

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092747** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.03.16

(51) Int. Cl. *A61K 47/65* (2017.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.05.28

(54) **МОДИФИЦИРОВАННЫЕ САМОРАЗРУШАЮЩИЕСЯ ФРАГМЕНТЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПРОЛЕКАРСТВАХ И КОНЬЮГАТАХ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ И ИЗГОТОВЛЕНИЯ**

(31) 62/677,307

(32) 2018.05.29

(33) US

(86) PCT/US2019/034114

(87) WO 2019/231879 2019.12.05

(71) Заявитель:

**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:

Паудел Ям Б., Гангвар Санджеев (US)

(74) Представитель:

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

(57) Соединения, представленные формулой (I)



могут быть использованы для изготовления конъюгатов антитело-лекарственное средство. Полученные таким образом конъюгаты стабильны как в сыворотке крови человека, так и в сыворотке крови мышей, что позволяет проводить доклинические исследования с использованием мышиной модели.

A1

202092747

202092747

A1

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ САМОРАЗРУШАЮЩИЕСЯ ФРАГМЕНТЫ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПРОЛЕКАРСТВАХ И КОНЬЮГАТАХ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ И ИЗГОТОВЛЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

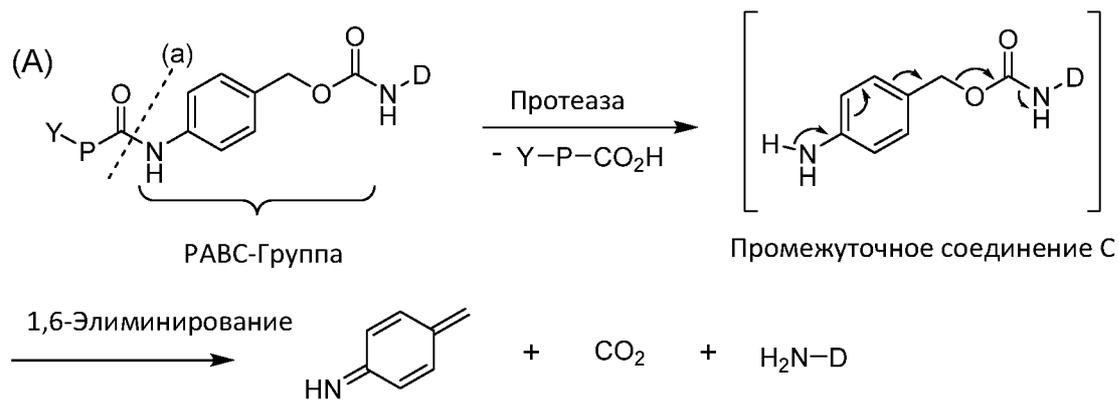
[0001] Данная заявка на патент испрашивает приоритет согласно 35 U.S.C. §119(e) по отношению к предварительной заявке США с серийным номером 62/677307, поданной 29 мая 2018 г.; раскрытие которой включено в данное описание посредством ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Данное раскрытие относится к ферментативно активируемым саморазрушающимся фрагментам, которые были модифицированы для модуляции их ферментативной активации, для применения в пролекарствах и конъюгатах.

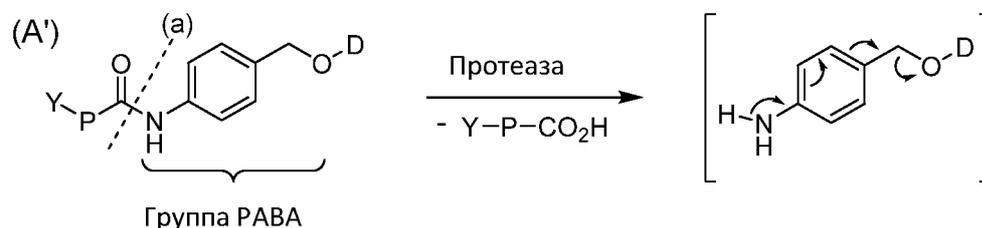
[0003] Иногда желательно присоединить пептид к биологически активной молекуле, с тем чтобы временно блокировать активность последней до контакта с протеазным ферментом, который расщепляет пептидную связь и высвобождает ее в разблокированной, активной форме. Биологически активная молекула может быть низкомолекулярным лекарственным средством или биологическим веществом, таким как антитело.

[0004] Если пептид непосредственно присоединен к биологически активной молекуле, последняя может препятствовать способности протеазы расщеплять пептидную связь по стерическим или другим причинам. Если это так, между пептидом и биологически активной молекулой может быть вставлен саморазрушающийся (self-immolating (SI)) фрагмент. Обычно используемый SI-фрагмент представляет собой *p*-аминобензил-оксикарбонильную (*p*-aminobenzyloxycarbonyl (PABC)) группу, способ действия которой изображен ниже, где биологически активная молекула представляет собой аминоксодержащую молекулу общей формулы D-NH₂, Р представляет собой пептид, расщепляемый по пунктирной линии (а) протеазой, и Y представляет собой необязательно присутствующий фрагмент, который может выполнять различные функции, как обсуждается ниже.



[0005] Протеазное расщепление пептида P по пунктирной линии (a) дает промежуточное соединение C, которое является нестабильным и самопроизвольно претерпевает реакции саморазрушения (по механизму 1,6-элиминирования) и декарбоксилирования с высвобождением D-NH₂. PABC-группа обеспечивает пространственное разделение D и P, с тем чтобы первая не мешала действию протеазы, и вдобавок структурирована таким образом, чтобы не препятствовать действию протеазы. См. Carl *et al.* 1981a и Doronina *et al.* 2008. См. Также Alouane *et al.* для общего обсуждения использования SI-фрагментов в качестве спейсеров.

[0006] В одном варианте биологически активная молекула может представлять собой D-OH, то есть, быть спиртом, а не амином, с высвобождением по аналогичному механизму. Если D-OH является достаточно хорошей уходящей группой, SI-фрагмент можно упростить до группы *p*-аминобензилового спирта (*p*-aminobenzyl alcohol (ПАВА)), которая саморазрушается посредством той же реакции 1,6-элиминирования, за исключением отсутствия декарбоксилирования.



[0007] Один из вариантов осуществления формулы (A) представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (antibody-drug conjugate, «ADC», также называемый иммуноконъюгатом), для направленной доставки D-NH₂ к месту предполагаемого действия, такому как опухоль. Если это так, Y представляет антитело, и синонимами D-NH₂ являются терапевтическое средство, заряд (warhead) или

полезный груз. Для Для противоракового лечения антитело Y выбирают таким образом, чтобы его антиген был ассоциированным с опухолью антигеном, то есть антигеном, который уникально или предпочтительно экспрессируется раковой клеткой, так что антитело Y служит нацеливающим агентом, ведущим ADC к месту опухоли.

[0008] Если антиген расположен на поверхности раковой клетки, связывание с ним ADC часто приводит к интернализации комплекса антиген-ADC посредством эндоцитоза в клетку-мишень. ADC в конечном итоге попадает в органеллу, такую как лизосома. Последовательность пептида P представляет собой селективный субстрат для лизосомальной протеазы. Его расщепление протеазой высвобождает D-NH₂. В то время как ADC циркулирует в кровотоке, D-NH₂ является неактивной, поскольку она остается соединенной с антителом и пептид P не является субстратом для протеаз, найденных в крови. Для обзора по ADC см. Gerber *et al.* 2013.

[0009] В другом варианте осуществления (A) может быть пролекарством, в котором D-NH₂ остается неактивной из-за ее связи с группой PABC. Если группы PABC и пептида P самих по себе достаточно для блокирования активности D-NH₂, то Y может отсутствовать. В противном случае, Y может присутствовать, чтобы обеспечить дополнительный эффект блокировки, и в данном случае Y называется блокирующим фрагментом. Поскольку Y не выполняет нацеливающую функцию, селективное высвобождение D-NH₂ в месте предполагаемого действия зависит от конструирования пептида P таким образом, чтобы он селективно расщеплялся ферментом, преимущественно находящимся в данном месте, по сравнению с тканью в другом месте или в крови.

[0010] Обычно ароматическое кольцо в группе PABC или PABA представляет собой незамещенное 1,4-фениленовое кольцо, как показано выше. Тем не менее, имеются описания замещенных колец. Было установлено, что электрон-оттягивающие группы ускоряют реакцию 1,6-элиминирования. См., например, Boyd *et al.* 2010, Burke *et al.* 2017, Carl *et al.* 1981b, McDonagh *et al.* 2007, Senter *et al.* 2006 и Szczepanik *et al.* 2014.

[0011] Также были описаны SI-фрагменты, в которых ароматическое кольцо представляет собой необязательно замещенный пяти- или шестичленный гетероцикл, который также может подвергаться реакции 1,6-элиминирования. См., например, Feng 2008 и 2011.

[0012] Также известны SI-фрагменты, в которых реакция 1,6-элиминирования запускается с помощью реакции, отличной от расщепления пептидных связей. Другие запускающие реакции могут представлять собой расщепление глюкуронидного фрагмента, гидролиз сложного эфира бората, гидролиз фосфата, восстановление нитрогруппы до амина и восстановление азидной группы до амина, часто опосредованное ферментом. Для обзора различных групп SI и их свойств см. Aouane *et al.* 2015. В целях подробного описания фрагментов, не являющихся PABC или PABA SI-фрагментами, см., например, Jeffrey 2011, Jeffrey *et al.* 2006, Kim *et al.* 2016, Machida *et al.* 2016, Major *et al.* 2011 и Zhang *et al.* 2015.

[0013] Гидрофильная группа была присоединена к бензильному положению группы PABC для улучшения растворимости. Lin *et al.* 2016 г.

[0014] Полные ссылки на документы, процитированные в данном документе первым автором или изобретателем и годом, перечислены в конце данного описания.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0015] Существуют ситуации, когда желательно модулировать протеолитическую восприимчивость связи пептид-PABC либо для предотвращения расщепления протеазой, отличной от для этого предназначенной активирующей протеазы, либо для модуляции скорости высвобождения биологически активной молекулы посредством активирующей протеазы.

[0016] Чтобы ADC или пролекарство были эффективными, расщепление пептида P не должно происходить преждевременно, например, пока ADC или пролекарство циркулируют в системе крови. Для интернализованного ADC пептид P может быть сконструирован так, чтобы он специфически расщеплялся лизосомальным ферментом, причем катепсин В является предпочтительным. См. Dubowchik *et al.* 1998a, 1998b и 2002 и Firestone *et al.* 2001.

[0017] Для пролекарства фермент может быть ферментом, который в большей степени обнаруживается во внеклеточной среде больной ткани по сравнению со здоровой тканью, таким как матриптаза или матриксная металлопротеиназа. Абсолютной селективности добиться трудно, поскольку кровь содержит собственный набор протеаз, для которых P может быть субстратом.

[0018] При доклинической оценке ADC или кандидата-пролекарства сначала оценивают его стабильность в сыворотке крови человека. Если он демонстрирует необходимую стабильность, он становится жизнеспособным кандидатом для дальнейшей доклинической оценки на животных моделях, обычно на мышинных моделях по соображениям целесообразности, так как это требует меньшего количества материала-кандидата и менее затратно в исполнении по сравнению с моделями с использованием приматов или более крупных грызунов. Кроме того, активность эстеразы сыворотки крови мыши обычно выше, чем активность эстеразы сыворотки крови человека, так что можно ожидать, что ADC, стабильный в сыворотке крови мыши, будет стабильным в сыворотке крови человека.

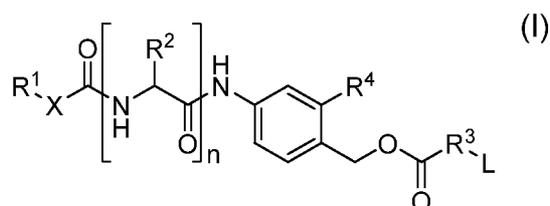
[0019] Комплемент протеаз в сыворотке крови мышей отличается от такового в сыворотке крови человека, что означает, что ADC или пролекарство, стабильные в сыворотке крови человека, не могут считаться стабильными в сыворотке крови мышей. Следовательно, важно также протестировать кандидатный ADC или пролекарство на стабильность в сыворотке крови мышей. Если он нестабилен, то модель на мышах неинформативна: нельзя сказать, связано ли отсутствие эффективности или возникновение токсических побочных эффектов с преждевременным высвобождением лекарства в кровотоке или нестабильностью ADC как такового.

[0020] Катепсины, в частности, катепсин В, были предпочтительным лизосомальным активирующим ферментом в ADC, поскольку пептидные последовательности, которые являются субстратами для них, не являются субстратами для протеаз, обнаруживаемых в сыворотке крови человека. Тем не менее, было обнаружено, что некоторые ADC, предназначенные для расщепления катепсином В, хотя и стабильны в сыворотке крови человека, являются нестабильными в сыворотке крови мыши, в связи с действием карбоксиэстеразы С1, содержащейся там. Dorywalska *et al.* 2016. Такая нестабильность не позволяет использовать модели на мышах, что затрудняет оценку соединений-кандидатов в лекарственные средства на животной модели.

[0021] Авторы изобретения обнаружили, что определенные заместители в группе РАВС, расположенные в *орто*-положении относительно бензилоксикарбонильной группы, могут модулировать восприимчивость к протеазному расщеплению присоединенного к ней пептидного фрагмента, либо предотвращая его расщепление протеазой, которая не является предполагаемой активирующей протеазой, либо

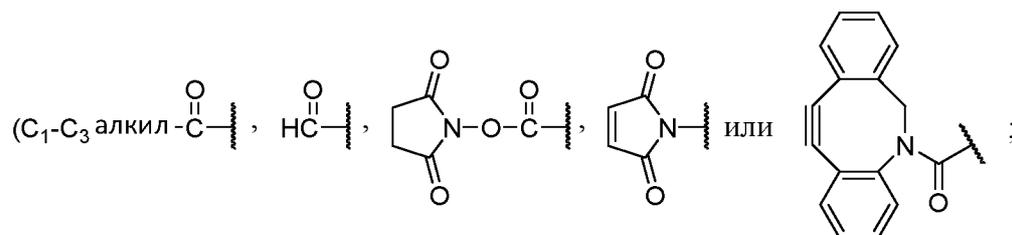
замедляя скорость расщепления предполагаемой активирующей протеазой. В частности, SI-фрагменты с *орто*-заместителями сохраняют свою стабильность в сыворотке крови человека и демонстрируют улучшенную стабильность в сыворотке крови мышей, но все еще легко расщепляются катепсином В.

[0022] В одном варианте осуществления обеспечено соединение, представленное формулой (I)



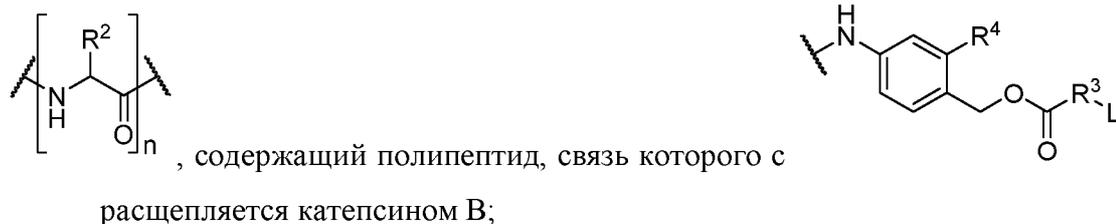
в которой

R¹ представляет собой C₁-C₅-алкил, N₃, OH, SH, ONH₂, NH₂, CO₂H,

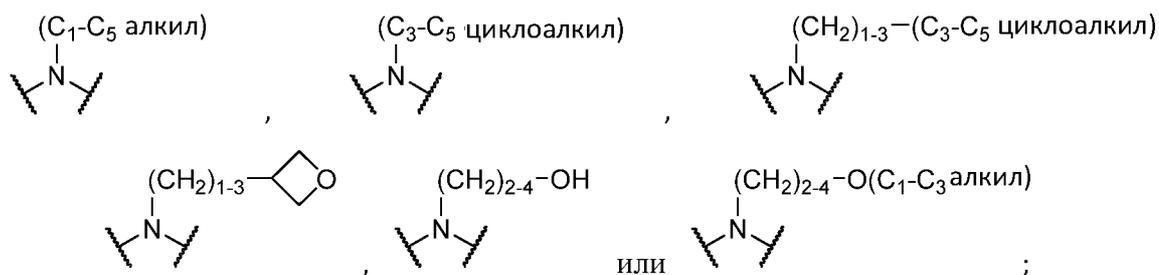


R² представляет собой боковую цепь остатка аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из аланина, β-аланина, γ-аминомасляной кислоты, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, γ-карбоксиглутаминовой кислоты, цитруллина, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, норлейцина, норвалина, орнитина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина;

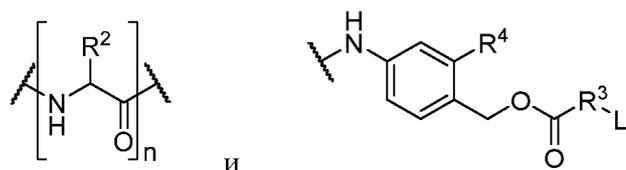
n равно 2, 3, 4 или 5;



R³ представляет собой O, NH,



R^4 представляет собой фрагмент, который существенно ингибирует расщепление связи между

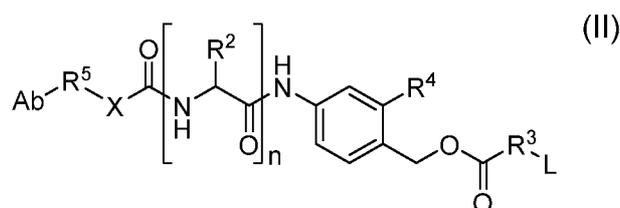


в сыворотке крови мышей, но существенно не ингибирует расщепление той же связи катепсином В;

L представляет собой остаток биоактивной молекулы формулы $L-R^3H$; и

X представляет собой спейсерную группу.

