, где любые две соседние группы  $R^{12}$  могут быть циклически связаны с образованием пиперазинильного кольца, и  $R^{13}$  выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила.

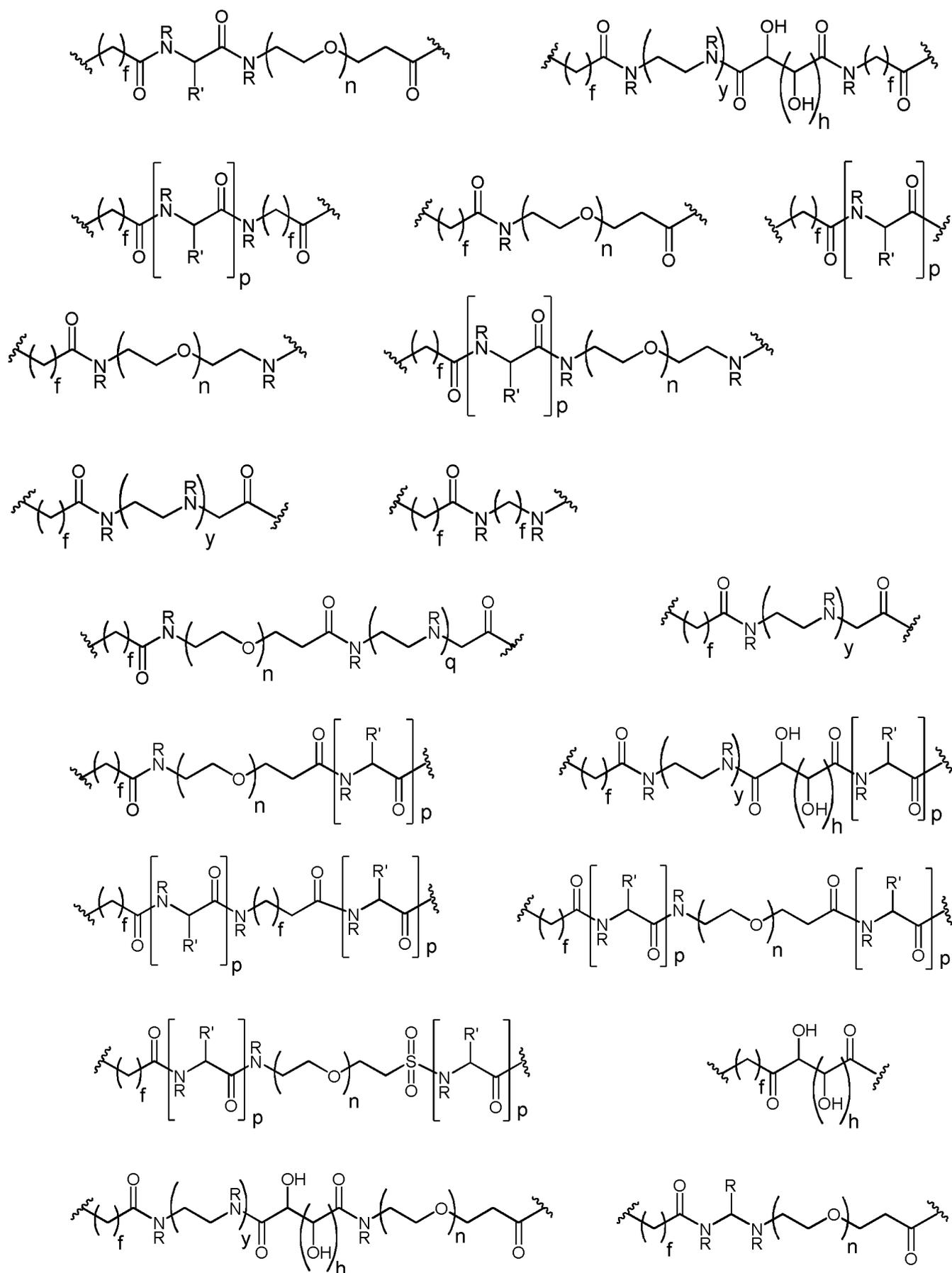
В некоторых вариантах осуществления  $T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  и  $V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  выбраны из следующей таблицы:

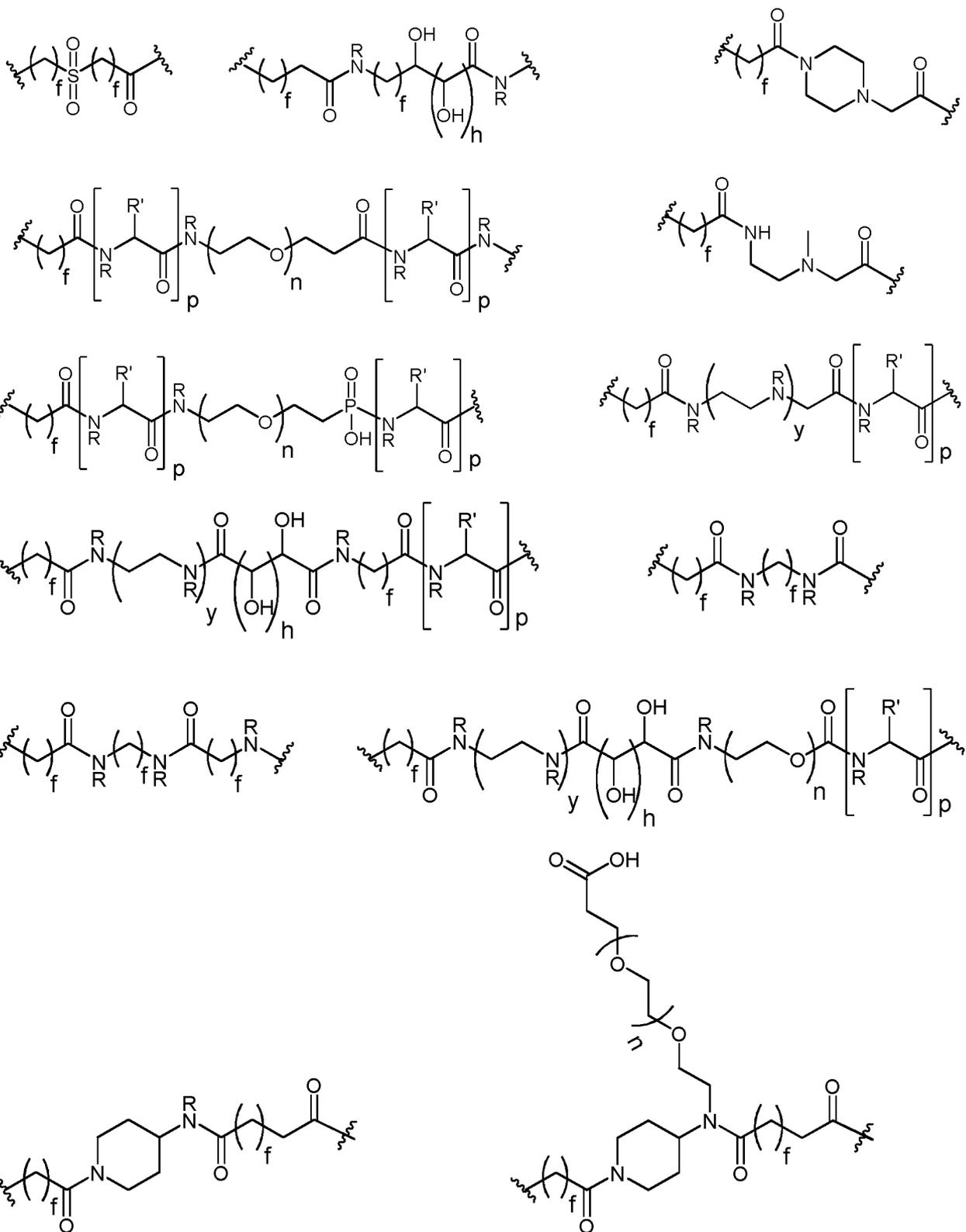
$T^1$	$V^1$	$T^2$	$V^2$	$T^3$	$V^3$	$T^4$	$V^4$
$(C_1-C_{12})$ алкил	- $\text{CONR}^{15}-$	$(\text{ПЭГ})_n$	$-\text{CO}-$	-	-	-	-
$(C_1-C_{12})$ алкил	$-\text{CO}-$	$(\text{АК})_p$	$-\text{NR}^{15}-$	$(\text{ПЭГ})_n$	$-\text{CO}-$	-	-
$(C_1-C_{12})$ алкил	$-\text{CO}-$	$(\text{АК})_p$	-	-	-	-	-
$(C_1-C_{12})$ алкил	- $\text{CONR}^{15}-$	$(\text{ПЭГ})_n$	$-\text{NR}^{15}-$	-	-	-	-
$(C_1-C_{12})$ алкил	$-\text{CO}-$	$(\text{АК})_p$	$-\text{NR}^{15}-$	$(\text{ПЭГ})_n$	$-\text{NR}^{15}-$	-	-

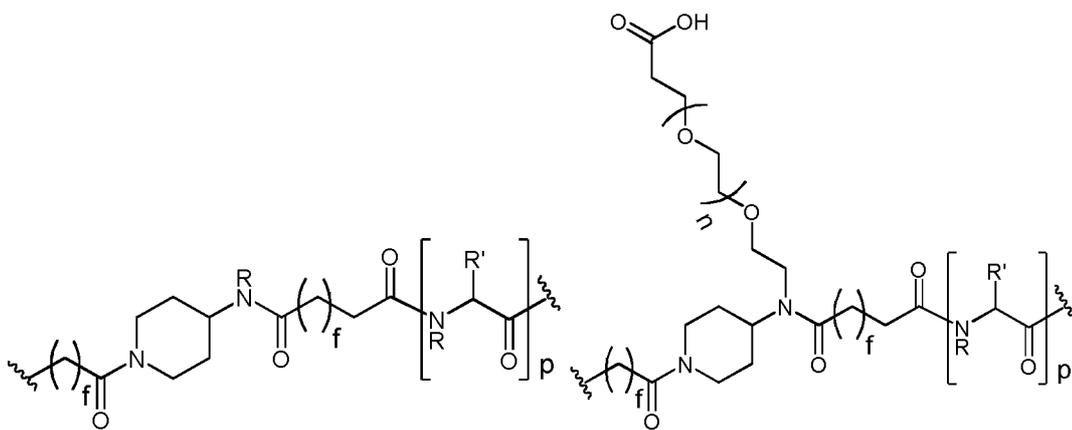
T <sup>1</sup>	V <sup>1</sup>	T <sup>2</sup>	V <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>	V <sup>4</sup>
C <sub>12</sub> )алкил							
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-SO <sub>2</sub> -	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	замещенн ый (C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> -	-SO <sub>2</sub> -	(C <sub>1</sub> -	-CO-	-	-	-	-

T <sup>1</sup>	V <sup>1</sup>	T <sup>2</sup>	V <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>	V <sup>4</sup>
C <sub>12</sub> )алкил		C <sub>12</sub> )алкил					
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	- NR <sup>15</sup> -
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	- P(O)OH -	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	(AK) <sub>p</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- NR <sup>15</sup> -
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	4АП	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	4АП	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-

В некоторых вариантах осуществления L выбран из одной из следующих структур:





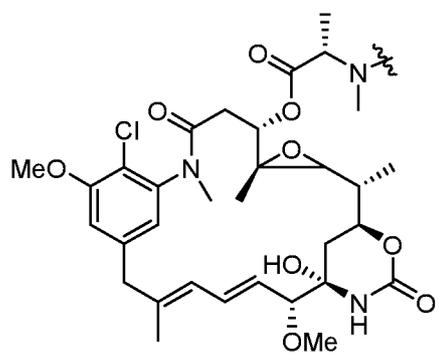


где

каждый  $f$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 12, каждый  $u$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 20, каждый  $p$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 30, каждый  $r$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 20, каждый  $h$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 12, каждый  $R$  независимо представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкокси, замещенный алкокси, амино, замещенный амино, карбоксил, сложного эфир карбоновой кислоты, ацил, ацилокси, ациламино, аминоксил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил, тиоалкокси, замещенный тиоалкокси, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл и замещенный гетероцикл, и

каждый  $R'$  независимо представляет собой H, группу боковой цепи аминокислоты, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкокси, замещенный алкокси, амино, замещенный амино, карбоксил, сложный эфир карбоновой кислоты, ацил, ацилокси, ациламино, аминоксил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил, тиоалкокси, замещенный тиоалкокси, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл и замещенный гетероцикл.

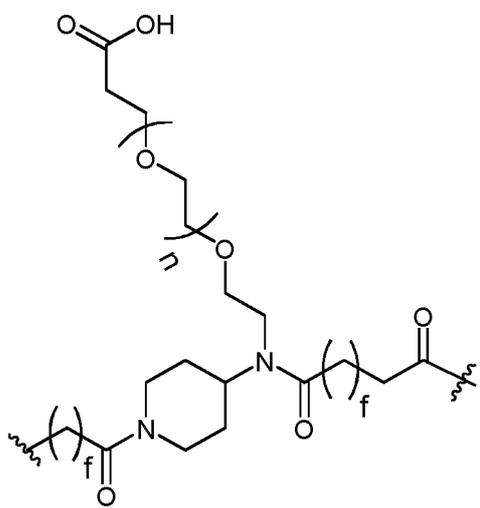
В некоторых вариантах осуществления майтансиноид представлен формулой:



где  $\sim$  обозначает точку присоединения между майтансиноидом и L.

В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^1$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^2$  представляет собой 4АП,  $V^2$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^3$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^3$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^4$  отсутствует и  $V^4$  отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления линкер L содержит следующую структуру:

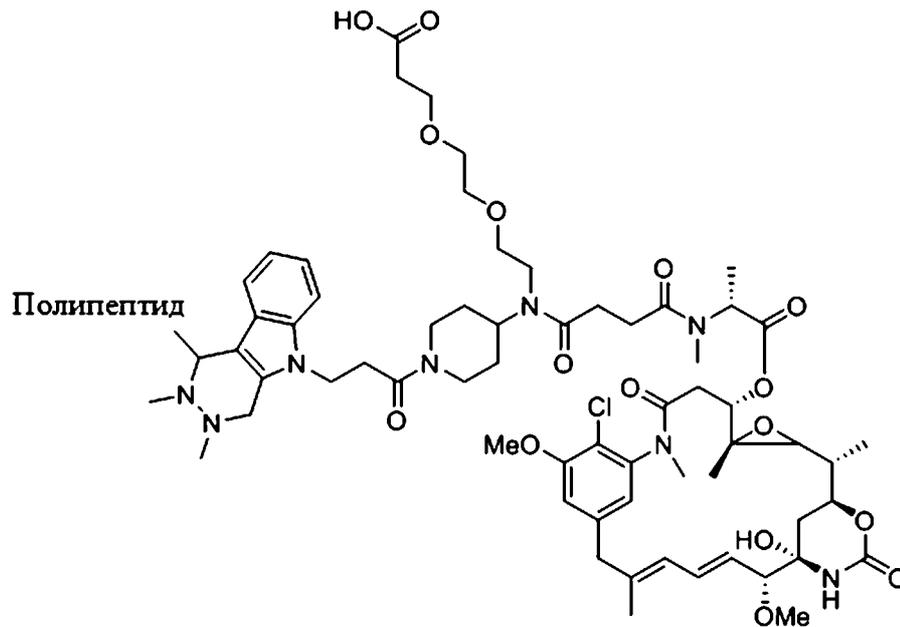


где

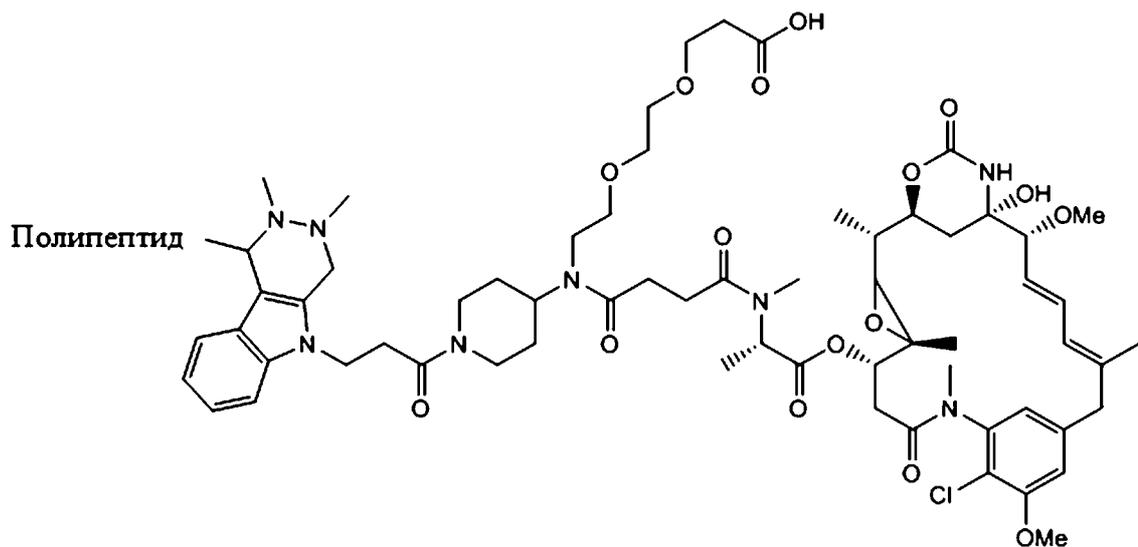
каждый  $f$  независимо представляет собой целое число от 1 до 12, и

$n$  представляет собой целое число от 1 до 30.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат содержит следующую структуру:

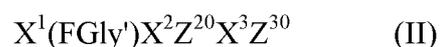


В некоторых вариантах осуществления конъюгат содержит следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления антитело против CD22 связывает эпитоп в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670 аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD22 содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

Z<sup>20</sup> представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,  $X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, если присутствует, может представлять собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), при условии, что если последовательность находится на N-конце конъюгата,  $X^1$  присутствует, и

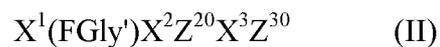
$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо представляет собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту).

В некоторых вариантах осуществления последовательность представляет собой L(FGly')TPSR (SEQ ID NO: 185).

В некоторых вариантах осуществления  $Z^{30}$  выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,  $X^1$  выбран из L, M, S и V, и  $X^2$  и  $X^3$  каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный аминокислотный остаток расположен на C-конце константной области тяжелой цепи антитела против CD22.

В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,  $X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, если присутствует, может представлять собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), при условии, что если последовательность находится на N-конце конъюгата,  $X^1$  присутствует, и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо представляет собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), и

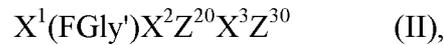
где последовательность является C-концевой по отношению к аминокислотной последовательности SLSLSPG (SEQ ID NO: 186).

В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит последовательность SPGSL(FGly')TPSRGS (SEQ ID NO: 184).

В некоторых вариантах осуществления  $Z^{30}$  выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,  $X^1$  выбран из L, M, S и V, и  $X^2$  и  $X^3$  каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный аминокислотный остаток расположен в константной области легкой цепи антитела против CD22.

В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

$X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, если присутствует, может представлять собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), при условии, что если последовательность находится на N-конце конъюгата,  $X^1$  присутствует, и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо представляет собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), и

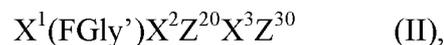
где последовательность является C-концевой по отношению к аминокислотной последовательности KVDNAL (SEQ ID NO: 58) и/или является N-концевой по отношению к аминокислотной последовательности QSGNSQ (SEQ ID NO: 59).

В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи содержит последовательность KVDNAL(FGly')TPSRQSGNSQ (SEQ ID NO: 60).

В некоторых вариантах осуществления  $Z^{30}$  выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,  $X_1$  выбран из L, M, S и V, и  $X^2$  и  $X^3$  каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH1 тяжелой цепи антитела против CD22.

В некоторых вариантах осуществления область CH1 тяжелой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

$X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, если присутствует, может представлять собой любую аминокислоту (например, любую

встречающуюся в природе аминокислоту), при условии, что если последовательность находится на N-конце конъюгата,  $X^1$  присутствует, и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо представляет собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), и

где последовательность является C-концевой по отношению к аминокислотной последовательности SWNSGA (SEQ ID NO: 61) и/или является N-концевой по отношению к аминокислотной последовательности GVHTFP (SEQ ID NO: 62).

В некоторых вариантах осуществления область CH1 тяжелой цепи содержит последовательность SWNSGAL(FGly')TPSRGVHTFP (SEQ ID NO: 63).

В некоторых вариантах осуществления  $Z^{30}$  выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,  $X^1$  выбран из L, M, S и V, и  $X^2$  и  $X^3$  каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH2 тяжелой цепи антитела против CD22.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH3 тяжелой цепи антитела против CD22.

В некоторых вариантах осуществления доза конъюгата антитела с лекарственным средством по настоящему изобретению составляет 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза конъюгата антитела с лекарственным средством составляет 1 мг/кг один раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления доза конъюгата антитела с лекарственным средством по настоящему изобретению составляет 3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза конъюгата антитела с лекарственным средством по настоящему изобретению составляет 3 мг/кг один раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления доза конъюгата антитела с лекарственным средством по настоящему изобретению составляет 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза конъюгата антитела с лекарственным средством по настоящему изобретению составляет 10 мг/кг один раз в неделю.

В некоторых вариантах осуществления один или более противораковых агентов выбран из метотрексата абитрексата, брентуксимаба ведотина, копанлисиба, копанлисиба гидрохлорида, хлорамбуцила, неларабина, аксиабтагена цилолейцела, кармустина, белиносата, бендамустина, бендамустина гидрохлорида, тозитумомаба йод-131, тозитумомаба, блеомицина, бортезомиба, акалабрутиниба, циклофосфамида, цитарабина, липосомного цитарабина, денилейкин дифтитокса, липосомного цитарабина, дексаметазона, доксорубицина, доксорубицина гидрохлорида, метотрексата, пралатрексата, офатумамба, обинутузумаба, окрелизумаба, ибритумомаба, тиуксетана, ибрутиниба, иделалисиба, рекомбинантного интерферона альфа-2b, ромидеспина,

леналидомида, мехлоретамин гидрохлорида, плериксафора, преднизона, ритуксимаба, ритуксимаба и гиалуронидазы человека, бортезомиба, винбластин, винбластин сульфата, винкристина, винкристина сульфата и вориноста.

В некоторых вариантах осуществления один или более противораковых агентов выбраны из ингибитора тирозинкиназы Брутона, конъюгата антитела против CD30 с лекарственным средством, ингибитора PI3K, ДНК-алкилирующего агента, ингибитора синтеза ДНК, ингибитора гистондеацетилазы, моноклонального антитела против CD20, ингибитора протеасомы, ингибитора ДНК-полимеразы, ингибитора РНК-полимеразы, ингибитора интерлейкина-2, кортикостероида, ингибитора топоизомеразы II, ингибитора дигидрофолатредуктазы, конъюгата антитела против CD20 с лекарственным средством, конъюгата антитела против CD20 с радиофармацевтическим средством, ингибитора P110 $\delta$ , ингибитора убиквитин-E3-лигазы, ингибитора рецептора хемокина CXCR4, ингибитора тубулина и агента для терапии адоптивного переноса клеток.

В некоторых вариантах осуществления один или более противораковых агентов выбраны из циклофосфида, доксорубин гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("CHOP"); циклофосфида, винкристина сульфата, прокарбазин гидрохлорида и преднизона ("COPP"); циклофосфида, винкристина сульфата и преднизона ("CVP"); этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфида и доксорубин гидрохлорида ("EPOCH"); циклофосфида, винкристина сульфата, доксорубин гидрохлорида и дексаметазона ("гипер-CVAD"); ифосфида, карбоплатин и этопозида фосфата ("ICE"); ритуксимаба, циклофосфида, доксорубин гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CHOP"); ритуксимаба, циклофосфида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CVP"); ритуксимаба, этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, ритуксимаба, этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфида и доксорубин гидрохлорида ("R-EPOCH"); и ритуксимаба, ифосфида, карбоплатин и этопозида фосфата ("R-ICE").

В некоторых вариантах осуществления один или более противораковых агентов включает ритуксимаб, циклофосфид, доксорубин гидрохлорид, винкрисдин сульфат и преднизон ("R-CHOP").

В некоторых вариантах осуществления рак связан с нарушением регуляции сигналинга BCR. В некоторых вариантах осуществления рак связан с нарушением регуляции сигналинга BCR, и рак реагирует на истощение популяции В-клеток.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой В-клеточную лимфому. В

некоторых вариантах осуществления рак выбран из лимфомы Беркитта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы (НХЛ). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой неходжкинскую лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из лимфомы из клеток маргинальной зоны, мантийноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы и первичной лимфомы центральной нервной системы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой мантийноклеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой фолликулярную лимфому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лимфому из клеток маргинальной зоны. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лейкоз.

В некоторых вариантах осуществления рак выбран из хронического миелопролиферативного синдрома, острого миелогенного лейкоза, хронического лимфолейкоза, мелкоклеточного лимфолейкоза, волосато-клеточного лейкоза и острого лимфобластного лейкоза.

В некоторых вариантах осуществления рак устойчив к лечению одним или более противораковыми агентами, выбранными из метотрексата абитрексата, брентуксимаба ведотина, копанлисиба, копанлисиба гидрохлорида, хлорамбуцила, неларабина, аксиабтагена цилолейцела, кармустина, белинонат, бендамустина, бендамустина гидрохлорида, тозитумомаба йод-131, тозитумомаба, блеомицина, бортезомиба, акалалбрутиниба, циклофосфамида, цитарабина, липосомного цитарабина, денилейкин дифтитокса, липосомного цитарабина, дексаметазона, доксорубицина, доксорубицина гидрохлорида, метотрексата, пралатрексата, офатумамба, обинутузумаба, окрелизумаба, ибритумомаба, тиуксетана, ибрутиниба, иделалисиба, рекомбинантного интерферона альфа-2b, ромидеспина, леналидомида, мехлоретамин гидрохлорида, плериксафора, преднизона, ритуксимаба, ритуксимаба и гиалуронидазы человека, бортезомиба, винбластин, винбластин сульфата, винкристин, винкристин сульфата и вориностата.

В некоторых вариантах осуществления рак устойчив к лечению одним или более противораковыми агентами, выбранными из: циклофосфамида, доксорубицин гидрохлорида, винкристин сульфата и преднизона ("CHOP"); циклофосфамида, винкристин сульфата, прокарбазин гидрохлорида и преднизона ("COPP"); циклофосфамида, винкристин сульфата и преднизона ("CVP"); этопозида фосфата, преднизона, винкристин сульфата, циклофосфамида и доксорубицин гидрохлорида ("EPOCH"); циклофосфамида, винкристин сульфата, доксорубицин гидрохлорида и дексаметазона ("гипер-CVAD"); ифосфамида, карбоплатина и этопозида фосфата ("ICE");

ритуксимаба, циклофосфамида, доксорубицина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CHOP"); ритуксимаба, циклофосфамида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CVP"); ритуксимаба, этопозид фосфата, преднизона, винкристина сульфата, ритуксимаба, этопозид фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфамида и доксорубицина гидрохлорида ("R-EPOCH"); и ритуксимаба, ифосфамида, карбоплатина и этопозид фосфата ("R-ICE").

В некоторых вариантах осуществления рак устойчив к лечению ритуксимабом, циклофосфамидом, доксорубицина гидрохлоридом, винкристина сульфатом и преднизолом ("R-CHOP").

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1, панель А, показана последовательность распознавания формилглицин-образующего фермента (FGE), вставленная в желаемое место вдоль остова антитела с применением стандартного молекулярно-биологического способа. После экспрессии, FGE, который является эндогенным для эукариотических клеток, катализирует превращение Cys в пределах консенсусной последовательности в остаток формилглицина (FGly). На фиг. 1, панель В, показаны антитела, несущие альдегидные фрагменты (по 2 на антитело), реагирующие с линкером гидразино-изо-Пикте-Шпенглера (Hydrazino-iso-Pictet-Spengler, HIPS) и нагрузкой с образованием сайт-специфически конъюгированного конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC). На фиг. 1, панель С, показан химический путь HIPS через промежуточный ион гидразиния, с последующим внутримолекулярным алкилированием нуклеофильным индолом с образованием стабильной связи С-С.

На фиг. 2 показана кривая хроматографии гидрофобного взаимодействия с колонкой (HIC) альдегид-меченного антитела против CD22, конъюгированного на С-конце (СТ) с нагрузкой майтансином, присоединенной к линкеру HIPS-4АП, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 3 показана кривая HIC альдегид-меченного антитела против CD22, конъюгированного на С-конце (СТ) с нагрузкой майтансином, присоединенной к линкеру HIPS-4АП, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 4 показана кривая обращенно-фазовой хроматографии (PLRP) альдегид-меченного антитела против CD22, конъюгированного на С-конце (СТ) с нагрузкой майтансином, присоединенной к линкеру HIPS-4АП, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 5 показан график аналитического анализа гель-фильтрационной хроматографии (SEC) альдегид-меченного антитела против CD22, конъюгированного на С-конце (СТ) с нагрузкой майтансином, присоединенной к линкеру HIPS-4АП, в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 6А показан график, показывающий эффективность *in vitro* в отношении клеток WSU-DLCL2 (% жизнеспособности в зависимости от Log концентрации конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC) (нМ)) для ADC против CD22, конъюгированных на С-конце (СТ) с нагрузкой майтансином, присоединенной к линкеру HIPS-4АП в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. На фиг. 6В показан график эффективности *in vitro* в отношении клеток Ramos (% жизнеспособности в зависимости от Log концентрации конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC) (нМ)) для ADC против CD22, конъюгированных на С-конце (СТ) с нагрузкой майтансином, присоединенной к линкеру HIPS-4АП в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 7 показан график, показывающий эффективность *in vivo* в отношении модели ксенотрансплантата WSU-DLCL2 (средний объем опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от дней) для ADC против CD22, конъюгированных на С-конце (СТ) с нагрузкой майтансином, присоединенной к линкеру HIPS-4АП в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 8А-8С представлены аминокислотные последовательности изоформ CD22, то есть изоформы 2 (SEQ ID NO: 1), изоформы 4 (SEQ ID NO: 2), изоформы 1 (SEQ ID NO: 3) и изоформы 3 (SEQ ID NO: 4).

На фиг. 9А показана карта сайтов, показывающая возможные сайты модификации для образования альдегид-меченного полипептида Ig. Верхняя последовательность представляет собой аминокислотную последовательность консервативной области легкой цепи полипептида IgG1 (SEQ ID NO: 5) и показывает возможные сайты модификации в легкой цепи Ig, нижняя последовательность представляет собой аминокислотную последовательность консервативной области тяжелой цепи полипептида Ig (SEQ ID NO: 6), (номер доступа в GenBank AAG00909) и показывает возможные сайты модификации в тяжелой цепи Ig. Нумерация тяжелых и легких цепей основана на полноразмерных тяжелых и легких цепях.

На фиг. 9В показано выравнивание последовательностей константных областей тяжелой цепи иммуноглобулина для IgG1 (SEQ ID NO: 7), IgG2 (SEQ ID NO: 8), IgG3 (SEQ ID NO: 9), IgG4 (SEQ ID NO: 10) и IgA (SEQ ID NO: 11), показывающее сайты модификации, в которых альдегидные метки могут быть встроены в тяжелую цепь

иммуноглобулина. Нумерация тяжелых и легких цепей основана на полноразмерных тяжелых и легких цепях.

На фиг. 9С показано выравнивание последовательностей константных областей легкой цепи иммуноглобулина, то есть *homo sapiens* каппа (SEQ ID NO: 12), номер доступа в GenBank CAA75031.1, *homo sapiens* каппа (SEQ ID NO: 13), номер доступа в GenBank BAC0168.1, *homo sapiens* лямбда (SEQ ID NO: 14), номер доступа в GenBank CAA75033, *Mus musculus* (SEQ ID NO: 15), номер доступа в GenBank AAB09710.1, *Rattus norvegicus* (SEQ ID NO: 16), номер доступа в GenBank AAD10133, показывающее сайты модификации, в которых альдегидные метки могут быть встроены в легкую цепь иммуноглобулина.

На фиг. 10 показаны изображения форматов ИФА для обнаружения различных анализов в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 11 представлен ADC против CD22 в соответствии с настоящим изобретением, высокомономерный, со средним значением DAR 1,8 и включающий один вид легкой и тяжелой цепи. ADC против CD22 анализировали с помощью (фиг. 11, панель А) гель-фильтрационной хроматографии для оценки процента мономеров (99,2 %), и хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC, фиг. 11, панель В) и обращенно-фазовой хроматографии (PLRP) (фиг. 11, панель С) для оценки отношения лекарственного средства к антителу (DAR), которое составляло 1,8.

На фиг. 12 представлен ADC против CD22 в соответствии с настоящим изобретением, который связывается с белком CD22 человека, а также с антителом против CD22 дикого типа. Для сравнения связывания ADC против CD22 с антителом против CD22 дикого типа (WT) применяли конкурентный анализ ИФА. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD) ( $n = 4$ ).

На фиг. 13 представлен ADC против CD22 в соответствии с настоящим изобретением, который опосредует интернализацию CD22 аналогично антителу против CD22 дикого типа. Клеточные линии HXL, Ramos, Granta-519 и WSU-DLCL2 применяли для сравнения интернализации CD22 клеточной поверхности, опосредованной связыванием либо с WT против CD22, либо с CAT-02-106.

На фиг. 14 представлен ADC против CD22 в соответствии с настоящим изобретением в равной степени сильный в отношении родительских и MDR1-экспрессирующих опухолевых клеток HXL *in vitro*. Ramos и WSU-DLCL2 родительские (WT) клетки (фиг. 14, панель А и панель С) и варианты тех линий, которые были сконструированы для экспрессии MDR1 (MDR1+, фиг. 14, панель В и панель D), применяли в качестве мишеней для исследования цитотоксичности *in vitro* активности

ADC против CD22. Свободный майтансин и  $\alpha$ CD22 ADC, полученные с антителом CAT-02, но конъюгированные с майтансином с применением расщепляемого линкера валинцитруллин, применяли в качестве контролей. В дополнительном контрольном эксперименте ингибитор MDR1, циклоспорин, добавляли к клеткам WT или MDR1+WSU-DLCL2 (фиг. 14, панель E и панель F). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 2$ ).

На фиг. 15 представлен ADC против CD22 в соответствии с настоящим изобретением, который не опосредует нецелевую цитотоксичность. Клеточную линию опухоли желудка NCI-N87 инкубировали *in vitro* в течение 5 дней в присутствии возрастающих концентраций ADC против CD22. Затем жизнеспособность клеток оценивали с применением способа на основе МТТ. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 2$ ).

На фиг. 16 представлен ADC-связанный ADC против CD22, против HER2, конъюгированный с нагрузкой линкер HIPS-4АП-майтансин, который не индуцирует неспецифический цитолиз. Исследования цитотоксичности *in vitro* проводили с применением клеток HER2+NCI-N87, клеток HER2-Ramos или совместного культивирования обеих линий клеток в качестве мишеней. Свободный майтансин (2 нМ) и антитело против HER2, конъюгированное с MMAE через расщепляемый линкер валинцитруллин (вц, вс) (нагрузка 2 нМ), применяли в качестве положительного контроля для неспецифического цитолиза. ADC против HER2 дозировали при нагрузке 2 нМ. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение ( $n = 2$ ).

На фиг. 17 представлен ADC против CD22 в соответствии с настоящим изобретением, который *in vivo* эффективен в отношении, полученных из НХЛ моделей ксенотрансплантатов WSU-DLCL2 и Ramos. Самок мышей CB17 ICR SCID (8 на группу), несущих ксенотрансплантаты WSU-DLCL2, обрабатывали только носителем или ADC против CD22, либо (фиг. 17, панель A) в виде однократной дозы 10 мг/кг либо (фиг. 17, панель B) в виде многократных доз 10 мг/кг, вводимых каждые четыре дня, в общем количестве четыре дозы ( $q4d \times 4$ ). Лечение начинали, когда средний размер опухолей достигал 118 или 262 мм<sup>3</sup> для исследований однократной дозы или многократных доз соответственно (фиг. 17, панель C). Самок мышей CB17 ICR SCID (12 на группу), несущих ксенотрансплантаты Ramos, обрабатывали только носителем или 5 или 10 мг/кг CAT-02-106  $q4d \times 4$ . Введение доз начинали, когда опухоли достигали среднего размера 246 мм<sup>3</sup>. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего значения (S.E.M.).

На фиг. 18 представлены клетки Ramos и WSU-DLCL2, которые экспрессируют разные уровни CD22 на клеточной поверхности. Клетки Ramos и WSU-DLCL2 инкубировали с меченым флуоресцеином антителом против CD22 и затем анализировали с помощью проточной цитометрии. Средняя интенсивность флуоресценции канала FL1 (обнаружение флуоресцеина) для каждого типа клеток показана на графике.

На фиг. 19 показано, что обработка ADC против CD22 в соответствии с настоящим изобретением не оказывает влияния на массу тела мыши. Показана средняя масса тела мышей в исследованиях эффективности ксенотрансплантата. Исследование WSU-DLCL2 с однократной дозой (фиг. 19, панель A), исследование WSU-DLCL2 с многократными дозами (фиг. 19, панель B), исследование линии Ramos (фиг. 19, панель C). Величина ошибок показывает стандартное отклонение.

На фиг. 20 показано, что ADC против CD22 в соответствии с настоящим изобретением можно вводить крысам в дозе до 60 мг/кг с минимальным влиянием. Крысы линии Спрег-Джули (5 на группу) получали дозу CAT-02-106 6, 20, 40 или 60 мг/кг с последующим 12-дневным периодом наблюдения. Массу тела контролировали в указанные моменты времени (фиг. 20, панель A). Количество аланинаминотрансферазы (ALT) (фиг. 20, панель B) и тромбоцитов (фиг. 20, панель C) оценивали через 5 и 12 дней после введения дозы. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

На фиг. 21 представлен ADC против CD22 по настоящему изобретению, специфически связанный с В-клетками макак-крабоедов. Лимфоциты периферической крови макак-крабоедов были ограничены в соответствии с их профилями прямого и бокового рассеяния (вверху слева). Клетки инкубировали либо с стрептавидином (СА), конъюгированным с флуоресцеин-изотиоцианатом (ФИТЦ) отдельно (вверху справа), либо с биотинилированным ADC против CD22, а затем с ФИТЦ СА. Совместная инкубация с антителами, распознающими Т-клетки (CD3, внизу слева) или В-клетки (CD20, внизу справа), продемонстрировала специфичность связывания CAT-02-106 с популяцией В-клеток.

На фиг. 22 показано, что ADC против CD22 в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует специфическую для В-клеток реактивность в тканях человека и макак-крабоедов. ADC против CD22 связывается с областями селезенки, богатыми В-клетками (вверху). Ткани сердца были отрицательными для окрашивания (посередине). Срезы легких были отрицательными, за исключением рассеянных лейкоцитов (внизу).

На фиг. 23 показано, что повторное введение дозы 60 мг/кг ADC против CD22 в соответствии с настоящим изобретением, макакам-крабоедам не оказывает побочных эффектов. Макакам-крабоедам (2 на пол на группу) вводили 10, 30 или 60 мг/кг ADC против CD22 один раз в три недели, в общем количестве две дозы с последующим 21-дневным периодом наблюдения. Аспартаттрансаминаза (AST) (фиг. 23, панель А), аланинаминотрансфераза (ALT) (фиг. 23, панель В), тромбоциты (фиг. 23, панель С) и моноциты (фиг. 23, панель D) контролировали в указанные моменты времени. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

На фиг. 24 (панель А и панель В) показано, что обработка ADC против CD22 в соответствии с настоящим изобретением снижает популяцию периферических В-клеток у макак-крабоедов. Мононуклеарные клетки периферической крови макак-крабоедов, включенных в исследование токсичности, контролировали с помощью проточной цитометрии для определения соотношения В-клеток (CD20+), Т-клеток (CD3+) и NK-клеток (CD20-/CD3-), наблюдаемых у животных перед введением дозы и на 7, 14, 28 и 35 дни. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

На фиг. 25 показано, что ADC против CD22 в соответствии с настоящим изобретением демонстрирует очень высокую стабильность *in vivo*, по данным фармакокинетического исследования на крысах. Крысам линии Спрег-Дули (3 на группу) вводили однократную внутривенную болюсную дозу 3 мг/кг ADC против CD22. Образцы плазмы собирали в определенное дизайном исследования время и анализировали (как показано на фиг. 10) общую концентрацию антител, конъюгата и ADC.

На фиг. 26 представлена таблица 3: сводные показатели средних ( $\pm$ стандартное отклонение) фармакокинетических и токсикокинетических (ТК) параметров общих значений ADC у животных, которым вводили ADC против CD22 в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 27 представлен график, изображающий регрессию опухоли в модели ксенотрансплантата Granta-519. На графике сравниваются режимы дозирования ADC против CD22 по настоящему изобретению и сравнивается лечение ADC против CD22 с лечением ритуксимабом.

На фиг. 28 представлен график, изображающий регрессию опухоли в модели ксенотрансплантата Granta-519. На графике сравниваются способы лечения ритуксимабом, ADC против CD22 по настоящему изобретению, R-СНОР и лечение R-СНОР с последующим лечением ADC против CD22.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам лечения рака, например, резистентного рака с применением конъюгата антитела против CD22 с майтансином, например, в комбинации с одним или более противораковыми агентами. Варианты осуществления каждого объекта описаны более подробно ниже.

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Следующие термины имеют указанные далее значения, если не указано иное. Любые неопределенные термины имеют определение, принятое в данной области техники.

Термин "алкил" относится к одновалентным насыщенным алифатическим углеводородным группам, имеющим от 1 до 10 атомов углерода и, например, от 1 до 6 атомов углерода, или от 1 до 5, или от 1 до 4, или от 1 до 3 атомов углерода. Этот термин включает, в качестве примера, линейные и разветвленные гидрокарбильные группы, такие как метил ( $\text{CH}_3-$ ), этил ( $\text{CH}_3\text{CH}_2-$ ), н-пропил ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), изопропил ( $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$ ), н-бутил ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), изобутил ( $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2-$ ), втор-бутил ( $(\text{CH}_3)(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{CH}-$ ), трет-бутил ( $(\text{CH}_3)_3\text{C}-$ ), н-пентил ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ) и неопентил ( $(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2-$ ).

Термин "замещенный алкил" относится к алкильной группе, как определено в настоящем описании, где один или более атомов углерода в алкильной цепи (кроме атома углерода  $\text{C}_1$ ) необязательно замещены гетероатомом, таким как -O-, -N-, -S-,  $-\text{S}(\text{O})_n-$  (где n равен от 0 до 2), -NR- (где R представляет собой водород или алкил) и имеют от 1 до 5 заместителей, выбранных из группы, состоящей из алкокси, замещенного алкокси, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, ацила, ациламино, ацилокси, амина, аминаоцила, аминаоцилокси, оксиаминоацила, азидо, циано, галогена, гидроксила, оксо, тиокето, карбоксила, карбоксиалкила, тиоарилокси, тиогетероарилокси, тиогетероциклоокси, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, арилокси, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, гидроксимино, алкоксимино, нитро, -SO-алкила, -SO-арила, -SO-гетероарила, -SO<sub>2</sub>-алкила, -SO<sub>2</sub>-арила, SO<sub>2</sub>-гетероарила и -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, где R<sup>a</sup> и R<sup>b</sup> могут быть одинаковыми или различными и выбраны из водорода, необязательно замещенного алкила, циклоалкила, алкенила, циклоалкенила, алкинила, арила, гетероарила и гетероциклического соединения.

Термин "алкилен" относится к двухвалентным алифатическим углеводородным группам, предпочтительно имеющим от 1 до 6 и более предпочтительно от 1 до 3 атомов углерода, которые имеют прямую или разветвленную цепь и которые необязательно прерываются одной или более группами, выбранными из -O-, -NR<sup>10</sup>-, -NR<sup>10</sup>C(O)-, -C(O)NR<sup>10</sup> и тому подобных. Данный термин включает, например, метилен ( $-\text{CH}_2-$ ), этилен

(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), н-пропилен (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), изопретилен (-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-), (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-), (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-), (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-) и тому подобное.

Термин "замещенный алкилен" относится к алкиленовой группе, имеющей от 1 до 3 атомов водорода, замещенных заместителями, как описано для атомов углерода в определении "замещенный" ниже.

Термин "алкан" относится к алкильной группе и алкиленовой группе, как определено в настоящем описании.

Термины "алкиламиноалкил", "алкиламиноалкенил" и "алкиламиноалкинил" относятся к группам R'NHR", где R' представляет собой алкильную группу, как определено в настоящем описании, и R" представляет собой алкиленовую, алкениленовую или алкиниленовую группу, как определено в настоящем описании.

Термин "алкарил" или "аралкил" относится к группам алкилен-арил и замещенный алкилен-арил, где алкилен, замещенный алкилен и арил являются такими, как определено в настоящем описании.

Термин "алкокси" относится к группе -О-алкил, где алкил является таким, как определено в настоящем описании. Алкокси включает, например, метокси, этокси, н-пропокси, изопророкси, н-бутокси, трет-бутокси, втор-бутокси, н-пентокси и тому подобное. Термин "алкокси" также относится к группам алкенил-О-, циклоалкил-О-, циклоалкенил-О- и алкинил-О-, где алкенил, циклоалкил, циклоалкенил и алкинил являются такими, как определено в настоящем описании.

Термин "замещенный алкокси" относится к группам замещенный алкил-О-, замещенный алкенил-О-, замещенный циклоалкил-О-, замещенный циклоалкенил-О- и замещенный алкинил-О-, где замещенный алкил, замещенный алкенил, замещенный циклоалкил, замещенный циклоалкенил и замещенный алкинил являются такими, как определено в настоящем описании.

Термин "алкоксиамино" относится к группе -NH-алкокси, где алкокси является таким, как определено в настоящем описании.

Термин "галогеналкокси" относится к группам алкил-О-, где один или более атомов водорода в алкильной группе замещены галогеновой группой и включают в качестве примеров такие группы, как трифторметокси и тому подобное.

Термин "галогеналкил" относится к замещенной алкильной группе, как описано выше, где один или более атомов водорода в алкильной группе замещены галогеновой группой. Примеры таких групп включают, без ограничения, фторалкильные группы, такие как трифторметил, дифторметил, трифторэтил и тому подобное.

Термин "алкилалкокси" относится к группам -алкилен-О-алкил, алкилен-О-замещенный алкил, замещенный алкилен-О-алкил и замещенный алкилен-О-замещенный алкил, где алкил, замещенный алкил, алкилен и замещенный алкилен являются такими, как определено в настоящем описании.

Термин "алкилтиоалкокси" относится к группе -алкилен-S-алкил, алкилен-S-замещенный алкил, замещенный алкилен-S-алкил и замещенный алкилен-S-замещенный алкил, где алкил, замещенный алкил, алкилен и замещенный алкилен являются такими, как определено в настоящем описании.

Термин "алкенил" относится к углеводородным группам с прямой или разветвленной цепью, имеющим от 2 до 6 атомов углерода и предпочтительно от 2 до 4 атомов углерода и имеющим по меньшей мере 1 и предпочтительно от 1 до 2 центров ненасыщенной двойной связи. Этот термин включает, например, бивинил, аллил и бут-3-ен-1-ил. В этот термин включены цис- и транс-изомеры или смеси этих изомеров.

Термин "замещенный алкенил" относится к алкенильной группе, как определено в настоящем описании, имеющей от 1 до 5 заместителей или от 1 до 3 заместителей, выбранных из алкокси, замещенного алкокси, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, ацила, ациламино, ацилокси, амино, замещенного амино, аминацила, аминацилокси, оксиаминоацила, азидо, циано, галогена, гидроксила, оксо, тиокето, карбоксила, карбоксилалкила, тиоарилокси, тиогетероарилокси, тиогетероциклоокси, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, арилокси, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, гидроксимино, алкоксиамино, нитро, -SO-алкила, -SO-замещенного алкила, SO-арила, -SO-гетероарила, -SO<sub>2</sub>-алкила, -SO<sub>2</sub>-замещенного алкила, -SO<sub>2</sub>-арила и -SO<sub>2</sub>-гетероарила.

"Алкинил" относится к неразветвленным или разветвленным одновалентным гидрокарбильным группам, имеющим от 2 до 6 атомов углерода и предпочтительно от 2 до 3 атомов углерода и имеющим по меньшей мере 1 и предпочтительно от 1 до 2 центров ненасыщенной тройной связи. Примеры таких алкинильных групп включают ацетиленил (-C≡CH) и пропаргил (-CH<sub>2</sub>C≡CH).

Термин "замещенный алкинил" относится к алкинильной группе, как определено в настоящем описании, имеющей от 1 до 5 заместителей или от 1 до 3 заместителей, выбранных из алкокси, замещенного алкокси, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, ацила, ациламино, ацилокси, амино, замещенного амино, аминацила, аминацилокси, оксиаминоацила, азидо, циано, галогена, гидроксила, оксо, тиокето, карбоксила, карбоксилалкила, тиоарилокси, тиогетероарилокси, тиогетероциклоокси, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси,

арила, арилокси, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, гидроксамино, алкоксиамино, нитро, -SO-алкила, -SO-замещенного алкила, SO-арила, -SO-гетероарила, -SO<sub>2</sub>-алкила, -SO<sub>2</sub>-замещенного алкила, -SO<sub>2</sub>-арила и -SO<sub>2</sub>-гетероарила.

"Алкинилокси" относится к группе -O-алкинила, где алкинил является таким, как определено в настоящем описании. Алкинилокси включает, например, этинилокси, пропинолокси и тому подобное.

"Ацил" относится к группам H-C(O)-, алкил-C(O)-, замещенный алкил-C(O)-, алкенил-C(O)-, замещенный алкенил-C(O)-, алкинил-C(O)-, замещенный алкинил-C(O)-, циклоалкил-C(O)-, замещенный циклоалкил-C(O)-, циклоалкенил-C(O)-, замещенный циклоалкенил-C(O)-, арил-C(O)-, замещенный арил C(O)-, гетероарил-C(O)-, замещенный гетероарил-C(O)-, гетероциклил-C(O)- и замещенный гетероциклил-C(O)-, где алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическое соединение и замещенное гетероциклическое соединение являются такими, как определено в настоящем документе. Например, ацил включает "ацетильную" группу CH<sub>3</sub>C(O)-.

"Ациламино" относится к группам -NR<sup>20</sup>C(O)алкил, -NR<sup>20</sup>C(O)замещенный алкил, -NR<sup>20</sup>C(O)циклоалкил, -NR<sup>20</sup>C(O)замещенный циклоалкил, -NR<sup>20</sup>C(O)циклоалкенил, -NR<sup>20</sup>C(O)замещенный циклоалкенил, -NR<sup>20</sup>C(O)алкенил, -NR<sup>20</sup>C(O)замещенный алкенил, -NR<sup>20</sup>C(O)алкинил, -NR<sup>20</sup>C(O)замещенный алкинил, -NR<sup>20</sup>C(O)арил, -NR<sup>20</sup>C(O)замещенный арил, -NR<sup>20</sup>C(O)гетероарил, -NR<sup>20</sup>C(O)замещенный гетероарил, -NR<sup>20</sup>C(O)гетероциклическое соединение и -NR<sup>20</sup>C(O)замещенное гетероциклическое соединение, где R<sup>20</sup> представляет собой водород или алкил, и где алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическое соединение и замещенное гетероциклическое соединение являются такими, как определено в настоящем документе.

"Аминокарбонил" или термин "аминоацил" относится к группе -C(O)NR<sup>21</sup>R<sup>22</sup>, где R<sup>21</sup> и R<sup>22</sup> независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, гетероарила, замещенного гетероарила, гетероциклического соединения и замещенного гетероциклического соединения, и где R<sup>21</sup> и R<sup>22</sup> необязательно соединены вместе с атомом азота, связанным с ними, с образованием гетероциклической или замещенной гетероциклической группы, и где алкил, замещенный алкил, алкенил,

замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическое соединение и замещенное гетероциклическое соединение являются такими, как определено в настоящем документе.

"Аминокарбониламино" относится к группе  $-NR^{21}C(O)NR^{22}R^{23}$ , где  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  и  $R^{23}$  независимо выбраны из водорода, алкила, арила или циклоалкила, или где две группы R соединены с образованием гетероциклической группы.

Термин "алкоксикарбониламино" относится к группе  $-NRC(O)OR$ , где каждый R независимо представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил или гетероциклический, где алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил и гетероциклический являются такими, как определено в настоящем описании.

Термин "ацилокси" относится к группам алкил- $C(O)O-$ , замещенный алкил- $C(O)O-$ , циклоалкил- $C(O)O-$ , замещенный циклоалкил- $C(O)O-$ , арил- $C(O)O-$ , гетероарил- $C(O)O-$  и гетероциклический- $C(O)O-$ , где алкил, замещенный алкил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, арил, гетероарил и гетероциклический являются такими, как определено в настоящем документе.

"Аминосульфонил" относится к группе  $-SO_2NR^{21}R^{22}$ , где  $R^{21}$  и  $R^{22}$  независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, гетероарила, замещенного гетероарила, гетероциклического соединения, замещенного гетероциклического соединения и где  $R^{21}$  и  $R^{22}$  необязательно соединены вместе с атомом азота, связанным с ними, с образованием гетероциклической или замещенной гетероциклической группы, и алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическое соединение и замещенное гетероциклическое соединение являются такими, как определено в настоящем документе.

"Сульфониламино" относится к группе  $-NR^{21}SO_2R^{22}$ , где  $R^{21}$  и  $R^{22}$  независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, гетероарила, замещенного гетероарила, гетероциклического соединения и замещенного гетероциклического соединения, и где  $R^{21}$  и  $R^{22}$  необязательно связаны вместе с атомами, связанными с ними, с образованием гетероциклической или замещенной

гетероциклической группы, и где алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическое соединение и замещенное гетероциклическое соединение являются такими, как определено в настоящем документе.

"Арил" или "Ar" относится к одновалентной ароматической карбоциклической группе, содержащей от 6 до 18 атомов углерода, имеющей одно кольцо (такое, как в фенильной группе), или кольцевую систему, имеющую множество конденсированных колец (примеры таких ароматических кольцевых систем включают нафтил, антрил и инданил), причем конденсированные кольца могут быть или не быть ароматическими при условии, что точка присоединения осуществляется через атом ароматического кольца. Этот термин включает, например, фенил и нафтил. Если иное не ограничено определением для арильного заместителя, такие арильные группы могут быть необязательно замещены от 1 до 5 заместителями или от 1 до 3 заместителями, выбранными из ацилокси, гидроксид, тиола, ацила, алкила, алкокси, алкенила, алкинила, циклоалкила, циклоалкенила, замещенного алкила, замещенного алкокси, замещенного алкенила, замещенного алкинила, замещенного циклоалкила, замещенного циклоалкенила, амина, замещенного амина, аминоксила, ациламина, алкарила, арила, арилокси, азидо, карбоксила, карбоксилалкила, циано, галогена, нитро, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, аминоксила, оксиамино, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, тиоарилокси, тиогетероарилокси, -SO-алкила, -SO-замещенного алкила, -SO-арила, -SO-гетероарила, -SO<sub>2</sub>-алкила, -SO<sub>2</sub>-замещенного алкила, -SO<sub>2</sub>-арила, -SO<sub>2</sub>-гетероарила и тригалогенметила.

"Арилокси" относится к группе -O-арил, где арил является таким, как определено в настоящем документе, включая, например, фенокси, нафтокси и тому подобное, включая необязательно замещенные арильные группы, которые также являются такими, как определено в настоящем описании.

"Амино" относится к группе -NH<sub>2</sub>.

Термин "замещенный амино" относится к группе -NRR, где каждый R независимо выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, алкенила, замещенного алкенила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, гетероарила и гетероциклила при условии, что по меньшей мере один R не является водородом.

Термин "азидо" относится к группе -N<sub>3</sub>.

"Карбоксил", "карбокси" или "карбоксилат" относится к -CO<sub>2</sub>H или его солям.

"Сложный эфир карбоновой кислоты" или "сложный карбоксиэфир" или термины "карбоксиалкил" или "карбоксилалкил" относятся к группам -C(O)O-алкил, -C(O)O-замещенный алкил, -C(O)O- алкенил, -C(O)O-замещенный алкенил, -C(O)O-алкинил, -C(O)O-замещенный алкинил, -C(O)O-арил, -C(O)O-замещенный арил, -C(O)O-циклоалкил, -C(O)O-замещенный циклоалкил, -C(O)O-циклоалкенил, -C(O)O-замещенный циклоалкенил, -C(O)O-гетероарил, -C(O)O-замещенный гетероарил, -C(O)O-гетероциклическое соединение и -C(O)O-замещенное гетероциклическое соединение, где алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическое соединение и замещенное гетероциклическое соединение являются такими, как определено в настоящем документе.

"(Сложный эфир карбоновой кислоты)окси" или "карбонат" относится к группам – O-C(O)O-алкил, -O-C(O)O-замещенный алкил, -O-C(O)O-алкенил, -O-C(O)O-замещенный алкенил, -O-C(O)O-алкинил, -O-C(O)O-замещенный алкинил, -O-C(O)O-арил, -O-C(O)O-замещенный арил, -O-C(O)O-циклоалкил, -O-C(O)O-замещенный циклоалкил, -O-C(O)O-циклоалкенил, -O-C(O)O-замещенный циклоалкенил, O-C(O)O-гетероарил, -O-C(O)O-замещенный гетероарил, -O-C(O)O-гетероциклическое соединение и -O-C(O)O-замещенное гетероциклическое соединение, где алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическое соединение и замещенное гетероциклическое соединение являются такими, как определено в настоящем описании.

"Циано" или "нитрил" относится к группе -CN.

"Циклоалкил" относится к циклическим алкильным группам, имеющим от 3 до 10 атомов углерода, имеющим одно или множество циклических колец, включая конденсированные, мостиковые и спирокольцевые системы. Примеры подходящих циклоалкильных групп включают, например, адамантил, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклооктил и тому подобное. Такие циклоалкильные группы включают, в качестве примера, структуры с одним кольцом, такие как циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклооктил и тому подобное, или структуры с множеством колец, такие как адамантан и тому подобное.

Термин "замещенный циклоалкил" относится к циклоалкильным группам, имеющим от 1 до 5 заместителей или от 1 до 3 заместителей, выбранных из алкила, замещенного алкила, алкокси, замещенного алкокси, циклоалкила, замещенного

циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, ацила, ациламино, ацилокси, амино, замещенного амино, аминацила, аминацилокси, оксиаминоацила, азидо, циано, галогена, гидроксила, оксо, тиокето, карбоксила, карбоксилалкила, тиоарилокси, тиогетероарилокси, тиогетероциклоокси, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, арилокси, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, гидроксиамино, алкоксиамино, нитро, -SO-алкила, -SO-замещенного алкила, -SO-арила, -SO-гетероарила, -SO<sub>2</sub>-алкила, -SO<sub>2</sub>-замещенного алкила, -SO<sub>2</sub>-арила и -SO<sub>2</sub>-гетероарила.

"Циклоалкенил" относится к неароматическим циклическим алкильным группам, содержащим от 3 до 10 атомов углерода, имеющим одно или множество колец и имеющим по меньшей мере одну двойную связь и предпочтительно от 1 до 2 двойных связей.

Термин "замещенный циклоалкенил" относится к циклоалкенильным группам, имеющим от 1 до 5 заместителей или от 1 до 3 заместителей, выбранных из алкокси, замещенного алкокси, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, ацила, ациламино, ацилокси, амино, замещенного амино, аминацила, аминацилокси, оксиаминоацила, азидо, циано, галогена, гидроксила, кето, тиокето, карбоксила, карбоксилалкила, тиоарилокси, тиогетероарилокси, тиогетероциклоокси, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, арилокси, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, гидроксиамино, алкоксиамино, нитро, -SO-алкила, -SO-замещенного алкила, -SO-арила, -SO-гетероарила, -SO<sub>2</sub>-алкила, -SO<sub>2</sub>-замещенного алкила, -SO<sub>2</sub>-арила и -SO<sub>2</sub>-гетероарила.

"Циклоалкинил" относится к неароматическим циклоалкильным группам, имеющим от 5 до 10 атомов углерода, одно или множество колец и имеющим по меньшей мере одну тройную связь.

"Циклоалкокси" относится к -O-циклоалкилу.

"Циклоалкенилокси" относится к -O-циклоалкенилу.

"Гало" или "галоген" относится к фтору, хлору, бром и йоду.

"Гидрокси" или "гидроксил" относится к группе -ОН.

"Гетероарил" относится к ароматической группе, имеющей от 1 до 15 атомов углерода, например, от 1 до 10 атомов углерода и от 1 до 10 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из кислорода, азота и серы в пределах кольца. Такие гетероарильные группы могут иметь одно кольцо (такое как пиридинил, имидазолил или фурил) или множество конденсированных колец в кольцевой системе (например, в таких группах, как индолизинил, хинолинил, бензофуран, бензимидазолил или бензотиенил), где по меньшей мере одно кольцо внутри кольцевой системы является ароматическим. Чтобы

удовлетворить требования валентности, любые гетероатомы в таких гетероарильных кольцах могут быть или не быть связаны с Н или группой заместителя, например, алкильной группой или другим заместителем, как определено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления атом(ы) азота и/или серы в кольце гетероарильной группы необязательно окисляют, чтобы получить N-оксидные (N→O), сульфинильные или сульфонильные фрагменты. Этот термин включает, например, пиридинил, пирролил, индолил, тиофенил и фуранил. Если иное не ограничено определением гетероарильного заместителя, такие гетероарильные группы могут быть необязательно замещены от 1 до 5 заместителями или от 1 до 3 заместителями, выбранными из ацилокси, гидроксид, тиола, ацила, алкила, алкокси, алкенила, алкинила, циклоалкила, циклоалкенила, замещенного алкила, замещенного алкокси, замещенного алкенила, замещенного алкинила, замещенного циклоалкила, замещенного циклоалкенила, амина, замещенного амина, аминоксид, ациламина, алкарила, арила, арилокси, азидо, карбоксила, карбоксилалкила, циано, галогена, нитро, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, аминоксид, оксиациламина, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, тиоарилокси, тиогетероарилокси, -SO-алкила, -SO-замещенного алкила, -SO-арила, -SO-гетероарила, -SO<sub>2</sub>-алкила, -SO<sub>2</sub>-замещенного алкила, -SO<sub>2</sub>-арила и -SO<sub>2</sub>-гетероарила и тригалогенметила.

Термин "гетероаралкил" относится к группам -алкилен-гетероарил, где алкилен и гетероарил являются такими, как определено в настоящем описании. Этот термин включает в качестве примера пиридилметил, пиридилэтил, индолилметил и тому подобное.

"Гетероарилокси" относится к -O-гетероарилу.

"Гетероцикл", "гетероциклическое соединение", "гетероциклоалкил" и "гетероциклил" относятся к насыщенной или ненасыщенной группе, имеющей одно кольцо или множество конденсированных колец, включая конденсированные, мостиковые и спирокольцевые системы, и имеющие от 3 до 20 кольцевых атомов, включая от 1 до 10 гетероатомов. Такие кольцевые атомы выбраны из азота, серы или кислорода, где в конденсированных кольцевых системах одно или более колец могут представлять собой циклоалкил, арил или гетероарил, при условии, что точка присоединения осуществляется через неароматическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления атом(ы) азота и/или серы гетероциклической группы необязательно окисляются с образованием N-оксидных, -S(O)- или -SO<sub>2</sub>- фрагментов. Чтобы удовлетворить требования валентности, любые гетероатомы в таких гетероциклических кольцах могут быть или не быть связаны с

одним или более Н или одной или более группой заместителей, например, алкильной группой или другим заместителем, как определено в настоящем описании.

Примеры гетероциклов и гетероариллов включают, но не ограничиваются ими, азетидин, пиррол, имидазол, пиразол, пиридин, пиразин, пиримидин, пиридазин, индолизин, изоиндол, индол, дигидроиндол, индазол, пурин, хинолинзин, изохинолин, хинолин, фталазин, нафтилпиридин, хиноксалин, хиназолин, циннолин, птеридин, карбазол, карболин, фенантридин, акридин, фенантролин, изотиазол, феназин, изоксазол, феноксазин, фенотиазин, имидазолидин, имидазолин, пиперидин, пиперазин, индолин, фталимид, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин, 4,5,6,7-тетрагидробензо[b]тиофен, тиазол, тиазолидин, тиофен, бензо[b]тиофен, морфолинил, тиоморфолинил (также называемый тиаморфолинил), 1,1-диоксотiomорфолинил, пиперидинил, пирролидин, тетрагидрофуранил и тому подобное.

Если иное не ограничено определением для гетероциклического заместителя, такие гетероциклические группы могут быть необязательно замещены от 1 до 5 или от 1 до 3 заместителями, выбранными из алкокси, замещенного алкокси, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, ацила, ациламино, ацилокси, amino, замещенного amino, aminoацила, aminoацилокси, оксиаминоацила, азидо, циано, галогена, гидроксила, оксо, тиокето, карбоксила, карбоксилоалкила, тиоарилокси, тиогетероарилокси, тиогетероциклоокси, тиола, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, арилокси, гетероарила, гетероарилокси, гетероциклила, гетероциклоокси, гидроксиамино, алкоксиамино, нитро, -SO-алкила, -SO-замещенного алкила, -SO-арила, -SO-гетероарила, -SO<sub>2</sub>-алкила, -SO<sub>2</sub>-замещенного алкила, -SO<sub>2</sub>-арила, -SO<sub>2</sub>-гетероарила и конденсированного гетероцикла.

"Гетероциклилокси" относится к группе -O-гетероциклил.

Термин "гетероциклилтио" относится к группе гетероциклическое соединение-S-.

Термин "гетероциклен" относится к бирадикальной группе, образованной из гетероцикла, как определено в настоящем документе.

Термин "гидроксиамино" относится к группе -NHOH.

"Нитро" относится к группе -NO<sub>2</sub>.

"Оксо" относится к атому (=O).

"Сульфонил" относится к группе SO<sub>2</sub>-алкил, SO<sub>2</sub>-замещенный алкил, SO<sub>2</sub>-алкенил, SO<sub>2</sub>-замещенный алкенил, SO<sub>2</sub>-циклоалкил, SO<sub>2</sub>-замещенный циклоалкил, SO<sub>2</sub>-циклоалкенил, SO<sub>2</sub>-замещенный циклоалкенил, SO<sub>2</sub>-арил, SO<sub>2</sub>-замещенный арил, SO<sub>2</sub>-гетероарил, SO<sub>2</sub>-замещенный гетероарил, SO<sub>2</sub>-гетероциклическое соединение и SO<sub>2</sub>-замещенное гетероциклическое соединение, где алкил, замещенный алкил, алкенил,

замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическое соединение и замещенное гетероциклическое соединение являются такими, как определено в настоящем документе. Сульфонил включает, в качестве примера, метил-SO<sub>2</sub>-, фенил-SO<sub>2</sub>- и 4-метилфенил-SO<sub>2</sub>-.

"Сульфонилокси" относится к группе -OSO<sub>2</sub>-алкил, OSO<sub>2</sub>-замещенный алкил, OSO<sub>2</sub>-алкенил, OSO<sub>2</sub>-замещенный алкенил, OSO<sub>2</sub>-циклоалкил, OSO<sub>2</sub>-замещенный циклоалкил, OSO<sub>2</sub>-циклоалкенил, OSO<sub>2</sub>-замещенный циклоалкенил, OSO<sub>2</sub>-арил, OSO<sub>2</sub>-замещенный арил, OSO<sub>2</sub>-гетероарил, OSO<sub>2</sub>-замещенный гетероарил, OSO<sub>2</sub>-гетероциклическое соединение и OSO<sub>2</sub>-замещенное гетероциклическое соединение, где алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклическое соединение и замещенное гетероциклическое соединение являются такими, как определено в настоящем документе.

Термин "аминокарбонилокси" относится к группе -OC(O)NRR, где каждый R независимо представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил или гетероциклическое соединение, где алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил и гетероциклическое соединение являются такими, как определено в настоящем описании.

"Тиол" относится к группе -SH.

Термин "тиоксо" или термин "тиокето" относится к атому (=S).

"Алкилтио" или термин "тиоалкокси" относится к группе -S-алкил, где алкил является таким, как определено в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления сера может быть окислена до -S(O)-. Сульфоксид может существовать в виде одного или более стереоизомеров.

Термин "замещенный тиоалкокси" относится к группе -S-замещенный алкил.

Термин "тиоарилокси" относится к группе арил-S-, где арильная группа является такой, как определено в настоящем документе, включая необязательно замещенные арильные группы, которые также являются такими, как определено в настоящем описании.

Термин "тиогетероарилокси" относится к группе гетероарил-S-, где гетероарильная группа является такой, как определено в настоящем документе, включая необязательно замещенные арильные группы, которые также являются такими, как определено в настоящем описании.

Термин "тиогетероциклоокси" относится к группе гетероциклил-S-, где гетероциклильная группа является такой, как определено в настоящем документе, включая необязательно замещенные гетероциклильные группы, которые также являются такими, как определено в настоящем описании.

В дополнение к раскрытию в настоящем описании, термин "замещенный", когда он применяется для модификации указанной группы или радикала, также может означать, что один или более атомов водорода указанной группы или радикала, каждый независимо друг от друга, заменены одинаковыми или различными группами заместителей, как определено ниже.

В дополнение к группам, относящимся к отдельным терминам в настоящем описании, группы заместителей для замены одного или более атомов водорода (любые два атома водорода на одном атоме углерода могут быть заменены =O, =NR<sup>70</sup>, =N-OR<sup>70</sup>, =N<sub>2</sub> или =S) на насыщенных атомах углерода в указанной группе или радикале, если не указано иное, представляют собой -R<sup>60</sup>, галоген, =O, -OR<sup>70</sup>, -SR<sup>70</sup>, -NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, тригалогенметил, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO<sub>2</sub>, =N<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>, -SO<sub>2</sub>O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -SO<sub>2</sub>OR<sup>70</sup>, -OSO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>, -OSO<sub>2</sub>O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -OSO<sub>2</sub>OR<sup>70</sup>, -P(O)(O<sup>-</sup>)<sub>2</sub>(M<sup>+</sup>)<sub>2</sub>, -P(O)(OR<sup>70</sup>)O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -P(O)(OR<sup>70</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)R<sup>70</sup>, -C(S)R<sup>70</sup>, -C(NR<sup>70</sup>)R<sup>70</sup>, -C(O)O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -C(O)OR<sup>70</sup>, -C(S)OR<sup>70</sup>, -C(O)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, -C(NR<sup>70</sup>)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, -OC(O)R<sup>70</sup>, -OC(S)R<sup>70</sup>, -OC(O)O<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -OC(O)OR<sup>70</sup>, -OC(S)OR<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(O)R<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(S)R<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>, -NR<sup>70</sup>CO<sub>2</sub>R<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(S)OR<sup>70</sup>, -NR<sup>70</sup>C(O)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, -NR<sup>70</sup>C(NR<sup>70</sup>)R<sup>70</sup> и -NR<sup>70</sup>C(NR<sup>70</sup>)NR<sup>80</sup>R<sup>80</sup>, где R<sup>60</sup> выбран из группы, состоящей из необязательно замещенного алкила, циклоалкила, гетероалкила, гетероциклоалкилалкила, циклоалкилалкила, арила, арилалкила, гетероарила и гетероарилалкила, причем каждый R<sup>70</sup> независимо представляет собой водород или R<sup>60</sup>, каждый R<sup>80</sup> независимо представляет собой R<sup>70</sup> или, альтернативно, два R<sup>80</sup> взятые вместе с атомом азота, с которым они связаны, образуют 5-, 6- или 7-членный гетероциклоалкил, который может необязательно включать от 1 до 4 одинаковых или различных дополнительных гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S, из которых N может иметь -H или C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> алкильное замещение, и каждый M<sup>+</sup> представляет собой противоион с общим положительным зарядом. Каждый M<sup>+</sup> может независимо представлять собой, например, ион щелочного металла, такой как K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, ион аммония, такой как <sup>+</sup>N(R<sup>60</sup>)<sub>4</sub>, или ион щелочноземельного металла, такой как [Ca<sup>2+</sup>]<sub>0.5</sub>, [Mg<sup>2+</sup>]<sub>0.5</sub> или [Ba<sup>2+</sup>]<sub>0.5</sub> ("нижний индекс 0,5 означает, что один из противоионов для таких двухвалентных ионов щелочноземельного металла может представлять собой ионизированную форму соединения по настоящему изобретению и другой типичный противоион, такой как

хлорид, или два ионизированных соединения по настоящему изобретению, могут служить противоионами для таких двухвалентных щелочноземельных ионов, или дважды ионизированное соединение по настоящему изобретению может служить противоионом для таких двухвалентных щелочноземельных ионов). В качестве конкретных примеров подразумевается, что  $-NR^{80}R^{80}$  включает  $-NH_2$ ,  $-NH$ -алкил, N-пирролидинил, N-пиперазинил, 4N-метилпиперазин-1-ил и N-морфолинил.

В дополнение к раскрытию в настоящем описании, группы заместителей для водородов на ненасыщенных атомах углерода в "замещенных" алкеновых, алкиновых, арильных и гетероарильных группах представляют собой, если не указано иное,  $-R^{60}$ , галоген,  $-OM^+$ ,  $-OR^{70}$ ,  $-SR^{70}$ ,  $-S^+M^+$ ,  $-NR^{80}R^{80}$ , тригалогенметил,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ,  $-OCN$ ,  $-SCN$ ,  $-NO$ ,  $-NO_2$ ,  $-N_3$ ,  $-SO_2R^{70}$ ,  $-SO_3^-M^+$ ,  $-SO_3R^{70}$ ,  $-OSO_2R^{70}$ ,  $-OSO_3^-M^+$ ,  $-OSO_3R^{70}$ ,  $-PO_3^{-2}(M^+)_2$ ,  $-P(O)(OR^{70})O^-M^+$ ,  $-P(O)(OR^{70})_2$ ,  $-C(O)R^{70}$ ,  $-C(S)R^{70}$ ,  $-C(NR^{70})R^{70}$ ,  $-CO_2^-M^+$ ,  $-CO_2R^{70}$ ,  $-C(S)OR^{70}$ ,  $-C(O)NR^{80}R^{80}$ ,  $-C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$ ,  $-OC(O)R^{70}$ ,  $-OC(S)R^{70}$ ,  $-OCO_2^-M^+$ ,  $-OCO_2R^{70}$ ,  $-OC(S)OR^{70}$ ,  $-NR^{70}C(O)R^{70}$ ,  $-NR^{70}C(S)R^{70}$ ,  $-NR^{70}CO_2^-M^+$ ,  $-NR^{70}CO_2R^{70}$ ,  $-NR^{70}C(S)OR^{70}$ ,  $-NR^{70}C(O)NR^{80}R^{80}$ ,  $-NR^{70}C(NR^{70})R^{70}$  и  $-NR^{70}C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$ , где  $R^{60}$ ,  $R^{70}$ ,  $R^{80}$  и  $M^+$  являются такими, как определено ранее, при условии, что в случае замещенного алкена или алкина заместители не являются  $-OM^+$ ,  $-OR^{70}$ ,  $-SR^{70}$  или  $-S^+M^+$ .

В дополнение к группам, относящимся к отдельным терминам в настоящем описании, группы заместителей для атомов водорода на атомы азота в "замещенных" гетероалкильных и циклогетероалкильных группах представляют собой, если не указано иное,  $-R^{60}$ ,  $-OM^+$ ,  $-OR^{70}$ ,  $-SR^{70}$ ,  $-S^+M^+$ ,  $-NR^{80}R^{80}$ , тригалогенметил,  $-CF_3$ ,  $-CN$ ,  $-NO$ ,  $-NO_2$ ,  $-S(O)_2R^{70}$ ,  $-S(O)_2OM^+$ ,  $-S(O)_2OR^{70}$ ,  $-OS(O)_2R^{70}$ ,  $-OS(O)_2OM^+$ ,  $-OS(O)_2OR^{70}$ ,  $-P(O)(O^-)_2(M^+)_2$ ,  $-P(O)(OR^{70})O^-M^+$ ,  $-P(O)(OR^{70})(OR^{70})$ ,  $-C(O)R^{70}$ ,  $-C(S)R^{70}$ ,  $-C(NR^{70})R^{70}$ ,  $-C(O)OR^{70}$ ,  $-C(S)OR^{70}$ ,  $-C(O)NR^{80}R^{80}$ ,  $-C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$ ,  $-OC(O)R^{70}$ ,  $-OC(S)R^{70}$ ,  $-OC(O)OR^{70}$ ,  $-OC(S)OR^{70}$ ,  $-NR^{70}C(O)R^{70}$ ,  $-NR^{70}C(S)R^{70}$ ,  $-NR^{70}C(O)OR^{70}$ ,  $-NR^{70}C(S)OR^{70}$ ,  $-NR^{70}C(O)NR^{80}R^{80}$ ,  $-NR^{70}C(NR^{70})R^{70}$  и  $-NR^{70}C(NR^{70})NR^{80}R^{80}$ , где  $R^{60}$ ,  $R^{70}$ ,  $R^{80}$  и  $M^+$  являются такими, как определено в настоящем описании.

В дополнение к раскрытию в настоящем описании, в определенном варианте осуществления группа, которая является замещенной, имеет 1, 2, 3 или 4 заместителя, 1, 2 или 3 заместителя, 1 или 2 заместителя или 1 заместитель.

Понятно, что во всех замещенных группах, определенных выше, полимеры, полученные путем определения заместителей с дополнительными заместителями к ним самим (например, замещенный арил, имеющий замещенную арильную группу в качестве

заместителя, который сам замещен замещенной арильной группой, которая представляет собой дополнительно замещенную замещенной арильной группой и т.д.), не предназначены для включения в данное описание. В данных случаях максимальное количество таких замен составляет три. Например, серийные замены замещенных арильных групп, конкретно рассматриваемых в настоящем документе, ограничены группой замещенный арил-(замещенный арил)-замещенный арил.

Если не указано иное, номенклатура заместителей, которые явно неопределены в данном документе, осуществляется путем наименования терминальной части функциональности, за которой следуют соседние функциональности в направлении точки присоединения. Например, заместитель "арилалкилоксикарбонил" относится к группе (арил)-(алкил)-O-C(O)-.

Что касается любой из раскрытых в настоящем описании групп, которые содержат один или более заместителей, понятно, что такие группы не содержат каких-либо замещений или паттернов замещения, которые являются стерически непрактичными и/или синтетически невозможными. Кроме того, соединения по настоящему изобретению включают все стереохимические изомеры, возникающие в результате замещения этих соединений.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая является приемлемой для введения пациенту, такому как млекопитающее (соли с противоионами, имеющие приемлемую безопасность для млекопитающего для данного режима дозирования). Такие соли могут быть получены из фармацевтически приемлемых неорганических или органических оснований и из фармацевтически приемлемых неорганических или органических кислот. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к фармацевтически приемлемым солям соединения, которые являются производными от множества органических и неорганических противоионов, хорошо известных в данной области техники, и включают, только в качестве примера, натрий, калий, кальций, магний, аммоний, тетраалкиламмоний и тому подобное, и когда молекула содержит основные функциональные группы, соли органических или неорганических кислот, такие как гидрохлорид, гидробромид, формиат, тартрат, бесилат, мезилат, ацетат, малеат, оксалат и тому подобное.

Термин "его соль" означает соединение, образуемое, когда протон кислоты заменяется катионом, таким как катион металла или органический катион и тому подобное. Где это применимо, соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль, хотя это не требуется для солей промежуточных соединений, которые не предназначены для введения пациенту. Например, соли соединений по настоящему

изобретению включают соли, где соединение протонируется неорганической или органической кислотой с образованием катиона с сопряженным основанием неорганической или органической кислоты в качестве анионного компонента соли.

"Сольват" относится к комплексу, образованному комбинацией молекул растворителя с молекулами или ионами растворенного вещества. Растворитель может быть органическим соединением, неорганическим соединением или их смесью. Некоторые примеры растворителей включают, но не ограничиваются ими, метанол, N,N-диметилформамид, тетрагидрофуран, диметилсульфоксид и воду. Когда растворителем является вода, образованный сольват представляет собой гидрат.

"Стереизомер" и "стереоизомеры" относятся к соединениям, которые имеют одинаковую атомную связь, но различное расположение атомов в пространстве. Стереоизомеры включают цис-транс изомеры, E и Z изомеры, энантиомеры и диастереомеры.

"Таутомер" относится к альтернативным формам молекулы, которые отличаются только электронной связью атомов и/или положением протона, такие как енол-кето и имин-енамин таутомеры, или таутомерным формам гетероарильных групп, имеющим расположение атомов кольца  $-N=C(H)-NH-$ , такие как пиразолы, имидазолы, бензимидазолы, триазолы и тетразолы. Специалисту в данной области техники будет понятно, что возможны другие расположения атомов таутомерного кольца.

Следует понимать, что термин "или его соль, или сольват, или стереоизомер" предназначен для включения всех комбинаций солей, сольватов и стереоизомеров, таких как сольват фармацевтически приемлемой соли стереоизомера соединения по настоящему изобретению.

"Фармацевтически эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество" относятся к количеству соединения, достаточному для лечения определенного расстройства или заболевания, или одного или более его симптомов и/или для предотвращения возникновения заболевания или расстройства. Что касается онкогенных пролиферативных расстройств, фармацевтически или терапевтически эффективное количество включает количество, достаточное, среди прочего, для того, чтобы опухоль сократилась или уменьшила скорость роста опухоли.

"Пациент" относится к субъектам, относящимся к человеку и не относящимся к человеку, особенно субъектам, относящимся к млекопитающим.

Используемый в настоящем описании термин "обработка" или "лечение" означает обработку или лечение заболевания или медицинского состояния у пациента, такого как млекопитающее (в частности, человек), которое включает: (а) предотвращение

возникновения заболевания или медицинского состояния, такого как профилактическое лечение субъекта, (b) уменьшение интенсивности заболевания или медицинского состояния, например, устранение или регрессия заболевания или медицинского состояния у пациента, (c) подавление заболевания или медицинского состояния, например, путем замедления или прекращения развития заболевания или медицинского состояния у пациента, или (d) облегчение симптомов заболевания или медицинского состояния у пациента.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" применяются в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения полимерной формы аминокислот любой длины. Если специально не указано иное, "полипептид", "пептид" и "белок" могут включать генетически кодируемые и не кодируемые аминокислоты, химически или биохимически модифицированные, или дериватизированные аминокислоты и полипептиды, имеющие модифицированные пептидные остовы. Термин включает слитые белки, включая, но не ограничиваясь ими, белки, слитые с гетерологичной аминокислотной последовательностью, слитые с гетерологичными и гомологичными лидерными последовательностями, белки, которые содержат по меньшей мере один N-концевой остаток метионина (например, чтобы облегчить получение в рекомбинантной бактериальной клетке-хозяине), иммунологически меченые белки, и тому подобное.

"Нативная аминокислотная последовательность" или "исходная аминокислотная последовательность" применяются в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения аминокислотной последовательности полипептида перед модификацией для включения модифицированного аминокислотного остатка.

Термины "аналог аминокислоты", "неприродная аминокислота" и тому подобное могут использоваться взаимозаменяемо и включают соединения, подобные аминокислотам, которые по структуре и/или общей форме сходны с одной или более аминокислотами, обычно встречающимися в природных белках (например, Ala или A, Cys или C, Asp или D, Glu или E, Phe или F, Gly или G, His или H, Ile или I, Lys или K, Leu или L, Met или M, Asn или N, Pro или P, Gln или Q, Arg или R, Ser или S, Thr или T, Val или V, Trp или W, Tyr или Y). Аналоги аминокислот также включают природные аминокислоты с модифицированными боковыми цепями или остовами. Аминокислотные аналоги также включают аналоги аминокислот с той же стереохимией, что и в встречающейся в природе D-форме, а также L-форме аналогов аминокислот. В некоторых случаях аминокислотные аналоги имеют общие структуры остовов и/или структуры боковых цепей с одной или более природными аминокислотами, с различием(ями), состоящем(ими) в одной или более модифицированными группами в молекуле. Такая модификация может включать,

но не ограничивается ими, замену атома (такого как N) на связанный атом (такой как S), добавление группы (такой как метил или гидроксил и т.д.) или атома (такого как C1 или Br и т.д.), удаление группы, замену ковалентной связи (одинарная связь для двойной связи и т.д.) или их комбинации. Например, аминокислотные аналоги могут включать  $\alpha$ -гидроксикислоты и  $\alpha$ -аминокислоты и тому подобное.

Термины "боковая цепь аминокислоты" и "аминокислотная боковая цепь" и тому подобное могут применяться для обозначения заместителя, присоединенного к  $\alpha$ -углероду аминокислотного остатка, включая природные аминокислоты, не природные аминокислоты и аналоги аминокислот. Аминокислотная боковая цепь может также включать аминокислотную боковую цепь, как описано в контексте модифицированных аминокислот и/или конъюгатов, как определено в настоящем описании.

Термин "углевод" и тому подобное можно применять для обозначения мономерных звеньев и/или полимеров моносахаридов, дисахаридов, олигосахаридов и полисахаридов. Термин сахар можно применять для обозначения более мелких углеводов, таких как моносахариды, дисахариды. Термин "производное углевода" включает соединения, в которых одна или более функциональных групп представляющего интерес углевода замещены (заменены любым подходящим заместителем), модифицированы (преобразованы в другую группу с применением любой удобной химии) или отсутствуют (например, удалены или заменены на H). Доступны различные углеводы и производные углеводов, и они могут быть адаптированы для применения в соединениях и конъюгатах по настоящему изобретению.

Термин "антитело" применяется в самом широком смысле и включает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела и полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), гуманизированные антитела, одноцепочечные антитела, химерные антитела, фрагменты антител (например, фрагменты Fab) и тому подобное. Антитело способно связываться с целевым антигеном (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York). Целевой антиген может содержать один или более сайтов связывания, также называемых эпитопами, распознаваемых областями, определяющими комплементарность (CDR), образованными одной или более переменными областями антитела.

Термин "природное антитело" относится к антителу, где тяжелые и легкие цепи антитела созданы и спарены иммунной системой многоклеточного организма. Селезенка, лимфатические узлы, костный мозг и сыворотка являются примерами тканей, которые вырабатывают природные антитела. Например, антитела, выработанные

антителопродуцирующими клетками, выделенными из организма первого животного, иммунизированного антигеном, представляют собой природные антитела.

Термин "гуманизированное антитело" или "гуманизированный иммуноглобулин" относится к антителу животного, не являющимся человеком (например, мыши или кролика), содержащему одну или более аминокислот (например, в каркасной области, константной области или CDR) которые заменены соответствующим образом расположенной аминокислотой человеческого антитела. В целом, гуманизированные антитела вызывают снижение иммунного ответа в организме человека-хозяина по сравнению с негуманизированной версией того же антитела. Антитела могут быть гуманизированы с применением различных способов, известных в данной области техники, включая, например, CDR-прививку (EP 239400, публикация PCT WO 91/09967, патенты США 5225539, 5530101 и 5585909), рекомбинацию поверхностных остатков или изменение поверхности (EP 592106, EP 519596, Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991), Studnicka et al., *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994), Roguska. et al., *PNAS* 91:969-973 (1994)) и перестановку цепей (патент США 5565332). В некоторых вариантах осуществления каркасные замены идентифицируют путем моделирования взаимодействий CDR и каркасных остатков, чтобы идентифицировать каркасные остатки, важные для связывания с антигеном, и сравнения последовательностей для идентификации необычных каркасных остатков в конкретных положениях (см., например, патент США 5585089, Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988)). Дополнительные способы гуманизации антител, предполагаемых для применения в настоящем изобретении, описаны в патентах США 5750078, 5502167, 5705154, 5770403, 5698417, 5693493, 5558864, 4935496, и 4816567 и публикациях PCT WO 98/45331 и WO 98/45332. В конкретных вариантах осуществления кроличье антитело по настоящему изобретению может быть гуманизировано в соответствии со способами, раскрытыми в US20040086979 и US20050033031. Соответственно, антитела, описанные выше, могут быть гуманизированы с применением способов, которые хорошо известны в данной области техники.

Термин "химерные антитела" относится к антителам, чьи гены легкой и тяжелой цепи сконструированы, как правило, с помощью генной инженерии, из генов переменных и константных областей антител, принадлежащих к различным видам. Например, переменные сегменты генов мышинового моноклонального антитела могут быть присоединены к константным сегментам человека, таким как гамма 1 и гамма 3. Примером терапевтического химерного антитела является гибридный белок, состоящий из переменного или антигенсвязывающего домена от антитела мыши и константного

или эффекторного домена от антитела человека, хотя могут быть применены домены других видов млекопитающих.

Вариабельная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина полипептида иммуноглобулина состоит из каркасной области (FR), прерываемой тремя гипервариабельными областями, также называемыми "областями, определяющими комплементарность" или "CDR". Размеры каркасной области и CDR определены (см. "Sequences of Proteins of Immunological Interest," E. Kabat et al., U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Каркасная область антитела, то есть объединенные каркасные области составляющих легкой и тяжелой цепей, служит для позиционирования и выравнивания CDR. CDR в первую очередь ответственны за связывание с эпитопом антигена.

На всем протяжении настоящего изобретения нумерация остатков в тяжелой цепи иммуноглобулина и в легкой цепи иммуноглобулина такая же, как в публикации Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), которая специально включена в настоящее описание в качестве ссылки.

"Исходный полипептид Ig" представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, где отсутствует константная область, меченная альдегидом, как определено в настоящем описании. Исходный полипептид может содержать константную область нативной последовательности или может содержать константную область с ранее существовавшими модификациями аминокислотной последовательности (такими как добавления, делеции и/или замены).

В контексте полипептида Ig термин "константная область" хорошо известен в данной области техники и относится к С-концевой области тяжелой цепи Ig или легкой цепи Ig. Константная область тяжелой цепи Ig включает домены CH1, CH2 и CH3 (и домены CH4, где тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь  $\mu$  или  $\epsilon$ ). В нативной тяжелой цепи Ig домены CH1, CH2, CH3 (и, если присутствует, CH4) начинаются сразу после (к С-концу) вариабельной области (VH) тяжелой цепи, и каждый из них содержит от примерно 100 до примерно 130 аминокислот в длину. В нативной легкой цепи Ig константная область начинается сразу после (к С-концу) вариабельной области (VL) легкой цепи и имеет длину примерно от 100 до 120 аминокислот.

В настоящем описании термин "CDR" или "область, определяющая комплементарность" предназначен для обозначения несмежных антигенсвязывающих центров антитела, находящихся в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. CDR были описаны в публикациях Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616

(1977), Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991), by Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), и MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), где определения включают перекрывающиеся или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, подразумевается, что применение любого определения для обозначения CDR антитела или привитых антител, или их вариантов расположен в пределах объема термина, как определено в настоящем описании. Аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, определенные в каждой из приведенных выше ссылок, приведены ниже в Таблице 1 для сравнения.

Таблица 1: Определения CDR

	Kabat <sup>1</sup>	Chothia <sup>2</sup>	MacCallum <sup>3</sup>
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32	30-35
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	53-55	47-58
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	96-101	93-101
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	30-36
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	46-55
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	89-96

<sup>1</sup> Нумерация остатков соответствует номенклатуре Kabat и соавт., выше.

<sup>2</sup> Нумерация остатков соответствует номенклатуре Chothia и соавт., выше.

<sup>3</sup> Нумерация остатков соответствует номенклатуре MacCallum и соавт., выше.

Термин "генетически кодируемый" в отношении аминокислотной последовательности полипептида, пептида или белка, означает, что аминокислотная последовательность состоит из аминокислотных остатков, которые могут быть продуцированы транскрипцией и трансляцией нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, где транскрипция и/или трансляция может происходить в клетке или в бесклеточной системе транскрипции/трансляции *in vitro*.

Термин "контрольные последовательности" относится к последовательностям ДНК, которые способствуют экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретной системе экспрессии, например, клетка млекопитающего, бактериальная клетка, бесклеточная система синтеза и т.д. Контрольные последовательности, подходящие, например, для прокариотических систем, включают промотор, необязательную последовательность оператора и сайт связывания рибосомы. В

эукариотических клеточных системах могут применяться промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота "функционально связана", когда она находится в функциональном отношении с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК предпоследовательности или секреторного лидера функционально связана с ДНК полипептида, если он экспрессируется в виде белка-предшественника, который участвует в секреции полипептидов, причем промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности, или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы способствовать инициации трансляции. Как правило, "функционально связанный" означает, что связываемые последовательности ДНК являются смежными и, в случае секреторного лидера, являются смежными и находятся в рамке считывания. Связывание осуществляется лигированием или реакцией амплификации. Синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры могут применяться для связывания последовательностей в соответствии с общепринятой практикой.

Термин "кассета экспрессии", как определено в настоящем описании, относится к сегменту нуклеиновой кислоты, обычно ДНК, который может быть вставлен в нуклеиновую кислоту (например, путем применения сайтов рестрикции, совместимых с лигированием в целевую конструкцию, или гомологичной рекомбинацией в целевую конструкцию или в геном клетки-хозяина). В общем, сегмент нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, который кодирует целевой полипептид, а кассеты и сайты рестрикции предназначены для того, чтобы способствовать вставке кассеты в соответствующую рамку считывания для транскрипции и трансляции. Кассеты экспрессии также могут содержать элементы, которые способствуют экспрессии полинуклеотида, кодирующего целевой полипептид в клетке-хозяине. Эти элементы могут включать, но не ограничиваются ими: промотор, минимальный промотор, энхансер, элемент ответа, терминирующая последовательность, последовательность полиаденилирования и тому подобное.

В настоящем описании термин "выделенный" предназначен для описания целевого соединения, которое находится в среде, отличной от той, где это соединение встречается в природе. "Выделенный" означает соединения, которые находятся в образцах, которые существенно обогащены целевым соединением и/или в которых целевое соединение частично или по существу очищено.

В настоящем описании термин "по существу очищенный" относится к соединению, которое извлечено из его естественной среды и не содержит по меньшей мере 60 % , по меньшей мере 75 % , по меньшей мере 80 % , по меньшей мере 85 % , по меньшей мере 90 % , по меньшей мере 95 % , по меньшей мере 98 % или более чем 98 % других компонентов, с которыми оно связано в естественной среде.

Термин "физиологические условия" предназначен для включения условий, которые совместимы с живыми клетками, например, преимущественно водные условия с температурой, значением pH, содержанием соли и т.д., которые совместимы с живыми клетками.

Под "реакционноспособным партнером" подразумевается молекула или молекулярный фрагмент, который специфически реагирует с другим реакционноспособным партнером с образованием продукта реакции. Типичные реакционноспособные партнеры включают цистеин или серин мотива сульфатазы и формилглицин-образующего фермента (FGE), которые реагируют с образованием продукта реакции в форме модифицированной альдегидной метки, содержащей формилглицин (FGly) вместо цистеина или серина в мотиве. Другие типичные реакционноспособные партнеры включают альдегид fGly остатка модифицированной альдегидной метки (например, реакционноспособной альдегидной группы) и "реакционноспособный партнер, способный реагировать с альдегидом", который содержит группу, способную реагировать с альдегидом, и фрагмент интереса, и который реагирует с образованием продукта реакции в форме модифицированного полипептида, меченного альдегидом, содержащего фрагмент интереса, конъюгированный с модифицированным полипептидом через модифицированный остаток fGly.

"N-конец" относится к концевому аминокислотному остатку полипептида, имеющего свободную аминогруппу, причем аминогруппа в аминокислотных остатках, не относящихся к N-концу, обычно образует часть ковалентного остова полипептида.

"С-конец" относится к концевому аминокислотному остатку полипептида, имеющего свободную карбоксильную группу, причем карбоксильная группа в аминокислотных остатках, не относящихся к С-концу, обычно образует часть ковалентного остова полипептида.

Термин "внутренний сайт" в отношении полипептида или аминокислотной последовательности полипептида, означает область полипептида, которая не находится ни на N-конце, ни на С-конце.

В настоящем описании термин "противораковый агент" относится, например, к химиотерапевтическому агенту и/или биологическому терапевтическому агенту,

например, низкомолекулярному соединению, антителу, конъюгату антитела с лекарственным средством и тому подобному, или их композиции, которые эффективны для лечения или предотвращения рака у субъекта.

В настоящем описании термин "резистентный рак" относится к раку, который не отвечает, больше не отвечает или недостаточно отвечает на конкретный(е) способ(ы) лечения. В настоящем описании термин "резистентный рак" применяется как синоним термина "трудно поддающийся лечению рак". В некоторых вариантах осуществления резистентный рак может представлять собой рецидивирующий рак, например, рак, при котором лечение первоначально дало положительные результаты, но при этом рак стал устойчивым к лечению.

В настоящем описании термин "сенсibiliзирующий рак" или "сенсibiliзированный рак" относится к резистентному раку, который больше не устойчив или стал менее устойчив к дальнейшему лечению. Другими словами, резистентный рак становится восприимчивым или восстанавливает чувствительность к лечению, когда он сенсibiliзирован.

В настоящем описании термин "конъюгат антитела против CD22" применяется как синоним термина "конъюгат антитела с лекарственным средством", "ADC", "конъюгат" и "конъюгат полипептида с лекарственным средством".

Прежде чем настоящее изобретение будет дополнительно описано, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, поскольку они, конечно, могут варьироваться. Также следует понимать, что применяемая в настоящем описании терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Когда представлен интервал значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение составляет десятый знак нижнего предела, если контекст явно не предписывает иное, между верхним и нижним пределом данного интервала, и любое другое указанное или промежуточное значение в указанном интервале включено в объем настоящего изобретения. Верхний и нижний пределы таких меньших интервалов могут независимо включаться в еще меньшие интервалы и также включены в объем настоящего изобретения, с учетом любого специально исключенного предела в указанном интервале. Если указанный интервал включает один или оба из этих пределов, интервалы, исключаящие один или оба из включенных пределов, также включены в объем настоящего изобретения.

Понятно, что определенные признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предусмотрены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предусмотрены отдельно или в любой подходящей комбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящихся к настоящему изобретению, конкретно охватываются настоящим изобретением и раскрываются в данном документе так же, как если бы каждая комбинация была раскрыта индивидуально и в явном виде, в той степени, в которой такие комбинации охватывают объекты, которые представляют собой, например, соединения, которые являются стабильными соединениями (то есть соединениями, которые могут быть получены, выделены, охарактеризованы и протестированы на биологическую активность). Кроме того, все подкомбинации различных вариантов осуществления и их элементов (например, элементов химических групп, перечисленных в вариантах осуществления, описывающих такие переменные) также конкретно охватываются настоящим изобретением и раскрываются в данном документе так же, как если бы каждая такая подкомбинация была индивидуально и явно раскрыта в данном документе.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут также применяться при практическом применении или проверке настоящего изобретения, предпочтительные способы и материалы представлены в настоящем описании. Все публикации, упомянутые в настоящем описании, включены в него посредством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в соответствии с цитируемыми публикациями.

Следует отметить, что используемые в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают формы множественного числа, если явно не указано иное. Кроме того, следует отметить, что формула изобретения может быть составлена таким образом, чтобы исключить любой необязательный элемент. Как таковое, это утверждение предназначено для применения в качестве предшествующего положения для применения такой исключительной терминологии, как "исключительно", "только" и т.п., в связи с перечислением элементов формулы изобретения или применением отрицательных признаков.

Понятно, что определенные признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предоставлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предусмотрены отдельно или в любой подходящей комбинации.

Публикации, упомянутые в настоящем описании, предоставлены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в настоящем документе не должно быть истолковано как допущение того, что настоящее изобретение не имеет права предшествовать такой публикации в силу более ранней даты создания предшествующего изобретения. Кроме того, предоставленные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут нуждаться в независимом подтверждении.

### КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛА С ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВОМ

Настоящее изобретение относится к конъюгатам, например, конъюгатам антитела с лекарственным средством. Под "конъюгатом" подразумевается первый фрагмент (например, антитело), стабильно связанный со вторым фрагментом (например, лекарственное средство). Например, конъюгат майтансина включает майтансин (например, фрагмент активного агента майтансина), стабильно связанный с другим фрагментом (например, антителом). Под "стабильно связанным" подразумевается, что фрагмент связан с другим фрагментом или структурой в стандартных условиях. В некоторых вариантах осуществления первый и второй фрагменты связаны друг с другом посредством одной или более ковалентных связей.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой полипептидный конъюгат, который включает полипептид, конъюгированный со вторым фрагментом. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, конъюгированный с полипептидом, может представлять собой любой из множества фрагментов интереса, таких как, но не ограничиваясь ими, детектируемая метка, лекарственное средство, водорастворимый полимер или фрагмент для иммобилизации полипептида к мембране или поверхности. В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой конъюгат майтансина, где полипептид конъюгирован с майтансином или фрагментом активного агента майтансина. "Майтансин", "фрагмент майтансина", "фрагмент активного агента майтансина" и "майтансиноид" относятся к майтансину и его аналогам и производным, и к фармацевтически активным фрагментам майтансина и/или их частям. Майтансин, конъюгированный с полипептидом, может быть любым из множества

фрагментов майтансина, таких как, но не ограничиваясь ими, майтансин и его аналоги и производные, как определено в настоящем описании.

Фрагмент интереса может быть конъюгирован с полипептидом в любом желаемом сайте полипептида. Таким образом, настоящее изобретение относится, например, к модифицированному полипептиду, имеющему фрагмент, конъюгированный в сайте на С-конце или вблизи С-конца полипептида. Другие примеры включают модифицированный полипептид, имеющий фрагмент, конъюгированный в сайте на N-конце или вблизи N-конца полипептида. Примеры также включают модифицированный полипептид, имеющий фрагмент, конъюгированный в положении между С-концом и N-концом полипептида (например, на внутреннем сайте полипептида). Комбинации вышеуказанных вариантов также возможны, когда модифицированный полипептид конъюгирован с двумя или более фрагментами.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат по настоящему изобретению включает майтансин, конъюгированный с аминокислотным остатком полипептида на  $\alpha$ -углероде аминокислотного остатка. Иными словами, конъюгат майтансина включает полипептид, где боковая цепь одного или более аминокислотных остатков в полипептиде модифицирована для присоединения к майтансину (например, присоединена к майтансину через линкер, как определено в настоящем описании). Например, конъюгат майтансина включает полипептид, где  $\alpha$ -углерод одного или более аминокислотных остатков в полипептиде был модифицирован для присоединения к майтансину (например, присоединен к майтансину через линкер, как определено в настоящем описании).

Варианты осуществления настоящего изобретения включают конъюгаты, в которых полипептид конъюгирован с одним или более фрагментами, например, 2 фрагментами, 3 фрагментами, 4 фрагментами, 5 фрагментами, 6 фрагментами, 7 фрагментами, 8 фрагментами, 9 фрагментами или 10 или больше фрагментами. Фрагменты могут быть конъюгированы с полипептидом в одном или более сайтах в полипептиде. Например, один или более фрагментов могут быть конъюгированы с одним аминокислотным остатком полипептида. В некоторых случаях один фрагмент конъюгирован с аминокислотным остатком полипептида. В других вариантах осуществления два фрагмента могут быть конъюгированы с одним и тем же аминокислотным остатком полипептида. В других вариантах осуществления первый фрагмент конъюгирован с первым аминокислотным остатком полипептида, а второй фрагмент конъюгирован со вторым аминокислотным остатком полипептида. Комбинации вышеуказанных вариантов также возможны, например, когда полипептид конъюгирован с первым фрагментом по первому аминокислотному остатку и конъюгирован с двумя

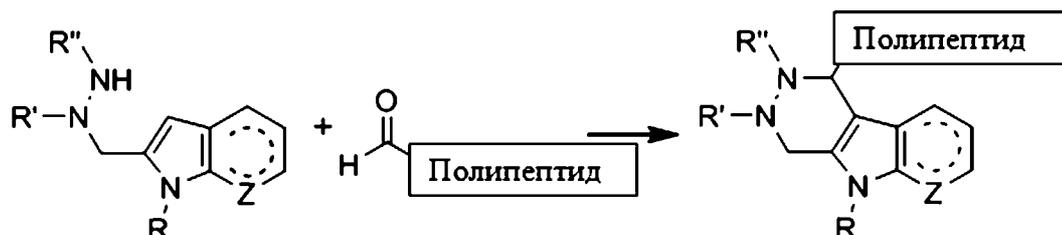
другими фрагментами по второму аминокислотному остатку. Возможны и другие комбинации, такие как, но не ограничиваясь ими, полипептид, конъюгированный с первым и вторым фрагментами по первому аминокислотному остатку и конъюгированный с третьим и четвертым фрагментами по второму аминокислотному остатку и т.д.

Один или более аминокислотных остатков полипептида, которые конъюгированы с одним или более фрагментами, могут представлять собой встречающиеся в природе аминокислоты, неприродные аминокислоты или их комбинации. Например, конъюгат может включать фрагмент, конъюгированный с природным аминокислотным остатком полипептида. В других случаях конъюгат может включать фрагмент, конъюгированный с не встречающимся в природе аминокислотным остатком полипептида. Один или более фрагментов могут быть конъюгированы с полипептидом в одном природном или неприродном аминокислотном остатке, как описано выше. Один или более природных или неприродных аминокислотных остатков в полипептиде могут быть конъюгированы с фрагментом или фрагментами, как определено в настоящем описании. Например, два (или более) аминокислотных остатка (например, природные или неприродные аминокислотные остатки) в полипептиде могут быть каждый конъюгированы с одним или двумя фрагментами, так что множество сайтов в полипептиде будут модифицированы.

Как определено в настоящем описании, полипептид может быть конъюгирован с одним или более фрагментами. В некоторых вариантах осуществления фрагмент интереса представляет собой химическое соединение, например, лекарственное средство или детектируемую метку. Например, лекарственное средство (например, майтансин) может быть конъюгировано с полипептидом, или в других вариантах осуществления детектируемая метка может быть конъюгирована с полипептидом. Таким образом, например, варианты осуществления настоящего изобретения включают, но не ограничиваются ими, конъюгат полипептида с лекарственным средством, конъюгат полипептида с детектируемой меткой, конъюгат двух или более лекарственных средств с полипептидом, конъюгат двух или более детектируемых меток с полипептидом, и тому подобное.

В некоторых вариантах осуществления полипептид и фрагмент интереса конъюгированы через связывающий фрагмент. Например, каждый полипептид и фрагмент интереса может быть связан (например, ковалентно связан) с соединительным фрагментом, таким образом, непрямым путем связывая вместе полипептид и фрагмент интереса (например, лекарственное средство, такое как майтансин) через связывающий фрагмент. В некоторых случаях связывающий фрагмент включает гидразинил-индолильное или гидразинил-пирроло-пиридинильное соединение, или производное

гидразинил-индолильного или гидразинил-пирроло-пиридиныльного соединения. Например, общая схема связывания фрагмента интереса (например, майтансина) с полипептидом через гидразинил-индолильный или гидразинил-пирролопиридиныльный связывающий фрагмент показана на общей схеме реакции ниже. Гидразинил-индолильный и гидразинил-пирролопиридиныльный связывающие фрагменты также упоминаются в настоящем описании как связывающий фрагмент гидразино-изо-Пикте-Шпенглера (HIPS) и связывающий фрагмент аза-гидразино-изо-Пикте-Шпенглера (azaHIPS), соответственно.



В приведенной выше схеме реакции R представляет собой фрагмент интереса (например, майтансин), который конъюгирован с полипептидом. Как показано на схеме реакции выше, полипептид, который включает остаток 2-формилглицина (fGly), реагирует с лекарственным средством (например, майтансином), которое было модифицировано с тем, чтобы включать связывающий фрагмент (например, гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридиныльный связывающий фрагмент) для получения полипептидного конъюгата, присоединенного к связывающему фрагменту, таким образом, присоединяя майтансин к полипептиду через связывающий фрагмент.

Как определено в настоящем описании, фрагмент может быть любым из множества фрагментов, таких как, но не ограничиваясь ими, химическое соединение, такое как детектируемая метка, или лекарственное средство (например, майтансиноид). R' и R'' каждый может независимо представлять собой любой желаемый заместитель, такой как, но не ограничиваясь ими, водород, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкокси, замещенный алкокси, амино, замещенный амино, карбоксил, сложный эфир карбоновой кислоты, ацил, ацилокси, ациламино, аминацил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил, тиоалкокси, замещенный тиоалкокси, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероциклил и замещенный гетероциклил. Z может представлять собой CR<sup>11</sup>, NR<sup>12</sup>, N, O или S, где R<sup>11</sup> и R<sup>12</sup> каждый независимо выбран из любого из заместителей, описанных для R' и R'' выше.

Также возможны другие гидразинил-индолильные или гидразинил-пирролопиридиныльные связывающие фрагменты, как определено в конъюгатах и

соединениях по настоящему изобретению. Например, гидразинил-индолилный или гидразинил-пирроло-пиридиновый связывающий фрагмент может быть модифицирован для присоединения (например, ковалентного присоединения) к линкеру. Как таковые, варианты осуществления настоящего изобретения включают гидразинил-индолилный или гидразинил-пирроло-пиридиновый связывающий фрагмент, присоединенный к лекарственному средству (например, майтансину) через линкер. Различные варианты осуществления линкера, который может связывать гидразинил-индолилный или гидразинил-пирролопиридиновый связывающий фрагмент с лекарственным средством (например, майтансин), подробно описаны в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления полипептид может быть конъюгирован с фрагментом интереса, где полипептид модифицирован до конъюгации с фрагментом интереса. Модификация полипептида может привести к получению модифицированного полипептида, который содержит одну или более реакционноспособных групп, подходящих для конъюгации с фрагментом интереса. В некоторых случаях полипептид может быть модифицирован по одному или более аминокислотным остаткам с получением одной или более реакционноспособных групп, подходящих для конъюгации с фрагментом интереса (например, фрагментом, который включает связывающий фрагмент, такой как гидразинил-индолилный или гидразинил-пирроло-пиридиновый связывающий фрагмент, как описано выше). Например, полипептид может быть модифицирован для включения реакционноспособной альдегидной группы (например, реакционноспособного альдегида). Реакционноспособный альдегид может быть включен в "альдегидную метку" или "альд-метку", что в контексте настоящего описания относится к аминокислотной последовательности, происходящей из мотива сульфатазы (например, L(C/S)TPSR), который был превращен посредством действия формилглицин-образующего фермента (FGE), в остаток 2-формилглицина (называемого в настоящем документе "FGly"). Остаток FGly, образуемый FGE, также может называться "формилглицин". Иными словами, термин "альдегидная метка" применяется в настоящем описании для обозначения аминокислотной последовательности, которая включает "превращенный" мотив сульфатазы (то есть мотив сульфатазы, где остаток цистеина или серина был превращен в FGly под действием FGE, например, L(FGly)TPSR). Превращенный мотив сульфатазы может быть получен из аминокислотной последовательности, которая включает "не превращенный" мотив сульфатазы (то есть мотив сульфатазы, где остаток цистеина или серина не был превращен в FGly с помощью FGE, но способен к превращению, например, непревращенный мотив сульфатазы с последовательностью: L(C/S)TPSR). Термин "превращение", используемый в контексте действия формилглицин-

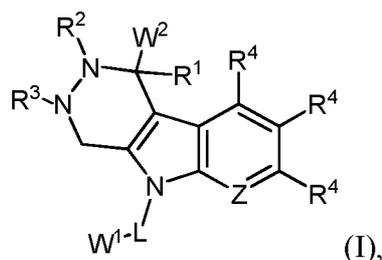
образующего фермента (FGE) на мотив сульфатазы, относится к биохимической модификации остатка цистеина или серина в мотиве сульфатазы в остаток формилглицина (FGly) (например, от Cys к FGly или Ser к FGly). Дополнительные аспекты альдегидных меток и их применение в сайт-специфической модификации белка описаны в патенте США 7985783 и патенте США 8729232, описания каждого из которых включены в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых случаях модифицированный полипептид, содержащий остаток FGly, может быть конъюгирован с фрагментом интереса посредством реакции FGly с соединением (например, соединением, содержащим гидразинил-индолильный или гидразинил-пирроло-пиридинильный связывающий фрагмент, как описано выше). Например, FGly-содержащий полипептид может взаимодействовать с лекарственным средством, содержащим реакционноспособного партнера, в условиях, подходящих для обеспечения конъюгации лекарственного средства с полипептидом. В некоторых случаях лекарственное средство, содержащее реакционноспособного партнера, может включать гидразинил-индолильный или гидразинил-пирроло-пиридинильный связывающий фрагмент, как описано выше. Например, майтансин может быть модифицирован с тем, чтобы включать гидразинил-индолильный или гидразинил-пирроло-пиридинильный связывающий фрагмент. В некоторых случаях майтансин присоединен к гидразинил-индолилу или гидразинил-пирроло-пиридинилу, например, ковалентно, присоединен к гидразинил-индолилу или гидразинил-пирроло-пиридинилу через линкер, как подробно определено в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат по настоящему изобретению включает полипептид (например, антитело, такое как антитело против CD22), имеющий по меньшей мере один модифицированный аминокислотный остаток. Модифицированный аминокислотный остаток полипептида может быть связан с лекарственным средством (например, майтансином), содержащим гидразинил-индолильный или гидразинил-пирролопиридинильный связывающий фрагмент, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления модифицированный аминокислотный остаток полипептида (например, антитело против CD22) может быть получен из остатка цистеина или серина, который был превращен в остаток FGly, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления остаток FGly конъюгирован с лекарственным средством, содержащим гидразинил-индолильный или гидразинил-пирроло-пиридинильный связывающий фрагмент, как описано выше с получением конъюгата по настоящему изобретению, где лекарственное средство конъюгировано с полипептидом через гидразинил-индолильный или гидразинил-пирроло-пиридинильный

связывающий фрагмент. В настоящем описании термин FGly' относится к модифицированному аминокислотному остатку полипептида (например, антитела против CD22), который связан с фрагментом интереса (например, лекарственное средство, такое как майтансиноид).

В некоторых вариантах осуществления конъюгат включает по меньшей мере один модифицированный аминокислотный остаток формулы (I), как определено в настоящем описании. Например, конъюгат может включать по меньшей мере один модифицированный аминокислотный остаток с боковой цепью формулы (I):



где

Z представляет собой CR<sup>4</sup> или N,

R<sup>1</sup> выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> каждый независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, amino, замещенного amino, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминоацила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила, или R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> необязательно циклически связаны с образованием 5- или 6-членного гетероциклила,

каждый R<sup>4</sup> независимо выбран из водорода, галогена, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, amino, замещенного amino, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминоацила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

L представляет собой линкер, содержащий  $-(T^1-V^1)_a-(T^2-V^2)_b-(T^3-V^3)_c-(T^4-V^4)_d-$ , где a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d составляет от 1 до 4,

$T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  каждый независимо выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила,  $(\text{ЭДА})_w$ ,  $(\text{ПЭГ})_n$ ,  $(\text{АК})_p$ ,  $-(\text{CR}^{13}\text{ОН})_h-$ , пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, гидразина, дисульфида и сложного эфира, где ЭДА представляет собой этилендиаминовый фрагмент, ПЭГ представляет собой полиэтиленгликоль или модифицированный полиэтиленгликоль, и АК представляет собой аминокислотный остаток, где w представляет собой целое число от 1 до 20, n представляет собой целое число от 1 до 30, p представляет собой целое число от 1 до 20 и h представляет собой целое число от 1 до 12,

$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  каждый независимо выбран из группы, состоящей из ковалентной связи,  $-\text{CO}-$ ,  $-\text{NR}^{15}-$ ,  $-\text{NR}^{15}(\text{CH}_2)_q-$ ,  $-\text{NR}^{15}(\text{C}_6\text{H}_4)-$ ,  $-\text{CONR}^{15}-$ ,  $-\text{NR}^{15}\text{CO}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{S}(\text{O})-$ ,  $-\text{SO}_2-$ ,  $-\text{SO}_2\text{NR}^{15}-$ ,  $-\text{NR}^{15}\text{SO}_2-$  и  $-\text{P}(\text{O})\text{OH}-$ , где q представляет собой целое число от 1 до 6,

каждый  $R^{13}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила,

каждый  $R^{15}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

$W^1$  представляет собой майтансиноид, и

$W^2$  представляет собой антитело против CD22.

В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой  $\text{CR}^4$  или N. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой  $\text{CR}^4$ . В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой N.

В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой алкил или замещенный алкил, такой как  $C_{1-6}$  алкил или  $C_{1-6}$  замещенный алкил, или  $C_{1-4}$  алкил или  $C_{1-4}$  замещенный алкил, или  $C_{1-3}$  алкил или  $C_{1-3}$  замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^1$  представляет собой алкенил или замещенный алкенил, такой как  $C_{2-6}$  алкенил или  $C_{2-6}$  замещенный алкенил,

или C<sub>2-4</sub> алкенил или C<sub>2-4</sub> замещенный алкенил, или C<sub>2-3</sub> алкенил или C<sub>2-3</sub> замещенный алкенил. В некоторых вариантах осуществления R<sup>1</sup> представляет собой алкинил или замещенный алкинил, такой как C<sub>2-6</sub> алкенил или C<sub>2-6</sub> замещенный алкенил, или C<sub>2-4</sub> алкенил или C<sub>2-4</sub> замещенный алкенил, или C<sub>2-3</sub> алкенил или C<sub>2-3</sub> замещенный алкенил. В некоторых вариантах осуществления R<sup>1</sup> представляет собой арил или замещенный арил, такой как C<sub>5-8</sub> арил или C<sub>5-8</sub> замещенный арил, такой как C<sub>5</sub> арил или C<sub>5</sub> замещенный арил, или C<sub>6</sub> арил или C<sub>6</sub> замещенный арил. В некоторых вариантах осуществления R<sup>1</sup> представляет собой гетероарил или замещенный гетероарил, такой как C<sub>5-8</sub> гетероарил или C<sub>5-8</sub> замещенный гетероарил, такой как C<sub>5</sub> гетероарил или C<sub>5</sub> замещенный гетероарил, или C<sub>6</sub> гетероарил или C<sub>6</sub> замещенный гетероарил. В некоторых вариантах осуществления R<sup>1</sup> представляет собой циклоалкил или замещенный циклоалкил, такой как C<sub>3-8</sub> циклоалкил или C<sub>3-8</sub> замещенный циклоалкил, такой как C<sub>3-6</sub> циклоалкил или C<sub>3-6</sub> замещенный циклоалкил, или C<sub>3-5</sub> циклоалкил или C<sub>3-5</sub> замещенный циклоалкил. В некоторых вариантах осуществления R<sup>1</sup> представляет собой гетероциклил или замещенный гетероциклил, такой как C<sub>3-8</sub> гетероциклил или C<sub>3-8</sub> замещенный гетероциклил, такой как C<sub>3-6</sub> гетероциклил или C<sub>3-6</sub> замещенный гетероциклил, или C<sub>3-5</sub> гетероциклил или C<sub>3-5</sub> замещенный гетероциклил.

В некоторых вариантах осуществления каждый из R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амина, замещенного амина, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминаоцила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонил, тиаалкокси, замещенного тиаалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила, или R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> необязательно циклически связаны с образованием 5- или 6-членного гетероциклила.

В некоторых вариантах осуществления R<sup>2</sup> выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амина, замещенного амина, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминаоцила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонил, тиаалкокси, замещенного тиаалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила. В некоторых вариантах осуществления R<sup>2</sup> представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления R<sup>2</sup> представляет собой алкил или замещенный алкил, такой как C<sub>1-6</sub> алкил или C<sub>1-6</sub> замещенный алкил, или

$C_{1-4}$  алкил или  $C_{1-4}$  замещенный алкил, или  $C_{1-3}$  алкил или  $C_{1-3}$  замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой алкенил или замещенный алкенил, такой как  $C_{2-6}$  алкенил или  $C_{2-6}$  замещенный алкенил, или  $C_{2-4}$  алкенил или  $C_{2-4}$  замещенный алкенил, или  $C_{2-3}$  алкенил или  $C_{2-3}$  замещенный алкенил. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой алкинил или замещенный алкинил. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой алкокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой амино или замещенный амино. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой карбоксил или сложный эфир карбоновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой ацил или ацилокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой амино или аминоксил. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой алкиламид или замещенный алкиламид. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой сульфонил. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой тиоалкокси или замещенный тиоалкокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой арил или замещенный арил, такой как  $C_{5-8}$  арил или  $C_{5-8}$  замещенный арил, такой как  $C_5$  арил или  $C_5$  замещенный арил, или  $C_6$  арил или  $C_6$  замещенный арил. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой гетероарил или замещенный гетероарил, такой как  $C_{5-8}$  гетероарил или  $C_{5-8}$  замещенный гетероарил, такой как  $C_5$  гетероарил или  $C_5$  замещенный гетероарил, или  $C_6$  гетероарил или  $C_6$  замещенный гетероарил. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой циклоалкил или замещенный циклоалкил, такой как  $C_{3-8}$  циклоалкил или  $C_{3-8}$  замещенный циклоалкил, такой как  $C_{3-6}$  циклоалкил или  $C_{3-6}$  замещенный циклоалкил, или  $C_{3-5}$  циклоалкил или  $C_{3-5}$  замещенный циклоалкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  представляет собой гетероцикл или замещенный гетероцикл, такой как  $C_{3-6}$  гетероцикл или  $C_{3-6}$  замещенный гетероцикл, или  $C_{3-5}$  гетероцикл или  $C_{3-5}$  замещенный гетероцикл.

В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амино, замещенного амино, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминоксилы, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой алкил или замещенный алкил, такой как  $C_{1-6}$  алкил или  $C_{1-6}$  замещенный алкил, или  $C_{1-4}$  алкил или  $C_{1-4}$  замещенный алкил, или  $C_{1-3}$  алкил или  $C_{1-3}$  замещенный алкил. В

некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой алкенил или замещенный алкенил, такой как  $C_{2-6}$  алкенил или  $C_{2-6}$  замещенный алкенил, или  $C_{2-4}$  алкенил или  $C_{2-4}$  замещенный алкенил, или  $C_{2-3}$  алкенил или  $C_{2-3}$  замещенный алкенил. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой алкинил или замещенный алкинил. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой алкокси или замещенный алкокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой амино или замещенный амино. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой карбоксил или сложный эфир карбоновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой ацил или ацилокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой ациламино или аминоксил. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой алкиламид или замещенный алкиламид. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой сульфонил. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой тиоалкокси или замещенный тиоалкокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой арил или замещенный арил, такой как  $C_{5-8}$  арил или  $C_{5-8}$  замещенный арил, такой как  $C_5$  арил или  $C_5$  замещенный арил, или  $C_6$  арил или  $C_6$  замещенный арил. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой гетероарил или замещенный гетероарил, такой как  $C_{5-8}$  гетероарил или  $C_{5-8}$  замещенный гетероарил, такой как  $C_5$  гетероарил или  $C_5$  замещенный гетероарил, или  $C_6$  гетероарил или  $C_6$  замещенный гетероарил. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой циклоалкил или замещенный циклоалкил, такой как  $C_{3-8}$  циклоалкил или  $C_{3-8}$  замещенный циклоалкил, такой как  $C_{3-6}$  циклоалкил или  $C_{3-6}$  замещенный циклоалкил, или  $C_{3-5}$  циклоалкил или  $C_{3-5}$  замещенный циклоалкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^3$  представляет собой гетероцикл или замещенный гетероцикл, такой как  $C_{3-8}$  гетероцикл или  $C_{3-8}$  замещенный гетероцикл, такой как  $C_{3-6}$  гетероцикл или  $C_{3-6}$  замещенный гетероцикл, или  $C_{3-5}$  гетероцикл или  $C_{3-5}$  замещенный гетероцикл.

В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  и  $R^3$  необязательно циклически связаны с образованием 5- или 6-членного гетероцикла. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  и  $R^3$  циклически связаны с образованием 5- или 6-членного гетероцикла. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  и  $R^3$  циклически связаны с образованием 5-членного гетероцикла. В некоторых вариантах осуществления  $R^2$  и  $R^3$  циклически связаны с образованием 6-членного гетероцикла.

В некоторых вариантах осуществления каждый  $R^4$  независимо выбран из водорода, галогена, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амино, замещенного амино,

карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила.

Различные необязательные варианты осуществления для каждого  $R^4$  описаны более подробно далее. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R^4$  представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой галоген, такой как F, Cl, Br или I. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой F. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой Cl. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой Br. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой I. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой алкил или замещенный алкил, такой как  $C_{1-6}$  алкил или  $C_{1-6}$  замещенный алкил, или  $C_{1-4}$  алкил или  $C_{1-4}$  замещенный алкил, или  $C_{1-3}$  алкил или  $C_{1-3}$  замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой алкенил или замещенный алкенил, такой как  $C_{2-6}$  алкенил или  $C_{2-6}$  замещенный алкенил, или  $C_{2-4}$  алкенил или  $C_{2-4}$  замещенный алкенил, или  $C_{2-3}$  алкенил или  $C_{2-3}$  замещенный алкенил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой алкинил или замещенный алкинил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой алкокси или замещенный алкокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой амино или замещенный амино. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой карбоксил или сложный эфир карбоновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой ацил или ацилокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой ациламино или аминоксил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой алкиламид или замещенный алкиламид. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой сульфонил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой тиоалкокси или замещенный тиоалкокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой арил или замещенный арил, такой как  $C_{5-8}$  арил или  $C_{5-8}$  замещенный арил, такой как  $C_5$  арил или  $C_5$  замещенный арил, или  $C_6$  арил или  $C_6$  замещенный арил (например, фенил или замещенный фенил). В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой гетероарил или замещенный гетероарил, такой как  $C_{5-8}$  гетероарил или  $C_{5-8}$  замещенный гетероарил, такой как  $C_5$  гетероарил или  $C_5$  замещенный гетероарил, или  $C_6$  гетероарил или  $C_6$  замещенный гетероарил. В некоторых вариантах осуществления  $R^4$  представляет собой циклоалкил или замещенный

циклоалкил, такой как C<sub>3-8</sub> циклоалкил или C<sub>3-8</sub> замещенный циклоалкил, такой как C<sub>3-6</sub> циклоалкил или C<sub>3-6</sub> замещенный циклоалкил, или C<sub>3-5</sub> циклоалкил или C<sub>3-5</sub> замещенный циклоалкил. В некоторых вариантах осуществления R<sup>4</sup> представляет собой гетероциклил или замещенный гетероциклил, такой как C<sub>3-8</sub> гетероциклил или C<sub>3-8</sub> замещенный гетероциклил, такой как C<sub>3-6</sub> гетероциклил или C<sub>3-6</sub> замещенный гетероциклил, или C<sub>3-5</sub> гетероциклил или C<sub>3-5</sub> замещенный гетероциклил.

В некоторых вариантах осуществления W<sup>1</sup> представляет собой майтансиноид. Дополнительное описание майтансиноида раскрыто далее в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления W<sup>2</sup> представляет собой антитело против CD22. Дополнительное описание антитела против CD22 раскрыто далее в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I) включают линкер L. Линкер может быть применен для связывания связывающего фрагмента с одним или более фрагментами интереса и/или одним или более полипептидами. В некоторых вариантах осуществления линкер связывает связывающий фрагмент либо с полипептидом, либо с химическим соединением. Линкер может быть связан (например, ковалентно связан) со связывающим соединительным фрагментом (например, как определено в настоящем описании) в любом удобном положении. Например, линкер может присоединять гидразинил-индолилный или гидразинил-пирроло-пиридинильный связывающий фрагмент к лекарственному средству (например, майтансину). Гидразинил-индолилный или гидразинил-пирроло-пиридинильный связывающий фрагмент может быть применен для конъюгации линкера (и, таким образом, лекарственного средства, например, майтансина) с полипептидом, таким как антитело против CD22.

В некоторых вариантах осуществления L присоединяет связывающий фрагмент к W<sup>1</sup>, и, таким образом, связывающий фрагмент непрямым путем связан с W<sup>1</sup> через линкер L. Как описано выше, W<sup>1</sup> представляет собой майтансиноид, и, таким образом, L присоединяет связывающий фрагмент к майтансиноиду, например, связывающий фрагмент непрямым путем связан с майтансиноидом через линкер L.

Любые подходящие линкеры могут быть применены в конъюгатах и соединениях по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления L включает группу, выбранную из алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амина, замещенного амина, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ациламино, алкиламида, замещенного алкиламида, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила. В

некоторых вариантах осуществления L включает алкильную или замещенную алкильную группу. В некоторых вариантах осуществления L включает алкенильную или замещенную алкенильную группу. В некоторых вариантах осуществления L включает алкинильную или замещенную алкинильную группу. В некоторых вариантах осуществления L включает алкокси или замещенную алкоксигруппу. В некоторых вариантах осуществления L включает амино или замещенную аминогруппу. В некоторых вариантах осуществления L включает карбоксильную или группу сложного эфира карбоновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления L включает ациламиногруппу. В некоторых вариантах осуществления L включает алкиламидную или замещенную алкиламидную группу. В некоторых вариантах осуществления L включает арильную или замещенную арильную группу. В некоторых вариантах осуществления L включает гетероарильную или замещенную гетероарильную группу. В некоторых вариантах осуществления L включает циклоалкильную или замещенную циклоалкильную группу. В некоторых вариантах осуществления L включает гетероциклическую или замещенную гетероциклическую группу.

В некоторых вариантах осуществления L включает полимер. Например, полимер может включать полиалкиленгликоль и его производные, включая полиэтиленгликоль, метоксиполиэтиленгликоль, гомополимеры полиэтиленгликоля, гомополимеры полипропиленгликоля, сополимеры этиленгликоля с пропиленгликолем (например, когда гомополимеры и сополимеры являются незамещенными или замещенными на одном конце с алкильной группой), поливиниловый спирт, простые поливинилэтиловые эфиры, поливинилпирролидон, их комбинации и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой полиалкиленгликоль. В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой полиэтиленгликоль. Другие линкеры также возможны, как показано в конъюгатах и соединениях, более подробно описанных ниже.

В некоторых вариантах осуществления L представляет собой линкер представленный формулой  $-(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c-(L^4)_d-$ , где каждый  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$  и  $L^4$  независимо, представляют собой линкерное звено и a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d составляет от 1 до 4.

В некоторых вариантах осуществления сумма a, b, c и d равна 1. В некоторых вариантах осуществления сумма a, b, c и d равна 2. В некоторых вариантах осуществления сумма a, b, c и d равна 3. В некоторых вариантах осуществления сумма a, b, c и d равна 4. В некоторых вариантах осуществления a, b, c и d каждый равен 1. В некоторых вариантах осуществления a, b и c каждый равен 1 и d равен 0. В некоторых вариантах осуществления

каждый a и b равен 1 и каждый c и d равен 0. В некоторых вариантах осуществления a равен 1, и каждый b, c и d равен 0.

В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  присоединен к гидразинил-индолильному или гидразинил-пирроло-пиридинильному связывающему фрагменту (например, как показано в формуле (I) выше). В некоторых вариантах осуществления  $L^2$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$ . В некоторых вариантах осуществления  $L^3$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$ . В некоторых вариантах осуществления  $L^4$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$ .

Любые подходящие линкерные звенья могут быть применены в линкерах по настоящему изобретению. Представляющие интерес линкерные звенья включают, но не ограничиваются ими, полимерные звенья, такие как полиэтиленгликоли, полиэтилены и полиакрилаты, аминокислотный(ые) остаток(ки), полимеры на основе углеводов или углеводные остатки и их производные, полинуклеотиды, алкильные группы, арильные группы, гетероциклические группы, их комбинации и их замещенные варианты. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$  и  $L^4$  (если присутствует) содержит одну или более групп, независимо выбранных из полиэтиленгликоля, модифицированного полиэтиленгликоля, аминокислотного остатка, алкильной группы, замещенного алкила, арильной группы, замещенной арильной группы и диамина (например, связывающая группа, которая включает алкилендиамин).

В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  (если присутствует) включает полиэтиленгликоль, модифицированный полиэтиленгликоль, аминокислотный остаток, алкильную группу, замещенный алкил, арильную группу, замещенную арильную группу или диамин. В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  включает полиэтиленгликоль. В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  включает модифицированный полиэтиленгликоль. В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  включает аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  включает алкильную группу или замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  содержит арильную группу или замещенную арильную группу. В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  содержит диамин (например, связывающую группу, включающую алкилендиамин).

В некоторых вариантах осуществления  $L^2$  (если присутствует) включает полиэтиленгликоль, модифицированный полиэтиленгликоль, аминокислотный остаток, алкильную группу, замещенный алкил, арильную группу, замещенную арильную группу или диамин. В некоторых вариантах осуществления  $L^2$  включает полиэтиленгликоль. В некоторых вариантах осуществления  $L^2$  включает модифицированный полиэтиленгликоль. В некоторых вариантах осуществления  $L^2$  включает аминокислотный

остаток. В некоторых вариантах осуществления  $L^2$  включает алкильную группу или замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления  $L^2$  содержит арильную группу или замещенную арильную группу. В некоторых вариантах осуществления  $L^2$  содержит диамин (например, связывающую группу, включающую алкилендиамин).

В некоторых вариантах осуществления  $L^3$  (если присутствует) включает полиэтиленгликоль, модифицированный полиэтиленгликоль, аминокислотный остаток, алкильную группу, замещенный алкил, арильную группу, замещенную арильную группу или диамин. В некоторых вариантах осуществления  $L^3$  включает полиэтиленгликоль. В некоторых вариантах осуществления  $L^3$  включает модифицированный полиэтиленгликоль. В некоторых вариантах осуществления  $L^3$  включает аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления  $L^3$  включает алкильную группу или замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления  $L^3$  содержит арильную группу или замещенную арильную группу. В некоторых вариантах осуществления  $L^3$  содержит диамин (например, связывающую группу, включающую алкилендиамин).

В некоторых вариантах осуществления  $L^4$  (если присутствует) включает полиэтиленгликоль, модифицированный полиэтиленгликоль, аминокислотный остаток, алкильную группу, замещенный алкил, арильную группу, замещенную арильную группу или диамин. В некоторых вариантах осуществления  $L^4$  включает полиэтиленгликоль. В некоторых вариантах осуществления  $L^4$  содержит модифицированный полиэтиленгликоль. В некоторых вариантах осуществления  $L^4$  включает аминокислотный остаток. В некоторых вариантах осуществления  $L^4$  включает алкильную группу или замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления  $L^4$  включает арильную группу или замещенную арильную группу. В некоторых вариантах осуществления  $L^4$  включает диамин (например, связывающую группу, включающую алкилендиамин).

В некоторых вариантах осуществления  $L$  представляет собой линкер, содержащий  $-(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c-(L^4)_d-$ , где:

- $-(L^1)_a-$  представляет собой  $-(T^1-V^1)_a-$ ,
- $-(L^2)_b-$  представляет собой  $-(T^2-V^2)_b-$ ,
- $-(L^3)_c-$  представляет собой  $-(T^3-V^3)_c-$ , и
- $-(L^4)_d-$  представляет собой  $-(T^4-V^4)_d-$ ,

где  $T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$ , если они присутствуют, представляют собой группы связи,

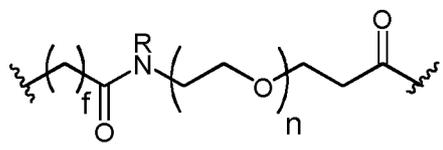
$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$ , если присутствуют, представляют собой ковалентные связи или связывающие функциональные группы, и

$a$ ,  $b$ ,  $c$  и  $d$  каждый независимо равен 0 или 1, где сумма  $a$ ,  $b$ ,  $c$  и  $d$  составляет от 1 до

Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления  $L^1$  присоединен к гидразинил-индолильному или гидразинил-пирроло-пиридилильному связывающему фрагменту (например, как показано в формуле (I) выше). По существу, в некоторых вариантах осуществления  $T^1$  присоединен к гидразинил-индолильному или гидразинил-пирроло-пиридилильному связывающему фрагменту (например, как показано в формуле (I) выше). В некоторых вариантах осуществления  $V^1$  присоединен к  $W^1$  (майтансиноид). В некоторых вариантах осуществления  $L^2$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$ . По существу, в некоторых вариантах осуществления  $T^2$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$ , или  $V^2$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$ . В некоторых вариантах осуществления  $L^3$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$ . По существу, в некоторых вариантах осуществления  $T^3$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$ , или  $V^3$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$ . В некоторых вариантах осуществления  $L^4$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$ . По существу, в некоторых вариантах осуществления  $T^4$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$ , или  $V^4$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$ .

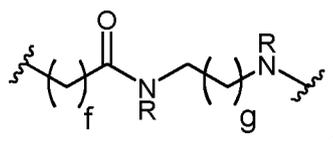
В отношении групп связи,  $T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$ , любые подходящие группы связи можно применять в линкерах по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления каждый  $T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  содержит одну или более групп, независимо выбранных из  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила,  $(ЭДА)_w$ ,  $(ПЭГ)_n$ ,  $(АК)_p$ ,  $(CR^{13}OH)_h$ , пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, дисульфида, гидразина и сложного эфира, где  $w$  представляет собой целое число от 1 до 20,  $n$  представляет собой целое число от 1 до 30,  $p$  представляет собой целое число от 1 до 20 и  $h$  представляет собой целое число от 1 до 12,

В некоторых вариантах осуществления, когда сумма  $a$ ,  $b$ ,  $c$  и  $d$  равна 2 и один из  $T^1-V^1$ ,  $T^2-V^2$ ,  $T^3-V^3$  или  $T^4-V^4$  представляет собой  $(ПЭГ)_n-CO$ , тогда  $n$  не равен 6. Например, в некоторых случаях линкер может иметь следующую структуру:



где  $n$  не равен 6.

В некоторых вариантах осуществления, когда сумма  $a$ ,  $b$ ,  $c$  и  $d$  равна 2 и один из  $T^1-V^1$ ,  $T^2-V^2$ ,  $T^3-V^3$  или  $T^4-V^4$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил- $NR^{15}$ , тогда  $(C_1-C_{12})$ алкил не является  $C_5$ -алкилом. Например, в некоторых случаях линкер может иметь следующую структуру:



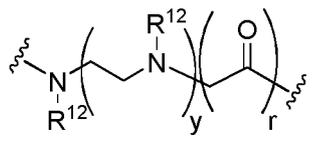
где  $g$  не равен 4.

В некоторых вариантах осуществления группа связи (например,  $T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и/или  $T^4$ ) включает  $(C_1-C_{12})$ алкил или замещенный  $(C_1-C_{12})$ алкил. В некоторых вариантах осуществления  $(C_1-C_{12})$ алкил представляет собой алкильную группу с прямой или разветвленной цепью, которая включает от 1 до 12 атомов углерода, например от 1 до 10 атомов углерода, или от 1 до 8 атомов углерода, или от 1 до 6 атомов углерода, или от 1 до 5 атомов углерода, или от 1 до 4 атомов углерода, или от 1 до 3 атомов углерода. В некоторых случаях  $(C_1-C_{12})$ алкил может представлять собой алкил или замещенный алкил, такой как  $C_1-C_{12}$  алкил, или  $C_1-C_{10}$  алкил, или  $C_1-C_6$  алкил, или  $C_1-C_3$  алкил. В некоторых случаях  $(C_1-C_{12})$ алкил представляет собой  $C_2$ -алкил. Например,  $(C_1-C_{12})$ алкил может представлять собой алкилен или замещенный алкилен, такой как  $C_1-C_{12}$  алкилен, или  $C_1-C_{10}$  алкилен, или  $C_1-C_6$  алкилен, или  $C_1-C_3$  алкилен. В некоторых случаях  $(C_1-C_{12})$ алкил представляет собой  $C_2$ -алкилен.

В некоторых вариантах осуществления замещенный  $(C_1-C_{12})$ алкил представляет собой замещенную алкильную группу с прямой или разветвленной цепью, которая включает от 1 до 12 атомов углерода, например от 1 до 10 атомов углерода, или от 1 до 8 атомов углерода, или от 1 до 6 атомов углерода, или от 1 до 5 атомов углерода, или от 1 до 4 атомов углерода, или от 1 до 3 атомов углерода. В некоторых случаях замещенный  $(C_1-C_{12})$ алкил может представлять собой замещенный алкил, такой как замещенный  $C_1-C_{12}$  алкил, или замещенный  $C_1-C_{10}$  алкил, или замещенный  $C_1-C_6$  алкил, или замещенный  $C_1-C_3$  алкил. В некоторых случаях замещенный  $(C_1-C_{12})$ алкил представляет собой замещенный  $C_2$ -алкил. Например, замещенный  $(C_1-C_{12})$ алкил может представлять собой замещенный алкилен, такой как замещенный  $C_1-C_{12}$  алкилен, или замещенный  $C_1-C_{10}$  алкилен, или замещенный  $C_1-C_6$  алкилен, или замещенный  $C_1-C_3$  алкилен. В некоторых случаях замещенный  $(C_1-C_{12})$ алкил представляет собой замещенный  $C_2$ -алкилен.

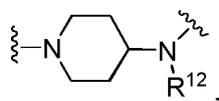
В некоторых вариантах осуществления группа связи (например,  $T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и/или  $T^4$ ) включает этилендиаминовый (ЭДА) фрагмент, например, ЭДА-содержащая группа связи. В некоторых вариантах осуществления  $(ЭДА)_w$  включает один или более фрагментов ЭДА, таких, где  $w$  представляет собой целое число от 1 до 50, например, от 1 до 40, от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 12 или от 1 до 6, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6). Связанные этилендиаминовые (ЭДА) фрагменты могут быть необязательно замещены в одном или более подходящих положениях любыми подходящими заместителями, например,

алкилом, замещенным алкилом, ацилом, замещенным ацилом, арилом или замещенным арилом. В некоторых вариантах осуществления фрагмент ЭДА представлен структурой:



где  $y$  представляет собой целое число от 1 до 6,  $r$  равен 0 или 1, и каждый  $R^{12}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амина, замещенного амина, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминацила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиаалкокси, замещенного тиаалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила. В некоторых вариантах осуществления  $y$  равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления  $y$  равен 1, а  $r$  равен 0. В некоторых вариантах осуществления  $y$  равен 1, а  $r$  равен 1. В некоторых вариантах осуществления  $y$  равен 2 и  $r$  равен 0. В некоторых вариантах осуществления  $y$  равен 2 и  $r$  равен 1. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R^{12}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила. В некоторых вариантах осуществления любые две соседние группы  $R^{12}$  в ЭДА могут быть циклически связаны, например, с образованием пиперазинильного кольца. В некоторых вариантах осуществления  $y$  равен 1, и две соседние группы  $R^{12}$  представляют собой алкильную группу, циклически связанную с образованием пиперазинильного кольца. В некоторых вариантах осуществления  $y$  равен 1, и соседние группы  $R^{12}$  выбраны из водорода, алкила (например, метила) и замещенного алкила (например, низшего алкил-ОН, такого как этил-ОН или пропил-ОН).

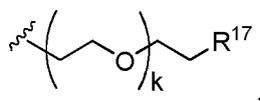
В некоторых вариантах осуществления группа связи включает фрагмент 4-аминопиперидина (4АП) (также называемый в настоящем описании пиперидин-4-амино, П4А). Фрагмент 4АП может быть необязательно замещен в одном или более подходящих положениях любыми подходящими заместителями, например, алкилом, замещенным алкилом, фрагментом полиэтиленгликоля, ацилом, замещенным ацилом, арилом или замещенным арилом. В некоторых вариантах осуществления фрагмент 4АП представлен структурой:



где  $R^{12}$  выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, фрагмента полиэтиленгликоля (например, полиэтиленгликоля или модифицированного

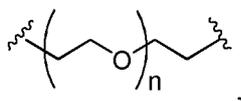
полиэтиленгликоля), алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амина, замещенного амина, сложного карбоксила эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиаалкокси, замещенного тиаалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила. В некоторых вариантах осуществления  $R^{12}$  представляет собой фрагмент полиэтиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления  $R^{12}$  представляет собой карбокси модифицированный полиэтиленгликоль.

В некоторых вариантах осуществления  $R^{12}$  включает фрагмент полиэтиленгликоля, имеющий формулу:  $(\text{ПЭГ})_k$ , который может быть представлен структурой:



где  $k$  представляет собой целое число от 1 до 20, такое как от 1 до 18, или от 1 до 16, или от 1 до 14, или от 1 до 12, или от 1 до 10, или от 1 до 8, или от 1 до 6, или от 1 до 4, или 1 или 2, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В некоторых вариантах осуществления  $k$  равен 2. В некоторых вариантах осуществления  $R^{17}$  выбран из  $\text{OH}$ ,  $\text{COOH}$  или  $\text{COOR}$ , где  $R$  выбран из алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила. В некоторых вариантах осуществления  $R^{17}$  представляет собой  $\text{COOH}$ .

В некоторых вариантах осуществления группа связи (например,  $T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и/или  $T^4$ ) включает  $(\text{ПЭГ})_n$ , где  $(\text{ПЭГ})_n$  представляет собой полиэтиленгликоль или связывающее звено модифицированного полиэтиленгликоля. В некоторых вариантах осуществления  $(\text{ПЭГ})_n$  представлен структурой:



где  $n$  представляет собой целое число от 1 до 50, такое как от 1 до 40, от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 12 или от 1 до 6, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В некоторых вариантах осуществления  $n$  равен 2. В некоторых вариантах осуществления  $n$  равен 3. В некоторых вариантах осуществления  $n$  равен 6. В некоторых вариантах осуществления  $n$  равен 12.

В некоторых вариантах осуществления группа связи (например,  $T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и/или  $T^4$ ) включает  $(\text{АК})_p$ , где АК представляет собой аминокислотный остаток. Можно применять любые подходящие аминокислоты. Представляющие интерес аминокислоты включают, но

не ограничиваются ими, L- и D-аминокислоты, встречающиеся в природе аминокислоты, такие как любая из 20 первичных альфа-аминокислот, и бета-аланин, не встречающиеся в природе аминокислоты (например, аналоги аминокислот), такие как не встречающаяся в природе альфа-аминокислота или не встречающаяся в природе бета-аминокислота и т.д. В некоторых вариантах осуществления  $p$  представляет собой целое число от 1 до 50, например, от 1 до 40, от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 12 или от 1 до 6, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В некоторых вариантах осуществления  $p$  равен 1. В некоторых вариантах осуществления  $p$  равен 2.

В некоторых вариантах осуществления группа связи (например,  $T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и/или  $T^4$ ) включает фрагмент, представленный формулой  $-(CR^{13}OH)_h-$ , где  $h$  равен 0 или  $n$  представляет собой целое число от 1 до 50, такое как от 1 до 40, от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 12 или от 1 до 6, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12. В некоторых вариантах осуществления  $h$  равен 1. В некоторых вариантах осуществления  $h$  равен 2. В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амина, замещенного амина, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминацила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиаалкокси, замещенного тиаалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл и замещенного гетероцикла. В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  представляет собой алкил или замещенный алкил, такой как  $C_{1-6}$  алкил или  $C_{1-6}$  замещенный алкил, или  $C_{1-4}$  алкил или  $C_{1-4}$  замещенный алкил, или  $C_{1-3}$  алкил или  $C_{1-3}$  замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  представляет собой алкенил или замещенный алкенил, такой как  $C_{2-6}$  алкенил или  $C_{2-6}$  замещенный алкенил, или  $C_{2-4}$  алкенил или  $C_{2-4}$  замещенный алкенил, или  $C_{2-3}$  алкенил или  $C_{2-3}$  замещенный алкенил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  представляет собой алкинил или замещенный алкинил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  представляет собой алкокси или замещенный алкокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  представляет собой амина или замещенный амина. В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  представляет собой карбоксил или сложный эфир карбоновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  представляет собой ацил или ацилокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  представляет собой ациламино или аминацил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  представляет собой алкиламид или замещенный алкиламид. В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  представляет собой сульфонил. В некоторых

вариантах осуществления  $R^{13}$  представляет собой тиоалкокси или замещенный тиоалкокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  представляет собой арил или замещенный арил, такой как  $C_{5-8}$  арил или  $C_{5-8}$  замещенный арил, такой как  $C_5$  арил или  $C_5$  замещенный арил, или  $C_6$  арил или  $C_6$  замещенный арил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  представляет собой гетероарил или замещенный гетероарил, такой как  $C_{5-8}$  гетероарил или  $C_{5-8}$  замещенный гетероарил, такой как  $C_5$  гетероарил или  $C_5$  замещенный гетероарил, или  $C_6$  гетероарил или  $C_6$  замещенный гетероарил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  представляет собой циклоалкил или замещенный циклоалкил, такой как  $C_{3-8}$  циклоалкил или  $C_{3-8}$  замещенный циклоалкил, такой как  $C_{3-6}$  циклоалкил или  $C_{3-6}$  замещенный циклоалкил, или  $C_{3-5}$  циклоалкил или  $C_{3-5}$  замещенный циклоалкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  представляет собой гетероциклил или замещенный гетероциклил, такой как  $C_{3-8}$  гетероциклил или  $C_{3-8}$  замещенный гетероциклил, такой как  $C_{3-6}$  гетероциклил или  $C_{3-6}$  замещенный гетероциклил, или  $C_{3-5}$  гетероциклил или  $C_{3-5}$  замещенный гетероциклил.

В некоторых вариантах осуществления  $R^{13}$  выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила. В указанных вариантах осуществления алкил, замещенный алкил, арил и замещенный арил являются такими, как определено выше для  $R^{13}$ .

В отношении связывающих функциональных групп,  $V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$ , любые подходящие связывающие функциональные группы можно применять в линкерах по настоящему изобретению. Связывающие функциональные группы, представляющие интерес, включают, но не ограничиваются ими, амино, карбонил, амидо, оксикарбонил, карбокси, сульфонил, сульфоксид, сульфониламино, аминосульфонил, тио, окси, фосфо, фосфорамидат, тиофосфораидат и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления каждый  $V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  независимо выбран из ковалентной связи,  $-CO-$ ,  $-NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}(CH_2)_q-$ ,  $-NR^{15}(C_6H_4)-$ ,  $-CONR^{15}-$ ,  $-NR^{15}CO-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO_2NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}SO_2-$  и  $-P(O)OH-$  где  $q$  представляет собой целое число от 1 до 6. В некоторых вариантах осуществления  $q$  представляет собой целое число от 1 до 6 (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6). В некоторых вариантах осуществления  $q$  равен 1. В некоторых осуществлениях  $q$  равен 2.

В некоторых вариантах осуществления каждый  $R^{15}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амино, замещенного амино, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкокси,

замещенного тиаалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила.

Различные возможные варианты осуществления для каждого  $R^{15}$  описаны более подробно далее. В некоторых вариантах осуществления  $R^{15}$  представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления каждый  $R^{15}$  представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления  $R^{15}$  представляет собой алкил или замещенный алкил, такой как  $C_{1-6}$  алкил или  $C_{1-6}$  замещенный алкил, или  $C_{1-4}$  алкил или  $C_{1-4}$  замещенный алкил, или  $C_{1-3}$  алкил или  $C_{1-3}$  замещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{15}$  представляет собой алкенил или замещенный алкенил, такой как  $C_{2-6}$  алкенил или  $C_{2-6}$  замещенный алкенил, или  $C_{2-4}$  алкенил или  $C_{2-4}$  замещенный алкенил, или  $C_{2-3}$  алкенил или  $C_{2-3}$  замещенный алкенил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{15}$  представляет собой алкинил или замещенный алкинил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{15}$  представляет собой алкокси или замещенный алкокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^{15}$  представляет собой амино или замещенный амино. В некоторых вариантах осуществления  $R^{15}$  представляет собой карбоксил или сложный эфир карбоновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления  $R^{15}$  представляет собой ацил или ацилокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^{15}$  представляет собой ациламино или аминоксил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{15}$  представляет собой алкиламид или замещенный алкиламид. В некоторых вариантах осуществления  $R^{15}$  представляет собой сульфонил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{15}$  представляет собой тиаалкокси или замещенный тиаалкокси. В некоторых вариантах осуществления  $R^{15}$  представляет собой арил или замещенный арил, такой как  $C_{5-8}$  арил или  $C_{5-8}$  замещенный арил, такой как  $C_5$  арил или  $C_5$  замещенный арил, или  $C_6$  арил или  $C_6$  замещенный арил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{15}$  представляет собой гетероарил или замещенный гетероарил, такой как  $C_{5-8}$  гетероарил или  $C_{5-8}$  замещенный гетероарил, такой как  $C_5$  гетероарил или  $C_5$  замещенный гетероарил, или  $C_6$  гетероарил или  $C_6$  замещенный гетероарил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{15}$  представляет собой циклоалкил или замещенный циклоалкил, такой как  $C_{3-8}$  циклоалкил или  $C_{3-8}$  замещенный циклоалкил, такой как  $C_{3-6}$  циклоалкил или  $C_{3-6}$  замещенный циклоалкил, или  $C_{3-5}$  циклоалкил или  $C_{3-5}$  замещенный циклоалкил. В некоторых вариантах осуществления  $R^{15}$  представляет собой гетероциклил или замещенный гетероциклил, такой как  $C_{3-8}$  гетероциклил или  $C_{3-8}$  замещенный гетероциклил, такой как  $C_{3-6}$  гетероциклил или  $C_{3-6}$  замещенный гетероциклил, или  $C_{3-5}$  гетероциклил или  $C_{3-5}$  замещенный гетероциклил.

В некоторых вариантах осуществления каждый  $R^{15}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила. В указанных вариантах осуществления водород, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, карбоксил, сложный эфир карбоновой кислоты, ацил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероциклил и замещенные гетероциклильные заместители являются такими, как определено выше для  $R^{15}$ .

В некоторых вариантах осуществления группа связи включает ацетальную группу, дисульфид, гидразин или сложный эфир. В некоторых вариантах осуществления группа связи включает ацетальную группу. В некоторых вариантах осуществления группа связи включает дисульфид. В некоторых вариантах осуществления группа связи включает гидразин. В некоторых вариантах осуществления группа связи включает сложный эфир.

Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления, L представляет собой линкер, содержащий  $-(T^1-V^1)_a-(T^2-V^2)_b-(T^3-V^3)_c-(T^4-V^4)_d-$ , где a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d составляет от 1 до 4.

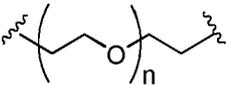
В некоторых вариантах в линкере по настоящему изобретению:

$T^1$  выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила и замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила,

$T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  каждый независимо выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила, (ЭДА)<sub>w</sub>, (ПЭГ)<sub>n</sub>, (АК)<sub>p</sub>,  $-(CR^{13}OH)_h-$ , пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, дисульфида, гидразина и сложного эфира, и

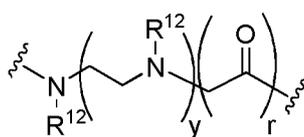
$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  каждый независимо выбран из ковалентной связи,  $-CO-$ ,  $-NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}(CH_2)_q-$ ,  $-NR^{15}(C_6H_4)-$ ,  $-CONR^{15}-$ ,  $-NR^{15}CO-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO_2NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}SO_2-$  и  $-P(O)OH-$ , где q представляет собой целое число от 1 до 6,

где:

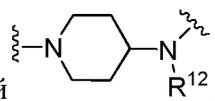
(ПЭГ)<sub>n</sub> представляет собой , где n представляет собой целое число

от 1 до 30,

ЭДА представляет собой этилендиаминовый фрагмент, имеющий следующую структуру:



, где  $y$  представляет собой целое число от 1 до 6 и  $r$  равен 0 или 1,



4-аминопиперидин (4АП) представляет собой

АК представляет собой аминокислотный остаток, где  $p$  представляет собой целое число от 1 до 20, и

каждый  $R^{15}$  и  $R^{12}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила, где любые две соседние группы  $R^{12}$  могут быть циклически связаны с образованием пиперазинильного кольца, и

$R^{13}$  выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила.

В некоторых вариантах осуществления  $T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  и  $V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  выбраны из следующей таблицы, например, из одной строки следующей таблицы:

$T^1$	$V^1$	$V^2$	$V^2$	$T^3$	$V^3$	$T^4$	$V^4$
( $C_1$ - $C_{12}$ )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	-	-	-	-
( $C_1$ - $C_{12}$ )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	-	-
( $C_1$ - $C_{12}$ )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-	-	-	-	-
( $C_1$ - $C_{12}$ )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-NR <sup>15</sup> -	-	-	-	-
( $C_1$ - $C_{12}$ )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-NR <sup>15</sup> -	-	-
( $C_1$ - $C_{12}$ )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	-	-	-	-
( $C_1$ - $C_{12}$ )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	( $C_1$ - $C_{12}$ )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-	-	-
( $C_1$ - $C_{12}$ )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	-	-
( $C_1$ - $C_{12}$ )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	-	-	-	-

T <sup>1</sup>	V <sup>1</sup>	V <sup>2</sup>	V <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>	V <sup>4</sup>
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-SO <sub>2</sub> -	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	замещен ый (C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-SO <sub>2</sub> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	- NR <sup>15</sup> -
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	- P(O)OH -	(АК) <sub>p</sub>	-

T <sup>1</sup>	V <sup>1</sup>	V <sup>2</sup>	V <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>	V <sup>4</sup>
(C <sub>1</sub> -C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	(AK) <sub>p</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> -C <sub>12</sub> )алкил	-CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> -C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> -C <sub>12</sub> )алкил	-CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> -C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-CO-	(C <sub>1</sub> -C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -
(C <sub>1</sub> -C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	4АП	-CO-	(C <sub>1</sub> -C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> -C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	4АП	-CO-	(C <sub>1</sub> -C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-

В некоторых вариантах осуществления L представляет собой линкер, содержащий  $-(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c-(L^4)_d-$ , где  $-(L^1)_a-$  представляет собой  $-(T^1-V^1)_a-$ ,  $-(L^2)_b-$  представляет собой  $-(T^2-V^2)_b-$ ,  $-(L^3)_c-$  представляет собой  $-(T^3-V^3)_c-$ , и  $-(L^4)_d-$  представляет собой  $-(T^4-V^4)_d-$ .

В некоторых вариантах осуществления T<sup>1</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>1</sup> представляет собой -CO-, T<sup>2</sup> представляет собой (AK)<sub>p</sub>, V<sup>2</sup> представляет собой -NR<sup>15</sup>-, T<sup>3</sup> представляет собой (ПЭГ)<sub>n</sub>, V<sup>3</sup> представляет собой -CO-, T<sup>4</sup> отсутствует и V<sup>4</sup> отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления T<sup>1</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>1</sup> представляет собой -CO-, T<sup>2</sup> представляет собой (ЭДА)<sub>w</sub>, V<sup>2</sup> представляет собой -CO-, T<sup>3</sup> представляет собой (CR<sup>13</sup>OH)<sub>h</sub>, V<sup>3</sup> представляет собой -CONR<sup>15</sup>-, T<sup>4</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил и V<sup>4</sup> представляет собой -CO-.

В некоторых вариантах осуществления T<sup>1</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>1</sup> представляет собой -CO-, T<sup>2</sup> представляет собой (AK)<sub>p</sub>, V<sup>2</sup> представляет собой -NR<sup>15</sup>-, T<sup>3</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>3</sup> представляет собой -CO-, T<sup>4</sup> отсутствует и V<sup>4</sup> отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления T<sup>1</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>1</sup> представляет собой -CONR<sup>15</sup>-, T<sup>2</sup> представляет собой (ПЭГ)<sub>n</sub>, V<sup>2</sup> представляет собой -CO-, T<sup>3</sup> отсутствует, V<sup>3</sup> отсутствует, T<sup>4</sup> отсутствует и V<sup>4</sup> отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления T<sup>1</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>1</sup> представляет собой -CO-, T<sup>2</sup> представляет собой (AK)<sub>p</sub>, V<sup>2</sup> отсутствует, T<sup>3</sup> отсутствует, V<sup>3</sup> отсутствует, T<sup>4</sup> отсутствует и V<sup>4</sup> отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления T<sup>1</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>1</sup> представляет собой -CONR<sup>15</sup>-, T<sup>2</sup> представляет собой (ПЭГ)<sub>n</sub>, V<sup>2</sup> представляет собой -NR<sup>15</sup>-, T<sup>3</sup> отсутствует, V<sup>3</sup> отсутствует, T<sup>4</sup> отсутствует и V<sup>4</sup> отсутствует.



В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^1$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^2$  представляет собой  $(ЭДА)_w$ ,  $V^2$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^3$  представляет собой  $(CR^{13}OH)_h$ ,  $V^3$  представляет собой  $-CONR^{15}-$ ,  $T^4$  представляет собой  $(ПЭГ)_n$  и  $V^4$  представляет собой  $-CO-$ .

В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^1$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^2$  представляет собой  $(CR^{13}OH)_h$ ,  $V^2$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^3$  отсутствует,  $V^3$  отсутствует,  $T^4$  отсутствует и  $V^4$  отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^1$  представляет собой  $-CONR^{15}-$ ,  $T^2$  представляет собой замещенный  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^2$  представляет собой  $-NR^{15}-$ ,  $T^3$  представляет собой  $(ПЭГ)_n$ ,  $V^3$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^4$  отсутствует и  $V^4$  отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^1$  представляет собой  $-SO_2-$ ,  $T^2$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^2$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^3$  отсутствует,  $V^3$  отсутствует,  $T^4$  отсутствует и  $V^4$  отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^1$  представляет собой  $-CONR^{15}-$ ,  $T^2$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^2$  отсутствует,  $T^3$  представляет собой  $(CR^{13}OH)_h$ ,  $V^3$  представляет собой  $-CONR^{15}-$ ,  $T^4$  отсутствует и  $V^4$  отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^1$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^2$  представляет собой  $(AK)_p$ ,  $V^2$  представляет собой  $-NR^{15}-$ ,  $T^3$  представляет собой  $(ПЭГ)_n$ ,  $V^3$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^4$  представляет собой  $(AK)_p$  и  $V^4$  представляет собой  $-NR^{15}-$ .

В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^1$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^2$  представляет собой  $(AK)_p$ ,  $V^2$  представляет собой  $-NR^{15}-$ ,  $T^3$  представляет собой  $(ПЭГ)_n$ ,  $V^3$  представляет собой  $-P(O)OH-$ ,  $T^4$  представляет собой  $(AK)_p$  и  $V^4$  отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^1$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^2$  представляет собой  $(ЭДА)_w$ ,  $V^2$  отсутствует,  $T^3$  представляет собой  $(AK)_p$ ,  $V^3$  отсутствует,  $T^4$  отсутствует и  $V^4$  отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^1$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^2$  представляет собой  $(ЭДА)_w$ ,  $V^2$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^3$  представляет собой  $(CR^{13}OH)_h$ ,  $V^3$  представляет собой  $-CONR^{15}-$ ,  $T^4$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил и  $V^4$  представляет собой  $-CO(AK)_p-$ .

В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^1$  представляет собой  $-CONR^{15}-$ ,  $T^2$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^2$  представляет

собой  $-NR^{15}$ -,  $T^3$  отсутствует,  $V^3$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^4$  отсутствует и  $V^4$  отсутствует.

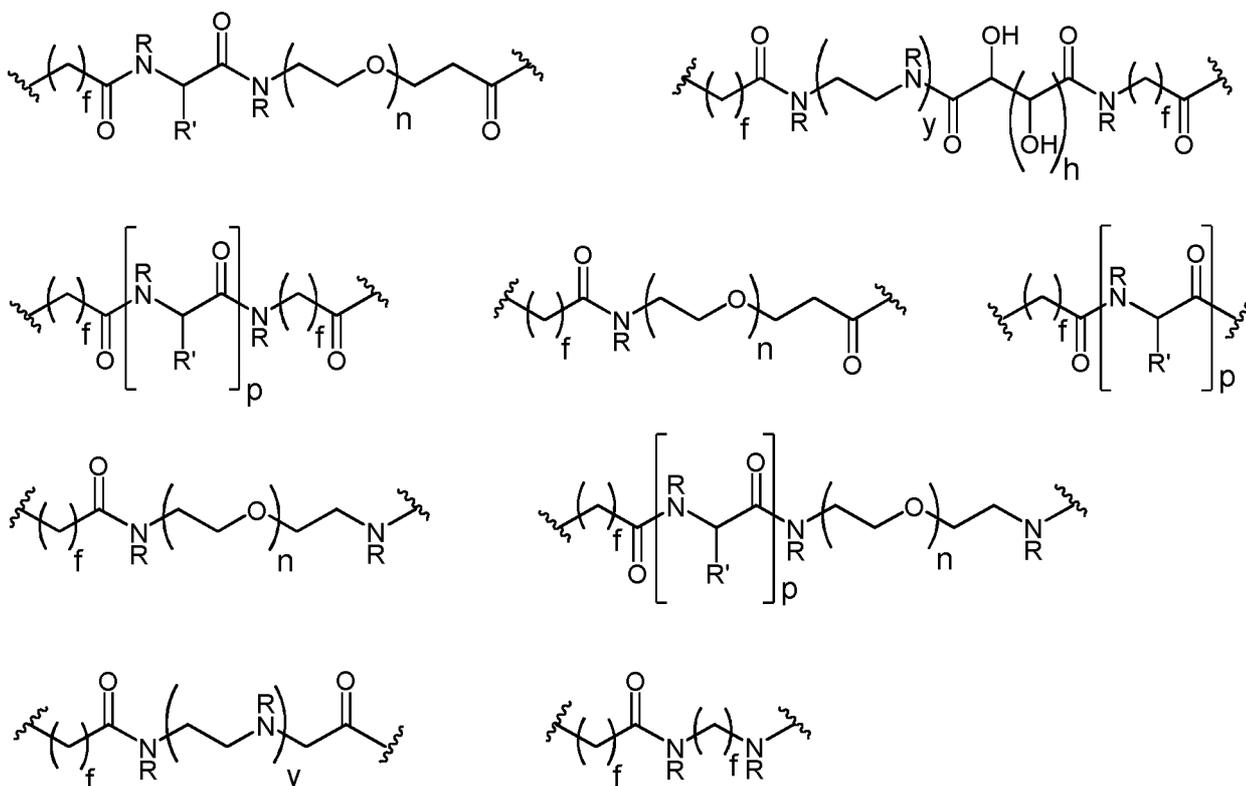
В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^1$  представляет собой  $-CONR^{15}$ -,  $T^2$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^2$  представляет собой  $-NR^{15}$ -,  $T^3$  отсутствует,  $V^3$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^4$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил и  $V^4$  представляет собой  $-NR^{15}$ -.

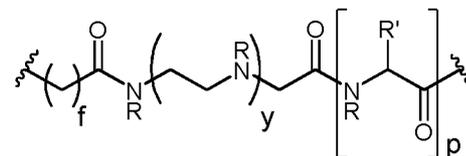
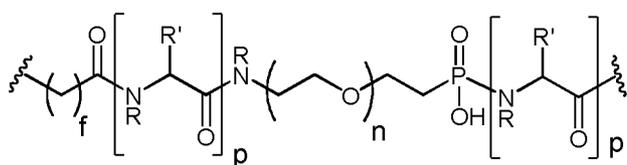
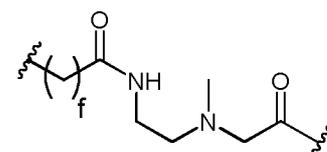
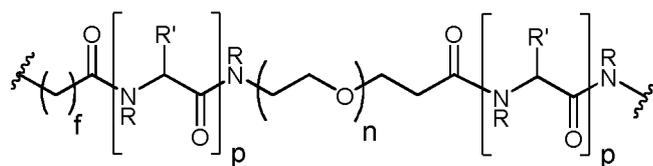
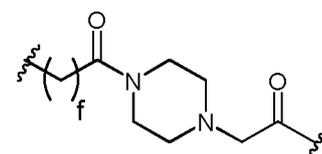
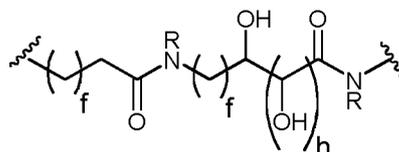
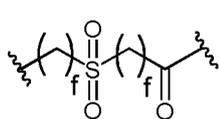
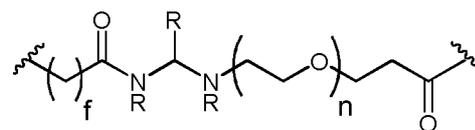
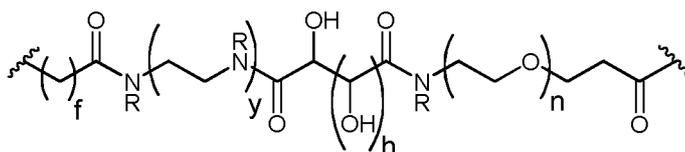
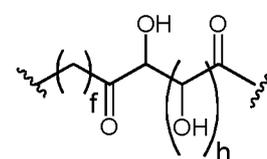
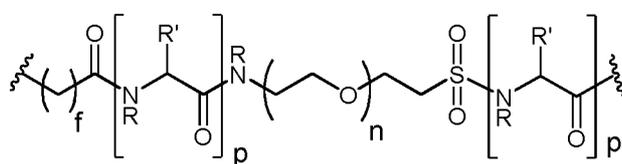
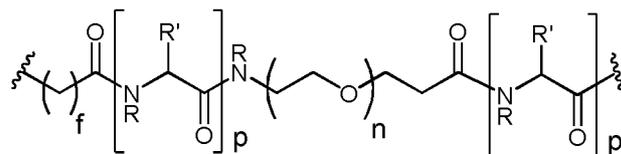
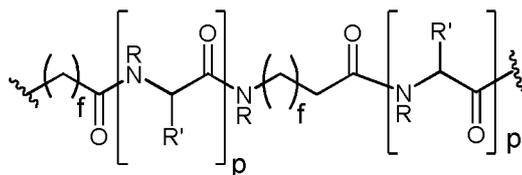
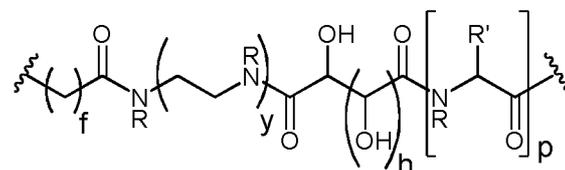
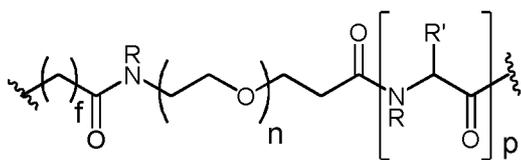
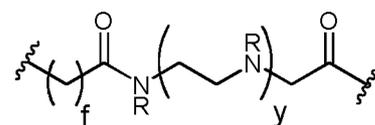
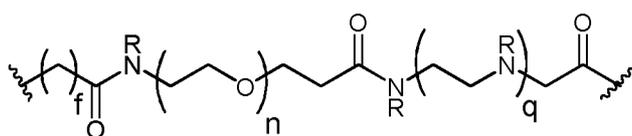
В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^1$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^2$  представляет собой  $(ЭДА)_w$ ,  $V^2$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^3$  представляет собой  $(CR^{13}OH)_h$ ,  $V^3$  представляет собой  $-CONR^{15}$ -,  $T^4$  представляет собой  $(ПЭГ)_n$  и  $V^4$  представляет собой  $-CO(АК)_p$ -.