[0023] Соединение формулы (I) может быть использовано для получения ADC, используя реактивную R^1 группу, такую как, в качестве примера, а не ограничения, NH_2 , для конъюгации с антителом. Таким образом, в другом варианте осуществления обеспечивается конъюгат, представленный формулой (II):



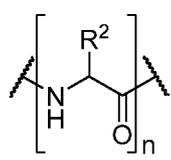
в которой

Ab представляет собой антитело,

R^2 представляет собой боковую цепь остатка аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из аланина, β -аланина, γ -аминомасляной кислоты, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, γ -карбоксихлутаминовой кислоты, цитруллина, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, норлейцина, норвалина, орнитина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина;

;

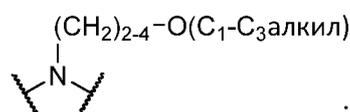
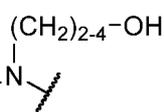
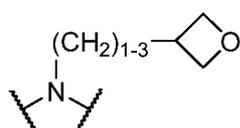
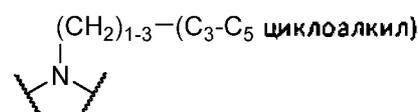
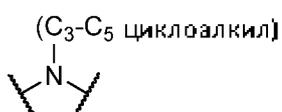
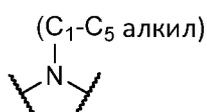
n равно 2, 3, 4 или 5;



, содержащий полипептид, связь которого с расщепляется катепсином В;

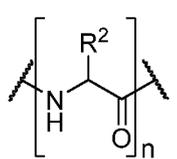


R³ представляет собой O, NH,

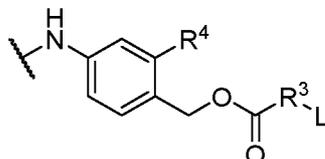


или ;

R⁴ представляет собой фрагмент, который существенно ингибирует расщепление связи между



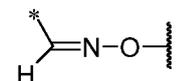
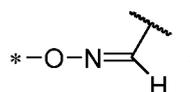
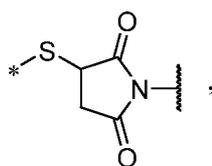
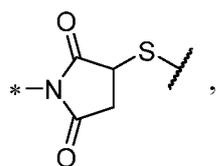
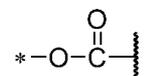
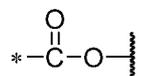
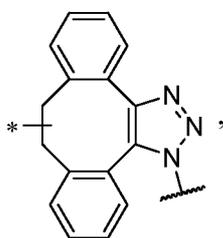
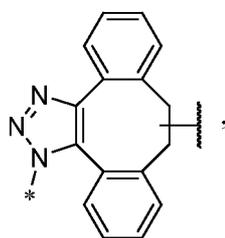
и

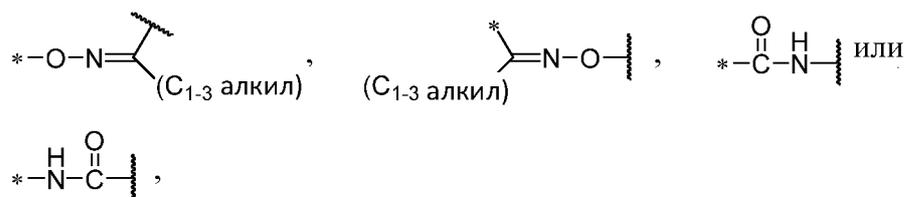


в сыворотке крови мышей, но

существенно не ингибирует расщепление той же связи катепсином В;

R⁵ представляет собой



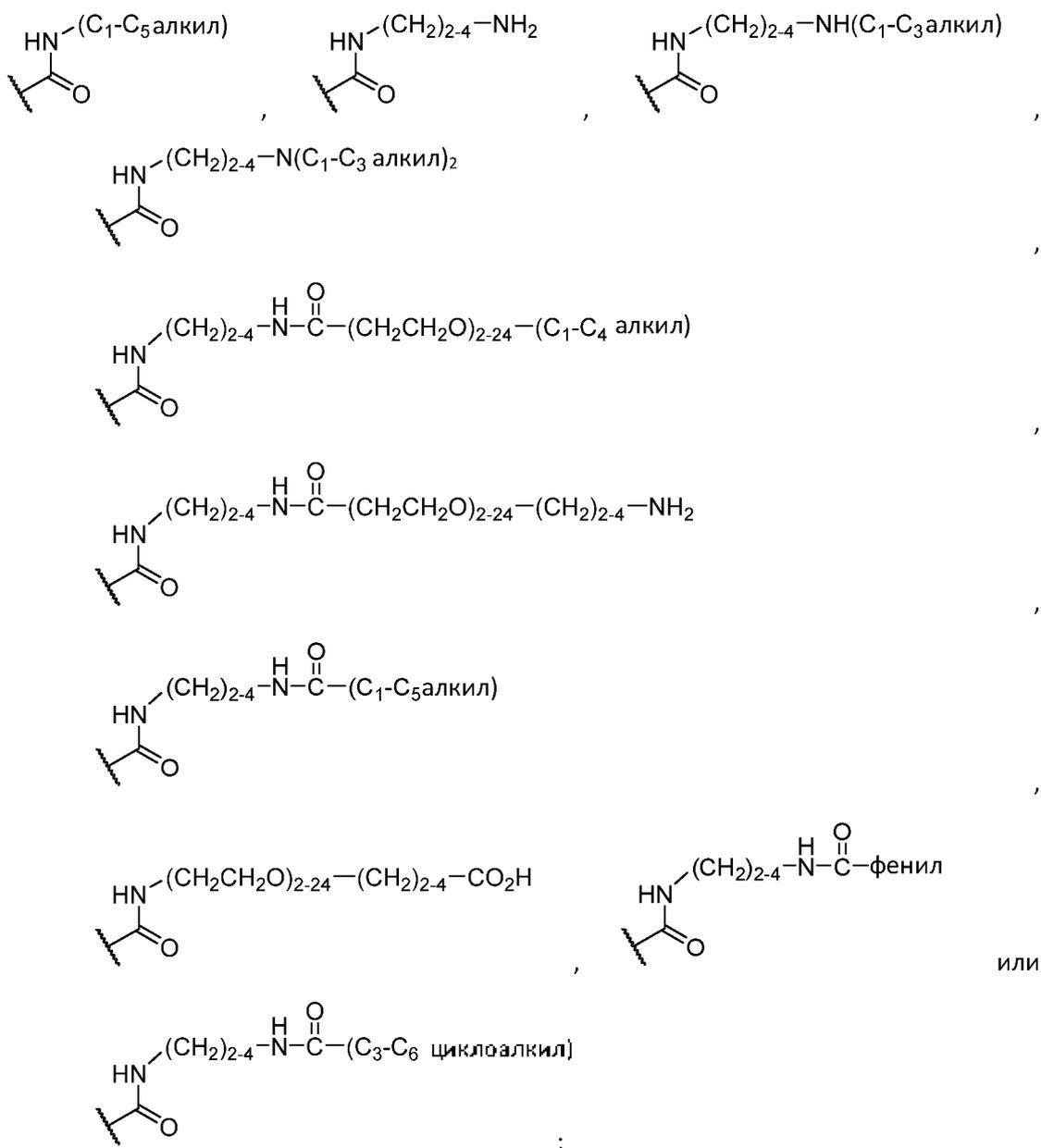


где валентное положение связывания с Ab обозначено звездочкой и валентное положение связывания с X обозначено волнистой линией;

L представляет собой остаток биоактивной молекулы формулы L-R³H; и

X представляет собой спейсерную группу.

[0024] Предпочтительно, R⁴ в формуле (I) или (II) представляет собой



фенильную или C₃-C₆ циклоалкильную группу, необязательно замещенную F, Cl, CN, NO₂ или C₁-C₃ алкилом.

[0025] В другом варианте осуществления обеспечивается способ получения конъюгата, представленного формулой (II), включающий конъюгирование антитела Ab с соединением формулы (I).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0026] **ФИГ. 1** показывает эффективность ADC, изготовленного с соединением по настоящему изобретению, против мезотелиомы на животной модели.

[0027] **ФИГ. 2А и 2В** показывают, совместно, схему А синтеза соединений, раскрытых в данном описании.

[0028] **ФИГ. 3А, 3В и 3С** показывают, совместно, схему В синтеза соединений, раскрытых в данном описании.

[0029] **ФИГ. 4** показывает схему С синтеза соединений, раскрытых в данном описании.

[0030] **ФИГ. 5** показывает схему D синтеза соединений, раскрытых в данном описании

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0031] «Антитело» означает целые антитела и любой антигенсвязывающий фрагмент (т.е. «антигенсвязывающий участок») или их одноцепочечные варианты. Целое антитело представляет собой белок, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь включает переменную область тяжелой цепи (V_H) и константную область тяжелой цепи, содержащую три домена, C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Каждая легкая цепь включает переменную область легкой цепи (V_L или V_K), и константную область легкой цепи, содержащую один одиночный домен, C_L. Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (complementarity determining regions (CDR)), перемежающимися более консервативными каркасными областями (framework regions (FR)). Каждая V_H и V_L содержит три CDR и четыре FR, расположенные от

амино- до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области могут опосредовать связывание антитела с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Считается, что антитело «специфически связывается» с антигеном X, если антитело связывается с антигеном X с K_D , равной 5×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 6×10^{-9} М или менее, более предпочтительно 3×10^{-9} М или менее, еще более предпочтительно 2×10^{-9} М или менее. Антитело может быть химерным, гуманизированным или, предпочтительно, человеческим. Константная область тяжелой цепи может быть сконструирована для воздействия на тип или степень гликозилирования, для увеличения периода полужизни антитела, для усиления или уменьшения взаимодействий с эффекторными клетками или системой комплемента или для модуляции некоторых других свойств. Конструирование может быть выполнено заменой, добавлением или удалением одной или нескольких аминокислот или заменой домена доменом из другого типа иммуноглобулина или комбинированием вышеперечисленного.

[0032] «Антигенсвязывающий фрагмент» и «антигенсвязывающий участок» антитела (или просто «участок антитела» или «фрагмент антитела») означают один или несколько фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела, такими как (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из V_L , V_H , C_L и C_{H1} доменов; (ii) фрагмент $F(ab')_2$, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fab', который по существу представляет собой Fab с частью шарнирной области (см., например, Abbas *et al.*, *Cellular and Molecular Immunology*, 6th Ed., Saunders Elsevier 2007); (iv) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и C_{H1} ; (v) фрагмент Fv, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (vi) фрагмент dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), который состоит из домена V_H ; (vii) выделенная определяющая комплементарность область (CDR); и (viii) нанотело, вариабельная область тяжелой цепи, содержащая один вариабельный домен и два константных домена. Предпочтительными антигенсвязывающими фрагментами являются фрагменты Fab, $F(ab')_2$, Fab', Fv и Fd. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H , кодируются отдельными генами,

они могут быть соединены с использованием рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, который позволяет им быть в виде единой белковой цепи, в которой пары областей V_L и V_H образуют одновалентные молекулы (известные как одноцепочечный Fv или scFv); См., например, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; и Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела охватываются термином «антигенсвязывающий участок» антитела.

[0033] Если не указано иное - например, со ссылкой на линейную нумерацию в списке SEQ ID NO: - ссылки на нумерацию аминокислотных положений в варибельной области тяжелой или легкой цепи антитела (V_H или V_L) соответствуют системе по Кабату (Kabat *et al.*, "Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed., Pub. No. 91-3242, U.S. Dept. Health & Human Services, NIH, Bethesda, Md., 1991, далее «Кабат») и ссылки на нумерацию аминокислотных положений в константной области тяжелой или легкой цепи антитела (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} или C_L) соответствуют индексу ЕС, указанному у Кабата. См. Lazar *et al.*, US 2008/0248028 A1, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки, для примеров такого использования. Кроме того, информационная система ImMunoGeneTics (IMGT) предоставляет на своем веб-сайте таблицу под названием «Научная диаграмма IMGT: соответствие между нумерациями C», показывающую соответствие между ее системой нумерации, нумерацией согласно ЕС и нумерацией согласно Кабату для константной области тяжелой цепи.

[0034] «Выделенное антитело» означает антитело, которое является по существу свободным от других антител, имеющих различные антигенные специфичности (например, выделенное антитело, которое специфически связывает антиген X, по существу не содержит антител, специфически связывающих антигены, кроме антигена X). Однако, выделенное антитело, которое специфически связывает антиген X, может обладать перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как молекулы антигена X других видов. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело специфически связывается с человеческим антигеном X и не вступает в перекрестную реакцию с другими антигенами антигена X (кроме человека). Более того, выделенное антитело может практически не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

[0035] «Моноклональное антитело» или «композиция моноклонального антитела» означает препарат молекул антитела с одним молекулярным составом,

который демонстрирует единственную специфичность связывания и сродство к конкретному эпитопу.

[0036] «Человеческое антитело» означает антитело, имеющее переменные области, в которых как каркасные области, так и области CDR (и константную область, если она присутствует) получают из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие антитела могут включать более поздние модификации, включая естественные или синтетические модификации. Человеческие антитела могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или путем соматической мутации *in vivo*). Тем не менее, «человеческое антитело» не включает в себя антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты к каркасным последовательностям человека.

[0037] «Человеческое моноклональное антитело» означает антитело, отображающее одну специфичность связывания, которое имеет переменные области, в которых как каркасные области, так и области CDR получены от последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. В одном варианте осуществления человеческие моноклональные антитела продуцируются гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного животного, отличного от человека, например трансгенной мыши, имеющего геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, слитый с иммортализованной клеткой.

[0038] «Алифатический» означает линейный или разветвленный, насыщенный или ненасыщенный, неароматический углеводородный фрагмент, имеющий определенное число атомов углерода (например, как в «С₃ алифатическом», «С₁₋₅ алифатическом», «С₁-С₅ алифатическом» или «от С₁ до С₅ алифатическом», последние три выражения являются синонимами для алифатического фрагмента, имеющего от 1 до 5 атомов углерода) или, если количество атомов углерода не указано явно, от 1 до 4 атомов углерода (от 2 до 4 атомов углерода в случае ненасыщенных алифатических фрагментов). Аналогично понимается количество атомов углерода в других типах, таких как С₂₋₄ алкен, С₄-С₇ циклоалифатический и т. д. Аналогично, следует понимать,

что такой термин как « $(\text{CH}_2)_{1-3}$ » означает сокращение для нижнего индекса, равного 1, 2 или 3, так что такой термин представляет CH_2 , CH_2CH_2 и $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$.

[0039] «Алкил» означает насыщенный алифатический фрагмент, с тем же условием для обозначения числа атомов углерода. В качестве иллюстрации, C_1 - C_4 алкильные фрагменты включают, но не ограничиваются ими, метил, этил, пропил, изопропил, изобутил, трет бутил, 1-бутил, 2-бутил и тому подобное. «Алкилен» означает двухвалентный аналог алкильной группы, такой как CH_2CH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ и $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$.

[0040] «Алкенил» означает алифатическую группу, имеющую по меньшей мере одну двойную углерод-углеродную связь, при этом применимо то же соглашение для обозначения числа атомов углерода. В качестве иллюстрации, C_2 - C_4 алкенильные фрагменты включают, но не ограничиваются ими, этенил (винил), 2-пропенил (аллил или проп-2-енил), цис-1-пропенил, *транс*-1-пропенил, *E*- (или *Z*-) 2-бутенил, 3-бутенил, 1,3-бутадиенил (бут-1,3-диенил) и тому подобное

[0041] «Алкинил» означает алифатическую группу, имеющую по меньшей мере одну тройную углерод-углеродную связь, при этом применимо то же соглашение для обозначения числа атомов углерода. В качестве иллюстрации, C_2 - C_4 алкинильные группы включают этинил (ацетиленил), пропаргил (проп-2-инил), 1-пропинил, бут-2-инил и тому подобное.

[0042] «Циклоалифатический» означает насыщенный или ненасыщенный, неароматический углеводородный фрагмент, имеющий от 1 до 3 колец, причем каждое кольцо имеет от 3 до 8 (предпочтительно от 3 до 6) атомов углерода. «Циклоалкил» означает циклоалифатический фрагмент, в котором каждое кольцо является насыщенным. «Циклоалкенил» означает циклоалифатический фрагмент, в котором по меньшей мере одно кольцо имеет по меньшей мере одну двойную углерод-углеродную связь. «Циклоалкинил» означает циклоалифатический фрагмент, в котором по меньшей мере одно кольцо имеет по меньшей мере одну тройную углерод-углеродную связь. В качестве иллюстрации, циклоалифатические фрагменты включают, но не ограничиваются ими, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогептил, циклооктил и адамантил. Предпочтительными циклоалифатическими остатками являются циклоалкильные группы, особенно циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил. «Циклоалкилен» означает двухвалентный аналог циклоалкильной группы.

[0043] «Гетероциклоалифатический» означает циклоалифатический фрагмент, в котором по меньшей мере в одном его кольце до трех (предпочтительно от 1 до 2) атомов углерода заменены гетероатомом, независимо выбранным из N, O или S, где N и S необязательно могут быть окислены и N необязательно может быть кватернизован. Предпочтительные циклоалифатические фрагменты состоят из одного кольца, имеющего размер от 5 до 6 членов. Аналогично, «гетероциклоалкил», «гетероциклоалкенил» и «гетероциклоалкинил» означают циклоалкильный, циклоалкенильный или циклоалкинильный фрагмент, соответственно, в котором по меньшей мере одно их кольцо модифицировано таким образом. Типичные гетероциклоалифатические фрагменты включают азиридирил, азетидинил, 1,3-диоксанил, оксетанил, тетрагидрофурил, пирролидинил, пиперидинил, пиперазинил, тетрагидропиранил, тетрагидротиопиранил, тетрагидротиопиранил-1, сульфониоморфолин-сульфонилдиоморфолин, тиоморфолин-сульфонилсульфон, 1-диоксоиенил, 1,4-диоксанил, тиетанил и тому подобное. «Гетероциклоалкилен» означает двухвалентный аналог гетероциклоалкильной группы.