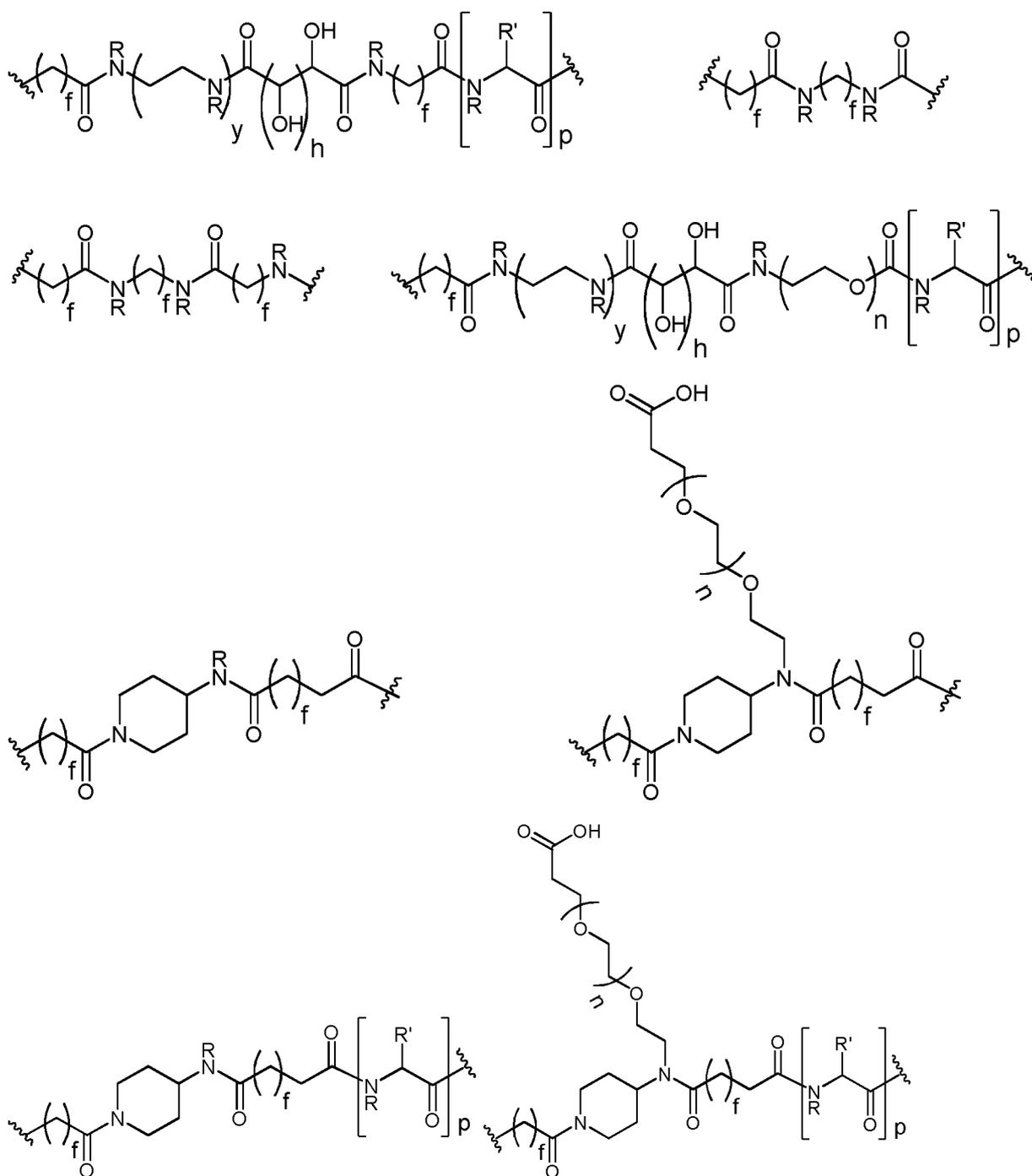
В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^1$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^2$  представляет собой 4АП,  $V^2$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^3$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^3$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^4$  представляет собой  $(АК)_p$  и  $V^4$  отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления  $T^1$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^1$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^2$  представляет собой 4АП,  $V^2$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^3$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^3$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^4$  отсутствует и  $V^4$  отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления линкер представлен одной из следующих структур:



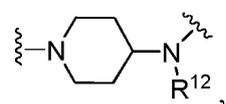




В некоторых вариантах осуществления линкерных структур, изображенных выше, каждый  $f$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 12, каждый  $y$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 20, каждый  $n$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 30, каждый  $p$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 20, каждый  $h$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 12, каждый  $R$  независимо представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкокси, замещенный алкокси, amino, замещенный amino, карбоксил, сложный эфир карбоновой кислоты, ацил, ацилокси, ациламино, aminoацил, алкиламид,

замещенный алкиламид, сульфонил, тиаалкокси, замещенный тиаалкокси, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл и замещенный гетероцикл, и каждый R<sup>1</sup> независимо представляет собой H, боковую цепь аминокислоты, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкокси, замещенный алкокси, амино, замещенный амино, карбоксил, сложный эфир карбоновой кислоты, ацил, ацилокси, ациламино, аминоксил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил, тиаалкокси, замещенный тиаалкокси, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл и замещенный гетероцикл. В некоторых вариантах осуществления линкерных структур, изображенных выше, каждый f независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, каждый y независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, каждый n независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, каждый p независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, и каждый h независимо равен 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления линкерных структур, изображенных выше, каждый R независимо представляет собой H, метил или -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-OH, где m равен 1, 2, 3 или 4 (например, 2).

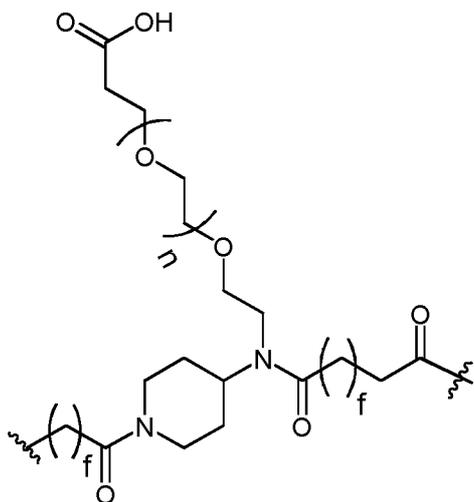
В некоторых вариантах осуществления линкера L, T<sup>1</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>1</sup> представляет собой -CO-, T<sup>2</sup> представляет собой 4АП, V<sup>2</sup> представляет собой -CO-, T<sup>3</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>3</sup> представляет собой -CO-, T<sup>4</sup> отсутствует и V<sup>4</sup> отсутствует. В некоторых вариантах осуществления T<sup>1</sup> представляет собой этилен, V<sup>1</sup> представляет собой -CO-, T<sup>2</sup> представляет собой 4АП, V<sup>2</sup> представляет собой -CO-, T<sup>3</sup> представляет собой этилен, V<sup>3</sup> представляет собой -CO-, T<sup>4</sup> отсутствует и V<sup>4</sup> отсутствует. В некоторых вариантах осуществления T<sup>1</sup> представляет собой этилен, V<sup>1</sup> представляет собой -CO-, T<sup>2</sup> представляет собой 4АП, V<sup>2</sup> представляет собой -CO-, T<sup>3</sup> представляет собой этилен, V<sup>3</sup> представляет собой -CO-, T<sup>4</sup> отсутствует и V<sup>4</sup> отсутствует, где T<sup>2</sup> (например, 4АП) имеет следующую структуру:



где

R<sup>12</sup> представляет собой полиэтиленгликолевый фрагмент (например, полиэтиленгликоль или модифицированный полиэтиленгликоль).

В некоторых вариантах осуществления линкера L включает следующую структуру:



где

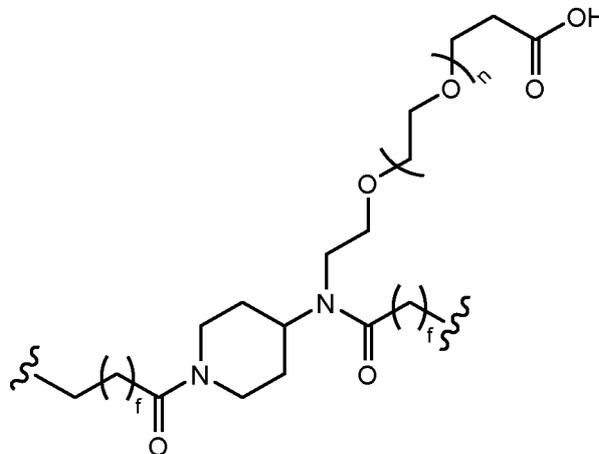
каждый  $f$  независимо представляет собой целое число от 1 до 12, и

$n$  представляет собой целое число от 1 до 30.

В некоторых вариантах осуществления  $f$  равен 1. В некоторых вариантах осуществления  $f$  равен 2. В некоторых вариантах осуществления один  $f$  равен 2, а другой  $f$  равен 1.

В некоторых вариантах осуществления  $n$  равен 1.

В некоторых вариантах осуществления линкер  $L$  включает следующую структуру:



где

каждый  $f$  независимо представляет собой целое число от 1 до 12, и

$n$  представляет собой целое число от 1 до 30.

В некоторых вариантах осуществления  $f$  равен 1. В некоторых вариантах осуществления  $f$  равен 2. В некоторых вариантах осуществления один  $f$  равен 2, а другой  $f$  равен 1. В некоторых вариантах оба  $f$  равны 1.

В некоторых вариантах осуществления  $n$  равен 1.

В некоторых вариантах осуществления левая сторона вышеуказанной линкерной структуры присоединена к гидразинил-индолильному или гидразинил-пирроло-

пиридинильному связывающему фрагменту, а правая сторона вышеуказанной линкерной структуры присоединена к майтансину.

Любое из химических соединений, линкеров и связывающих фрагментов, указанных в приведенных выше структурах, может быть адаптировано для применения в соединениях и конъюгатах по настоящему изобретению.

Дополнительное изобретение, относящееся к гидразинил-индолильному и гидразинил-пирроло-пиридинильному соединениям и способам получения конъюгата, раскрыто в публикации заявки на патент США 2014/0141025, поданной 11 марта 2013 г., и публикации заявки на патент США 2015/0157736, поданной 26 ноября 2014 г., содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

### АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD22

Как отмечено выше, конъюгат по настоящему изобретению может содержать в качестве заместителя  $W^2$  антитело против CD22, где антитело против CD22 было модифицировано с включением остатка 2-формилглицина (FGly). В контексте настоящего описания аминокислоты могут упоминаться по их стандартному названию, их стандартному трехбуквенному сокращению и/или их стандартному однобуквенному сокращению, такому как: аланин или Ala или A, Цистеин или Cys или C, Аспарагиновая кислота или Asp или D, Глутаминовая кислота или Glu или E, Фенилаланин или Phe или F, Глицин или Gly или G, Гистидин или His или H, Изолейцин или Ile или I, Лизин или Lys или K, Лейцин или Leu или L, Метионин или Met или M, Аспарагин или Asn или N, Пролин или Pro или P, Глутамин или Gln или Q, Аргинин или Arg или R, Серин или Ser или S, Треонин или Thr или T, Валин или Val или V, Триптофан или Trp или W, и тирозин или Tyr или Y.

В некоторых вариантах осуществления подходящее антитело против CD22 специфически связывает полипептид CD22, где эпитоп содержит аминокислотные остатки в антигене CD22 (например, в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670, аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C).

Эпитоп CD22 может быть образован полипептидом, имеющим по меньшей мере примерно 75 %, по меньшей мере примерно 80 %, по меньшей мере примерно 85 %, по меньшей мере примерно 90 %, по меньшей мере примерно 95 %, по меньшей мере примерно 98 %, по меньшей мере примерно 99 % или 100 % идентичности аминокислотной последовательности по отношению к смежному фрагменту от примерно 500 аминокислот до примерно 670 аминокислот аминокислотной последовательности

изоформы 4 CD22 человека, изображенной на фиг. 8A-8C. Эпитоп CD22 может быть образован полипептидом, имеющим, по меньшей мере примерно 75 %, по меньшей мере примерно 80 %, по меньшей мере примерно 85 %, по меньшей мере примерно 90 %, по меньшей мере примерно 95 %, по меньшей мере примерно 98 %, по меньшей мере примерно 99 % или 100 % идентичности аминокислотной последовательности по отношению к смежному фрагменту от примерно 500 аминокислот до примерно 751 аминокислот аминокислотной последовательности изоформы 3 CD22 человека, изображенной на фиг. 8A-8C. Эпитоп CD22 может быть образован полипептидом, имеющим по меньшей мере примерно 75 %, по меньшей мере примерно 80 %, по меньшей мере примерно 85 %, по меньшей мере примерно 90 %, по меньшей мере примерно 95 %, по меньшей мере примерно 98 %, по меньшей мере примерно 99 % или 100 % идентичности аминокислотной последовательности по отношению к смежному фрагменту от примерно 500 аминокислот до примерно 759 аминокислот аминокислотной последовательности изоформы 2 CD22 человека, изображенной на фиг. 8A-8C. Эпитоп CD22 может быть образован полипептидом, имеющим по меньшей мере примерно 75 %, по меньшей мере примерно 80 %, по меньшей мере примерно 85 %, по меньшей мере примерно 90 %, по меньшей мере примерно 95 %, по меньшей мере примерно 98 %, по меньшей мере примерно 99 % или 100 % идентичности аминокислотной последовательности по отношению к смежному фрагменту от примерно 500 аминокислот до примерно 847 аминокислот аминокислотной последовательности изоформы 1 CD22 человека, изображенной на фиг. 8A-8C.

"Антиген CD22" или "полипептид CD22" может включать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 75 %, по меньшей мере примерно 80 %, по меньшей мере примерно 90 %, по меньшей мере примерно 95 %, по меньшей мере примерно 98 %, по меньшей мере примерно 99 % или 100 % идентичности аминокислотной последовательности по отношению к смежному фрагменту от примерно 500 аминокислот (ак) до примерно 847 ак (изоформа 1), до примерно 759 ак (изоформа 2), до примерно 751 ак (изоформа 3) или до примерно 670 ак (изоформа 4) изоформы CD22 1, 2, 3 или 4 аминокислотной последовательности, изображенной на фиг. 8A-8C.

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 проявляет высокую аффинность связывания с CD22. Например, в некоторых случаях подходящее антитело против CD22 связывается с CD22 с аффинностью по меньшей мере примерно  $10^{-7}$  М, по меньшей мере примерно  $10^{-8}$  М, по меньшей мере примерно  $10^{-9}$  М, по меньшей мере примерно  $10^{-10}$  М, по меньшей мере примерно  $10^{-11}$  М, или по меньшей мере примерно  $10^{-12}$  М или более  $10^{-12}$  М. В некоторых случаях подходящее антитело против CD22

связывается с эпитопом, представленным на CD22, с аффинностью от примерно  $10^{-7}$  М до  $10^{-8}$  М, от  $10^{-8}$  М до  $10^{-9}$  М, от  $10^{-9}$  М до  $10^{-10}$  М, от  $10^{-10}$  М до  $10^{-11}$  М, или от примерно  $10^{-11}$  М до примерно  $10^{-12}$  М или более  $10^{-12}$  М.

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 конкурирует за связывание с эпитопом CD22 со вторым антителом против CD22 и/или связывается с тем же эпитопом CD22, что и второе антитело против CD22. В некоторых случаях антитело против CD22, которое конкурирует за связывание с эпитопом в CD22 со вторым антителом против CD22, также связывается с эпитопом в качестве второго антитела против CD22. В некоторых случаях антитело против CD22, которое конкурирует за связывание с эпитопом CD22 со вторым антителом против CD22, связывается с эпитопом, который перекрывается с эпитопом, связанным со вторым антителом против CD22. В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным.

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 может индуцировать апоптоз в клетке, которая экспрессирует CD22 на своей клеточной поверхности.

Антитело против CD22, подходящее для применения в конъюгате по настоящему изобретению, в некоторых случаях будет ингибировать пролиферацию опухолевых клеток человека, которые сверхэкспрессируют CD22, где ингибирование происходит *in vitro*, *in vivo* или как *in vitro*, так и *in vivo*. Например, в некоторых случаях антитело против CD22, подходящее для применения в конъюгате по настоящему изобретению, ингибирует пролиферацию опухолевых клеток человека, которые сверхэкспрессируют CD22, по меньшей мере примерно на 15 %, по меньшей мере примерно на 20 %, по меньшей мере примерно на 25 %, по меньшей мере примерно на 30 %, по меньшей мере примерно на 40 %, по меньшей мере примерно на 50 %, по меньшей мере примерно на 60 %, по меньшей мере примерно на 70 %, по меньшей мере примерно на 80 % или более 80%, например, по меньшей мере примерно на 85 %, по меньшей мере примерно на 90 %, по меньшей мере примерно на 95 %, по меньшей мере примерно на 98 %, по меньшей мере примерно на 99 % или 100 %.

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в антигене CD22 (например, в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670 аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C), с антителом, содержащим область, определяющую комплементарность тяжелой цепи (CDR), выбранную из IYDMS (VH CDR1, SEQ ID NO: 17), YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2, SEQ ID NO: 18) и HSGYGSSYGVLFAAY (VH CDR3, SEQ ID NO: 19). В некоторых случаях

антитело против CD22 является гуманизированным. В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в антигене CD22 (например, в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670 аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C), с антителом, содержащим CDR легкой цепи, выбранную из RASQDISNYLN (VL CDR1, SEQ ID NO: 20), YTSILHS (VL CDR2, SEQ ID NO: 21) и QQGNTLPWT (VL CDR3, SEQ ID NO: 22). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным.

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в антигене CD22 (например, в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670 аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C), с антителом, содержащим CDR вариабельной области тяжелой цепи IYDMS (VH CDR1, SEQ ID NO: 17), YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2, SEQ ID NO: 18) и HSGYGSSYGVLFAFAY (VH CDR3, SEQ ID NO: 19). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным. В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в антигене CD22 (например, эпитоп в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670 аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C), с антителом, содержащим CDR вариабельной области легкой цепи RASQDISNYLN (VL CDR1, SEQ ID NO: 20), YTSILHS (VL CDR2, SEQ ID NO: 21) и QQGNTLPWT (VL CDR3, SEQ ID NO: 22). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным. В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитоп, содержащий аминокислотные остатки в антигене CD22 (например, в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670 аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C), с антителом, которое содержит CDR вариабельной области тяжелой цепи IYDMS (VH CDR1, SEQ ID NO: 17), YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2, SEQ ID NO: 18) и HSGYGSSYGVLFAFAY (VH CDR3, SEQ ID NO: 19) и CDR вариабельной области легкой цепи RASQDISNYLN (VL CDR1, SEQ ID NO: 20), YTSILHS (VL CDR2, SEQ ID NO: 21) и

QQGNTLPWT (VL CDR3, SEQ ID NO: 22). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным.

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 содержит CDR варибельной области тяжелой цепи IYDMS (VH CDR1, SEQ ID NO: 17), YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2, SEQ ID NO: 18) и HSGYGSSYGVLFAFAY (VH CDR3, SEQ ID NO: 19). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным. В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 включает CDR варибельной области легкой цепи RASQDISNYLN (VL CDR1, SEQ ID NO: 20), YTSILHS (VL CDR2, SEQ ID NO: 21) и QQGNTLPWT (VL CDR3, SEQ ID NO: 22). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным. В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 содержит CDR варибельной области тяжелой цепи IYDMS (VH CDR1, SEQ ID NO: 17), YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2, SEQ ID NO: 18) и HSGYGSSYGVLFAFAY (VH CDR3, SEQ ID NO: 19) и CDR варибельной области легкой цепи RASQDISNYLN (VL CDR1, SEQ ID NO: 20), YTSILHS (VL CDR2, SEQ ID NO: 21) и QQGNTLPWT (VL CDR3, SEQ ID NO: 22). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным.

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 содержит CDR варибельной области тяжелой цепи (VH), присутствующие в VH-области антитела против CD22, содержащей следующую аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGTTYYPDTVKG RFTISRDN AKNSLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFAYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 23). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным.

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 содержит CDR варибельной области легкой цепи (VL), присутствующие в VL-области антитела против CD22, содержащей следующую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 24). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным.

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 содержит CDR варибельной области тяжелой цепи, представленные в EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKG RFTISRDN AKNSLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFAYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 23) и CDR варибельной области легкой цепи, представленные в DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHSGVPS

RFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGKVEIKR (SEQ ID NO: 24).

В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным.

В некоторых случаях, подходящее антитело против CD22 содержит: а) тяжелую цепь, содержащую VH-область, имеющую аминокислотную последовательность EVQLVESGGGLVKPGGSLX<sup>1</sup>LSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTT YYPDTVKGRFTISRDNAX<sup>2</sup>LYLQMX<sup>3</sup>SLRAEDTAMYYCARHSGYGSYGVLFAYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 25), где X<sup>1</sup> представляет собой K (Lys) или R (Arg); X<sup>2</sup> представляет собой S (Ser) или T (Thr), и X<sup>3</sup> представляет собой N (Asn) или S (Ser) и b) легкую цепь иммуноглобулина.

Легкая цепь может иметь любую подходящую аминокислотную последовательность V<sub>L</sub>, при условии, что полученное антитело специфически связывается с CD22.

Типичные аминокислотные последовательности V<sub>L</sub> включают:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHS  
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGKVEIKR (SEQ ID  
NO: 24, VK1),

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHS  
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGKVEIKR (SEQ ID  
NO: 26, VK2), и

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHS  
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGKVEIKR (SEQ ID  
NO: 27, VK4).

Таким образом, например, подходящее антитело против CD22 может содержать: а) тяжелую цепь, содержащую VH-область, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, содержащую VL-область VK1 (SEQ ID NO: 24). В других случаях подходящее антитело против CD22 может содержать: а) тяжелую цепь, содержащую VH-область, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, содержащую VL-область VK2 (SEQ ID NO: 26). В других случаях рассматриваемое антитело против CD22 может содержать: а) тяжелую цепь, содержащую VH-область, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, содержащую VL-область VK4 (SEQ ID NO: 27).

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 содержит: а) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность DIQMTQSPSSX<sup>1</sup>SASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAX<sup>2</sup>KLLIYYTSILHSGVP

SRFSGSGSGTDYTLTISSLQX<sup>3</sup>EDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 28), где X<sup>1</sup> представляет собой L (Leu) или V (Val), X<sup>2</sup> представляет собой V (Val) или P (Pro), и X<sup>3</sup> представляет собой Q (Gln) или P (Pro), и b) тяжелую цепь иммуноглобулина. Тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, выбранную из:

EVQLVESGGGLV<sup>K</sup>PGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSG  
GGTTYYPDTV<sup>K</sup>GRFTISRDN<sup>A</sup>KNTLYLQ<sup>M</sup>SSLRAEDTAMYYCARHSGY<sup>G</sup>SSYGVLFAY  
WGQ<sup>G</sup>TLVTVSS (SEQ ID NO: 29, VH3),

EVQLVESGGGLV<sup>K</sup>PGGSLRLS<sup>C</sup>AASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSG  
GGTTYYPDTV<sup>K</sup>GRFTISRDN<sup>A</sup>KNSLYLQ<sup>M</sup>SSLRAEDTAMYYCARHSGY<sup>G</sup>SSYGVLFAY  
WGQ<sup>G</sup>TLVTVSS (SEQ ID NO: 23, VH4),

EVQLVESGGGLV<sup>K</sup>PGGSLKLS<sup>C</sup>AASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSG  
GGTTYYPDTV<sup>K</sup>GRFTISRDN<sup>A</sup>KNSLYLQ<sup>M</sup>NSLRAEDTAMYYCARHSGY<sup>G</sup>SSYGVLFAY  
WGQ<sup>G</sup>TLVTVSS (SEQ ID NO: 30, VH5), и

EVQLVESGGGLV<sup>K</sup>PGGSLKLS<sup>C</sup>AASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSG  
GGTTYYPDTV<sup>K</sup>GRFTISRDN<sup>A</sup>KNSLYLQ<sup>M</sup>SSLRAEDTAMYYCARHSGY<sup>G</sup>SSYGVLFAY  
WGQ<sup>G</sup>TLVTVSS (SEQ ID NO: 31, VH6).

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 содержит VH-область, содержащую следующую аминокислотную последовательность:  
EVQLVESGGGLV<sup>K</sup>PGGSLRLS<sup>C</sup>AASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTT  
YYPDTV<sup>K</sup>GRFTISRDN<sup>A</sup>KNSLYLQ<sup>M</sup>SSLRAEDTAMYYCARHSGY<sup>G</sup>SSYGVLFAYWGQ  
GTLVTVSS (SEQ ID NO: 23).

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 содержит VH-область, содержащую следующую аминокислотную последовательность:  
EVQLVESGGGLV<sup>K</sup>PGGSLRLS<sup>C</sup>AASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTT  
YYPDTV<sup>K</sup>GRFTISRDN<sup>A</sup>KNSLYLQ<sup>M</sup>SSLRAEDTAMYYCARHSGY<sup>G</sup>SSYGVLFAYWGQ  
GTLVTVSS (SEQ ID NO: 23) и VL-область, содержащую следующую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASV<sup>G</sup>DRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHSGVPS  
RFSGSGSGTDYTLTISSLQ<sup>Q</sup>EDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 24).

Модифицированные последовательности константной области

Как отмечено выше, аминокислотная последовательность антитела против CD22 модифицирована и включает мотив сульфатазы, который содержит остаток серина или цистеина, который способен превращаться (окисляться) в остаток 2-формилглицина (FGly) посредством реакции формилглицин-образующего фермента (FGE), либо *in vivo* (например, во время трансляции белка, содержащего альд-метку в клетке), либо *in vitro*

(например, путем взаимодействия белка, содержащего альд-метку, с FGE в бесклеточной системе). Такие мотивы сульфатазы могут также упоминаться в настоящем описании как сайт FGE-модификации.

#### Мотивы сульфатазы

Минимальный мотив сульфатазы альдегидной метки обычно составляет 5 или 6 аминокислотных остатков в длину, обычно не более 6 аминокислотных остатков в длину. Мотивы сульфатазы, содержащиеся в полипептиде Ig, содержат по меньшей мере 5 или 6 аминокислотных остатков и могут быть, например, от 5 до 16, от 6 до 16, от 5 до 15, от 6 до 15, от 5 до 14, от 6 до 14, от 5 до 13, от 6 до 13, от 5 до 12, от 6 до 12, от 5 до 11, от 6 до 11, от 5 до 10, от 6 до 10, от 5 до 9, от 6 до 9, от 5 до 8 или от 6 до 8 аминокислотных остатков в длину, чтобы определить мотив сульфатазы длиной менее 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 или 7 аминокислотных остатков в длину.

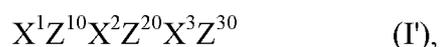
В некоторых вариантах осуществления представляющие интерес полипептиды включают те, у которых один или более аминокислотных остатков, например, 2 или более, или 3 или более, или 4 или более, или 5 или более, или 6 или более, или 7 или более, или 8 или более, или 9 или более, или 10 или более, или 11 или более, или 12 или более, или 13 или более, или 14 или более, или 15 или более, или 16 или более, или 17 или более, или 18 или более, или 19 или более, или 20 или более аминокислотных остатков были вставлены, удалены, замещены (заменены) относительно нативной аминокислотной последовательности, чтобы обеспечить последовательность мотива сульфатазы в полипептиде. В некоторых вариантах осуществления полипептид включает модификацию (вставку, добавление, делецию и/или замещение/замену) менее чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотных остатков аминокислотной последовательности относительно нативной аминокислотной последовательности полипептида. Когда аминокислотная последовательность, нативная для полипептида (например, антитело против CD22), содержит один или более остатков желаемого мотива сульфатазы, общее количество модификаций остатков может быть уменьшено, например, путем сайт-специфической модификации (вставка, добавление, делеция, замещение/замена) аминокислотных остатков, фланкирующих нативные аминокислотные остатки, для получения последовательности желаемого мотива сульфатазы. В некоторых вариантах осуществления степень модификации нативной аминокислотной последовательности целевого полипептида против CD22 минимизируется, чтобы минимизировать количество вставленных, удаленных, замещенных (замененных) или добавленных (например, к N- или C-концу) аминокислотных остатков. Минимизация степени модификации аминокислотной последовательности целевого полипептида против

CD22 может минимизировать влияние таких модификаций на функцию и/или структуру антитела против CD22.

Следует отметить, что, хотя альдегидные метки, представляющие особый интерес, содержат по меньшей мере минимальный мотив сульфатазы (также называемый "консенсусный мотив сульфатазы"), будет понятно, что более длинные альдегидные метки и предполагаются, и охватываются настоящим изобретением и могут найти применение в композициях и способах по настоящему изобретению. Альдегидные метки могут, таким образом, содержать минимальный мотив сульфатазы из 5 или 6 остатков или могут быть длиннее и содержать минимальный мотив сульфатазы, который может быть фланкирован на N- и/или C-концах мотива дополнительными аминокислотными остатками. Предполагаются альдегидные метки, например, из 5 или 6 аминокислотных остатков, и более длинные аминокислотные последовательности из более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислотных остатков.

Альдегидная метка может присутствовать на или вблизи C-конца тяжелой цепи Ig, например, альдегидная метка может присутствовать в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот C-конца нативной тяжелой цепи Ig дикого типа. Альдегидная метка может присутствовать в домене CH1 тяжелой цепи Ig. Альдегидная метка может присутствовать в домене CH2 тяжелой цепи Ig. Альдегидная метка может присутствовать в домене CH3 тяжелой цепи Ig. Альдегидная метка может присутствовать в константной области легкой цепи Ig, например, в константной области легкой цепи каппа или константной области легкой цепи лямбда.

В некоторых вариантах осуществления применяемый мотив сульфатазы может быть представлен формулой (SEQ ID NO: 191-192):



где

$Z^{10}$  представляет собой цистеин или серин (который также может быть представлен как (C/S)),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина (который также может быть представлен как (P/A)),

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту (например, аргинин (R) и может представлять собой лизин (K) или гистидин (H), например, лизин), или алифатическую аминокислоту (аланин (A), глицин (G), лейцин (L), валин (V), изолейцин (I) или пролин (P), например, A, G, L, V или I,

$X^1$  присутствует (SEQ ID NO: 191) или отсутствует (SEQ ID NO: 192) и, если присутствует, может представлять собой любую аминокислоту (например, любую

встречающуюся в природе аминокислоту), например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную незаряженную аминокислоту (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например L, M, V, S или T, например L, M, S или V при условии, что если мотив сульфатазы находится на N-конце целевого полипептида,  $X^1$  присутствует, и

$X^2$  и  $X^3$  независимо могут представлять собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), хотя обычно это алифатическая аминокислота, полярная незаряженная аминокислота или серосодержащая аминокислота (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, S, T, A, V, G или C, например, S, T, A, V или G.

Аминокислотная последовательность тяжелой и/или легкой цепи против CD22 может быть модифицирована с обеспечением последовательности по меньшей мере из 5 аминокислот формулы  $X^1Z^{10}X^2Z^{20}X^3Z^{30}$ , где

$Z^{10}$  представляет собой цистеин или серин,

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой алифатическую аминокислоту или основную аминокислоту,

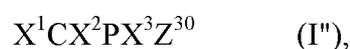
$X^1$  присутствует (SEQ ID NO: 191) или отсутствует (SEQ ID NO: 192) и, если присутствует, представляет собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), при условии, что если гетерологичный мотив сульфатазы находится на N-конце полипептида,  $X^1$  присутствует,

каждый  $X^2$  и  $X^3$  независимо представляют собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту),

где последовательность расположена в пределах или рядом с доступной для растворителя петлевой областью константной области Ig, и где последовательность не находится на C-конце тяжелой цепи Ig.

Мотив сульфатазы обычно выбирают так, чтобы он был способен к превращению выбранным FGE, например, FGE, присутствующим в клетке-хозяине, где экспрессируется меченый альдегидом полипептид, или FGE, который должен взаимодействовать с меченым альдегидом полипептидом в бесклеточной среде *in vitro*.

Например, когда FGE представляет собой эукариотический FGE (например, FGE млекопитающего, включая FGE человека), мотив сульфатазы может иметь формулу (SEQ ID NO: 193-194):



где

$X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 193) или отсутствовать (SEQ ID NO: 194) и, когда он присутствует, может представлять собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную незаряженную аминокислоту (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, L, M, S или V, при условии, что если мотив сульфатазы находится на N-конце целевого полипептида,  $X^1$  присутствует,

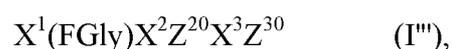
$X^2$  и  $X^3$  независимо могут представлять собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную незаряженную аминокислоту (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, S, T, A, V, G или C, например, S, T, A, V или G, и

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту (например, аргинин (R) и может представлять собой лизин (K) или гистидин (H), например, лизин), или алифатическую аминокислоту (аланин (A), глицин (G), лейцин (L), валин (V), изолейцин (I) или пролин (P), например, A, G, L, V или I.

Конкретные примеры мотивов сульфатазы включают LCTPSR (SEQ ID NO: 32), MCTPSR (SEQ ID NO: 33), VCTPSR (SEQ ID NO: 34), LCSPSR (SEQ ID NO: 35), LCAPSR (SEQ ID NO: 36), LCVPSR (SEQ ID NO: 37), LCGPSR (SEQ ID NO: 38), ICTPAR (SEQ ID NO: 39), LCTPSK (SEQ ID NO: 40), MCTPSK (SEQ ID NO: 41), VCTPSK (SEQ ID NO: 42), LCSPSK (SEQ ID NO: 43), LCAPSK (SEQ ID NO: 44), LCVPSK (SEQ ID NO: 45), LCGPSK (SEQ ID NO: 46), LCTPSA (SEQ ID NO: 47), ICTPAA (SEQ ID NO: 48), MCTPSA (SEQ ID NO: 49), VCTPSA (SEQ ID NO: 50), LCSPSA (SEQ ID NO: 51), LCAPSA (SEQ ID NO: 52), LCVPSA (SEQ ID NO: 53) и LCGPSA (SEQ ID NO: 54).

#### FGly-содержащие последовательности

При действии FGE на модифицированную тяжелую и/или легкую цепь антитела против CD22, серин или цистеин в мотиве сульфатазы модифицируется до FGly. Таким образом, FGly-содержащий мотив сульфатазы может иметь формулу (SEQ ID NO: 187 и 188):



где

FGly представляет собой остаток формилглицина,

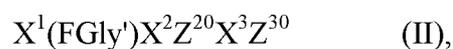
$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина (который также может быть представлен как (P/A)),

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту (например, аргинин (R) и может представлять собой лизин (K) или гистидин (H), обычно лизин) или алифатическую аминокислоту (аланин (A), глицин (G), лейцин (L), валин (V), изолейцин (I) или пролин (P), например, A, G, L, V или I,

$X^1$  может присутствовать (то есть SEQ ID NO: 187) или отсутствовать (то есть SEQ ID NO: 188) и, когда он присутствует, может представлять собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), например алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную незаряженную аминокислоту (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например L, M, V, S или T, например L, M или V, при условии, что если мотив сульфатазы находится на N-конце целевого полипептида,  $X^1$  присутствует, и

$X^2$  и  $X^3$  независимо могут представлять собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную незаряженную аминокислоту (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, S, T, A, V, G или C, например, S, T, A, V или G.

Как описано выше, модифицированный полипептид, содержащий остаток FGly, может быть конъюгирован с лекарственным средством (например, майтансиноидом) посредством взаимодействия FGly с лекарственным средством (например, лекарственным средством, содержащим гидразинил-индолильный или гидразинил-пирролопиридинильный связывающий фрагмент, как описано выше) с получением FGly'-содержащего мотива сульфатазы. Используемый в настоящем описании термин FGly' относится к модифицированному аминокислотному остатку мотива сульфатазы, который связан с лекарственным средством, например, майтансиноид (например, модифицированный аминокислотный остаток формулы (I)). Таким образом, FGly'-содержащий мотив сульфатазы может иметь формулу (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина (который также может быть представлен как (P/A)),

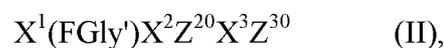
$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту (например, аргинин (R) и может представлять собой лизин (K) или гистидин (H), обычно лизин) или алифатическую

аминокислоту (аланин (A), глицин (G), лейцин (L), валин (V), изолейцин (I) или пролин (P), например, A, G, L, V или I,

$X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда он присутствует, может представлять собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), например алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную незаряженную аминокислоту (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например L, M, V, S или T, например L, M или V, при условии, что если мотив сульфатазы находится на N-конце целевого полипептида,  $X^1$  присутствует, и

$X^2$  и  $X^3$  независимо могут представлять собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную незаряженную аминокислоту (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, S, T, A, V, G или C, например, S, T, A, V или G.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный аминокислотный остаток формулы (I) расположен на C-конце константной области тяжелой цепи антитела против CD22. В некоторых случаях константная область тяжелой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина (который также может быть представлен как (P/A)),

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту (например, аргинин (R) и может представлять собой лизин (K) или гистидин (H), обычно лизин) или алифатическую аминокислоту (аланин (A), глицин (G), лейцин (L), валин (V), изолейцин (I) или пролин (P), например, A, G, L, V или I,

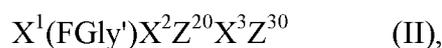
$X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда он присутствует, может представлять собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), например алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную незаряженную аминокислоту (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например L, M, V, S или T, например L, M или V, при условии, что если мотив сульфатазы находится на N-конце целевого полипептида,  $X^1$  присутствует,

$X^2$  и  $X^3$  независимо могут представлять собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную незаряженную аминокислоту (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, S, T, A, V, G или C, например, S, T, A, V или G, и

где последовательность является С-концевой по отношению к аминокислотной последовательности QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 55), и где последовательность может включать 1, 2, 3, 4, 5 или от 5 до 10 аминокислот, не присутствующих в нативной константной области тяжелой цепи Ig дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи включает последовательность SLSLSPGSL(FGly')TPSRGS (SEQ ID NO: 56) на С-конце тяжелой цепи Ig, например, вместо нативной последовательности SLSLSPGK (SEQ ID NO: 57).

В некоторых вариантах осуществления модифицированный аминокислотный остаток формулы (I) расположен в константной области легкой цепи антитела против CD22. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина (который также может быть представлен как (P/A)),

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту (например, аргинин (R) и может представлять собой лизин (K) или гистидин (H), обычно лизин) или алифатическую аминокислоту (аланин (A), глицин (G), лейцин (L), валин (V), изолейцин (I) или пролин (P), например, A, G, L, V или I,

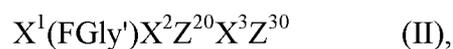
$X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда он присутствует, может представлять собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), например алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную незаряженную аминокислоту (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например L, M, V, S или T, например L, M или V, при условии, что если мотив сульфатазы находится на N-конце целевого полипептида,  $X^1$  присутствует,

$X^2$  и  $X^3$  независимо могут представлять собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную незаряженную аминокислоту (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, S, T, A, V, G или C, например, S, T, A, V или G, и

где последовательность является С-концевой по отношению к аминокислотной последовательности KVDNAL (SEQ ID NO: 58) и/или является N-концевой по отношению к аминокислотной последовательности QSGNSQ (SEQ ID NO: 59).

В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи содержит последовательность KVDNAL(FGly')TPSRQSGNSQ (SEQ ID NO: 60).

В некоторых вариантах осуществления модифицированный аминокислотный остаток формулы (I) расположен в области CH1 тяжелой цепи антитела против CD22. В некоторых вариантах осуществления область CH1 тяжелой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина (который также может быть представлен как (P/A)),

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту (например, аргинин (R) и может представлять собой лизин (K) или гистидин (H), обычно лизин) или алифатическую аминокислоту (аланин (A), глицин (G), лейцин (L), валин (V), изолейцин (I) или пролин (P), например, A, G, L, V или I,

$X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда он присутствует, может представлять собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), например алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную незаряженную аминокислоту (отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например L, M, V, S или T, например L, M или V, при условии, что когда мотив сульфатазы находится на N-конце целевого полипептида,  $X^1$  присутствует,

$X^2$  и  $X^3$  независимо могут представлять собой любую аминокислоту (например, любую встречающуюся в природе аминокислоту), например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную незаряженную

аминокислоту (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, S, T, A, V, G или C, например, S, T, A, V или G, и

где последовательность является С-концевой по отношению к аминокислотной последовательности SWNSGA (SEQ ID NO: 61) и/или является N-концевой по отношению к аминокислотной последовательности GVHTFP (SEQ ID NO: 62).

В некоторых вариантах осуществления область CH1 тяжелой цепи содержит последовательность SWNSGAL(FGly')TPSRGVHTFP (SEQ ID NO: 63).

#### Сайт модификации

Как отмечено выше, аминокислотная последовательность антитела против CD22 модифицирована и включает мотив сульфатазы, который содержит остаток серина или цистеина, который способен превращаться (окисляться) в остаток FGly под действием FGE либо *in vivo* (например, во время трансляции белка, содержащего альд-метку в клетке), либо *in vitro* (например, путем взаимодействия белка, содержащего альд-метку, с FGE в бесклеточной системе). Полипептиды против CD22, применяемые для получения конъюгата по настоящему изобретению, включают по меньшей мере константную область Ig, например константную область тяжелой цепи Ig (например, по меньшей мере домен CH1, по меньшей мере домен CH1 и домен CH2, домен CH1, CH2 и CH3, или домен CH1, CH2, CH3 и CH4) или константную область легкой цепи Ig. Такие полипептиды Ig обозначены в настоящем описании как "целевые полипептиды Ig" или "целевые антитела против CD22" или "целевые полипептиды Ig против CD22".

Сайт в антителе против CD22, в который введен мотив сульфатазы может представлять собой любой подходящий сайт. Как отмечено выше, в некоторых случаях степень модификации нативной аминокислотной последовательности целевого полипептида против CD22 сводится к минимуму с тем, чтобы минимизировать количество аминокислотных остатков, которые вставлены, удалены, замещены (заменены) и/или добавлены (например, к N- или С-концу). Минимизация степени модификации аминокислотной последовательности целевого полипептида против CD22 может минимизировать влияние таких модификаций на функцию и/или структуру антитела против CD22.

Константная область тяжелой цепи антитела против CD22 может включать константные области Ig любого изотипа тяжелой цепи, не встречающиеся в природе константные области тяжелой цепи Ig (включая консенсусные константные области тяжелой цепи Ig). Константная область Ig может быть модифицирована с включением альдегидной метки, где альдегидная метка присутствует в пределах или рядом с доступной для растворителя петлевой областью константной области Ig. Константная

область Ig может быть модифицирована путем вставки и/или замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 аминокислот или более 16 аминокислот с обеспечением аминокислотной последовательности мотива сульфатазы, как описано выше.

В некоторых случаях альдегид-меченое антитело против CD22, содержит альдегид-меченую константную область тяжелой цепи Ig (например, по меньшей мере, домен CH1, по меньшей мере домен CH1 и CH2, домен CH1, CH2 и CH3 или домен CH1, CH2, CH3 и CH4). Альдегид-меченая константная область тяжелой цепи Ig может содержать последовательности константной области тяжелой цепи изотипа IgA, IgM, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или любого его аллотипического варианта, например последовательности константной области тяжелой цепи человека или последовательности константной области тяжелой цепи мыши, гибридную константную область тяжелой цепи, синтетическую константную область тяжелой цепи или консенсусную последовательность константной области тяжелой цепи и т.д., модифицированные таким образом, чтобы содержать по меньшей мере один мотив сульфатазы, который может быть модифицирован с помощью FGE с образованием FGly-модифицированного полипептида Ig. Аллотипические варианты тяжелых цепей Ig известны в данной области техники. См., например, Jefferis and Lefranc (2009) MAbs 1:4.

В некоторых случаях альдегид-меченое антитело против CD22 содержит альдегид-меченую константную область легкой цепи Ig. Альдегид-меченая константная область легкой цепи Ig может включать последовательности константной области легкой цепи каппа, легкой цепи лямбда, например, константные области легкой цепи каппа или лямбда человека, гибридной константной области легкой цепи, синтетической константной области легкой цепи, или консенсусной последовательности константной области легкой цепи и т.д., модифицированные таким образом, чтобы содержать по меньшей мере один мотив сульфатазы, который может быть модифицирован с помощью FGE с образованием FGly-модифицированного полипептида антитела против CD22. Типичные константные области включают области гамма-1 и гамма-3 человека. За исключением мотива сульфатазы, модифицированная константная область может иметь аминокислотную последовательность дикого типа или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70 % идентична (например, по меньшей мере на 80 %, по меньшей мере на 90 % или по меньшей мере на 95 % идентична) аминокислотной последовательности дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы находится в положении, отличном от или в дополнение к, С-конца тяжелой цепи полипептида Ig. Как отмечено выше, выделенный альдегид-меченный полипептид против CD22 может содержать

константную область тяжелой цепи, модифицированную таким образом, чтобы содержать мотив сульфатазы, как описано выше, где мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с доступной на поверхности петлевой областью константной области тяжелой цепи полипептида против CD22.

В некоторых случаях целевой иммуноглобулин против CD22 модифицируют для того, чтобы включить мотив сульфатазы, как определено выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG1, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты со 122 по 127; 2) аминокислоты со 137 по 143; 3) аминокислоты со 155 по 158; 4) аминокислоты со 163 по 170; 5) аминокислоты со 163 по 183; 6) аминокислоты со 179 по 183; 7) аминокислоты со 190 по 192; 8) аминокислоты с 200 по 202; 9) аминокислоты со 199 по 202; 10) аминокислоты с 208 по 212; 11) аминокислоты с 220 по 241; 12) аминокислоты с 247 по 251; 13) аминокислоты с 257 по 261; 14) аминокислота с 269 по 277; 15) аминокислоты с 271 по 277; 16) аминокислоты с 284 по 285; 17) аминокислоты с 284 по 292; 18) аминокислоты с 289 по 291; 19) аминокислоты с 299 по 303; 20) аминокислоты с 309 по 313; 21) аминокислоты с 320 по 322; 22) аминокислоты с 329 по 335; 23) аминокислоты с 341 по 349; 24) аминокислоты с 342 по 348; 25) аминокислоты с 356 по 365; 26) аминокислоты с 377 по 381; 27) аминокислоты с 388 по 394; 28) аминокислоты с 398 по 407; 29) аминокислоты с 433 по 451 и 30) аминокислоты с 446 по 451, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как показано на фигуре 9B.

В некоторых случаях целевой иммуноглобулин против CD22 модифицируют для того, чтобы включить мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG1, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 16 по 22; 3) аминокислоты с 34 по 47; 4) аминокислоты с 42 по 49; 5) аминокислоты с 42 по 62; 6) аминокислоты с 34 по 37; 7) аминокислоты с 69 по 71; 8) аминокислоты с 79 по 81; 9) аминокислоты с 78 по 81; 10) аминокислоты с 87 по 91; 11) аминокислоты с 100 по 121; 12) аминокислоты со 127 по 131; 13) аминокислоты со 137 по 141; 14) аминокислоты со 149 по 157; 15) аминокислоты со 151 по 157; 16) аминокислоты со 164 по 165; 17) аминокислоты со 164 по 172; 18) аминокислоты со 169 по 171; 19) аминокислоты со 179 по 183; 20) аминокислоты со 189 по 193; 21) аминокислоты с 200 по 202; 22) аминокислоты с 209 по 215; 23) аминокислоты

с 221 по 229; 24) аминокислоты с 22 по 228; 25) аминокислоты с 236 по 245; 26) аминокислоты с 217 по 261; 27) аминокислоты с 268 по 274; 28) аминокислоты с 278 по 287; 29) аминокислоты с 313 по 331; и 30) аминокислоты с 324 по 331, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO: 7 (константная область IgG1 человека, последовательность изображена на фигуре 9B).

Типичные доступные на поверхности петлевые области тяжелой цепи IgG1 включают: 1) ASTKGP (SEQ ID NO: 64); 2) KSTSGGT (SEQ ID NO: 65); 3) PEPV (SEQ ID NO: 66); 4) NSGALTSG (SEQ ID NO: 67); 5) NSGALTSGVHTFPAVLQSSGL (SEQ ID NO: 68); 6) QSSGL (SEQ ID NO: 69); 7) VTV (SEQ ID NO: 70); 8) QTY (SEQ ID NO: 71); 9) TQTY (SEQ ID NO: 72); 10) HKPSN (SEQ ID NO: 73); 11) EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 74); 12) FPPKP (SEQ ID NO: 75); 13) ISRTP (SEQ ID NO: 76); 14) DVSHEDPEV (SEQ ID NO: 77); 15) SHEDPEV (SEQ ID NO: 78); 16) DG (SEQ ID NO: 79); 17) DGVEVHNAK (SEQ ID NO: 80); 18) HNA (SEQ ID NO: 81); 19) QYNST (SEQ ID NO: 82); 20) VLTVL (SEQ ID NO: 83); 21) GKE (SEQ ID NO: 84); 22) NKALPAP (SEQ ID NO: 85); 23) SKAKGQPRE (SEQ ID NO: 86); 24) KAKGQPR (SEQ ID NO: 87); 25) PPSRKELTKN (SEQ ID NO: 88); 26) YPSDI (SEQ ID NO: 89); 27) NGQPENN (SEQ ID NO: 90); 28) TPPVLDSGGS (SEQ ID NO: 91); 29) HEALHNHYTQKLSLSPGK (SEQ ID NO: 92) и 30) SLSPGK (SEQ ID NO: 93), как показано на фиг. 9A и 9B.

В некоторых случаях целевой иммуноглобулин модифицируют так, чтобы он включал мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG2, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 13 по 24; 3) аминокислоты с 33 по 37; 4) аминокислоты с 43 по 54; 5) аминокислоты с 58 по 63; 6) аминокислоты с 69 по 71; 7) аминокислоты с 78 по 80; 8) 87 по 89; 9) аминокислоты с 95 по 96; 10) со 114 по 118; 11) со 122 по 126; 12) со 134 по 136; 13) со 144 по 152; 14) со 159 по 167; 15) со 175 по 176; 16) со 184 по 188; 17) со 195 по 197; 18) с 204 по 210; 19) с 216 по 224; 20) с 231 по 233; 21) с 237 по 241; 22) с 252 по 256; 23) с 263 по 269; 24) с 273 по 282; 25) аминокислоты с 299 по 302, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8 (IgG2 человека, также изображен на фигуре 9B).

Типичные доступные на поверхности петлевые области тяжелой цепи IgG2 включают 1) ASTKGP (SEQ ID NO: 64); 2) PCSRSTSESTAA (SEQ ID NO: 94); 3) FPEPV

(SEQ ID NO: 95); 4) SGALTSGVHTFP (SEQ ID NO: 96); 5) QSSGLY (SEQ ID NO: 97); 6) VTV (SEQ ID NO: 70); 7) TQT (SEQ ID NO: 98); 8) HKP (SEQ ID NO: 99); 9) DK (SEQ ID NO: 100); 10) VAGPS (SEQ ID NO: 101); 11) FPPKP (SEQ ID NO: 75); 12) RTP (SEQ ID NO: 102); 13) DVSHEDPEV (SEQ ID NO: 77); 14) DGVEVHNAK (SEQ ID NO: 80); 15) FN (SEQ ID NO: 103); 16) VLTVV (SEQ ID NO: 104); 17) GKE (SEQ ID NO: 84); 18) NKGLPAP (SEQ ID NO: 105); 19) SKTKGQPRE (SEQ ID NO: 106); 20) PPS (SEQ ID NO: 107); 21) MTKNQ (SEQ ID NO: 108); 22) YPSDI (SEQ ID NO: 89); 23) NGQPENN (SEQ ID NO: 90); 24) TPPMLDSGGS (SEQ ID NO: 109); 25) GNVF (SEQ ID NO: 110) и 26) HEALHNHYTQKSLSPGK (SEQ ID NO: 92), как показано на фиг. 9B.

В некоторых случаях целевой иммуноглобулин модифицируют так, чтобы он включал мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG3, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 13 по 22; 3) аминокислоты с 33 по 37; 4) аминокислоты с 43 по 61; 5) аминокислота 71; 6) аминокислоты с 78 по 80; 7) с 87 по 91; 8) аминокислоты с 97 по 106; 9) со 111 по 115; 10) со 147 по 167; 11) со 173 по 177; 16) со 185 по 187; 13) со 195 по 203; 14) с 210 по 218; 15) с 226 по 227; 16) с 238 по 239; 17) с 246 по 248; 18) с 255 по 261; 19) с 267 по 275; 20) с 282 по 291; 21) аминокислоты с 303 по 307; 22) аминокислоты с 313 по 320; 23) аминокислоты с 324 по 333; 24) аминокислоты с 350 по 352; 25) аминокислоты с 359 по 365 и 26) аминокислоты с 372 по 377, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9 (IgG3 человека, также изображен на фигуре 9B).

Типичные доступные на поверхности петлевые области тяжелой цепи IgG3 включают 1) ASTKGP (SEQ ID NO: 64); 2) PCSRSTSGGT (SEQ ID NO: 111); 3) FPEPV (SEQ ID NO: 95); 4) SGALTSGVHTFPAVLQSSG (SEQ ID NO: 112); 5) V (SEQ ID NO: 113); 6) TQT (SEQ ID NO: 98); 7) HKPSN (SEQ ID NO: 73); 8) RVELKTPLGD (SEQ ID NO: 114); 9) CPRCPKP (SEQ ID NO: 115); 10) PKSCDTPPPCPRCPPELLGG (SEQ ID NO: 116); 11) FPPKP (SEQ ID NO: 75); 12) RTP (SEQ ID NO: 102); 13) DVSHEDPEV (SEQ ID NO: 77); 14) DGVEVHNAK (SEQ ID NO: 80); 15) YN (SEQ ID NO: 117); 16) VL (SEQ ID NO: 118); 17) GKE (SEQ ID NO: 84); 18) NKALPAP (SEQ ID NO: 85); 19) SKTKGQPRE (SEQ ID NO: 119); 20) PPSREEMTKN (SEQ ID NO: 120); 21) YPSDI (SEQ ID NO: 89); 22) SSGQPENN (SEQ ID NO: 121); 23) TPPMLDSGGS (SEQ ID NO: 109); 24) GNI (SEQ ID NO: 122); 25) HEALHNR (SEQ ID NO: 123); и 26) SLSPGK (SEQ ID NO: 93), как показано на фиг. 9B.

В некоторых случаях целевой иммуноглобулин модифицируют так, чтобы он включал мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG4, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 5; 2) аминокислоты с 12 по 23; 3) аминокислоты с 32 по 36; 4) аминокислоты с 42 по 53; 5) аминокислоты с 57 по 62; 6) аминокислоты с 68 по 70; 7) аминокислоты с 77 по 79; 8) аминокислоты с 86 по 88; 9) аминокислоты с 94 по 95; 10) аминокислоты с 101 по 102; 11) аминокислоты с 108 по 118; 12) аминокислоты с 122 по 126; 13) аминокислоты с 134 по 136; 14) аминокислоты с 144 по 152; 15) аминокислоты с 159 по 167; 16) аминокислоты с 175 по 176; 17) аминокислоты с 185 по 186; 18) аминокислоты с 196 по 198; 19) аминокислоты с 205 по 211; 20) аминокислоты с 217 по 226; 21) аминокислоты с 232 по 241; 22) аминокислоты с 253 по 257; 23) аминокислоты с 264 по 265; 24) с 269 по 270; 25) аминокислоты с 274 по 283; 26) аминокислоты с 300 по 303; 27) аминокислоты с 399 по 417, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10 (IgG4 человека, также изображен на фигуре 9B).

Типичные доступные на поверхности петлевые области тяжелой цепи IgG4 включают 1) STKGP (SEQ ID NO: 124); 2) PCSRSTSESTAA (SEQ ID NO: 94); 3) FPEPV (SEQ ID NO: 95); 4) SGALTSGVHTFP (SEQ ID NO: 96); 5) QSSGLY (SEQ ID NO: 97); 6) VTV (SEQ ID NO: 70); 7) TKT (SEQ ID NO: 125); 8) HKP (SEQ ID NO: 99); 9) DK (SEQ ID NO: 100); 10) YG (SEQ ID NO: 126); 11) CPAPEFLGGPS (SEQ ID NO: 127); 12) FPPKP (SEQ ID NO: 75); 13) RTP (SEQ ID NO: 102); 14) DVSQEDPEV (SEQ ID NO: 128); 15) DGVEVHNAK (SEQ ID NO: 80); 16) FN (SEQ ID NO: 103); 17) VL (SEQ ID NO: 118); 18) GKE (SEQ ID NO: 84); 19) NKGLPSS (SEQ ID NO: 129); 20) SKAKGQPREP (SEQ ID NO: 130); 21) PPSQEEMTKN (SEQ ID NO: 131); 22) YPSDI (SEQ ID NO: 89); 23) NG (SEQ ID NO: 132); 24) NN (SEQ ID NO: 133); 25) TPPVLDSGDS (SEQ ID NO: 91); 26) GNVF (SEQ ID NO: 110) и 27) HEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 134), как показано на фиг. 9B.

В некоторых случаях целевой иммуноглобулин модифицируют так, чтобы он включал мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgA, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 13; 2) аминокислоты с 17 по 21; 3) аминокислоты с 28 по 32; 4)

аминокислоты с 44 по 54; 5) аминокислоты с 60 по 66; 6) аминокислоты с 73 по 76; 7) аминокислоты с 80 по 82; 8) аминокислоты с 90 по 91; 9) аминокислоты с 123 по 125; 10) аминокислоты с 130 по 133; 11) аминокислоты с 138 по 142; 12) аминокислоты с 151 по 158; 13) аминокислоты с 165 по 174; 14) аминокислоты с 181 по 184; 15) аминокислоты с 192 по 195; 16) аминокислота 199; 17) аминокислоты с 209 по 210; 18) аминокислоты с 222 по 245; 19) аминокислоты с 252 по 256, 20) аминокислоты с 266 по 276, 21) аминокислоты с 293 по 294; 22) аминокислоты с 301 по 304; 23) аминокислоты с 317 по 320; 24) аминокислоты с 329 по 353, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11 (IgA человека, также изображен на фигуре 9B).

Типичные доступные на поверхности петлевые области тяжелой цепи IgA включают 1) ASPTSPKVFPLSL (SEQ ID NO: 135); 2) QPDGN (SEQ ID NO: 136); 3) VQGFFPQEPL (SEQ ID NO: 137); 4) SGQGV TARNFP (SEQ ID NO: 138); 5) SGDLYTT (SEQ ID NO: 139); 6) PATQ (SEQ ID NO: 140); 7) GKS (SEQ ID NO: 141); 8) YT (SEQ ID NO: 142); 9) CHP (SEQ ID NO: 143); 10) HHPA (SEQ ID NO: 144); 11) LLGSE (SEQ ID NO: 145); 12) GLRDASGV (SEQ ID NO: 146); 13) SSGKSAVQGP (SEQ ID NO: 147); 14) GCYS (SEQ ID NO: 148); 15) CAEP (SEQ ID NO: 149); 16) PE (SEQ ID NO: 150); 17) SGNTFRPEVHLLPPPSEELALNEL (SEQ ID NO: 151); 18) ARGFS (SEQ ID NO: 152); 19) QGSQELPREKY (SEQ ID NO: 153); 20) AV (SEQ ID NO: 154); 21) AAED (SEQ ID NO: 155); 22) HEAL (SEQ ID NO: 156) и 23) IDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY (SEQ ID NO: 157); как показано на фиг. 9B.

Мотив сульфатазы может быть расположен в пределах или рядом с одной или более из указанных аминокислотных последовательностей таких сайтов модификации тяжелой цепи Ig. Например, полипептид тяжелой цепи Ig может быть модифицирован (например, когда модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков) в одной или более из указанных аминокислотных последовательностей, чтобы обеспечить мотив сульфатазы, смежный и N-концевой и/или смежный и C-концевой относительно указанных сайтов модификации. Альтернативно или дополнительно, полипептид тяжелой цепи Ig может быть модифицирован (например, когда модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков) в одной или более из указанных аминокислотных последовательностей, чтобы обеспечить мотив сульфатазы между любыми двумя остатками сайтов модификации тяжелой цепи Ig. В некоторых вариантах осуществления полипептид тяжелой цепи Ig может быть модифицирован таким образом, чтобы содержать два мотива, которые могут быть смежными относительно друг друга, или

которые могут быть разделены одним, двумя, тремя, четырьмя или более (например, от примерно 1 до примерно 25, от примерно 25 до примерно 50 или от примерно 50 до примерно 100, или более аминокислот). Альтернативно или дополнительно, где нативная аминокислотная последовательность предусматривает один или более аминокислотных остатков последовательности мотива сульфатазы, выбранные аминокислотные остатки в сайтах модификации аминокислотной последовательности полипептида тяжелой цепи Ig могут быть модифицированы (например, когда модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков), чтобы обеспечить мотив сульфатазы в сайте модификации.

Таким образом, аминокислотная последовательность доступной на поверхности петлевой области может быть модифицирована с образованием мотива сульфатазы, где модификации могут включать вставки, делеции и/или замены. Например, если модификация находится в домене CH1, доступная на поверхности петлевая область, может иметь аминокислотную последовательность NSGALTSG (SEQ ID NO: 67), и альдегид-меченная последовательность может представлять собой, например, NSGALCTPSRG (SEQ ID NO: 158), например, где остатки "TS" последовательности NSGALTSG (SEQ ID NO: 67) заменены на "CTPSR", то есть NSGALCTPSRG (SEQ ID NO: 159), так что мотив сульфатазы имеет последовательность LCTPSR (SEQ ID NO: 32). В качестве другого примера, где модификация находится в домене CH2, доступная на поверхности петлевая область может иметь аминокислотную последовательность NKALPAP (SEQ ID NO: 85), а альдегид-меченная последовательность может представлять собой, например, NLCTPSRAP (SEQ ID NO: 160), например, где остатки "KAL" последовательности NKALPAP (SEQ ID NO: 85) заменены на "LCTPSR", так что мотив сульфатазы имеет последовательность LCTPSR (SEQ ID NO: 32). В качестве другого примера, где модификация находится в домене CH2/CH3, доступная на поверхности петлевая область может иметь аминокислотную последовательность КАКGQPR (SEQ ID NO: 87), а альдегид-меченная последовательность может представлять собой, например, КАКGLCTPSR (SEQ ID NO: 161), например, где остатки "GQP" последовательности КАКGQPR (SEQ ID NO: 87) заменены на "LCTPS", так что мотив сульфатазы имеет последовательность LCTPSR (SEQ ID NO: 32).

Как отмечено выше, выделенный альдегид-меченный -полипептид Ig против CD22 может содержать константную область легкой цепи, модифицированную таким образом, чтобы включать мотив сульфатазы, как описано выше, где мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с доступной на поверхности петлевой областью константной области

легкой цепи полипептида Ig. Типичные примеры доступных на поверхности петлевых областей константной области легкой цепи представлены на фиг. 9А и 9С.

В некоторых случаях целевой иммуноглобулин модифицируют так, чтобы он включал мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области легкой цепи Ig, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 130 по 135; 2) аминокислоты с 141 по 143; 3) аминокислота 150; 4) аминокислоты с 162 по 166; 5) аминокислоты с 163 по 166; 6) аминокислоты с 173 по 180; 7) аминокислоты с 186 по 194; 8) аминокислоты с 211 по 212; 9) аминокислоты с 220 по 225; 10) аминокислоты с 233 по 236, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот легкой цепи каппа человека, как показано на фиг. 9С. В некоторых случаях целевой иммуноглобулин модифицируют так, чтобы он включал мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области легкой цепи Ig, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 12 по 14; 3) аминокислота 21; 4) аминокислоты с 33 по 37; 5) аминокислоты с 34 по 37; 6) аминокислоты с 44 по 51; 7) аминокислоты с 57 по 65; 8) аминокислоты с 83 по 83; 9) аминокислоты с 91 по 96; 10) аминокислоты с 104 по 107, где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO: 12 и 13 (легкая цепь каппа человека, аминокислотные последовательности изображены на фиг. 9С, то есть seq1 и seq2 соответственно).

Типичные доступные на поверхности петлевые области легкой цепи Ig (например, легкой цепи каппа человека) включают: 1) RTVAAP (SEQ ID NO: 162); 2) PPS (SEQ ID NO: 107); 3) Gly (см., например, Gly в положении 150 последовательности легкой цепи каппа человека, изображенной на фиг. 9С); 4) YPREA (SEQ ID NO: 163); 5) PREA (SEQ ID NO: 164); 6) DNALQSGN (SEQ ID NO: 165); 7) TEQDSKDST (SEQ ID NO: 166), 8) НК (SEQ ID NO: 167); 9) HQGLSS (SEQ ID NO: 168) и 10) RGEC (SEQ ID NO: 169), как показано на фиг. 9А и 9С.

Типичные доступные на поверхности петлевые области легкой цепи лямбда Ig, например, seq3 (SEQ ID NO: 14) на фиг. 9С, включают QPKAAP (SEQ ID NO: 170), PPS (SEQ ID NO: 107), НК (SEQ ID NO: 171), DFYPGAV (SEQ ID NO: 172), DSSPVKAG (SEQ ID NO: 173), TTP (SEQ ID NO: 174), SN (SEQ ID NO: 175), HKS (SEQ ID NO: 176), EG (SEQ ID NO: 177) и APTECS (SEQ ID NO: 178), как показано на фиг. 9С.

В некоторых случаях целевой иммуноглобулин модифицируют так, чтобы он включал мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области легкой цепи Ig крысы, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 12 по 14; 3) аминокислоты с 121 по 22; 4) аминокислоты с 31 по 37; 5) аминокислоты с 44 по 51; 6) аминокислоты с 55 по 57; 7) аминокислоты с 61 по 62; 8) аминокислоты с 81 по 83; 9) аминокислоты с 91 по 92; 10) аминокислоты с 102 по 105, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот легкой цепи крысы, как указано в SEQ ID NO: 16 (seq5 изображено на фиг. 9C).

В некоторых случаях мотив сульфатазы встроен в область CH1 константной области тяжелой цепи против CD22. В некоторых случаях мотив сульфатазы встроен в или вблизи (например, в пределах от 1 до 10 аминокислот) С-конца тяжелой цепи против CD22. В некоторых случаях мотив сульфатазы встроен в константную область легкой цепи.

В некоторых случаях мотив сульфатазы встроен в область CH1 константной области тяжелой цепи против CD22, например, в пределах аминокислот с 121 по 219 аминокислотной последовательности тяжелой цепи IgG1, изображенной на фиг. 9A. Например, в некоторых случаях мотив сульфатазы встроен в аминокислотную последовательность:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE (SEQ ID NO: 179). Например, в некоторых из указанных вариантов осуществления аминокислотная последовательность GALTSGVH (SEQ ID NO: 180) модифицирована до GALCTPSRGVH (SEQ ID NO: 181), где мотив сульфатазы представляет собой LCTPSR (SEQ ID NO: 32).

В некоторых случаях мотив сульфатазы встроен в или вблизи С-конца тяжелой цепи против CD22, например мотивы сульфатазы встроены в 1 аминокислоту, 2 аминокислоты (ак), 3 ак, 4 ак, 5 ак, 6 ак, 7 ак, 8 ак, 9 ак или 10 ак С-конца тяжелой цепи против CD22. В качестве одного неограничивающего примера, С-концевой остаток лизина тяжелой цепи против CD22 может быть заменен аминокислотной последовательностью SLCTPSRGS (SEQ ID NO: 182).

В некоторых случаях мотив сульфатазы встроен в константную область легкой цепи антитела против CD22. В качестве одного неограничивающего примера, в некоторых случаях, мотив сульфатазы встроен в константную область легкой цепи антитела против

CD22, где мотив сульфатазы является С-концевым по отношению к KVDNAL (SEQ ID NO: 58), и/или является N-концевым по отношению к QSGNSQ (SEQ ID NO: 59). Например, в некоторых случаях мотив сульфатазы представляет собой LCTPSR (SEQ ID NO: 32), а легкая цепь против CD22 содержит аминокислотную последовательность KVDNALLCTPSRQSGNSQ (SEQ ID NO: 183).

#### Типичные антитела против CD22

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитопом в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670, аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8А-8С) с антителом, содержащим CDR VH тяжелой цепи, выбранную из IYDMS (VH CDR1, SEQ ID NO: 17), YISSGGGTYYPDVKG (VH CDR2, SEQ ID NO: 18) и HSGYGSSYGVLFAAY (VH CDR3, SEQ ID NO: 19). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным. В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG1, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 16 по 22; 3) аминокислоты с 34 по 47; 4) аминокислоты с 42 по 49; 5) аминокислоты с 42 по 62; 6) аминокислоты с 34 по 37; 7) аминокислоты с 69 по 71; 8) аминокислоты с 79 по 81; 9) аминокислоты с 78 по 81; 10) аминокислоты с 87 по 91; 11) аминокислоты с 100 по 121; 12) аминокислоты с 127 по 131; 13) аминокислоты с 137 по 141; 14) аминокислоты с 149 по 157; 15) аминокислоты с 151 по 157; 16) аминокислоты с 164 по 165; 17) аминокислоты с 164 по 172; 18) аминокислоты с 169 по 171; 19) аминокислоты с 179 по 183; 20) аминокислоты с 189 по 193; 21) аминокислоты с 200 по 202; 22) аминокислоты с 209 по 215; 23) аминокислоты с 221 по 229; 24) аминокислоты с 22 по 228; 25) аминокислоты с 236 по 245; 26) аминокислоты с 217 по 261; 27) аминокислоты с 268 по 274; 28) аминокислоты с 278 по 287; 29) аминокислоты с 313 по 331 и 30) аминокислоты с 324 по 331, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO: 7 (константная область IgG1 человека, изображенная на фигуре 9В). В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков, например, где мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области каппа Ig,

соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6, 2) аминокислоты с 12 по 14, 3) аминокислота 21, 4) аминокислоты с 33 по 37, 5) аминокислоты с 34 по 37, 6) аминокислоты с 44 по 51, 7) аминокислоты с 57 по 65, 8) аминокислоты с 83 по 83, 9) аминокислоты с 91 по 96, 10) аминокислоты с 104 по 107, где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO: 12 или 13 (легкие цепи каппа человека, аминокислотные последовательности изображены на фиг. 9C, то есть seq1 или seq2 соответственно).

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, с эпитопом в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670, аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C) с антителом, содержащим CDR легкой цепи, выбранный из RASQDISNYLN (VL CDR1, SEQ ID NO: 20), YTSILHS (VL CDR2, SEQ ID NO: 21) и QQGNTLPWT (VL CDR3, SEQ ID NO: 22). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным. В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG1, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 122 по 127; 2) аминокислоты с 137 по 143; 3) аминокислоты с 155 по 158; 4) аминокислоты с 163 по 170; 5) аминокислоты с 163 по 183; 6) аминокислоты с 179 по 183; 7) аминокислоты с 190 по 192; 8) аминокислоты с 200 по 202; 9) аминокислоты с 199 по 202; 10) аминокислоты с 208 по 212; 11) аминокислоты с 220 по 241; 12) аминокислоты с 247 по 251; 13) аминокислоты с 257 по 261; 14) аминокислоты с 269 по 277; 15) аминокислоты с 271 по 277; 16) аминокислоты с 284 по 285; 17) аминокислоты с 284 по 292; 18) аминокислоты с 289 по 291; 19) аминокислоты с 299 по 303; 20) аминокислоты с 309 по 313; 21) аминокислоты с 320 по 322; 22) аминокислоты с 329 по 335; 23) аминокислоты с 341 по 349; 24) аминокислоты с 342 по 348; 25) аминокислоты с 356 по 365; 26) аминокислоты с 377 по 381; 27) аминокислоты с 388 по 394; 28) аминокислоты с 398 по 407; 29) аминокислоты с 433 по 451 и 30) аминокислоты с 446 по 451, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как показано на фигуре 9B. В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков, например, когда мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области каппа Ig, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 12 по

14; 3) аминокислота 21; 4) аминокислоты с 33 по 37; 5) аминокислоты с 34 по 37; 6) аминокислоты с 44 по 51; 7) аминокислоты с 57 по 65; 8) аминокислоты с 83 по 83; 9) аминокислоты с 91 по 96; 10) аминокислоты с 104 по 107, где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO: 12 или 13 (легкие цепи каппа человека, аминокислотные последовательности изображены на фиг. 9C, то есть seq1 или seq2 соответственно).

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитопом в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670, аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C), с антителом, содержащим CDR VH IYDMS (VH CDR1, SEQ ID NO: 17), YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2, SEQ ID NO: 18) и HSGYGSSYGVLFAY (VH CDR3, SEQ ID NO: 19). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным. В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG1, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 16 по 22; 3) аминокислоты с 34 по 47; 4) аминокислоты с 42 по 49; 5) аминокислоты с 42 по 62; 6) аминокислоты с 34 по 37; 7) аминокислоты с 69 по 71; 8) аминокислоты с 79 по 81; 9) аминокислоты с 78 по 81; 10) аминокислоты с 87 по 91; 11) аминокислоты с 100 по 121; 12) аминокислоты с 127 по 131; 13) аминокислоты с 137 по 141; 14) аминокислоты с 149 по 157; 15) аминокислоты с 151 по 157; 16) аминокислоты с 164 по 165; 17) аминокислоты с 164 по 172; 18) аминокислоты с 169 по 171; 19) аминокислоты с 179 по 183; 20) аминокислоты с 189 по 193; 21) аминокислоты с 200 по 202; 22) аминокислоты с 209 по 215; 23) аминокислоты с 221 по 229; 24) аминокислоты с 22 по 228; 25) аминокислоты с 236 по 245; 26) аминокислоты с 217 по 261; 27) аминокислоты с 268 по 274; 28) аминокислоты с 278 по 287; 29) аминокислоты с 313 по 331 и 30) аминокислоты с 324 по 331, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO: 7 (константная область IgG1 человека, изображенная на фигуре 9B). В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков, например, где мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области каппа Ig, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 12 по 14; 3) аминокислота 21; 4) аминокислоты

с 33 по 37; 5) аминокислоты с 34 по 37; 6) аминокислоты с 44 по 51; 7) аминокислоты с 57 по 65; 8) аминокислоты с 83 по 83; 9) аминокислоты с 91 по 96; 10) аминокислоты с 104 по 107, где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO: 12 или 13 (легкие цепи каппа человека, аминокислотные последовательности, изображенные на фиг. 9C, seq1 или seq2 соответственно).

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитопом в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670, из аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C), с антителом, содержащим CDR VL RASQDISNYLN (VL CDR1, SEQ ID NO: 20), YTSILHS (VL CDR2, SEQ ID NO: 21) и QQGNTLPWT (VL CDR3, SEQ ID NO: 22). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным. В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG1, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 16 по 22; 3) аминокислоты с 34 по 47; 4) аминокислоты с 42 по 49; 5) аминокислоты с 42 по 62; 6) аминокислоты с 34 по 37; 7) аминокислоты с 69 по 71; 8) аминокислоты с 79 по 81; 9) аминокислоты с 78 по 81; 10) аминокислоты с 87 по 91; 11) аминокислоты с 100 по 121; 12) аминокислоты с 127 по 131; 13) аминокислоты с 137 по 141; 14) аминокислоты с 149 по 157; 15) аминокислоты с 151 по 157; 16) аминокислоты с 164 по 165; 17) аминокислоты с 164 по 172; 18) аминокислоты с 169 по 171; 19) аминокислоты с 179 по 183; 20) аминокислоты с 189 по 193; 21) аминокислоты с 200 по 202; 22) аминокислоты с 209 по 215; 23) аминокислоты с 221 по 229; 24) аминокислоты с 22 по 228; 25) аминокислоты с 236 по 245; 26) аминокислоты с 217 по 261; 27) аминокислоты с 268 по 274; 28) аминокислоты с 278 по 287; 29) аминокислоты с 313 по 331 и 30) аминокислоты с 324 по 331, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO: 7 (константная область IgG1 человека, изображенная на фигуре 9B). В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков, например, когда мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области каппа Ig, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6, 2) аминокислоты с 12 по 14, 3) аминокислота 21, 4) аминокислоты

с 33 по 37, 5) аминокислоты с 34 по 37, 6) аминокислоты с 44 по 51, 7) аминокислоты с 57 по 65, 8) аминокислоты с 83 по 83, 9) аминокислоты с 91 по 96, 10) аминокислоты с 104 по 107, где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO: 12 или 13 (легкие цепи каппа человека, аминокислотные последовательности изображены на фиг. 9C, то есть seq1 или seq2 соответственно).

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитопом в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670 аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C), с антителом, которое содержит CDR VH IYDMS (VH CDR1, SEQ ID NO: 17), YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2, SEQ ID NO: 18) и HSGYGSSYGVLFAY (VH CDR3, SEQ ID NO: 19) и CDR VL RASQDISNYLN (VL CDR1, SEQ ID NO: 20), YTSILHS (VL CDR2, SEQ ID NO: 21) и QQGNTLPWT (VL CDR3, SEQ ID NO: 22). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным. В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG1, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 16 по 22; 3) аминокислоты с 34 по 47; 4) аминокислоты с 42 по 49; 5) аминокислоты с 42 по 62; 6) аминокислоты с 34 по 37; 7) аминокислоты с 69 по 71; 8) аминокислоты с 79 по 81; 9) аминокислоты с 78 по 81; 10) аминокислоты с 87 по 91; 11) аминокислоты с 100 по 121; 12) аминокислоты с 127 по 131; 13) аминокислоты с 137 по 141; 14) аминокислоты с 149 по 157; 15) аминокислоты с 151 по 157; 16) аминокислоты с 164 по 165; 17) аминокислоты с 164 по 172; 18) аминокислоты с 169 по 171; 19) аминокислоты с 179 по 183; 20) аминокислоты с 189 по 193; 21) аминокислоты с 200 по 202; 22) аминокислоты с 209 по 215; 23) аминокислоты с 221 по 229; 24) аминокислоты с 22 по 228; 25) аминокислоты с 236 по 245; 26) аминокислоты с 217 по 261; 27) аминокислоты с 268 по 274; 28) аминокислоты с 278 по 287; 29) аминокислоты с 313 по 331 и 30) аминокислоты с 324 по 331, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO: 7 (константная область IgG1 человека, изображенная на фигуре 9B). В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков, например, где мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области каппа Ig,

соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 12 по 14; 3) аминокислота 21; 4) аминокислоты с 33 по 37; 5) аминокислоты с 34 по 37; 6) аминокислоты с 44 по 51; 7) аминокислоты с 57 по 65; 8) аминокислоты с 83 по 83; 9) аминокислоты с 91 по 96; 10) аминокислоты с 104 по 107, где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO: 12 или 13 (легкие цепи каппа человека, аминокислотные последовательности, изображенные на фигуре 9C, то есть seq1 или seq2, соответственно).

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 содержит CDR VH IYDMS (VH CDR1, SEQ ID NO: 17), YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2, SEQ ID NO: 18) и HSGYGSSYGVLFAAY (VH CDR3, SEQ ID NO: 19). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным. В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG1, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 16 по 22; 3) аминокислоты с 34 по 47; 4) аминокислоты с 42 по 49; 5) аминокислоты с 42 по 62; 6) аминокислоты с 34 по 37; 7) аминокислоты с 69 по 71; 8) аминокислоты с 79 по 81; 9) аминокислоты с 78 по 81; 10) аминокислоты с 87 по 91; 11) аминокислоты с 100 по 121; 12) аминокислоты с 127 по 131; 13) аминокислоты с 137 по 141; 14) аминокислоты с 149 по 157; 15) аминокислоты с 151 по 157; 16) аминокислоты с 164 по 165; 17) аминокислоты с 164 по 172; 18) аминокислоты с 169 по 171; 19) аминокислоты с 179 по 183; 20) аминокислоты с 189 по 193; 21) аминокислоты с 200 по 202; 22) аминокислоты с 209 по 215; 23) аминокислоты с 221 по 229; 24) аминокислоты с 22 по 228; 25) аминокислоты с 236 по 245; 26) аминокислоты с 217 по 261; 27) аминокислоты с 268 по 274; 28) аминокислоты с 278 по 287; 29) аминокислоты с 313 по 331 и 30) аминокислоты с 324 по 331, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO: 7 (константная область IgG1 человека, изображенная на фигуре 9B). В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков, например, где мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области каппа Ig, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 12 по 14; 3) аминокислота 21; 4) аминокислоты с 33 по 37; 5) аминокислоты с 34 по 37; 6) аминокислоты с 44 по 51; 7) аминокислоты с 57 по 65; 8) аминокислоты с 83 по 83; 9) аминокислоты с 91 по 96; 10) аминокислоты с 104 по 107, где нумерация аминокислот

основана на SEQ ID NO: 12 или 13 (легкие цепи каппа человека, аминокислотные последовательности изображены на фиг. 9C, то есть seq1 или seq2 соответственно).

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 включает CDR VL RASQDISNYLN (VL CDR1, SEQ ID NO: 20), YTSILHS (VL CDR2, SEQ ID NO: 21) и QQGNTLPWT (VL CDR3, SEQ ID NO: 22). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным. В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG1, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 16 по 22; 3) аминокислоты с 34 по 47; 4) аминокислоты с 42 по 49; 5) аминокислоты с 42 по 62; 6) аминокислоты с 34 по 37; 7) аминокислоты с 69 по 71; 8) аминокислоты с 79 по 81; 9) аминокислоты с 78 по 81; 10) аминокислоты с 87 по 91; 11) аминокислоты с 100 по 121; 12) аминокислоты с 127 по 131; 13) аминокислоты с 137 по 141; 14) аминокислоты с 149 по 157; 15) аминокислоты с 151 по 157; 16) аминокислоты с 164 по 165; 17) аминокислоты с 164 по 172; 18) аминокислоты с 169 по 171; 19) аминокислоты с 179 по 183; 20) аминокислоты с 189 по 193; 21) аминокислоты с 200 по 202; 22) аминокислоты с 209 по 215; 23) аминокислоты с 221 по 229; 24) аминокислоты с 22 по 228; 25) аминокислоты с 236 по 245; 26) аминокислоты с 217 по 261; 27) аминокислоты с 268 по 274; 28) аминокислоты с 278 по 287; 29) аминокислоты с 313 по 331 и 30) аминокислоты с 324 по 331, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO: 7 (константная область IgG1 человека, изображенная на фигуре 9B). В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков, например, когда мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области каппа Ig, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 12 по 14; 3) аминокислота 21; 4) аминокислоты с 33 по 37; 5) аминокислоты с 34 по 37; 6) аминокислоты с 44 по 51; 7) аминокислоты с 57 по 65; 8) аминокислоты с 83 по 83; 9) аминокислоты с 91 по 96; 10) аминокислоты с 104 по 107, где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO: 12 или 13 (легкие цепи каппа человека, аминокислотные последовательности, изображенные на фиг. 9C, seq1 или seq2 соответственно).

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 содержит CDR VH IYDMS (VH CDR1, SEQ ID NO: 17), YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2, SEQ ID NO: 18)

и HSGYGSSYGVLFAAY (VH CDR3, SEQ ID NO: 19) и CDR VL RASQDISNYLN (VL CDR1, SEQ ID NO: 20), YTSILHS (VL CDR2, SEQ ID NO: 21) и QQGNTLPWT (VL CDR3, SEQ ID NO: 22). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным. В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG1, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 16 по 22; 3) аминокислоты с 34 по 47; 4) аминокислоты с 42 по 49; 5) аминокислоты с 42 по 62; 6) аминокислоты с 34 по 37; 7) аминокислоты с 69 по 71; 8) аминокислоты с 79 по 81; 9) аминокислоты с 78 по 81; 10) аминокислоты с 87 по 91; 11) аминокислоты с 100 по 121; 12) аминокислоты с 127 по 131; 13) аминокислоты с 137 по 141; 14) аминокислоты с 149 по 157; 15) аминокислоты с 151 по 157; 16) аминокислоты с 164 по 165; 17) аминокислоты с 164 по 172; 18) аминокислоты с 169 по 171; 19) аминокислоты с 179 по 183; 20) аминокислоты с 189 по 193; 21) аминокислоты с 200 по 202; 22) аминокислоты с 209 по 215; 23) аминокислоты с 221 по 229; 24) аминокислоты с 22 по 228; 25) аминокислоты с 236 по 245; 26) аминокислоты с 217 по 261; 27) аминокислоты с 268 по 274; 28) аминокислоты с 278 по 287; 29) аминокислоты с 313 по 331 и 30) аминокислоты с 324 по 331, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO: 7 (константная область IgG1 человека, изображенная на фигуре 9B). В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков, например, когда мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области каппа Ig, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 12 по 14; 3) аминокислота 21; 4) аминокислоты с 33 по 37; 5) аминокислоты с 34 по 37; 6) аминокислоты с 44 по 51; 7) аминокислоты с 57 по 65; 8) аминокислоты с 83 по 83; 9) аминокислоты с 91 по 96; 10) аминокислоты с 104 по 107, где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO: 12 или 13 (легкие цепи каппа человека, аминокислотные последовательности, изображенные на фиг. 9C, seq1 или seq2 соответственно).

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 содержит CDR VH, присутствующую в VH-области против CD22, содержащей следующую аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTT

YYPDTVKGFRFTISRDNANKNSLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQ  
GTLVTVSS (SEQ ID NO: 23). В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным. В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG1, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 16 по 22; 3) аминокислоты с 34 по 47; 4) аминокислоты с 42 по 49; 5) аминокислоты с 42 по 62; 6) аминокислоты с 34 по 37; 7) аминокислоты с 69 по 71; 8) аминокислоты с 79 по 81; 9) аминокислоты с 78 по 81; 10) аминокислоты с 87 по 91; 11) аминокислоты с 100 по 121; 12) аминокислоты с 127 по 131; 13) аминокислоты с 137 по 141; 14) аминокислоты с 149 по 157; 15) аминокислоты с 151 по 157; 16) аминокислоты с 164 по 165; 17) аминокислоты с 164 по 172; 18) аминокислоты с 169 по 171; 19) аминокислоты с 179 по 183; 20) аминокислоты с 189 по 193; 21) аминокислоты с 200 по 202; 22) аминокислоты с 209 по 215; 23) аминокислоты с 221 по 229; 24) аминокислоты с 22 по 228; 25) аминокислоты с 236 по 245; 26) аминокислоты с 217 по 261; 27) аминокислоты с 268 по 274; 28) аминокислоты с 278 по 287; 29) аминокислоты с 313 по 331 и 30) аминокислоты с 324 по 331, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO: 7 (константная область IgG1 человека, изображенная на фигуре 9B). В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков, например, когда мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области каппа Ig, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 12 по 14; 3) аминокислота 21; 4) аминокислоты с 33 по 37; 5) аминокислоты с 34 по 37; 6) аминокислоты с 44 по 51; 7) аминокислоты с 57 по 65; 8) аминокислоты с 83 по 83; 9) аминокислоты с 91 по 96; 10) аминокислоты с 104 по 107, где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO: 12 или 13 (легкие цепи каппа человека, аминокислотные последовательности изображены на фиг. 9C, то есть seq1 или seq2 соответственно).

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 содержит CDR VL, присутствующие в VL-области против CD22, включающей следующую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHSGVPS  
RFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 24).

В некоторых случаях антитело против CD22 является гуманизированным. В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG1, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 16 по 22; 3) аминокислоты с 34 по 47; 4) аминокислоты с 42 по 49; 5) аминокислоты с 42 по 62; 6) аминокислоты с 34 по 37; 7) аминокислоты с 69 по 71; 8) аминокислоты с 79 по 81; 9) аминокислоты с 78 по 81; 10) аминокислоты с 87 по 91; 11) аминокислоты с 100 по 121; 12) аминокислоты с 127 по 131; 13) аминокислоты с 137 по 141; 14) аминокислоты с 149 по 157; 15) аминокислоты с 151 по 157; 16) аминокислоты с 164 по 165; 17) аминокислоты с 164 по 172; 18) аминокислоты с 169 по 171; 19) аминокислоты с 179 по 183; 20) аминокислоты с 189 по 193; 21) аминокислоты с 200 по 202; 22) аминокислоты с 209 по 215; 23) аминокислоты с 221 по 229; 24) аминокислоты с 22 по 228; 25) аминокислоты с 236 по 245; 26) аминокислоты с 217 по 261; 27) аминокислоты с 268 по 274; 28) аминокислоты с 278 по 287; 29) аминокислоты с 313 по 331 и 30) аминокислоты с 324 по 331, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO: 7 (константная область IgG1 человека, изображенная на фигуре 9B). В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков, например, когда мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области каппа Ig, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 12 по 14; 3) аминокислота 21; 4) аминокислоты с 33 по 37; 5) аминокислоты с 34 по 37; 6) аминокислоты с 44 по 51; 7) аминокислоты с 57 по 65; 8) аминокислоты с 83 по 83; 9) аминокислоты с 91 по 96; 10) аминокислоты с 104 по 107, где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO: 12 или 13 (легкие цепи каппа человека, аминокислотные последовательности, изображенные на фиг. 9C, seq1 или seq2 соответственно).

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 содержит CDR VH, присутствующие в EVQLVESGGGLV<sup>K</sup>PGGSLRLS<sup>A</sup>ASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTT YYPDTV<sup>K</sup>GRFTISRDN<sup>A</sup>KNSLYLQ<sup>M</sup>SSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 23) и CDR VL, присутствующие в DIQMTQSPSSLSASV<sup>G</sup>DRVITICRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHSGVPS

RFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 24).

В некоторых случаях, антитело против CD22 является гуманизированным. В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG1, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 16 по 22; 3) аминокислоты с 34 по 47; 4) аминокислоты с 42 по 49; 5) аминокислоты с 42 по 62; 6) аминокислоты с 34 по 37; 7) аминокислоты с 69 по 71; 8) аминокислоты с 79 по 81; 9) аминокислоты с 78 по 81; 10) аминокислоты с 87 по 91; 11) аминокислоты с 100 по 121; 12) аминокислоты с 127 по 131; 13) аминокислоты с 137 по 141; 14) аминокислоты с 149 по 157; 15) аминокислоты с 151 по 157; 16) аминокислоты с 164 по 165; 17) аминокислоты с 164 по 172; 18) аминокислоты с 169 по 171; 19) аминокислоты с 179 по 183; 20) аминокислоты с 189 по 193; 21) аминокислоты с 200 по 202; 22) аминокислоты с 209 по 215; 23) аминокислоты с 221 по 229; 24) аминокислоты с 22 по 228; 25) аминокислоты с 236 по 245; 26) аминокислоты с 217 по 261; 27) аминокислоты с 268 по 274; 28) аминокислоты с 278 по 287; 29) аминокислоты с 313 по 331 и 30) аминокислоты с 324 по 331, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO: 7 (константная область IgG1 человека, изображенная на фигуре 9B). В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков, например, когда мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области каппа Ig, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 12 по 14; 3) аминокислота 21; 4) аминокислоты с 33 по 37; 5) аминокислоты с 34 по 37; 6) аминокислоты с 44 по 51; 7) аминокислоты с 57 по 65; 8) аминокислоты с 83 по 83; 9) аминокислоты с 91 по 96; 10) аминокислоты с 104 по 107, где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO: 12 или 13 (легкие цепи каппа человека, аминокислотные последовательности, изображенные на фиг. 9C, seq1 или seq2 соответственно).

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 содержит аминокислотную последовательность VH  
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTT  
YYPDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQ  
GTLVTVSS (SEQ ID NO: 23). В некоторых случаях подходящее антитело против CD22

содержит аминокислотную последовательность VL  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYT SILHSGVPS  
RFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 24).

В некоторых случаях подходящее антитело против CD22 содержит аминокислотную последовательность VH

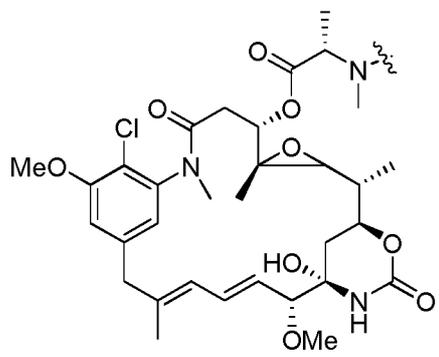
EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTT  
YYPDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSGYGGSSYGVLFAFWGQ  
GTLVTVSS (SEQ ID NO: 23), и аминокислотную последовательность VL  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYT SILHSGVPS  
RFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 24).

В некоторых случаях антитело против CD22 модифицируют так, чтобы оно включало мотив сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или более вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления мотив сульфатазы расположен в пределах или рядом с областью константной области тяжелой цепи IgG1, соответствующей одной или более из: 1) аминокислоты с 1 по 6; 2) аминокислоты с 16 по 22; 3) аминокислоты с 34 по 47; 4) аминокислоты с 42 по 49; 5) аминокислоты с 42 по 62; 6) аминокислоты с 34 по 37; 7) аминокислоты с 69 по 71; 8) аминокислоты с 79 по 81; 9) аминокислоты с 78 по 81; 10) аминокислоты с 87 по 91; 11) аминокислоты с 100 по 121; 12) аминокислоты с 127 по 131; 13) аминокислоты с 137 по 141; 14) аминокислоты с 149 по 157; 15) аминокислоты с 151 по 157; 16) аминокислоты с 164 по 165; 17) аминокислоты с 164 по 172; 18) аминокислоты с 169 по 171; 19) аминокислоты с 179 по 183; 20) аминокислоты с 189 по 193; 21) аминокислоты с 200 по 202; 22) аминокислоты с 209 по 215; 23) аминокислоты с 221 по 229; 24) аминокислоты с 22 по 228; 25) аминокислоты с 236 по 245; 26) аминокислоты с 217 по 261; 27) аминокислоты с 268 по 274; 28) аминокислоты с 278 по 287; 29) аминокислоты с 313 по 331 и 30) аминокислоты с 324 по 331, где нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO: 7 (константная область IgG1 человека, изображенная на фигуре 9B).

#### Лекарственные средства для конъюгации с полипептидом

Настоящее изобретение относится к конъюгатам лекарственного средства с полипептидом. Примеры лекарственных средств включают низкомолекулярные лекарственные средства, такие как противораковый агент. Например, где полипептид представляет собой антитело (или его фрагмент), которое обладает специфичностью к опухолевой клетке, антитело может быть модифицировано, как определено в настоящем описании, для включения модифицированной аминокислоты, которая может быть

впоследствии конъюгирована с противораковым агентом, например, агентами, воздействующими на микротрубочки. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство представляет собой агент, воздействующий на микротрубочки, который обладает антипролиферативной активностью, такой как майтансиноид. В определенных вариантах осуществления лекарственное средство представляет собой майтансиноид, который имеет следующую структуру:



где  $\sim$  обозначает точку присоединения между майтансиноидом и линкером L в формуле (I). Под "точкой присоединения" подразумевается, что символ  $\sim$  обозначает связь между N майтансиноида и линкером L в формуле (I). Например, в формуле (I)  $W^1$  представляет собой майтансиноид, такой как майтансиноид вышеописанной структуры, где  $\sim$  обозначает точку присоединения между майтансиноидом и линкером L.

Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления L представляет собой линкер, описываемый формулой  $-(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c-(L^4)_d-$ , где  $L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$  и  $L^4$  каждый независимо представляет собой линкерное звено. В некоторых вариантах осуществления  $L^1$  присоединен к связывающему фрагменту, такому как гидразинил-индолильный или гидразинил-пирроло-пиридиный связывающий фрагмент (например, как показано в формуле (I) выше). В некоторых вариантах осуществления  $L^2$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$  (майтансиноиду). В некоторых вариантах осуществления  $L^3$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$  (майтансиноиду). В некоторых вариантах осуществления  $L^4$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$  (майтансиноиду).

Как описано выше, в некоторых вариантах осуществления линкер  $-(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c-(L^4)_d-$  описывается формулой  $-(T^1-V^1)_a-(T^2-V^2)_b-(T^3-V^3)_c-(T^4-V^4)_d-$ , где a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления как описано выше,  $L^1$  присоединен к гидразинил-индолильному или гидразинил-пирроло-пиридиному связывающему фрагменту (например, как показано в формуле (I) выше). По существу, в некоторых вариантах осуществления  $T^1$  присоединен к гидразинил-индолильному или гидразинил-пирроло-пиридиному связывающему фрагменту (например, как показано в формуле (I) выше). В некоторых

вариантах осуществления  $V^1$  присоединен к  $W^1$  (майтансиноиду). В некоторых вариантах осуществления, как описано выше,  $L^2$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$  (майтансиноиду). По существу, в некоторых вариантах осуществления  $T^2$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$  (майтансиноиду), или  $V^2$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$  (майтансиноиду). В некоторых вариантах осуществления, как описано выше,  $L^3$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$  (майтансиноиду). По существу, в некоторых вариантах осуществления  $T^3$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$  (майтансиноиду), или  $V^3$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$  (майтансиноиду). В некоторых вариантах осуществления, как описано выше,  $L^4$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$  (майтансиноиду). По существу, в некоторых вариантах осуществления  $T^4$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$  (майтансиноид), или  $V^4$ , если присутствует, присоединен к  $W^1$  (майтансиноиду).

Варианты осуществления настоящего изобретения включают конъюгаты, в которых полипептид (например, антитело против CD22) конъюгирован с одним или более фрагментом лекарственного средства (например, мایتансиноидом), например, 2 фрагмента лекарственного средства, 3 фрагмента лекарственного средства, 4 фрагмента лекарственного средства, 5 фрагментов лекарственного средства, 6 фрагментов лекарственного средства, 7 фрагментов лекарственного средства, 8 фрагментов лекарственного средства, 9 фрагментов лекарственного средства или 10 или более фрагментов лекарственного средства. Лекарственные фрагменты могут быть конъюгированы с полипептидом в одном или более сайтах в полипептиде, как определено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты имеют среднее отношение лекарственного средства к антителу (DAR) (молярное отношение) в диапазоне от 0,1 до 10, или от 0,5 до 10, или от 1 до 10, например, от 1 до 9, или от 1 до 8, или от 1 до 7, или от 1 до 6, или от 1 до 5, или от 1 до 4, или от 1 до 3, или от 1 до 2. В некоторых вариантах конъюгаты имеют среднее отношение DAR от 1 до 2, такое как 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2. В некоторых вариантах конъюгаты имеют среднее отношение DAR от 1,6 до 1,9. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты имеют среднее отношение DAR 1,7. Под средним подразумевается среднее арифметическое значение.

#### Противораковые агенты

Противораковые агенты по настоящему изобретению включают любой агент для лечения рака, например, химиотерапевтические агенты и/или биологические терапевтические агенты. В некоторых вариантах осуществления рак, подлежащий лечению раскрытыми способами (например, лечением с помощью ADC, как определено в

настоящем описании), устойчив к противораковому агенту (например, противораковому агенту, указанному ниже). В некоторых вариантах осуществления противораковые агенты, изложенные ниже, применяются в комбинации с ADC, как определено в настоящем описании, для лечения рака, включая раковые заболевания, которые устойчивы к противораковым агентам, указанным ниже.

Противораковый агент может включать алкилирующий агент, например, ДНК-алкилирующий агент. Например, алкилирующий агент может включать бендамустин, хлорамбуцил, кармустин, циклофосфамид, мехлоретамин или тому подобное и их фармацевтически приемлемые соли и композиции. Противораковый агент может включать ингибиторы синтеза ДНК или РНК, например, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы полимеразы, ингибиторы дигидрофолатредуктазы или тому подобное. Например, ингибитор синтеза ДНК или РНК может включать неларабин, блеомицин, циарабин, доксорубицин, пралатрексат, метотрексат или тому подобное, и их фармацевтически приемлемые соли и композиции. Противораковый агент может включать ингибитор киназы, например, ингибитор тирозинкиназы Брутона (ВТК), например, акалабрутиниб, ибрутиниб или тому подобное, и их фармацевтически приемлемые соли и композиции. Противораковый агент может включать ингибитор фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) или ингибитор его изоформы, например, ингибитор P110 $\delta$ . Например, ингибитор PI3K может включать копанлисиб, идедалисиб или тому подобное и их фармацевтически приемлемые соли и композиции. Противораковый агент может включать ингибитор хемокинов, например, ингибитор рецептора хемокина CXCR4. Ингибитор хемокинов может включать плериксафор или тому подобное, и его фармацевтически приемлемые соли и композиции. Противораковый агент может включать ингибитор гистондеацетилазы, например, вориностат, ромидеспсин, белиностат и т.п., и их фармацевтически приемлемые соли и композиции. Противораковый агент может включать ингибитор протеасомы, такой как бортезомиб. Противораковый агент может включать кортикостероид, такой как дексаметазон, преднизон или тому подобное. Противораковый агент может включать иммуносупрессанты или противоопухолевые агенты. Например, противораковый агент может включать ингибитор интерлейкина-2, например, денилейкин дифтитокс или тому подобное. Например, противораковый агент может включать рекомбинантный интерферон альфа 2b. Противораковый агент может включать ингибитор тубулина, например, винкристин, винбластин или тому подобное, и их фармацевтически приемлемые соли и композиции. Противораковый агент может включать моноклональное антитело или его лекарственные конъюгаты, например, низкомолекулярные лекарственные конъюгаты, радиоактивные лекарственные конъюгаты

или тому подобное. Например, противораковый агент может включать антитела CD19, CD20, CD22, CD30 или тому подобное. Примеры противораковых агентов на основе антител включают брентуксимаб ведотин, тозитумомаб, тозитумомаба йод-131, ибритумомаб, тиуксетан, обинутузумаб, ритуксимаб, ритуксимаб и гиалуронидаза человека или тому подобное. Противораковый агент может включать ингибитор E3-убиквитинлигазы, например, леналидомид или тому подобное. Противораковый агент может включать агент для терапии адоптивного переноса клеток, например, с помощью аксиабтагена цилолейцела.

Настоящее изобретение может включать терапию (например, комбинированную терапию), включающую более одного противоракового агента (например, в комбинации с ADC, как определено в настоящем описании). В одном варианте осуществления противораковый агент включает циклофосфамид, доксорубицина гидрохлорид, винкристина сульфат и преднизон ("CHOP"). В одном варианте осуществления противораковый агент включает циклофосфамид, винкристина сульфат, прокарбазина гидрохлорид и преднизон ("COPP"). В одном варианте осуществления противораковый агент включает циклофосфамид, винкристина сульфат и преднизон ("CVP"). В одном варианте осуществления противораковый агент включает этопозид фосфат, преднизон, винкристина сульфат, циклофосфамид и доксорубицина гидрохлорид ("EPOCH"). В одном варианте осуществления противораковый агент включает циклофосфамид, винкристина сульфат, доксорубицина гидрохлорид и дексаметазон ("гипер-CVAD"). В одном варианте осуществления противораковый агент включает ифосфамид, карбоплатин и этопозид фосфат ("ICE"). В одном варианте осуществления противораковый агент включает ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицина гидрохлорид, винкристина сульфат и преднизон ("R-CHOP"). В одном варианте осуществления противораковый агент включает ритуксимаб, циклофосфамид, винкристина сульфат и преднизон ("R-CVP"). В одном варианте осуществления противораковый агент включает ритуксимаб, этопозид фосфат, преднизон, винкристина сульфат, циклофосфамид и доксорубицина гидрохлорид ("R-EPOCH"). В одном варианте осуществления противораковый агент включает ритуксимаб, ифосфамид, карбоплатин и этопозид фосфат ("R-ICE").

В других вариантах осуществления противораковый агент может включать R-CHOP, R-CVP, R-EPOCH или R-ICE, где ритуксимаб заменен другим антителом против CD20, например офатумумабом, обинутузумабом, окрелизумабом или тому подобным. Например, R-CHOP с заменой ритуксимаба на обинутузумаб может включать обинутузумаб, циклофосфамид, доксорубицина гидрохлорид, винкристина сульфат и преднизон. Например, R-CVP с заменой ритуксимаба на обинутузумаб может включать в

себя обинутузумаб, циклофосфамид, винкристина сульфат и преднизон. Например, R-ЕРОСН с заменой ритуксимаба на окрелизумаб может включать окрелизумаб, этопозида фосфат, преднизон, винкристина сульфат, циклофосфамид и доксорубицина гидрохлорид.

В одном варианте осуществления противораковый агент включает R-СНОР.

В одном варианте осуществления противораковый агент включает ритуксимаб.

В одном варианте осуществления противораковый агент включает бендамустин.

#### Композиции

Конъюгаты (включая конъюгаты антител) по настоящему изобретению могут быть получены различными способами. В общем, когда конъюгат представляет собой конъюгат полипептида с лекарственным средством, конъюгат получают способом, совместимым с лекарственным средством, конъюгированным с полипептидом, состоянием, которое подлежит лечению, и способом введения, который следует применять.

Конъюгат (например, конъюгат конъюгат полипептида с лекарственным средством) может быть предоставлен в любой подходящей форме, например, в форме фармацевтически приемлемой соли, и может быть получен для любого подходящего пути введения, например, перорального, местного или парентерального введения. Когда конъюгат обеспечен в виде инъекционной жидкости (например, в тех вариантах осуществления, где их вводят внутривенно (в.в.) или непосредственно в ткань), конъюгат может быть обеспечен в виде готовой к употреблению дозированной формы или в виде восстанавливаемого стабильного при хранении порошка или жидкости, состоящих из фармацевтически приемлемых носителей и эксципиентов.

Противораковые агенты по настоящему изобретению могут быть получены различными способами. В общем, противораковый агент получают способом, совместимым с состоянием, которое подлежит лечению, и способом введения, который следует применять.

Противораковые агенты могут быть обеспечены в любой подходящей форме, например, в форме фармацевтически приемлемой соли, и могут быть получены для любого подходящего пути введения, например, перорального, местного или парентерального введения.

Способы получения конъюгатов и/или противораковых агентов могут быть адаптированы из уже доступных для применения. Например, конъюгаты и/или противораковые агенты могут быть получены в фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество конъюгата и фармацевтически приемлемый носитель (например, физиологический раствор). Фармацевтическая композиция может необязательно содержать другие добавки (например, буферы,

стабилизаторы, консерванты и тому подобное). В некоторых вариантах осуществления композиции подходят для введения млекопитающему, например, такие, которые подходят для введения человеку.

В некоторых вариантах осуществления, когда состояние требует комбинированной терапии, то есть лечения конъюгатом по настоящему изобретению и одним или более противораковыми агентами, конъюгат и один или более противораковых агентов могут быть получены вместе для совместного введения, или могут быть получены отдельно для последующего введения. Аналогичным образом, когда применяют более одного противоракового агента, один или более противораковых агентов могут быть получены вместе или могут быть получены отдельно.

#### Способы лечения

Конъюгаты полипептида с лекарственным средством по настоящему изобретению применяют для лечения состояния или заболевания у субъекта, которое поддается лечению введением исходного лекарственного средства (то есть лекарственного средства до конъюгации с полипептидом). Под "лечением" подразумевается, что достигается по меньшей мере уменьшение интенсивности симптомов, связанных с состоянием, поражающим хозяина, где уменьшение интенсивности используется в широком смысле для обозначения, по меньшей мере, уменьшения величины параметра, например, симптома, связанного с состоянием, подлежащим лечению. Как таковое, лечение также включает в себя ситуации, когда патологическое состояние или по меньшей мере связанные с ним симптомы полностью ингибируют, например, предотвращают или прекращают, например, прекращают, так что хозяин больше не страдает от состояния или, по крайней мере от симптомов, которые характеризуют состояние. Таким образом, лечение включает: (i) предотвращение, то есть снижение риска развития клинических симптомов, включая предотвращение развития клинических симптомов, например, предотвращение прогрессирования заболевания до опасного состояния, (ii) ингибирование, то есть задержка развития или дальнейшего развития клинических симптомов, например, уменьшение или полное ингибирование активного заболевания, и/или (iii) ослабление, то есть регресс клинических симптомов.

В контексте рака, термин "лечение" включает любое или все из следующих: уменьшение роста солидной опухоли, ингибирование репликации раковых клеток, уменьшение общей опухолевой нагрузки и уменьшение одного или более симптомов, связанных с раком.

Субъект, подлежащий лечению может представлять собой того, кто нуждается в терапии, где хозяин, подлежащий лечению, отвечает на лечение с применением исходного

лекарственного средства. Соответственно, различные субъекты могут отвечать на лечение с применением конъюгатов полипептида с лекарственным средством, как определено в настоящем описании. Обычно такие субъекты представляют собой "млекопитающее", при этом человек представляют интерес. Другие субъекты могут включать домашних животных (например, собак и кошек), сельскохозяйственных животных (например, коров, свиней, коз, лошадей и тому подобное), грызунов (например, мышей, морских свинок и крыс, например, как на животных моделях болезни), и приматов, не являющихся людьми (например, шимпанзе и обезьян).

Количество вводимого конъюгата полипептида с лекарственным средством может быть первоначально определено на основании указания дозы и/или режима дозирования исходного лекарственного средства. Как правило, конъюгаты полипептида с лекарственным средством могут обеспечивать целевую доставку и/или увеличенный период полужизни в сыворотке связанного лекарственного средства, обеспечивая, таким образом, по меньшей мере снижение дозы или уменьшенного введения в режиме дозирования. Таким образом, конъюгаты полипептида с лекарственным средством могут обеспечивать уменьшение дозы и/или уменьшение введения в режиме дозирования по сравнению с исходным лекарственным средством до конъюгации в конъюгат полипептида с лекарственным средством по настоящему изобретению.

Кроме того, как отмечено выше, поскольку конъюгаты полипептида с лекарственным средством могут обеспечивать контролируемую стехиометрию доставки лекарственного средства, дозировки конъюгатов полипептида с лекарственным средством могут быть рассчитаны на основе количества молекул лекарственного средства, обеспеченного на основе конъюгата полипептида с лекарственным средством.

В некоторых вариантах осуществления вводят множественные дозы конъюгата полипептида с лекарственным средством. Частота введения конъюгата полипептида с лекарственным средством может варьироваться в зависимости от любого из множества факторов, например серьезности симптомов, состояния субъекта и т.д. Например, в некоторых вариантах осуществления конъюгат полипептида с лекарственным средством вводят один раз в месяц, два раза в месяц, три раза в месяц, один раз в две недели, один раз в неделю (qwk), два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю, пять раз в неделю, шесть раз в неделю, один раз в два дня, ежедневно (qd/od), два раза в день (bds/bid) или три раза в день (tds/tid) и т.д.

Конъюгаты полипептида с лекарственным средством по настоящему изобретению применяют в комбинированном лечении с противораковыми агентами для состояний или заболеваний у субъекта, которые поддаются лечению введением исходного

лекарственного средства, например, майтансина, и/или поддаются лечению, или ранее поддавались лечению путем введения противоракового агента. Комбинированное лечение может оказывать синергетическое воздействие на состояние или заболевание. Комбинированное лечение может помочь сделать состояние или заболевание более восприимчивым к лечению. Например, резистентный рак, например, рак, устойчивый к лечению одним или более противораковыми агентами, может стать восприимчивым к комбинированной терапии, как определено в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления дозированное количество в мг/кг конъюгата полипептида с лекарственным средством, вводимого субъекту, может включать одно или более из: 0,10, 0,25, 0,50, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 и 20, или диапазон между любыми из указанных чисел, например, от примерно 3 до примерно 5, от примерно 5 до примерно 10, от примерно 9 до 10, или тому подобное. Конъюгат полипептида с лекарственным средством можно вводить в одном из указанных значений дозы со скоростью один раз в неделю (qw), один раз в две недели (q2w), один раз в три недели (q3w) или один раз в месяц (qm). Конъюгат полипептида с лекарственным средством можно вводить в одном из указанных значений дозы со скоростью один раз в неделю (qw), один раз в две недели (q2w), один раз в три недели (q3w) или один раз в месяц (qm), в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 недель. В некоторых вариантах осуществления конъюгат полипептида с лекарственным средством вводят один раз в три недели (например, в течение периода 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 недель). Альтернативно, конъюгат полипептида с лекарственным средством можно вводить в однократной дозе в любом из указанных значений дозы. Конъюгат полипептида с лекарственным средством можно вводить в другой дозе с одной из указанных скоростей в течение одного из указанных периодов. Например, конъюгат полипептида с лекарственным средством можно вводить в дозе 10 мг/кг один раз в три недели в течение шести недель. Кроме того, например, конъюгат полипептида с лекарственным средством может быть введен позже в дозе 3 мг/кг один раз в неделю в течение периода 4 недель и так далее.

В некоторых вариантах осуществления один или более противораковых агентов могут быть введены субъекту в виде однократной или многократных доз. Частота введения одного или более противораковых агентов может варьироваться в зависимости от любого из множества факторов, например, от тяжести симптомов, состояния субъекта и т.д. Например, в некоторых вариантах осуществления один или более противораковых агентов вводят один раз в месяц, два раза в месяц, три раза в месяц, один раз в две недели, один раз в неделю (qw), один раз в две недели (q2wk), один раз в три недели (q3wk), два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю, пять раз в неделю, шесть раз в

неделю, один раз в два дня, ежедневно (qd/od), два раза в день (bds/bid) или три раза в день (tds/tid) и т.д. Противораковый агент можно вводить в значении дозы, с интенсивностью дозы и в течение периода времени, который был одобрен для определенного противоракового агента Управлением за качеством продуктов питания и лекарственных средств США.

В некоторых вариантах осуществления совместно вводят конъюгат пептида с лекарственным средством и один или более противораковых агентов.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат пептида с лекарственным средством вводят до введения одного или более противораковых агентов. Например, конъюгат пептида с лекарственным средством вводят, как определено в настоящем описании, с последующим введением одного или более противораковых агентов, как определено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления введение конъюгата пептида с лекарственным средством и введение одного или более противораковых агентов разделено во времени.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат пептида с лекарственным средством вводят в течение некоторого периода времени, а затем конъюгат пептида с лекарственным средством вводят совместно с одним или более противораковыми агентами.

В некоторых вариантах осуществления один или более противораковых агентов вводят перед введением конъюгата пептида с лекарственным средством. Например, один или более противораковых агентов вводят, как определено в настоящем описании, с последующим введением конъюгата пептида с лекарственным средством, как определено в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления один или более противораковых агентов вводят в течение некоторого периода времени, а затем один или более противораковых агентов вводят совместно с конъюгатом пептида с лекарственным средством.

В некоторых вариантах осуществления рак становится устойчивым к введению одного или более противораковых агентов. Введение конъюгата пептида с лекарственным средством субъекту, имеющему резистентный рак, может лечить рак и/или повышать восприимчивость рака к дальнейшему лечению одним или более противораковыми агентами.

#### Способы лечения рака

Настоящее изобретение относится к способам доставки одного или более противораковых агентов и конъюгата пептида с лекарственным средством субъекту, имеющему рак или рак, как определено в настоящем описании, который стал устойчивым

к одному или более противораковым агентам, например, R-СНОР. Эти способы применимы для лечения широкого спектра раковых заболеваний, включая карциномы, саркомы, лейкоза и лимфомы. Способы также применимы для сенсбилизации рака, как определено в настоящем описании, то есть для ослабления устойчивости рака к одному или более противораковым агентам, как определено в настоящем описании, например, R-СНОР. В некоторых вариантах осуществления конъюгат пептида с лекарственным средством можно вводить при раке в отсутствие других способов лечения (например, в виде монотерапии). В некоторых вариантах осуществления конъюгат пептида с лекарственным средством можно вводить при раке в сочетании с другими видами лечения рака (например, в комбинации с R-СНОР).

Настоящее изобретение относится к способам доставки одного или более противораковых агентов и конъюгата пептида с лекарственным средством субъекту, имеющему рак. Эти способы применимы для лечения рака, связанного с нарушением регуляции сигналинга BCR вследствие избыточной экспрессии В-клеток и/или дисфункции. Эти способы применимы для лечения раковых заболеваний, которые поддаются лечению истощением популяции В-клеток. Способы также применимы для лечения раковых заболеваний, связанных с нарушением регуляции сигналинга BCR, которые стали устойчивыми к одному или более противораковым агентам.

Карциномы, которые можно лечить с применением способа по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, рак пищевода, гепатоклеточная карцинома, базально-клеточная карцинома (форма рака кожи), плоскоклеточная карцинома (различные ткани), карцинома мочевого пузыря, включая переходноклеточный рак (злокачественные новообразования мочевого пузыря), бронхогенный рак, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак желудка, рак легких, включая мелкоклеточный рак и немелкоклеточный рак легкого, адренокортикальная карцинома, рак щитовидной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, карцинома яичников, карцинома простаты, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярная карцинома, папиллярная аденокарцинома, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, почечно-клеточная карцинома, протоковая карцинома *in situ* или карцинома жёлчного протока, хориокарцинома, сперматоцитомы, эмбриональный рак, опухоль Вильма, карцинома шейки матки, карцинома матки, карцинома яичка, остеогенная карцинома, эпителиома, носоглоточная карцинома и др.

Саркомы, которые можно лечить с применением способа по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, хордому, остеогенную саркому, остеосаркому,

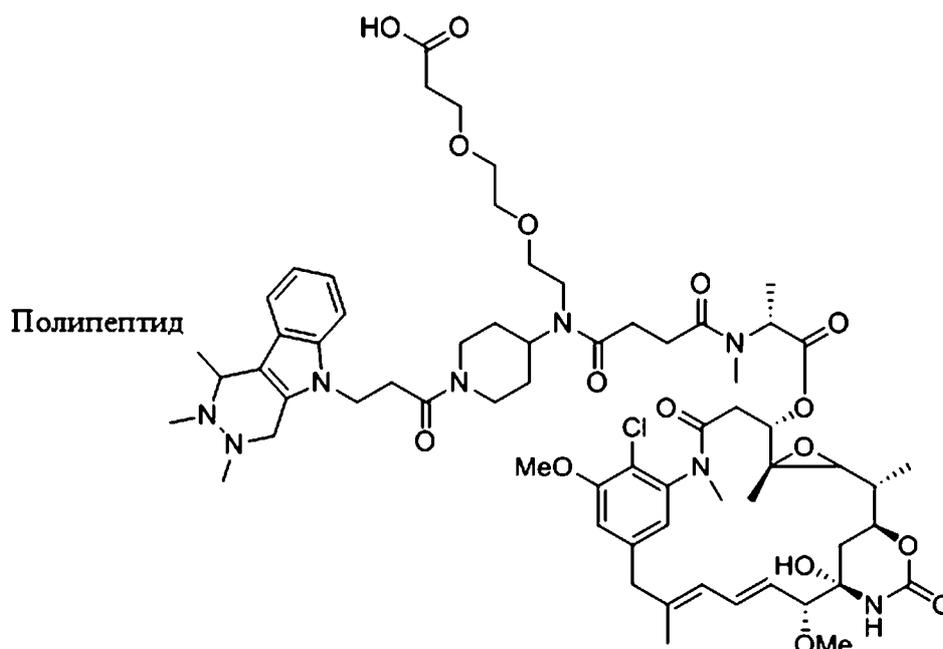
ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, саркому Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому и другие саркомы мягких тканей.

Другие солидные опухоли, которые можно лечить с применением способа по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, невриному слухового нерва, олигодендроглиому, менангиому, меланому, нейробластому и ретинобластому.

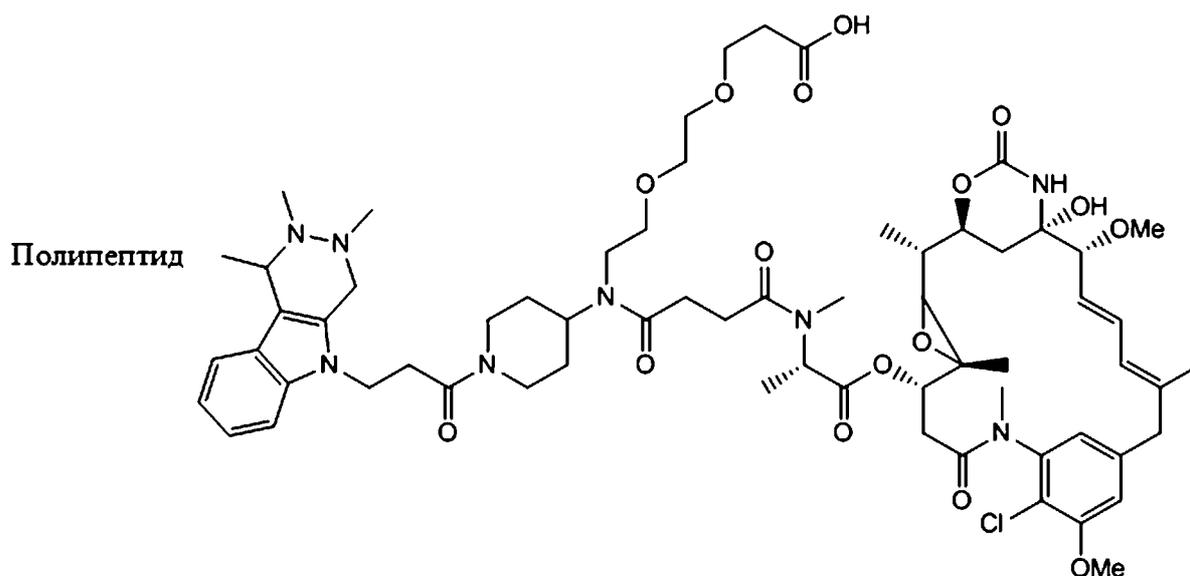
Лейкозы, которые можно лечить с применением способа по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, а) хронические миелопролиферативные синдромы (неопластические заболевания мультипотентных гемопоэтических стволовых клеток), б) острые миелогенные лейкозы (неопластическая трансформация мультипотентной гемопоэтической стволовой клетки или гематопоэтической клетки с ограниченной способностью к дифференцировке, с) хронический лимфолейкоз (ХЛЛ, клональная пролиферация иммунологически незрелых и функционально некомпетентных малых лимфоцитов), включая В-клеточный ХЛЛ, Т-клеточный ХЛЛ пролимфоцитарный лейкоз, мелкоклеточный лимфолейкоз (МЛЛ) и волосато-клеточный лейкоз, и d) острые лимфобластные лейкозы (характеризующиеся накоплением лимфобластов).

Лимфомы, которые можно лечить с применением способа по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, В-клеточные лимфомы (например, лимфому Беркитта, диффузную В-крупноклеточную лимфому), лимфому Ходжкина, неходжкинскую В-клеточную лимфому (например, лимфомы из клеток маргинальной зоны (ЛКМЗ), мантийноклеточную лимфому (МКЛ), фолликулярную лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы), и тому подобное.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к лечению неходжкинской лимфомы с помощью ADC, как определено в настоящем описании. Способ может включать введение ADC, где неходжкинская лимфома устойчива к R-CHOP (например, после окончания действия R-CHOP). В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

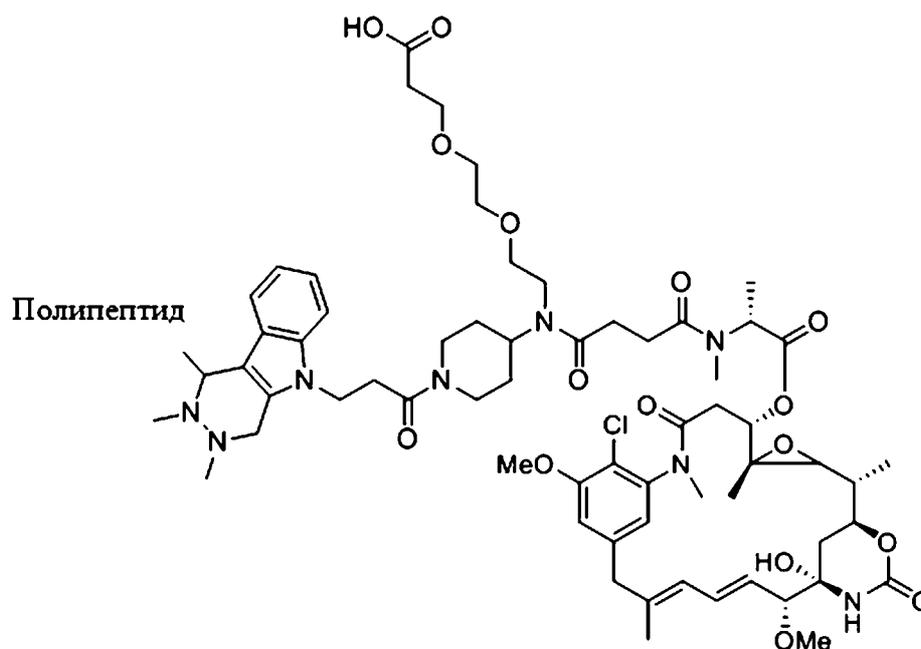


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

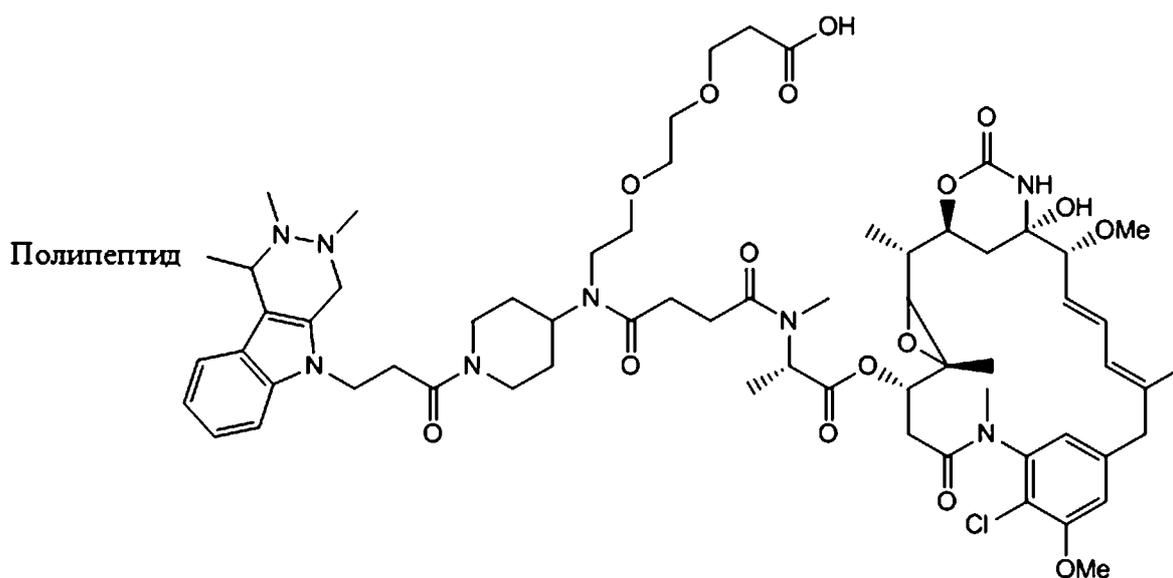


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к лечению неходжкинской лимфомы с помощью ADC, как определено в настоящем описании, в сочетании с R-CHOP. Способ может включать введение ADC в сочетании с R-CHOP, где неходжкинская лимфома устойчива к R-CHOP (например, после окончания действия R-CHOP). В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

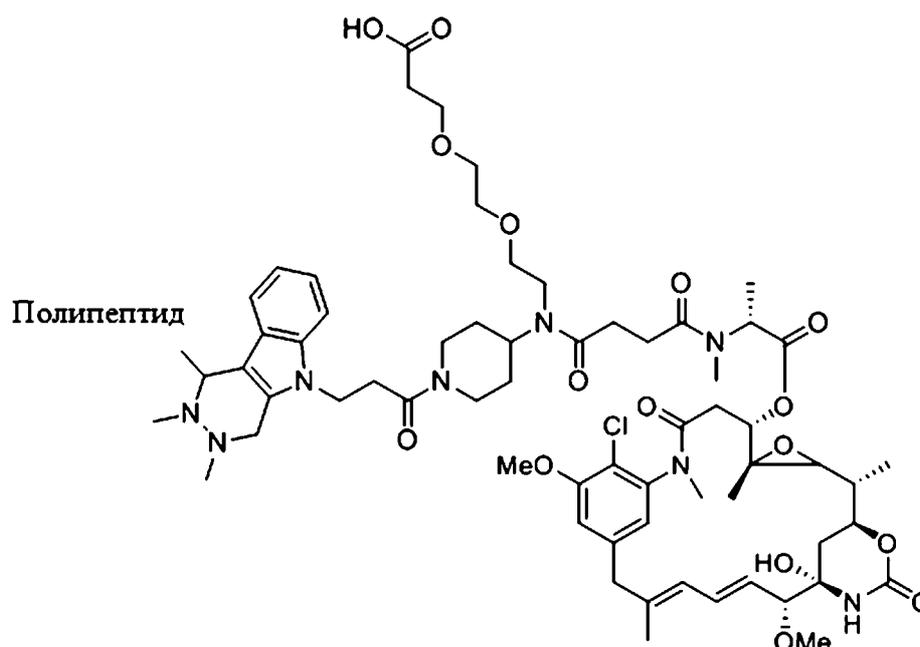


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

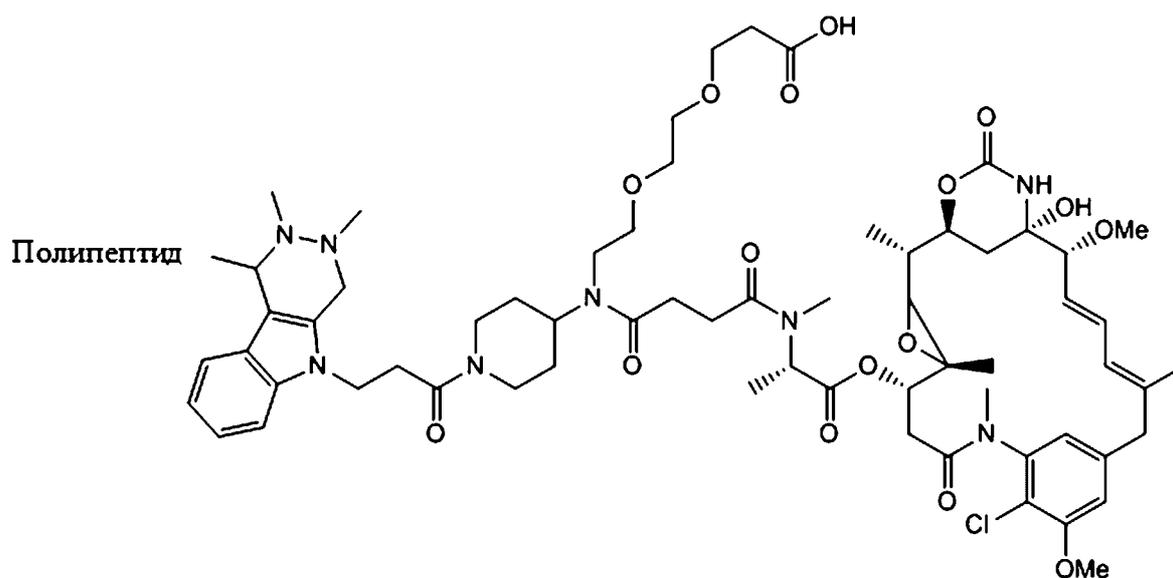


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к лечению диффузной В-крупноклеточной лимфомы с помощью ADC, как определено в настоящем описании. Способ может включать введение ADC, где диффузная В-крупноклеточная лимфома устойчива к R-СНОР (например, после окончания действия R-СНОР). В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

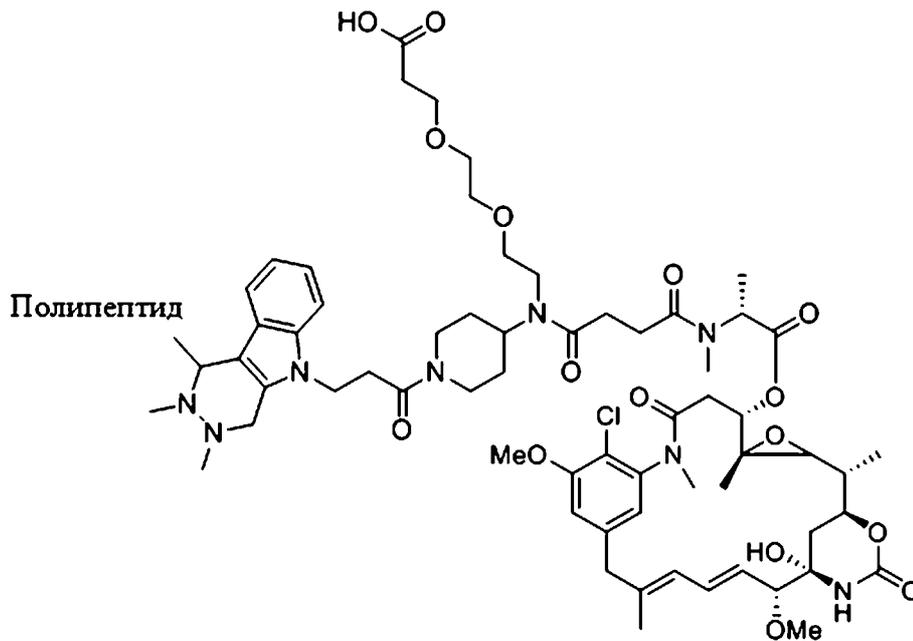


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

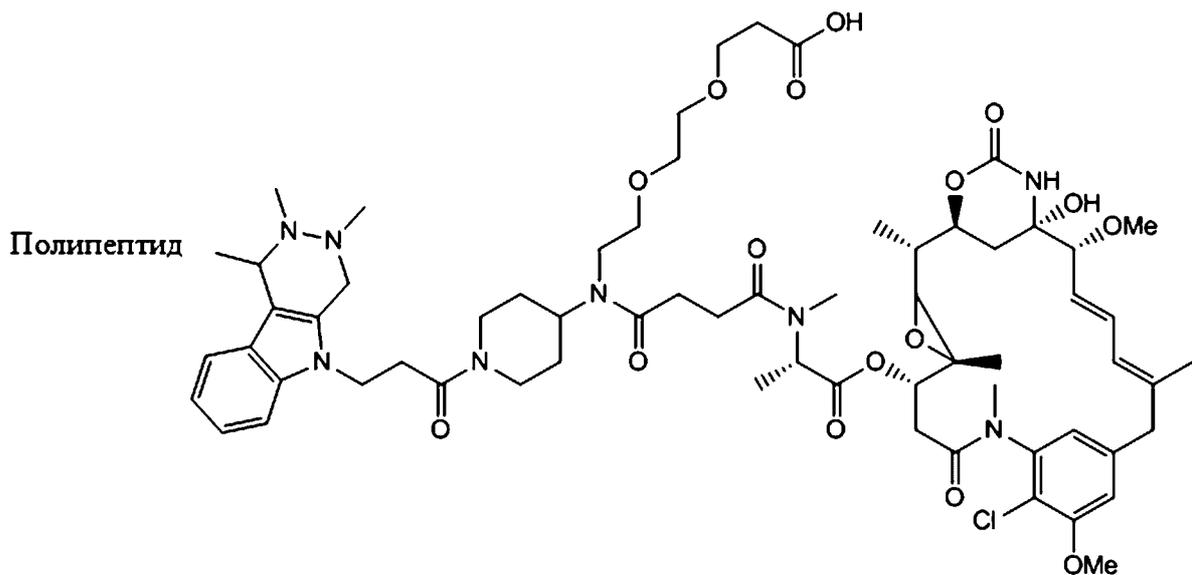


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к лечению диффузной В-крупноклеточной лимфомы с помощью ADC, как определено в настоящем описании, в сочетании с R-CHOP. Способ может включать введение ADC в сочетании с R-CHOP, где диффузная В-крупноклеточная лимфома устойчива к R-CHOP (например, после окончания действия R-CHOP). В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

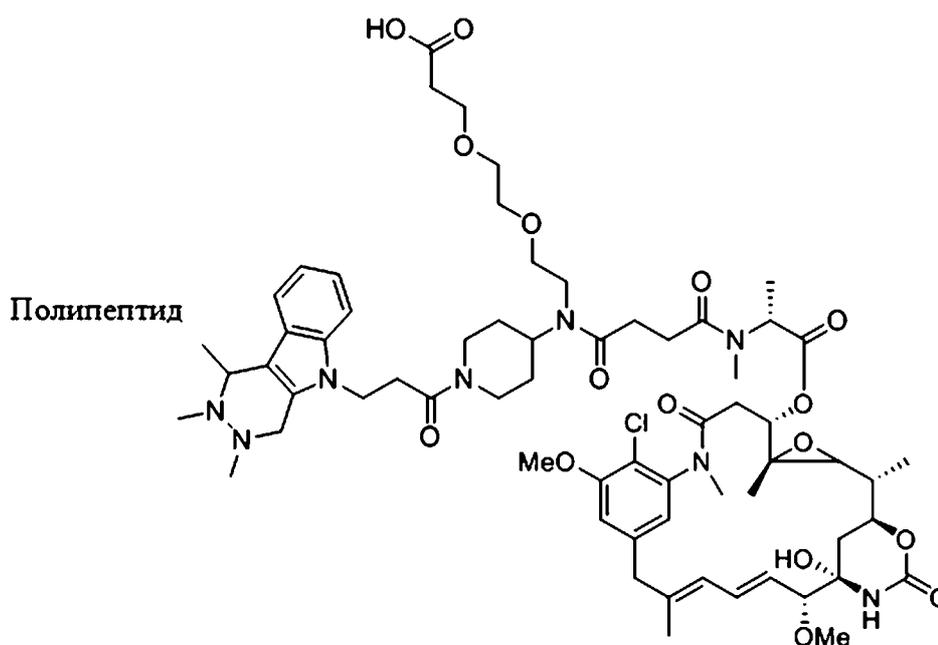


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

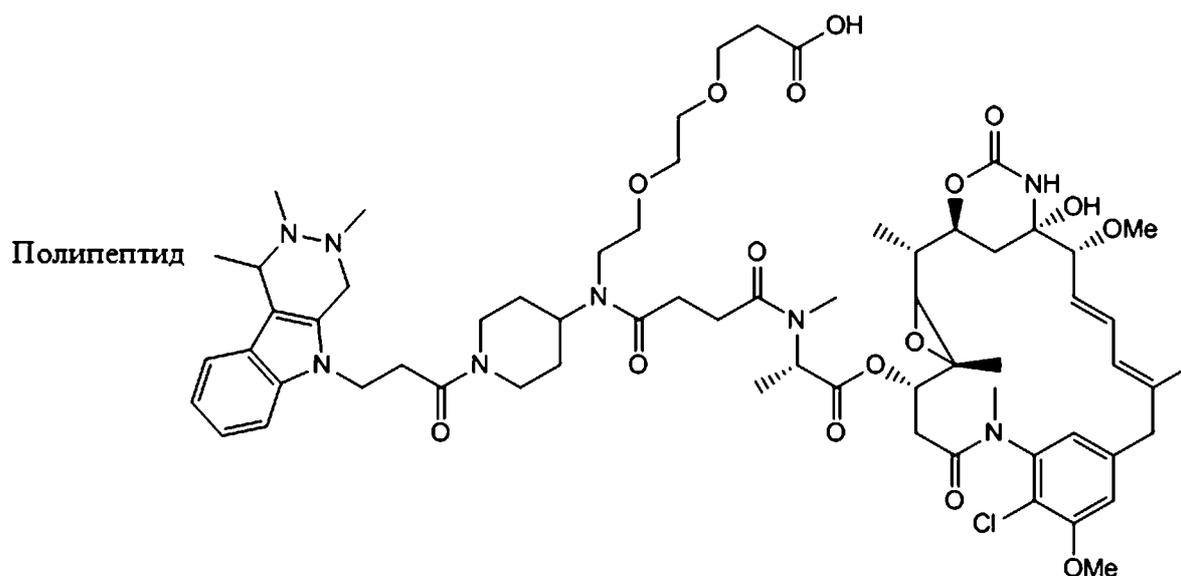


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к лечению фолликулярной лимфомы с помощью ADC, как определено в настоящем описании. Способ может включать введение ADC, где фолликулярная лимфома устойчива к R-CHOP (например, после окончания действия R-CHOP). В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

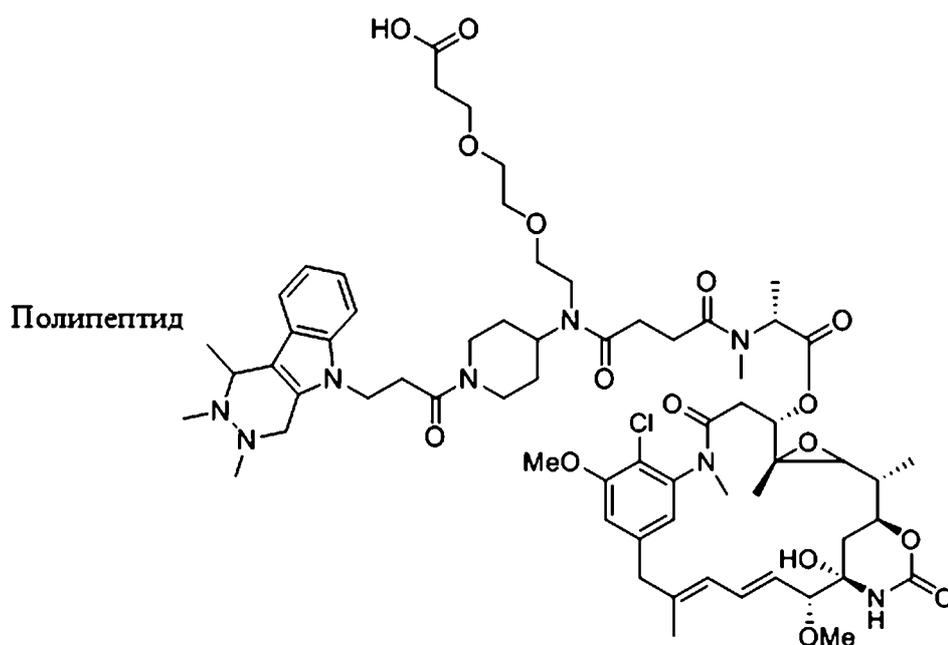


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

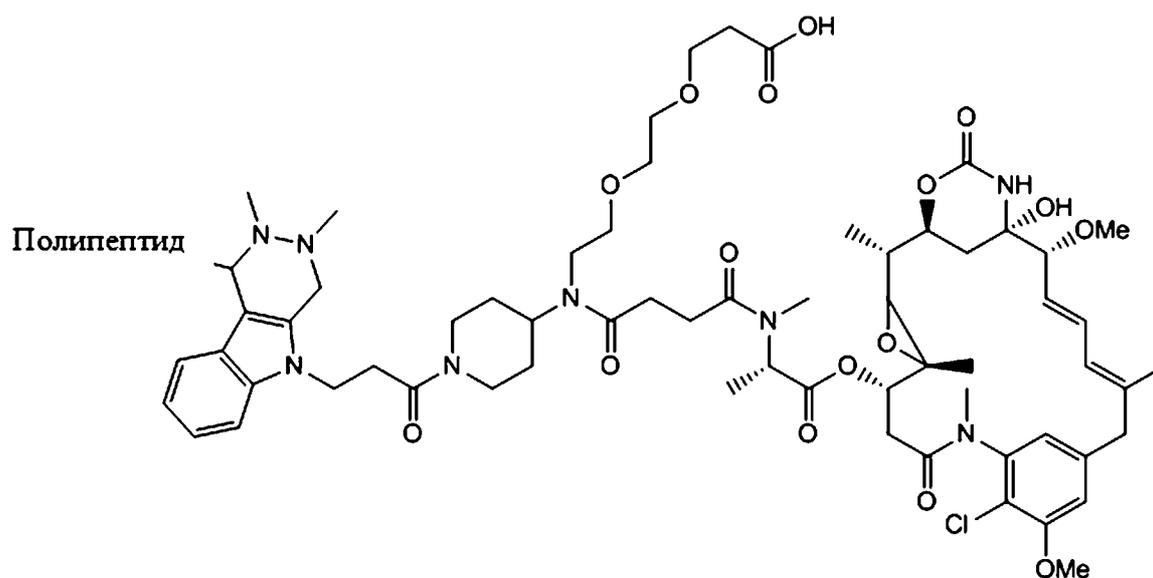


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к лечению фолликулярной лимфомы с помощью ADC, как указано здесь, в сочетании с R-CHOP. Способ может включать введение ADC в сочетании с R-CHOP, где фолликулярная лимфома устойчива к R-CHOP (например, после окончания действия R-CHOP). В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

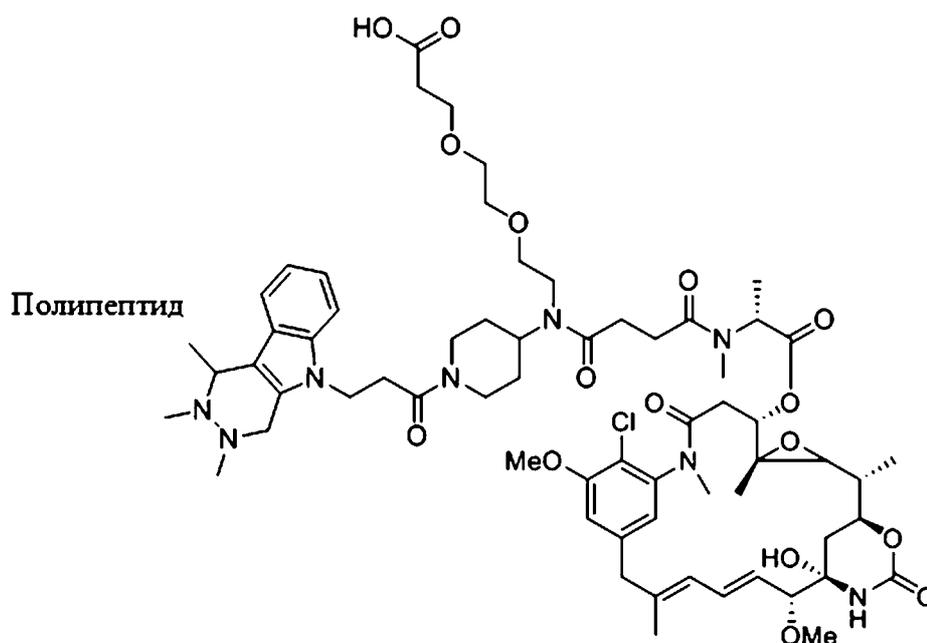


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

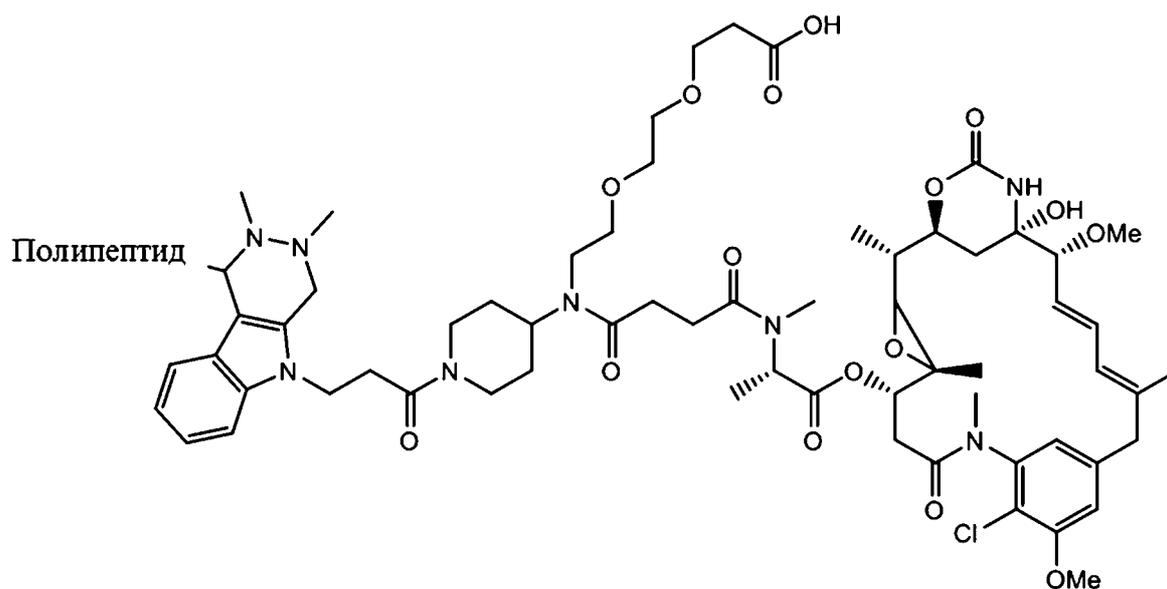


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к лечению мантийноклеточной лимфомы с помощью ADC, как определено в настоящем описании. Способ может включать введение ADC, где мантийноклеточная лимфома устойчива к R-CHOP (например, после окончания действия R-CHOP). В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

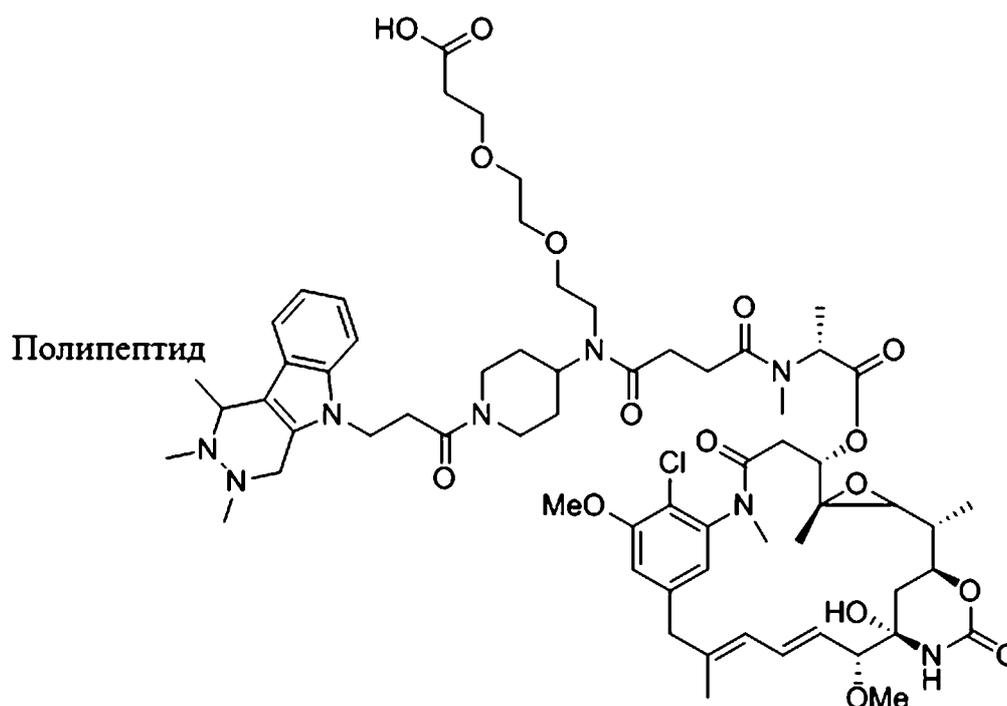


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

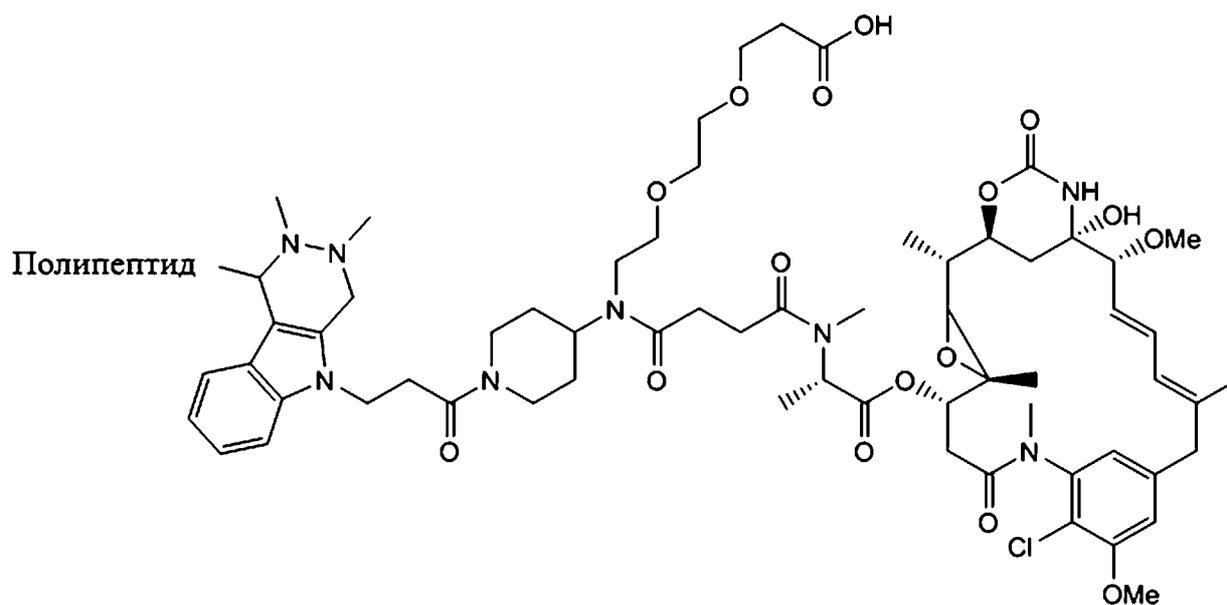


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к лечению мантийноклеточной лимфомы с помощью ADC, как определено в настоящем описании, в сочетании с R-CHOP. Способ может включать введение ADC в сочетании с R-CHOP, где мантийноклеточная лимфома устойчива к R-CHOP (например, после окончания действия R-CHOP). В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

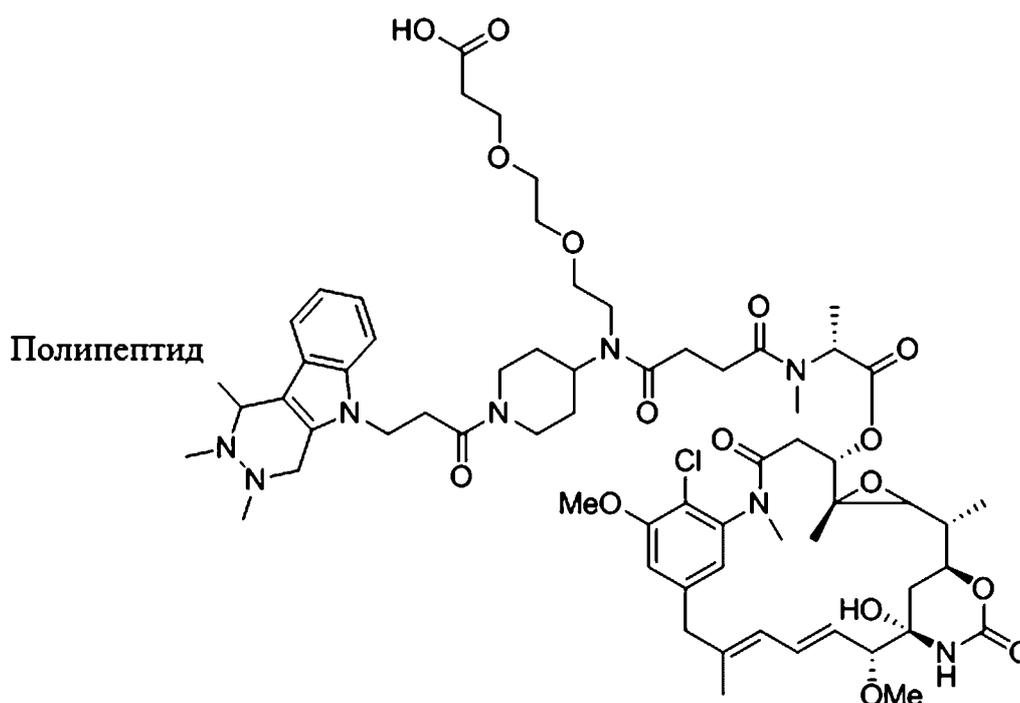


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

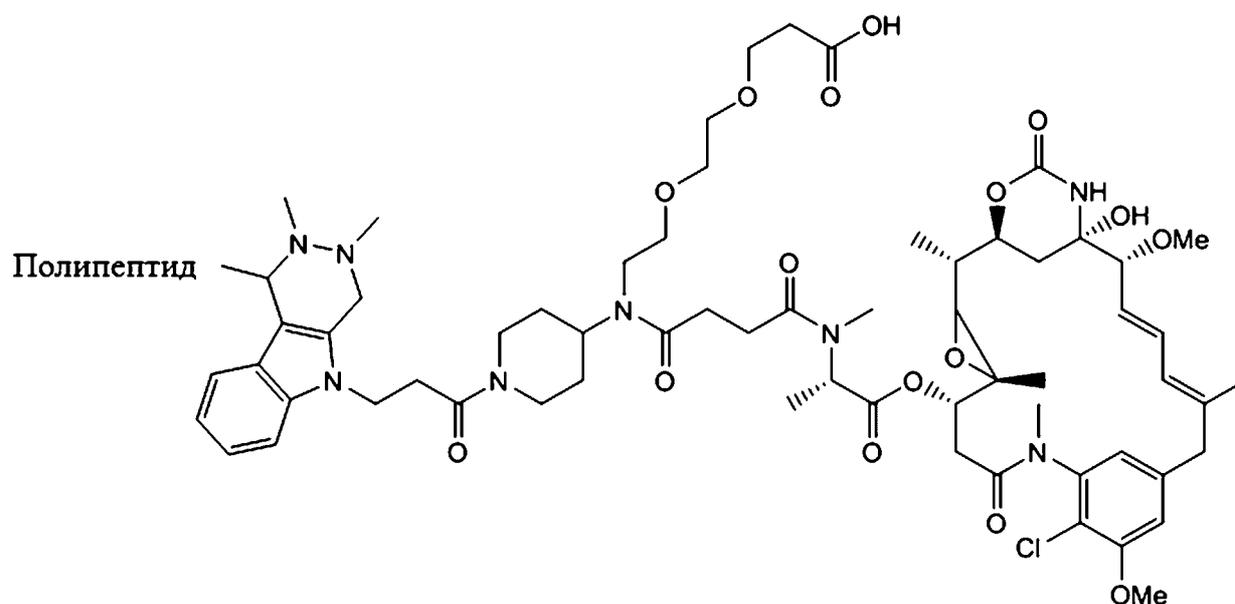


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к лечению лимфомы из клеток маргинальной зоны с помощью ADC, как определено в настоящем описании. Способ может включать введение ADC, где лимфома из клеток маргинальной зоны устойчива к R-CHOP (например, после окончания действия R-CHOP). В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

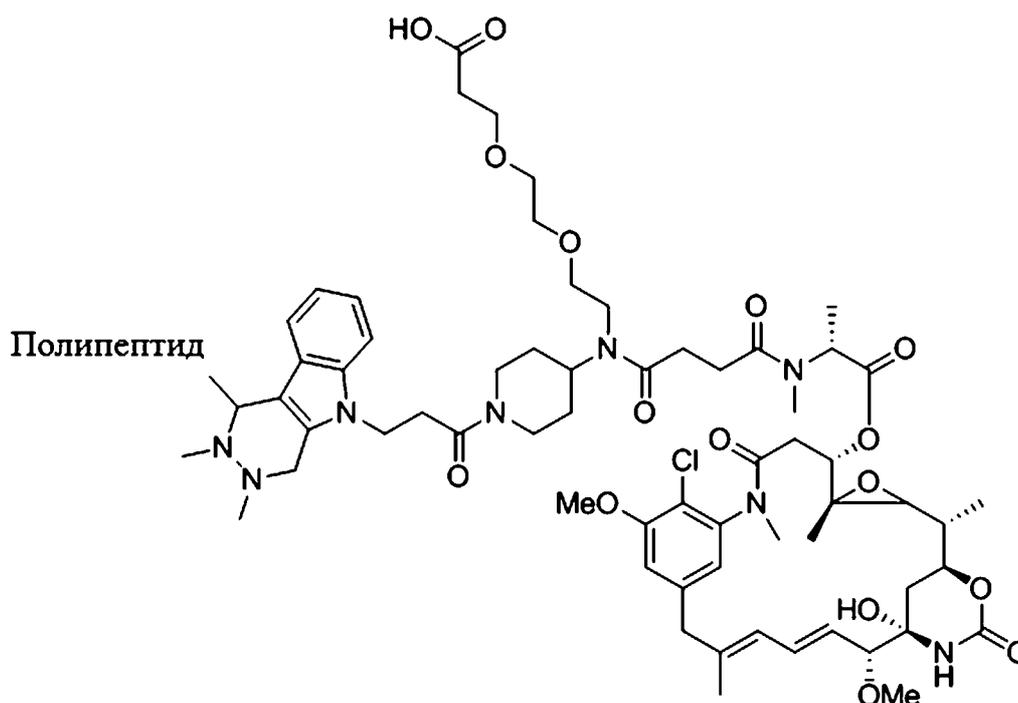


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:

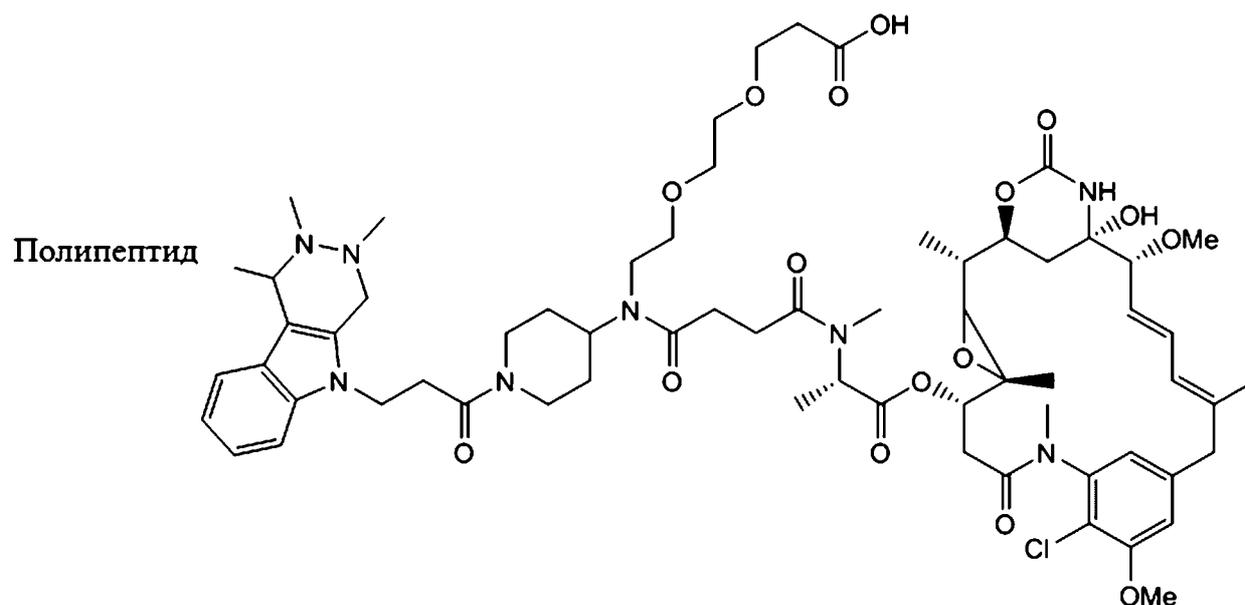


и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к лечению лимфомы из клеток маргинальной зоны с помощью ADC, как определено в настоящем описании, в сочетании с R-CHOP. Способ может включать введение ADC в сочетании с R-CHOP, где лимфома из клеток маргинальной зоны устойчива к R-CHOP (например, после окончания действия R-CHOP). В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:



и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой:



и его вводят в дозе примерно 10 мг/кг.

#### Примеры

Следующие примеры приведены для того, чтобы обеспечить среднему специалисту в данной области техники полное раскрытие и описание того, как осуществить и применить настоящее изобретение, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения рассматривают как свое изобретение, а также не предназначены для представления того, что описанные ниже эксперименты представляют все или являются единственными выполненными экспериментами. Предприняты усилия для обеспечения

точности в отношении используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать, что возможны некоторые ошибки эксперимента и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднемассовую молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, а давление равно или приблизительно равно атмосферному. Под "средним" подразумевается среднее арифметическое значение. Могут применяться стандартные сокращения, например, п.о., пара(ы) оснований, кб, килобаза, пл, пиколитр(ы), с или сек, секунда(ы), мин, минута(ы), ч или час, час(ы), ак, аминокислота(ы), кб, килобаза(ы), п.о., пара(ы) оснований, нт, нуклеотид(ы), в/м, внутримышечный(о), в/б, внутрибрюшинный(о), п/к, подкожный(о), и тому подобное.

#### Общие способы получения

Существует много общедоступных ссылок, по которым представлены общеизвестные схемы и условия химического синтеза, применяемые для получения соединений по настоящему изобретению (см., например, Smith and March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, Fifth Edition, Wiley-Interscience, 2001; или Vogel, *A Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis*, Fourth Edition, New York: Longman, 1978).

Соединения, как определено в настоящем описании, могут быть очищены с помощью любого способа очистки, известного в данной области техники, включая хроматографию, такую как ВЭЖХ, препаративная тонкослойная хроматография, колоночная флэш-хроматография и ионообменная хроматография. Можно применять любую подходящую стационарную фазу, включая нормальную и обращенную фазы, и ионные смолы. В некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению очищают с помощью хроматографии на силикагеле и/или оксиде алюминия. См., например, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd Edition, ed. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, John Wiley and Sons, 1979; и *Thin Layer Chromatography*, ed E. Stahl, Springer-Verlag, New York, 1969.

Во время осуществления любого из способов получения соединений по настоящему изобретению может быть необходимо и/или желательно защитить чувствительные или реакционноспособные группы в любой из рассматриваемых молекул. Это может быть достигнуто с помощью обычных защитных групп, как описано в стандартных работах, таких как J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, London and New York 1973, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", Third edition, Wiley, New York 1999, в "The Peptides"; Volume 3 (editors: E. Gross and J. Meienhofer), Academic Press, London and New York 1981,

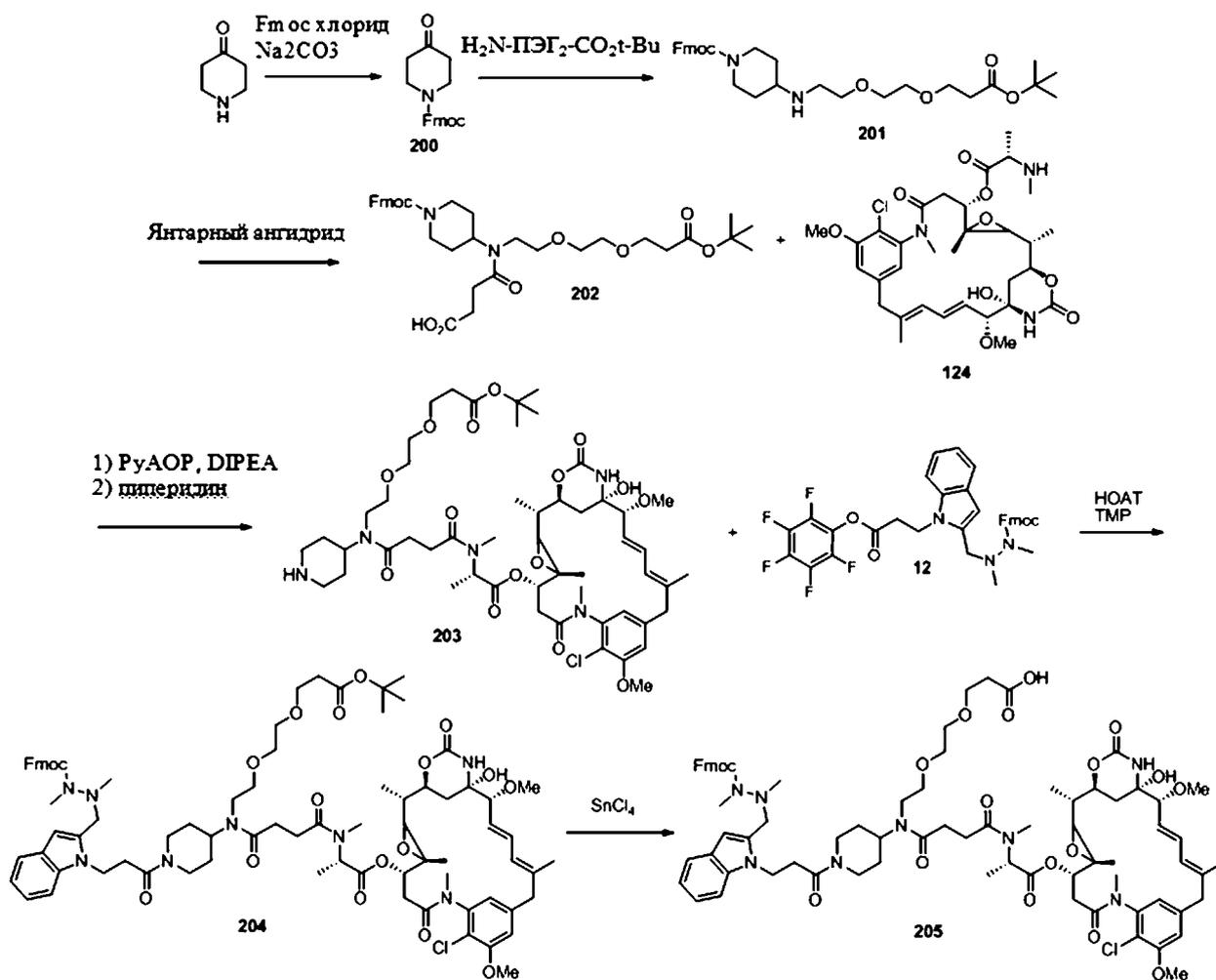
“Methoden der organischen Chemie”, Houben-Weyl, 4th edition, Vol. 15/1, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, H.-D. Jakubke and H. Jescheit, “Aminosäuren, Peptide, Proteine”, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, and Basel 1982, и/или Jochen Lehmann, “Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide and Derivate”, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974. Защитные группы могут быть удалены на последующей стадии с применением способов, известных в данной области техники.