[0044] «Алкокси», «арилокси», «алкилтио» и «арилтио» означают -O(алкил), -O(арил), -S(алкил), и -S(арил), соответственно. Примерами являются метокси, фенокси, метилтио и фенилтио, соответственно.

[0045] «Галоген» или «галоген» означает фтор, хлор, бром или йод, если не указано более узкое значение.

[0046] «Арил» означает углеводородный остаток, имеющий моно-, би- или трициклическую кольцевую систему (предпочтительно моноциклическую), где каждое кольцо содержит от 3 до 7 атомов углерода и по меньшей мере одно кольцо является ароматическим. Кольца в кольцевой системе могут быть слиты друг с другом (как в нафтиле) или соединены друг с другом (например, в бифениле) и могут быть слиты или соединены с неароматическими кольцами (как в инданиле или циклогексиле, фениле). В качестве дополнительной иллюстрации, арильные фрагменты включают, но не ограничиваются ими, фенил, нафтил, тетрагидронафтил, инданил, бифенил, фенантрил, антраценил и аценафтил. «Арилен» означает бивалентный аналог арильной группы, например, 1,2-фенилен, 1,3-фенилен или 1,4-фенилен.

[0047] «Гетероарил» означает группировку, имеющую моно-, би- или трициклическую кольцевую систему (предпочтительно от 5 до 7-членную моноциклическую), где каждое кольцо имеет от 3 до 7 атомов углерода и по меньшей

мере одно кольцо является ароматическим кольцом, содержащим от 1 до 4 гетероатомов, независимо выбранных из N, O или S, где N и S необязательно могут быть окислены и N необязательно может быть кватернизован. Такое по меньшей мере одно ароматическое кольцо, содержащее гетероатом, может быть конденсировано с другими типами колец (как в бензофураниле или тетрагидроизохинолиле) или непосредственно связано с другими типами колец (как в фенилпиридиле или 2-циклопентилпиридиле). В качестве дополнительной иллюстрации, гетероарильные фрагменты включают пирролил, фуранил, тиофенил (тиенил), имидазолил, пиразолил, оксазолил, изоксазолил, тиазолил, изотиазолил, триазолил, тетразолил, пиридил, N-оксопиридил, пиридазинил, пиримидинил, пиразинил, хинолинил, изохинолинил, хиназолинил, циннолинил, хинозалинил, нафтиридинил, бензофуранил, индолил, бензотиофенил, оксадиазолил, тиадиазолил, фенотиазолил, бензимидазолил, бензотриазолил, дибензофуранил, карбазолил, дибензотиофенил, акридинил и тому подобное. «Гетероарилен» означает двухвалентный аналог гетероарильной группы.

[0048] Если указано, что фрагмент может быть замещен, например, при использовании фразы «незамещенный или замещенный» или «необязательно замещенный», как в «незамещенном или замещенном C₁-C₅ алкиле» или «необязательно замещенном гетероариле», такой фрагмент может иметь один или несколько независимо выбранных заместителей, предпочтительно от одного до пяти, более предпочтительно от одного или двух. Заместители и схемы замещения могут быть выбраны специалистом в данной области техники с учетом фрагмента, к которому присоединен заместитель, для получения соединений, которые являются химически стабильными и которые могут быть синтезированы способами, известными в данной области техники, и способами, изложенными в данном описании. Если фрагмент идентифицирован как «незамещенный или замещенный» или «необязательно замещенный», в предпочтительном варианте осуществления такой фрагмент является незамещенным.

[0049] «Арилалкил», (гетероциклоалифатический)алкил, «арилалкенил», «арилалкинил», «биарилалкил» и тому подобное означают алкильный, алкенильный или алкинильный фрагмент, в зависимости от обстоятельств, замещенный арильным, гетероциклоалифатическим, биарильным и т. д., фрагментом, в зависимости от обстоятельств, с открытой (неудовлетворенной) валентностью у алкильного, алкенильного или алкинильного фрагмента, например, как в бензиле, фенетиле, N-

имидазоилэтиле, N-морфолиноэтиле и тому подобном. И наоборот, «алкиларил», «алкенилциклоалкил» и подобные означают арильный, циклоалкильный и т. д. фрагмент, в зависимости от обстоятельств, замещенный алкильным, алкенильным и т. д. фрагментом, в зависимости от обстоятельств, например, как в метилфениле (толил) или аллилциклогексиле. «Гидроксиалкил», «галогеналкил», «алкиларил», «цианоарил» и тому подобное означают алкильный, арильный и т.д. фрагмент, в зависимости от обстоятельств, замещенный одним или несколькими из идентифицированных заместителей (гидроксил, галоген, и т.д., в зависимости от обстоятельств).

[0050] Например, допустимые заместители включают, но не ограничиваются ими, алкил (особенно метил или этил), алкенил (особенно аллил), алкинил, арил, гетероарил, циклоалифатический, гетероцикло-алифатический, галоген (особенно фтор), галоидалкил (особенно трифторметил), гидроксил, гидроксиалкил (особенно гидроксиэтил), циано, нитро, алкокси, -O(гидроксиалкил), -O(галоалкил) (особенно -OCF₃), -O(циклоалкил), -O(гетероциклоалкил), -O(арил), алкилтио, арилтио, =O, =NH, =N(алкил), =NOH, =NO(алкил), -C(=O)(алкил), -C(=O)H, -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(алкил), -C(=O)O(гидроксиалкил), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(алкил), -C(=O)N(алкил)₂, -OC(=O)(алкил), -OC(=O)(гидроксиалкил), -OC(=O)O(алкил), -OC(=O)O(гидроксиалкил), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(алкил), -OC(=O)N(алкил)₂, азидо, -NH₂, -NH(алкил), -N(алкил)₂, -NH(арил), -NH(гидроксиалкил), -NHC(=O)(алкил), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(алкил), -NHC(=O)N(алкил)₂, -NHC(=NH)NH₂, -OSO₂(алкил), -SH, -S(алкил), -S(арил), -S(циклоалкил), -S(=O)алкил, -SO₂(алкил), -SO₂NH₂, -SO₂NH(алкил), -SO₂N(алкил)₂ и тому подобное.

[0051] В случае, если замещенный фрагмент представляет собой алифатический фрагмент, предпочтительные заместители представляют собой арил, гетероарил, циклоалифатическую группу, гетероциклоалифатическую группу, галоген, гидроксил, циано, нитро, алкокси, -O(гидроксиалкил), -O(галогеналкил), -O(циклоалкил), -O(гетероциклоалкил), -O(арил), алкилтио, арилтио, =O, =NH, =N(алкил), =NOH, =NO(алкил), -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(алкил), -C(=O)O(гидроксиалкил), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(алкил), -C(=O)N(алкил)₂, -OC(=O)(алкил), -OC(=O)(гидроксиалкил), -OC(=O)O(алкил), -OC(=O)O(гидроксиалкил), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(алкил), -OC(=O)N(алкил)₂, азидо, -NH₂, -NH(алкил), -N(алкил)₂, -NH(арил), -NH(гидроксиалкил), -NHC(=O)(алкил), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(алкил), -NHC(=O)N(алкил)₂, -NHC(=NH)NH₂, -OSO₂(алкил), -SH, -

S(алкил), -S(арил), -S(=O)алкил, -S(циклоалкил), -SO₂(алкил), -SO₂NH₂, -SO₂NH(алкил), -SO₂N(алкил)₂. Более предпочтительными заместителями являются галоген, гидроксид, циано, нитро, алкокси, -O(арил), =O, =NOH, =NO(алкил), -OC(=O)(алкил), -OC(=O)O(алкил), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(алкил), -OC(=O)N(алкил)₂, азидо, -NH₂, -NH(алкил), -N(алкил)₂, -NH(арил), -NHC(=O)(алкил), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(алкил), -NHC(=O)N(алкил)₂ и -NHC(=NH)NH₂. Особенно предпочтительными являются фенил, циано, галоген, гидроксид, нитро, C₁-C₄алкокси, O(C₂-C₄ алкилен)ОН и O(C₂-C₄ алкилен)галоген.

[0052] В случае, если замещенный фрагмент представляет собой циклоалифатический, гетероциклоалифатический, арильный или гетероарильный фрагмент, предпочтительные заместители представляют собой алкил, алкенил, алкинил, галоген, галогеналкил, гидроксид, гидроксипалкил, циано, нитро, алкокси, -O(гидроксипалкил), -O(галогеналкил), -O(арил), -O(циклоалкил), -O(гетероциклоалкил), алкилтио, арилтио, -C(=O)(алкил), -C(=O)H, -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(алкил), -C(=O)O(гидроксипалкил), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(алкил), -C(=O)N(алкил)₂, -OC(=O)(алкил), -OC(=O)(гидроксипалкил), -OC(=O)O(алкил), -OC(=O)O(гидроксипалкил), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(алкил), -OC(=O)N(алкил)₂, азидо, -NH₂, -NH(алкил), -N(алкил)₂, -NH(арил), -NH(гидроксипалкил), -NHC(=O)(алкил), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(алкил), -NHC(=O)N(алкил)₂, -NHC(=NH)NH₂, -OSO₂(алкил), -SH, -S(алкил), -S(арил), -S(циклоалкил), -S(=O)алкил, -SO₂(алкил), -SO₂NH₂, -SO₂NH(алкил) и -SO₂N(алкил)₂. Более предпочтительные заместители представляют собой алкил, алкенил, галоген, галогеналкил, гидроксид, гидроксипалкил, циано, нитро, алкокси, -O(гидроксипалкил), -C(=O)(алкил), -C(=O)H, -CO₂H, -C(=O)NHOH, -C(=O)O(алкил), -C(=O)O(гидроксипалкил), -C(=O)NH₂, -C(=O)NH(алкил), -C(=O)N(алкил)₂, -OC(=O)(алкил), -OC(=O)(гидроксипалкил), -OC(=O)O(алкил), -OC(=O)O(гидроксипалкил), -OC(=O)NH₂, -OC(=O)NH(алкил), -OC(=O)N(алкил)₂, -NH₂, -NH(алкил), -N(алкил)₂, -NH(арил), -NHC(=O)(алкил), -NHC(=O)H, -NHC(=O)NH₂, -NHC(=O)NH(алкил), -NHC(=O)N(алкил)₂ и -NHC(=NH)NH₂. Особенно предпочтительными являются C₁-C₄ алкил, циано, нитро, галоген и C₁-C₄ алкокси.

[0053] Если указан диапазон, как в «C₁-C₅ алкиле» или «от 5 до 10%», такой диапазон включает конечные точки диапазона, как в C₁ и C₅ в первом случае и 5% и 10% во втором случае.

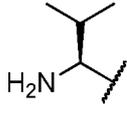
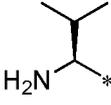
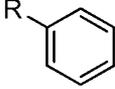
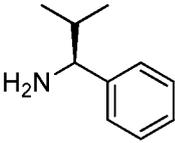
[0054] Если конкретные стереоизомеры не указаны конкретно (например, жирным или пунктирным шрифтом в соответствующем стереоцентре в структурной формуле, путем изображения двойной связи как имеющей E или Z-конфигурацию в структурной формуле, или путем использования обозначающей стереохимию номенклатуры), все стереоизомеры включены в объем изобретения, как чистые соединения, так и их смеси. Если не указано иное, индивидуальные энантиомеры, диастереомеры, геометрические изомеры, а также их комбинации и смеси охватываются настоящим изобретением.

[0055] Специалисты в данной области техники поймут, что соединения могут иметь таутомерные формы (например, кето- и енольные формы), резонансные формы и цвиттерионные формы, которые эквивалентны тем, которые изображены в структурных формулах, используемых в данном документе, и что структурные формулы охватывают такие таутомерные, резонансные или цвиттерионные формы.

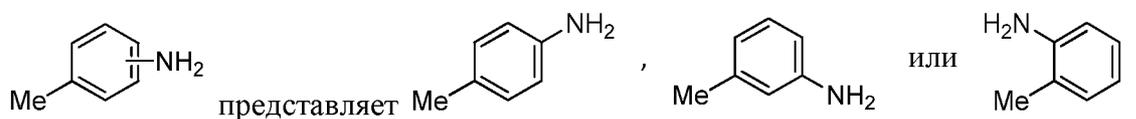
[0056] «Фармацевтически приемлемый сложный эфир» означает сложный эфир, который гидролизуется *in vivo* (например, в организме человека) с образованием исходного соединения или его соли или имеет активность как таковую, аналогичную активности исходного соединения. Подходящие сложные эфиры включают C₁-C₅ алкиловые, C₂-C₅ алкениловые или C₂-C₅ алкиниловые эфиры, особенно метиловый, этиловый или n-пропиловый.

[0057] «Фармацевтически приемлемая соль» означает соль соединения, подходящую для фармацевтического состава. Если соединение имеет одну или несколько основных групп, соль может быть кислотно-аддитивной солью, такой как сульфат, гидробромид, тартрат, мезилат, малеат, цитрат, фосфат, ацетат, памоат (эмбонат), гидроиодид, нитрат, гидрохлорид, лактат, метилсульфат, фумарат, бензоат, сукцинат, мезилат, лактобионат, суберат, тозилат и тому подобное. Если соединение имеет одну или несколько кислотных групп, соль может быть солью, такой как соль кальция, соль калия, соль магния, соль меглумина, соль аммония, соль цинка, соль пиперазина, соль трометамина, соль лития, соль холина, соль диэтиламина, соль 4-фенилциклогексиламина, соль бензатина, соль натрия, соль тетраметиламмония и тому подобное. Полиморфные кристаллические формы и сольваты также входят в объем данного изобретения.

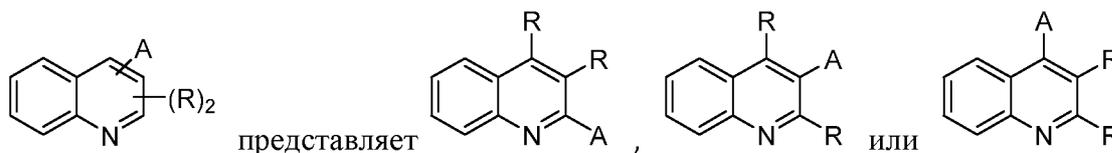
[0058] В формулах данного описания волнистая линия () , поперечная по отношению к связи, или звездочка (*) на конце связи обозначают сайт ковалентного

связывания. Например, утверждение, что R представляет собой  или что R представляет собой  в формуле , означает .

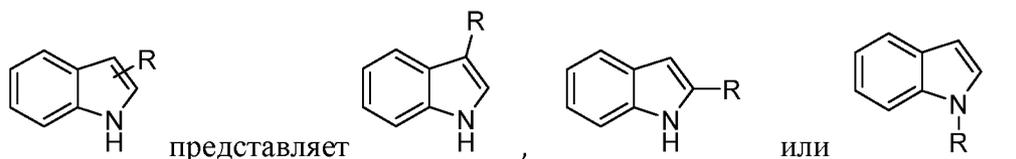
[0059] В формулах данного описания связь, проходящая через ароматическое или гетероароматическое кольцо между двумя его атомами углерода, означает, что группа, присоединенная к связи, может находиться в любом из положений ароматического или гетероароматического кольца, становящегося доступным путем удаления водорода, который неявно присутствует. В качестве иллюстрации, формула



[0060] В других фигурах



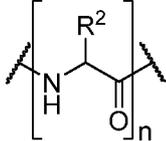
и

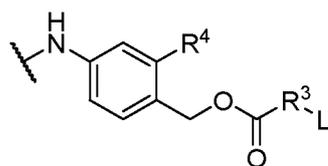


[0061] Обычно таутомерные структуры представлены в данном документе в форме енола для обеспечения согласованности и удобства. Специалисты в данной области техники поймут, что они также могли быть представлены в эквивалентной кето-форме и что два таутомера эквивалентны.

СОЕДИНЕНИЯ

[0062] Авторы изобретения обнаружили, что размещение заместителя R⁴ в *орто*-положении по отношению к бензилоксикарбонильной группе в фрагменте PABC

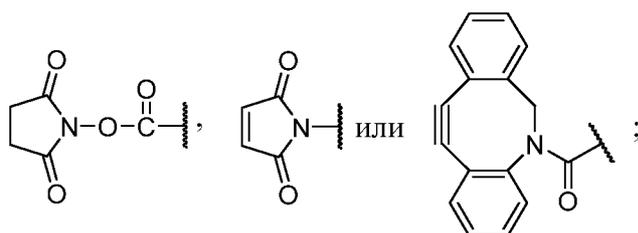
существенно ингибирует расщепление связи между пептидом  и



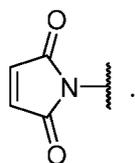
замещенной группой RABC в сыворотке крови мыши, но, тем не менее, существенно не ингибирует расщепление той же связи катепсином В, о чем свидетельствуют данные, представленные ниже. Следовательно, описанные в данном документе соединения могут быть конъюгированы с антителами, которые поддаются оценке на моделях на мышах.

[0063] Под существенным ингибированием расщепления вышеупомянутой связи сывороткой крови мышей авторы изобретения подразумевают, что расщепление составляет 10% или менее, предпочтительно 6% или менее расщепления через 24 часа в условиях, описанных в разделе ПРИМЕРЫ ниже. Напротив, под несущественным ингибированием расщепления вышеупомянутой связи катепсином В авторы изобретения подразумевают, что расщепление составляет 90% или более через 24 часа в условиях, описанных в разделе ПРИМЕРЫ ниже.