Соединения по настоящему изобретению можно получать различными способами синтеза с применением коммерчески доступных исходных материалов и/или исходных материалов, полученных обычными способами. Множество примеров способов получения, которые можно применять для синтеза соединений по настоящему изобретению, описаны на схемах ниже.

### Пример 1

Линкер, содержащий 4-аминопиперидиновую (4АП) группу получали в соответствии со схемой 1, показанной ниже.

### Схема 1



## Получение (9H-флуорен-9-ил)метил 4-оксопиперидин-1-карбоксилата (200)

В круглодонную колбу объемом 100 мл, содержащую магнитную мешалку, добавляли моногидрат гидрохлорида пиперидин-4-она (1,53 г, 10 ммоль), Fmoc хлорид (9-флуоренилметоксикарбонил) (2,58 г, 10 ммоль), карбонат натрия (3,18 г, 30 ммоль), диоксан (20 мл) и воду (2 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Смесь разбавляли EtOAc (этилацетат) (100 мл) и экстрагировали водой (1×100 мл). Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный материал сушили в вакууме, получая соединение 200 в виде белого твердого вещества (3,05 г, выход 95 %).

<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,78 (d, 2H, J = 7,6), 7,59 (d, 2H, J = 7,2), 7,43 (t, 2H, J = 7,2), 7,37 (t, 2H, J = 7,2), 4,60 (d, 2H, J = 6,0), 4,28 (t, 2H, J = 6,0), 3,72 (br, 2H), 3,63 (br, 2H), 2,39 (br, 2H), 2,28 (br, 2H).

МС (масспектрометрия) (ESI) (ионизация электроспреем) m/z: [M+H]<sup>+</sup> Вычислено для C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub> 322,4, найдено 322,2.

## Получение (9H-флуорен-9-ил)метил 4-((2-(2-(3-(трет-бутоксипропокси)этокси)этил)амино)пиперидин-1-карбоксилата (201)

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнитную мешалку, добавляли пиперидинон 200 (642 мг, 2,0 ммоль), H<sub>2</sub>N-ПЭГ<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>t-Bu (560 мг, 2,4 ммоль), 4 Å молекулярный фильтр (активированный порошок, 500 мг) и 1,2-дихлорэтан (5 мл). Смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. К реакционной смеси добавляли триацетоксиборгидрид натрия (845 мг, 4,0 ммоль). Смесь перемешивали в течение 5 дней при комнатной температуре. Полученную смесь разбавляли EtOAc. Органический слой промывали насыщенным NaHCO<sub>3</sub> (1×50 мл) и соевым раствором (1×50 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая соединение 201 в виде масла, которое применяли без дополнительной очистки.

## Получение 13-(1-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)пиперидин-4-ил)-2,2-диметил-4,14-диоксо-3,7,10-триокса-13-азагептадекан-17-овой кислоты (202)

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнитную мешалку, добавляли N-Fmoc-пиперидин-4-амино-ПЭГ<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>t-Bu (201) с предыдущей стадии, янтарный ангидрид (270 мг, 2,7 ммоль) и дихлорметан (5 мл). Смесь перемешивали в течение 18 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь распределяли на части между EtOAc и насыщенным NaHCO<sub>3</sub>. Водный слой экстрагировали EtOAc (3 раза). Водный слой подкисляли HCl (1 M) до значения pH примерно 3. Водный слой экстрагировали (3 раза) с помощью ДХМ. Объединенные органические слои сушили над

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Реакционную смесь очищали флэш-хроматографией на C18 (элюировали от 10 до 100 % MeCN/вода с 0,1 % уксусной кислотой). Фракции, содержащие продукт, концентрировали при пониженном давлении и затем подвергали азеотропной перегонке с толуолом (3×50 мл), чтобы удалить остаточную уксусную кислоту, с получением 534 мг (42 %, 2 стадии) соединения 202 в виде белого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (DMCO-d<sub>6</sub>) δ 11,96 (br, 1H), 7,89 (d, 2H, J = 7,2), 7,63 (d, 2H, J = 7,2), 7,42 (t, 2H, J = 7,2), 7,34 (t, 2H, J = 7,2), 4,25-4,55 (m, 3H), 3,70-4,35 (m, 3H), 3,59 (t, 2H, J = 6,0), 3,39 (m, 5H), 3,35 (m, 3H), 3,21 (br, 1H), 2,79 (br, 2H), 2,57 (m, 2H), 2,42 (q, 4H, J = 6,0), 1,49 (br, 3H), 1,37 (s, 9H).

МС (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> Вычислено для C<sub>35</sub>H<sub>47</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> 639,3, Найдено 639,2.

Получение (2S)-1-(((1<sup>4</sup>S,1<sup>6</sup>S,3<sup>3</sup>S,2R,4S,10E,12E,14R)-8<sup>6</sup>-хлор-1<sup>4</sup>-гидрокси-8<sup>5</sup>,14-диметокси-3<sup>3</sup>,2,7,10-тетраметил-1<sup>2</sup>,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинана-3(2,3)-оксирана-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)окси)-2,3-диметил-1,4,7-триоксо-8-(пиперидин-4-ил)-11,14-диокса-3,8-диазагептадекан-17-овой кислоты (203)

К раствору сложного эфира 202 (227 мг, 0,356 ммоль), диизопропилэтиламина (174 мкл, 1,065 ммоль), N-деацетилмайтансина 124 (231 мг, 0,355 ммоль) в 2 мл ДМФА добавляли РуАОР (185 мг, 0,355 ммоль). Раствор перемешивали в течение 30 минут. Пиперидин (0,5 мл) добавляли к реакционной смеси и дополнительно перемешивали в течение 20 минут. Неочищенную реакционную смесь очищали с помощью обращенно-фазовой хроматографии на C18, применяя градиент от 0 до 100 % ацетонитрил:вода, с получением 203,2 мг (55 %, 2 стадии) соединения 203.

Получение 17-(трет-бутил) 1-(((1<sup>4</sup>S,1<sup>6</sup>S,3<sup>3</sup>S,2R,4S,10E,12E,14R)-8<sup>6</sup>-хлор-1<sup>4</sup>-гидрокси-8<sup>5</sup>,14-диметокси-3<sup>3</sup>,2,7,10-тетраметил-1<sup>2</sup>,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинана-3(2,3)-оксирана-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил) (2S)-8-(1-(3-(2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-1,2-диметилгидразинил)метил)-1H-индол-1-ил)пропаноил)пиперидин-4-ил)-2,3-диметил-4,7-диоксо-11,14-диокса-3,8-диазагептадекандиоат (204)

Раствор пиперидина 203 (203,2 мг, 0,194 ммоль), сложного эфира 12 (126,5 мг, 0,194 ммоль), 2,4,6-триметилпиридина (77 мкл, 0,582 ммоль), НОАТ (26,4 мг, 0,194 ммоль) в 1 мл ДМФА перемешивали в течение 30 мин. Неочищенную реакцию очищали с помощью обращенно-фазовой хроматографии на C18, применяя градиент от 0 до 100 % ацетонитрил:вода с 0,1 % муравьиной кислоты, с получением 280,5 мг (выход 97 %) соединения 204.

МС (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> Вычислено для C<sub>81</sub>H<sub>106</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>18</sub> 1513,7, Найдено 1514,0.

Получение (2S)-8-(1-(3-(2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-1,2-диметилгидразинил)метил)-1H-индол-1-ил)пропаноил)пиперидин-4-ил)-1-(((1<sup>4</sup>S,1<sup>6</sup>S,3<sup>3</sup>S,2R,4S,10E,12E,14R)-8<sup>6</sup>-хлор-1<sup>4</sup>-гидрокси-8<sup>5</sup>,14-диметокси-3<sup>3</sup>,2,7,10-тетраметил-1<sup>2</sup>,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинана-3(2,3)-оксирана-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)окси)-2,3-диметил-1,4,7-триоксо-11,14-диокса-3,8-диазагептадекан-17-овой кислоты (205)

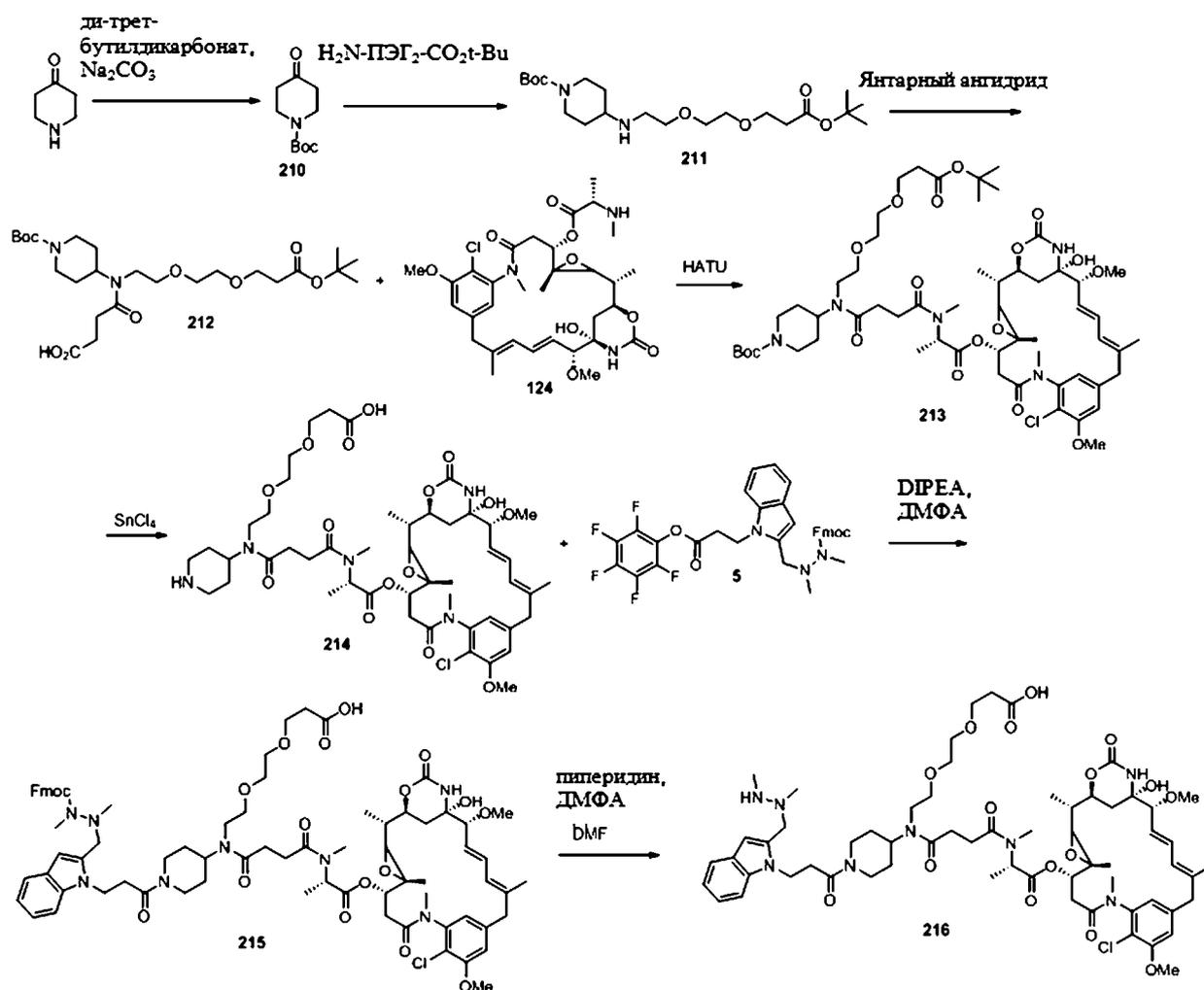
К раствору соединения 204 (108 мг, 0,0714 ммоль) в 500 мкл безводного ДХМ добавляли 357 мкл 1M раствора SnCl<sub>4</sub> в ДХМ. Гетерогенную смесь перемешивали в течение 1 часа и затем очищали с помощью обращенно-фазовой хроматографии на C18, применяя градиент от 0 до 100 % ацетонитрил:вода с 0,1 % муравьиной кислоты, с получением 78,4 мг (выход 75 %) соединения 205.

МС (ESI) m/z: [M-H]<sup>-</sup> Вычислено для C<sub>77</sub>H<sub>96</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>18</sub> 1455,7, Найдено 1455,9.

### Пример 2

Линкер, содержащий 4-аминопиперидиновую (4АП) группу, получали в соответствии со Схемой 2, показанной ниже.

### Схема 2



## Получение трет-бутил-4-оксопиперидин-1-карбоксилата (210)

В круглодонную колбу объемом 100 мл, содержащую магнитную мешалку, добавляли моногидрат гидрохлорида пиперидин-4-она (1,53 г, 10 ммоль), ди-трет-бутилдикарбонат (2,39 г, 11 ммоль), карбонат натрия (1,22 г, 11,5 ммоль), диоксан (10 мл) и воду (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Смесь разбавляли водой (100 мл) и экстрагировали EtOAc (3×100 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный материал сушили в вакууме с получением 1,74 г (87 %) соединения 210 в виде белого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) δ 3.73 (t, 4H, J = 6,0), 2.46 (t, 4H, J = 6,0), 1.51 (s, 9H).

МС (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> Вычислено для C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>3</sub> 200,3, Найдено 200,2.

Получение трет-бутил 4 -((2-(2-(3-(трет-бутокси)-3-оксопропокси)этокси)этил)амино)пиперидин-1-карбоксилата (211)

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнитную мешалку, добавляли трет-бутил-4-оксопиперидин-1-карбоксилат (399 мг, 2 ммоль), H<sub>2</sub>N-ПЭГ<sub>2</sub>-COOt-Bu (550 мг, 2,4 ммоль), 4 Å молекулярный фильтр (активированный порошок, 200 мг) и 1,2-дихлорэтан (5 мл). Смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. К реакционной смеси добавляли триацетоксиборгидрид натрия (845 мг, 4 ммоль). Смесь перемешивали в течение 3 дней при комнатной температуре. Полученную смесь распределяли на части между EtOAc и насыщенным водным NaHCO<sub>3</sub>. Органический слой промывали солевым раствором, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая 850 мг соединения 211 в виде вязкого масла.

МС (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> Вычислено для C<sub>21</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> 417,3, Найдено 417,2.

Получение 13-(1-(трет-бутоксикарбонил)пиперидин-4-ил)-2,2-диметил-4,14-диоксо-3,7,10-триокса-13-азагептадекан-17-овой кислоты (212)

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнитную мешалку, добавляли трет-бутил 4-((2-(2-(3-(трет-бутокси)-3-оксопропокси)этокси)этил)амино)пиперидин-1-карбоксилат 211 (220 мг, 0,5 ммоль), янтарный ангидрид (55 мг, 0,55 ммоль), 4-(диметиламино)пиперидин (5 мг, 0,04 ммоль) и дихлорметан (3 мл). Смесь перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь частично очищали флэш-хроматографией (элюирование 50-100 % EtOAc/гексаны) с получением 117 мг соединения 212 в виде прозрачного масла, которое применяли без дополнительной очистки.

МС (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> Вычислено для C<sub>25</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> 517,6, Найдено 517,5.

Получение 17-(трет-бутил) 1-(((1<sup>4</sup>S,1<sup>6</sup>S,3<sup>3</sup>S,2R,4S,10E,12E,14R)-8<sup>6</sup>-хлор-1<sup>4</sup>-гидрокси-8<sup>5</sup>,14-диметокси-3<sup>3</sup>,2,7,10-тетраметил-1<sup>2</sup>,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинана-3(2,3)-оксирана-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил) (2S)-8-(1-(трет-бутоксикарбонил)пиперидин-4-ил)-2,3-диметил-4,7-диоксо-11,14-диокса-3,8-диазагептадекандиоата (213)

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнитную мешалку, добавляли 13-(1-(трет-бутоксикарбонил)пиперидин-4-ил)-2,2-диметил-4,14-диоксо-3,7,10-триокса-13-азагептадекан-17-овую кислоту 212 (55 мг, 0,1 ммоль), N-деацил-майтансин 124 (65 мг, 0,1 ммоль), HATU (43 мг, 0,11 ммоль), ДМФА (1 мл) и дихлорметан (0,5 мл). Смесь перемешивали в течение 8 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь непосредственно очищали флэш-хроматографией на C18 (элюирование 5-100 % MeCN/вода), с получением 18 мг (16 %) соединения 213 в виде белой пленки.

МС (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> Вычислено для C<sub>57</sub>H<sub>87</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>17</sub> 1148,6, Найдено 1148,7.

Получение (2S)-1-(((1<sup>4</sup>S,1<sup>6</sup>S,3<sup>3</sup>S,2R,4S,10E,12E,14R)-8<sup>6</sup>-хлор-1<sup>4</sup>-гидрокси-8<sup>5</sup>,14-диметокси-3<sup>3</sup>,2,7,10-тетраметил-12,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинана-3(2,3)-оксирана-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)окси)-2,3-диметил-1,4,7-триоксо-8-(пиперидин-4-ил)-11,14-диокса-3,8-диазагептадекан-17-овой кислоты (214)

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнитную мешалку, добавляли мйтансиноид 213 (31 мг, 0,027 ммоль) и дихлорметан (1 мл). Раствор охлаждали до 0 °С и добавляли тетрахлорид олова (IV) (1,0 М раствор в дихлорметане, 0,3 мл, 0,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при 0 °С. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии на C18 (элюирование 5-100% MeCN/вода) с получением 16 мг (60%) соединения 214 в виде белого твердого вещества (16 мг, выход 60%).

МС (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> Вычислено для C<sub>48</sub>H<sub>71</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>15</sub> 992,5, Найдено 992,6.

Получение (2S)-8-(1-(3-(2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-1,2-диметилгидразинил)метил)-1H-индол-1-ил)пропаноил)пиперидин-4-ил)-1-(((1<sup>4</sup>S,1<sup>6</sup>S,3<sup>3</sup>S,2R,4S,10E,12E,14R)-8<sup>6</sup>-хлор-1<sup>4</sup>-гидрокси-8<sup>5</sup>,14-диметокси-3<sup>3</sup>,2,7,10-тетраметил-12,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинана-3(2,3)-оксирана-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,1<sup>2</sup>-диен-4-ил)окси)-2,3-диметил-1,4,7-триоксо-11,14-диокса-3,8-диазагептадекан-17-овой кислоты (215)

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнитную мешалку, добавляли мйтансиноид 214 (16 мг, 0,016 ммоль), (9H-флуорен-9-ил)метил 1,2-диметил-2-((1-(3-оксо-3)-(перфторфеноксипропил)-1H-индол-2-ил)метил)гидразин-1-карбоксилат

(5) (13 мг, 0,02 ммоль), DIPEA (8 мкл, 0,05 ммоль) и ДМФА (1 мл). Раствор перемешивали в течение 18 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии на C18 (элюирование 5-100% MeCN/вода) с получением 18 мг (77%) соединения 215 в виде белого твердого вещества.

МС (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> Вычислено для C<sub>77</sub>H<sub>98</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>18</sub> 1457,7, Найдено 1457,9.

Получение (2S)-1-(((1<sup>4</sup>S,1<sup>6</sup>S,3<sup>3</sup>S,2R,4S,10E,12E,14R)-8<sup>6</sup>-хлор-14-гидрокси-8,5,14-диметокси-3<sup>3</sup>,2,7,10-тетраметил-1<sup>2</sup>,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазина-3(2,3)-оксирана-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)окси)-8-(1-(3-(2-((1,2-диметилгидразинил)метил)-1H-индол-1-ил)пропаноил)пиперидин-4-ил)-2,3-диметил-1,4,7-триоксо-11,14-диокса-3,8-диазагептадекан-17-овой кислоты (216)

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнитную мешалку, добавляли майтансиноид 215 (18 мг, 0,012 ммоль), пиперидин (20 мкл, 0,02 ммоль) и ДМФА (1 мл). Раствор перемешивали в течение 20 минут при комнатной температуре. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии на C<sub>18</sub> (элюирование 1-60 % MeCN/вода (MeCN - ацетонитрил)) с получением 15 мг (98 %) соединения 216 (также называемого в настоящем описании HIPS-4АП-майтансин или HIPS-4-аминопиперидин-майтансин) в виде белого твердого вещества.

МС (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> Вычислено для C<sub>62</sub>H<sub>88</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>16</sub> 1235,6, Найдено 1236,0.

### Пример 3

#### Способы проведения экспериментов

#### Общий

Эксперименты проводили для создания сайт-специфически конъюгированных конъюгатов антитела с лекарственным средством (ADC). Сайт-специфическое получение ADC включало встраивание формилглицина (FGly), неприродной аминокислоты, в последовательность белка. Для того, чтобы встроить FGly (фиг. 1), короткую консенсусную последовательность, CXPXR, где X представляет собой серин, треонин, аланин или глицин, вставляли в желаемое место в консервативных областях тяжелых или легких цепей антитела, применяя стандартные способы клонирования молекулярной биологии. Эта "меченая" конструкция была рекомбинантно получена в клетках, совместно экспрессирующих формилглицин-образующий фермент (FGE), который котрансляционно превращал цистеин в пределах метки в остаток FGly, создавая альдегидную функциональную группу (также называемую в настоящем описании как альдегидная метка). Альдегидная функциональная группа служила химическим маркером биоортогональной конъюгации. Лигирование гидразино-изо-Пикте-Шпенглера (HIPS) применяли для соединения нагрузки (например, лекарственного средства, такого как

цитотоксин (например, майтансин)) с FGly, что приводило к образованию стабильной ковалентной связи С-С между нагрузкой цитотоксином и антителом. Ожидалось, что такая связь С-С будет устойчивой к физиологически значимым условиям, которым ADC подвергается во время циркуляции и рециркуляции FcRn, например, протеаз, с низким pH и восстанавливающих реагентов. Антитела, несущие альдегидную метку, могут быть получены в различных положениях. Эксперименты проводили для проверки влияния вставки альдегидной метки на С-конце (СТ) тяжелой цепи. Биофизическую и функциональную характеристику проводили на ADC, полученных конъюгацией с нагрузкой майтансином через линкер HIPS.

#### Клонирование, экспрессия и очистка меченых антител

Последовательность альдегидной метки вставляли на С-конец (СТ) тяжелой цепи с применением стандартных способов молекулярной биологии. Для мелкомасштабного производства клетки CHO-S трансфицировали человеческими экспрессирующими конструкциями FGE, а пулы клеток, сверхэкспрессирующих FGE, применяли для временной продукции антител. Для крупномасштабного производства применяли технологию GPEX (Catalent, Inc., Somerset, NJ) для создания клональной клеточной линии со сверхэкспрессией человеческого FGE (GPEX). Затем клон FGE применяли для создания объемных стабильных пулов клеток, экспрессирующих антитела. Антитела очищали от кондиционированной среды с применением хроматографии на основе белка А (MabSelect, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). Очищенные антитела мгновенно замораживали и хранили при минус 80 °С до дальнейшего применения.

#### Биоконъюгация, очистка и ВЭЖХ аналитика

С-концевое альдегид-меченое антитело к  $\alpha$ -CD22 (15 мг/мл) конъюгировали с HIPS-4АП-майтансином (8 мол. эквивалентов лекарственное средство:антитело) в течение 72 ч при 37 °С в 50 мМ цитрате натрия, 50 мМ NaCl, pH 5,5, содержащем 0,85 % ДМА. Неконъюгированное антитело удаляли с применением препаративной хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC, GE Healthcare 17-5195-01) с подвижной фазой А: 1,0 М сульфата аммония, 25 мМ фосфата натрия pH 7,0 и подвижной фазой В: 25 % изопропанола, 18,75 мМ фосфат натрия, pH 7,0. Изократический градиент 33 % В применяли для элюирования неконъюгированного материала, после чего следовал линейный градиент 41-95 % В для элюирования моно- и диконъюгированных веществ. Чтобы определить значение DAR конечного продукта, ADC исследовали с помощью аналитической HIC (Tosoh # 14947, Grove City, OH) с подвижной фазой А: 1,5 М сульфата аммония, 25 мМ фосфата натрия pH 7,0 и подвижной фазой В: 25% изопропанола. 18,75 мМ фосфат натрия, pH 7,0. Для определения агрегации, образцы анализировали с

применением аналитической гель-фильтрационной хроматографии (SEC, Tosoh # 08541) с подвижной фазой 300 mM NaCl, 25 mM фосфата натрия, pH 6,8.

#### Результаты

Антитела к  $\alpha$ CD22, модифицированные так, чтобы они содержали альдегидную метку на С-конце (СТ) тяжелой цепи, были конъюгированы с нагрузкой майтансином, присоединенной к линкеру HIPS-4АП, как описано выше. По завершении реакции конъюгации неконъюгированное антитело удаляли препаративной НИС, а оставшееся свободное лекарственное средство удаляли в течение замены буфера путем тангенциальной поточной фильтрации. Реакции имели высокий выход, с эффективностью конъюгации более или равно 84 % и общим выходом более 70 %. Полученные ADC имели отношение лекарственного средства к антителу (DAR) 1,6-1,9 и были преимущественно мономерными. На фиг. 2-5 представлено значение DAR типичных реакций неочищенных и очищенных ADC, как определено с помощью НИС и обращенно-фазовой хроматографией, и показывают мономерную целостность, как определено с помощью SEC.

На фиг. 2 показана кривая колонки гидрофобного взаимодействия (НИС) альдегид-меченного антитела против CD22, конъюгированного на С-конце (СТ) с нагрузкой майтансином, присоединенной к линкеру HIPS-4АП. На фиг. 2 показано, что первоначальное значение DAR составляло 1,68, как определено с помощью НИС.

На фиг. 3 показана кривая НИС альдегид-меченного антитела против CD22, конъюгированного на С-конце (СТ) с нагрузкой майтансином, присоединенной к линкеру HIPS-4АП. На фиг. 3 показано, что окончательное значение DAR составило 1,77, как определено с помощью НИС.

На фиг. 4 показана кривая обращенно-фазовой хроматографии (PLRP) альдегид-меченного антитела против CD22, конъюгированного на С-конце (СТ) с нагрузкой майтансином, присоединенной к линкеру HIPS-4АП. На фиг. 4 показано, что окончательное значение DAR составило 1,81, как определено с помощью обращенно-фазовой хроматографии (PLRP).

На фиг. 5 показан график аналитического анализа гель-фильтрационной хроматографии (SEC) альдегид-меченного антитела против CD22, конъюгированного на С-конце (СТ) с нагрузкой майтансином, присоединенной к линкеру HIPS-4АП. Как показано на фиг. 5, с помощью аналитической SEC показано 98,2 % мономера для конечного продукта.

#### Цитотоксичность in vitro

CD22-позитивные клеточные линии В-клеточной лимфомы Ramos и WSU-DLCL2 были получены из банков клеток ATCC и DSMZ, соответственно. Клетки поддерживали в среде RPMI-1640 (Cellgro, Manassas, VA), дополненной 10 % фетальной бычьей сывороткой (Invitrogen, Grand Island, NY) и Glutamax (Invitrogen). За 24 ч до культивирования клетки пересевали для обеспечения лог-фазы роста. В день культивирования 5000 клеток на лунку высевали на 96-луночные планшеты в 90 мкл нормальной ростовой среды с добавлением 10 МЕ пенициллина и 10 мкг/мл стрептомицина (Cellgro). Клетки обрабатывали в различных концентрациях 10 мкл разведенных анализов и планшеты инкубировали при 37 °C в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Через 5 дней добавляли 100 мкл/лунку реагента Cell Titer-Glo (Promega, Madison, WI) и измеряли люминесценцию с применением планшет-ридера Molecular Devices SpectraMax M5. Для анализа данных применяли программное обеспечение GraphPad Prism.

#### Результаты

$\alpha$ CD22 CT HIPS-4АП-майтансин проявлял очень сильную активность в отношении клеток WSU-DLCL2 и Ramos *in vitro* по сравнению со свободным мйтансином (фиг. 6). Концентрации IC<sub>50</sub> (концентрация полумаксимального ингибирования процесса/активности) составляли 0,018 и 0,086 нМ для ADC и свободного лекарственного средства, соответственно, в отношении клеток WSU-DLCL2, и составляли 0,007 и 0,040 нМ для ADC и свободного лекарственного средства, соответственно, в отношении клеток Ramos.

На фиг. 6А показан график эффективности *in vitro* в отношении клеток WSU-DLCL2 (% жизнеспособности в зависимости от Log концентрации конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC) (нМ)) для ADC против CD22, конъюгированных на С-конце (CT) с нагрузкой мйтансином, присоединенной к линкеру HIPS-4АП. На фиг. 6В показан график эффективности *in vitro* в отношении клеток Ramos (% жизнеспособности в зависимости от Log концентрации конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC) (нМ)) для ADC против CD22, конъюгированных на С-конце (CT) с нагрузкой мйтансином, присоединенной к линкеру HIPS-4АП.

#### Исследования ксенотрансплантата

Самкам мышей ICR SCID (8 на группу) подкожно инокулировали 5×10<sup>6</sup> клеток WSU-DLCL2. Лечение начинали, когда опухоли достигали в среднем 262 мм<sup>3</sup>, и в это время животным вводили внутривенно только носитель или CT-меченный  $\alpha$ CD22 HIPS-4АП-майтансин (10 мг/кг). Введение доз продолжали каждые четыре дня, в общем количестве четыре дозы (q4d×4). Животных анализировали два раза в неделю на массу

тела и размер опухоли. Животных подвергали эвтаназии, когда опухоли достигали 2000 мм<sup>3</sup>.

#### Результаты

Среднее время до конечной точки для животных в контрольных группах носителя составляло 16 дней, следовательно, ингибирование роста опухоли (TGI %) рассчитывали в этот день. TGI% определяли по следующей формуле:

$$\text{TGI (\%)} = (\text{ОО}_{\text{контрольная группа}} - \text{ОО}_{\text{группа лечения}}) / \text{ОО}_{\text{контроль}} \times 100$$

где ОО - это объем опухоли.

Животные, которым вводили αCD22 HIPS-4АП-майтанин, продемонстрировали 90 % TGI на 16 день, причем 5 из 8 опухолей подвергались полной регрессии (фиг. 7). Три из этих полных регрессий были продолжительными до конца исследования (день 58). На фиг. 7 показан график, показывающий эффективность *in vivo* в отношении модели ксенотрансплантата WSU-DLCL2 (средний объем опухоли (мм<sup>3</sup>) в зависимости от дней) для ADC против CD22, конъюгированных на С-конце (СТ) с нагрузкой мйтанином, присоединенной к линкеру HIPS-4АП. Вертикальные стрелки на фиг. 7 показывают введение дозы, которое осуществляли каждые четыре дня, в общем количестве четыре дозы (q4d × 4).

#### Пример 4

##### Введение

Гематологически обусловленные опухоли составляют примерно 10 % всех вновь диагностированных случаев рака в США. Из них название неходжкинская лимфома (НХЛ) описывает разнообразную группу раковых заболеваний, которые в совокупности входят в десятку наиболее часто диагностируемых раковых заболеваний во всем мире. Хотя долгосрочные тенденции выживания улучшаются, остается значительная неудовлетворенная клиническая потребность в лечении, направленно на помощь пациентам с рецидивирующим или трудно поддающимся лечению заболеванием, одной из причин которого является эффлюкс лекарственного средства вследствие активации ксенобиотических насосов, таких как MDR1. Был получен сайт-специфически конъюгированный конъюгат антитела с лекарственным средством, нацеленный против CD22 и несущий нерасщепляемую нагрузку мйтанином, который был устойчив к MDR1-опосредованному эффлюксу. Конструкция была эффективна в отношении CD22+ НХЛ ксенотрансплантатов и ее можно многократно вводить макакам-крабоедам в дозе 60 мг/кг без каких-либо наблюдаемых побочных эффектов. Вместе данные показали, что указанный препарат можно эффективно применять у пациентов с опухолями CD22+, у которых развилась резистентность, связанная с MDR1, к предшествующим способам

лечения. CD22 является клинически подтвержденной мишенью при лечении НХЛ и ОЛЛ (острый лимфобластный лейкоз). Конъюгат антитела с лекарственным средством против CD22 (ADC) согласно настоящему изобретению может быть применен для лечения пациентов с рецидивирующей/трудно поддающийся лечению НХЛ и ОЛЛ.

#### Материал и способы

Антитело против CD22 конъюгировали сайт-специфически, с применением технологии альдегидной метки, с нерасщепляемым линкером нагрузки майтансином. ADC охарактеризовали как биофизически, так и функционально *in vitro*. Затем эффективность *in vivo* определяли на мышах с применением двух моделей ксенотрансплантата, и исследования токсичности были выполнены на крысах и макаках-крабоедах. Фармакодинамические исследования выполнили на макаках, а с помощью фармакологических и токсикокинетических исследований сравнивали общее воздействие ADC в исследованиях по эффективности и токсичности.

#### Результаты

ADC было высокоактивным *in vivo*, даже в отношении клеточных линий, которые были сконструированы со сверхэкспрессией эффлюксного насоса, MDR1. Конструкция была эффективна при дозах 10 мг/кг×4 в отношении моделей опухолей ксенотрансплантата НХЛ, и в исследовании токсичности для макак-крабоедов ADC вводили дважды по 60 мг/кг без каких-либо наблюдаемых побочных эффектов. Воздействие общего ADC в этих дозах (согласно оценке  $AUC_{0-inf}$  (площадь под кривой «концентрация - время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности) показало, что воздействие, необходимое для достижения эффективности, было ниже допустимых пределов. Наконец, изучение фармакодинамического ответа у обработанных макак продемонстрировало, что В-клеточный компартмент был избирательно истощен, что указывает на то, что ADC элиминировал клетки-мишени без проявления заметной нецелевой токсичности.

Результаты показали, что ADC можно эффективно применять у пациентов с опухолями CD22+, у которых развилась резистентность, связанная с MDR1, к предшествующим способам лечения.

#### Пример 5

##### Введение

Лейкозы, лимфомы и миеломы широко распространены в популяции, составляя примерно 10 % всех вновь диагностированных случаев рака в США в 2015 году. Из этих видов рака, злокачественные новообразования, вызванные В-клетками, составляют большую и разнообразную группу, которая включает неходжкинскую лимфому (НХЛ),

хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) и острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ). Аналогично, в качестве категории, НХЛ включает примерно 60 подгрупп лимфом, из которых около 85 % являются производными В-клеток, включая диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДККЛ), фолликулярную лимфому (ФЛ) и мантийноклеточную лимфому (МКЛ). В совокупности заболевания НХЛ являются одними из самых распространенных типов рака, которые занимают 7-е место среди самых распространенных видов рака в США и 10-е место среди самых распространенных видов рака в мире в 2012 году. В то время как долгосрочные тенденции показывают улучшение показателей 5-летней выживаемости для большинства пациентов с диагностированным раком крови, остается значительная неудовлетворенная клиническая потребность, 16 % пациентов с ХЛЛ, 30 % пациентов с ОЛЛ и 30 % пациентов с НХЛ, диагностированных с 2004 по 2010 год, не достигли 5-летней конечной точки выживания.

CD22 представляет собой поверхностный гликопротеин, ограниченный В-клеточной линией дифференцировки, который экспрессируется на большинстве гематологических злокачественных опухолей В-клеток, но не экспрессируется на гемопоэтических стволовых клетках, В-клетках памяти или других нормальных негематopoэтических тканях. Его паттерн экспрессии и быстрая кинетика интернализации делают его мишенью для терапии конъюгатом антитела с лекарственным средством (ADC), и это было подтверждено в клинических испытаниях в отношении НХЛ и ОЛЛ.

В описанных в настоящем документе экспериментах применяли способ сайт-специфической конъюгации, основанной на альдегидной метке и химии гидразино-изо-Пикте-Шпенглера (HIPS), для помещения нагрузки майтансином, связанной через нерасщепляемый линкер, с С-концом тяжелой цепи антитела. Генетически кодируемая альдегидная метка включает последовательность из шести аминокислот, LCTPSR (SEQ ID NO: 32). Котрансляционно, сверхэкспрессируемый формилглицин-образующий фермент (FGE), превращал цистеин в пределах консенсусной последовательности в остаток формилглицина, несущий альдегидную функциональную группу, которая реагировала с нагрузкой линкер HIPS с образованием ADC. Этот подход позволил контролировать как размещение нагрузки, так и значение DAR, и привел к получению высокоомогенных препаратов ADC. Сайт-специфически конъюгированные ADC демонстрировали улучшенную фармакокинетику (ФК) и эффективность по сравнению со стохастическими конъюгатами, вероятно, из-за низкого содержания недостаточно- или чрезмерно конъюгированных типов в препарате, которые могут привести к неэффективным или чрезмерно токсичным молекулам, соответственно. Кроме того, нерасщепляемая нагрузка линкер-майтансин, применяемая в ADC против CD22, была устойчивой к эффлюксу,

вызванному MDR1, и не опосредовала нецелевой или неспецифический цитолиз. Вместе эти особенности способствовали эффективности и безопасности ADC против CD22 в доклинических исследованиях.

#### Материалы и способы

##### Общее

Все исследования на животных проводились в соответствии с руководящими принципами Институционального комитета по уходу за животными и их использованию и проводились в лабораториях Charles River, Aragen Bioscience или Covance Laboratories. Мышиное антитело против майтансина было получено ProMab и подтверждено собственными силами. Кроличье антитело против AF488 было приобретено у Life Technologies. Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), получали от Jackson Immunoresearch. Антитела, примененные для фармакодинамических исследований, были получены от BD Pharmingen. Клеточные линии были получены из банков клеток ATCC и DSMZ, где они были аутентифицированы по морфологии, кариотипированием и ПЦР-подходами.

##### Клонирование, экспрессия и очистка меченых антител

Антитела были получены с применением стандартных способов клонирования и очистки и технологии экспрессии GPEX®.

##### Биоконъюгация, очистка и ВЭЖХ аналитика

ADC получали и определяли так, как описано в Drake et al., *Bioconjugate Chem.*, 2014, 25, 1331-41.

##### Получение клеточных линий MDR1+

кДНК MDR1 (ABCB1) была получена от Sino Biological и клонирована в плазмиду pEF с селективным маркером гигромицином. Прибор AMAXA Nucleofector™ применяли для электропорации клеток Ramos (ATCC CRL-1923) и WSU-DLCL2 (DSMZ ACC 575) в соответствии с инструкциями производителя. После селекции с гигромицином (Invitrogen 10687010) пулы обогащали обработкой паклитакселом (25 нМ в течение до 10 дней) для дальнейшего отбора клеток с функциональным MDR1. Полученные клетки поддерживали при селекции с гигромицином в RPMI (Gibco 21870-092) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) и 1X GlutaMax (Gibco 35050-079).

##### Анализ цитотоксичности *in vitro*

Клеточные линии высевали в 96-луночные планшеты (Costar 3610) с плотностью  $5 \times 10^4$  клеток/лунку в 100 мкл питательной среды и оставляли на 5 часов. Последовательное разбавление тестируемых образцов проводили в RPMI при 6-кратной конечной концентрации и 20 мкл добавляли к клеткам. После инкубации при 37 °C в

атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> в течение 5 дней жизнеспособность измеряли с применением анализа пролиферации клеток Promega CellTiter 96® AQueous One Solution (G3581) в соответствии с инструкциями производителя. Кривые GI<sub>50</sub> (концентрация полумаксимального ингибирования пролиферации) рассчитывали в GraphPad Prism с применением значения отношения лекарственного средства к антителу (DAR) ADC для нормализации дозы к концентрации нагрузки.

#### Исследования ксенотрансплантата

Самок мышей CB17 ICR SCID инокулировали подкожно клетками WSU-DLCL2 или Ramos в 50 % матригеле. Опухоли измеряли два раза в неделю, а объем опухоли оценивали по формуле:

$$\text{объем опухоли (мм}^3\text{)} = \frac{w^2 \times l}{2},$$

где w представляет собой ширину опухоли и l представляет собой длину опухоли. Когда опухоли достигали желаемого среднего объема, животных путем рандомизации разделяли на группы от 8 до 12 мышей и им вводили дозы так, как описано ниже. Животных подвергали эвтаназии в конце исследования или, когда опухоли достигали 2000 мм<sup>3</sup>.

#### Токсикологическое исследование и токсикокинетический анализ (ТК) на крысах

Самцам крыс линии Спрег-Дуоли (возраст 8-9 недель в начале исследования) внутривенно вводили однократную дозу 6, 20, 40 или 60 мг/кг ADC против CD22 (5 животных на группу). Животных наблюдали в течение 12 дней после введения дозы. Массу тела регистрировали на 0, 1, 4, 8 и 11 день. Кровь собирали у всех животных через 8 часов и через 5, 9 и 12 дней и применяли для токсикокинетических анализов (все моменты времени) и для клинической химии и гематологических анализов (дни 5 и 12). Токсикокинетические анализы выполняли с помощью ИФА, применяя те же условия и реагенты, которые описаны для фармакокинетических анализов.

#### Токсикология и ТК исследования на приматах, не являющихся человеком

Макаки-крабоеды (2/пол/группа) получали две дозы (каждый 21 день) 10, 30 или 60 мг/кг ADC против CD22 с последующим 21-дневным периодом наблюдения. Массу тела оценивали до введения дозы в 1-й день и на 8, 15, 22 (до введения), 29, 36 и 42 дни. Кровь собирали для токсикокинетического, клинического химического и гематологического анализов в соответствии с графиками, представленными в таблице 2. Токсикокинетические анализы выполняли с помощью ИФА, применяя те же условия и реагенты, которые описаны для фармакокинетических анализов, за исключением того, что

белок CD22-His применяли в качестве реагента захвата для измерения общего антитела и общего ADC.

Таблица 2. Сводные данные фармакокинетических результатов у крыс, получавших дозу 3 мг/кг с ADC против CD22

Параметр, среднее значение (SD)	Суммарно по антителам	Суммарно по ADC	Суммарно по конъюгатам
AUC <sub>0-inf</sub> (дней • мкг/мл)	304 (40)	218 (18)	261 (26)
Клиренс (мл/день/кг)	10,0 (1)	13,8 (1)	11,6 (1)
C <sub>0,04 d</sub>	73,2 (5)	83,9 (16)	76,8 (6)
t <sub>1/2</sub> эффективный (дни)*	9,48 (1)	6,13 (0,6)	7,22 (0,6)
VSS (мл/кг)	41,1 (3)	36,7 (7)	39,2 (3)

Суммарные значения по антителам включают конъюгированные и неконъюгированные антитела. Суммарные значения по ADC представляют собой DAR-чувствительные измерения. Суммарные значения по конъюгатам включают все анализы с DAR более или равно 1. SD, стандартное отклонение. AUC<sub>0-inf</sub>, площадь под кривой зависимости концентрации от времени от 0 до бесконечности. C<sub>0,04 d</sub>, концентрация, наблюдаемая через 1 ч. t<sub>1/2</sub> эффективный, эффективный период полураспада. V<sub>SS</sub>, объем распределения в устойчивом состоянии. \*Неопределенность для периода полураспада приведена в качестве стандартной ошибки.

#### Фармакодинамическое исследование на приматах, не являющихся человеком

Образцы цельной крови от макак-крабоедов, включенных в токсикологическое исследование ADC против CD22, анализировали с помощью проточной цитометрии для оценки популяций лейкоцитов CD3<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> и CD3<sup>-</sup>/CD20<sup>-</sup>. Кратко, к аликвоте 100 мкл цельной крови добавляли либо антитела изотипического контроля, конъюгированные с флуоресцеином и с фикоэритрином, либо антитела против CD20, конъюгированные с флуоресцеином и антитела против CD3, конъюгированные с фикоэритрином, и инкубировали на льду в течение 30 минут. Затем эритроциты лизировали раствором хлорида аммония (Stem Cell Technologies) и клетки дважды промывали фосфатно-солевым буферным раствором + 1 % FBS. Меченые клетки анализировали проточной цитометрией на приборе FACSCanto™ с программным обеспечением FACSDiva™.

#### Дизайн фармакокинетических (ФК) исследований

Для исследования на мышах, животных, применяемых в эксперименте с ксенотрансплантатом Ramos, отбирали в группы по три единицы в моменты времени, начиная с 1 часа после первой дозы и продолжая в течение периода наблюдения. Для

исследования на крысах, самцам крыс линии Спрег-Доули (по 3 на группу) внутривенно вводили один болкус ADC 3 мг/кг. Плазму собирали через 1, 8 и 24 ч, и через 2, 4, 6, 8, 10, 14 и 21 день после введения дозы. Образцы плазмы хранили при -80 °С до применения.

#### Анализ образцов ФК и ТК

Концентрации суммарных антител, суммарных ADC (DAR-чувствительный) и суммарных конъюгатов (DAR более или равно 1) определяли количественно с помощью ИФА, как показано на фиг. 10. Суммарно для антител, конъюгаты захватывали антителом, специфичным к IgG человека, и детектировали антителом, специфичным к Fc человека, конъюгированным с HRP. Суммарно для ADC, конъюгаты захватывали антителом, специфичным к Fab человека и детектировали с помощью первичного антитела мыши к майтансину, а затем с помощью вторичного антитела, специфичного к IgG мыши, подкласс 1, конъюгированного с HRP. Суммарно для конъюгатов, конъюгаты захватывали антителом против майтансина и детектировали антителом, специфичным к Fc человека, конъюгированным с HRP. Связанное вторичное антитело детектировали с применением субстрата ИФА Ultra TMB One-Step (Thermo Fisher). После гашения реакции с помощью серной кислоты, сигналы считывали, измеряя оптическую плотность при 450 нм на планшет-ридере Molecular Devices Spectra Max M5, оснащенный программным обеспечением SoftMax Pro. Данные проанализировали с применением GraphPad Prism и Microsoft Excel.

#### Непрямое ИФА связывание антигена CD22

96-луночные планшеты Maxisorp (Nunc) покрывали в течение ночи при 4 °С 1 мкг/мл CD22-His человека (Sino Biological) в ФСБ (фосфатно-солевой буферный раствор). Планшет блокировали казеиновым буфером (ThermoFisher), а затем антитела против CD22 дикого типа и ADC высевали в 11-ступенчатой серии 2-кратных разведений, начиная с 200 нг/мл. Планшет инкубировали, встряхивая, при комнатной температуре в течение 2 часов. После промывки 0,1 % Твин-20 в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ), связанный анализ детектировали с помощью вторичного антитела, специфичного к Fc-γ человека, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP). Сигналы визуализировали с помощью Ultra TMB (Pierce) и гасили 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Абсорбцию при 450 нм определяли с применением планшет-ридера Molecular Devices SpectraMax M5, а данные анализировали с применением GraphPad Prism.

#### Интернализация CD22+, опосредованная ADC против CD22 на клеточных линиях CD22+ НХЛ

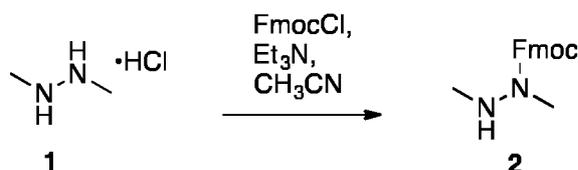
Клетки Ramos, Granta-519 и WSU-DLCL2 (1 мкг на тест) инкубировали либо только в буфере для мечения [фосфатно-солевой буферный раствор + 1 % фетальная

бычья сыворотка (FBS)], либо в буфере для мечения с ADC против CD22 (1 мкг на тест). Образцы помещали при 4 или 37 °C на 2 часа. Затем клетки инкубировали на льду в течение 20 минут с антителами против CD22, меченными флуоресцеином. После двукратной промывки в буфере для мечения, клетки анализировали проточной цитометрией на приборе FACSCanto™, с программным обеспечением FACSDiva™. Разницу в флуоресценции между клетками при 4 и 37 °C ± ADC интерпретировали как интернализацию, опосредованную ADC против CD22.

Исследования перекрёстной реактивности тканей макак-крабоедов и человека

Исследования перекрестной реактивности тканей проводили с помощью Ensigna Biosystems Inc. (Richmond, CA) с применением биотинилированного ADC против CD22 и биотинилированного изотипического антитела, конъюгированного с нагрузкой линкер HIPS-4АП-майтансин, в качестве контроля. Применяли тканевые микрочипы, содержащие кожу, сердце, легкие, почки, печень, поджелудочную железу, желудок, тонкую кишку, толстую кишку и селезенку (положительный контроль). Первичное антитело определяли с применением стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена, с последующей визуализацией с применением субстрата DAB.

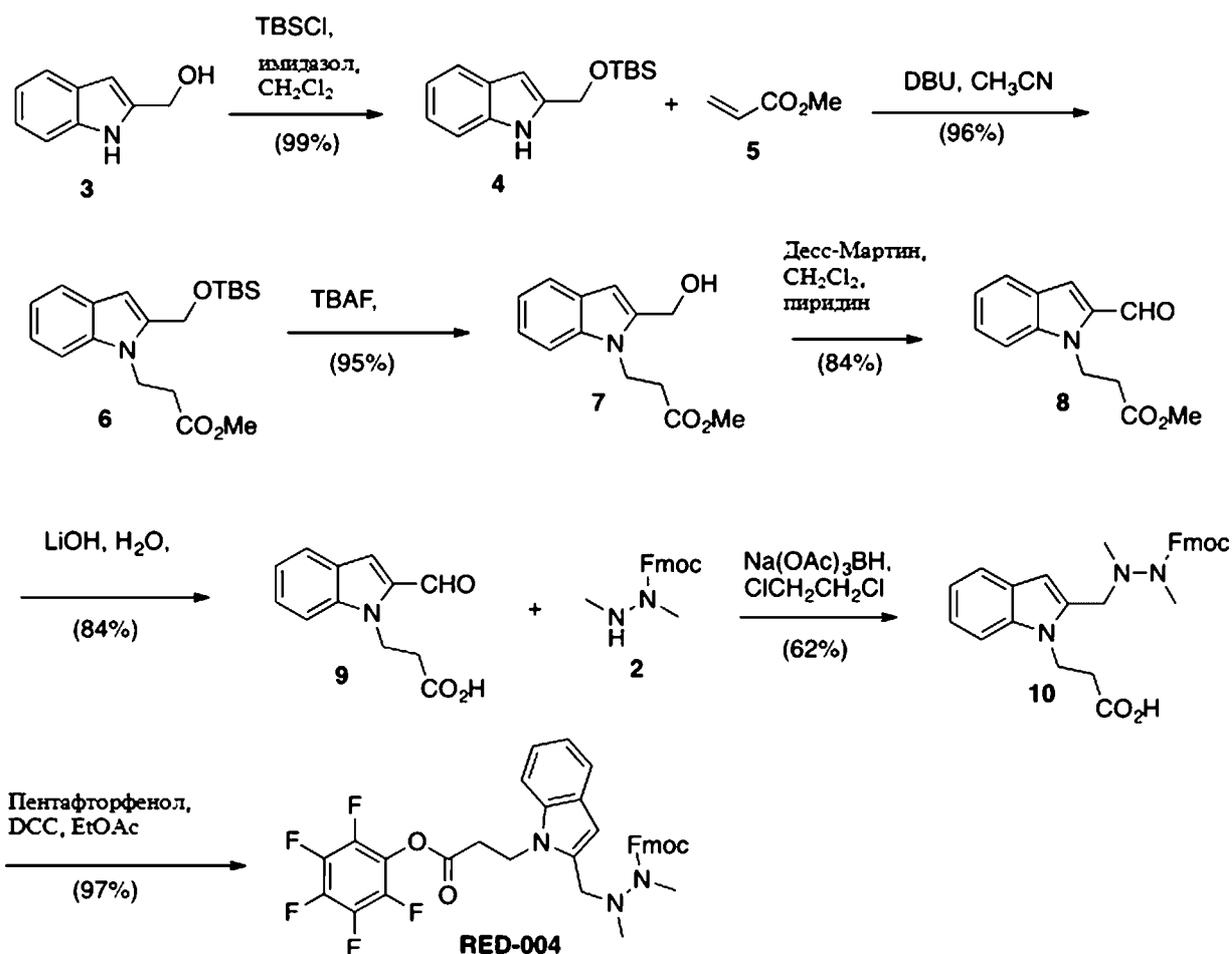
Получение нагрузки линкер HIPS-4АП-майтансин



(9H-флуорен-9-ил)метил 1,2-диметилгидразин-1-карбоксилат (2).

MeNHNHMe•2HCl (1) (5,0 г, 37,6 м моль) растворяли в CH<sub>3</sub>CN (80 мл). Добавляли Et<sub>3</sub>N (триэтиламин) (22 мл, 158 ммоль) и образовавшийся осадок удаляли фильтрацией. К оставшемуся раствору MeNHNHMe по каплям добавляли раствор FmocCl (0,49 г, 18,9 ммоль, 0,5 экв.) в течение 2,5 ч при минус 20 °C. Затем реакционную смесь разбавляли EtOAc, промывали H<sub>2</sub>O, солевым раствором, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали в вакууме. Остаток очищали флэш-хроматографией на диоксиде кремния (гексаны:EtOAc = 3:2), получая 3,6 г (34 %) соединения 2.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,75-7,37 (m, 8 H), 4,48 (br s, 2H), 4,27 (t, J = 6,0 Гц, 1H), 3,05 (s, 3H), 2,55 (br s, 3H).



#### 2-(((трет-б утилдиметилсилил)окси)метил)-1H-индол (4)

В высушенную в печи колбу загружали индол-2-метанол **3** (1,51 г, 10,74 ммоль), TBSCl (1,789 г, 11,87 ммоль) и имидазол (2,197 г, 32,27 ммоль), и эту смесь суспендировали в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 мл, безводный). Через 16 ч реакционную смесь концентрировали до оранжевого остатка. Неочищенную смесь растворяли в Et<sub>2</sub>O (50 мл), промывали водным AcOEt об./об.%, 3×50 мл) и соевым раствором (25 мл). Объединенные органические слои сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и концентрировали, получая 2,789 г (99 %) соединения **4** в виде кристаллического твердого вещества, которое применяют без дальнейшей очистки.

<sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,29 (s, 1H), 7,57 (d,  $J = 7,7$  Гц, 1H), 7,37 (dd,  $J = 8,1, 0,6$  Гц, 1H), 7,19 – 7,14 (m, 1H), 7,12 – 7,07 (m, 1H), 6,32 (d,  $J = 1,0$  Гц, 1H), 4,89 (s, 2H), 0,95 (s, 9H), 0,12 (s, 6H).

<sup>13</sup>C ЯМР (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  138,3, 136,0, 128,6, 121,7, 120,5, 119,8, 110,9, 99,0, 59,4, 26,1, 18,5, минус 5,2.

HRMS (ESI) вычислено для  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{NOSi}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 262,1627, найдено: 262,1625.

Метил 3-(2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-1H-индол-1-ил)пропаноат (**6**)

К раствору индола 4 (2,789 мкг, 10,67 ммоль) в  $\text{CH}_3\text{CN}$  (25 мл) добавляли метилакрилат 5 (4,80 мл, 53,3 ммоль), а затем 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (800 мкл, 5,35 ммоль), и полученную смесь кипятят с обратным холодильником. Через 18 ч раствор охлаждали и концентрировали до оранжевого масла, которое очищали хроматографией на силикагеле (9:1 гексаны:EtOAc), получая 3,554 г (96 %) соединения 6 в виде бесцветного масла.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,58 (d,  $J = 7,8$  Гц, 1H), 7,34 (d,  $J = 8,2$  Гц, 1H), 7,23 – 7,18 (m, 1H), 7,12 – 7,07 (m, 1H), 6,38 (s, 1H), 4,84 (s, 2H), 4,54 – 4,49 (m, 2H), 2,89 – 2,84 (m, 2H), 0,91 (s, 9H), 0,10 (s, 6H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172,0, 138,5, 137,1, 127,7, 122,0, 121,0, 119,8, 109,3, 101,8, 58,2, 51,9, 39,5, 34,6, 26,0, 18,4, минус 5,2.

HRMS (ESI) вычислено для  $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{NO}_3\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 348,1995, найдено: 348,1996.

Метил 3-(2-(гидроксиметил)-1H-индол-1-ил)пропаноат (7)

К раствору соединения 6 (1,283 г, 3,669 ммоль) в ТГФ (20 мл) при 0 °С добавляли 1,0 М раствор фторида тетрабутиламмония в ТГФ (3,90 мл, 3,90 ммоль). Через 15 минут реакционную смесь разбавляли  $\text{Et}_2\text{O}$  (диэтиловый простой эфир) (20 мл) и промывали  $\text{NaHCO}_3$  (насыщенный водный раствор, 3×20 мл) и концентрировали до бледно-зеленого масла. Масло очищали хроматографией на силикагеле (2:1 гексаны:EtOAc), получая 822 мг (95 %) соединения 7 в виде белого кристаллического твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (500 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,60 (d,  $J = 7,8$  Гц, 1H), 7,34 (dd,  $J = 8,2, 0,4$  Гц, 1H), 7,27 – 7,23 (m, 1H), 7,16 – 7,11 (m, 1H), 6,44 (s, 1H), 4,77 (s, 2H), 4,49 (t,  $J = 7,3$  Гц, 2H), 3,66 (s, 3H), 2,87 (t,  $J = 7,3$  Гц, 2H), 2,64 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (126 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172,3, 138,5, 137,0, 127,6, 122,2, 121,1, 119,9, 109,3, 102,3, 57,1, 52,0, 39,1, 34,3.

HRMS (ESI) вычислено для  $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NNaO}_3$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 256,0950, найдено: 256.0946.

Метил 3-(2-формил-1H-индол-1-ил)пропаноат (8)

Периодинан Десса-Мартина (5,195 г, 12,25 ммоль) суспендировали в смеси  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 мл) и пиридина (2,70 мл, 33,5 ммоль). Через 5 мин полученную белую суспензию переносили в раствор метил 3-(2-(гидроксиметил)-1H-индол-1-ил)пропаноата (соединение 7, 2,611 г, 11,19 ммоль) в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 мл), что приводило к красно-коричневой суспензии. Через 1 ч реакцию гасили тиосульфатом натрия (10 % водный раствор, 5 мл) и  $\text{NaHCO}_3$  (насыщенный водный раствор, 5 мл). Водный слой экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3×20 мл), Объединенные экстракты сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали до коричневого масла. Очистка хроматографией на силикагеле (5-50 % EtOAc в гексанах) давала 2,165 г (84 %) соединения 8 в виде бесцветного масла.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,87 (s, 1H), 7,73 (dt,  $J = 8,1, 1,0$  Гц, 1H), 7,51 (dd,  $J = 8,6, 0,9$  Гц, 1H), 7,45 – 7,40 (m, 1H), 7,29 (d,  $J = 0,9$  Гц, 1H), 7,18 (ddd,  $J = 8,0, 6,9, 1,0$  Гц, 1H), 4,84 (t,  $J = 7,2$  Гц, 2H), 3,62 (s, 3H), 2,83 (t,  $J = 7,2$  Гц, 2H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  182,52, 171,75, 140,12, 135,10, 127,20, 126,39, 123,46, 121,18, 118,55, 110,62, 51,83, 40,56, 34,97.

HRMS (ESI) вычислено для  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 254,0793, найдено: 254,0786.

3-(2-формил-1H-индол-1-ил)пропановая кислота (9)

К раствору индола 8 (2,369 г, 10,24 ммоль), растворенному в диоксане (100 мл), добавляли LiOH (4 М водный раствор, 7,68 мл, 30,73 ммоль). В течение нескольких часов постепенно образовывался густой белый осадок. Через 21 час добавляли по каплям HCl (1 М водный раствор (30 мл), чтобы получить раствор со значением pH 4. Раствор концентрировали и полученное бледно-коричневое масло растворяли в EtOAc (50 мл) и промывали водой (2×50 мл) и солевым раствором (20 мл). Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали до оранжевого твердого вещества. Очистка хроматографией на силикагеле (10-50 % EtOAc в гексане с 0,1 % уксусной кислотой) давала 1,994 г (84 %) соединения 9 в виде бледно-желтого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,89 (s, 1H), 7,76 (dt,  $J = 8,1, 0,9$  Гц, 1H), 7,53 (dd,  $J = 8,6, 0,9$  Гц, 1H), 7,48 – 7,43 (m, 1H), 7,33 (d,  $J = 0,8$  Гц, 1H), 7,21 (ddd,  $J = 8,0, 6,9, 1,0$  Гц, 1H), 4,85 (t,  $J = 7,2$  Гц, 2H), 2,91 (t,  $J = 7,2$  Гц, 2H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  182,65, 176,96, 140,12, 135,02, 127,33, 126,42, 123,53, 121,27, 118,76, 110,55, 40,19, 34,82.

HRMS (ESI) вычислено для  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{NO}_3$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 216,0666, найдено: 216,0665.

3-(2-((2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-1,2-диметилгидразинил)метил)-1H-индол-1-ил)пропановая кислота (10)

К раствору соединения 9 (1,193 г, 5,492 ммоль) и (9H-флуорен-9-ил)метил 1,2-диметилгидразинкарбоксилата, соединение 2 (2,147 г, 7,604 ммоль) в 1,2-дихлорэтаноле (безводный, 25 мл) добавляли триацетоксиборгидрид натрия (1,273 г, 6,006 ммоль). Полученную желтую суспензию перемешивали в течение 2 часов и затем гасили  $\text{NaHCO}_3$  (насыщенный водный раствор, 10 мл) с последующим добавлением HCl (1 М водный раствор) до значения pH 4. Органический слой отделяли, а водный слой экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5×10 мл). Объединенные органические экстракты сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали до оранжевого масла. Очистка хроматографией на силикагеле  $\text{C}_{18}$  (20-90 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  в воде) давала 1,665 г (62 %) соединения 10 в виде воскообразного твердого вещества розового цвета.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,76 (d,  $J = 7,4$  Гц, 2H), 7,70 – 7,47 (br m, 3H), 7,42 – 7,16 (br m, 6H), 7,12 – 7,05 (m, 1H), 6,37 (s, 0,6H), 6,05 (s, 0,4H), 4,75 – 4,30 (br m, 4H), 4,23 (m, 1H), 4,10 (br s, 1H), 3,55 (br d, 1H), 3,11 – 2,69 (m, 5H), 2,57 (br s, 2H), 2,09 (br s, 1H).

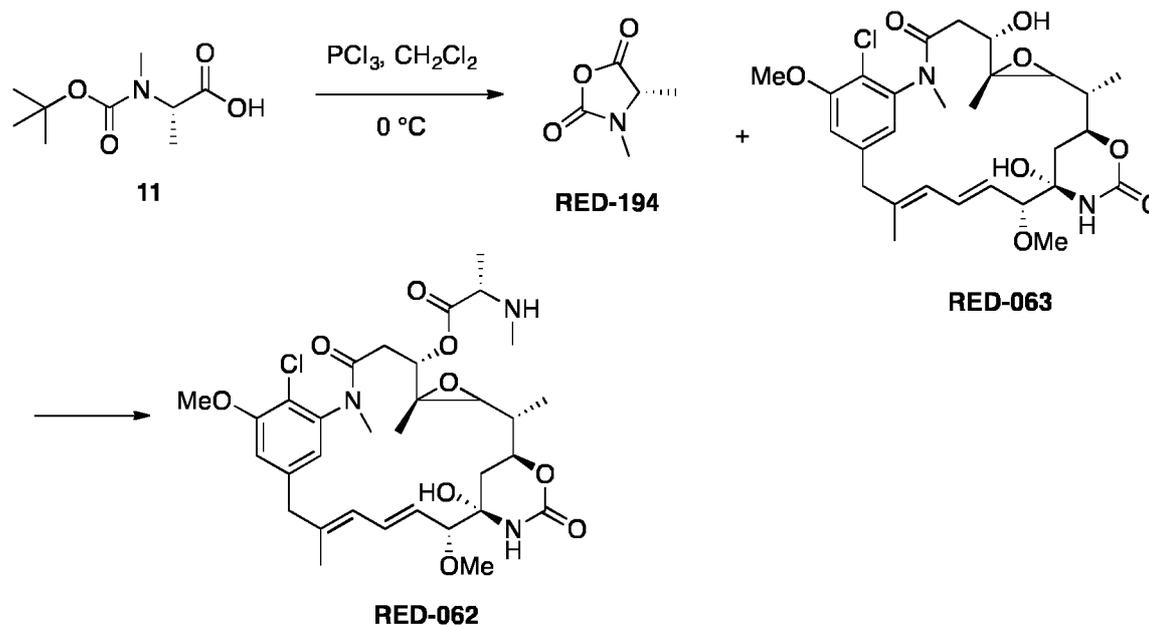
$^{13}\text{C}$  ЯМР (101 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174,90, 155,65, 143,81, 141,42, 136,98, 134,64, 127,75, 127,48, 127,12, 124,92, 122,00, 120,73, 120,01, 119,75, 109,19, 103,74, 67,33, 66,80, 51,39, 47,30, 39,58, 39,32, 35,23, 32,10.

HRMS (ESI) вычислено для  $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 484,2236, найдено: 484,2222.

(9H-флуорен-9-ил)метил 1,2-диметил-2-((1-(3-оксо-3-(перфторфенокси)пропил)-1H-индол-2-ил)метил)гидразин-1-карбоксилат (RED-004).

Соединение 10 (5,006 г, 10,4 ммоль) добавляли в высушенную двухгорлую круглодонную колбу объемом 100 мл, содержащую высушенную мешалку. С помощью шприца добавляли 40 мл безводного EtOAc, и раствор перемешивали при 20 °C в течение 5 минут с получением прозрачного бледного желто-зеленого раствора. Раствор охлаждали до 0 °C на ледяной бане и по каплям добавляли пентафторфенол (2098,8 мг, 11,4 ммоль) в 3 мл безводного EtOAc. Раствор перемешивали при 0 °C в течение 5 минут. С помощью шприца по каплям медленно добавляли DCC (2348,0 мг, 11,4 ммоль) в 7 мл безводного EtOAc. Раствор перемешивали при 0 °C в течение 5 мин, затем удаляли из бани и нагревали до 20 °C. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов, охлаждали до 0 °C и фильтровали, получая прозрачный бледный желто-зеленый раствор. Раствор разбавляли 50 мл EtOAc и промывали 2×25 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , 1 × 25 мл 5 М NaCl и сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Раствор фильтровали, упаривали и сушили в глубоком вакууме, получая 6552,5 мг (97 %) RED-004 в виде зеленовато-белого твердого вещества.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  780 (d,  $J = 7,2$  Гц, 2H), 7,58 (m, 3H), 7,45-7,22 (m, 6H), 7,14 (dd(appt, t),  $J = 7,4$  Гц, 1H), 6,42 & 6,10 (2 br s, 1H), 4,74 (dd(appt, t),  $J = 5,4$  Гц, 2H), 3,65-3,18 (br, 3H), 3,08 & 2,65 (2 br s, 3H), 2,88 (s, 3H).

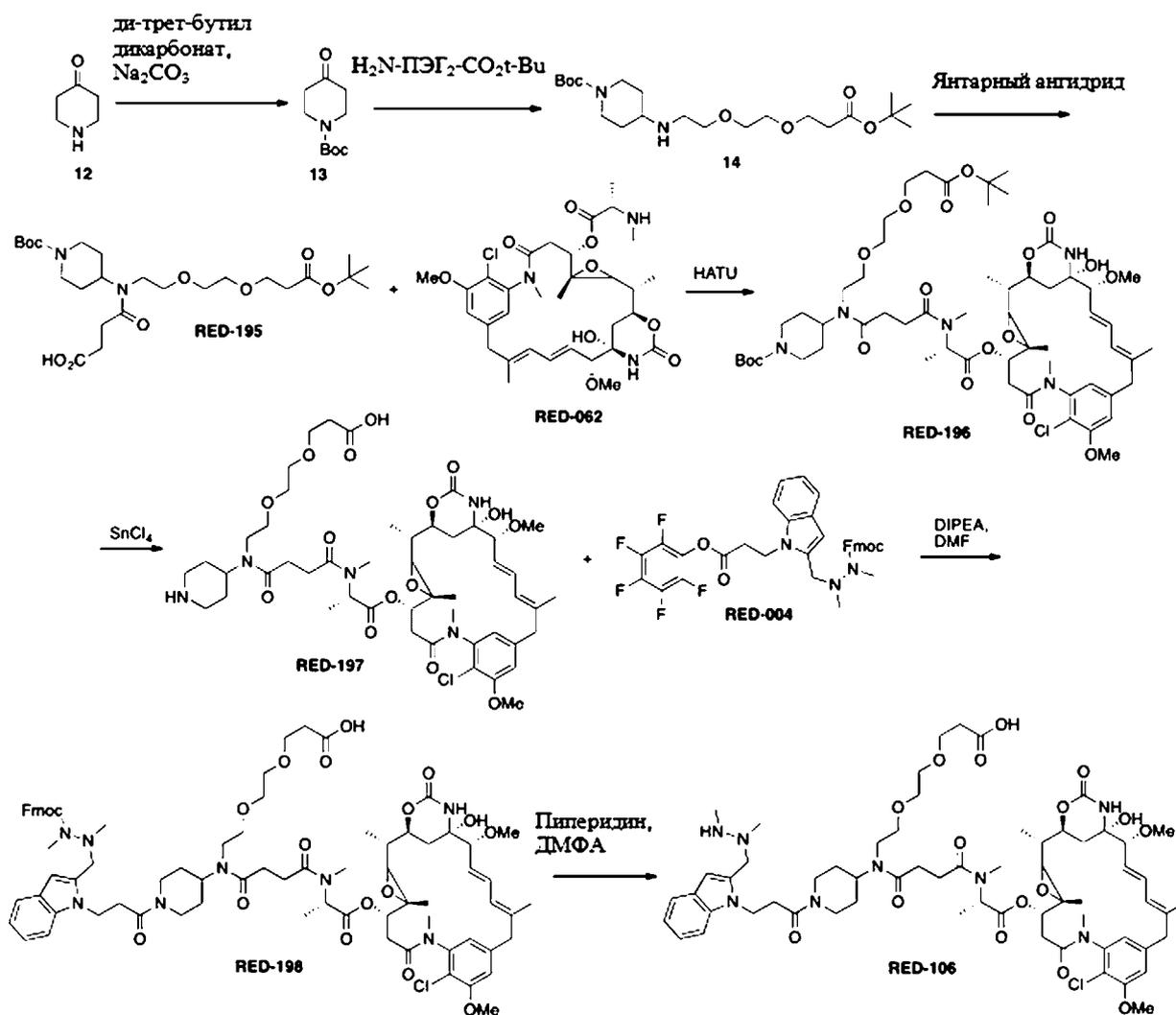


(S)-3,4-диметилксазолидин-2,5-дион (RED-194).

К раствору N-Вос-Ala-OH (11) (0,005 моль) в метиленхлориде (25 мл) при 0 °С добавляли в атмосфере азота 1,2 эквивалента трихлорида фосфора. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 0 °С, растворитель удаляли при пониженном давлении и остаток промывали четыреххлористым углеродом (3×20 мл) с получением RED-194.

(1<sup>4</sup>S,1<sup>6</sup>S,3<sup>2</sup>R,3<sup>3</sup>R,2R,4S,10E,12E,14R)-8<sup>6</sup>-хлор-1<sup>4</sup>-гидрокси-8<sup>5</sup>,14-диметокси-3<sup>3</sup>,2,7,10-тетраметил-1<sup>2</sup>,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинана-3(2,3)-оксирана-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил метил-L-аланинат (RED-062),

Майтансинол (RED-063) (4,53 г, 8 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (11 мл) с получением прозрачного бесцветного раствора, который переносили в высушенную двухгорлую круглодонную колбу в атмосфере азота. Добавляли безводный ТГФ (44 мл), а затем DIPEA (8,4 мл, 48 ммоль). Раствор RED-194 (5,4 г, 42 ммоль) добавляли для получения прозрачного бесцветного раствора. К перемешиваемому раствору добавляли высушенный тонкоизмельченный Zn(OTf)<sub>2</sub> (трифлат цинка) (8,7 г, 24 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при 20 °С в течение 2 дней. Реакцию гасили добавлением к раствору 70 мл 1,2 М NaHCO<sub>3</sub> и 70 мл EtOAc. При перемешивании полученная смесь давала белый осадок, который удаляли фильтрацией. Фильтрат экстрагировали EtOAc (5×70 мл), сушили (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) и концентрировали, получая красновато-оранжевое масло. Масло растворяли в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 мл) и очищали с применением системы Biotage (адсорбировано на пробах 2x Biotage Ultra 10 г, очистка на картриджах 2x Biotage Ultra 100 г с градиентом 0-20% MeOH в CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) с получением 4,38 г RED-062 в виде твердого вещества светло-персикового цвета (95 % де, 93,7 % желаемый диастереомер).



Трет-бутил 4-оксопиперидин-1-карбоксилат (13).

В круглодонную колбу объемом 100 мл, содержащую магнитную мешалку, добавляли моногидрат гидрохлорида пиперидин-4-она (12) (1,53 г, 10 ммоль), ди-трет-бутилдикарбонат (2,39 г, 11 ммоль), карбонат натрия (1,22 г, 11,5 ммоль), диоксан (10 мл) и воду (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Смесь разбавляли водой (100 мл) и экстрагировали EtOAc (3×100 мл). Объединенные органические слои промывали солевым раствором, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный материал сушили в вакууме, получая 1,74 г (87 %) соединения 13 в виде белого твердого вещества.

<sup>1</sup>H ЯМР (CDCl<sub>3</sub>) δ 3,73 (t, 4H, J = 6,0), 2,46 (t, 4H, J = 6,0), 1,51 (s, 9H).

МС (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> Вычислено для C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>3</sub> 200,3, Найдено 200,2.

Трет-бутил 4-(((2-(2-(3-(трет-бутоксипропокси)этокси)этил)амино)пиперидин-1-карбоксилат (14).

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнитную мешалку, добавляли соединение 13 (399 мг, 2 ммоль),  $\text{H}_2\text{N-ПЭГ}_2\text{-COOt-Bu}$  (550 мг, 2,4 ммоль), 4 Å молекулярный фильтр (активированный порошок, 200 мг) и 1,2-дихлорэтан (5 мл). Смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. К реакционной смеси добавляли триацетоксиборгидрид натрия (845 мг, 4 ммоль). Смесь перемешивали в течение 3 дней при комнатной температуре. Полученную смесь распределяли частями между EtOAc и насыщенным водным  $\text{NaHCO}_3$ . Органический слой промывали солевым раствором, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, получая 850 мг соединения 14 в виде вязкого масла.

МС (ESI) m/z:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  Вычислено для  $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_6$  417,3, Найдено 417,2.

13-(1-(трет-бутоксикарбонил)пиперидин-4-ил)-2,2-диметил-4,14-диоксо-3,7,10-триокса-13-азагептадекан-17-овая кислота (RED-195),

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнитную мешалку, добавляли соединение 14 (220 мг, 0,5 ммоль), янтарный ангидрид (55 мг, 0,55 ммоль), 4-(диметиламино)пиридин (5 мг, 0,04 ммоль) и дихлорметан (3 мл). Смесь перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь частично очищали флэш-хроматографией (элюирование 50-100 % EtOAc/гексаны) с получением 117 мг соединения RED-195 в виде прозрачного масла, которое применяли без дополнительной характеристики.

МС (ESI) m/z:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  Вычислено для  $\text{C}_{25}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_9$  517,6, Найдено 517,5.

17-(трет-бутил) 1-(( $1^4\text{S}, 1^6\text{S}, 3^3\text{S}, 2\text{R}, 4\text{S}, 10\text{E}, 12\text{E}, 14\text{R}$ )- $8^6$ -хлор- $1^4$ -гидрокси- $8^5, 14$ -диметокси- $3^3, 2, 7, 10$ -тетраметил- $1^2, 6$ -диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинана-3(2,3)-оксирана-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил) (2S)-8-(1-(трет-бутоксикарбонил)пиперидин-4-ил)-2,3-диметил-4,7-диоксо-11,14-диокса-3,8-диазагептадекандиоат (RED-196).

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнитную мешалку, добавляли RED-195 (445 мг, 0,86 ммоль), NATU (320 мг, 0,84 ммоль), DIPEA (311 мг, 2,42 ммоль) и дихлорметан (6 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 минут. Полученный раствор добавляли к RED-062 (516 мг, 0,79 ммоль) и реакционную смесь дополнительно перемешивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Реакционную смесь непосредственно очищали флэш-хроматографией (элюирование 3-10 % MeOH/DCM), получая 820 мг (90 %) RED-196 в виде светлого желтовато-коричневого твердого вещества.

МС (ESI) m/z:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  Вычислено для  $\text{C}_{57}\text{H}_{87}\text{ClN}_5\text{O}_{17}$  1148,6, Найдено 1148,8.

(2S)-1-(((1<sup>4</sup>S,1<sup>6</sup>S,3<sup>3</sup>S,2R,4S,10E,12E,14R)-8<sup>6</sup>-хлор-1<sup>4</sup>-гидрокси-8<sup>5</sup>,14-диметокси-3<sup>3</sup>,2,7,10-тетраметил-1<sup>2</sup>,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинана-3(2,3)-оксирана-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)окси)-2,3-диметил-1,4,7-триоксо-8-(пиперидин-4-ил)-11,14-диокса-3,8-диазагептадекан-17-овая кислота (RED-197).

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнитную мешалку, добавляли RED-196 (31 мг, 0,027 ммоль) и дихлорметан (1 мл). Раствор охлаждали до 0 °С и добавляли тетрагидрохлорид олова (IV) (1,0 М раствор в дихлорметане, 0,3 мл, 0,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при 0 °С. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии на C18 (элюирование 5-100 % MeCN/вода) с получением 16 мг (60 %) RED-197 в виде белого твердого вещества (16 мг, выход 60 %).

МС (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> Вычислено для C<sub>48</sub>H<sub>71</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>15</sub> 992,5, Найдено 992,6.

(2S)-8-(1-(3-(2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-1,2-диметилгидразинил)метил)-1H-индол-1-ил)пропаноил)пиперидин-4-ил)-1-(((1<sup>4</sup>S,1<sup>6</sup>S,3<sup>3</sup>S,2R,4S,10E,12E,14R)-8<sup>6</sup>-хлор-1<sup>4</sup>-гидрокси-8<sup>5</sup>,14-диметокси-3<sup>3</sup>,2,7,10-тетраметил-1<sup>2</sup>,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинана-3(2,3)-оксирана-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)окси)-2,3-диметил-1,4,7-триоксо-11,14-диокса-3,8-диазагептадекан-17-овая кислота (RED-198).

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнитную мешалку, добавляли RED-197 (16 мг, 0,016 ммоль), (9H-флуорен-9-ил)метил 1,2-диметил-2-(((1-(3-оксо-3-(перфторфенокси)пропил)-1H-индол-2-ил)метил)гидразин-1-карбоксилат (12) (13 мг, 0,02 ммоль), DIPEA (8 мкл, 0,05 ммоль) и ДМФА (1 мл). Раствор перемешивали в течение 18 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии на C18 (элюирование 5-100 % MeCN/вода) с получением 18 мг (77 %) RED-198 в виде белого твердого вещества.

МС (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> Вычислено для C<sub>77</sub>H<sub>98</sub>ClN<sub>8</sub>O<sub>18</sub> 1457,7, Найдено 1457,9.

(2S)-1-(((1<sup>4</sup>S,1<sup>6</sup>S,3<sup>3</sup>S,2R,4S,10E,12E,14R)-8<sup>6</sup>-хлор-1<sup>4</sup>-гидрокси-8<sup>5</sup>,14-диметокси-3<sup>3</sup>,2,7,10-тетраметил-1<sup>2</sup>,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинана-3(2,3)-оксирана-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)окси)-8-(1-(3-(2-(((1,2-диметилгидразинил)метил)-1H-индол-1-ил)пропаноил)пиперидин-4-ил)-2,3-диметил-1,4,7-триоксо-11,14-диокса-3,8-диазагептадекан-17-овая кислота (RED-106).

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнитную мешалку, добавляли RED-197 (18 мг, 0,012 ммоль), пиперидин (20 мкл, 0,02 ммоль) и ДМФА (1 мл). Раствор перемешивали в течение 20 минут при комнатной температуре. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии на C18 (элюирование

1-60% MeCN/вода) с получением 15 мг (98%) соединения RED-106 в виде белого твердого вещества.

МС (ESI)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  Вычислено для  $C_{62}H_{88}ClN_8O_{16}$  1235,6, Найдено 1236,0.

Результаты и обсуждение

Получение и первоначальная характеристика ADC против CD22

Применяемой антитело против CD22 (CAT-02) представляло собой гуманизированный вариант антитела RFB4. Меченное на С-конце антитело против CD22 получали с применением клональной клеточной линии GPEx® с титрами биореактора 1,6 г/л и конверсией цистеина в формилглицин на 97 %. Нагрузку линкер HIPS-4АП-майтансин получали (описано выше) и конъюгировали с альдегид-меченным антителом. Полученный ADC был охарактеризован (фиг. 11) с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру для оценки процентного содержания мономера (99,2 %) и с помощью гидрофобного взаимодействия (HIC) и обращенно-фазовой хроматографии (PLRP) для оценки отношения лекарственного средства к антителу (DAR), составляющего 1,8. ADC сравнивали с антителом против CD22 дикого типа (без меток) с точки зрения аффинности к белку CD22 человека и интернализации на CD22+ клетках, применяя способ на основе ИФА (фиг. 12) и способ на основе проточной цитометрии (фиг. 13) соответственно. По данным обоих функциональных показателей, ADC работал так же хорошо, как антитело дикого типа, что указывает на то, что конъюгация не влияла на эти параметры.

ADC против CD22 не является субстратом для MDR1 и не индуцирует нецелевой или неспецифический цитолиз

Эффективность ADC против CD22 тестировали *in vitro* в отношении линий опухолевых клеток НХЛ Ramos и WSU-DLCL2. Активность сравнивали с активностью свободного мйтансина и связанного с ним ADC, полученного с антителом против CD22 CAT-02, конъюгированным с мйтансином через расщепляемый валин-цитруллин-дипептидный линкер. Оба ADC показали субнанолярную активность в отношении клеток дикого типа Ramos и WSU-DLCL2 (фиг. 14, панель А и панель С). В вариантах этих клеток, сконструированных для экспрессии ксенобиотического эффлюксного насоса, MDR1, только ADC против CD22 по настоящему изобретению сохранял свою первоначальную активность (фиг. 14, панель В и панель D). Напротив, свободный мйтансин был в примерно 10 раз менее эффективен, а ADC, несущий расщепляемый мйтансин, был по существу лишен активности. В контрольном эксперименте совместная обработка клеток WSU-DLCL2 циклоспорином и ингибитором MDR1, не оказала влияния на клетки дикого типа, но восстановила первоначальную активность свободного

майтансина и расщепляемого ADC в клетках MDR1+ (фиг. 14, панель E и панель F). Вместе эти результаты показали, что активный метаболит ADC против CD22 по настоящему изобретению не являлся субстратом для эффлюкса MDR1. В связанных исследованиях цитотоксичности *in vitro*, ADC против CD22 по настоящему изобретению не оказывал влияния на антиген-негативную клеточную линию NCI-N87 (фиг. 15), что указывает на то, что он не обладал нецелевой активностью в течение 5 дневного периода в клеточной культуре. Кроме того, ADC против HER2, конъюгированный с нагрузкой линкер HIPS-4АП-майтансин, не опосредует неспецифический цитолиз антиген-негативных клеток при совместном культивировании с антиген-позитивными клетками (фиг. 16), подразумевая, что активный метаболит ADC против CD22 по настоящему изобретению, который будет таким же, как и у конъюгата ADC против HER2, также не будет опосредовать неспецифический цитолиз.

ADC против CD22 эффективен в отношении моделей ксенотрансплантата НХЛ

*In vivo* эффективность ADC против CD22 оценивали в отношении моделей ксенотрансплантата WSU-DLCL2 и Ramos (фиг. 17), которые экспрессировали относительно более высокие и более низкие количества CD22 соответственно (фиг. 18). В исследовании с однократной дозой мышам с опухолями WSU-DLCL2 давали 10 мг/кг ADC против CD22 или контрольного носителя. Дозирование начинали, когда опухоли составляли в среднем 118 мм<sup>3</sup>. Из животных, которые получали ADC, 25 % (2 из 8) имели частичный ответ, с опухолями, которые регрессировали до 4 мм<sup>3</sup> на 31 день. Группа, обработанная ADC против CD22 и контрольная группа, обработанная носителем, имели средний объем опухолей 415 и 1783 мм<sup>3</sup>, соответственно, к 31 дню. Затем в исследовании многократных доз, мышам, несущих ксенотрансплантаты WSU-DLCL2 обрабатывали 10 мг/кг ADC против CD22 или контрольного носителя каждые четыре дня, в общем количестве четыре дозы. Дозирование начинали, когда опухоли составляли в среднем 262 мм<sup>3</sup>. Из животных, которые получили ADC, 75 % (6 из 8) показали полный ответ, причем 38 % из них (3 из 8) были устойчивы к концу исследования (день 59), 43 дня после последней дозы. Напротив, в контрольной группе, обработанной только носителем средний объем опухоли достиг 2191 мм<sup>3</sup> к 17 дню. Наконец, в исследовании многократных доз, мышам, несущих ксенотрансплантаты Ramos обрабатывали либо 5, либо 10 мг/кг ADC против CD22 или контрольного носителя каждые четыре дня в общей сложности четыре дозы. Дозирование начинали, когда опухоли составляли в среднем 246 мм<sup>3</sup>. Как и ожидалось, эффект дозы наблюдали в группах, получавших дозу 5 или 10 мг/кг, демонстрируя задержку роста опухоли 63% или 87% соответственно. В частности, среднее время до конечной точки составило 12, 19 и 22 дня для контрольной группы,

получавшей 5 и 10 мг/кг, соответственно. Во всех трех исследованиях не наблюдалось влияния на массу тела мыши в группах, получавших ADC против CD22 (фигура 19).

ADC против CD22 хорошо переносился в дозе до 60 мг/кг у крыс и макак-крабоедов

ADC против CD22 не связывался с CD22 грызунов, однако введение дозы ADC у этих животных обеспечивало информацию относительно нецелевой токсичности и безопасностью нагрузки линкером. Как упомянуто выше, в исследованиях на ксенотрансплантатах мышей не наблюдалось влияния дозирования на массу тела или клинические наблюдения. В предварительном исследовании токсичности на крысах (фигура 20) животным (по 5 на группу) вводили однократную внутривенную дозу ADC против CD22 в количестве 6, 20, 40 или 60 мг/кг и наблюдали в течение 12 дней после введения дозы. Все животные выжили до конца исследования. Животные, получавшие дозу 60 мг/кг, испытывали снижение массы тела на 10 % по сравнению с контрольной группой носителя. Клинические химические изменения, совместимые с минимальным или легким гепатобилиарным повреждением, произошли на 5-й день у животных, получавших дозу 40 мг/кг или более, и включали увеличение активности аланинаминотрансферазы (ALT), аспартаттрансаминазы (AST) и щелочной фосфатазы (ALP). Большинство изменений устранялись к 12 дню. Что касается гематологии, умеренно или заметно уменьшилось количество тромбоцитов у животных, получавших дозу 40 мг/кг или более, и полностью восстановилось к 12 дню. Изменения, соответствующие воспалению, произошли на 5 и 12 дни у животных, получавших дозу 40 мг/кг или более и включали незначительно или умеренно повышенное количество нейтрофилов и моноцитов, слегка повышенные концентрации глобулина и пониженное соотношение альбумин:глобулин.

ADC против CD22 связывался с CD22 макак-крабоедов (фиг. 21) и имел сходный профиль перекрестной реактивности тканей у макак по сравнению с человеком (фиг. 22). Таким образом, макаки-крабоеды представляют собой подходящую модель для тестирования как целевой, так и нецелевой токсичности ADC. В экспериментальном исследовании повторного введения дозы, обезьянам (2/пол/группа) вводили 10, 30 или 60 мг/кг ADC против CD22 один раз в три недели, в общем количестве две дозы с последующим 21-дневным периодом наблюдения. Все животные выжили до окончания исследования. Не наблюдалось связанных с против CD22 ADC изменений в клинических наблюдениях, массе тела или потреблении пищи. Изменения клинической патологии происходили в основном у животных, которым давали дозу 30 мг/кг или более, и соответствовали минимальным повреждением печени, повышенным истощением и/или секвестрацией тромбоцитов и воспалением (фиг. 23). Эти изменения были одинаковыми

при дозах 30 и 60 мг/кг и после первой и второй дозы и имели величину, которая, как ожидается, не будет связана с микроскопическими изменениями или клиническими эффектами. Изменения, соответствующие минимальным повреждением печени у животных, получавших дозу 30 мг/кг или более, заключались в повышении активности ALT, AST и ALP, которая частично устранилась к 21 и 42 дню. Снижение количества тромбоцитов, которое наблюдалось в течение недели после введения дозы, было незначительным или умеренным, и в основном устранялось к 21 и 42 дню. Изменения, соответствующие воспалению, состояли из увеличения количества нейтрофилов и моноцитов от минимального до умеренного, увеличения концентрации глобулина от легкого до умеренного и минимально пониженной концентрации альбумина.

Введение ADC против CD22 приводило к истощению популяции В-клеток у макак-крабоедов

Для оценки фармакодинамических эффектов ADC против CD22 у перекрестно-реактивных видов, контролировали популяции мононуклеарных клеток периферической крови в образцах, взятых у макак-крабоедов, включенных в исследование токсичности при повторном введении. В частности, применяли проточную цитометрию для определения соотношения В-клеток (CD20<sup>+</sup>), Т-клеток (CD3<sup>+</sup>) и NK-клеток (CD20<sup>-</sup>/CD3<sup>-</sup>), наблюдаемых у животных до введения дозы и на 7, 14, 28 и 35 день (фиг. 5). У животных до введения дозы ADC против CD22, В-клетки включали в среднем 11,6 % от общего количества лимфоцитов, это значение упало в среднем до 3,8 % к 35 дню, что представляет собой среднее снижение на 68 % в измеренных популяциях В-клеток относительно исходных уровней (фиг. 24). Истощение популяции В-клеток было одинаковым во всех группах дозирования, от 10 до 60 мг/кг, что указывает на то, что самой низкой дозы было достаточно для получения эффекта. Между тем, показатели по В-клеткам в контрольной группе, получавшей носитель, Т-клеткам и NK-клеткам (не показаны) во всех группах в основном не изменялись в течение курса лечения. Результаты показали, что ADC против CD22 был способен избирательно опосредовать истощение популяции клеток CD22<sup>+</sup> макак-крабоедов *in vivo*, не приводя к неблагоприятным побочным эффектам.

Фармако- и токсикокинетика ADC против CD22 у мышей, крыс и макак-крабоедов

Чтобы оценить *in vivo* стабильность ADC против CD22, выполнили фармакокинетическое (ФК) исследование на крысах. Концентрации суммарных антител, суммарных ADC и суммарных конъюгатов контролировали в периферической крови животных (3 на группу) в течение 21 дня после получения однократной дозы 3 мг/кг ADC против CD22 (таблица 2 и фиг. 25). Как показано на фиг. 10, в анализах суммарных ADC и

суммарных конъюгатов применяли DAR-чувствительные DAR-нечувствительные измерения, соответственно. Параметры ФК, полученные для всех трех анализов, были сходными, что указывает на то, что конъюгат был в значительной степени стабильным в циркуляции. Например, периоды полураспада суммарных антител, суммарных ADC и суммарных конъюгатов составляли 9,48, 6,13 и 7,22 дня соответственно.

Затем концентрации аналита ADC против CD22 измеряли в динамике в периферической крови мышей Ramos из группы исследования эффективности многократной дозы, описанного выше. Цель этого анализа состояла в том, чтобы определить суммарный уровень воздействия ADC, достигнутый при эффективной дозе в исследованиях ксенотрансплантата (фиг. 26). Для этого теста напомним, что дозы 10 мг/кг×4 в течение 22 дней привели к 87 % задержке роста опухоли в модели Ramos, и что дозы 10 мг/кг×4 в течение 28 дней привели к тому, что у 75 % животных наблюдали полный ответ (не остается пальпируемой опухоли) в модели WSU-DLCL2. Средняя площадь под кривой зависимости концентрации от времени от 0 до бесконечности ( $AUC_{0-\infty}$ ) для дозы 10 мг/кг×4 для мыши составляла  $2530 \pm 131$  (стандартное отклонение) в день • мкг/мл.

Наконец, оценивали концентрации аналита ADC против CD22 в токсикокинетическом исследовании образцов плазмы от животных, получавших дозы, как определено ранее для исследований токсичности на крысах и макаках-крабоедах (фиг. 26). Цель этих анализов состояла в том, чтобы определить суммарные уровни воздействия ADC, достигнутые при дозах, коррелирующих с наличием или отсутствием наблюдаемой токсичности. Что касается исследования на крысах, значения  $C_{max}$  и  $AUC_{0-\infty}$  обычно были пропорциональны дозе. Среднее значение  $AUC_{0-\infty}$  для дозы 60 мг/кг составляло  $5201 \pm 273$  дня • мкг/мл. Что касается исследования на макаках-крабоедах, значения  $C_{max}$  и  $AUC_{0-\infty}$  обычно были пропорциональны дозе. Среднее значение  $AUC_{0-\infty}$  для первой дозы 60 мг/кг составляло  $6140 \pm 667$  дней • мкг/мл. Антитело, связывалось с антигеном в модели макак-крабоедов, однако клиренс (не показан) был одинаковым среди всех групп дозирования. Это указывало на то, что низкая (10 мг/кг) доза была достаточной для насыщения механизмов мишень-опосредованного клиренса и, следовательно, что антиген-опосредованный клиренс не оказывал значительного влияния на результаты настоящего исследования. Это наблюдение соответствовало фармакодинамическому эффекту лечения ADC против CD22 на истощение популяции В-клеток, степень которого была одинаковой во всех группах дозирования.

Пример 6

Майтйноклеточная лимфома: регрессия опухоли после обработки R-CHOP в модели ксенотрансплантата Granta-519

Клетки Granta-519 ( $0,5 \times 10^7$ ) имплантировали в правый бок мышей CB17-SCID. Средний объем опухоли составил  $180 \text{ мм}^3$  через одиннадцать дней после имплантации. Мыши разделяли путем рандомизации на 8 групп по 8 мышей на группу. ADC, ритуксимаб и R-CHOP тестировали на ингибирование роста опухоли в сравнении с контрольным носителем. Всем мышам внутривенно (в/в) вводили ADC либо раз в неделю, либо раз в три недели в течение 6 недель, как показано в таблице 4 ниже. R-CHOP вводили внутривенно в однократной дозе: ритуксимаб 30 мг/кг, циклофосфамид 30 мг/кг, доксорубин 2,475 мг/кг, и винкристин 0,365 мг/кг. Преднизон (0,15 мг/кг) вводили перорально один раз в день.

Таблица 4

Группа	n	Лечение	Дозировка (мг/кг)	Путь	Схема введения
1	8	Носитель	-	в.в.	QW×3
2	8	Ритуксимаб	30мг/кг	в.в.	QW×4
3	8	ADC	1мг/кг	в.в.	QW×4
4	8	ADC	3мг/кг	в.в.	QW×6
5	8	ADC	10мг/кг	в.в.	QW×6
6	8	ADC	10мг/кг	в.в.	Q3W×2
7	8	R-CHOP (день 0 введения дозы)	Ритуксимаб: 30мг/кг	в.в.	Однократная доза
			Циклофосфамид: 30мг/кг	в.в.	Однократная доза
			Доксорубин: 2.475мг/кг	в.в.	Однократная доза
			Винкристин: 0.365мг/кг	в.в.	Однократная доза
			Преднизон: 0.15мг/кг	п.о	QD×5
8	8	R-CHOP (0 день) + ADC (14 день)	Ритуксимаб: 30мг/кг	в.в.	Однократная доза
			Циклофосфамид: 30мг/кг	в.в.	Однократная доза
			Доксорубин: 2.475мг/кг	в.в.	Однократная доза
			Винкристин: 0.365мг/кг	в.в.	Однократная доза
			Преднизон: 0.15мг/кг	п.о.	QD×5
		ADC, 10мг/кг	в.в.	QW с 14 дня	

Введение ADC в дозе 1 мг/кг, 3 мг/кг и 10 мг/кг один раз в неделю, приводило к 19 %, 59,7 % и 87,3 % ингибирования роста опухоли (TGI) соответственно, что без

привлечения теории, предполагает дозозависимую противоопухолевую активность. См. фиг. 27. Стоит также отметить, что противоопухолевая активность была существенно выше при схеме введения один раз в неделю (87,3 % TGI) по сравнению с схемой введения один раз в три недели (70,5 % TGI). Лечение R-CHOP (дни 0-5) приводило к временному ингибированию роста опухоли. Опухоли восстановились, и к 14 дню объемы опухолей были равны объему опухоли, зарегистрированному до лечения. На 14 день восстановленные опухоли обрабатывали ADC (10 мг/кг) один раз в неделю. Показано значительное ингибирование роста опухоли к 38 дню ( $p$  менее 0,001). См. фиг. 28.

ADC ингибировал рост опухоли Granta-519 у мышей дозозависимым и в зависимости от частоты введения, не влияя на массу тела. Кроме того, ADC возобновил ингибирование роста опухоли после окончания действия R-CHOP.

#### Выводы

Получен ADC, нацеленный на CD22, сайт-специфически конъюгированный с нагрузкой майтансином, который устойчив к эффлюксу MDR1-экспрессирующими клетками. ADC имел значение DAR 1,8, показал хорошие биофизические характеристики и опосредованную эффективность в диапазоне от значительной (87 %) задержки роста опухоли до полного ответа *in vivo* в отношении двух моделей ксенотрансплантата НХЛ. Эта эффективность была достигнута при уровнях воздействия значительно ниже тех, которые связаны с токсичностью, более того, в исследовании токсичности при повторном введении доз макакам-крабоедам не было отмечено никаких побочных эффектов даже при самой высокой дозе 60 мг/кг, что указывает на возможность применения более высоких доз. ADC против CD22 обладает сочетанием эффективности и безопасности. В качестве дополнительного преимущества, ряд исходных компонентов, включая целевой антиген, исходное антитело и цитотоксическую нагрузку на основе майтансина, уже прошли применение у людей и были хорошо изучены в отношении безопасности и токсичности. На основании данных о макаках-крабоедах, которые являются разумной моделью для прогнозирования профилей фармакокинетики и токсичности для человека, результаты настоящих исследований показали, что ADC против CD22 имеет терапевтическое применение для пациентов с НХЛ, таких как те, у которых развилось трудно поддающееся лечению заболевание вследствие активации MDR1.

Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на конкретные варианты осуществления, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что могут быть сделаны различные изменения и могут быть заменены эквиваленты без отклонения от истинной сущности и объема изобретения. Кроме того, может быть сделано много модификаций для адаптации конкретной ситуации, материала, состава вещества, способа,

стадии или стадий способа, объекта, сущности и объема настоящего изобретения. Предполагается, что все такие модификации находятся в пределах объема прилагаемой формулы настоящего изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

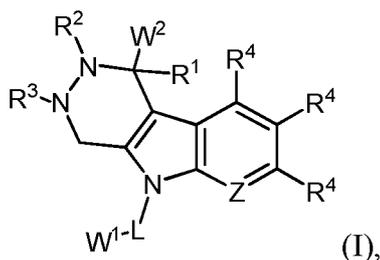
1. Способ лечения рака у субъекта, включающий:

введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества:

одного или более противораковых агентов и

конъюгата, содержащего:

по меньшей мере один модифицированный аминокислотный остаток с боковой цепью формулы (I):



где:

Z представляет собой CR<sup>4</sup> или N,

R<sup>1</sup> выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> каждый независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, amino, замещенного amino, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила, или R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> необязательно циклически связаны с образованием 5- или 6-членного гетероциклила,

каждый R<sup>4</sup> независимо выбран из водорода, галогена, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, amino, замещенного amino, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

L представляет собой линкер, содержащий  $-(T^1-V^1)_a-(T^2-V^2)_b-(T^3-V^3)_c-(T^4-V^4)_d$ , где a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d составляет от 1 до 4,

$T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  каждый независимо выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила, (ЭДА)<sub>w</sub>, (ПЭГ)<sub>b</sub>, (АК)<sub>p</sub>,  $-(CR^{13}OH)_h$ -, пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, гидразина, дисульфида и сложного эфира, где ЭДА представляет собой этилендиаминовый фрагмент, ПЭГ представляет собой полиэтиленгликоль или модифицированный полиэтиленгликоль и АК представляет собой аминокислотный остаток, где w представляет собой целое число от 1 до 20, p представляет собой целое число от 1 до 30, h представляет собой целое число от 1 до 20 и b представляет собой целое число от 1 до 12,

$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  каждый независимо выбран из группы, состоящей из ковалентной связи,  $-CO-$ ,  $-NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}(CH_2)_q-$ ,  $-NR^{15}(C_6H_4)-$ ,  $-CONR^{15}-$ ,  $-NR^{15}CO-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO_2NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}SO_2-$  и  $-P(O)OH-$ , где q представляет собой целое число от 1 до 6,

каждый  $R^{13}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила,

каждый  $R^{15}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

$W^1$  представляет собой майтансиноид и

$W^2$  представляет собой антитело против CD22,

где введение эффективно для лечения рака у субъекта.

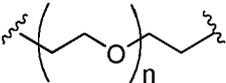
2. Способ по п. 1, где

$T^1$  выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила и замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила,

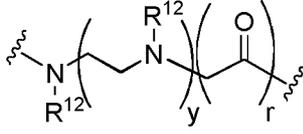
$T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  каждый независимо выбран из (ЭДА)<sub>w</sub>, (ПЭГ)<sub>b</sub>,  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила, (АК)<sub>p</sub>,  $-(CR^{13}OH)_h$ -, пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, гидразина и сложного эфира и

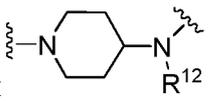
$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  каждый независимо выбран из группы, состоящей из ковалентной связи,  $-CO-$ ,  $-NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}(CH_2)_q-$ ,  $-NR^{15}(C_6H_4)-$ ,  $-CONR^{15}-$ ,  $-NR^{15}CO-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO_2NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}SO_2-$  и  $-P(O)OH-$ ,

где:

(ПЭГ)<sub>n</sub> представляет собой , где n представляет собой целое число от 1 до 30,

ЭДА представляет собой этилендиаминовый фрагмент, имеющий следующую

структуру: , где y представляет собой целое число от 1 до 6 и r равен 0 или 1,

4-аминопиперидин (4АП) представляет собой ,

каждый R<sup>12</sup> и R<sup>15</sup> независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, полиэтиленгликолевого фрагмента, арила и замещенного арила, где любые две соседние группы R<sup>12</sup> могут быть циклически связаны с образованием пиперазинильного кольца и R<sup>13</sup> выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила.

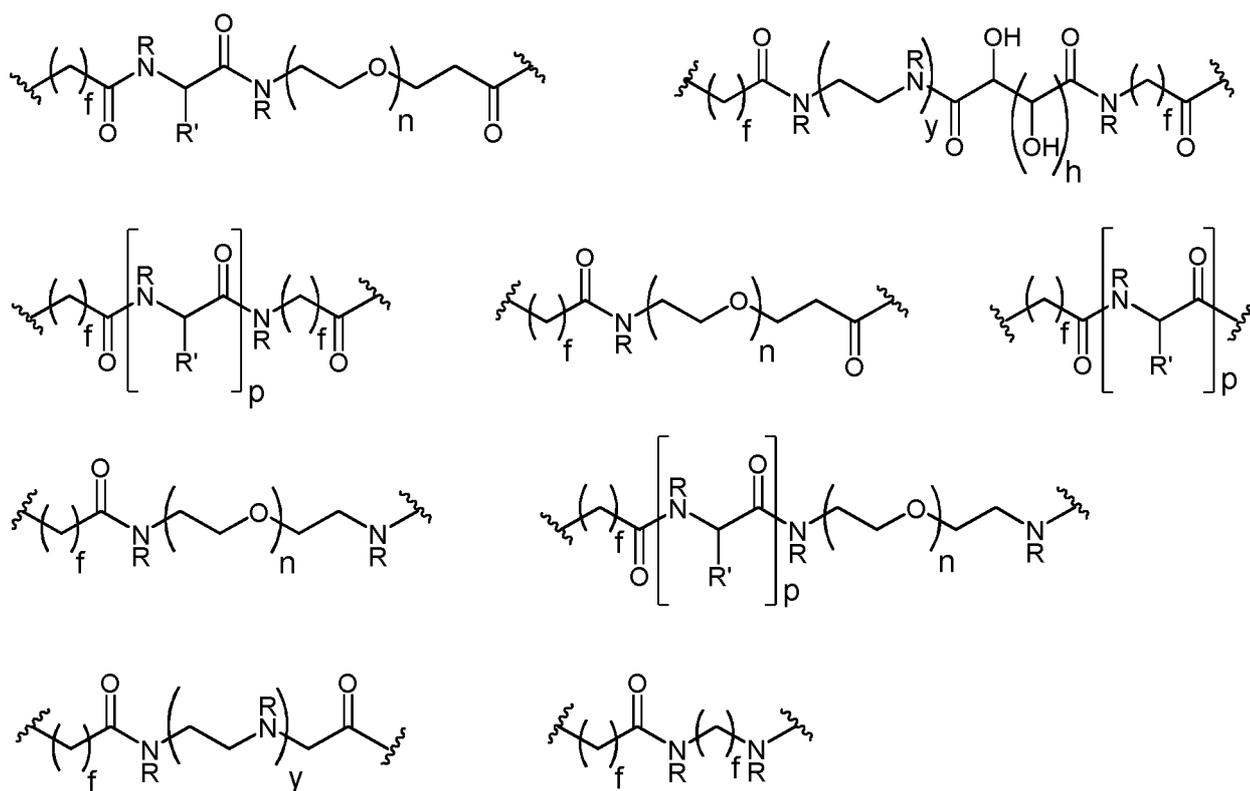
3. Способ по п. 1, где T<sup>1</sup>, T<sup>2</sup>, T<sup>3</sup> и T<sup>4</sup> и V<sup>1</sup>, V<sup>2</sup>, V<sup>3</sup> и V<sup>4</sup> выбраны из следующей таблицы:

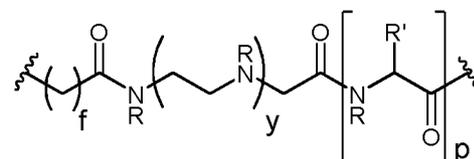
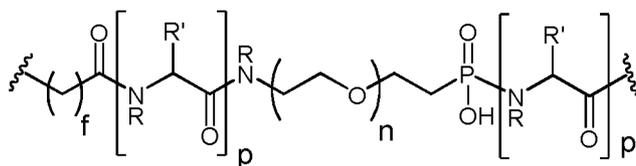
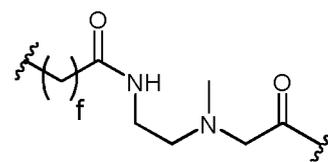
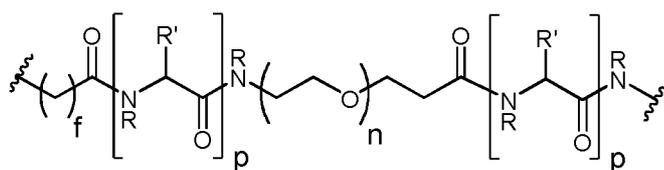
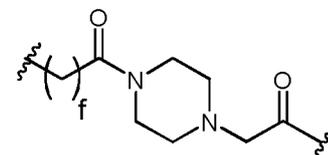
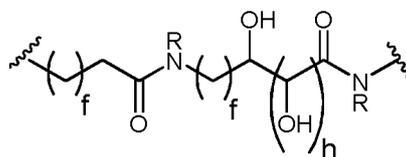
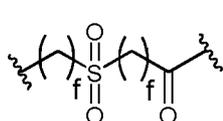
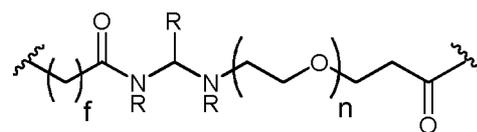
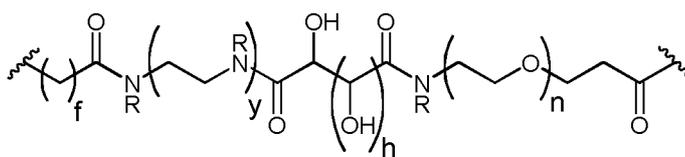
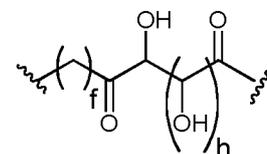
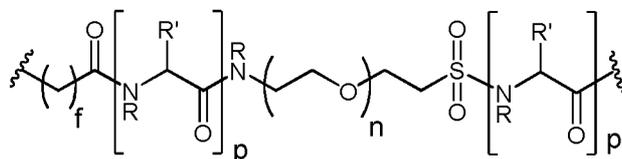
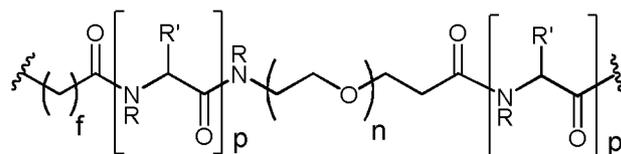
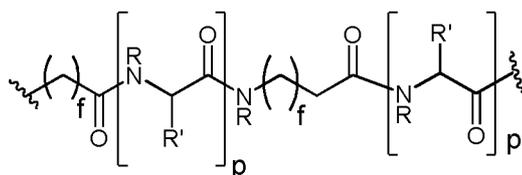
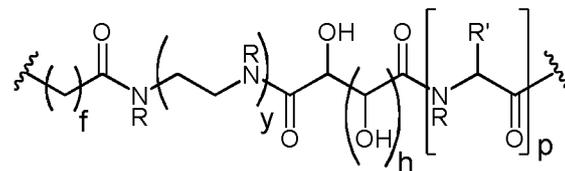
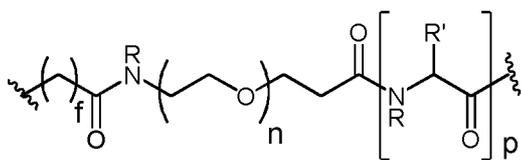
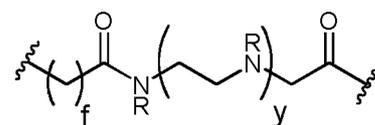
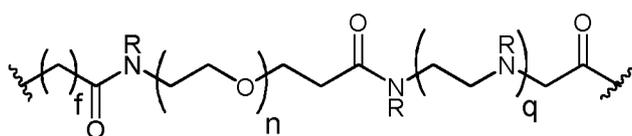
T <sup>1</sup>	V <sup>1</sup>	T <sup>2</sup>	V <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>	V <sup>4</sup>
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-NR <sup>15</sup> -	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-NR <sup>15</sup> -	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	-	-

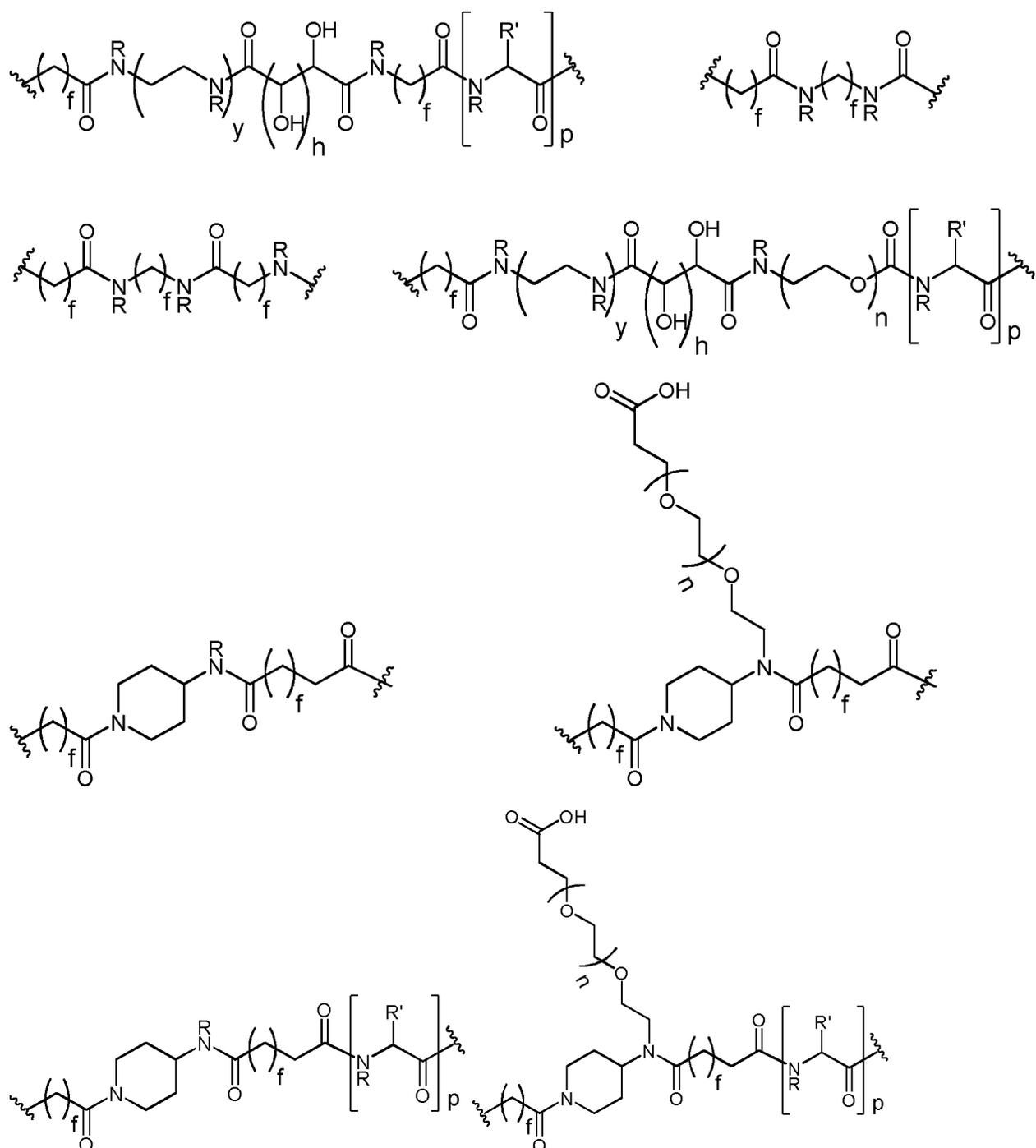
T <sup>1</sup>	V <sup>1</sup>	T <sup>2</sup>	V <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>	V <sup>4</sup>
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-SO <sub>2</sub> -	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	замещенн ый (C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-SO <sub>2</sub> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	- NR <sup>15</sup> -
(C <sub>1</sub> -	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-	(АК) <sub>p</sub>	-

T <sup>1</sup>	V <sup>1</sup>	T <sup>2</sup>	V <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>	V <sup>4</sup>
C <sub>12</sub> )алкил					P(O)OH -		
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	(AK) <sub>p</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- NR <sup>15</sup> -
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	4АП	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	4АП	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-

4. Способ по п. 1, где линкер L выбран из одной из следующих структур:







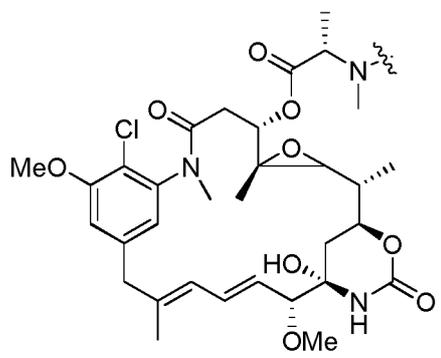
где

каждый  $f$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 12,  
 каждый  $y$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 20,  
 каждый  $p$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 30,  
 каждый  $h$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 12,  
 каждый  $R$  независимо представляет собой водород, алкил, замещенный алкил,  
 алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкокси, замещенный  
 алкокси, амино, замещенный амино, карбоксил, сложный эфир карбоновой кислоты, ацил,

ацилокси, ациламино, аминоксил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил, тиоалкокси, замещенный тиоалкокси, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл и замещенный гетероцикл и

каждый R<sup>1</sup> независимо представляет собой H, группу боковой цепи аминокислоты, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкокси, замещенный алкокси, амино, замещенный амино, карбоксил, сложный эфир карбоновой кислоты, ацил, ацилокси, ациламино, аминоксил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил, тиоалкокси, замещенный тиоалкокси, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл и замещенный гетероцикл.

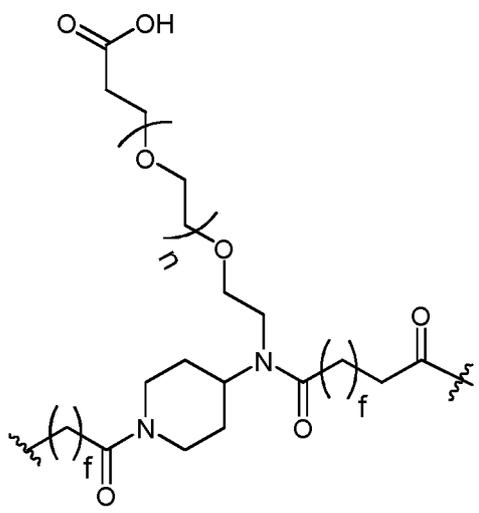
5. Способ по п. 1, где майтансиноид имеет формулу



где ~~~ обозначает точку присоединения между майтансиноидом и L.

6. Способ по п. 1, где T<sup>1</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>1</sup> представляет собой -CO-, T<sup>2</sup> представляет собой 4АП, V<sup>2</sup> представляет собой -CO-, T<sup>3</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>3</sup> представляет собой -CO-, T<sup>4</sup> отсутствует и V<sup>4</sup> отсутствует.

7. Способ по п. 1, где линкер L содержит следующую структуру:



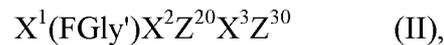
где

каждый f независимо представляет собой целое число от 1 до 12 и

n представляет собой целое число от 1 до 30.

8. Способ по п. 1, где антитело против CD22 связывает эпитоп в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670 аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C.

9. Способ по п. 1, где антитело против CD22 содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

$X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата,  $X^1$  присутствует, и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо представляет собой любую аминокислоту.

10. Способ по п. 9, где последовательность представляет собой L(FGly')TPSR (SEQ ID NO: 185).

11. Способ по п. 9, где

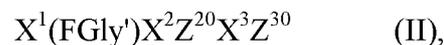
$Z^{30}$  выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

$X^1$  выбран из L, M, S и V и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

12. Способ по п. 1, где модифицированный аминокислотный остаток расположен на C-конце константной области тяжелой цепи антитела против CD22.

13. Способ по п. 12, где константная область тяжелой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

$X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата,  $X^1$  присутствует, и  $X^2$  и  $X^3$  каждый независимо представляет собой любую аминокислоту и где последовательность является С-концевой по отношению к аминокислотной последовательности SLSLSPG (SEQ ID NO: 186).

14. Способ по п. 13, где константная область тяжелой цепи содержит последовательность SPGSL(FGly')TPSRGS (SEQ ID NO: 184).

15. Способ по п. 13, где

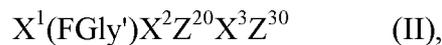
$Z^{30}$  выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

$X^1$  выбран из L, M, S и V и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

16. Способ по п. 1, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в константной области легкой цепи антитела против CD22.

17. Способ по п. 16, где константная область легкой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

$X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата,  $X^1$  присутствует, и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо представляет собой любую аминокислоту и

при этом последовательность является С-концевой по отношению к аминокислотной последовательности KVDNAL (SEQ ID NO: 58) и/или является N-концевой по отношению к аминокислотной последовательности QSGNSQ (SEQ ID NO: 59).

18. Способ по п. 17, где константная область легкой цепи содержит последовательность KVDNAL(FGly')TPSRQSGNSQ (SEQ ID NO: 60).

19. Способ по п. 17, где

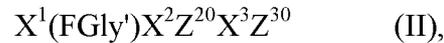
$Z^{30}$  выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

$X^1$  выбран из L, M, S и V и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

20. Способ по п. 1, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH1 тяжелой цепи антитела против CD22.

21. Способ по п. 20, где область CH1 тяжелой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

$X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата,  $X^1$  присутствует, и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо представляет собой любую аминокислоту и

где последовательность является C-концевой по отношению к аминокислотной последовательности SWNSGA (SEQ ID NO: 61) и/или является N-концевой по отношению к аминокислотной последовательности GVHTFP (SEQ ID NO: 62).

22. Способ по п. 21, где область CH1 тяжелой цепи содержит последовательность SWNSGAL(FGly')TPSRGVHTFP (SEQ ID NO: 63).

23. Способ по п. 21, где

$Z^{30}$  выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

$X^1$  выбран из L, M, S и V и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

24. Способ по п. 1, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH2 тяжелой цепи антитела против CD22.

25. Способ по п. 1, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH3 тяжелой цепи антитела против CD22.

26. Способ по п. 1, где один или более противораковых агентов выбран из метотрексата абитрексата, брентуксимаба ведотина, копанлисиба, копанлисиба гидрохлорида, хлорамбуцила, неларабина, аксиабтагена цилолейцела, кармустина, белиностата, бендамустина, бендамустина гидрохлорида, тозитумомаба йод-131, тозитумомаба, блеомицина, бортезомиба, акалабрутиниба, циклофосфамида, цитарабина, липосомного цитарабина, денилейкин дифтитокса, липосомного цитарабина, дексаметазона, доксорубицина, доксорубицина гидрохлорида, метотрексата,

пралатрексата, офатумамба, обинутузумаба, окрелизумаба, ибритумомаба, тиуксетана, ибрутиниба, идедалисиба, рекомбинантного интерферона альфа-2b, ромидеспина, леналидомида, мехлоретамин гидрохлорида, плериксафора, преднизона, ритуксимаба, ритуксимаба и гиалуронидазы человека, бортезомиба, винбластина, винбластина сульфата, винкристина, винкристина сульфата и вориноста.

27. Способ по п. 1, где один или более противораковых агентов выбран из ингибитора тирозинкиназы Брутона, конъюгата антитела против CD30 с лекарственным средством, ингибитора PI3K, ДНК-алкилирующего агента, ингибитора синтеза ДНК, ингибитора гистондеацетилазы, моноклонального антитела против CD20, ингибитора протеасомы, ингибитора ДНК-полимеразы, ингибитора РНК-полимеразы, ингибитора интерлейкина-2, кортикостероида, ингибитора топоизомеразы II, ингибитора дигидрофолатредуктазы, конъюгата антитела против CD20 с лекарственным средством, конъюгата антитела против CD20 с радиофармацевтическим средством, ингибитора P110δ, ингибитора убиквитин-Е3-лигазы, ингибитора рецептора хемокина CXCR4, ингибитора тубулина и агента для терапии адоптивного переноса клеток.

28. Способ по п. 1, где один или более противораковых агентов выбран из циклофосфамида, доксорубицина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("CHOP"); циклофосфамида, винкристина сульфата, прокарбазина гидрохлорида и преднизона ("COPP"); циклофосфамида, винкристина сульфата и преднизона ("CVP"); этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфамида и гидрохлорида доксорубицина ("EPOCH"); циклофосфамида, винкристина сульфата, доксорубицина гидрохлорида и дексаметазона ("гипер-CVAD"); ифосфамида, карбоплатина и этопозида фосфата ("ICE"); ритуксимаба, циклофосфамида, доксорубицина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CHOP"); ритуксимаба, циклофосфамида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CVP"); ритуксимаба, этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, ритуксимаба, этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфамида и доксорубицина гидрохлорида ("R-EPOCH"); и ритуксимаба, ифосфамида, карбоплатина и этопозида фосфата ("R-ICE").

29. Способ по п. 1, где один или более противораковых агентов включает ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицина гидрохлорид, винкристин сульфат и преднизон ("R-CHOP").

30. Способ по п. 1, где рак связан с нарушением регуляции сигналинга BCR.

31. Способ по п. 1, где рак связан с нарушением регуляции сигналинга BCR и рак реагирует на истощение В-клеток.

32. Способ по п. 1, где рак представляет собой лимфому.

33. Способ по п. 1, где рак представляет собой В-клеточную лимфому.
34. Способ по п. 1, где рак выбран из лимфомы Беркитта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы.
35. Способ по п. 1, где рак представляет собой неходжкинскую лимфому.
36. Способ по п. 1, где рак выбран из лимфомы из клеток маргинальной зоны, мантийноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы и первичной лимфомы центральной нервной системы.
37. Способ по п. 1, где рак представляет собой мантийноклеточную лимфому.
38. Способ по п. 1, где рак представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому.
39. Способ по п. 1, где рак представляет собой фолликулярную лимфому.
40. Способ по п. 1, где рак представляет собой лимфому из клеток маргинальной зоны.
41. Способ по п. 1, где рак представляет собой лейкоз.
42. Способ по п. 1, где рак выбран из хронического миелопролиферативного синдрома, острого миелогенного лейкоза, хронического лимфолейкоза, мелкоклеточного лимфолейкоза, волосато-клеточного лейкоза и острого лимфобластного лейкоза.
43. Способ по п. 1, где рак устойчив к лечению одним или более противораковыми агентами, выбранными из метотрексата абитрексата, брентуксимаба ведотина, копанлисиба, копанлисиба гидрохлорида, хлорамбуцила, неларабина, аксиабтагена цилолейцела, кармустина, белинонат, бендамустина, бендамустина гидрохлорида, тозитумомаба йод-131, тозитумомаба, блеомицина, бортезомиба, акалабрутиниба, циклофосфамида, цитарабина, липосомного цитарабина, денилейкин-дифтитокса, липосомного цитарабина, дексаметазона, доксорубицина, доксорубицина гидрохлорида, метотрексата, пралатрексата, офатумамба, обинутумаба, окрелизумаба, ибритумомаба, тиуксетана, ибрутиниба, иделалисиба, рекомбинантного интерферона альфа-2b, ромидеспсина, леналидомида, мехлоретамин гидрохлорида, плериксафора, преднизона, ритуксимаба, ритуксимаба и гиалуронидазы человека, бортезомиба, винбластина, винбластина сульфата, винкристина, винкристина сульфата и вориностага.
44. Способ по п. 1, где рак устойчив к лечению одним или более противораковыми агентами, выбранными из: циклофосфамида, доксорубицина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("CHOP"); циклофосфамида, винкристина сульфата, прокарбазина гидрохлорида и преднизона ("COPP"); циклофосфамида, винкристина сульфата и преднизона ("CVP"); этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфамида и доксорубицина гидрохлорида ("EPOCH"); циклофосфамида,

винкристина сульфата, доксорубицина гидрохлорида и дексаметазона ("гипер-CVAD"); ифосфамида, карбоплатина и этопозида фосфата ("ICE"); ритуксимаба, циклофосфамида, доксорубицина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CHOP"); ритуксимаба, циклофосфамида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CVP"); ритуксимаба, этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, ритуксимаба, этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфамида и доксорубицина гидрохлорида ("R-EPOCH"); и ритуксимаба, ифосфамида, карбоплатина и этопозида фосфата ("R-ICE").

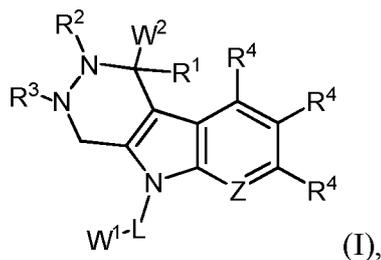
45. Способ лечения резистентного рака у субъекта, включающий:

введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества:

одного или более противораковых агентов и

конъюгата, содержащего:

по меньшей мере, один модифицированный аминокислотный остаток с боковой цепью формулы (I):



где:

Z представляет собой CR<sup>4</sup> или N,

R<sup>1</sup> выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> каждый независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амина, замещенного амина, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила, или R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> необязательно циклически связаны с образованием 5- или 6-членного гетероциклила,

каждый  $R^4$  независимо выбран из водорода, галогена, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амина, замещенного амина, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминаоцила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

L представляет собой линкер, содержащий  $-(T^1-V^1)_a-(T^2-V^2)_b-(T^3-V^3)_c-(T^4-V^4)_d-$ , где a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d составляет от 1 до 4,

$T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  каждый независимо выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила, (ЭДА)<sub>w</sub>, (ПЭГ)<sub>n</sub>, (АК)<sub>p</sub>,  $-(CR^{13}OH)_h-$ , пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, гидразина, дисульфида и сложного эфира, где ЭДА представляет собой этилендиаминовый фрагмент, ПЭГ представляет собой полиэтиленгликоль или модифицированный полиэтиленгликоль и АК представляет собой аминокислотный остаток, где w представляет собой целое число от 1 до 20, n представляет собой целое число от 1 до 30, p представляет собой целое число от 1 до 20 и h представляет собой целое число от 1 до 12,

$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  каждый независимо выбран из группы, состоящей из ковалентной связи,  $-CO-$ ,  $-NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}(CH_2)_q-$ ,  $-NR^{15}(C_6H_4)-$ ,  $-CONR^{15}-$ ,  $-NR^{15}CO-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO_2NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}SO_2-$  и  $-P(O)OH-$ , где q представляет собой целое число от 1 до 6,

каждый  $R^{13}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила,

каждый  $R^{15}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

$W^1$  представляет собой майтансиноид и

$W^2$  представляет собой антитело против CD22,

где введение эффективно для лечения резистентного рака у субъекта.

46. Способ по п. 45, где:

$T^1$  выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила и замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила,

$T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  каждый независимо выбран из  $(\text{ЭДА})_w$ ,  $(\text{ПЭГ})_n$ ,  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила,  $(\text{АК})_p$ ,  $-(\text{CR}^{13}\text{ОН})_h-$ , пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, гидразина и сложного эфира и

$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  каждый независимо выбран из группы, состоящей из ковалентной связи,  $-\text{CO}-$ ,  $-\text{NR}^{15}-$ ,  $-\text{NR}^{15}(\text{CH}_2)_q-$ ,  $-\text{NR}^{15}(\text{C}_6\text{H}_4)-$ ,  $-\text{CONR}^{15}-$ ,  $-\text{NR}^{15}\text{CO}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{S}(\text{O})-$ ,  $-\text{SO}_2-$ ,  $-\text{SO}_2\text{NR}^{15}-$ ,  $-\text{NR}^{15}\text{SO}_2-$  и  $-\text{P}(\text{O})\text{OH}-$ ,

где:

$(\text{ПЭГ})_n$  представляет собой , где  $n$  представляет собой целое число

от 1 до 30,

ЭДА представляет собой этилендиаминовый фрагмент, имеющий следующую

структуру: , где  $y$  представляет собой целое число от 1 до 6 и  $r$  равен 0 или 1,

4-аминопиперидин (4АП) представляет собой ,

каждый  $R^{12}$  и  $R^{15}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, полиэтиленгликолевого фрагмента, арила и замещенного арила, где любые две соседние группы  $R^{12}$  могут быть циклически связаны с образованием пиперазинильного кольца и  $R^{13}$  выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила.

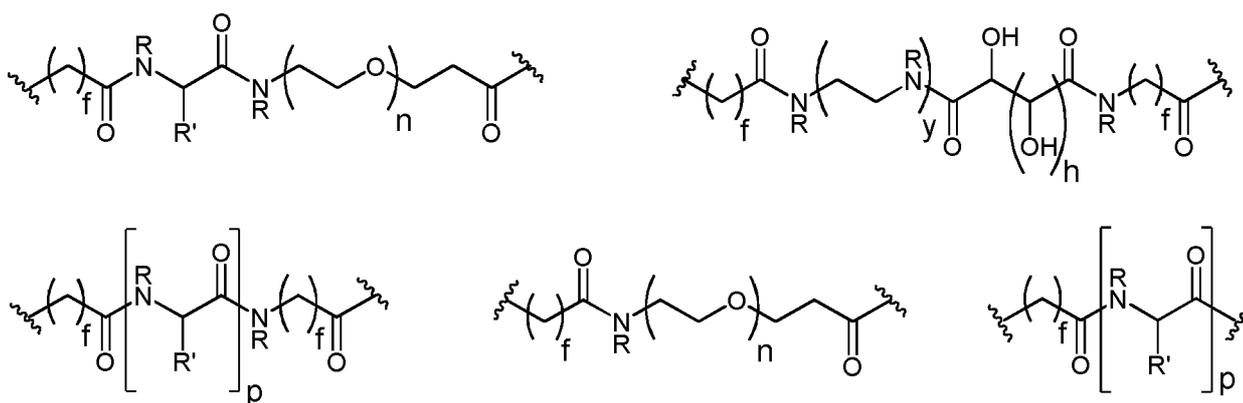
47. Способ по п. 45, где  $T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  и  $V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  выбраны из следующей таблицы:

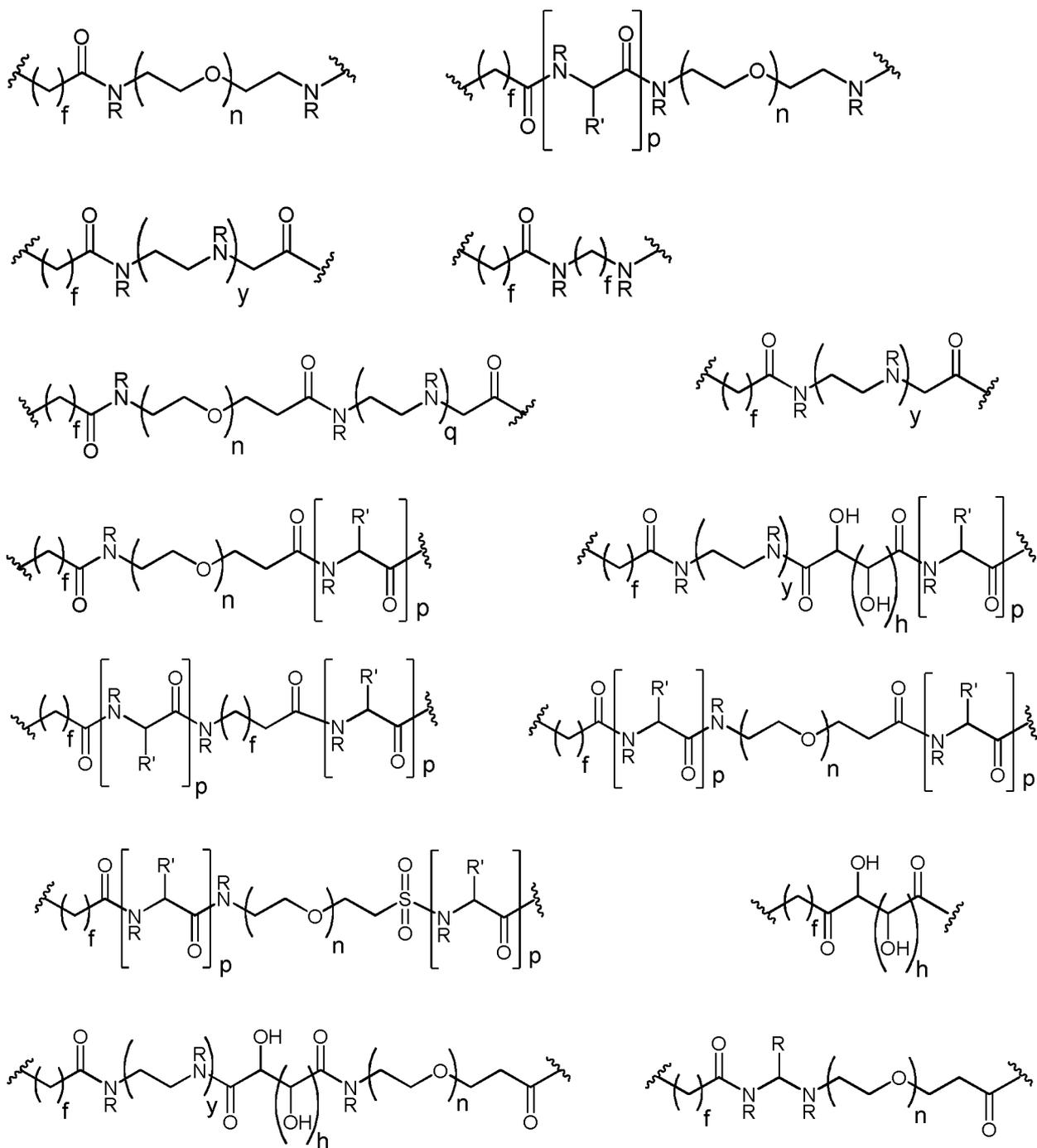
$T^1$	$V^1$	$T^2$	$V^2$	$T^3$	$V^3$	$T^4$	$V^4$
$(C_1-C_{12})$ алкил	- $\text{CONR}^{15}-$	$(\text{ПЭГ})_n$	$-\text{CO}-$	-	-	-	-
$(C_1-C_{12})$ алкил	$-\text{CO}-$	$(\text{АК})_p$	$-\text{NR}^{15}-$	$(\text{ПЭГ})_n$	$-\text{CO}-$	-	-
$(C_1-C_{12})$ алкил	$-\text{CO}-$	$(\text{АК})_p$	-	-	-	-	-
$(C_1-C_{12})$ алкил	- $\text{CONR}^{15}-$	$(\text{ПЭГ})_n$	$-\text{NR}^{15}-$	-	-	-	-
$(C_1-C_{12})$ алкил	$-\text{CO}-$	$(\text{АК})_p$	$-\text{NR}^{15}-$	$(\text{ПЭГ})_n$	$-\text{NR}^{15}-$	-	-

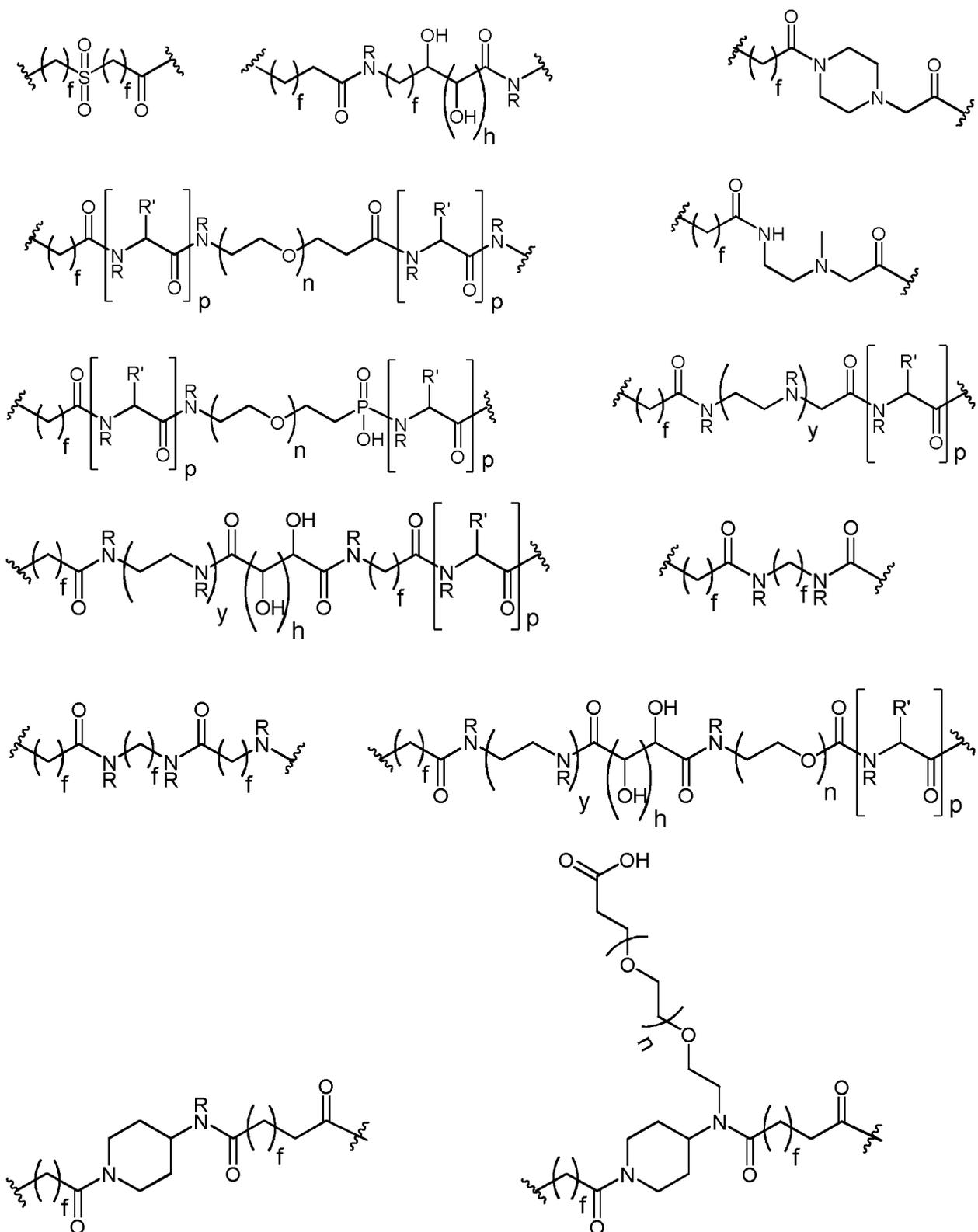
T <sup>1</sup>	V <sup>1</sup>	T <sup>2</sup>	V <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>	V <sup>4</sup>
C <sub>12</sub> )алкил							
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-SO <sub>2</sub> -	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	замещен ый (C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> -	-SO <sub>2</sub> -	(C <sub>1</sub> -	-CO-	-	-	-	-

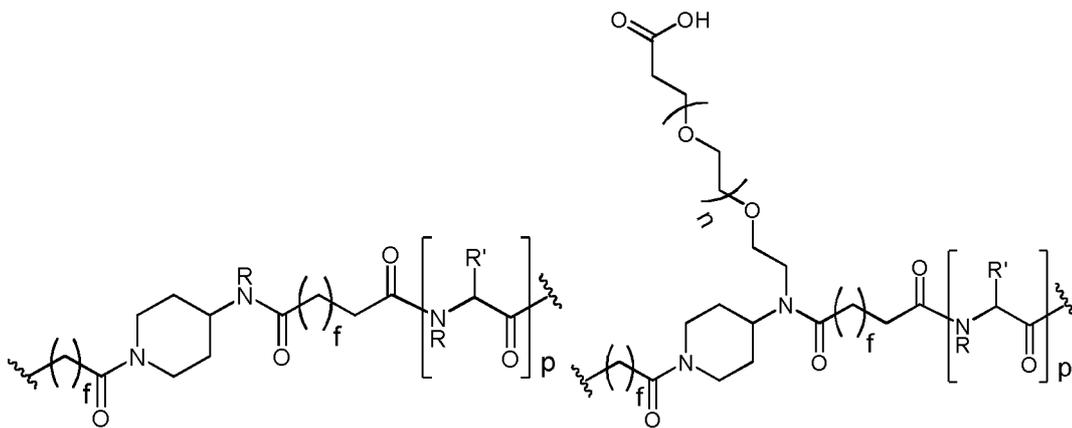
T <sup>1</sup>	V <sup>1</sup>	T <sup>2</sup>	V <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>	V <sup>4</sup>
C <sub>12</sub> )алкил		C <sub>12</sub> )алкил					
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	- NR <sup>15</sup> -
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	- P(O)OH -	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	(AK) <sub>p</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- NR <sup>15</sup> -
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	4АП	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	4АП	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-

48. Способ по п. 45, где линкер L выбран из одной из следующих структур:







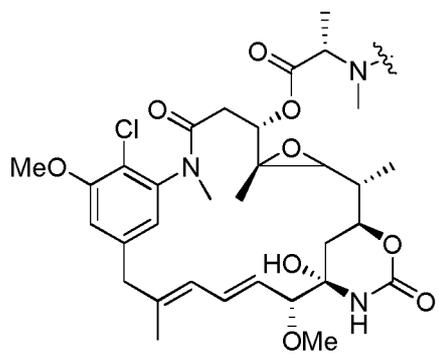


где

каждый  $f$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 12,  
 каждый  $u$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 20,  
 каждый  $p$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 30,  
 каждый  $r$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 20,  
 каждый  $h$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 12,  
 каждый  $R$  независимо представляет собой водород, алкил, замещенный алкил,  
 алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкокси, замещенный  
 алкокси, амино, замещенный амино, карбоксил, сложный эфир карбоновой кислоты, ацил,  
 ацилокси, ациламино, аминоксил, алкиламид, замещенный алкиламид сульфонил,  
 тиоалкокси, замещенный тиоалкокси, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный  
 гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл и замещенный  
 гетероцикл и

каждый  $R'$  независимо представляет собой H, боковую цепь аминокислоты, алкил,  
 замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил,  
 алкокси, замещенный алкокси, амино, замещенный амино, карбоксил, сложный эфир  
 карбоновой кислоты, ацил, ацилокси, ациламино, аминоксил, алкиламид, замещенный  
 алкиламид, сульфонил, тиоалкокси, замещенный тиоалкокси, арил, замещенный арил,  
 гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл  
 и замещенный гетероцикл.

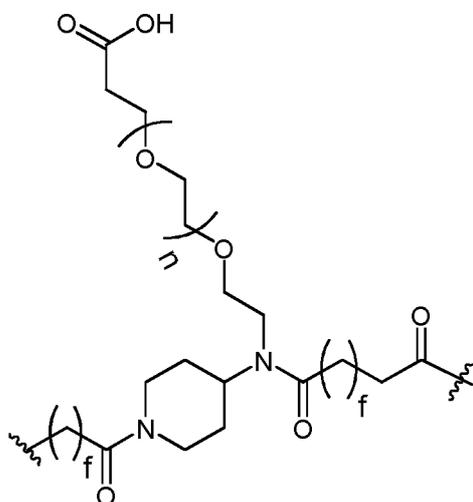
49. Способ по п. 45, где майтансиноид имеет формулу



где ~~~ обозначает точку присоединения между мйтансиноидом и L.

50. Способ по п. 45, где T<sup>1</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>1</sup> представляет собой -CO-, T<sup>2</sup> представляет собой 4АП, V<sup>2</sup> представляет собой -CO-, T<sup>3</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>3</sup> представляет собой -CO-, T<sup>4</sup> отсутствует и V<sup>4</sup> отсутствует.

51. Способ по п. 45, где линкер L содержит следующую структуру:



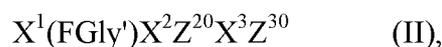
где

каждый f независимо представляет собой целое число от 1 до 12 и

n представляет собой целое число от 1 до 30.

52. Способ по п. 45, где антитело против CD22 связывает эпитоп в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670 аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C.

53. Способ по п. 45, где антитело против CD22 содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

Z<sup>20</sup> представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,  $X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата,  $X^1$  присутствует и  $X^2$  и  $X^3$  каждый независимо представляет собой любую аминокислоту.

54. Способ по п. 53, где последовательность представляет собой L(FGly')TPSR (SEQ ID NO: 185).

55. Способ по п. 53, где

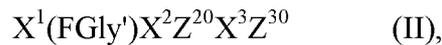
$Z^{30}$  выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

$X^1$  выбран из L, M, S и V и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

56. Способ по п. 45, где модифицированный аминокислотный остаток расположен на C-конце константной области тяжелой цепи антитела против CD22.

57. Способ по п. 56, где константная область тяжелой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

$X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата,  $X^1$  присутствует, и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо представляет собой любую аминокислоту и

где последовательность является C-концевой по отношению к аминокислотной последовательности SLSLSPG (SEQ ID NO: 186).

58. Способ по п. 57, где константная область тяжелой цепи содержит последовательность SPGSL(FGly')TPSRGS (SEQ ID NO: 184).

59. Способ по п. 57, где

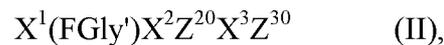
$Z^{30}$  выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

$X^1$  выбран из L, M, S и V и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

60. Способ по п. 45, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в константной области легкой цепи антитела против CD22.

61. Способ по п. 60, где константная область легкой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

Z<sup>20</sup> представляет собой остаток пролина или аланина,

Z<sup>30</sup> представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

X<sup>1</sup> может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата, X<sup>1</sup> присутствует и

X<sup>2</sup> и X<sup>3</sup> каждый независимо представляет собой любую аминокислоту и

где последовательность является C-концевой по отношению к аминокислотной последовательности KVDNAL (SEQ ID NO: 58) и/или является N-концевой по отношению к аминокислотной последовательности QSGNSQ (SEQ ID NO: 59).

62. Способ по п. 61, где константная область легкой цепи содержит последовательность KVDNAL(FGly')TPSRQSGNSQ (SEQ ID NO: 60).

63. Способ по п. 61, где

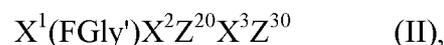
Z<sup>30</sup> выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

X<sup>1</sup> выбран из L, M, S и V и

X<sup>2</sup> и X<sup>3</sup> каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

64. Способ по п. 45, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH1 тяжелой цепи антитела против CD22.

65. Способ по п. 64, где область CH1 тяжелой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

Z<sup>20</sup> представляет собой остаток пролина или аланина,

Z<sup>30</sup> представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

X<sup>1</sup> может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата, X<sup>1</sup> присутствует, и

X<sup>2</sup> и X<sup>3</sup> каждый независимо представляет собой любую аминокислоту и

где последовательность является С-концевой по отношению к аминокислотной последовательности SWNSGA (SEQ ID NO: 61) и/или является N-концевой по отношению к аминокислотной последовательности GVHTFP (SEQ ID NO: 62).

66. Способ по п. 65, где область CH1 тяжелой цепи содержит последовательность SWNSGAL(FGly')TPSRGVHTFP (SEQ ID NO: 63).

67. Способ по п. 65, где

Z<sup>30</sup> выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

X<sup>1</sup> выбран из L, M, S и V и

X<sup>2</sup> и X<sup>3</sup> каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

68. Способ по п. 45, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH2 тяжелой цепи антитела против CD22.

69. Способ по п. 45, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH3 тяжелой цепи антитела против CD22.

70. Способ по п. 45, где один или более противораковых агентов выбран из метотрексата абитрексата, брентуксимаба ведотина, копанлисиба, копанлисиба гидрохлорида, хлорамбуцила, неларабина, аксиабтагена цилолейцела, кармустина, белиностата, бендамустина, бендамустина гидрохлорида, тозитумомаба, йода-131, блеомицина, бортезомиба, акалабрутиниба, циклофосамида, цитарабина, липосомного цитарабина, денилейкин дифтитокса, липосомного цитарабина, дексаметазона, доксорубицина, доксорубицина гидрохлорида, метотрексата, пралатрексата, офатумамба, обинутузумаба, окрелизумаба, ибритумомаба, тиуксетана, ибрутиниба, идедалисиба, рекомбинантного интерферона альфа-2b, ромидеспина, леналидомида, мехлоретамина гидрохлорида, плериксафора, преднизона, ритуксимаба, ритуксимаба и гиалуронидазы человека, бортезомиба, винбластин, винбластин сульфата, винкристина, винкристина сульфата и вориноста.

71. Способ по п. 45, где один или более противораковых агентов выбран из ингибитора тирозинкиназы Брутона, конъюгата антитела против CD30 с лекарственным средством, ингибитора PI3K, ДНК-алкилирующего агента, ингибитора синтеза ДНК, ингибитора гистондеацетилазы, моноклонального антитела против CD20, ингибитора протеасомы, ингибитора ДНК-полимеразы, ингибитора РНК-полимеразы, ингибитора интерлейкина-2, кортикостероида, ингибитора топоизомеразы II, ингибитора дигидрофолатредуктазы, конъюгата антитела против CD20 с лекарственным средством, конъюгата антитела против CD20 с радиофармацевтическим средством, ингибитора P110δ, ингибитора убиквитин-Е3-лигазы, ингибитора рецептора хемокина CXCR4, ингибитора тубулина и агента для терапии адоптивного переноса клеток.

72. Способ по п. 45, где один или более противораковых агентов выбран из циклофосфамида, доксорубина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("CHOP"); циклофосфамида, винкристина сульфата, прокарбазина гидрохлорида и преднизона ("COPP"); циклофосфамида, винкристина сульфата и преднизона ("CVP"); этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфамида и доксорубина гидрохлорида ("EPOCH"); циклофосфамида, винкристина сульфата, гидрохлорида доксорубина и дексаметазона ("гипер-CVAD"); ифосфамида, карбоплатина и этопозида фосфата ("ICE"); ритуксимаба, циклофосфамида, доксорубина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CHOP"); ритуксимаба, циклофосфамида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CVP"); ритуксимаба, этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфамида и доксорубина гидрохлорида ("R-EPOCH"); и ритуксимаба, ифосфамида, карбоплатина и этопозида фосфата ("R-ICE").

73. Способ по п. 45, где один или более противораковых агентов включает ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубина гидрохлорид, винкристина сульфат и преднизон ("R-CHOP").

74. Способ по п. 45, где резистентный рак связан с нарушением регуляции сигналинга BCR.

75. Способ по п. 45, где резистентный рак связан с нарушением регуляции сигналинга BCR и рак реагирует на истощение популяции В-клеток.

76. Способ по п. 45, где резистентный рак представляет собой лимфому.

77. Способ по п. 45, где резистентный рак представляет собой В-клеточную лимфому.

78. Способ по п. 45, где резистентный рак выбран из лимфомы Беркитта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы.

79. Способ по п. 45, где резистентный рак представляет собой неходжкинскую лимфому.

80. Способ по п. 45, где резистентный рак выбран из лимфомы из клеток маргинальной зоны, мантийноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы и первичной лимфомы центральной нервной системы.

81. Способ по п. 45, где резистентный рак представляет собой мантийноклеточную лимфому.

82. Способ по п. 45, где резистентный рак представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому.

83. Способ по п. 45, где резистентный рак представляет собой фолликулярную лимфому.

84. Способ по п. 45, где резистентный рак представляет собой лимфому из клеток маргинальной зоны.

85. Способ по п. 45, где резистентный рак представляет собой лейкоз.

86. Способ по п. 45, где резистентный рак выбран из хронического миелопролиферативного синдрома, острого миелогенного лейкоза, хронического лимфолейкоза, мелкоклеточного лимфолейкоза, волосато-клеточного лейкоза и острого лимфобластного лейкоза.

87. Способ по п. 45, где рак устойчив к лечению одним или более противораковыми агентами, выбранными из метотрексата абитрексата, брентуксимаба ведотина, копанлисиба, копанлисиба гидрохлорида, хлорамбуцила, неларабина, аксиабтагена цилолейцела, кармустина, белинонат, бендамустина, бендамустина гидрохлорида, тозитумомаба, йод-131, тозитумомаба, блеомицина, бортезомиба, акалабрутиниба, циклофосфамида, цитарабина, липосомного цитарабина, денилейкин дифтитокса, липосомного цитарабина, дексаметазона, доксорубицина, доксорубицина гидрохлорида, метотрексата, пралатрексата, офатумамба, обинутузумаба, окрелизумаба, ибритумомаба, тиуксетана, ибрутиниба, идеалалисиба, рекомбинантного интерферона альфа-2b, ромидеспина, леналидомида, мехлоретамин гидрохлорида, плериксафора, преднизона, ритуксимаба, ритуксимаба и гиалуронидазы человека, бортезомиба, винбластин, винбластин сульфата, винкристина, винкристина сульфата и вориноста.

88. Способ по п. 45, где рак устойчив к лечению одним или более противораковыми агентами, выбранными из: циклофосфамида, доксорубицина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("CHOP"); циклофосфамида, винкристина сульфата, прокарбазина гидрохлорида и преднизона ("COPP"); циклофосфамида, винкристина сульфата и преднизона ("CVP"); этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфамида и доксорубицина гидрохлорида ("EPOCH"); циклофосфамида, винкристина сульфата, доксорубицина гидрохлорида и дексаметазона ("гипер-CVAD"); ифосфамида, карбоплатина и этопозида фосфата ("ICE"); ритуксимаба, циклофосфамида, доксорубицина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CHOP"); ритуксимаба, циклофосфамида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CVP"); ритуксимаба, этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, ритуксимаба, этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфамида и доксорубицина гидрохлорида ("R-EPOCH"); и ритуксимаба, ифосфамида, карбоплатина и этопозида фосфата ("R-ICE").

89. Способ по п. 45, где рак устойчив к лечению ритуксимабом, циклофосфамидом, доксорубицином гидрохлоридом, винкристина сульфатом и преднизолоном ("R-CHOP").

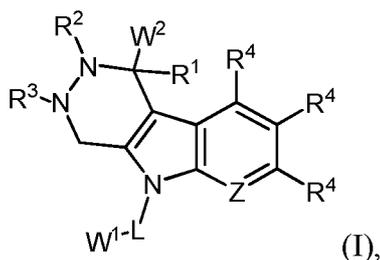
90. Способ сенсбилизации рака у субъекта, включающий:

введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества:

одного или более противораковых агентов и

конъюгата, содержащего:

по меньшей мере, один модифицированный аминокислотный остаток с боковой цепью формулы (I):



где:

Z представляет собой CR<sup>4</sup> или N,

R<sup>1</sup> выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероцикла и замещенного гетероцикла,

R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> каждый независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амина, замещенного амина, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминацила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонил, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероцикла и замещенного гетероцикла, или R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> необязательно циклически связаны с образованием 5- или 6-членного гетероцикла,

каждый R<sup>4</sup> независимо выбран из водорода, галогена, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амина, замещенного амина, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминацила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонил, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероцикла и замещенного гетероцикла,

L представляет собой линкер, содержащий  $-(T^1-V^1)_a-(T^2-V^2)_b-(T^3-V^3)_c-(T^4-V^4)_d-$ , где a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d составляет от 1 до 4,

$T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  каждый независимо выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила, (ЭДА)<sub>w</sub>, (ПЭГ)<sub>b</sub>, (АК)<sub>p</sub>,  $-(CR^{13}OH)_h-$ , пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, гидразина, дисульфида и сложного эфира, где ЭДА представляет собой этилендиаминовый фрагмент, ПЭГ представляет собой полиэтиленгликоль или модифицированный полиэтиленгликоль и АК представляет собой аминокислотный остаток, где w представляет собой целое число от 1 до 20, p представляет собой целое число от 1 до 30, h представляет собой целое число от 1 до 12,

$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  каждый независимо выбран из группы, состоящей из ковалентной связи,  $-CO-$ ,  $-NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}(CH_2)_q-$ ,  $-NR^{15}(C_6H_4)-$ ,  $-CONR^{15}-$ ,  $-NR^{15}CO-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO_2NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}SO_2-$  и  $-P(O)OH-$ , где q представляет собой целое число от 1 до 6,

каждый  $R^{13}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила,

каждый  $R^{15}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

$W^1$  представляет собой майтансиноид и

$W^2$  представляет собой антитело против CD22,

где введение является эффективным для сенсibilизации рака у субъекта.

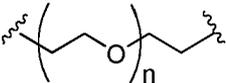
91. Способ по п. 90, где:

$T^1$  выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила и замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила,

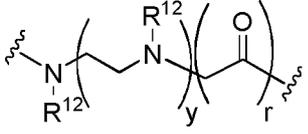
$T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  каждый независимо выбран из (ЭДА)<sub>w</sub>, (ПЭГ)<sub>b</sub>,  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила, (АК)<sub>p</sub>,  $-(CR^{13}OH)_h-$ , пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, гидразина и сложного эфира и

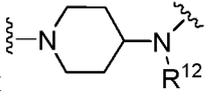
$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  каждый независимо выбран из группы, состоящей из ковалентной связи,  $-CO-$ ,  $-NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}(CH_2)_q-$ ,  $-NR^{15}(C_6H_4)-$ ,  $-CONR^{15}-$ ,  $-NR^{15}CO-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO_2NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}SO_2-$  и  $-P(O)OH-$ ,

где:

(ПЭГ)<sub>n</sub> представляет собой , где n представляет собой целое число от 1 до 30,

ЭДА представляет собой этилендиаминовый фрагмент, имеющий следующую

структуру: , где y представляет собой целое число от 1 до 6 и r равен 0 или 1,

4-аминопиперидин (4АП) представляет собой ,

каждый R<sup>12</sup> и R<sup>15</sup> независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, полиэтиленгликолевого фрагмента, арила и замещенного арила, где любые две соседние группы R<sup>12</sup> могут быть циклически связаны с образованием пиперазинильного кольца и R<sup>13</sup> выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила.

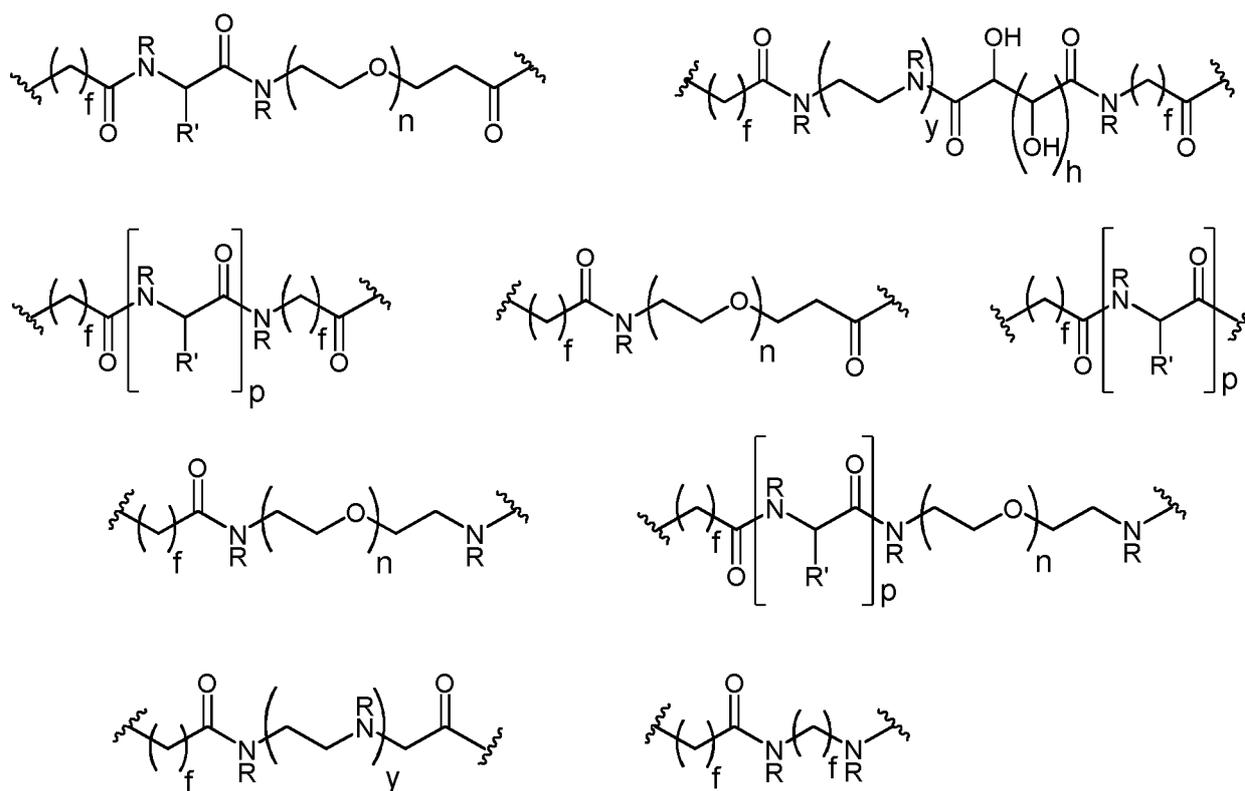
92. Способ по п. 90, где T<sup>1</sup>, T<sup>2</sup>, T<sup>3</sup> и T<sup>4</sup> и V<sup>1</sup>, V<sup>2</sup>, V<sup>3</sup> и V<sup>4</sup> выбраны из следующей таблицы:

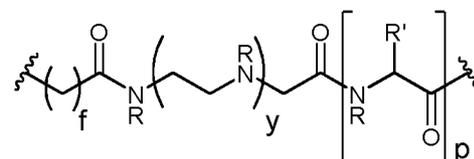
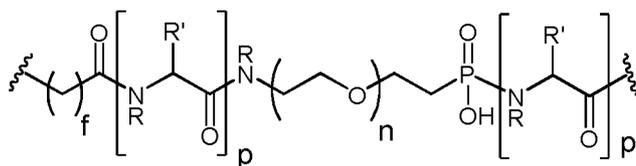
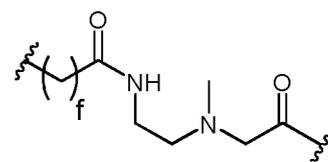
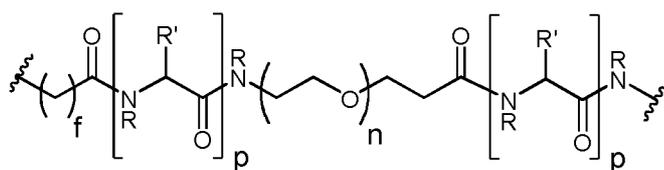
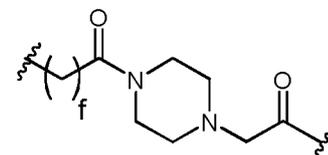
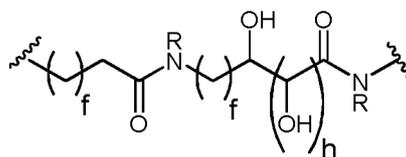
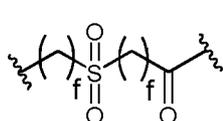
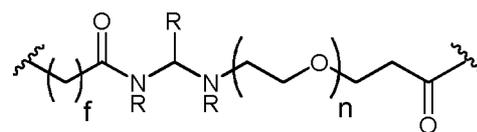
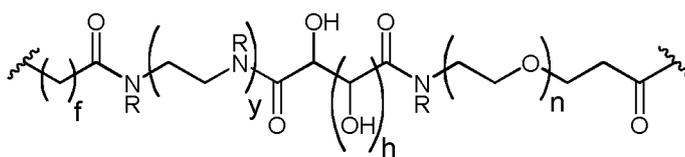
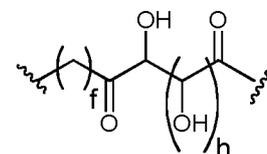
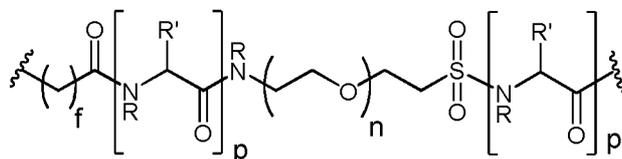
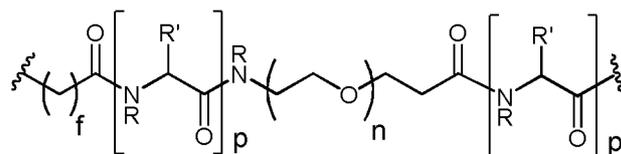
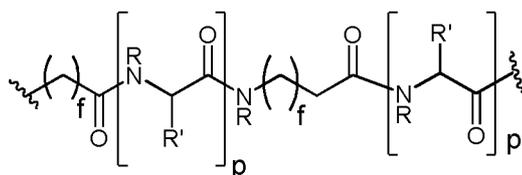
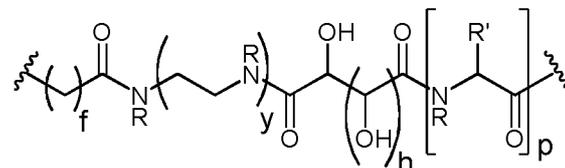
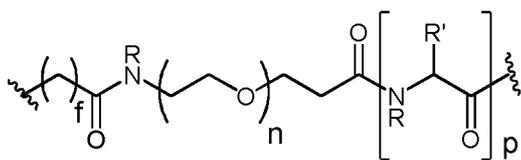
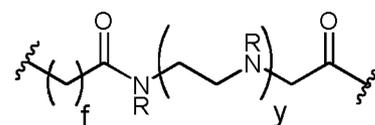
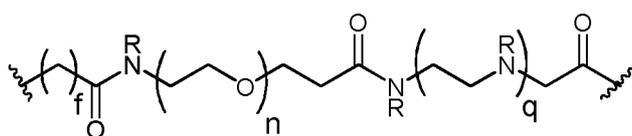
T <sup>1</sup>	V <sup>1</sup>	T <sup>2</sup>	V <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>	V <sup>4</sup>
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-NR <sup>15</sup> -	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-NR <sup>15</sup> -	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	-	-

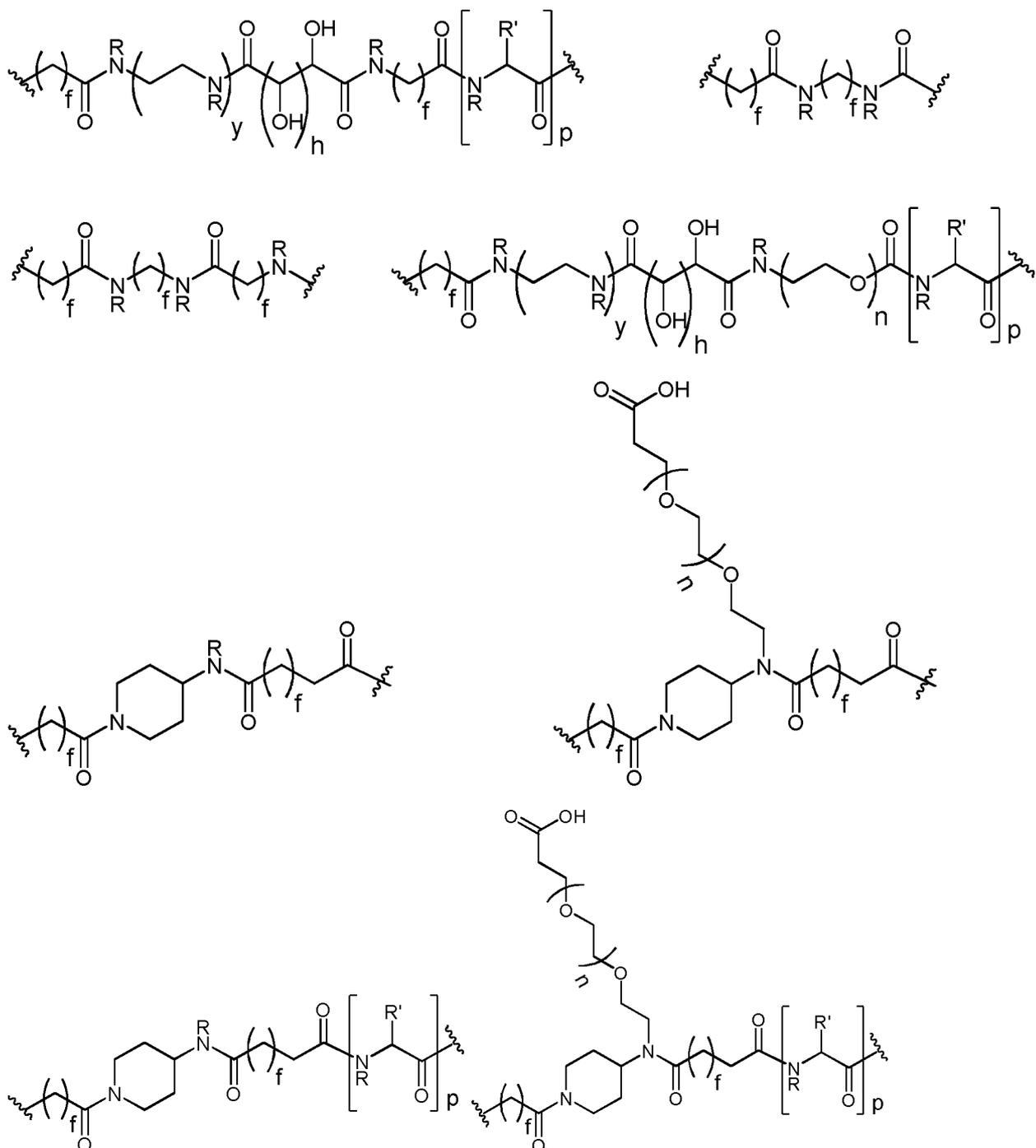
T <sup>1</sup>	V <sup>1</sup>	T <sup>2</sup>	V <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>	V <sup>4</sup>
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-SO <sub>2</sub> -	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	замещенн ый (C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-SO <sub>2</sub> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	- NR <sup>15</sup> -
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-	(АК) <sub>p</sub>	-

T <sup>1</sup>	V <sup>1</sup>	T <sup>2</sup>	V <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>	V <sup>4</sup>
C <sub>12</sub> )алкил					P(O)OH -		
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	(АК) <sub>p</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- NR <sup>15</sup> -
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	4АП	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(АК) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	4АП	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-

93. Способ по п. 90, где линкер L выбран из одной из следующих структур:







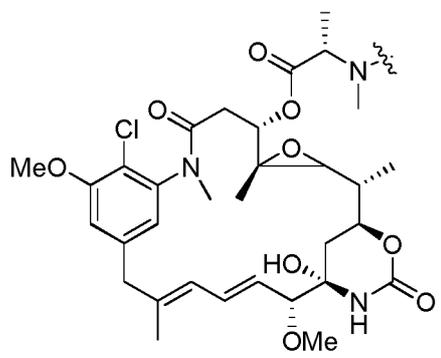
где

каждый  $f$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 12,  
 каждый  $y$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 20,  
 каждый  $p$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 30,  
 каждый  $p$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 20,  
 каждый  $h$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 12,  
 каждый  $R$  независимо представляет собой водород, алкил, замещенный алкил,  
 алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкокси, замещенный  
 алкокси, amino, замещенный amino, карбоксил, сложный эфир карбоновой кислоты, ацил,

ацилокси, ациламино, аминоксил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил, тиоалкокси, замещенный тиоалкокси, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл и замещенный гетероцикл и

каждый R<sup>1</sup> независимо представляет собой H, группу боковой цепи аминокислоты, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкокси, замещенный алкокси, амино, замещенный амино, карбоксил, сложный эфир карбоновой кислоты, ацил, ацилокси, ациламино, аминоксил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил, тиоалкокси, замещенный тиоалкокси, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл и замещенный гетероцикл.