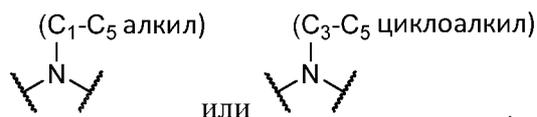
[0064] В формулах (I) предпочтительно R¹ представляет собой H, CH₃, NH₂, N₃,



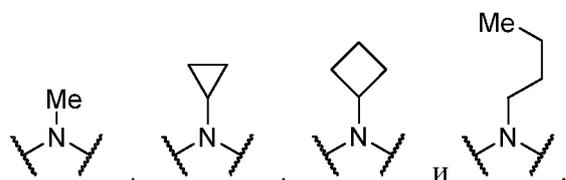
причем особенно предпочтительными являются NH₂ и



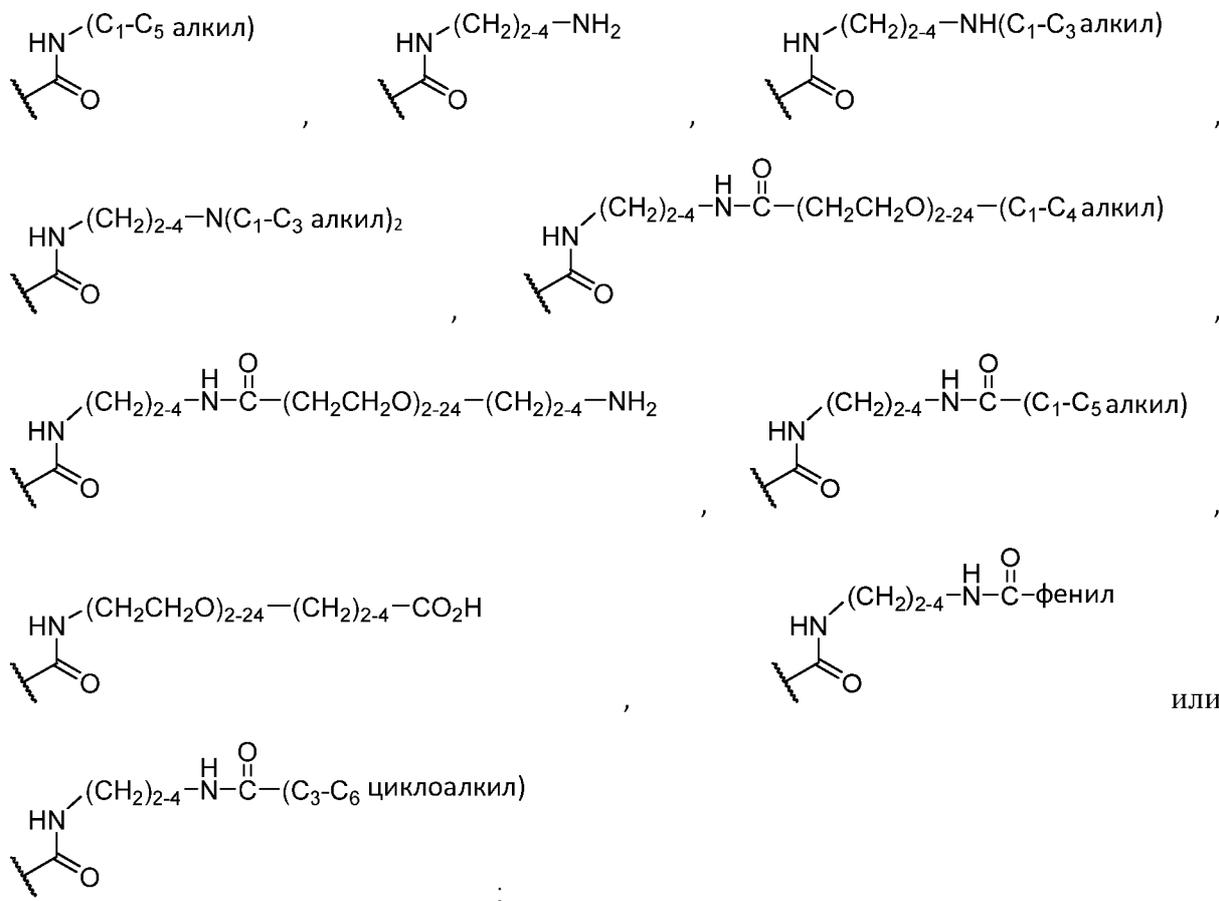
[0065] В формулах (I) и (II) предпочтительно R³ представляет собой NH,



[0066] Особенно предпочтительные R³ представляют собой NH,

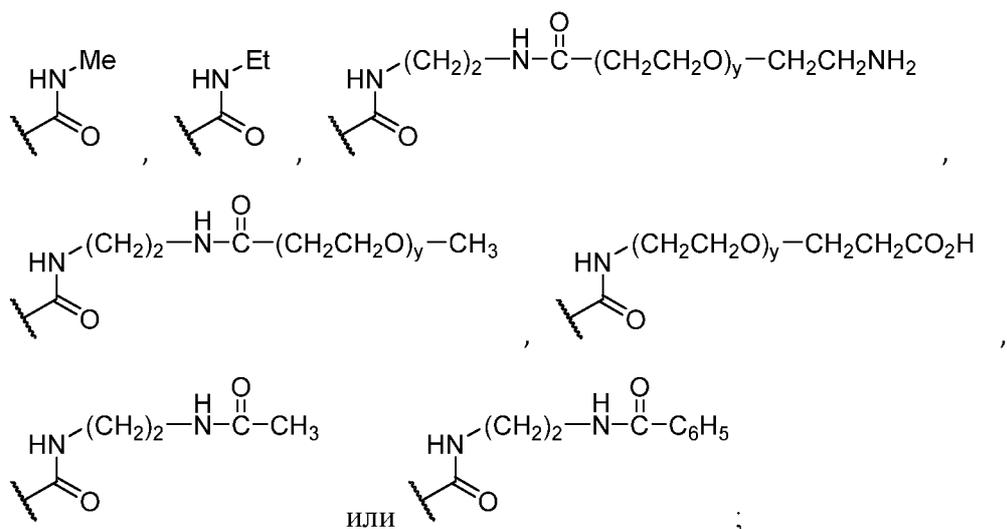


[0067] В формулах (I) и (II) R⁴ предпочтительно представляет собой



фенильную или C₃-C₆ циклоалкильную группу, необязательно замещенную F, Cl, CN, NO₂ или C₁-C₃ алкилом.

[0068] R⁴ более предпочтительно представляет собой

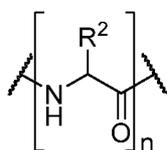


где y равно 4, 8, 12 или 24.

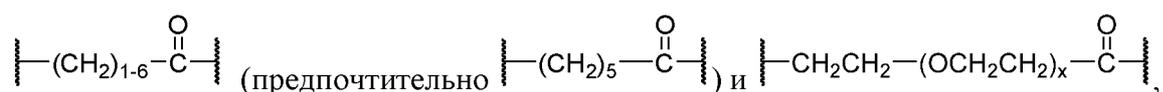
[0069] Предпочтительно в формулах (I) и (II) R² представляет собой остаток боковой цепи аминокислоты, выбранной из валина (Val), глутаминовой кислоты (Glu), цитруллина (Cit), лизина (Lys), аланина (Ala), фенилаланина (Phe), аргинина (Arg) и глицина (Gly).

[0070] Предпочтительно в формулах (I) и (II) пептидная группа представляет собой группу, которая расщепляется катепсином В, но стабильна в сыворотке крови человека. Примеры таких пептидных групп включают (перечислены в направлении от N к C): Val-Cit, Glu-Val-Cit, Phe-Lys, Phe-Arg, Val-Lys, Ala-Lys, Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Val-Ala, Ala-Val-Cit и Val-Gly.

[0071] Поскольку пептид

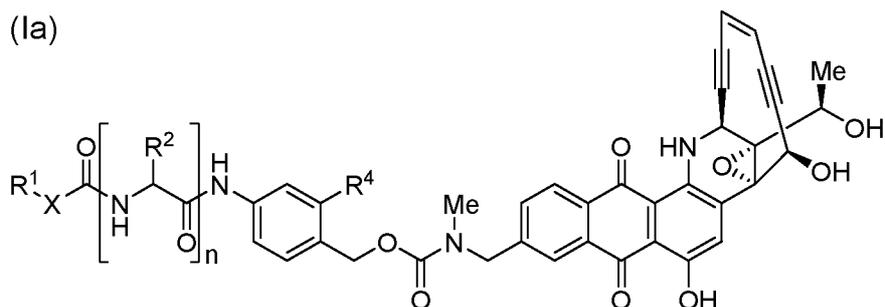


ориентирован в направлении от N к C (от amino к карбоксилу), спейсерная группа X соединяет N-конец пептида с R¹. Обычно X включает карбонильную группу, образующую амидную связь с N-концом пептида, но вместо этого X может быть связан с функциональной группой в боковой цепи концевой аминокислоты, такой как карбоксильная группа Glu или Asp. Когда R¹ представляет собой алкил, X может быть просто карбонилем (C=O). Другие варианты осуществления X представляют собой:



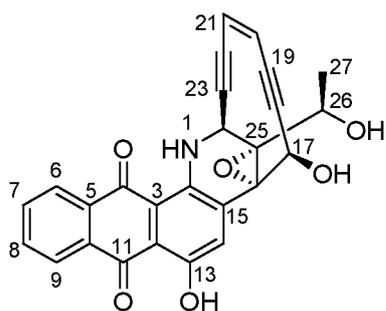
где x представляет собой целое число от 2 до 24 включительно, предпочтительно 2, 4 или 8.

[0072] В одном варианте осуществления соединения формулы (I) представлены формулой (Ia):

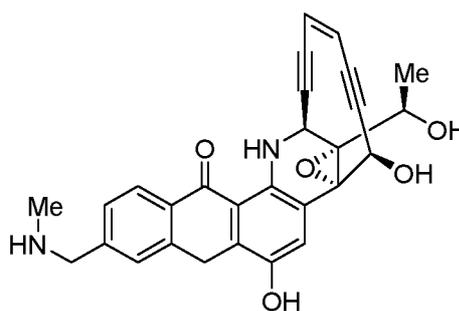


(Вышеуказанные предпочтения для R¹, X, R² и R⁴ в контексте формулы (I) также применимы к формуле (Ia).)

[0073] В формуле (Ia) биоактивная молекула, соответствующая L-R³H, представляет собой 8-аминометил-унциаламицин (Nicolaou *et al.*, US 9777013 B2 (2017)), синтетический аналог природного продукта унциаламицина (Davies *et al.*, *Org. Lett.* **2005**, 7 (23), 5233), который представляет собой цитотоксин, обладающий противоопухолевыми свойствами.



Унциаламицин



8-аминометил-унциаламицин

[0074] Примеры соединений согласно формуле (Ia) показаны в таблице А.

Таблица А - Соединения согласно формуле (Ia)

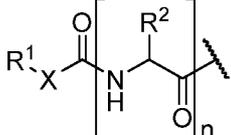
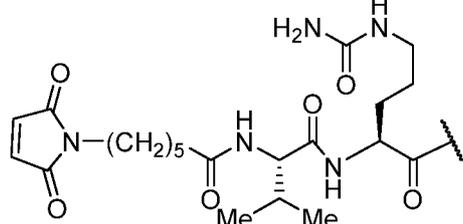
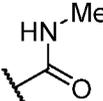
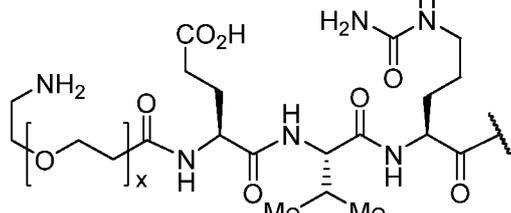
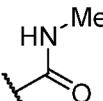
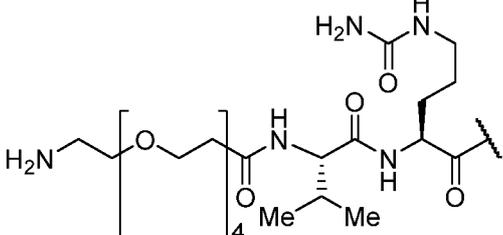
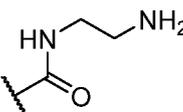
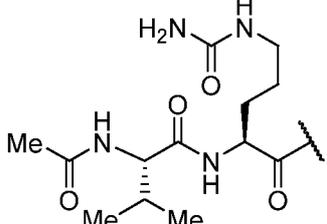
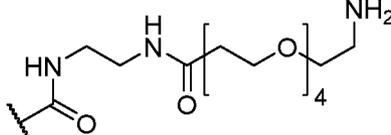
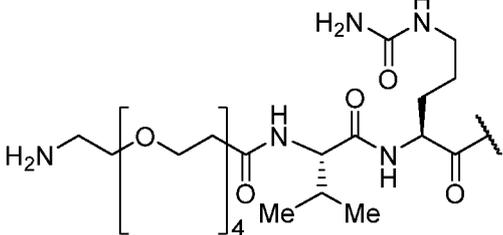
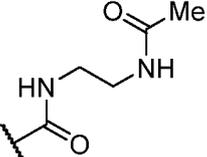
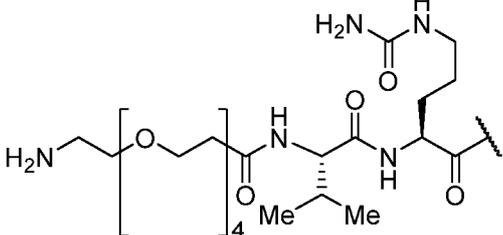
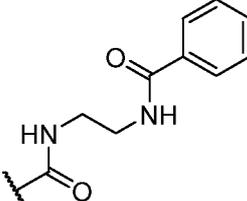
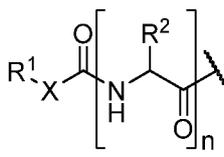
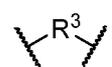
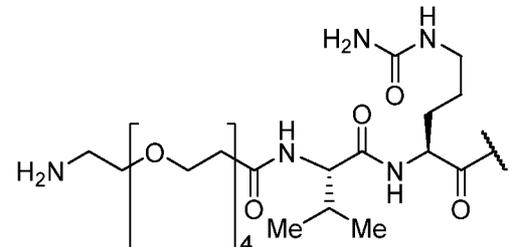
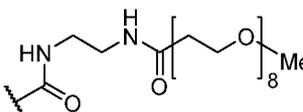
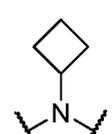
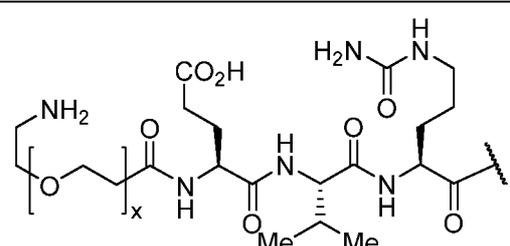
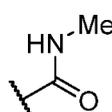
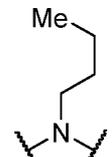
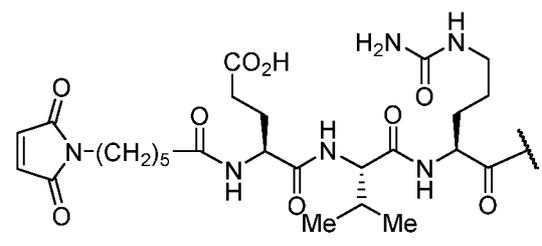
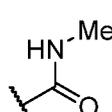
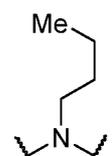
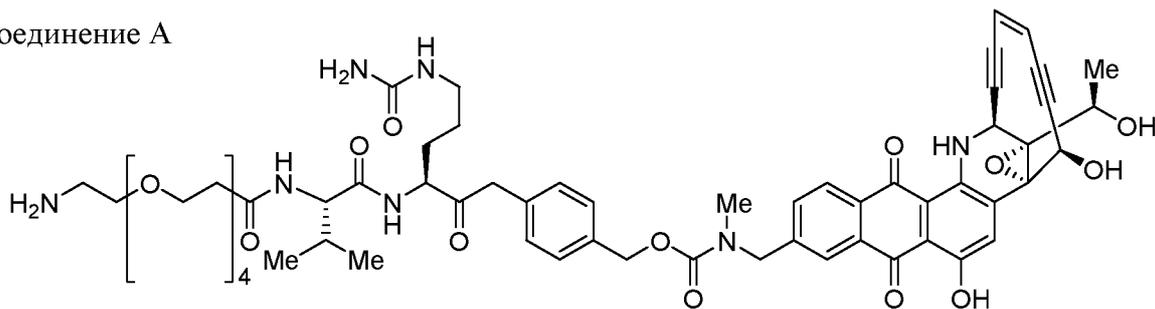
Соединение		
(Ia-01)		
(Ia-02) (x = 8) (Ia-03) (x = 4) (Ia-04) (x = 2)		
(Ia-05)		
(Ia-06)		
(Ia-07)		
(Ia-08)		

Таблица В - Соединения согласно формуле (Ib)			
Соединение			
(Ib-01)			
(Ib-02) x = 2 (Ib-03) x = 4 (Ib-04) x = 8			
(Ib-05)			

[0078] Таблица С показывает, как соединения, имеющие *орто*-заместитель по отношению к бензилоксикарбонильной группе в группе РАВС, как раскрыто в данном документе, стабильны как в сыворотке крови человека, так и в сыворотке крови мыши (или имеют улучшенную стабильность в сыворотке крови мыши), но все же расщепляются катепсином В. Напротив, два контроля с незамещенной группой РАВС, один, нагруженный 8-аминометил-унциаламицином (соединение А), и один, нагруженный агонистом TLR7 (соединение В), были оба нестабильны в сыворотке крови мыши.

Соединение А



Соединение В

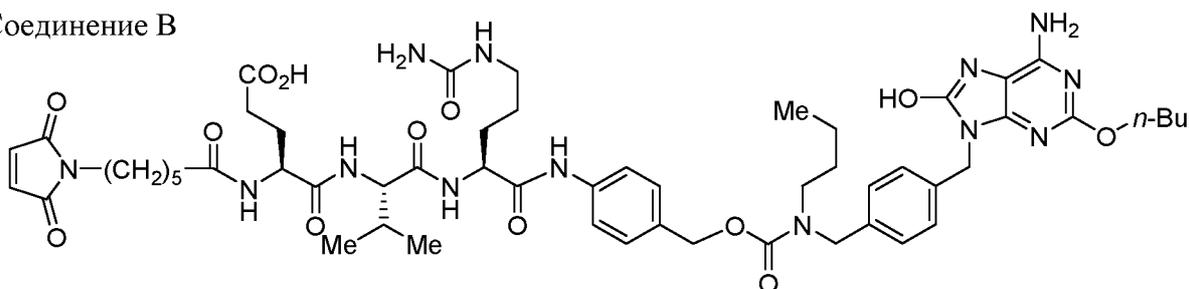


Таблица С - Стабильность соединений в сыворотке крови человека и мыши и расщепление катепсином В			
Соединение	Стабильность в сыворотке крови человека (% расщепленного через 24 часа)	Стабильность в сыворотке мыши (% расщепленного через 24 часа)	Расщепление катепсином В (% расщепленного через 24 часа)
Соединение А	0	100	100
Соединение В	0	50	100
(Ia-01)	0	50	100
(Ia-03)	0	7	100
(Ia-05)	0	3	100
(Ia-06)	0	6	100
(Ib-01)	0	3	100
(Ib-05)	0	2	100

КОНЬЮГАТЫ

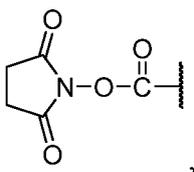
[0079] Конъюгаты формулы (II) могут быть получены из антитела и соединения формулы (I) множеством способов в соответствии с идентичностью группы R¹.

[0080] Когда R¹ представляет собой группу OH, она может быть этерифицирована карбоксильной группой на антителе, например, на боковой цепи

аспарагиновой кислоты или глутаминовой кислоты или на С-конце тяжелой или легкой цепи антитела.

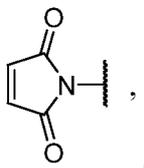
[0081] Когда R^1 представляет собой группу CO_2H , она может быть этерифицирована ОН-группой на антителе, например, в боковой цепи остатка серина, или амидирована аминогруппой на антителе, такой как боковая цепь лизина.

[0082] Когда R^1 представляет собой сложный эфир N-гидроксисукцинимида

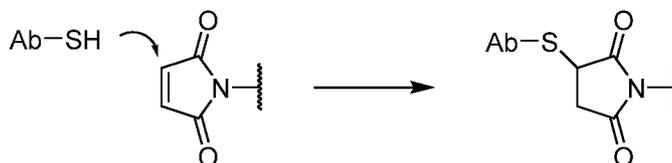


он функционально является активированной карбоксильной группой и может быть амидирован путем реакции с аминогруппой (например, из лизина) в антителе.

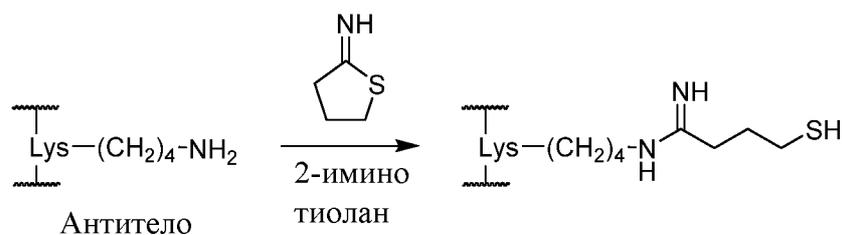
[0083] В одном предпочтительном варианте осуществления R^1 представляет собой малеимидную группу,



которая может быть конъюгирована с SH-группой на антителе (например, из цистеина или из химической модификации антитела для введения сульфгидрильной функциональной группы) в реакции присоединения Михаэля.



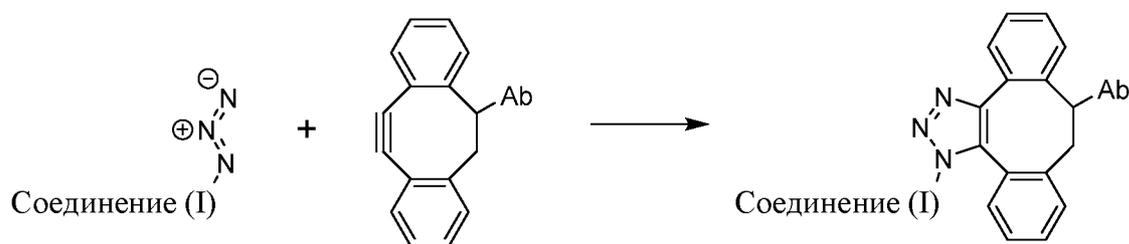
[0084] Когда антитело не имеет цистеиновой SH-группы, доступной для конъюгации (большинство цистеиновых SH-групп антитела связаны дисульфидными связями), ϵ -аминогруппа в боковой цепи остатка лизина может реагировать с 2-иминотиоланом или N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)-пропионатом («SPDP») для введения свободной тиоловой (-SH) группы, создавая как бы заменитель цистеина, который затем можно использовать для конъюгации.



[0085] Обычно достигается уровень тиолирования от двух до трех тиоловых групп на антитело. Для репрезентативной процедуры см. Cong *et al.*, US 8,980,824 B2 (2015), раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0086] В обратном порядке, антитело может быть модифицировано N-сукцинимидил-4-(maleimidomethyl)cyclohexanecarboxylate («SMCC») или его сульфированным вариантом сульфо-SMCC, оба из которых коммерчески доступны, для введения к нему maleimidной группы. Затем можно провести конъюгацию с соединением формулы (I), где R¹ представляет собой SH.

[0087] В альтернативном способе конъюгации используется способ «клик-химии» без участия соединений меди, при котором азидная группа присоединяется через напряженный циклооктин с образованием 1,2,3-триазольного кольца. См., например, Agard *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046; Best, *Biochemistry* **2009**, *48*, 6571, описания которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Азид может находиться на антителе, и циклооктин может находиться на соединении формулы (I), или наоборот. Предпочтительной циклооктиновой группой является дибензоциклооктин (DIBO). Различные реагенты, имеющие группу DIBO, доступны от Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, Oregon. Реакция ниже иллюстрирует конъюгацию посредством клик-химии для случая, при котором группа DIBO присоединяется к антителу (Ab):

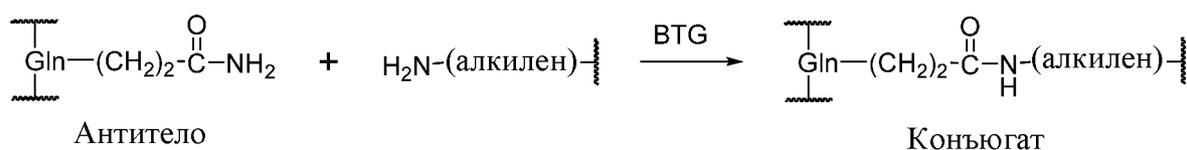


[0088] Еще один способ конъюгации включает введение неприродной аминокислоты в антитело, при этом неприродная аминокислота обеспечивает функциональную группу для конъюгации с реакционноспособной функциональной группой в фрагменте лекарственного средства. Например, неприродная аминокислота

п-ацетилфенилаланин может быть включена в антитело или другой полипептид, как указано в Tian *et al.*, WO 2008/030612 A2 (2008). Кетонная группа в п-ацетилфенилаланине может быть сайтом конъюгации через образование оксима с гидроксиламиногруппой на фрагменте линкер-лекарственное средство. Альтернативно, неприродная аминокислота п-азидофенилаланин может быть включена в антитело, чтобы обеспечить азидную функциональную группу для конъюгации с помощью клик-химии, как обсуждалось выше. Неприродные аминокислоты также могут быть включены в антитело или другой полипептид с использованием бесклеточных способов, как описано в Goerke *et al.*, US 2010/0093024 A1 (2010) и Goerke *et al.*, Biotechnol. Bioeng. **2009**, 102 (2), 400-416.

[0089] В предпочтительном варианте осуществления R¹ представляет собой NH₂, что позволяет проводить конъюгирование с использованием фермента трансглутаминазы.

[0090] Трансглутаминаза (предпочтительно бактериальная трансглутаминаза из *Streptomyces mobaraensis* или BTG) образует амидную связь между карбоксамидом боковой цепи глутамина (акцептор амина) и алкиленаминогруппой (донор амина), которая может быть, например, ε-аминогруппой лизина или 5-амино-н-пентильной группой (Jeger *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 9995). Алкиленаминогруппа может быть в соединении формулы (I), где R¹ представляет собой NH₂.



[0091] Расположение остатка глутамина на полипептидной цепи оказывает большое влияние на ее восприимчивость к трансамидированию, опосредованному BTG. Ни один из остатков глутамина в антителе обычно не является субстратом BTG. Однако, если антитело дегликозилировано, тогда сайт гликозилирования представляет собой аспарагин 297 (N297; нумерация в соответствии с индексом ЕС, как указано в Kabat *et al.*, «Sequences of the Protein Immunological Interest», 5th ed., Pub. No. 91-3242, Департамент здравоохранения и социальных служб США, NIH, Bethesda, Md., 1991; далее «Kabat») тяжелой цепи, и соседний глутамин 295 (Q295) становится чувствительным к BTG. Антитело может быть ферментативно дегликозилировано обработкой PNGазой F (пептид-N-гликозидаза F). Альтернативно, антитело можно

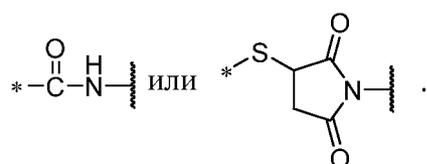
синтезировать без гликозидов путем введения мутации N297A в константную область, чтобы устранить сайт гликозилирования N297. Кроме того, было показано, что замена N297Q не только устраняет гликозилирование, но также вводит второй остаток глутамина (в положении 297), который также является акцептором амина. Таким образом, в одном варианте осуществления антитело дегликозилировано. В другом варианте осуществления антитело имеет замену N297Q. Специалисты в данной области техники поймут, что дегликозилирование посредством модификации после синтеза или путем введения мутации N297A генерирует два VTG-реактивных остатка глутамина на антитело (по одному на тяжелую цепь в положении 295), тогда как антитело с заменой N297Q будет иметь четыре VTG-реактивных остатка глутамина (по два на тяжелую цепь в положениях 295 и 297).

[0092] Антитело также можно сделать восприимчивым к VTG-опосредованной конъюгации путем введения в него глутаминсодержащего пептида или «метки», как указано, например в Pons *et al.*, US 2013/0230543 A1 (2013) и Rao-Naik *et al.*, WO 2016/144608 A1.

[0093] В дополнительном подходе субстратная специфичность VTG может быть изменена путем изменения его аминокислотной последовательности, так что он становится способным реагировать с глутамином 295 в немодифицированном антителе, как указано в Rao-Naik *et al.*, WO 2017/059158 A1 (2017).

[0094] Хотя наиболее широко доступной бактериальной трансглутаминазой является трансглутаминаза из *S. mobaraensis*, можно рассмотреть трансглутаминазу из других бактерий, обладающих несколько иной субстратной специфичностью, например, трансглутаминазу из *Streptovercillium ladakanum* (Hu *et al.*, US 2009/0318349 A1 (2009), US 2010/0099610 A1 (2010) и US 2010/0087371 A1 (2010)).

[0095] Предпочтительно, в конъюгате формулы (II) R⁵ представляет собой



[0096] Многие различные антитела могут быть конъюгированы с соединением формулы (I). Предпочтительно антитело представляет собой антитело против ассоциированного с опухолью антигена, позволяющее избирательно нацеливаться на

раковые клетки. Примеры таких антигенов включают: мезотелин, специфический мембранный антиген простаты (PSMA), CD19, CD22, CD30, CD70, B7H3, B7H4 (также известный как O8E), протеинтирозинкиназу 7 (PTK7), глипикан-3, RG1, фукозил-GM1, CTLA-4 и CD44. Антитело может быть животным (например, мышинным), химерным, гуманизированным или, предпочтительно, человеческим. Антитело предпочтительно является моноклональным, особенно моноклональным человеческим антителом. Получение человеческих моноклональных антител против некоторых из вышеупомянутых антигенов описано в Korman *et al.*, US 8,609,816 B2 (2013; B7H4, также известно как O8E; в частности, антитела 2A7, 1G11 и 2F9); Rao-Naik *et al.*, 8097703 B2 (2012; CD19; в частности, антитела 5G7, 13F1, 46E8, 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3 и 3C10); King *et al.*, US 8,481,683 B2 (2013; CD22; в частности, антитела 12C5, 19A3, 16F7 и 23C6); Keler *et al.*, US 7,387,776 B2 (2008; CD30; в частности, антитела 5F11, 2H9 и 17G1); Terrett *et al.*, US 8,124,738 B2 (2012; CD70; в частности, антитела 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 и 69A7); Korman *et al.*, US 6,984,720 B1 (2006; CTLA-4; в частности, антитела 10D1, 4B6 и 1E2); Vistica *et al.*, US 8,383,118 B2 (2013 г., фукозил-GM1, в частности антитела 5B1, 5B1a, 7D4, 7E4, 13B8 и 18D5); Korman *et al.*, US 8 008 449 B2 (2011; PD-1; в частности, антитела 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 и 5F4); Huang *et al.*, US 2009/0297438 A1 (2009; PSMA, в частности, антитела 1C3, 2A10, 2F5, 2C6); Cardarelli *et al.*, US 7 875 278 B2 (2011; PSMA; в частности, антитела 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 и 1C3); Terrett *et al.*, US 8 222 375 B2 (2012; PTK7; в частности, антитела 3G8, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8); Terrett *et al.*, US 8680247 B2 (2014; глипикан-3; в частности, антитела 4A6, 11E7 и 16D10); Harkins *et al.*, US 7,335,748 B2 (2008; RG1; в частности, антитела A, B, C и D); Terrett *et al.*, US 8 268 970 B2 (2012 г.; мезотелин; в частности, антитела 3C10, 6A4 и 7B1); Xu *et al.*, 2010/0092484 A1 (2010; CD44; в частности, антитела 14G9.B8.B4, 2D1.A3.D12 и 1A9.A6.B9); Deshpande *et al.*, US 8,258,266 B2 (2012; IP10; в частности, антитела 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S и 13C4); Kuhne *et al.*, US 8,450,464 B2 (2013; CXCR4; в частности, антитела F7, F9, D1 и E2); и Korman *et al.*, US 7,943,743 B2 (2011; PD-L1; в частности, антитела 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4); раскрытия которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

[0097] Практика данного изобретения может быть дополнительно понята из следующих примеров, которые предоставлены в качестве иллюстрации, но не ограничения.

[0098] В таблице после примеров перечислены акронимы и аббревиатуры, используемые в данном документе, и их значение.

Пример 1 – Стабильность в сыворотке крови

[0099] Следующая процедура была использована для тестирования стабильности линкеров в сыворотке крови мышей, крыс или человека.

[00100] 5 мкл тестируемого соединения (0,5 мМ в DMSO) переносили отдельно в отдельные пробирки, содержащие 120 мкл 1X фосфатно-солевого буфера, сыворотки крови мыши, крысы или человека. Образцы инкубировали при 37 °С в течение 0, 1, 2, 4 и 24 часов. После каждой временной точки из образцов отбирали аликвоту по 20 мкл и гасили с 60 мкл смеси MeOH:ацетонитрил:муравьиная кислота в соотношении 75:25:0,1. После гашения реакции все образцы выдерживали при -20 °С в течение 1 часа и затем центрифугировали при 14000 оборотах в минуту в течение 15 минут. Супернатант переносили в чистый флакон и хранили при -20 °С до анализа.

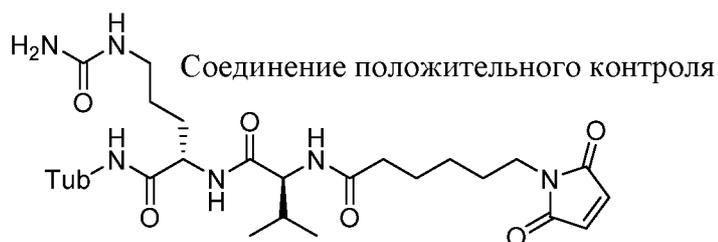
[00101] Образцы анализировали с помощью ЖХ-МС/МС на масс-спектрометре Agilent 6530 Q-TOF, соединенным с Agilent 1290 UPLC. 3 мкл образцов вводили в колонку Waters BEH C18 (2,1 x 50 мм, 1,7 мкм), поддерживаемую при температуре 60 °С. Соединения элюировали из колонки при скорости потока 0,4 мл/мин, с использованием градиента 0,1% муравьиной кислоты в воде и 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Общее время пробега составляет 9,5 мин.

Пример 2 - Расщепление катепсином В

[00102] Следующую процедуру использовали для тестирования расщепления линкеров катепсином В.

[00103] 7,5 мкл тестируемого соединения (0,5 мМ в DMSO) переносили в индивидуальную пробирку, содержащую 135 мкл буфера катепсина В (25 мМ ацетат натрия, 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT, pH 5,5), и расщепление начинали с добавления 7,5 мкл разведенного фермента катепсина В (активированного, 1,45 мкМ, 0,1 единиц). Образцы инкубировали при 37 °С в течение 24 часов. Через 24 ч отбирали аликвоту 20 мкл и гасили с 80 мкл смеси MeOH:ацетонитрил:муравьиная кислота в соотношении

75:25:0,1. Отрицательный контроль также был включен, без добавления катепсина В. Контрольное соединение (структура ниже) расщепляли аналогичным образом и включали в качестве положительного контроля. После гашения реакции все образцы выдерживали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 часа и затем центрифугировали со скоростью 14000 оборотов в минуту в течение 5 мин. Супернатант переносили в чистую пробирку и помещали в автосамплер UPLC для анализа, в соответствии с методикой предыдущего примера.