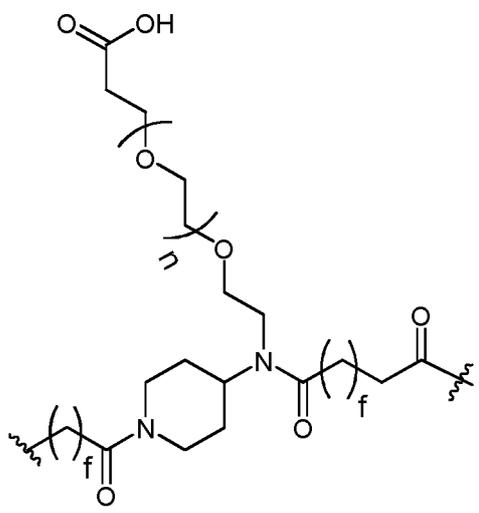
94. Способ по п. 90, где майтансиноид имеет формулу



где ~~~ обозначает точку присоединения между майтансиноидом и L.

95. Способ по п. 90, где T<sup>1</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>1</sup> представляет собой -CO-, T<sup>2</sup> представляет собой 4АП, V<sup>2</sup> представляет собой -CO-, T<sup>3</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>3</sup> представляет собой -CO-, T<sup>4</sup> отсутствует и V<sup>4</sup> отсутствует.

96. Способ по п. 90, где линкер L содержит следующую структуру:



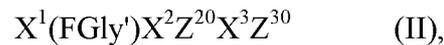
где

каждый f независимо представляет собой целое число от 1 до 12 и

n представляет собой целое число от 1 до 30.

97. Способ по п. 90, где антитело против CD22 связывает эпитоп в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670 аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C.

98. Способ по п. 90, где антитело против CD22 содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

$X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата,  $X^1$  присутствует и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо представляет собой любую аминокислоту.

99. Способ по п. 98, где последовательность представляет собой L(FGly')TPSR (SEQ ID NO: 185).

100. Способ по п. 99, где

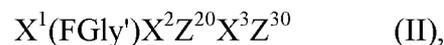
$Z^{30}$  выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

$X^1$  выбран из L, M, S и V и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

101. Способ по п. 90, где модифицированный аминокислотный остаток расположен на C-конце константной области тяжелой цепи антитела против CD22.

102. Способ по п. 101, где константная область тяжелой цепи включает последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

X<sup>1</sup> может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата, X<sup>1</sup> присутствует и X<sup>2</sup> и X<sup>3</sup> каждый независимо представляет собой любую аминокислоту и где последовательность является С-концевой по отношению к аминокислотной последовательности SLSLSPG (SEQ ID NO: 186).

103. Способ по п. 102, где константная область тяжелой цепи содержит последовательность SPGSL(FGly')TPSRGS (SEQ ID NO: 184).

104. Способ по п. 102, где

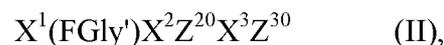
Z<sup>30</sup> выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

X<sup>1</sup> выбран из L, M, S и V и

X<sup>2</sup> и X<sup>3</sup> каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

105. Способ по п. 90, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в константной области легкой цепи антитела против CD22.

106. Способ по п. 105, где константная область легкой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

Z<sup>20</sup> представляет собой остаток пролина или аланина,

Z<sup>30</sup> представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

X<sup>1</sup> может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата, X<sup>1</sup> присутствует и X<sup>2</sup> и X<sup>3</sup> каждый независимо представляет собой любую аминокислоту и где последовательность является С-концевой по отношению к аминокислотной последовательности KVDNAL (SEQ ID NO: 58) и/или является N-концевой по отношению к аминокислотной последовательности QSGNSQ (SEQ ID NO: 59).

107. Способ по п. 106, где константная область легкой цепи содержит последовательность KVDNAL(FGly')TPSRQSGNSQ (SEQ ID NO: 60).

108. Способ по п. 106, где

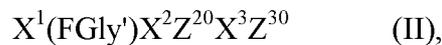
Z<sup>30</sup> выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

X<sup>1</sup> выбран из L, M, S и V и

X<sup>2</sup> и X<sup>3</sup> каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

109. Способ по п. 90, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH1 тяжелой цепи антитела против CD22.

110. Способ по п. 109, где область CH1 тяжелой цепи включает последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

Z<sup>20</sup> представляет собой остаток пролина или аланина,

Z<sup>30</sup> представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

X<sup>1</sup> может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата, X<sup>1</sup> присутствует, и

X<sup>2</sup> и X<sup>3</sup> каждый независимо представляет собой любую аминокислоту и

где последовательность является C-концевой по отношению к аминокислотной последовательности SWNSGA (SEQ ID NO: 61) и/или является N-концевой по отношению к аминокислотной последовательности GVHTFP (SEQ ID NO: 62).

111. Способ по п. 110, где область CH1 тяжелой цепи содержит последовательность SWNSGAL(FGly')TPSRGVHTFP (SEQ ID NO: 63).

112. Способ по п. 110, где

Z<sup>30</sup> выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

X<sup>1</sup> выбран из L, M, S и V и

X<sup>2</sup> и X<sup>3</sup> каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

113. Способ по п. 90, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH2 тяжелой цепи антитела против CD22.

114. Способ по п. 90, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH3 тяжелой цепи антитела против CD22.

115. Способ по п. 90, где один или более противораковых агентов выбран из метотрексата абитрексата, брентуксимаба ведотина, копанлисиба, копанлисиба гидрохлорида, хлорамбуцила, неларабина, аксиабтагена цилолейцела, кармустина, белиностата, бендамустина, бендамустина гидрохлорида, тозитумомаба йод-131, тозитумомаба, блеомицина, бортезомиба, акалабрутиниба, циклофосфамида, липосомного цитарабина, цитарабина, денилейкин дифтитокса, липосомного цитарабина, дексаметазона, доксорубицина, доксорубицина гидрохлорида, метотрексата, пралатрексата, офатумамба, обинутузумаба, окрелизумаба, ибритумомаба, тиуксетана,

ибрутиниба, иделалисиба, рекомбинантного интерферона альфа-2b, ромидеспина, леналидомида, мехлоретамин гидрохлорида, плериксафора, преднизона, ритуксимаба, ритуксимаба и гиалуронидазы человека, бортезомиба, винбластина, винбластина сульфата, винкристина, винкристина сульфата и вориностата.

116. Способ по п. 90, где один или более противораковых агентов выбран из ингибитора тирозинкиназы Брутона, конъюгата антитела против CD30 с лекарственным средством, ингибитора PI3K, ДНК-алкилирующего агента, ингибитора синтеза ДНК, ингибитора гистондеацетилазы, моноклонального антитела против CD20, ингибитора протеасомы, ингибитора ДНК-полимеразы, ингибитора РНК-полимеразы, ингибитора интерлейкина-2, кортикостероида, ингибитора топоизомеразы II, ингибитора дигидрофолатредуктазы, конъюгата антитела против CD20 с лекарственным средством, конъюгата антитела против CD20 с радиофармацевтическим средством, ингибитора P110δ, ингибитора убиквитин-Е3-лигазы, ингибитора рецептора хемокина CXCR4, ингибитора тубулина и агента для терапии адоптивного переноса клеток.

117. Способ по п. 90, где один или более противораковых агентов выбран из циклофосфамида, доксорубицина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("CHOP"); циклофосфамида, винкристина сульфата, прокарбазина гидрохлорида и преднизона ("COPP"); циклофосфамида, винкристина сульфата и преднизона ("CVP"); этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфамида и доксорубицина гидрохлорида ("EPOCH"); циклофосфамида, винкристина сульфата, доксорубицина гидрохлорида и дексаметазона ("гипер-CVAD"); ифосфамида, карбоплатина и этопозида фосфата ("ICE"); ритуксимаба, циклофосфамида, доксорубицина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CHOP"); ритуксимаба, циклофосфамида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CVP"); ритуксимаба, этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, ритуксимаба, этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфамида и доксорубицина гидрохлорида ("R-EPOCH"); и ритуксимаба, ифосфамида, карбоплатина и этопозида фосфата ("R-ICE").

118. Способ по п. 90, где один или более противораковых агентов включает ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицина гидрохлорид, винкристина сульфат и преднизон ("R-CHOP").

119. Способ по п. 90, где рак связан с нарушением регуляции сигналинга BCR.

120. Способ по п. 90, где рак связан с нарушением регуляции сигналинга BCR и рак реагирует на истощение В-клеток.

121. Способ по п. 90, где рак представляет собой лимфому.

122. Способ по п. 90, где рак представляет собой В-клеточную лимфому.
123. Способ по п. 90, где рак выбран из лимфомы Беркитта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы.
124. Способ по п. 90, где рак представляет собой неходжкинскую лимфому.
125. Способ по п. 90, где рак выбран из лимфомы из клеток краевой зоны, мантийноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы и первичной лимфомы центральной нервной системы.
126. Способ по п. 90, где рак представляет собой мантийноклеточную лимфому.
127. Способ по п. 90, где рак представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому.
128. Способ по п. 90, где рак представляет собой фолликулярную лимфому.
129. Способ по п. 90, где рак представляет собой лимфому из клеток краевой зоны.
130. Способ по п. 90, где рак представляет собой лейкоз.
131. Способ по п. 90, где рак выбран из хронического миелопролиферативного синдрома, острого миелогенного лейкоза, хронического лимфолейкоза, мелкоклеточного лимфолейкоза, волосато-клеточного лейкоза и острого лимфобластного лейкоза.
132. Способ по п. 90, где рак устойчив к лечению одним или более противораковыми агентами, выбранными из метотрексата абитрексата, брентуксимаба ведотина, копанлисиба, копанлисиба гидрохлорида, хлорамбуцила, неларабина, аксиабтагена цилолейцела, кармустина, белинонат, бендамустина, бендамустина гидрохлорида, тозитумомаба йод-131, тозитумомаба, блеомицина, бортезомиба, акалабрутиниба, циклофосфамида, цитарабина, липосомного цитарабина, денилейкин дифтитокса, липосомного цитарабина, дексаметазона, доксорубицина, доксорубицина гидрохлорида, метотрексата, пралатрексата, офатумамба, обинутузумаба, окрелизумаба, ибритумомаба, тиуксетана, ибрутиниба, идеалалисиба, рекомбинантного интерферона альфа-2b, ромидеспина, леналидомида, мехлоретамин гидрохлорида, плериксафора, преднизона, ритуксимаба, ритуксимаба и гиалуронидазы человека, бортезомиба, винбластин, винбластин сульфата, винкристина, винкристина сульфата и вориностата.
133. Способ по п. 90, где рак устойчив к лечению одним или более противораковыми агентами, выбранными из: циклофосфамида, доксорубицина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("CHOP"); циклофосфамида, винкристина сульфата, прокарбазина гидрохлорида и преднизона ("COPP"); циклофосфамида, винкристина сульфата и преднизона ("CVP"); этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфамида и доксорубицина гидрохлорида ("EPOCH"); циклофосфамида, винкристина сульфата, доксорубицина гидрохлорида и

дексаметазона ("гипер-CVAD"); ифосфамида, карбоплатина и этопозид фосфата ("ICE"); ритуксимаба, циклофосфамида, доксорубина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CHOP"); ритуксимаба, циклофосфамида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CVP"); ритуксимаба, этопозид фосфата, преднизона, винкристина сульфата, ритуксимаба, этопозид фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфамида и доксорубина гидрохлорида ("R-EPOCH"); и ритуксимаба, ифосфамида, карбоплатина и этопозид фосфата ("R-ICE").

134. Способ по п. 90, где рак устойчив к лечению ритуксимабом, циклофосфамидом, доксорубина гидрохлоридом, винкристина сульфатом и преднизонам ("R-CHOP").

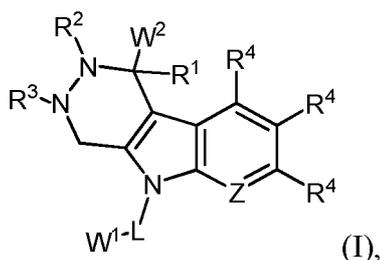
135. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая:

один или более противораковых агентов,

конъюгат и

фармацевтически приемлемый эксципиент,

где конъюгат содержит по меньшей мере один модифицированный аминокислотный остаток с боковой цепью формулы (I):



где:

Z представляет собой CR<sup>4</sup> или N,

R<sup>1</sup> выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> каждый независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, amino, замещенного amino, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила, или R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> необязательно циклически связаны с образованием 5- или 6-членного гетероциклила,

каждый  $R^4$  независимо выбран из водорода, галогена, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амино, замещенного амино, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминацила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

L представляет собой линкер, содержащий  $-(T^1-V^1)_a-(T^2-V^2)_b-(T^3-V^3)_c-(T^4-V^4)_d$ , где a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d составляет от 1 до 4,

$T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  каждый независимо выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила, (ЭДА)<sub>w</sub>, (ПЭГ)<sub>n</sub>, (АК)<sub>p</sub>,  $-(CR^{13}OH)_h$ -, пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, гидразина, дисульфида и сложного эфира, где ЭДА представляет собой этилендиаминовый фрагмент, ПЭГ представляет собой полиэтиленгликоль или модифицированный полиэтиленгликоль и АК представляет собой аминокислотный остаток, где w представляет собой целое число от 1 до 20, n представляет собой целое число от 1 до 30, p представляет собой целое число от 1 до 20 и h представляет собой целое число от 1 до 12,

$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  каждый независимо выбран из группы, состоящей из ковалентной связи,  $-CO-$ ,  $-NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}(CH_2)_q-$ ,  $-NR^{15}(C_6H_4)-$ ,  $-CONR^{15}-$ ,  $-NR^{15}CO-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO_2NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}SO_2-$  и  $-P(O)OH-$ , где q представляет собой целое число от 1 до 6,

каждый  $R^{13}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила,

каждый  $R^{15}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

$W^1$  представляет собой майтансиноид и

$W^2$  представляет собой антитело против CD22.

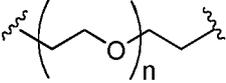
136. Фармацевтическая композиция по п. 135, где

$T^1$  выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила и замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила,

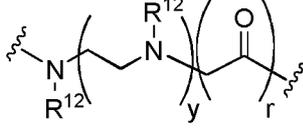
$T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  каждый независимо выбран из (ЭДА)<sub>w</sub>, (ПЭГ)<sub>n</sub>,  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила, (АК)<sub>p</sub>,  $-(CR^{13}OH)_h$ -, пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, гидразина и сложного эфира и

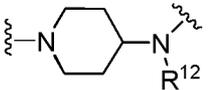
$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  каждый независимо выбран из группы, состоящей из ковалентной связи,  $-CO-$ ,  $-NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}(CH_2)_q-$ ,  $-NR^{15}(C_6H_4)-$ ,  $-CONR^{15}-$ ,  $-NR^{15}CO-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO_2NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}SO_2-$  и  $-P(O)OH-$ ,

где:

(ПЭГ)<sub>n</sub> представляет собой , где n представляет собой целое число от 1 до 30,

ЭДА представляет собой этилендиаминовый фрагмент, имеющий следующую

структуру: , где y представляет собой целое число от 1 до 6 и r равен 0 или 1,

пиперидин-4-амино представляет собой ,

каждый  $R^{12}$  и  $R^{15}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, полиэтиленгликолевого фрагмента, арила и замещенного арила, где любые две соседние группы  $R^{12}$  могут быть циклически связаны с образованием пиперазинильного кольца и  $R^{13}$  выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила.

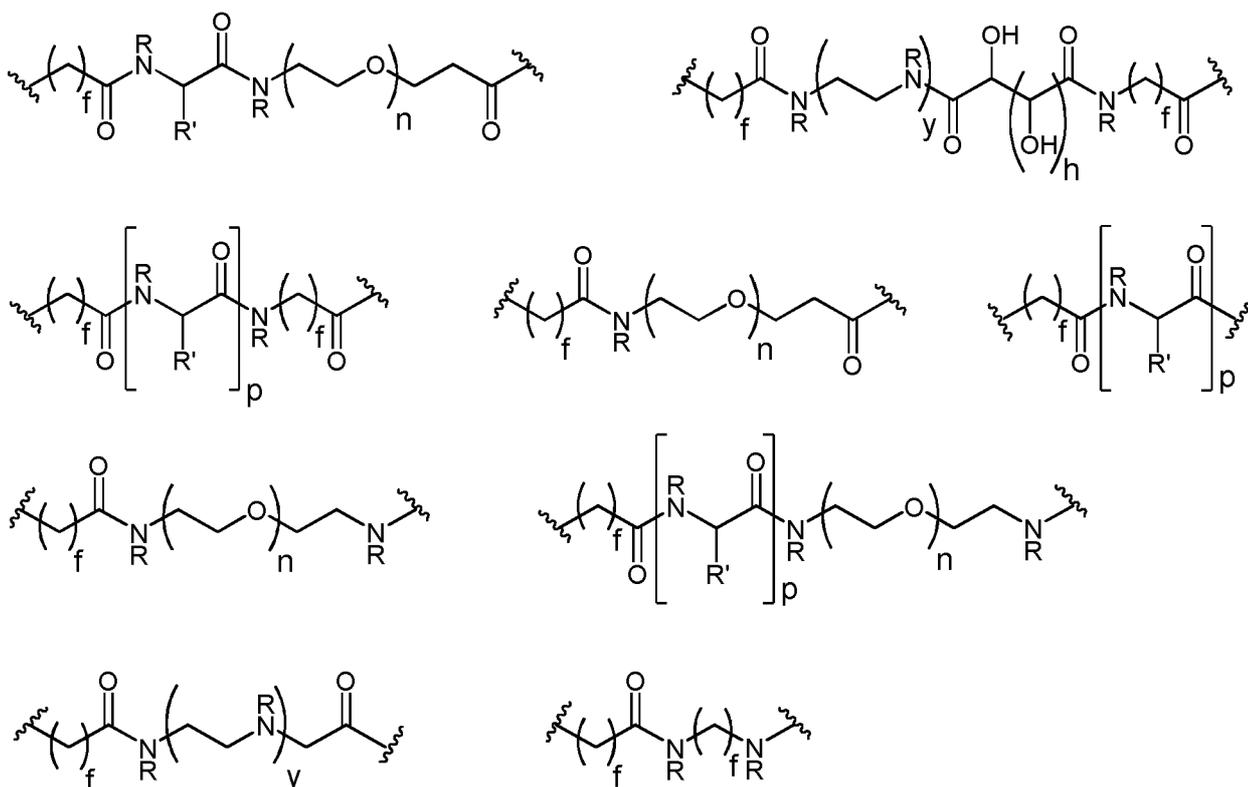
137. Фармацевтическая композиция по п. 135, где  $T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  и  $V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  выбраны из следующей таблицы:

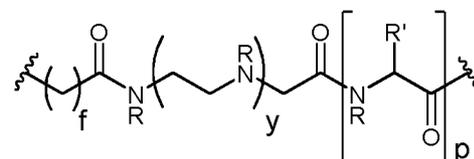
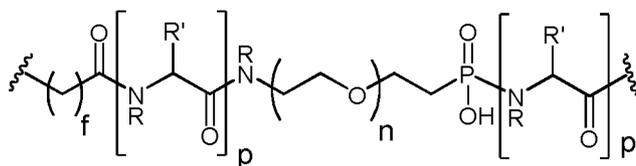
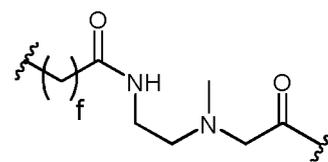
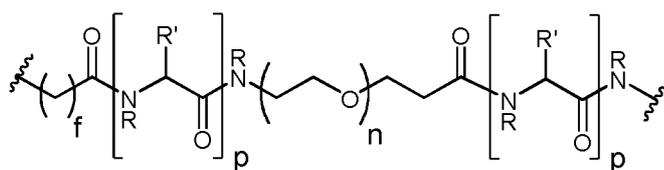
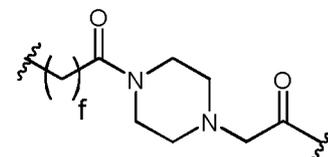
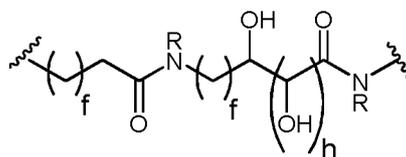
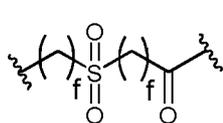
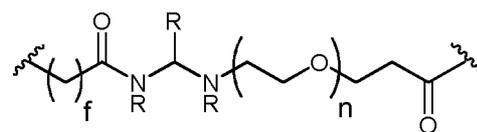
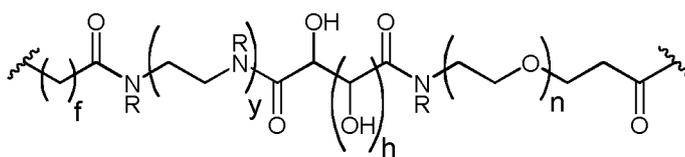
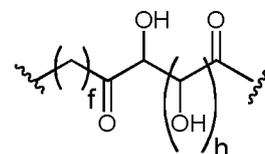
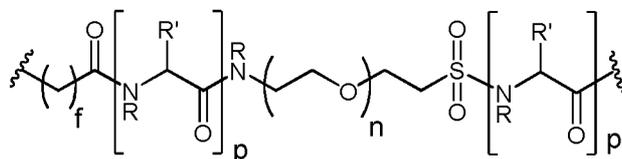
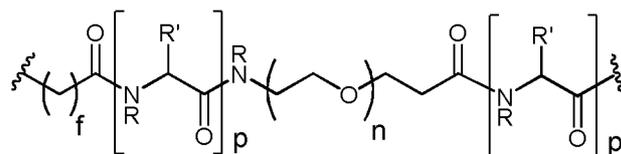
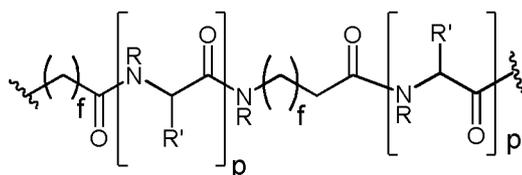
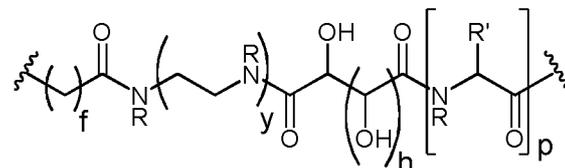
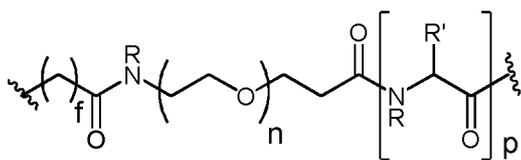
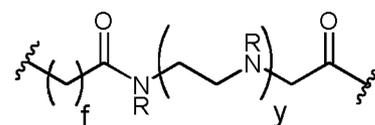
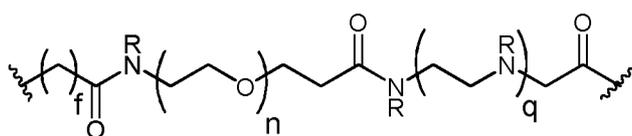
$T^1$	$V^1$	$T^2$	$V^2$	$T^3$	$V^3$	$T^4$	$V^4$
( $C_1$ - $C_{12}$ )алкил	- $CONR^{15}-$	(ПЭГ) <sub>n</sub>	$-CO-$	-	-	-	-
( $C_1$ - $C_{12}$ )алкил	$-CO-$	(АК) <sub>p</sub>	$-NR^{15}-$	(ПЭГ) <sub>n</sub>	$-CO-$	-	-
( $C_1$ - $C_{12}$ )алкил	$-CO-$	(АК) <sub>p</sub>	-	-	-	-	-
( $C_1$ - $C_{12}$ )алкил	- $CONR^{15}-$	(ПЭГ) <sub>n</sub>	$-NR^{15}-$	-	-	-	-
( $C_1$ - $C_{12}$ )алкил	$-CO-$	(АК) <sub>p</sub>	$-NR^{15}-$	(ПЭГ) <sub>n</sub>	$-NR^{15}-$	-	-
( $C_1$ - $C_{12}$ )алкил	$-CO-$	(ЭДА) <sub>w</sub>	$-CO-$	-	-	-	-

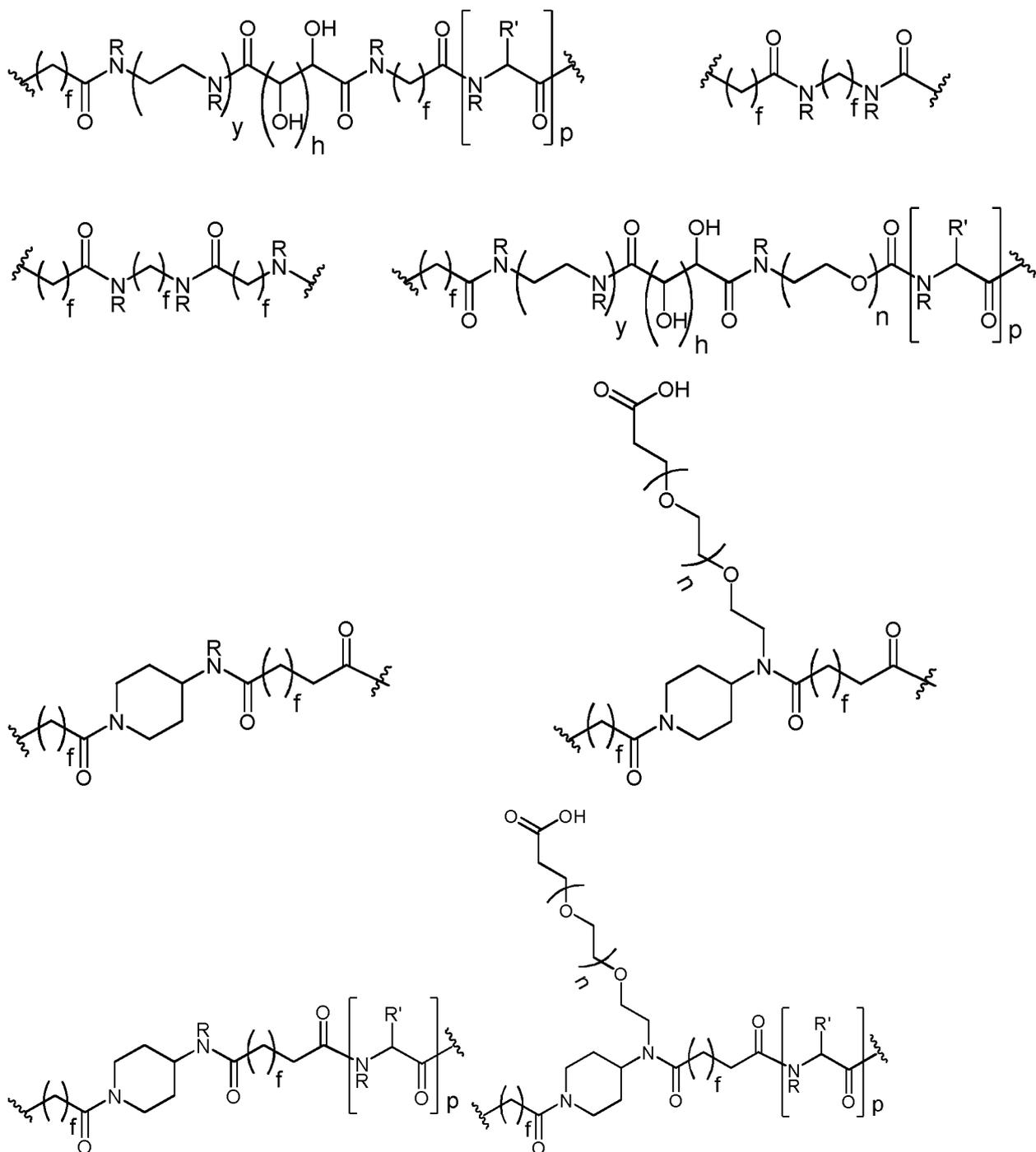
T <sup>1</sup>	V <sup>1</sup>	T <sup>2</sup>	V <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>	V <sup>4</sup>
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-SO <sub>2</sub> -	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	замещенн ый (C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-SO <sub>2</sub> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup>	-	-

T <sup>1</sup>	V <sup>1</sup>	T <sup>2</sup>	V <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>	V <sup>4</sup>
					-		
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	- NR <sup>15</sup> -
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	- P(O)OH -	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	(AK) <sub>p</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- NR <sup>15</sup> -
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	4АП	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	4АП	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-

138. Фармацевтическая композиция по п. 135, где линкер L выбран из одной из следующих структур:







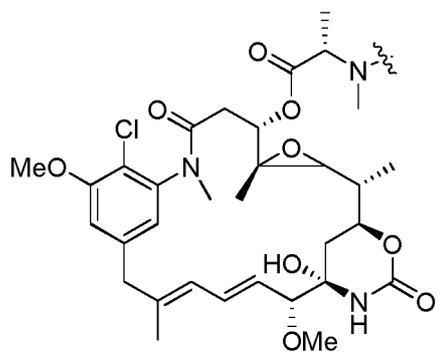
где

каждый  $f$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 12,  
каждый  $y$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 20,  
каждый  $p$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 30,  
каждый  $r$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 20,  
каждый  $h$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 12,  
каждый  $R$  независимо представляет собой водород, алкил, замещенный алкил,  
алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкокси, замещенный  
алкокси, amino, замещенный amino, карбоксил, сложный эфир карбоновой кислоты, ацил,

ацилокси, ациламино, аминоксил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил, тиоалкокси, замещенный тиоалкокси, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл и замещенный гетероцикл и

каждый R<sup>1</sup> независимо представляет собой H, группу боковой цепи аминокислоты, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкокси, замещенный алкокси, амино, замещенный амино, карбоксил, сложный эфир карбоновой кислоты, ацил, ацилокси, ациламино, аминоксил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил, тиоалкокси, замещенный тиоалкокси, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл и замещенный гетероцикл.

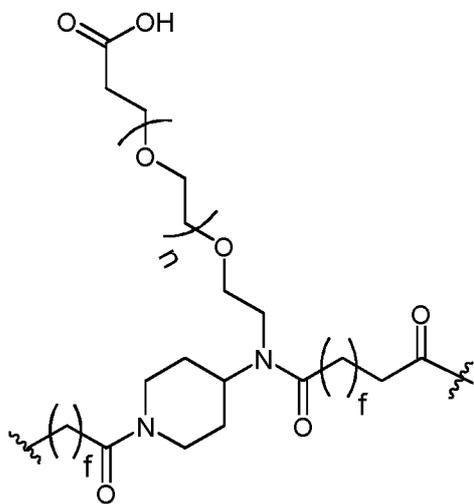
139. Фармацевтическая композиция по п. 135, где майтансиноид имеет формулу



где ~~~ обозначает точку присоединения между майтансиноидом и L.

140. Фармацевтическая композиция по п. 135, где T<sup>1</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>1</sup> представляет собой -CO-, T<sup>2</sup> представляет собой 4АП, V<sup>2</sup> представляет собой -CO-, T<sup>3</sup> представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)алкил, V<sup>3</sup> представляет собой -CO-, T<sup>4</sup> отсутствует и V<sup>4</sup> отсутствует.

141. Фармацевтическая композиция по п. 135, где линкер L имеет следующую структуру:



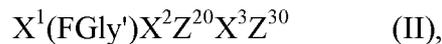
где

каждый  $f$  независимо представляет собой целое число от 1 до 12 и

$n$  представляет собой целое число от 1 до 30.

142. Фармацевтическая композиция по п. 135, где антитело против CD22 связывает эпитоп в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670 аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C.

143. Фармацевтическая композиция по п. 135, где антитело против CD22 содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

$X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата,  $X^1$  присутствует и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо представляет собой любую аминокислоту.

144. Фармацевтическая композиция по п. 143, где последовательность представляет собой L(FGly')TPSR.

145. Фармацевтическая композиция по п. 143, где

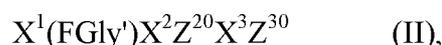
$Z^{30}$  выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

$X^1$  выбран из L, M, S и V и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

146. Фармацевтическая композиция по п. 135, где модифицированный аминокислотный остаток расположен на C-конце константной области тяжелой цепи антитела против CD22.

147. Фармацевтическая композиция по п. 146, где константная область тяжелой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,  $X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата,  $X^1$  присутствует, и  $X^2$  и  $X^3$  каждый независимо представляет собой любую аминокислоту и где последовательность является C-концевой по отношению к аминокислотной последовательности SLSLSPG (SEQ ID NO: 186).

148. Фармацевтическая композиция по п. 147, где константная область тяжелой цепи содержит последовательность SPGSL(FGly')TPSRGS (SEQ ID NO: 184).

149. Фармацевтическая композиция по п. 147, где

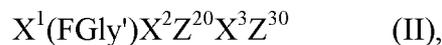
$Z^{30}$  выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

$X^1$  выбран из L, M, S и V и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

150. Фармацевтическая композиция по п. 135, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в константной области легкой цепи антитела против CD22.

151. Фармацевтическая композиция по п. 150, где константная область легкой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

$X_1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата,  $X_1$  присутствует, и

$X_2$  и  $X_3$  каждый независимо представляет собой любую аминокислоту и

где последовательность является C-концевой по отношению к аминокислотной последовательности KVDNAL (SEQ ID NO: 58) и/или является N-концевой по отношению к аминокислотной последовательности QSGNSQ (SEQ ID NO: 59).

152. Фармацевтическая композиция по п. 151, где константная область легкой цепи содержит последовательность KVDNAL(FGly')TPSRQSGNSQ (SEQ ID NO: 60).

153. Фармацевтическая композиция по п. 151, где

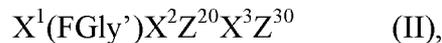
$Z^{30}$  выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

X<sub>1</sub> выбран из L, M, S и V и

X<sub>2</sub> и X<sub>3</sub> каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

154. Фармацевтическая композиция по п. 135, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH1 тяжелой цепи антитела против CD22.

155. Фармацевтическая композиция по п. 154, где область CH1 тяжелой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

Z<sup>20</sup> представляет собой остаток пролина или аланина,

Z<sup>30</sup> представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

X<sup>1</sup> может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата, X<sup>1</sup> присутствует, и

X<sup>2</sup> и X<sup>3</sup> каждый независимо представляет собой любую аминокислоту и

где последовательность является C-концевой по отношению к аминокислотной последовательности SWNSGA (SEQ ID NO: 61) и/или является N-концевой по отношению к аминокислотной последовательности GVHTFP (SEQ ID NO: 62).

156. Фармацевтическая композиция по п. 155, где область CH1 тяжелой цепи содержит последовательность SWNSGAL(FGly')TPSRGVHTFP (SEQ ID NO: 63).

157. Фармацевтическая композиция по п. 155, где

Z<sup>30</sup> выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

X<sup>1</sup> выбран из L, M, S и V и

X<sup>2</sup> и X<sup>3</sup> каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

158. Фармацевтическая композиция по п. 135, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH2 тяжелой цепи антитела против CD22.

159. Фармацевтическая композиция по п. 135, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH3 тяжелой цепи антитела против CD22.

160. Фармацевтическая композиция по п. 135, где один или более противораковых агентов выбраны из метотрексата абитрексата, брентуксимаба ведотина, копанлисиба, копанлисиба гидрохлорида, хлорамбуцила, неларабина, аксиабтагена цилолейцела, кармустина, белиноста, бендамустина, бендамустина гидрохлорида, тозитумомаба, тозитумомаба йод-131, блеомицина, бортезомиба, акалабрутиниба, циклофосамида, цитарабина, цитарабина липосомы, денилейкин дифтитокса, липосомного цитарабина,

дексаметазона, доксорубицина, доксорубицина гидрохлорида, метотрексата, пралатрексата, офатумамба, обинутузимаба, окрелизумаба, ибритумомаба, тиуксетана, ибрутиниба, идегалисиба, рекомбинантного интерферона альфа-2b, ромидеспина, леналидомида, мехлоретамин гидрохлорида, плериксафора, преднизона, ритуксимаба, ритуксимаба и гиалуронидазы человека, бортезомиба, винбластина, винбластина сульфата, винкристина, винкристина сульфата и вориноста.

161. Фармацевтическая композиция по п. 135, где один или более противораковых агентов выбраны из ингибитора тирозинкиназы Брутона, конъюгата антитела против CD30 с лекарственным средством, ингибитора PI3K, ДНК-алкилирующего агента, ингибитора синтеза ДНК, ингибитора гистондеацетилазы, моноклонального антитела против CD20, ингибитора протеасомы, ингибитора ДНК-полимеразы, ингибитора РНК-полимеразы, ингибитора интерлейкина-2, кортикостероида, ингибитора топоизомеразы II, ингибитора дигидрофолатредуктазы, конъюгата антитела против CD20 с лекарственным средством, конъюгата антитела против CD20 с радиофармацевтическим средством, ингибитора P110δ, ингибитора убиквитин-Е3-лигазы, ингибитора рецептора хемокина CXCR4, ингибитора тубулина и агента для терапии адоптивного переноса клеток.

162. Фармацевтическая композиция по п. 135, где один или более противораковых агентов выбраны из циклофосфида, доксорубицина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("CHOP"); циклофосфида, винкристина сульфата, прокарбазина гидрохлорида и преднизона ("COPP"); циклофосфида, винкристина сульфата и преднизона ("CVP"); этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфида и доксорубицина гидрохлорида ("EPOCH"); циклофосфида, винкристина сульфата, доксорубицина гидрохлорида и дексаметазона ("гипер-CVAD"); ифосфида, карбоплатина и этопозида фосфата ("ICE"); ритуксимаба, циклофосфида, доксорубицина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CHOP"); ритуксимаба, циклофосфида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CVP"); ритуксимаба, этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, ритуксимаба, этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфида и доксорубицина гидрохлорида ("R-EPOCH"); и ритуксимаба, ифосфида, карбоплатина и этопозида фосфата ("R-ICE").

163. Фармацевтическая композиция по п. 135, где один или более противораковых агентов включает ритуксимаб, циклофосфид, доксорубицина гидрохлорид, винкристина сульфат и преднизон ("R-CHOP").

164. Применение фармацевтической композиции для получения лекарственного средства для лечения рака, содержащей фармацевтическую композицию по любому из пп. 135-163.

165. Применение фармацевтической композиции для получения лекарственного средства для лечения резистентного рака, содержащей фармацевтическую композицию по любому из пп. 135-163.

166. Применение фармацевтической композиции для получения лекарственного средства для сенсibilизации рака, содержащей фармацевтическую композицию по любому из пп. 135-163.

167. Применение фармацевтической композиции для лечения рака, содержащей фармацевтическую композицию по любому из пп. 135-163.

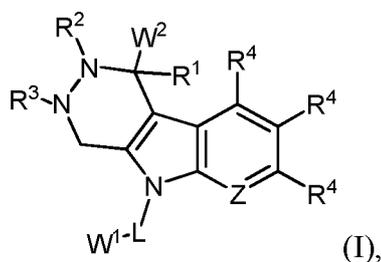
168. Применение фармацевтической композиции для лечения резистентного рака, содержащей фармацевтическую композицию по любому из пп. 135-163.

169. Применение фармацевтической композиции для сенсibilизации рака, содержащей фармацевтическую композицию по любому из пп. 135-163.

170. Способ лечения резистентного рака у субъекта, включающий:

введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества конъюгата, содержащего:

по меньшей мере один модифицированный аминокислотный остаток с боковой цепью формулы (I):



где

Z представляет собой CR<sup>4</sup> или N,

R<sup>1</sup> выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> каждый независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, amino, замещенного amino, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминоацила, алкиламида, замещенного алкиламида,

сульфонила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила, или  $R^2$  и  $R^3$  необязательно циклически связаны с образованием 5- или 6-членного гетероциклила,

каждый  $R^4$  независимо выбран из водорода, галогена, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амина, замещенного амина, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

L представляет собой линкер, содержащий  $-(T^1-V^1)_a-(T^2-V^2)_b-(T^3-V^3)_c-(T^4-V^4)_d-$ , где a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d составляет от 1 до 4,

$T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  каждый независимо выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила, (ЭДА)<sub>w</sub>, (ПЭГ)<sub>n</sub>, (АК)<sub>p</sub>,  $-(CR^{13}OH)_h-$ , пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, гидразина, дисульфида и сложного эфира, где ЭДА представляет собой этилендиаминовый фрагмент, ПЭГ представляет собой полиэтиленгликоль или модифицированный полиэтиленгликоль и АК представляет собой аминокислотный остаток, где w представляет собой целое число от 1 до 20, n представляет собой целое число от 1 до 30, p представляет собой целое число от 1 до 20 и h представляет собой целое число от 1 до 12,

$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  каждый независимо выбран из группы, состоящей из ковалентной связи,  $-CO-$ ,  $-NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}(CH_2)_q-$ ,  $-NR^{15}(C_6H_4)-$ ,  $-CONR^{15}-$ ,  $-NR^{15}CO-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO_2NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}SO_2-$  и  $-P(O)OH-$ , где q представляет собой целое число от 1 до 6,

каждый  $R^{13}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила,

каждый  $R^{15}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

$W^1$  представляет собой майтансиноид и

$W^2$  представляет собой антитело против CD22,

где введение эффективно для лечения резистентного рака у субъекта.

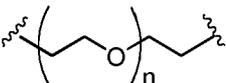
171. Способ по п. 170, где:

$T^1$  выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила и замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила,

$T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  каждый независимо выбран из  $(ЭДА)_w$ ,  $(ПЭГ)_n$ ,  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила,  $(АК)_p$ ,  $-(CR^{13}OH)_h-$ , пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, гидразина и сложного эфира и

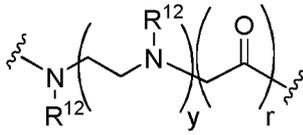
$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  каждый независимо выбран из группы, состоящей из ковалентной связи,  $-CO-$ ,  $-NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}(CH_2)_q-$ ,  $-NR^{15}(C_6H_4)-$ ,  $-CONR^{15}-$ ,  $-NR^{15}CO-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO_2NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}SO_2-$  и  $-P(O)OH-$ ,

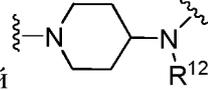
где:

$(ПЭГ)_n$  представляет собой , где  $n$  представляет собой целое число

от 1 до 30,

ЭДА представляет собой этилендиаминовый фрагмент, имеющий следующую

структуру: , где  $y$  представляет собой целое число от 1 до 6 и  $r$  равен 0 или 1,

пиперидин-4-амино представляет собой ,

каждый  $R^{12}$  и  $R^{15}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, полиэтиленгликолевого фрагмента, арила и замещенного арила, где любые две соседние группы  $R^{12}$  могут быть циклически связаны с образованием пиперазинильного кольца и  $R^{13}$  выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила.

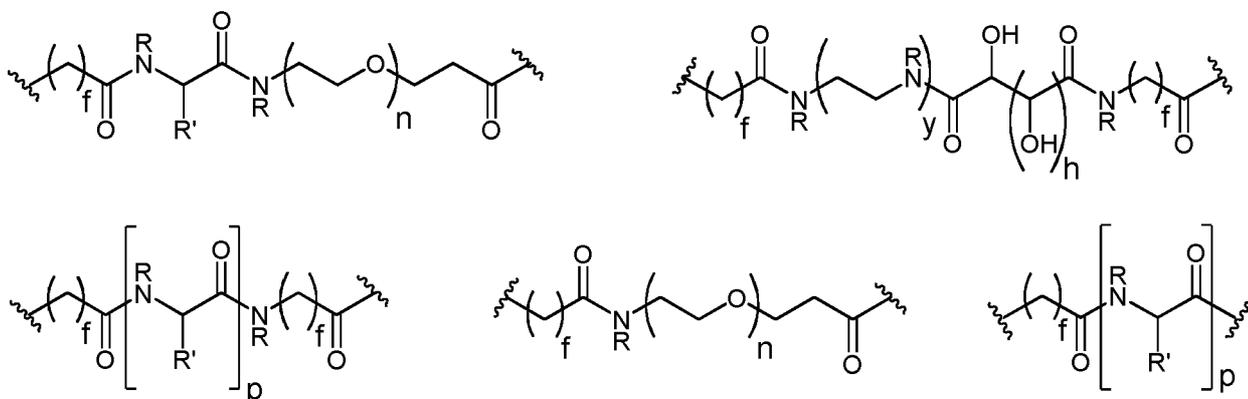
172. Способ по п. 170, где  $T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  и  $V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  выбраны из следующей таблицы:

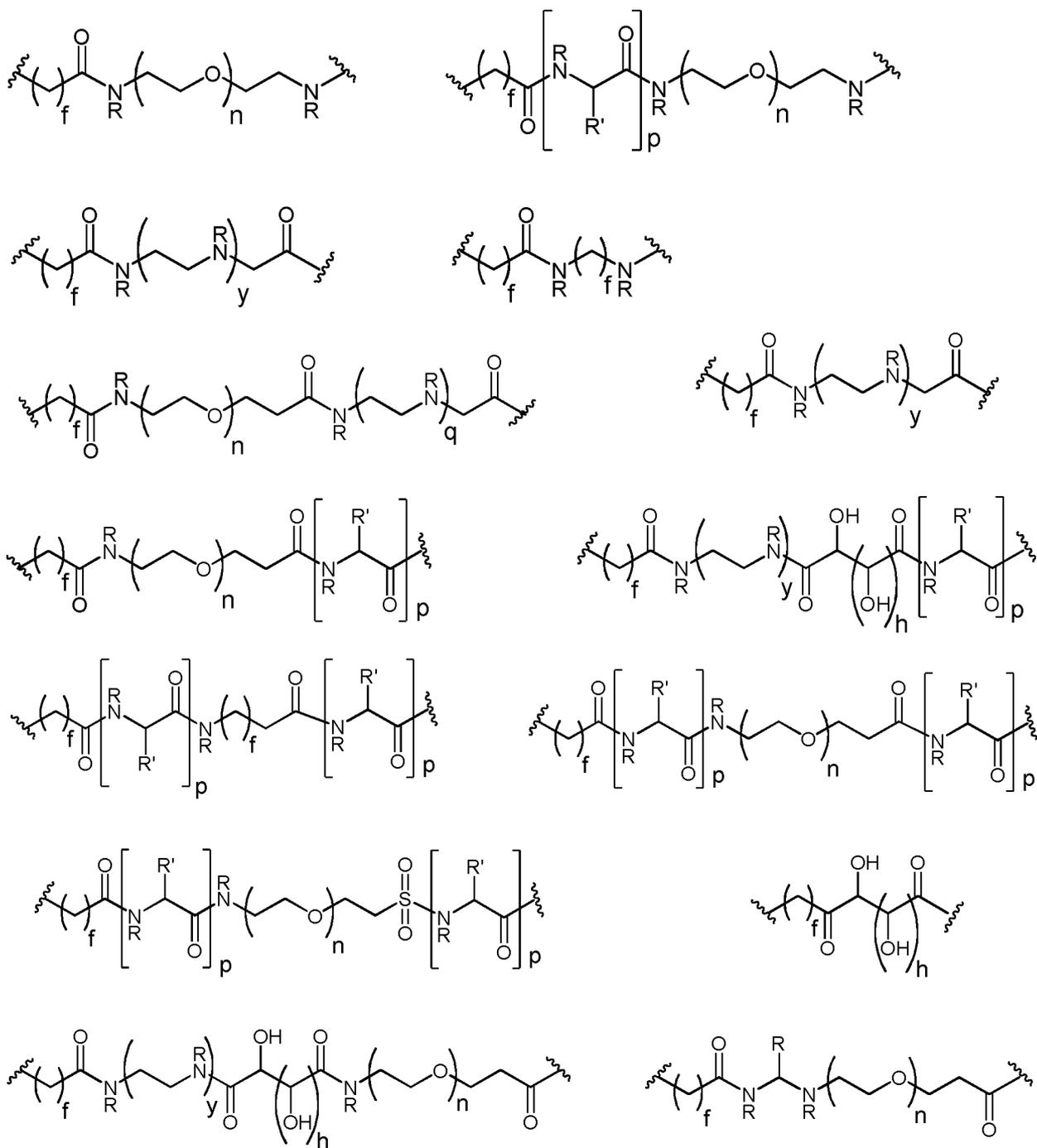
$T^1$	$V^1$	$T^2$	$V^2$	$T^3$	$V^3$	$T^4$	$V^4$
$(C_1-C_{12})$ алкил	- $CONR^{15}-$	$(ПЭГ)_n$	$-CO-$	-	-	-	-
$(C_1-C_{12})$ алкил	$-CO-$	$(АК)_p$	$-NR^{15}-$	$(ПЭГ)_n$	$-CO-$	-	-
$(C_1-C_{12})$ алкил	$-CO-$	$(АК)_p$	-	-	-	-	-
$(C_1-$	-	$(ПЭГ)_n$	$-NR^{15}-$	-	-	-	-

T <sup>1</sup>	V <sup>1</sup>	T <sup>2</sup>	V <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>	V <sup>4</sup>
C <sub>12</sub> )алкил	CONR <sup>15</sup> -						
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-NR <sup>15</sup> -	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-SO <sub>2</sub> -	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	замещенн ый (C <sub>1</sub> -	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	-	-

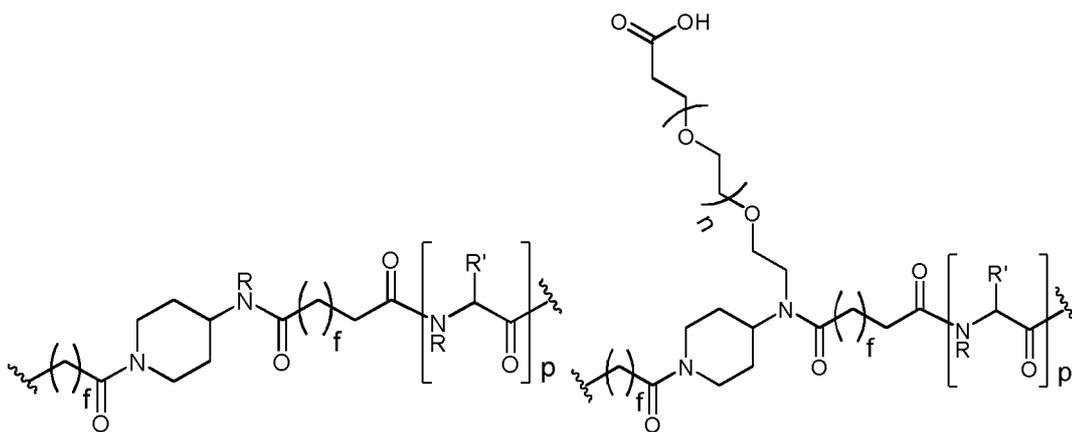
T <sup>1</sup>	V <sup>1</sup>	T <sup>2</sup>	V <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	V <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>	V <sup>4</sup>
		C <sub>12</sub> )алкил					
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-SO <sub>2</sub> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-	(CR <sup>13</sup> OH) <sub>h</sub>	- CONR <sup>15</sup> -	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	- NR <sup>15</sup> -
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-NR <sup>15</sup> -	(ПЭГ) <sub>n</sub>	- P(O)OH -	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(ЭДА) <sub>w</sub>	-	(AK) <sub>p</sub>	-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-CO-	-	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- CONR <sup>15</sup> -	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-NR <sup>15</sup> -	-	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	- NR <sup>15</sup> -
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	4АП	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	(AK) <sub>p</sub>	-
(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	4АП	-CO-	(C <sub>1</sub> - C <sub>12</sub> )алкил	-CO-	-	-

173. Способ по п. 170, где линкер L выбран из одной из следующих структур:







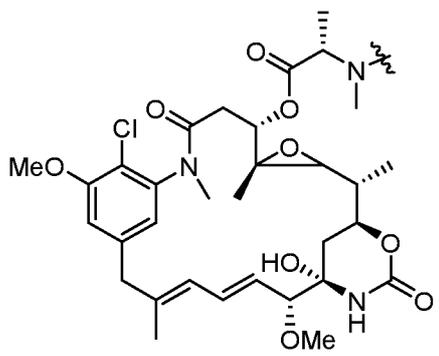


где

каждый  $f$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 12,  
 каждый  $u$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 20,  
 каждый  $n$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 30,  
 каждый  $p$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 20,  
 каждый  $h$  независимо равен 0 или представляет собой целое число от 1 до 12,  
 каждый  $R$  независимо представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкокси, замещенный алкокси, амино, замещенный амино, карбоксил, сложный эфир карбоновой кислоты, ацил, ацилокси, ациламино, аминоксил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил, тиоалкокси, замещенный тиоалкокси, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл и замещенный гетероцикл и

каждый  $R'$  независимо представляет собой H, группу боковой цепи аминокислоты, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкокси, замещенный алкокси, амино, замещенный амино, карбоксил, сложный эфир карбоновой кислоты, ацил, ацилокси, ациламино, аминоксил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил, тиоалкокси, замещенный тиоалкокси, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл и замещенный гетероцикл.

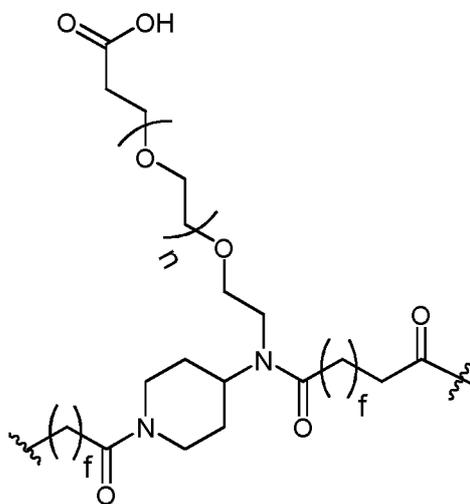
174. Способ по п. 170, где майтансиноид имеет формулу



где  $\sim$  обозначает точку присоединения между майтансиноидом и L.

175. Способ по п. 170, где  $T^1$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^1$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^2$  представляет собой 4АП,  $V^2$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^3$  представляет собой  $(C_1-C_{12})$ алкил,  $V^3$  представляет собой  $-CO-$ ,  $T^4$  отсутствует и  $V^4$  отсутствует.

176. Способ по п. 170, где линкер L содержит следующую структуру:



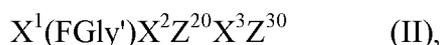
где

каждый  $f$  независимо представляет собой целое число от 1 до 12 и

$n$  представляет собой целое число от 1 до 30.

177. Способ по п. 170, где антитело против CD22 связывает эпитоп в пределах аминокислот с 1 по 847, в пределах аминокислот с 1 по 759, в пределах аминокислот с 1 по 751 или в пределах аминокислот с 1 по 670 аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C.

178. Способ по п. 170, где антитело против CD22 включает последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly<sup>1</sup> представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,  $X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата,  $X^1$  присутствует, и  $X^2$  и  $X^3$  каждый независимо представляет собой любую аминокислоту.

179. Способ по п. 178, где последовательность представляет собой L(FGly')TPSR (SEQ ID NO: 185).

180. Способ по п. 178, где

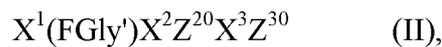
$Z^{30}$  выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

$X^1$  выбран из L, M, S и V и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

181. Способ по п. 170, где модифицированный аминокислотный остаток расположен на C-конце константной области тяжелой цепи антитела против CD22.

182. Способ по п. 181, где константная область тяжелой цепи включает последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

$Z^{20}$  представляет собой остаток пролина или аланина,

$Z^{30}$  представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

$X^1$  может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата,  $X^1$  присутствует, и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо представляет собой любую аминокислоту и

где последовательность является C-концевой по отношению к аминокислотной последовательности SLSLSPG (SEQ ID NO: 186).

183. Способ по п. 182, где константная область тяжелой цепи содержит последовательность SPGSL(FGly')TPSRGS (SEQ ID NO: 184).

184. Способ по п. 182, где

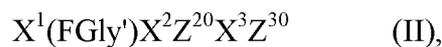
$Z^{30}$  выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

$X^1$  выбран из L, M, S и V и

$X^2$  и  $X^3$  каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

185. Способ по п. 170, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в константной области легкой цепи антитела против CD22.

186. Способ по п. 185, где константная область легкой цепи содержит последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

Z<sup>20</sup> представляет собой остаток пролина или аланина,

Z<sup>30</sup> представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

X<sup>1</sup> может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, когда присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата, X<sup>1</sup> присутствует, и

X<sup>2</sup> и X<sup>3</sup> каждый независимо представляет собой любую аминокислоту и

где последовательность является C-концевой по отношению к аминокислотной последовательности KVDNAL (SEQ ID NO: 58) и/или является N-концевой по отношению к аминокислотной последовательности QSGNSQ (SEQ ID NO: 59).

187. Способ по п. 186, где константная область легкой цепи содержит последовательность KVDNAL(FGly')TPSRQSGNSQ (SEQ ID NO: 60).

188. Способ по п. 186, где

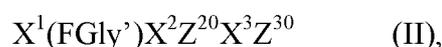
Z<sup>30</sup> выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

X<sup>1</sup> выбран из L, M, S и V и

X<sup>2</sup> и X<sup>3</sup> каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

189. Способ по п. 170, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH1 тяжелой цепи антитела против CD22.

190. Способ по п. 189, где область CH1 тяжелой цепи включает последовательность формулы (II) (SEQ ID NO: 189-190):



где

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I),

Z<sup>20</sup> представляет собой остаток пролина или аланина,

Z<sup>30</sup> представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту,

X<sup>1</sup> может присутствовать (SEQ ID NO: 189) или отсутствовать (SEQ ID NO: 190) и, если присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что когда последовательность находится на N-конце конъюгата, X<sup>1</sup> присутствует, и

X<sup>2</sup> и X<sup>3</sup> каждый независимо представляет собой любую аминокислоту и

где последовательность является С-концевой по отношению к аминокислотной последовательности SWNSGA (SEQ ID NO: 61) и/или является N-концевой по отношению к аминокислотной последовательности GVHTFP (SEQ ID NO: 62).

191. Способ по п. 190, где область CH1 тяжелой цепи включает последовательность SWNSGAL(FGly')TPSRGVHTFP (SEQ ID NO: 63).

192. Способ по п. 190, где

Z<sup>30</sup> выбран из R, K, H, A, G, L, V, I и P,

X<sup>1</sup> выбран из L, M, S и V и

X<sup>2</sup> и X<sup>3</sup> каждый независимо выбран из S, T, A, V, G и C.

193. Способ по п. 170, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH2 тяжелой цепи антитела против CD22.

194. Способ по п. 170, где модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH3 тяжелой цепи антитела против CD22.

195. Способ по п. 170, где резистентный рак связан с нарушением регуляции сигналинга BCR.

196. Способ по п. 170, где резистентный рак связан с нарушением регуляции сигналинга BCR и рак реагирует на истощение популяции В-клеток.

197. Способ по п. 170, где резистентный рак представляет собой лимфому.

198. Способ по п. 170, где резистентный рак представляет собой В-клеточную лимфому.

199. Способ по п. 170, где резистентный рак выбран из лимфомы Беркитта, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы.

200. Способ по п. 170, где резистентный рак представляет собой неходжкинскую лимфому.

201. Способ по п. 170, где резистентный рак выбран из лимфомы из клеток маргинальной зоны, мантийноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы и первичной лимфомы центральной нервной системы.

202. Способ по п. 170, где резистентный рак представляет собой мантийноклеточную лимфому.

203. Способ по п. 170, где резистентный рак представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому.

204. Способ по п. 170, где резистентный рак представляет собой фолликулярную лимфому.

205. Способ по п. 170, где резистентный рак представляет собой лимфому из клеток краевой зоны.

206. Способ по п. 170, где резистентный рак представляет собой лейкоз.

207. Способ по п. 170, где резистентный рак выбран из хронического миелопролиферативного синдрома, острого миелогенного лейкоза, хронического лимфолейкоза, мелкоклеточного лимфолейкоза, волосато-клеточного лейкоза и острого лимфобластного лейкоза.

208. Способ по любому из 170, где рак устойчив к лечению с одним или более противораковыми агентами, выбранными из метотрексата абитрексата, брентуксимаба ведотина, копанлисиба, копанлисиба гидрохлорида, хлорамбуцила, неларабина, аксиабтагена цилолейцела, кармустина, белинонат, бендамустина, бендамустина гидрохлорида, тозитумомаба, тозитумомаба йод-131, блеомицина, бортезомиба, акалабрутиниба, циклофосфамида, цитарабина, липосомного цитарабина, денилейкин-дифтитокса, липосомного цитарабина, дексаметазона, доксорубицина, доксорубицина гидрохлорида, метотрексата, пралатрексата, офатумамба, обинутузумаба, окрелизумаба, ибритумомаба, тиуксетана, ибрутиниба, идеалалисиба, рекомбинантного интерферона альфа-2b, ромидеспсина, леналидомида, мехлоретамин гидрохлорида, плериксафора, преднизона, ритуксимаба, ритуксимаба и гиалуронидазы человека, бортезомиба, винбластин, винбластин сульфата, винкристина, винкристина сульфата и вориноста.

209. Способ по п. 170, где рак устойчив к лечению одним или более противораковыми агентами, выбранными из: циклофосфамида, доксорубицина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("CHOP"); циклофосфамида, винкристина сульфата, прокарбазина гидрохлорида и преднизона ("COPP"); циклофосфамида, винкристина сульфата и преднизона ("CVP"); этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфамида и доксорубицина гидрохлорида ("EPOCH"); циклофосфамида, винкристина сульфата, доксорубицина гидрохлорида и дексаметазона ("гипер-CVAD"); ифосфамида, карбоплатина и этопозида фосфата ("ICE"); ритуксимаба, циклофосфамида, доксорубицина гидрохлорида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CHOP"); ритуксимаба, циклофосфамида, винкристина сульфата и преднизона ("R-CVP"); ритуксимаба, этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, ритуксимаба, этопозида фосфата, преднизона, винкристина сульфата, циклофосфамида и доксорубицина гидрохлорида ("R-EPOCH"); и ритуксимаба, ифосфамида, карбоплатина и этопозида фосфата ("R-ICE").

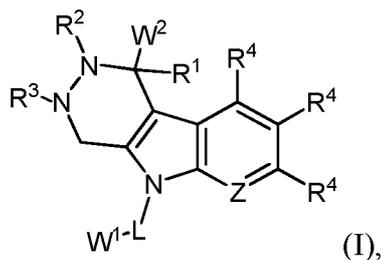
210. Способ по п. 170, где рак устойчив к лечению ритуксимабом, циклофосфамидом, доксорубицина гидрохлоридом, винкристина сульфатом и преднизолоном ("R-СНОР").

211. Применение композиции, содержащей:

один или более противораковых агентов и

конъюгат, содержащий:

по меньшей мере один модифицированный аминокислотный остаток с боковой цепью формулы (I):



где

Z представляет собой CR<sup>4</sup> или N,

R<sup>1</sup> выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> каждый независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, amino, замещенного amino, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила, или R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> необязательно циклически связаны с образованием 5- или 6-членного гетероциклила,

каждый R<sup>4</sup> независимо выбран из водорода, галогена, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, amino, замещенного amino, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкокси, замещенного тиоалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

L представляет собой линкер, содержащий  $-(T^1-V^1)_a-(T^2-V^2)_b-(T^3-V^3)_c-(T^4-V^4)_d$ , где a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d составляет от 1 до 4,

$T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  каждый независимо выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила,  $(\text{ЭДА})_w$ ,  $(\text{ПЭГ})_n$ ,  $(\text{АК})_p$ ,  $-(\text{CR}^{13}\text{OH})_h$ -, пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, гидразина, дисульфида и сложного эфира, где ЭДА представляет собой этилендиаминовый фрагмент, ПЭГ представляет собой полиэтиленгликоль или модифицированный полиэтиленгликоль и АК представляет собой аминокислотный остаток, где w представляет собой целое число от 1 до 20, n представляет собой целое число от 1 до 30, p представляет собой целое число от 1 до 20 и h представляет собой целое число от 1 до 12,

$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  каждый независимо выбран из группы, состоящей из ковалентной связи,  $-\text{CO}-$ ,  $-\text{NR}^{15}-$ ,  $-\text{NR}^{15}(\text{CH}_2)_q-$ ,  $-\text{NR}^{15}(\text{C}_6\text{H}_4)-$ ,  $-\text{CONR}^{15}-$ ,  $-\text{NR}^{15}\text{CO}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{S}(\text{O})-$ ,  $-\text{SO}_2-$ ,  $-\text{SO}_2\text{NR}^{15}-$ ,  $-\text{NR}^{15}\text{SO}_2-$  и  $-\text{P}(\text{O})\text{OH}-$ , где q представляет собой целое число от 1 до 6,

каждый  $R^{13}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила,

каждый  $R^{15}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

$W^1$  представляет собой майтансиноид и

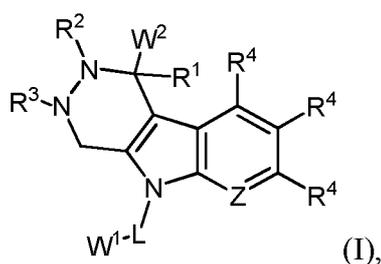
$W^2$  представляет собой антитело против CD22,

для получения лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом.

212. Применение композиции, содержащей:

один или более противораковых агентов и конъюгат, содержащий:

по меньшей мере один модифицированный аминокислотный остаток с боковой цепью формулы (I):



где

Z представляет собой  $CR^4$  или N,

$R^1$  выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

$R^2$  и  $R^3$  каждый независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амина, замещенного амина, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминацила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиаалкокси, замещенного тиаалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила, или  $R^2$  и  $R^3$  необязательно циклически связаны с образованием 5- или 6-членного гетероциклила,

каждый  $R^4$  независимо выбран из водорода, галогена, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкокси, замещенного алкокси, амина, замещенного амина, карбоксила, сложного эфира карбоновой кислоты, ацила, ацилокси, ациламино, аминацила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиаалкокси, замещенного тиаалкокси, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

L представляет собой линкер, содержащий  $-(T^1-V^1)_a-(T^2-V^2)_b-(T^3-V^3)_c-(T^4-V^4)_d-$ , где a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d составляет от 1 до 4,

$T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  и  $T^4$  каждый независимо выбран из  $(C_1-C_{12})$ алкила, замещенного  $(C_1-C_{12})$ алкила, (ЭДА)<sub>w</sub>, (ПЭГ)<sub>n</sub>, (АК)<sub>p</sub>,  $-(CR^{13}OH)_h-$ , пиперидин-4-амино (4АП), ацетальной группы, гидразина, дисульфида и сложного эфира, где ЭДА представляет собой этилендиаминовый фрагмент, ПЭГ представляет собой полиэтиленгликоль или модифицированный полиэтиленгликоль и АК представляет собой аминокислотный остаток, где w представляет собой целое число от 1 до 20, n представляет собой целое число от 1 до 30, p представляет собой целое число от 1 до 20 и h представляет собой целое число от 1 до 12,

$V^1$ ,  $V^2$ ,  $V^3$  и  $V^4$  каждый независимо выбран из группы, состоящей из ковалентной связи,  $-CO-$ ,  $-NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}(CH_2)_q-$ ,  $-NR^{15}(C_6H_4)-$ ,  $-CONR^{15}-$ ,  $-NR^{15}CO-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-OC(O)-$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO_2NR^{15}-$ ,  $-NR^{15}SO_2-$  и  $-P(O)OH-$ , где q представляет собой целое число от 1 до 6,

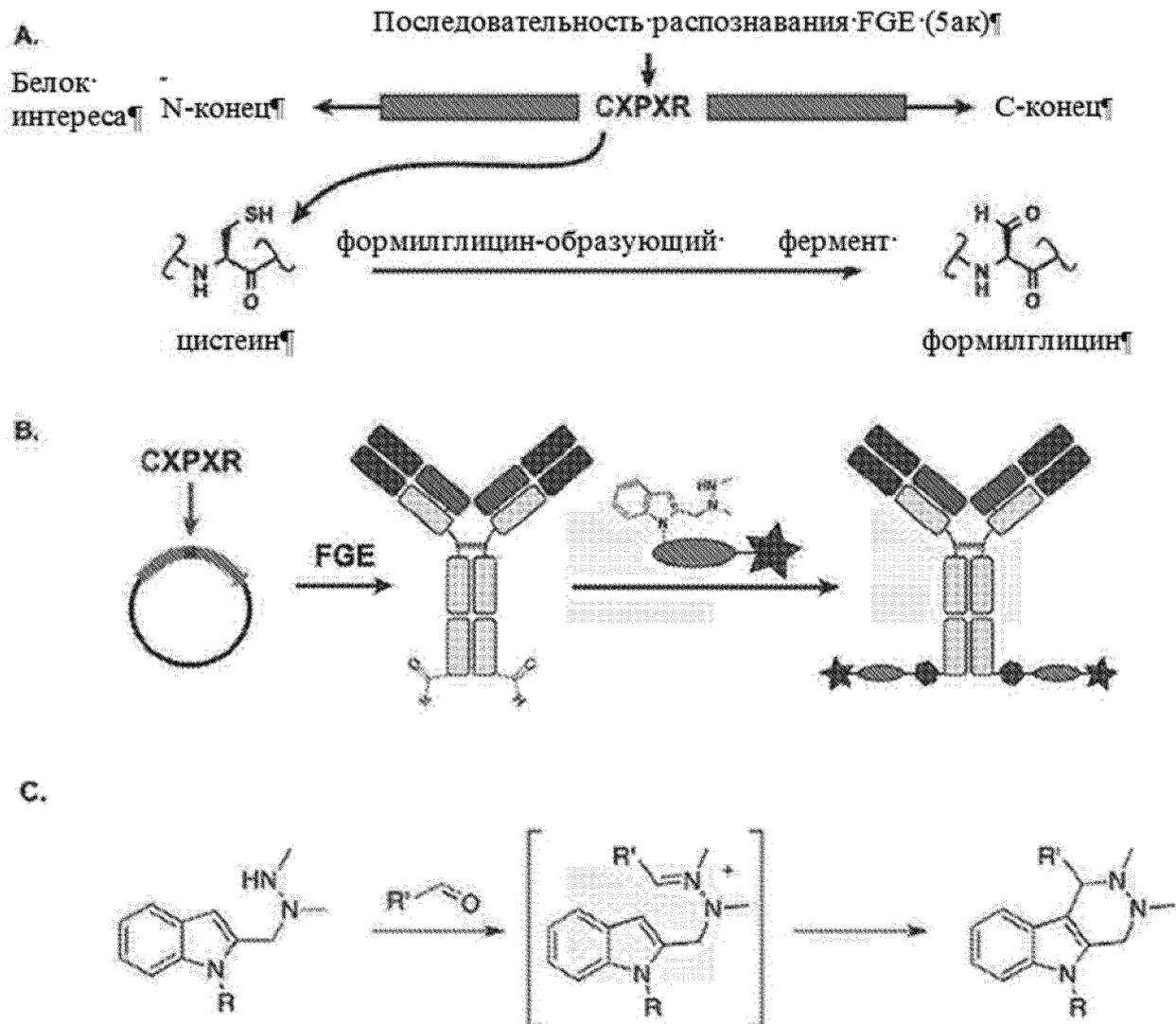
каждый  $R^{13}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила,

каждый  $R^{15}$  независимо выбран из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, карбоксила, эфира карбоновой кислоты, ацила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила,

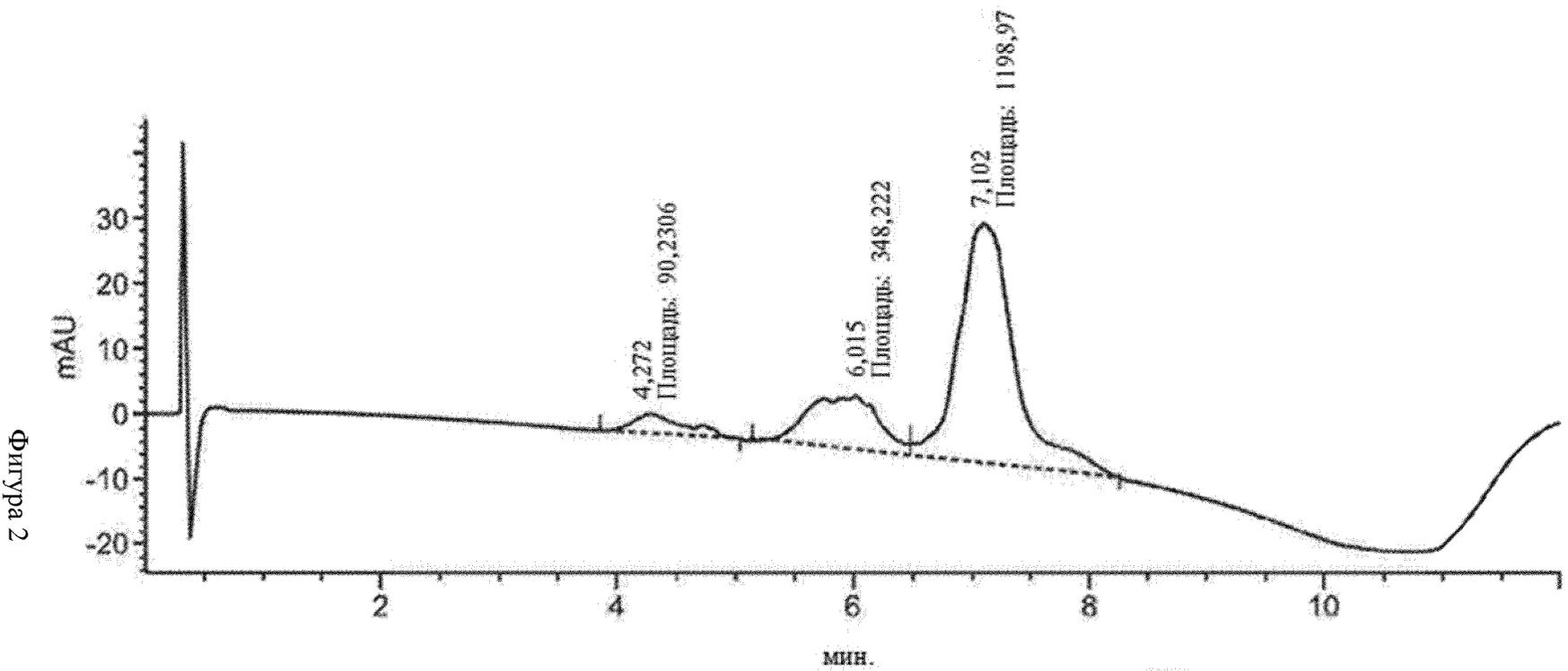
$W^1$  представляет собой майтансиноид и

$W^2$  представляет собой антитело против CD22,

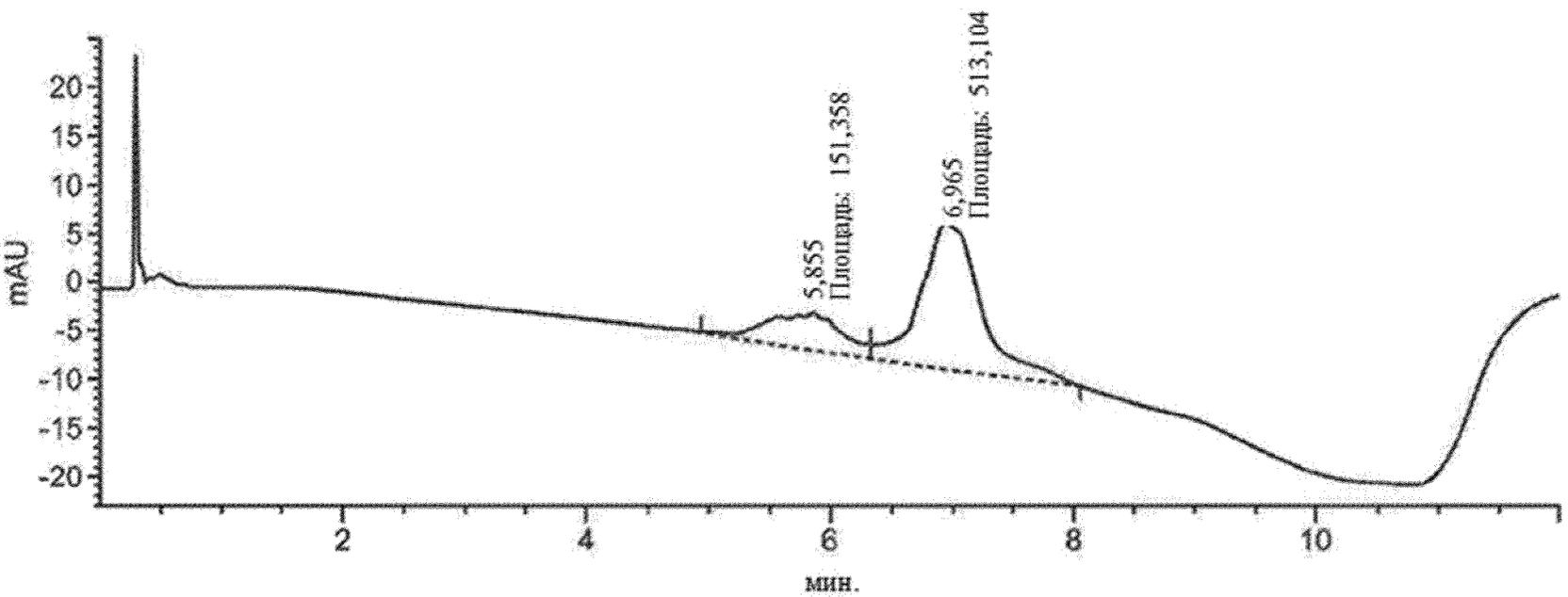
для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом.