[00104] В приведенной выше структуре «Tub» обозначает аналог тубулизина (Cheng *et al.*, US 8,394,922 B2 (2013)). Дипептид валин-цитруллин (Val-Cit) является известным субстратом для катепсина В.

Пример 3 - Получение конъюгатов с использованием трансглутаминазы

[00105] Следующая процедура может быть использована для опосредованной трансглутаминазой конъюгации линкерных соединений, где линкер имеет аминогруппу, которая может действовать как донор амина (например, соединения от **Ia-02** до **Ia-12** и от **Ib-01** до **Ib-04**). Антитело может быть антителом, содержащим глутамин, реагирующий с трансглутаминазой, например, с заменой N297A или N297Q. Конъюгация осуществляется рекомбинантной бактериальной трансглутаминазой с молярным соотношением антитело:фермент, равным 5:1. Конъюгацию проводят с использованием стандартных протоколов в 50 мМ Трис-буфере, pH 8,0, инкубируют в течение ночи при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Полученный конъюгат очищают на колонке с протеином А, предварительно уравновешенной 50 мМ Трис, pH 8,0. Конъюгат элюируют 0,1 М натрийцитратным буфером, pH 3,5. Элюированные фракции нейтрализуют 1М Трис pH 9,0. Конъюгат может быть приготовлен в 20 мг/мл сорбита, 10 мг/мл глицина, pH 5,0

[00106] **ФИГ. 1** подтверждает, что ADC, содержащие модифицированный SI-фрагмент, как раскрыто в данном документе, эффективны при противоопухолевом лечении на мышинной модели с использованием раковых клеток H226 (мезотелиомы), которые экспрессируют мезотелин, но не CD70. График показывает, что ADC,

полученный с использованием соединения (**Ia-03**) и моноклонального антитела против мезотелина (Terrett *et al.*, US 8 268 970 B2 (2012)), уменьшал объем опухоли через 35 дней по сравнению с контролями, состоящими из буфера для композиции или ADC, полученного с использованием соединения (**Ia-03**) и моноклонального антитела против CD70 (Terrett *et al.*, US 8,124,7 38 B2 (2012)). В анти-CD70 ADC отсутствие экспрессии антигена CD70 клетками H226 не позволяет антителу против CD70 быть эффективным нацеливающим агентом для ADC. (Как анти-мезотелин, так и анти-CD70 были модифицированы заменой N297A, чтобы сделать их подходящими акцепторами амина для конъюгации, опосредованной трансглутаминазой.)

Пример 4 - Получение конъюгатов присоединением малеимида по Михаэлю

[00107] Данная общая процедура основана на введении свободных тиоловых групп в антитело с помощью реакции взаимодействия ϵ -аминогрупп лизина с 2-иминотиоланом, с последующей реакцией взаимодействия с малеимид-содержащим линкером, таким как соединения **Ia-01** и **Ib-05**. Первоначально буфер антитела заменяют на 0,1 М фосфатный буфер (pH 8,0), содержащий 50 мМ NaCl и 2 мМ ДТРА, и концентрируют до 5-10 мг/мл. Тиолирование достигается путем добавления к антителу 2-иминотиолана. Количество добавляемого 2-иминотиолана может быть определено предварительным экспериментом и варьируется от антитела к антителу. В предварительном эксперименте проводится титрование возрастающими количествами 2-иминотиолана, добавляемыми к антителу, и после инкубации с антителом в течение 1 часа при комнатной температуре антитело обессоливают в 50 мМ HEPES, 5 мМ глицина, 2 мМ ДТРА, pH 5,5 с использованием колонки с SEPHADEX™ G-25, и количество введенных тиоловых групп быстро определяют реакцией с DTDP. Взаимодействие тиоловых групп с DTDP приводит к высвобождению тиопиридина, которое можно контролировать спектроскопически при 324 нм. Обычно используются образцы с концентрацией белка от 0,5 до 1,0 мг/мл. Поглощение при 280 нм можно использовать для точного определения концентрации белка в образцах, и затем аликвоту каждого образца (0,9 мл) инкубируют с 0,1 мл DTDP (5 мМ исходный раствор в этаноле) в течение 10 минут при RT. Одновременно инкубируют контрольные образцы, содержащие только буфер плюс DTDP. Через 10 мин измеряют оптическую плотность при 324 нм и количественно определяют количество тиоловых групп, используя коэффициент экстинкции тиопиридина, равный 19800 M⁻¹.

[00108] Как правило, достигается уровень тиолирования от двух до трех тиоловых групп на антитело. Например, с некоторыми антителами это может быть достигнуто путем добавления 15-кратного молярного избытка 2-иминотиолана с последующей инкубацией при RT в течение 1 часа. Антитело затем инкубируют с 2-иминотиоланом при требуемом молярном соотношении и затем обессоливают в буфере для конъюгации (50 mM HEPES, 5 mM глицин, 2 mM DTPA, pH 5,5). Тиолированный материал поддерживается на льду, в то время как количество введенных тиоловых групп определяют количественно, как описано выше.

[00109] После проверки количества введенных тиоловых групп добавляют фрагмент лекарственное средство-линкер в 2,5-кратном молярном избытке в пересчете на тиоловую группу. Реакцию конъюгации проводят в буфере для конъюгации, содержащем конечную концентрацию 25% пропиленгликоля и 5% трегалозы. Обычно, исходный раствор линкера растворяют в 100% DMSO. Исходный раствор добавляют непосредственно к тиолированному антителу.

[00110] Реакционную смесь для проведения конъюгации инкубируют при RT в течение 2 ч при осторожном перемешивании. Затем к смеси для конъюгации добавляют 10-кратный молярный избыток N-этилмалеимида (100 mM исходное количество в DMSO) и перемешивают в течение дополнительного часа для блокирования любых непрореагировавших тиолов. Образец затем фильтруют через фильтр с размером пор 0,2 мкм. Буфер материала заменяют через мембрану TFF VivaFlow 50 Sartorius 30 MWCO PES на 10 мг/мл глицин, 20 мг/мл сорбитол, 15% ацетонитрил, pH 5,0 (5-кратный объем замены буфера TFF) для удаления любого непрореагировавшего лекарственного средства. Окончательный состав получают с помощью TFF в 20 мг/мл сорбитола, 10 мг/мл глицина, pH 5,0.

Пример 5 - Тестирование модели мыши

[00111] Следующая процедура может использоваться для типа тестирования мышинной модели, представленного на **ФИГ. 1**.

[00112] Раковые клетки (мезотелиома H226 в примере на **ФИГ. 1**), ресуспендированные в 0,1 мл фосфатно-солевого буфера («PBS») плюс 0,1 мл матригеля, имплантируют подкожно в боковую область мышей SCID. Измерения опухолей начинают через 28 дней, и мышей случайным образом разделяют на группы по 7 мышей, каждая с приблизительно одинаковым размером опухоли (в мм³,

оцениваемых по LWH/2 опухолей; приблизительно 135 мм³ в примере на **ФИГ. 1**). Через 29 дней после имплантации опухоли мышам вводят однократно внутривентриально тестируемый конъюгат.

Пример 6 - Синтез соединений по схеме А

[00113] Данный пример и **ФИГ. 1А-1В** относятся к схеме А синтеза соединений, раскрытых в данном документе, с особой ссылкой на соединение **1а-03**.

[00114] *Соединение 2.* Смесь 6-аминоизобензофуран-1(3H)-она **1** (1,0 г, 6,70 ммоль) и метанамина (2M в MeOH, 16,76 мл, 33,5 ммоль) в DCM (5 мл) перемешивали в течение 3 дней. ЖХМС (M+N-H₂O=163,0) показала присутствие продукта с раскрытым кольцом. Растворитель выпаривали с получением соединения **2** в виде бесцветной пасты (количественный выход).

[00115] *Соединение 3.* К раствору (S)-2-((S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентановой кислоты (Fmoc-Val-Cit, 1,681 г, 3,39 ммоль) и соединения **2** (1,22 г, 6,77 ммоль) в THF (5 мл) добавляли EEDQ (1,674 г, 6,77 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при RT в течение ночи. ЖХМС (M+N-H₂O=659,3) показала образование продукта. Реакционную смесь очищали непосредственно на колонке COMBIFLASH™, используя 40 г силикагеля и элюируя смесью от 0 до 100% MeOH/DCM, получая соединение **3** (выход 53%).

[00116] *Соединение 4.* К раствору соединения **3** (206 мг, 0,313 ммоль) в DMF (1 мл) добавляли бис(4-нитрофенил)карбонат (190 мг, 0,625 ммоль) и затем DIEA (0,164 мл, 0,938 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при RT в течение 3 ч, после чего ЖХМС (M+N = 824,3) показала образование продукта. Продукт вводили непосредственно в колонку COMBIFLASH™ (40 г силикагель) и элюировали смесью от 0 до 100% MeOH/DCM с получением соединения **4** в виде белого твердого вещества (выход 50%).

[00117] *Соединение 6.* К раствору соединения **5** (26 мг, 0,054 ммоль) в DMF (0,5 мл) добавляли соединение **4** (66,6 мг, 0,081 ммоль) с последующим добавлением 2,6-лутидина (0,013 мл, 0,108 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при RT в течение 3 ч, после чего ЖХМС (M+N=1167,3) показала завершение реакции с образованием промежуточного аддукта. Реакционную смесь обрабатывали насыщенным водным раствором NaHCO₃/EtOAc, и аддукт был взят в неочищенном виде на следующую стадию.

[00118] К раствору аддукта (63,0 мг, 0,054 ммоль) в DMF (0,5 мл) добавляли DEA (0,056 мл, 0,540 ммоль). ЖХМС (M+N=945,4) через 30 мин показала завершение реакции. Реакционную смесь разбавляли DMSO (0,5 мл) и очищали в системе Shimadzu LC-20AP для препаративной ВЭЖХ с колонкой XBridge Prep C18 5 мкм OBD 10x150 мм, элюируя смесью от 0 до 95% H₂O/ацетонитрил (0,05% муравьиной кислоты). Содержащую продукт фракцию в момент времени 11 мин лиофилизировали с получением соединения **6** в виде твердого вещества пурпурного цвета.

[00119] *Соединение 7.* Смесь (S)-2-((((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-5-(аллилокси)-5-оксопентановой кислоты (FmocNH-O-allos-Глу, 38,1 мг, 0,093 ммоль) и соединения **6** (88 мг, 0,093 ммоль) обрабатывали 2,6-лутидином (0,033 мл, 0,279 ммоль) и HATU (70,8 мг, 0,186 ммоль) и перемешивали в течение 1 часа. ЖХМС (M+N=1279,6) показала образование аддукта. Реакционную смесь обрабатывали EtOAc/насыщенным водным раствором NaHCO₃, и аддукт был взят в неочищенном виде на следующую стадию.

[00120] К аддукту, полученному на описанной выше стадии, добавляли морфолин (0,016 мл, 0,186 ммоль), затем палладийтетраakis (10,76 мг, 9,31 мкмоль) и перемешивали в течение 30 минут. ЖХМС (M+N=1240,0) показывает удаление группы allos. К данной смеси добавляли DEA (0,049 мл, 0,466 ммоль) и перемешивали в течение 30 мин, после чего ЖХМС (M+N=1017,6) показала завершение реакции. Реакционную смесь очищали на колонке COMBIFLASH™ с обращенной фазой (40 г c-18), элюируя от 0 до 100% водой в ацетонитриле (0,05% муравьиной кислоты), с получением соединения **7** в виде твердого вещества пурпурного цвета.

[00121] *Соединение Ia-03.* Раствор соединения **7** (10,2 мг, 9,50 мкмоль) и 2,5-диоксопирролидин-1-ил 1-(9H-флуорен-9-ил)-3-оксо-2,7,10,13,16-пентаокса-4-азанонадекан-19-оата (FmocNH-PEG4-OSuc, 5,55 мг, 9,50 мкмоль) в DMF (0,5 мл) обрабатывали 2,6-лутидином (3,32 мкл, 0,028 ммоль) и перемешивали в течение 3 часов. ЖХМС (M+N=1357,5) показала завершение реакции. К данной реакционной смеси добавляли DEA (0,020 мл, 0,190 ммоль) с последующим перемешиванием в течение 30 минут, после чего ЖХМС (M+N=1135,4) показала завершение реакции. Реакционную смесь разбавляли DMSO (0,5 мл) и очищали в системе Shimadzu LC-20AP для препаративной ВЭЖХ с колонкой XBridge Prep C18 5 мкм OBD 10x150 мм, элюируя смесью от 0 до 95% H₂O/ацетонитрил (0,05% муравьиной кислоты).

Содержащую продукт фракцию в момент времени 11,5 мин лиофилизировали с получением соединения **Ia-03** в виде твердого вещества пурпурного цвета.

[00122] По схеме А, с соответствующими изменениями, получали соединения в таблице D:

Таблица D - Соединения, полученные по схеме А		
Соединение	Ожидаемая масса (M+N)	Наблюдаемая масса (M+N)
Соединение А	1134,4	1135,4
(Ia-01)	1137,4	1138,4
(Ia-02)	1497,5	1498,9
(Ia-03)	1320,5	1321,3
(Ia-04)	1232,5	1233,3

Пример 7 - Синтез соединений по схеме В

[00123] Данный пример и **ФИГ. 3А-3С** относится к схеме В для синтеза соединений, описанных в данном документе, с конкретной ссылкой на соединения **Ia-06** и **Ia-09**.

[00124] *Соединение 8.* К раствору 6-аминоизобензофуран-1(3H)-она **1** (1 г, 6,70 ммоль) в метаноле (1 мл) добавляли этан-1,2-диамин (2,246 мл, 33,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при RT в течение 3 часов. ЖХМС (M+N-H₂O=192,2) показала исчезновение исходного материала и присутствие продукта. Растворитель и избыток реагента удаляли выпариванием, и неочищенный продукт **8** отправляли на следующую стадию.

[00125] *Соединение 9.* К раствору соединения **8** (1402 мг, 6,70 ммоль) в DMF (5 мл) при 0 °C добавляли раствор аллилхлорформиата (0,715 мл, 6,70 ммоль) в THF (1 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч, после чего ЖХМС (M+N-H₂O=276,2) показала образование продукта. Реакцию гасили добавлением насыщенного водного раствора NaHCO₃ и экстрагировали EtOAc. Неочищенный продукт очищали на колонке с 40 г силикагеля, элюируя смесью от 0 до 100% MeOH в DCM с получением соединения **9** в виде белого твердого вещества.

[00126] *Соединение 10.* К раствору (S)-2-((S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентановой кислоты (Fmoc-Val-Cit, 242 мг, 0,488 ммоль) и соединения **9** (286 мг, 0,975 ммоль) в MeOH (2 мл) добавляли EEDQ (241 мг, 0,975 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при RT в течение ночи. ЖХМС (M+N=772,5) показала новый пик. Реакционную смесь очищали непосредственно на колонке COMBIFLASH™, используя 40 г силикагеля, элюируя смесью от 0 до 100% MeOH/DCM, с получением соединения **10**

[00127] *Соединение 11.* К раствору соединения **10** (102 мг, 0,132 ммоль) в DMF (1 мл) добавляли бис(4-нитрофенил)карбонат (121 мг, 0,396 ммоль) и DIPEA (0,046 мл, 0,264 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при RT в течение 3 ч, после чего ЖХМС (M+N=937,3) показала завершение реакции. Прямая очистка на колонке COMBIFLASH™ на колонке с силикагелем 40 г, с элюированием от 0 до 50% MeOH в DCM, дала соединение **11** в виде белого твердого вещества.

[00128] *Соединение 12.* Смесь соединения **11** и соединения **5** (53,0 мг, 0,110 ммоль) перемешивали в течение ночи. ЖХМС (M+N=1110,4) показала завершение реакции, после чего реакционную смесь обрабатывали насыщенным водным раствором NaHCO₃/EtOAc и сушили. К данной неочищенной смеси в DMF (5 мл) добавляли DEA (0,057 мл, 0,550 ммоль) с последующим перемешиванием в течение 30 мин. ЖХМС (M+N=888,1) показала завершение реакции. Продукт непосредственно вводили в колонку COMBIFLASH™ с обращенной фазой (150 г C-18) и элюировали от 0 до 50% водой в ацетонитриле (0,05% муравьиной кислоты) с получением соединения **12** в виде твердого вещества пурпурного цвета.

[00129] *Соединение 13.* К раствору соединения **12** (150 мг, 0,142 ммоль) и 2,5-диоксопирролидин-1-ил 1-(9H-флуорен-9-ил)-3-оксо-2,7,10,13,16-пентаокса-4-азанонадекан-19-оата (FmocNH-PEG₄-OSu, 83 мг, 0,142 ммоль) в DMF (0,5 мл) добавляли 2,6-лутидин (0,050 мл, 0,425 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 2 часа. ЖХМС (M+N=1528,7) показала новый пик. Неочищенный продукт очищали на колонке combiflash с обращенной фазой, элюируя смесью от 0 до 100% ацетонитрил/вода (0,05% муравьиной кислоты), с получением желаемого продукта в виде твердого вещества пурпурного цвета.

[00130] Продукт с предыдущей стадии (5 мг, 0,037 мкмоль) растворяли в DMF (0,5 мл) и обрабатывали фенилсиланом (0,775 мкл, 6,28 мкмоль) и затем палладийтетраakisом (1,815 мг, 1,571 мкмоль). ЖХМС (M+N=1444.4) показывает

удаление группы allos. Реакционную смесь фильтровали через в шприцевой фильтр и растворитель выпаривали с получением соединения **13**.

[00131] *Соединение Ia-09*. Раствор соединения **8** (4,8 мг, 3,14 мкмоль) растворяли в DMF (0,5 мл) и обрабатывали 2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксагексакозан-26-овой кислотой (6,75 мг, 0,016 ммоль), NATU (6,22 мг, 0,016 ммоль) и 2,6-лутидином (4 мкл, 0,033 ммоль) и перемешивали в течение 1 ч, что давало ацилирование амина. Затем неочищенную реакционную смесь обрабатывали DEA (3,28 мкл, 0,031 ммоль). ЖХМС (M+N=1616,5) показывает снятие защиты группы Fmoc. Неочищенный продукт непосредственно впрыскивали в систему Shimadzu для препаративной ВЭЖХ с колонкой xBridge PrepC18 5 мкм 19x150 мм и элюировали смесью от 0 до 95% MeCN/H₂O (0,1% FA), и содержащие продукт фракции лиофилизировали, чтобы обеспечить соединение **Ia-09** (1,3 мг, 0,833 мкмоль, выход 26,5%) в виде твердого вещества пурпурного цвета.

[00132] *Соединение 14*. Раствор соединения **12** в DMF (0,5 мл) обрабатывали 2,6-лутидином (10,24 мкл, 0,088 ммоль) и затем уксусным ангидридом (2,76 мкл, 0,029 ммоль). ЖХМС (M+N=1100,3) через 5 мин показывает завершение ацетилирования. К данной смеси добавляли морфолин (5,10 мкл, 0,059 ммоль), затем палладийтетраakis (6,77 мг, 5,86 мкмоль) и перемешивали в течение 1 часа. ЖХМС (M+N=1016,3) показала завершение реакции. Реакционную смесь непосредственно очищали на колонке COMBIFLASH™ с обращенной фазой, используя колонку C-18 50 г, элюируя смесью от 0 до 50% вода/ацетонитрил (0,05% муравьиная кислота), с получением соединения **14** в виде твердого вещества пурпурного цвета.

[00133] *Соединение Ia-06*. К раствору соединения **14** (22 мг, 0,022 ммоль) в DMF (0,5 мл) добавляли 2,5-диоксопирролидин-1-ил 1-(9H-флуорен-9-ил)-3-оксо-2,7,10,13,16-пентаокса-4-азанонадекан-19-оат (12,66 мг, 0,022 ммоль) и 2,6-лутидин (7,57 мкл, 0,065 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч, после чего ЖХМС показала завершение реакции. Добавляли диэтиламин (0,011 мл, 0,108 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин, после чего ЖХМС (M+N=1363,3) показала образование продукта. Реакционную смесь разбавляли DMSO (0,5 мл) и очищали в системе Shimadzu LC-20AP для препаративной ВЭЖХ с колонкой XBridge Prep C18 5 мкм OBD 10x150 мм, элюируя смесью от 0 до 95% H₂O/ацетонитрил (0,05% муравьиной кислоты). Фракции, содержащие продукт, лиофилизировали с получением соединения **Ia-06** в виде твердого вещества пурпурного цвета.

[00134] Следуя схеме В, с соответствующими изменениями, получали соединения в таблице Е:

Таблица Е - Соединения, полученные по схеме В		
Соединение	Ожидаемая масса (М+Н)	Наблюдаемая масса (М+Н)
(Ia-05)	1220,5	1221,2
(Ia-06)	1262,5	1263,3
(Ia-07)	1262,5	1264,5
(Ia-08)	1324,5	1326,2
(Ia-09)	1614,7	1616,5
(Ia-10)	1790,8	896,6 (М+Н)/2
(Ia-11)	2319,1	1161,3 (М+Н)/2

Пример 8 - Синтез соединений по схеме С

[00135] Данный пример и **ФИГ. 4** относятся к схеме С синтеза соединений, раскрытых в данном документе, с конкретной ссылкой на соединение **Ib-05**.

[00136] *Соединение 17.* К смеси соединения **15** (124 мг, 0,312 ммоль) и соединения **16** (310 мг, 0,312 ммоль) в DMF (2 мл)/DMSO (2 мл) добавляли DIPEA (0,164 мл, 0,937 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 50 °С в течение 2 часов. ЖХМС (М+Н=1251,2) показала завершение реакции. Основание выпаривали и неочищенный продукт очищали на колонке COMBIFLASH™ (80 г силикагеля), элюируя с от 0 до 50% MeOH/DCM с получением соединения **17** в виде твердого вещества белого цвета.

[00137] *Соединение 18.* Раствор соединения **17** (52 мг, 0,042 ммоль) в DMF (0,5 мл) обрабатывали морфолином (7,23 мкл, 0,083 ммоль) и затем палладийтетраакисом (9,60 мг, 8,30 мкмоль). ЖХМС через 1 ч показала удаление выделенной группы. Данный раствор обрабатывали DEA (0,043 мл, 0,415 ммоль). Через 30 мин ЖХМС (М+Н/2= 495,9) показала завершение реакции. Неочищенный продукт непосредственно вводили в систему Shimadzu для препаративной ВЭЖХ с колонкой xBridge PrepC18 5 мм 19x150 мм и элюировали смесью от 0 до 95% ацетонитрил/Н₂О (0,1% муравьиная

кислота). Фракции, содержащие продукт, лиофилизировали с получением соединения **18** в виде твердого вещества белого цвета.

[00138] Соединение **Ib-05**. Раствор соединения **18** (17 мг, 0,017 ммоль) и 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексаноата (МС-OSuc, 5,29 мг, 0,017 ммоль) в DMF (0,5 мл)/DMSO (0,5 мл) обрабатывали 2,6-лутидином (6,00 мкл, 0,052 ммоль) и нагревали при 40 °С в течение 1 часа. ЖХМС (M+N=1183,3) показала завершение реакции. Неочищенный продукт непосредственно вводили в систему Shimadzu для препаративной ВЭЖХ с колонкой xBridge PrepC18 5 мм 19x150 мм и элюировали смесью от 0 до 95% ацетонитрил/Н₂O (0,1% муравьиная кислота). Фракции, содержащие продукт, лиофилизировали с получением 15 мг соединения **Ib-05** в виде твердого вещества белого цвета.

[00139] Соединение **B** было также синтезировано по схеме **C**, с соответствующими изменениями (ожидалось масс-спектр (M+N) 1182,5 и наблюдалось 1183,3).

Пример 9 - Синтез соединений по схеме D

[00140] Данный пример и **ФИГ. 5** относятся к схеме **D** синтеза соединений, раскрытых в данном документе, с конкретной ссылкой на соединение **Ib-01**.

[00141] Соединение **21**. Раствор соединения **20** (575 мг, 0,604 ммоль) и соединения **19** (240 мг, 0,604 ммоль) в DMF (1 мл) обрабатывали DIPEA (0,316 мл, 1,811 ммоль). После перемешивания при RT в течение 3 ч ЖХМС (M+N=1211.0) показала завершение реакции. Основание выпаривали и неочищенный продукт очищали на колонке COMBIFLASH™ с использованием 80 г диоксида кремния геля, элюируя с от 0 до 50% MeOH/DCM с получением соединения **21** в виде светло-желтого твердого вещества.

[00142] Соединение **22**. Раствор соединения **21** (0,206 г, 0,170 ммоль) в DMF (1 мл) обрабатывали DEA (1 мл) и перемешивали в течение 1 часа. Избыток основания упаривали и раствор обрабатывали раствором NATU (0,071 г, 0,187 ммоль) и 1-(9H-флуорен-9-ил)-3-оксо-2,7,10,13,16-пентаокса-4-азанонадекан-19-овой кислотой (0,083 г, 0,170 ммоль) и 2,6-лутидином (0,059 мл, 0,510 ммоль). После перемешивания в течение 30 мин ЖХМС (M+N=1458,4) показала завершение реакции. Реакционную смесь очищали на установке COMBIFLASH™ с обращенной фазой с использованием

колонки 50 г, элюируя смесью от 0 до 100% ацетонитрил/Н₂О (0,05% муравьиной кислоты), с получением соединения **22**.

[00143] Соединение **Ib-01**. Раствор соединения **22** (0,249g) обрабатывали TFA (1 мл) и перемешивали в течение 1 ч, после чего ЖХМС (M+N=1358,1) показала удаление защитной группы Boc. TFA выпаривали на испарителе V-10.

[00144] В сосуде растворяли 2,5,8,11,14,17,20,23-октаоксагексакозан-26-овую кислоту (0,070 г, 0,171 ммоль) в DMF (0,5 мл) и обрабатывали HATU (0,078 г, 0,205 ммоль) и DIPEA (0,149 мл, 0,854 ммоль) и перемешивали в течение 20 мин. Данный раствор обрабатывали лишенным защиты соединением **22** и перемешивали в течение 30 мин. ЖХМС (M+N=1752,4) показала образование целевого продукта.

[00145] Данный раствор обрабатывали DEA (0,357 мл, 3,41 ммоль). ЖХМС (M+N=1529,3) через 30 мин показывает образование соединения **Ib-01**. Основание выпаривали в испарителе V-10 и неочищенный продукт очищали в блоке COMBIFLASH™ с обращенной фазой с использованием колонки C-18 в 50 г и элюировали смесью от 0 до 95% ацетонитрил/Н₂О (0,1% муравьиной кислоты), и фракции, содержащие продукт, лиофилизировали с получением соединения **Ib-01** (122 мг, 0,073 ммоль, выход 43,0%).

[00146] По схеме D, с соответствующими изменениями, получали соединения в таблице F:

Таблица F - Соединения, полученные по схеме D		
Соединение	Ожидаемая масса (M+N)	Наблюдаемая масса (M+N)
(Ib-01)	1528,8	1529,3
(Ib-02)	1148,5	575,5 (M+N)/2
(Ib-03)	1237,5	1237,4
(Ib-04)	1412,7	1413,5

[00147] Вышеизложенное подробное описание изобретения включает отрывки, которые главным образом или исключительно касаются конкретных частей или аспектов изобретения. Следует понимать, что это сделано для ясности и удобства, что конкретный признак может иметь отношение не только к тому отрывку, в котором он раскрыт, и что раскрытие в данном документе включает в себя все соответствующие

комбинации информации, найденной в различных отрывках. Точно так же, хотя различные фигуры и описания в данном документе относятся к конкретным вариантам осуществления изобретения, следует понимать, что там, где конкретный признак раскрыт в контексте конкретного чертежа или варианта осуществления, такой признак также может использоваться, в соответствующей степени, в контексте другого чертежа или варианта осуществления в сочетании с другим признаком или в изобретении в целом.

[00148] Кроме того, хотя настоящее изобретение было конкретно описано в терминах определенных предпочтительных вариантов осуществления, изобретение не ограничивается такими предпочтительными вариантами осуществления. Скорее, объем изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения.

АКРОНИМЫ И СОКРАЩЕНИЯ

[00149] Это список акронимов и сокращений, используемых в данном описании, вместе с их значениями.

АКРОНИМ ИЛИ СОКРАЩЕНИЕ	ЗНАЧЕНИЕ ИЛИ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
Alloc	Аллилоксикарбонил
Boc	<i>t</i> -Butyloxycarbonyl
DCM	Дихлорметан
DEA	Диэтиламин
DIPEA, DIEA	N,N-диизопропилэтиламин, также известный как основание Хюнига
DMF	N,N-диметилформамид
DMSO	Диметилсульфоксид
DTDP	2,2'-дитиодипиридин
DTPA	Диэтилентриаминпентауксусная кислота
EEDQ	Этил-2-этоксихинолин-1(2H)карбоксилат
Fmoc	Флуоренилметилоксикарбонил
HATU	Гексафторфосфат Азабензотриазол Тетраметил уроний; 1- [Бис(диметиламино)метилен]-1H-1,2,3- триазоло[4,5-b]пиридиния 3-оксид гексафторфосфат

АКРОНИМ ИЛИ СОКРАЩЕНИЕ	ЗНАЧЕНИЕ ИЛИ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
HEPES	4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоная кислота, N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоная кислота)
PEG	Поли(этиленгликоль)
RT	Комнатная температура, около 25 °С
TFA	Трифторуксусная кислота
THF	Тетрагидрофуран

ССЫЛКИ

[00150] Ниже приводятся полные версии следующих ссылок, процитированных в сокращенном виде с указанием только первого автора (или изобретателя) и даты ранее в данном описании. Каждая из данных ссылок включена в данный документ посредством ссылки для всех целей.

[00151] Alouane *et al.*, *Ang. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 7492, “Self-Immolative spacers: Kinetic Aspects, Structure-Property Relationships, and Application.”

[00152] Boyd *et al.*, US 7,691,962 B2 (2010).

[00153] Burke *et al.*, US 2017/0247412 A1 (2017).

[00154] Carl *et al.*, *J. Med. Chem.* **1981**, 24(5), 479, “A Novel Connector Linkage Applicable in Prodrug Design.” [1981a]

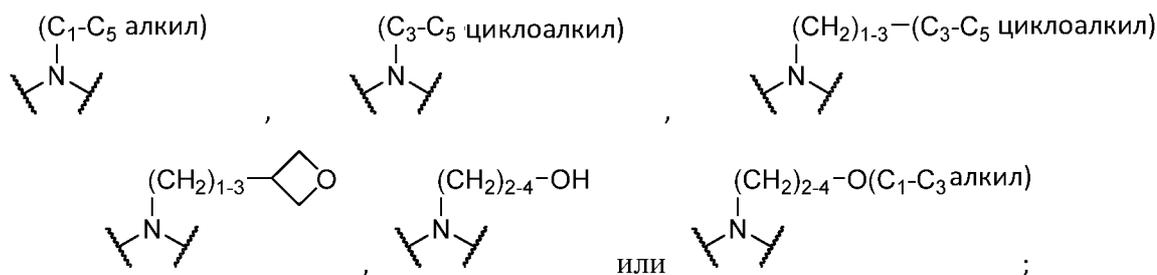
[00155] Carl *et al.*, WO 81/01145 A1 (1981). [1981b]

[00156] Doronina *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 1960, “Novel Peptide Linkers for Highly Potent Antibody-Auristatin Conjugate.”

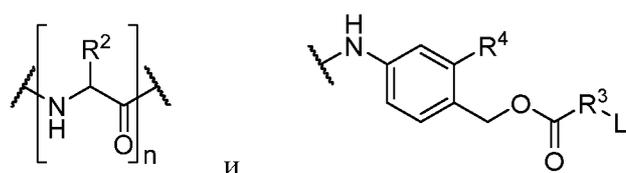
[00157] Dorywalska *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* **2016**, 15(5), 958, “Molecular Basis of Valine-citrulline-PABC Linker Instability in Site-specific ADCs and its Mitigation by Linker Design.”

[00158] Dubowchik *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3341, “Cathepsin B-Sensitive Dipeptide Prodrugs. 1. A Model Study of Structural Requirements for Efficient Release of Doxorubicin.” [1998a].

- [00159] Dubowchik et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3347, “Cathepsin B-Sensitive Dipeptide Prodrugs. 2. Models of Anticancer Drugs Paclitaxel (Taxol®), Mitomycin C and Doxorubicin.” [1998b].
- [00160] Dubowchik *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 855, “Cathepsin B-Labile Dipeptide Linkers for Lysosomal Release of Doxorubicin from Internalizing Immunoconjugates: Model Studies of Enzymatic Drug Release and Antigen-Specific In Vitro Anticancer Activity.”
- [00161] Feng, US 7,375,078 B2 (2008).
- [00162] Feng, US 7,989,434 B2 (2011).
- [00163] Firestone *et al.*, US 6,214,345 B1 (2001).
- [00164] Gerber *et al.*, *Nat. Prod. Rep.* **2013**, 30, 625, “The antibody-drug conjugate: an enabling modality for natural product based cancer therapies.”
- [00165] Jeffrey, US 8,039,273 (2011).
- [00166] Jeffrey *et al.*, *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 831, “Development and Properties of β -Glucuronide Linkers for Monoclonal Antibody-Drug Conjugates.”
- [00167] Lin *et al.*, US 9,089,614 B2 (2015).
- [00168] Kim *et al.*, US 2016/0184451 A1 (2016).
- [00169] Kim *et al.*, US 2017/0095576 A1 (2017).
- [00170] Machida *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 8595, “Allosterically Regulated Phosphatase Activity from Peptide-PNA Conjugates Folded Through Hybridization.”
- [00171] Major *et al.*, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 7968, “Investigation of Self-Immolative Linkers in the Design of Hydrogen Peroxide Activated Metalloprotein Inhibitors.”
- [00172] McDonagh *et al.*, WO 2007/103288 A2 (2007).
- [00173] Senter *et al.*, US 7,091,186 B2 (2006).
- [00174] Szczepanik *et al.*, US 8,828,678 B2 (2014).
- [00175] Zhang *et al.*, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 7031, “An Enzyme Activatable Probe with a Self-immolative Linker for Rapid and Sensitive Alkaline Phosphatase Detection and Cell Imaging through a Cascade Reaction.”



R^4 представляет собой фрагмент, который существенно ингибирует расщепление связи между

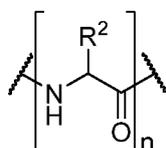


в сыворотке крови мышей, но существенно не ингибирует расщепление той же связи катепсином В;

L представляет собой остаток биоактивной молекулы формулы $L-R^3H$; и

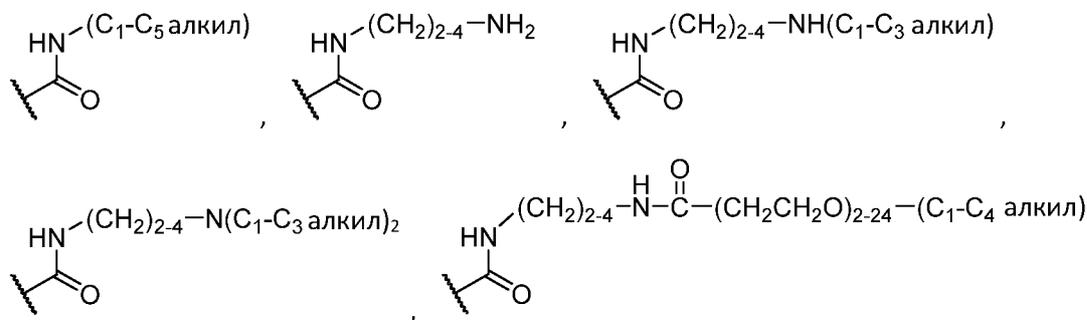
X представляет собой спейсерную группу.