Фигура 1

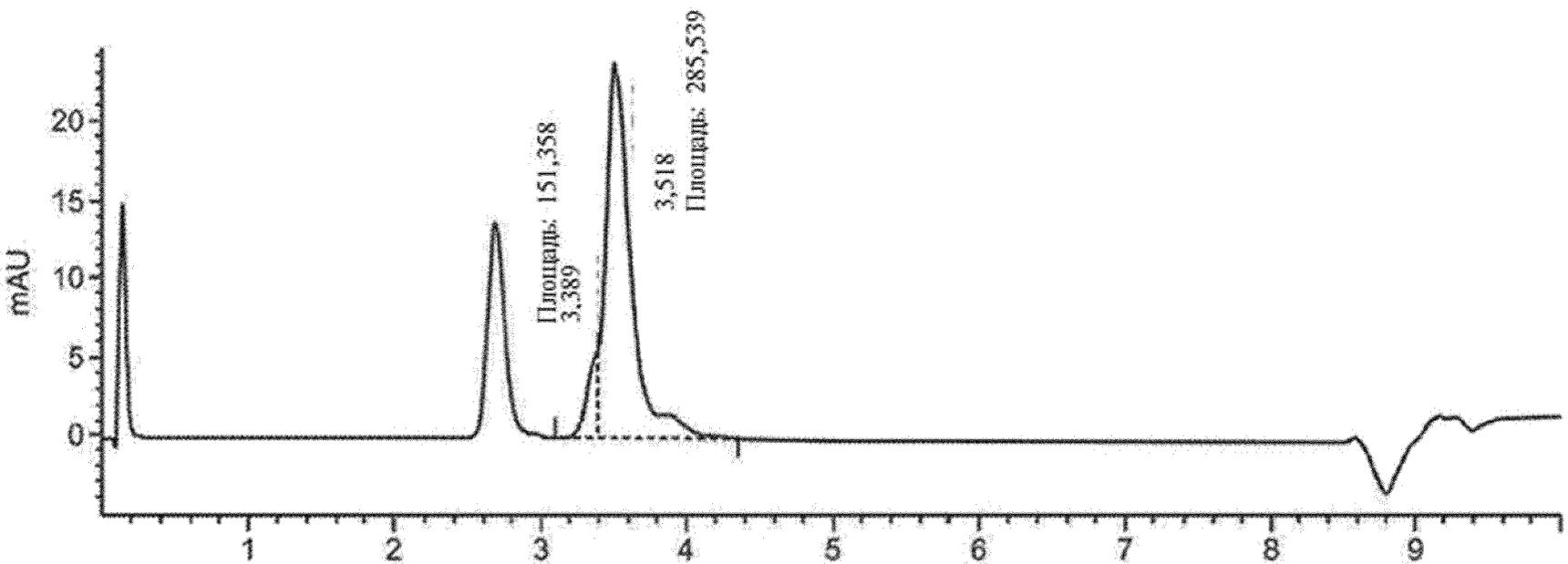


#	Время	Площадь	Высота	Ширина	Площадь%	Симметрия
1	4.272	90.2	2.8	0.5446	5.511	0.46
2	6.015	348.2	8.3	0.7005	21.267	1.757
3	7.102	1199	36.5	0.548	73.223	0.809



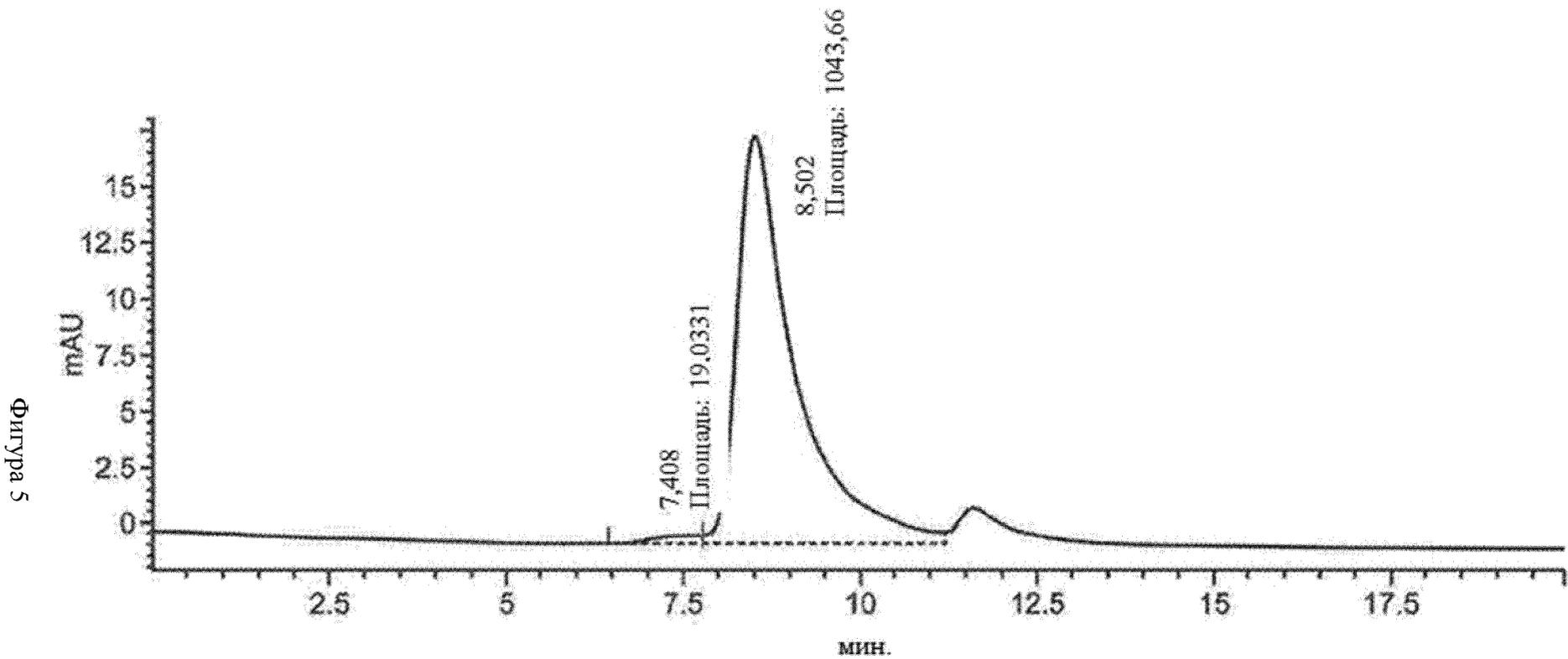
Фигура 3

#	Время	Площадь	Высота	Ширина	Площадь%	Симметрия
1	5.855	151.4	3.6	0.7039	22.779	1.421
2	6.965	513.1	14.7	0.5819	77.221	0.65



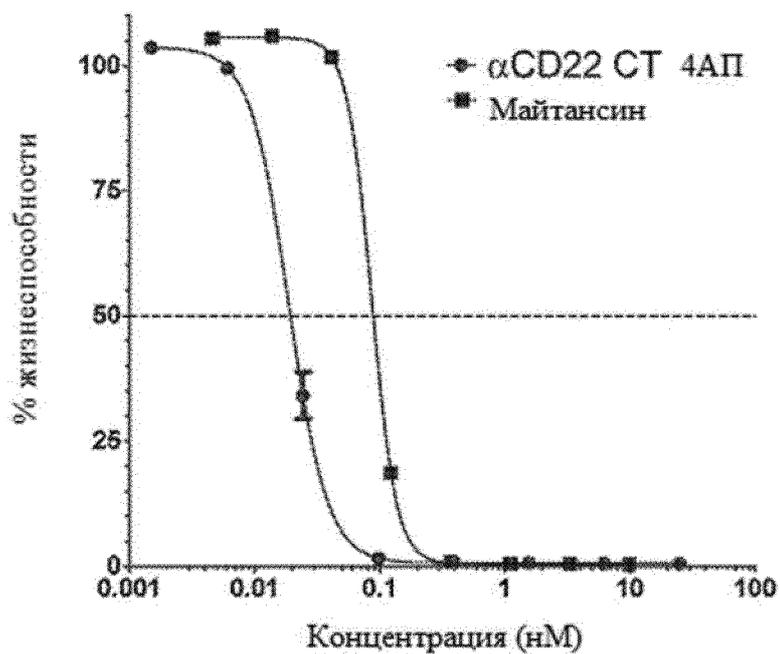
#	Время	Площадь	Высота	Ширина	Площадь%	Симметрия
1	3.389	30.5	5.6	0.0913	9.281	1729.18
2	3.516	298.5	23.7	0.2102	90.719	0.54

Фигура 4

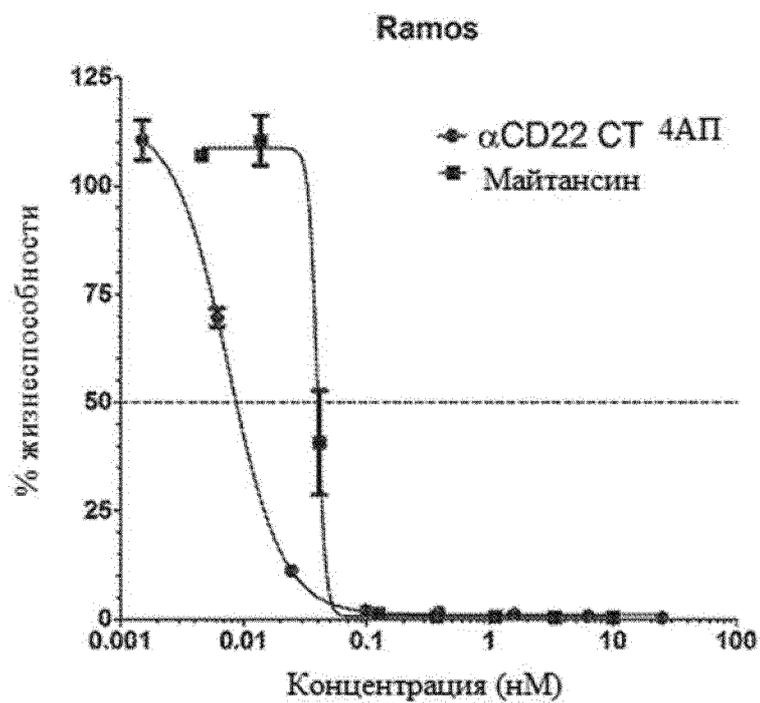


#	Время	Площадь	Высота	Ширина	Площадь%	Симметрия
1	7.408	19	4E-1	0.7939	1.791	1.355
2	8.502	1043.7	18	0.9658	98.209	0.423

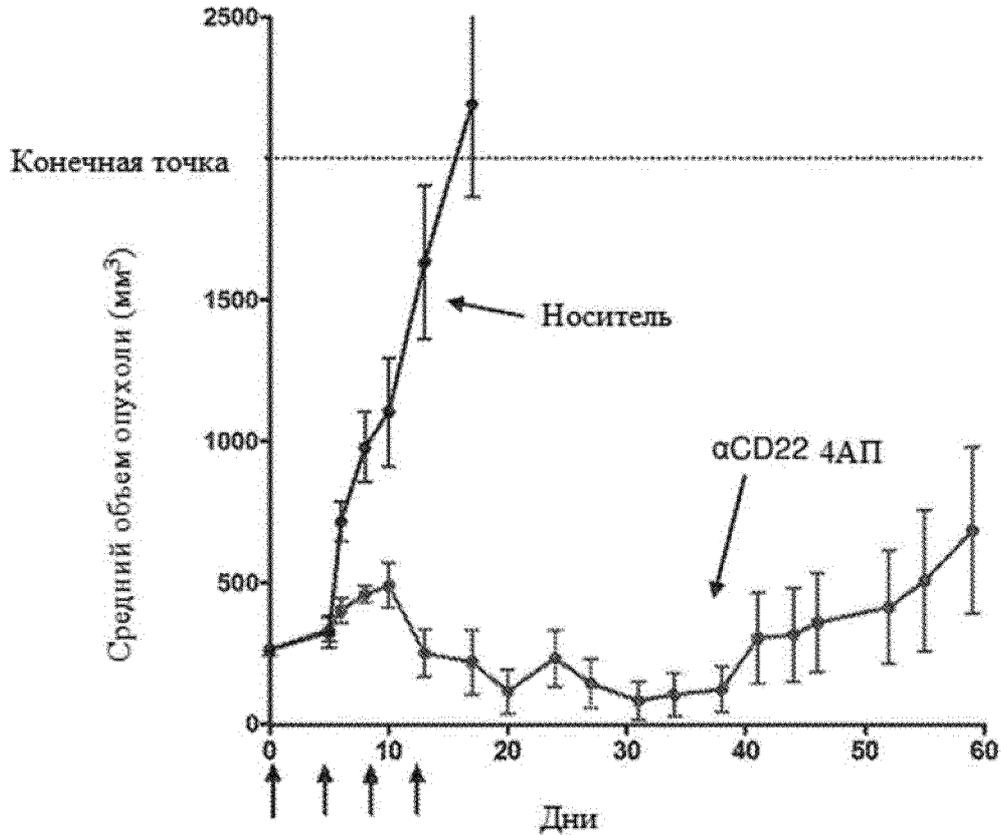
КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛА  
К CD22 И МАЙТАНСИНА,  
ИХ КОМБИНАЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ  
Клетки WSU



Фигура 6А



Фигура 6В



Фигура 7

изоформа 2	MHLLGFWLLLLLVLEYLAFSDSSKQVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFH	60
изоформа 4	MHLLGFWLLLLLVLEYLAFSDSSKQVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFH	60
изоформа 1	MHLLGFWLLLLLVLEYLAFSDSSKQVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFH	60
изоформа 3	MHLLGFWLLLLLVLEYLAFSDSSKQVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFH	60
*****		
изоформа 2	NPEYKNKTSKFDGTRLYESTKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCTLSIHPVHLNDSGQLGLR	120
изоформа 4	NPEYKNKTSKFDGTRLYESTKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCTLSIHPVHLNDSGQLGLR	120
изоформа 1	NPEYKNKTSKFDGTRLYESTKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCTLSIHPVHLNDSGQLGLR	120
изоформа 3	NPEYKNKTSKFDGTRLYESTKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCTLSIHPVHLNDSGQLGLR	120
*****		
изоформа 2	MESKTEKWMERIHNLVSRPFPFPHIQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSYGYPIQLQWLLEG	180
изоформа 4	MESKTEKWMERIHNLVSRPFPFPHIQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSYGYPIQLQWLLEG	180
изоформа 1	MESKTEKWMERIHNLVSRPFPFPHIQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSYGYPIQLQWLLEG	180
изоформа 3	MESKTEKWMERIHNLVSRPFPFPHIQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSYGYPIQLQWLLEG	180
*****		
изоформа 2	VPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFSQWSHHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKH	240
изоформа 4	VPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFSQWSHHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKH	240
изоформа 1	VPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFSQWSHHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKH	240
изоформа 3	VPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFSQWSHHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKH	240
*****		
изоформа 2	TPKLEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNLRVET	300
изоформа 4	TPKLEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNLRVET	300
изоформа 1	TPKLEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNLRVET	300
изоформа 3	TPKLEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNLRVET	300
-----		
изоформа 2	KDQSGKYCCQVSNVDVGPGRSEEVFLQVQ-----	328
изоформа 4	KDQSGKYCCQVSNVDVGPGRSEEVFLQVQYAPPEPSTVQILHSPAVEGSQVEFLCMSLANPL	360
изоформа 1	KDQSGKYCCQVSNVDVGPGRSEEVFLQVQYAPPEPSTVQILHSPAVEGSQVEFLCMSLANPL	360
изоформа 3	KDQSGKYCCQVSNVDVGPGRSEEVFLQVQYAPPEPSTVQILHSPAVEGSQVEFLCMSLANPL	360

Фигура 8A

ИХ КОМБИНАЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

изоформа 2	-----YPPK	332
изоформа 4	-----PPK	243
изоформа 1	PTNYTWYHNGKEMQGRTEEKVNI PKILPWHAGTYSVAENILGTGQRGPGAELDVQYPPK	420
изоформа 3	PTNYTWYHNGKEMQGRTEEKVNI PKILPWHAGTYSVAENILGTGQRGPGAELDVQYPPK	420
	***	
изоформа 2	KVTTVIQNPMPIREGDTVTLSCNYNSSNPSVTRYEWKPHGAWEEP SLGVLKIQNVGWDNT	392
изоформа 4	KVTTVIQNPMPIREGDTVTLSCNYNSSNPSVTRYEWKPHGAWEEP SLGVLKIQNVGWDNT	303
изоформа 1	KVTTVIQNPMPIREGDTVTLSCNYNSSNPSVTRYEWKPHGAWEEP SLGVLKIQNVGWDNT	480
изоформа 3	KVTTVIQNPMPIREGDTVTLSCNYNSSNPSVTRYEWKPHGAWEEP SLGVLKIQNVGWDNT	480
	*****	
изоформа 2	TIACAACNSWCSWAS PVALNVQYAPRDVVRVKIKPLSEIHSNGNSVSLQCDFSSSHPKVEQ	452
изоформа 4	TIACAACNSWCSWAS PVALNVQYAPRDVVRVKIKPLSEIHSNGNSVSLQCDFSSSHPKVEQ	363
изоформа 1	TIACAACNSWCSWAS PVALNVQYAPRDVVRVKIKPLSEIHSNGNSVSLQCDFSSSHPKVEQ	540
изоформа 3	TIACAACNSWCSWAS PVALNVQYAPRDVVRVKIKPLSEIHSNGNSVSLQCDFSSSHPKVEQ	540
	*****	
изоформа 2	FFWEKNGRLLGKESQLNFDSIS PEDAGSYSWCWVNSIGQTASKAWTLEVLYAPRRLRVSM	512
изоформа 4	FFWEKNGRLLGKESQLNFDSIS PEDAGSYSWCWVNSIGQTASKAWTLEVLYAPRRLRVSM	423
изоформа 1	FFWEKNGRLLGKESQLNFDSIS PEDAGSYSWCWVNSIGQTASKAWTLEVLYAPRRLRVSM	600
изоформа 3	FFWEKNGRLLGKESQLNFDSIS PEDAGSYSWCWVNSIGQTASKAWTLEVLYAPRRLRVSM	600
	*****	
изоформа 2	SPGDQVMGKSATLTCESDANP PVSHYTWFDWNNQSLPYHSQKLRLEPVKVQHS GAYWCQ	572
изоформа 4	SPGDQVMGKSATLTCESDANP PVSHYTWFDWNNQSLPYHSQKLRLEPVKVQHS GAYWCQ	483
изоформа 1	SPGDQVMGKSATLTCESDANP PVSHYTWFDWNNQSLPYHSQKLRLEPVKVQHS GAYWCQ	660
изоформа 3	SPGDQVMGKSATLTCESDANP PVSHYTWFDWNNQSLPYHSQKLRLEPVKVQHS GAYWCQ	660
	*****	
изоформа 2	GTNSVGKGRSPLSTLTVVYSPETIGRRVAVGLGSLAILILAI CGLKLRRWKRTQSQQG	632
изоформа 4	GTNSVGKGRSPLSTLTVVYSPETIGRRVAVGLGSLAILILAI CGLKLRRWKRTQSQQG	543
изоформа 1	GTNSVGKGRSPLSTLTVVYSPETIGRRVAVGLGSLAILILAI CGLKLRRWKRTQSQQG	720
изоформа 3	GTNSVGKGRSPLSTLTVVYSPETIGRRVAVGLGSLAILILAI CGLKLRRWKRTQSQQG	720
	*****	

Фигура 8B

изоформа 2	LQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGP HSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPENI PRTGDAES	692
изоформа 4	LQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGP HSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPENI PRTGDAES	603
изоформа 1	LQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGP HSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPENI PRTGDAES	780
изоформа 3	LQENSSGQSFFVRNKKRCRVLR-----DAET	746
	***** * , ***;	
изоформа 2	SEMQRPPDCDDTVTYSALHNRQVGDYENVI PDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENV	752
изоформа 4	SEMQRPPDCDDTVTYSALHNRQVGDYENVI PDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENV	663
изоформа 1	SEMQRPPDCDDTVTYSALHNRQVGDYENVI PDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENV	840
изоформа 3	SPGLR-----	751
	* *	
изоформа 2	DYVILKH	759
изоформа 4	DYVILKH	670
изоформа 1	DYVILK-	846
изоформа 3	-----	

- Изоформа 2 = SEQ ID NO: 1
- Изоформа 4 = SEQ ID NO: 2
- Изоформа 1 = SEQ ID NO: 3
- Изоформа 3 = SEQ ID NO: 4

Фигура 8C

## ИХ КОМБИНАЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Консервативная область легкой цепи:

SEQ ID NO: 5

140 150 160 170 180 189  
~~STV~~ARSVPI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFY~~PS~~AKVQ WKV~~NS~~DRG NSQESV~~TR~~  
 200 210 220 230 236  
~~ST~~SYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT ~~Q~~HS~~SP~~VTK GFN~~PS~~

Консервативная область тяжелой цепи:

SEQ ID NO: 6

130 140 150 160 170 180  
~~AS~~K~~PS~~SVFP LAPSS~~ST~~ST~~ST~~DTAALGCLVK DYF~~PS~~TVTS W~~NS~~DL~~TR~~TV HTTFAVIL~~SS~~  
 190 200 210 220 230 240  
~~ST~~YSLSSVVT VPSSSLGT~~ST~~ MICNVNHKPS NTKVDK~~VE~~ ~~NS~~DK~~TR~~TC~~PS~~ DPAPAEIL~~SS~~  
 250 260 270 280 290 300  
 PSVFLFPKP KDTLM~~ST~~ST~~ST~~ EVTCVVVDV~~ST~~ ~~NS~~DK~~TR~~KFNW YV~~PS~~VEV~~TR~~NS KTKFREE~~ST~~  
 310 320 330 340 350 360  
~~ST~~YRVVSVLT VLRQDWLNGK EYKCKV~~ST~~ST~~ST~~ ~~NS~~DK~~TR~~IEKTIS ~~NS~~DK~~TR~~REPO VYTLPPSREE  
 370 380 390 400 410 420  
 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWES~~ST~~ST~~ST~~ ENNYK~~TR~~TR~~TR~~ ~~NS~~DK~~TR~~FFLY SKLTVDKSRW  
 430 440 450  
 OQGNVFSCSV MHEALMNHYT QKSL~~ST~~ST~~ST~~

Фигура 9А



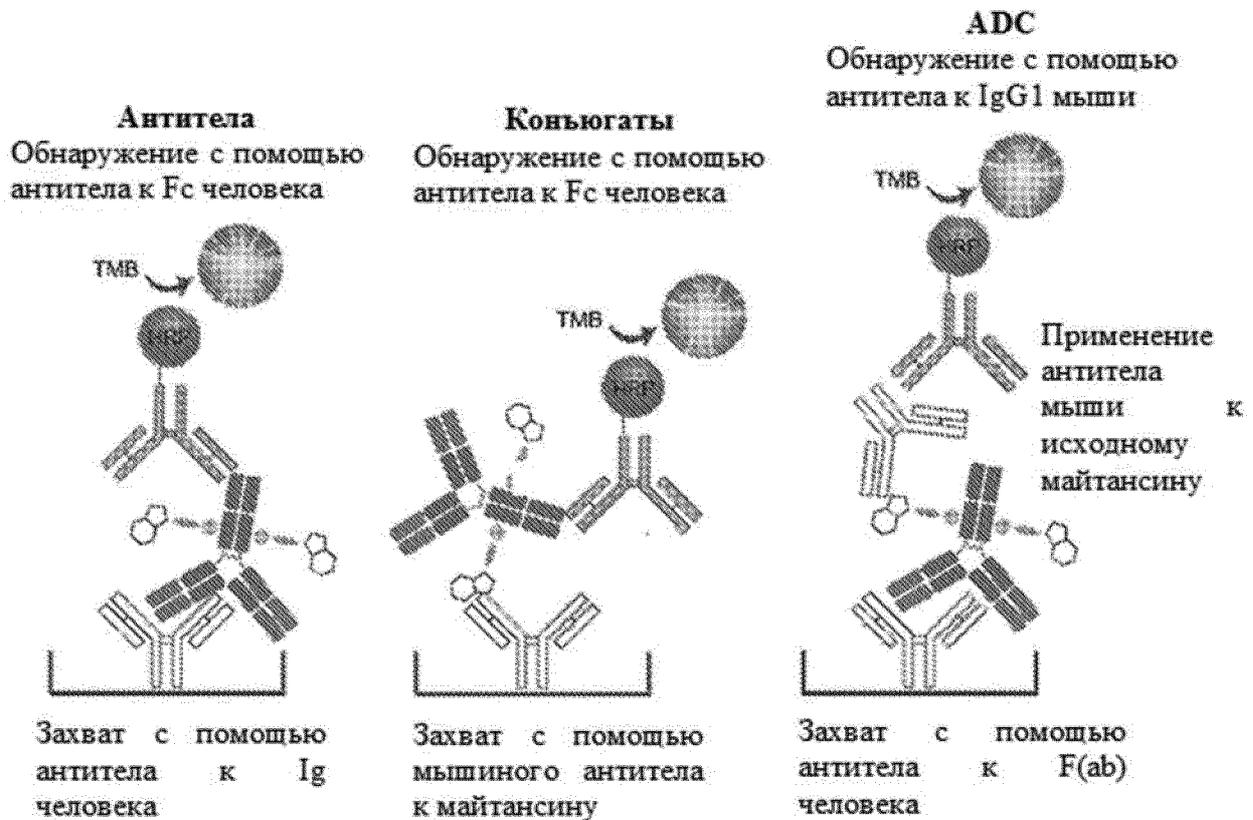
- Seq1 = Константная область легкой цепи каппа человека разумного, GenBank CAA75031,1
- Seq2 = Константная область легкой цепи каппа человека разумного, GenBank BAC0168,1
- Seq3 = Константная область легкой цепи лямбда человека разумного, GenBank CAA75033
- Seq4 = Константная область легкой цепи мыши домового, GenBank AAB09710,1
- Seq5 = Константная область легкой цепи крысы серой, GenBank AAD10133

```
seq1      RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD 189
seq2      RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
seq4      RADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQD
seq5      RADAAPT VSI FPPSMEQLTSGGATVVCVFNNTFYPRDLSVTKWKIDGSEQRDGLVDSVTDQD
seq3      QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQ
          .. **:* :**** ** :. *::**:::*** . * ** *.: . : ..:
```

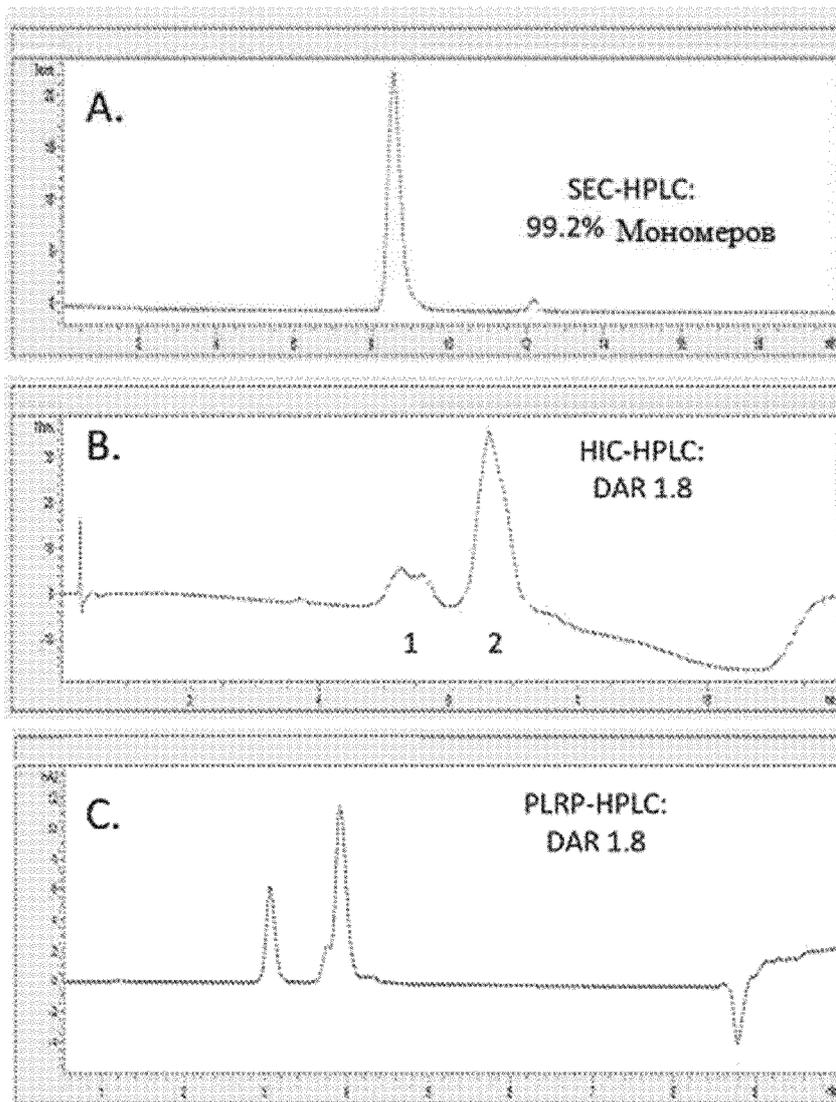
```
seq1      SKDSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC 236
seq2      SKDSTYLSLSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
seq4      SKDSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRGEC
seq5      SKDSTYSMSSTLSLTKEVEYERHNLTYCEVVKHTSSSPVVKSFNRNEC
seq3      S-NNKYAASSYLSLTPEQWKS HKSYSQCQVTHEG--STVEKTVAPTECS
          * ..*:* ** **:: ::: *:*:***:..* :. : *.: **
```

- seq1 = SEQ ID NO: 12
- seq2 = SEQ ID NO: 13
- seq3 = SEQ ID NO: 14
- seq4 = SEQ ID NO: 15
- seq5 = SEQ ID NO: 16

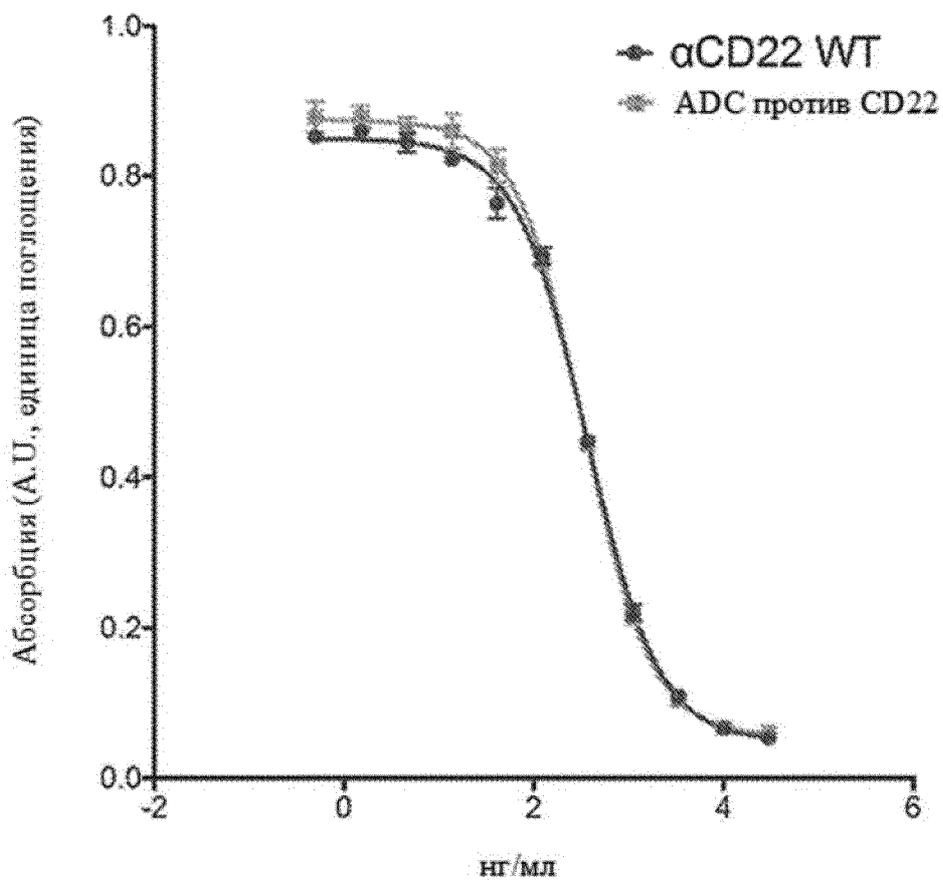
Фигура 9C



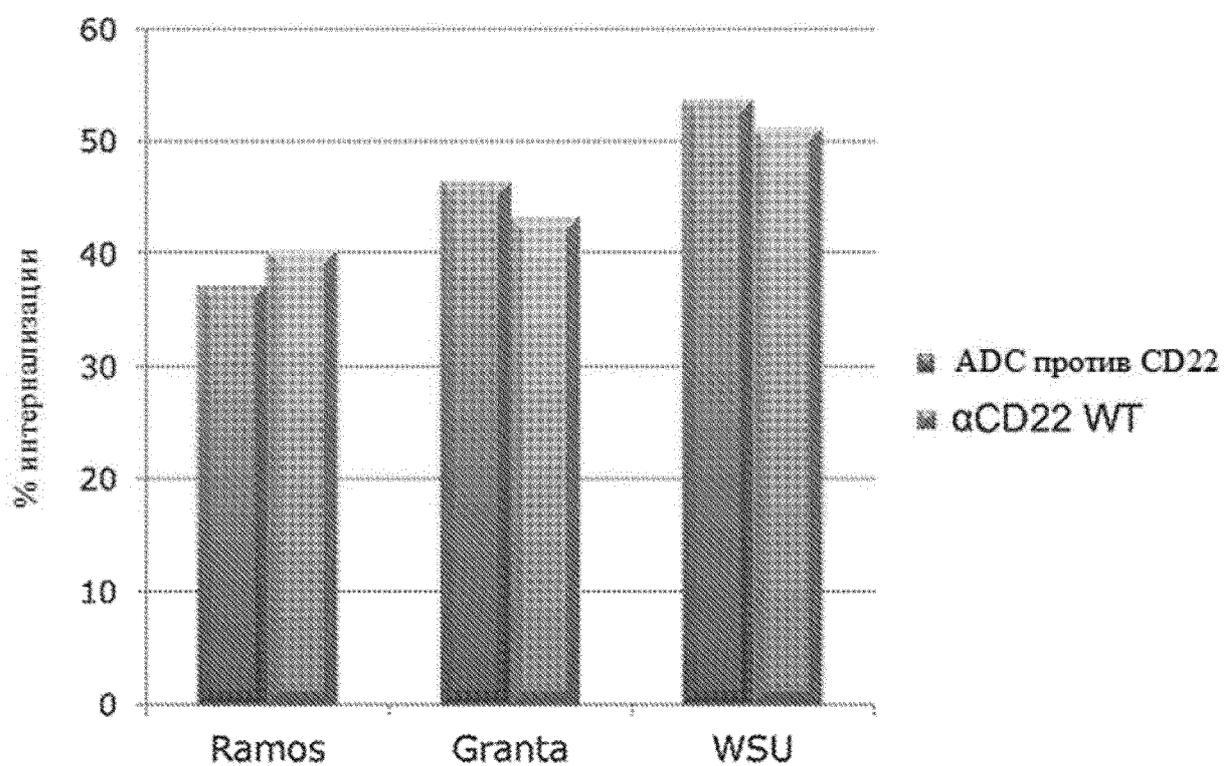
Фигура 10



Фигура 11

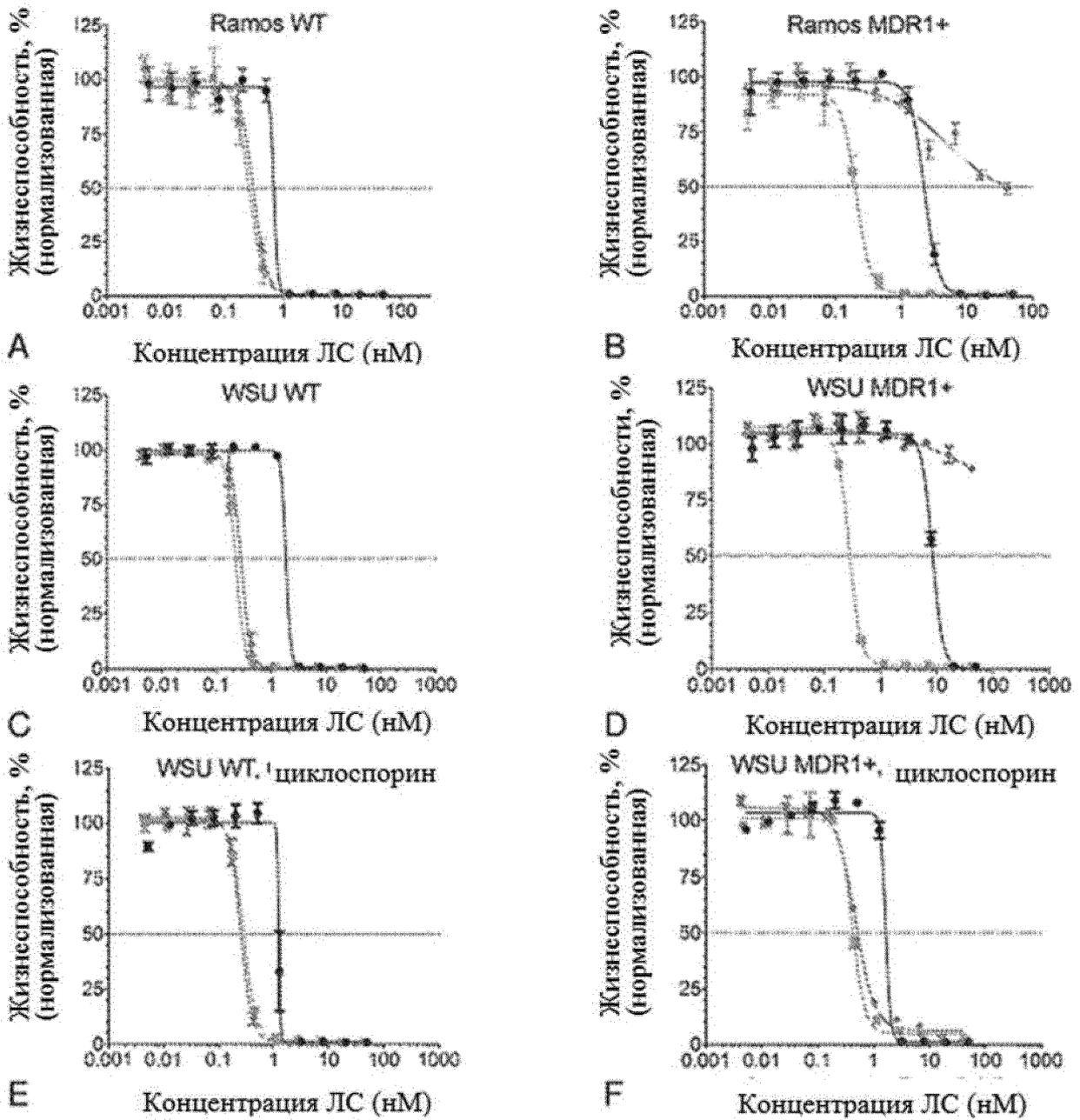


Фигура 12



Фигура 13

- ◆ Майтансин
- ADC против CD22
- ◆ αCD22 расщепляемый майтансин

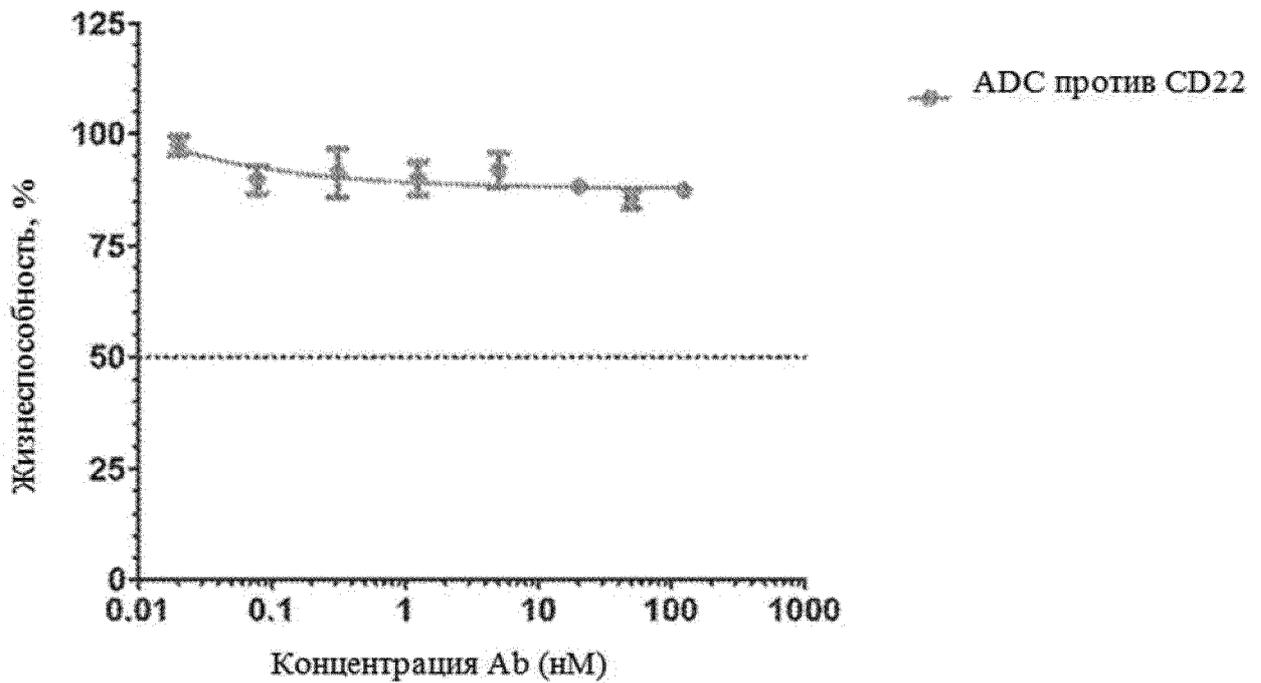


\*ЛС – лекарственное средство

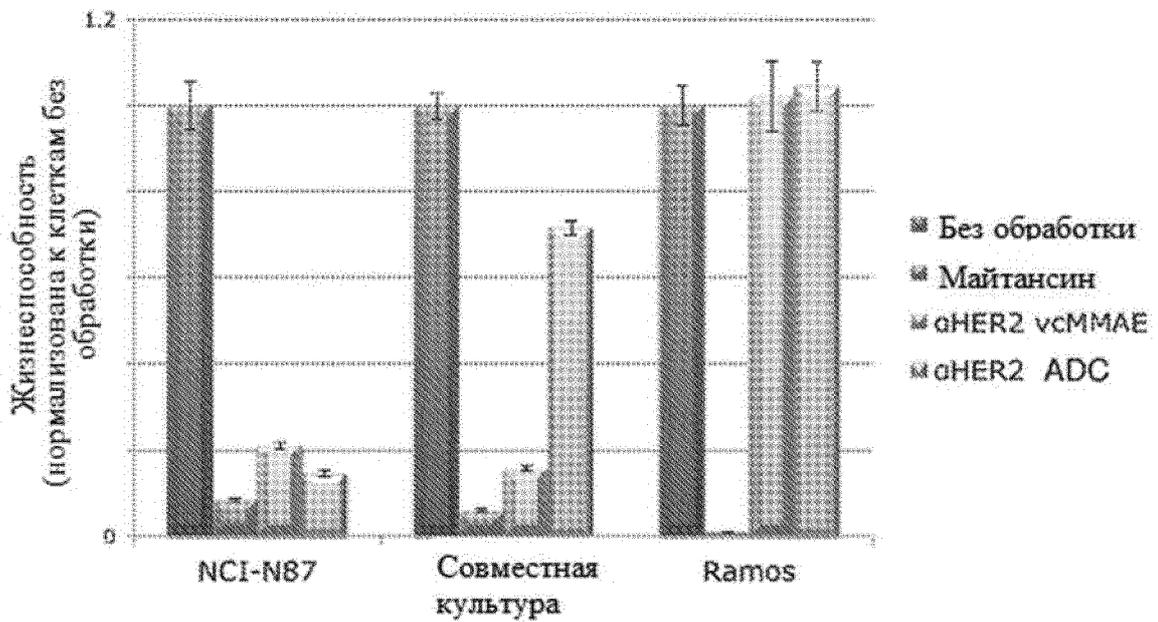
WT – дикий тип

Фигура 14

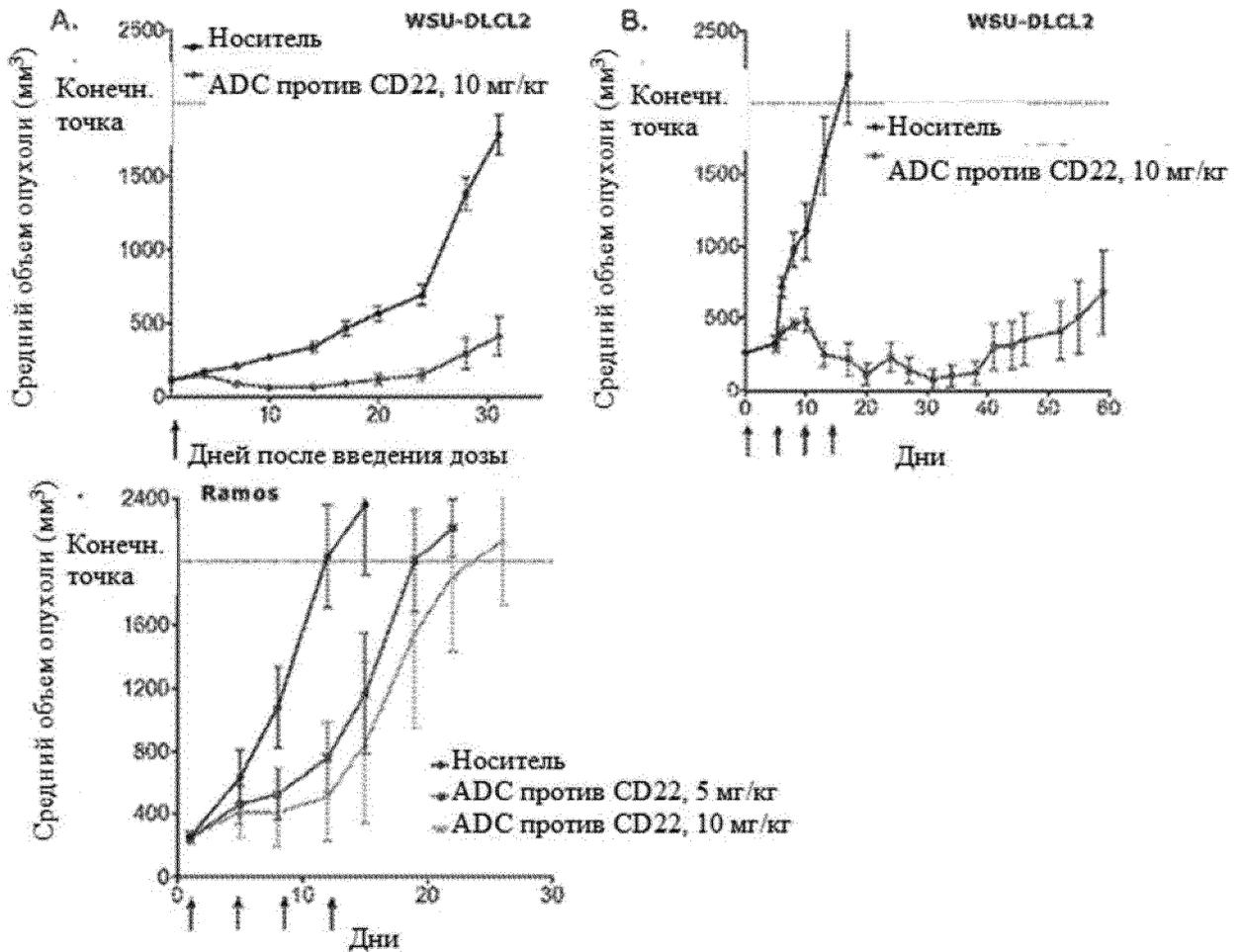
**CD22- NCI-N87** клетки



Фигура 15

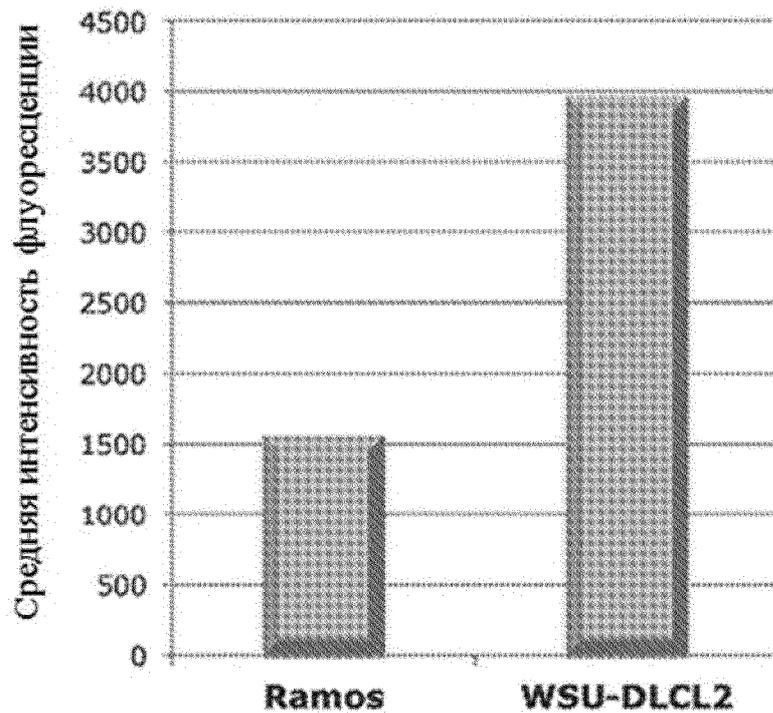


Фигура 16

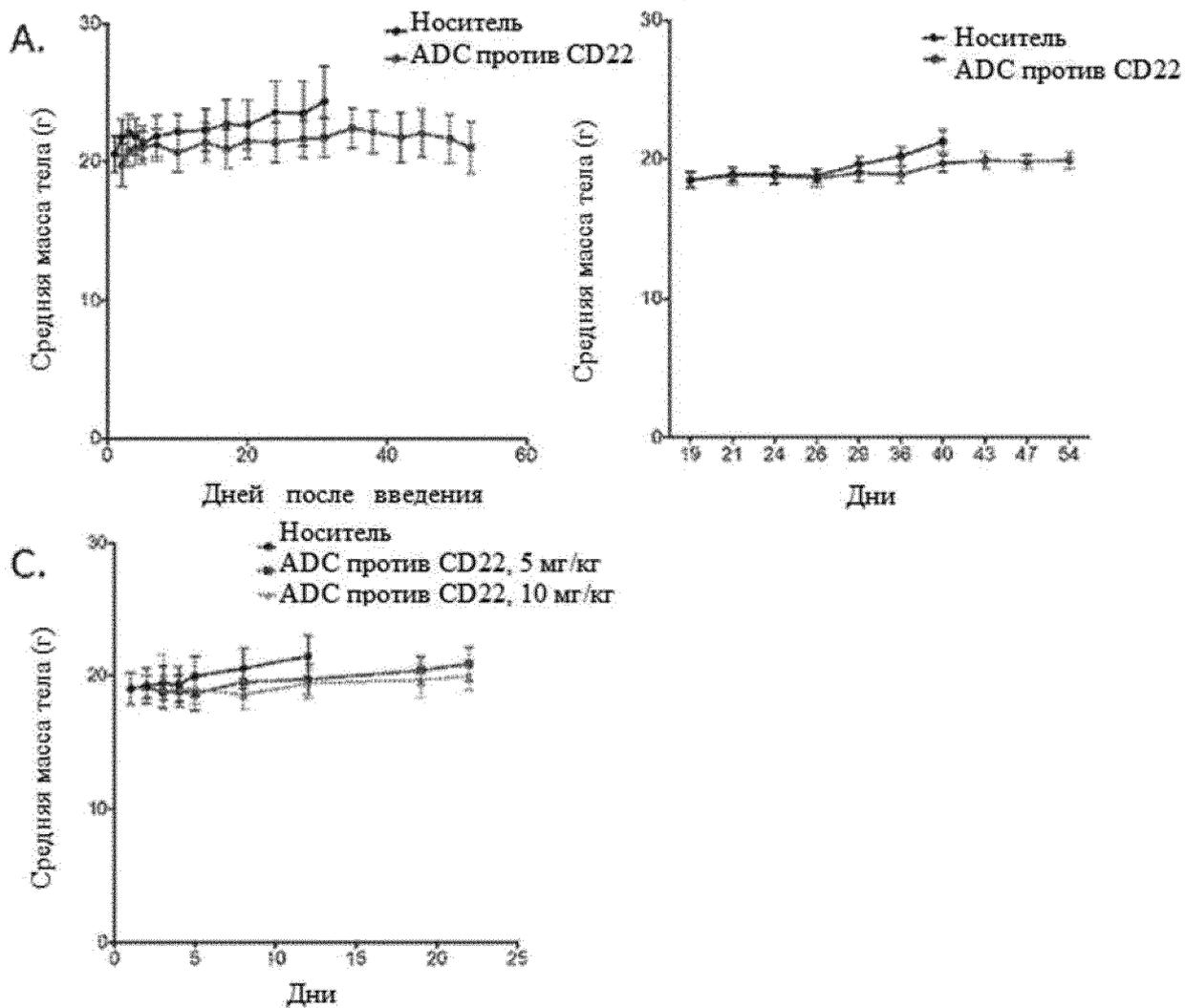


Фигура 17

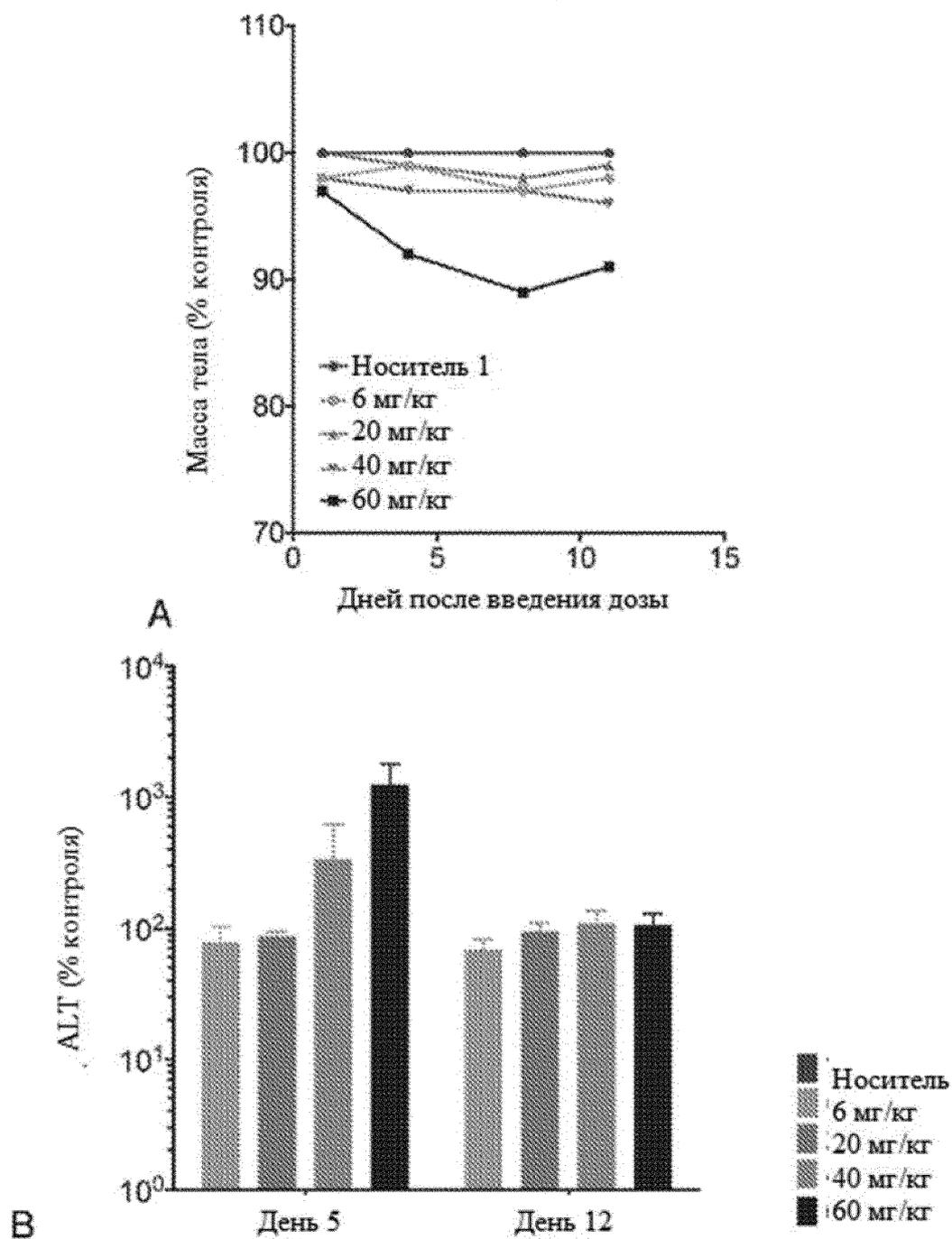
Уровни экспрессии CD22 на клеточной поверхности



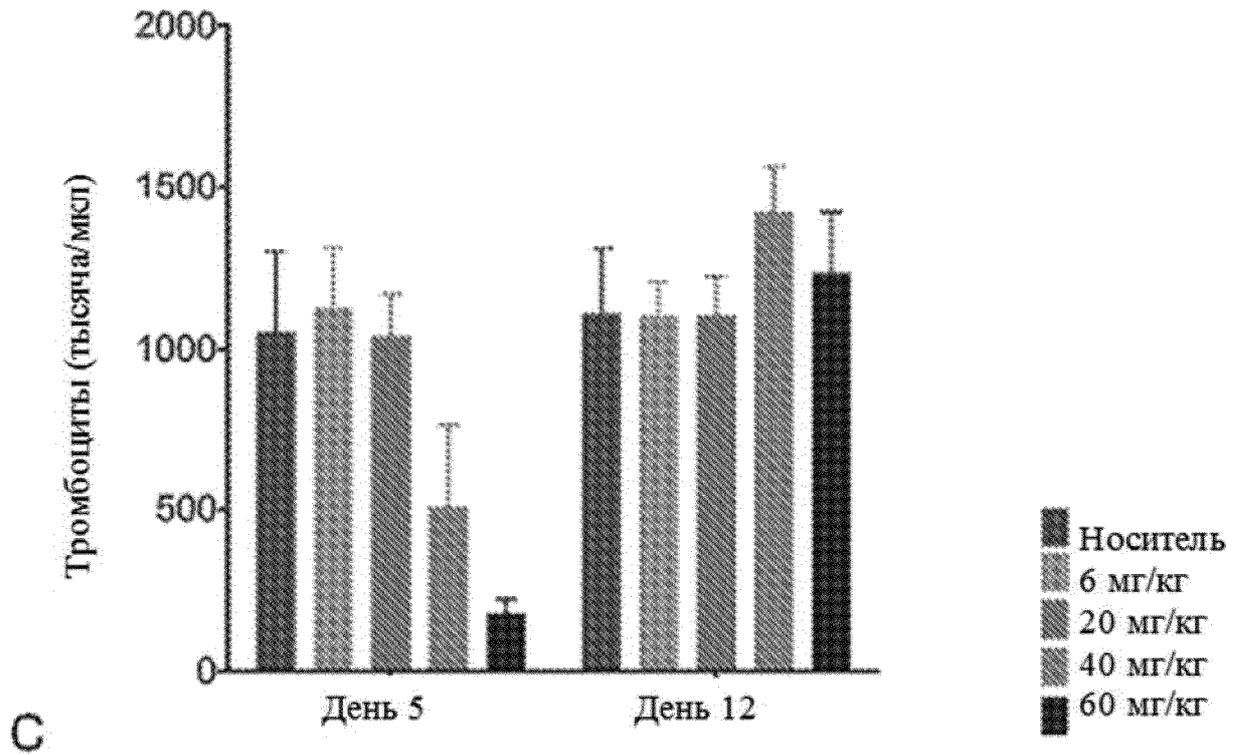
Фигура 18



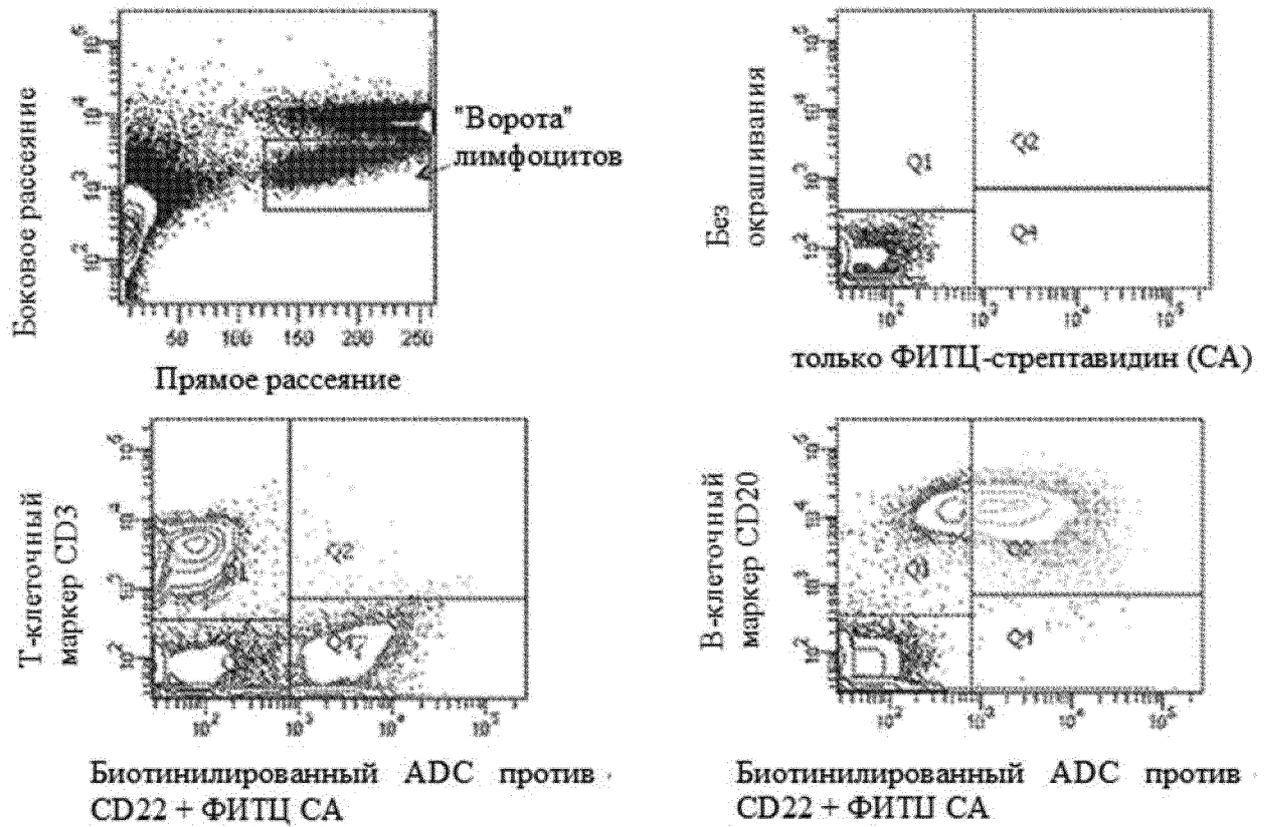
Фигура 19



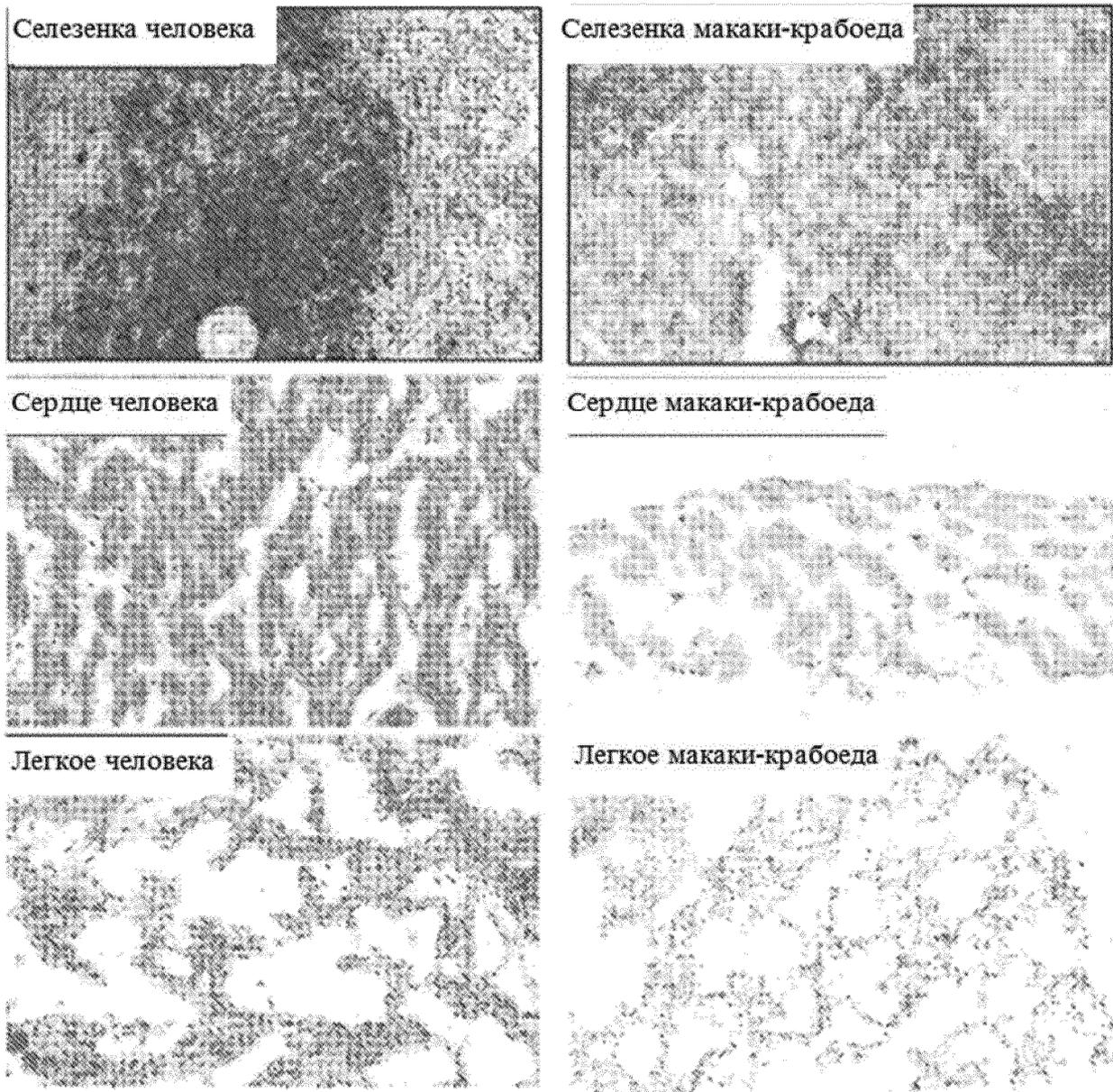
Фигура 20



Фигура 20 (продолжение)

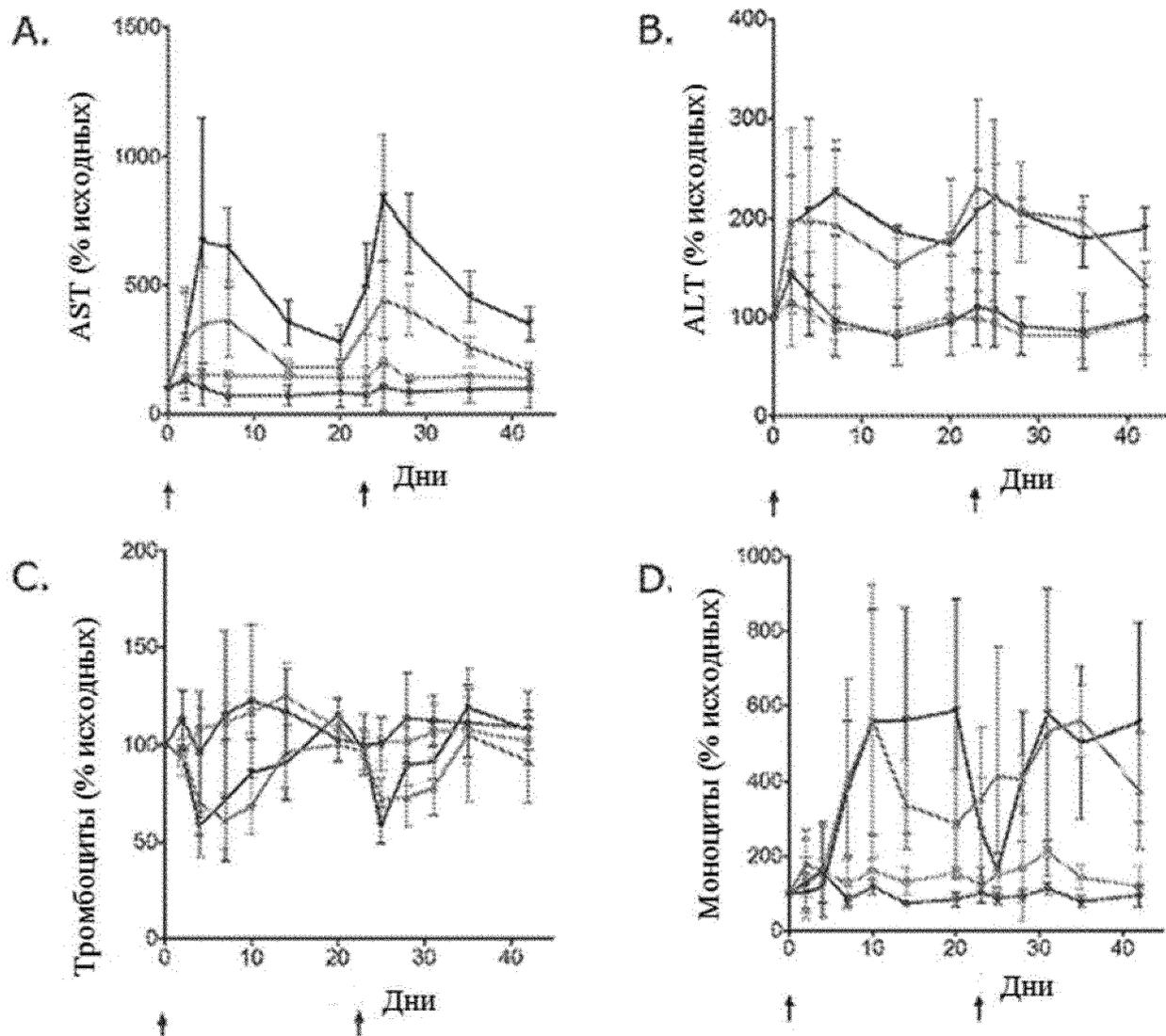


Фигура 21



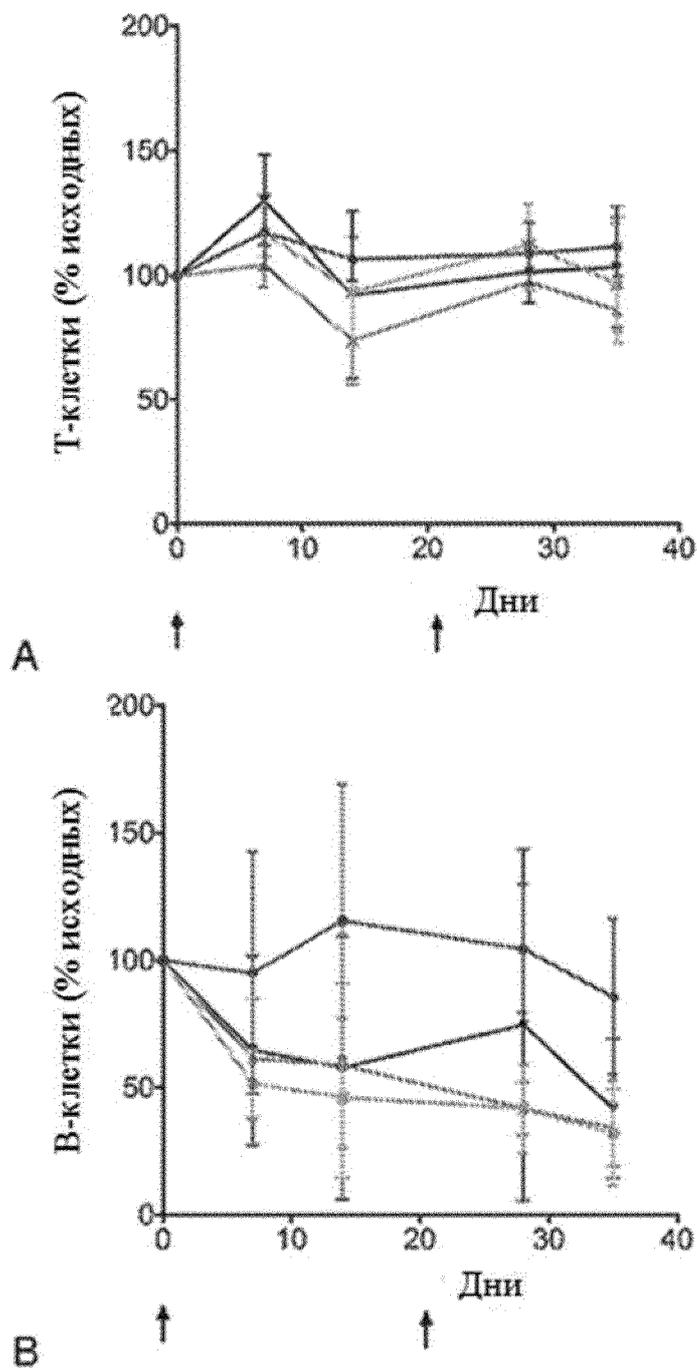
Фигура 22

- ◆ Носитель
- ◆ 10 мг/кг
- ◆ 30 мг/кг
- ◆ 60 мг/кг

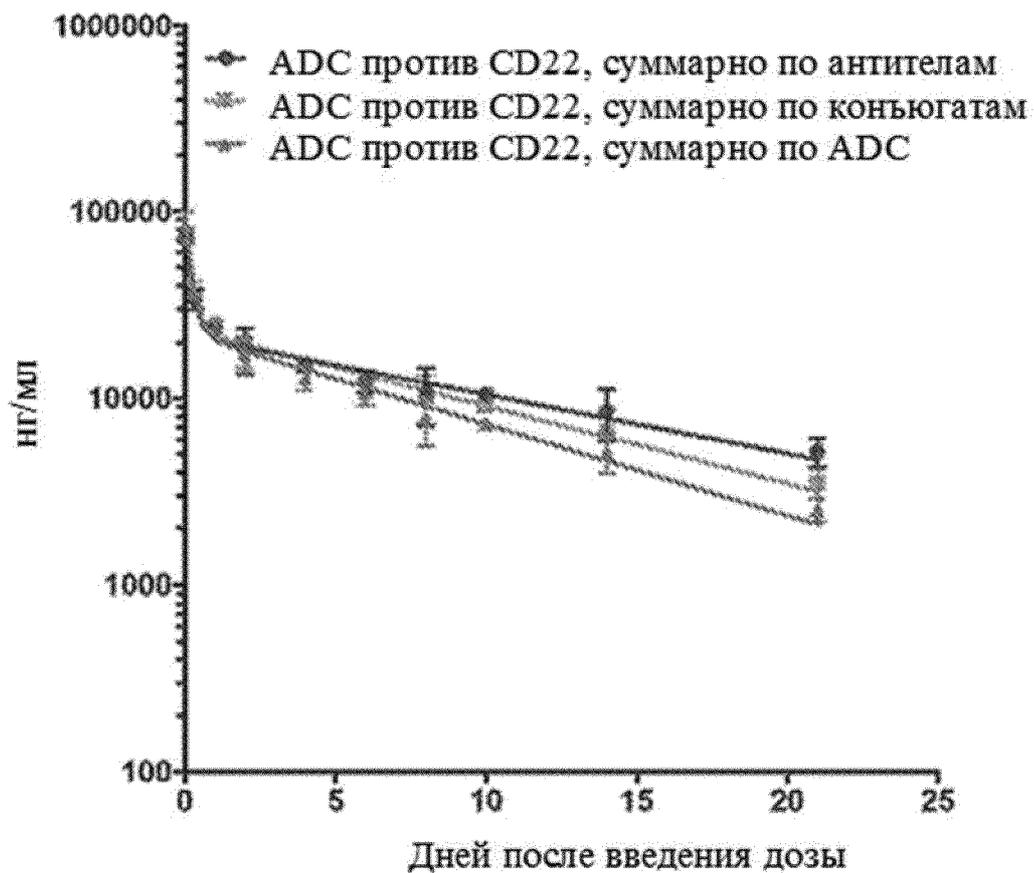


Фигура 23

- Носитель
- 10 мг/кг
- 30 мг/кг
- 60 мг/кг



Фигура 24



Фигура 25

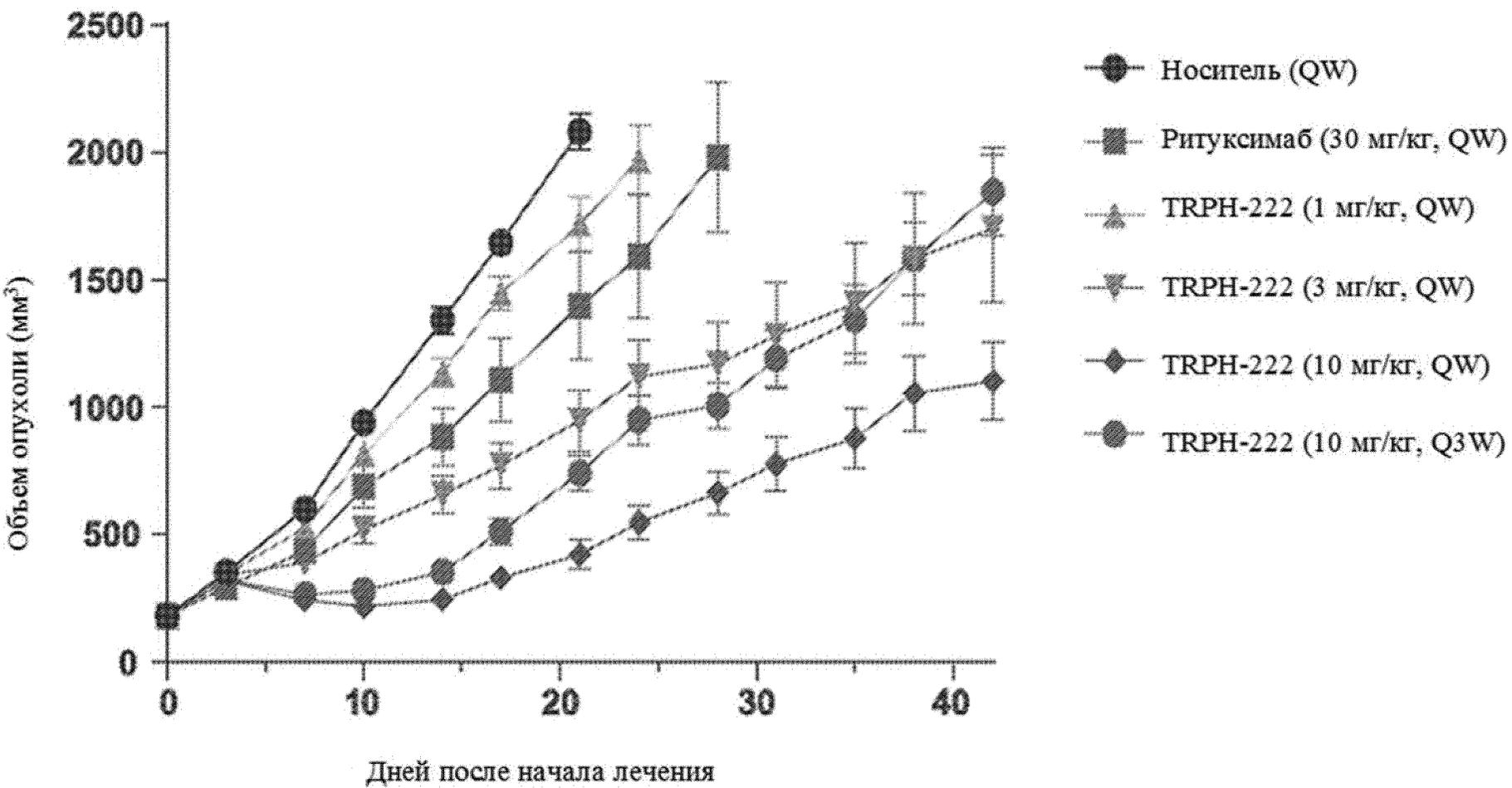
Таблица 3. Сводные показатели средних ( $\pm$ стандартное отклонение, SD) фармакокинетических (ФК) и токсикокинетических (ТК) параметров суммарных значений ADC у животных, которым вводили ADC против CD22

Доза мг/кг	Мышь (q4d $\times$ 4) <sup>a</sup>		Крыса (однократная доза)		Макак-крабод (q3w $\times$ 2) <sup>b</sup>	
	C <sub>max</sub> первая доза (мкг/мл)	AUC <sub>0-inf</sub> (дней) • (мкг/мл)	C <sub>max</sub> (мкг/мл)	AUC <sub>0-inf</sub> (дней) • (мкг/мл)	C <sub>max</sub> первая доза (мкг/мл)	AUC <sub>0-inf</sub> (дней) • (мкг/мл)
3			83,9 (16)	218 (18,4)		
5	74,4 (5,48)	1500 (45,1)				
6			110 (38,5)	660 (143)		
10	136 (4,57)	2530 (131)			318 (110)	1360 (556)
20			382 (63,0)	2280 (325)		
30					1030 (57,4)	4200 (768)
40			687 (52,8)	3740 (185)		
60			1020 (158)	5201 (273)	1630 (138)	6140 (667)

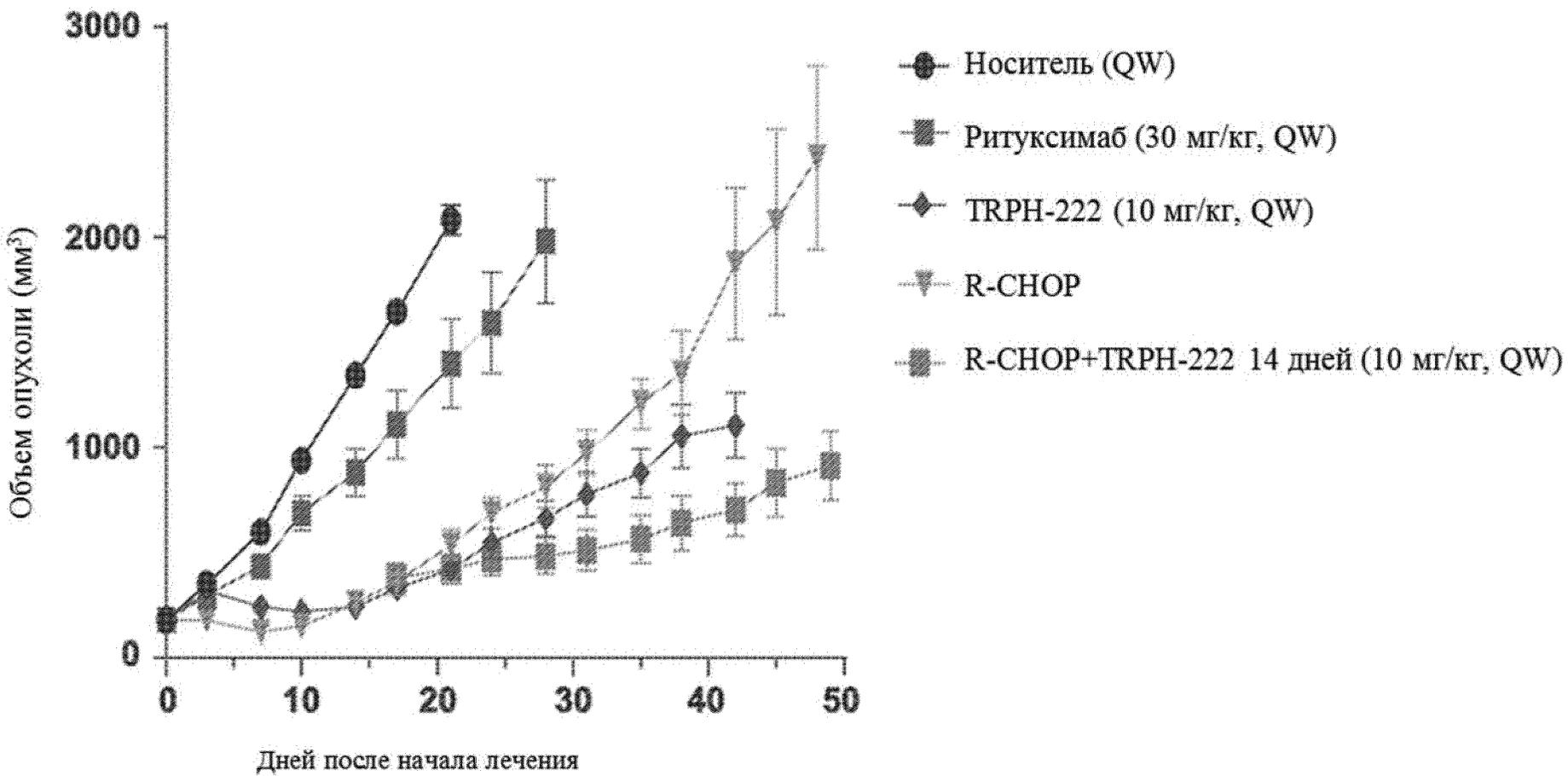
<sup>a</sup> AUC вычисления включают все дозы

<sup>b</sup> AUC вычисления только первой дозы

SD, стандартное отклонение. AUC<sub>0-inf</sub>, площадь под кривой зависимости концентрации от времени от 0 до бесконечности. C<sub>max</sub>, самая высокая концентрация, наблюдаемая в первых точках каждого исследования, которые представляют собой: ФК мыши и крысы 1 час; ТК крысы 8 часов; ТК макак-крабодов 5 минут.



Фигура 27



Фигура 28