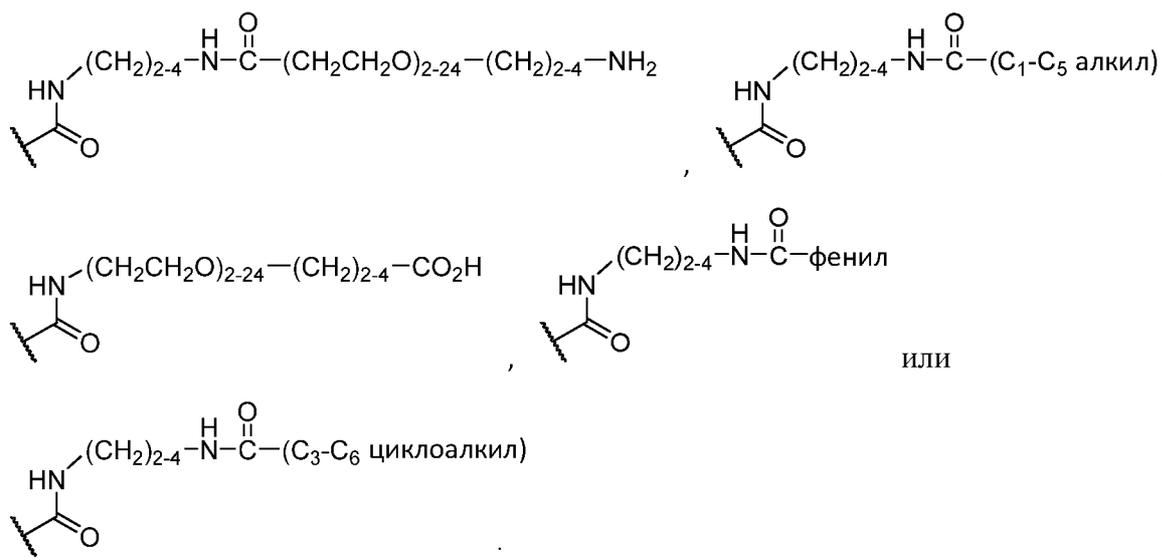
2. Соединение по п. 1, в котором



представляет собой Val-Cit, Glu-Val-Cit, Phe-Lys, Phe-Arg, Val-Lys, Ala-Lys, Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Val-Ala, Ala-Val-Cit или Val-Gly.

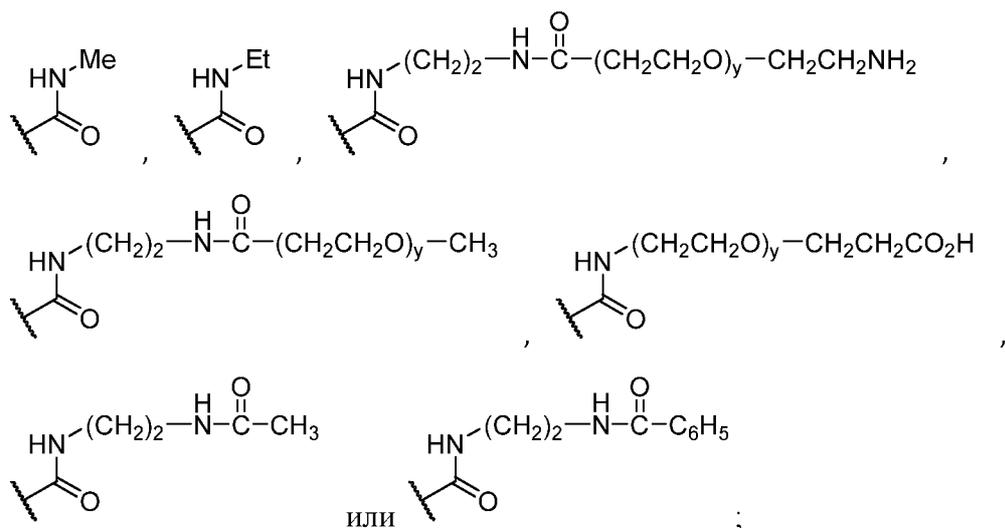
3. Соединение по п. 2, в котором R^4 представляет собой





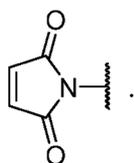
фенильную или C₃-C₆ циклоалкильную группу, необязательно замещенную F, Cl, CN, NO₂ или C₁-C₃ алкилом.

4. Соединение по п. 3, в котором R⁴ представляет собой

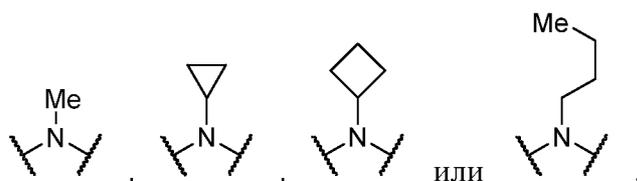


где y равно 4, 8, 12 или 24.

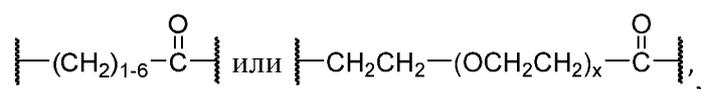
5. Соединение по п. 1, в котором R¹ представляет собой NH₂ или



6. Соединение по п. 1, в котором R³ представляет собой NH,

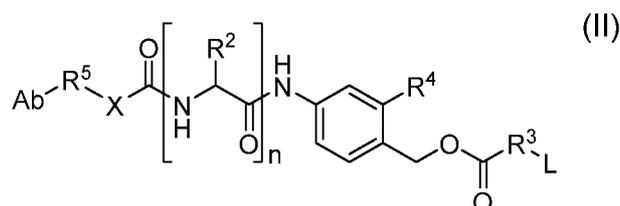


7. Соединение по п. 1, в котором X представляет собой



где x представляет собой целое число в диапазоне от 2 до 24, включительно.

8. Конъюгат, представленный формулой (II)

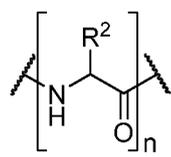


в которой

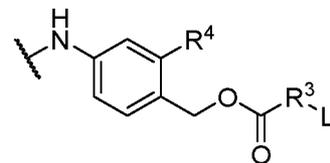
Ab представляет собой антитело,

R² представляет собой боковую цепь остатка аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из аланина, β-аланина, γ-аминомасляной кислоты, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, γ-карбоксихлутамина, цитруллина, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, норлейцина, норвалина, орнитина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина;

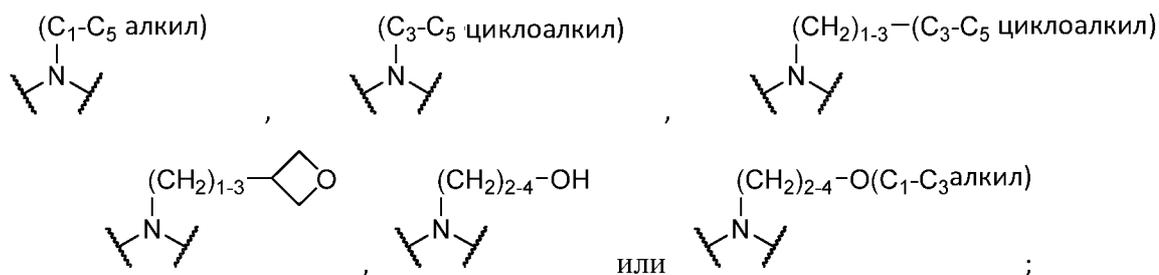
n равно 2, 3, 4 или 5;



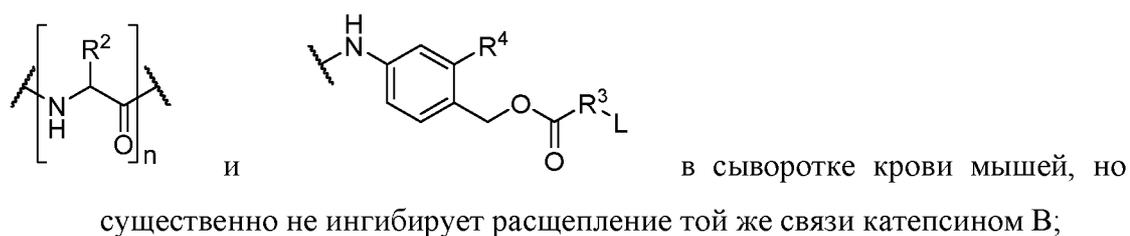
, содержащий полипептид, связь которого с расщепляется катепсином В;



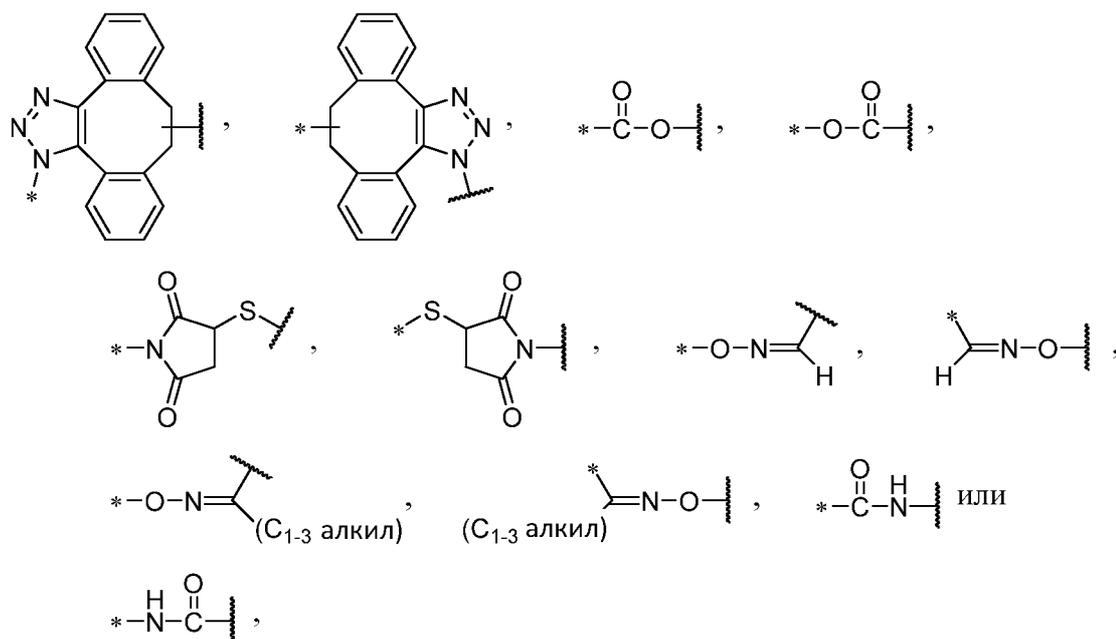
R³ представляет собой O, NH,



R⁴ представляет собой фрагмент, который существенно ингибирует расщепление связи между



R⁵ представляет собой

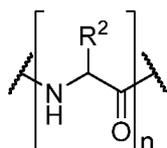


где валентное положение связывания с Ab обозначено звездочкой и валентное положение связывания с X обозначено волнистой линией;

L представляет собой остаток биоактивной молекулы формулы L-R³H; и

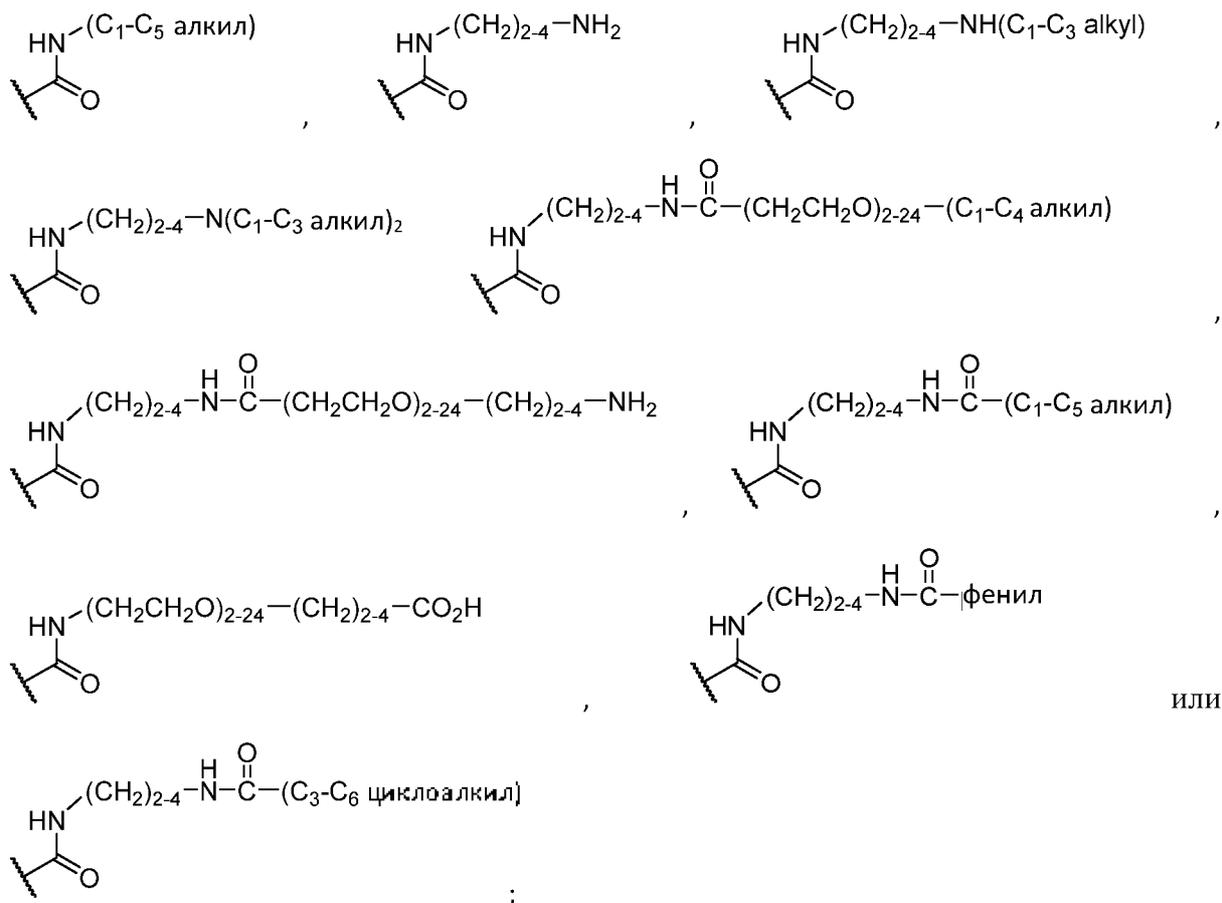
X представляет собой спейсерную группу.

9. Конъюгат по п. 8, в котором



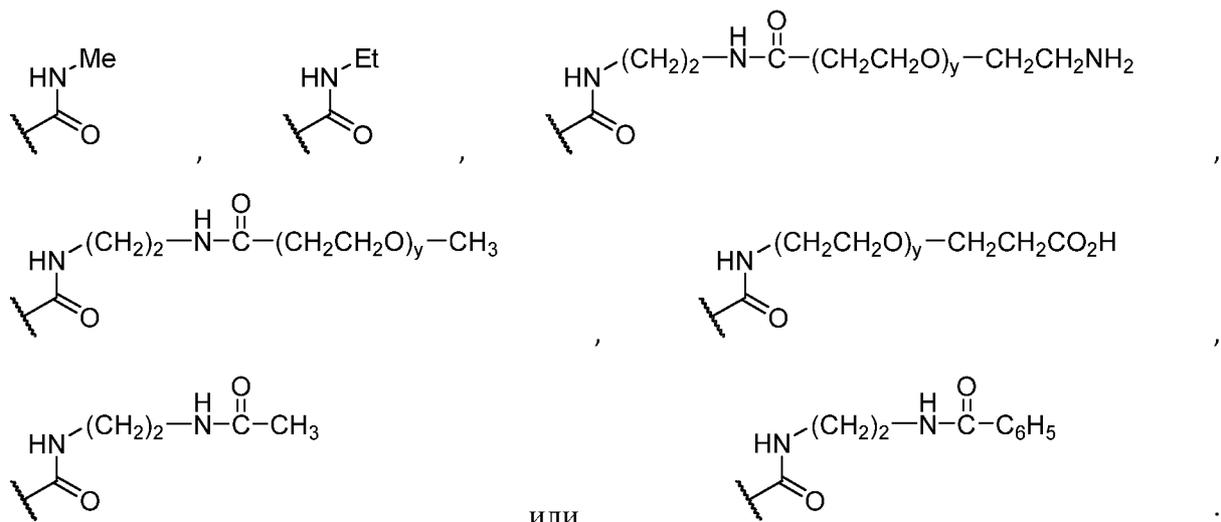
представляет собой Val-Cit, Glu-Val-Cit, Phe-Lys, Phe-Arg, Val-Lys, Ala-Lys, Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Val-Ala, Ala-Val-Cit или Val-Gly.

10. Конъюгат по п. 9, в котором R⁴ представляет собой



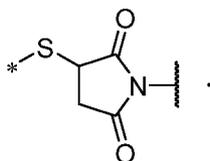
фенильную или C₃-C₆ циклоалкильную группу, необязательно замещенную F, Cl, CN, NO₂ или C₁-C₃ алкилом.

11. Конъюгат по п. 9, в котором R⁴ представляет собой

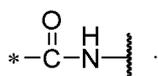


где y равно 4, 8, 12 или 24.

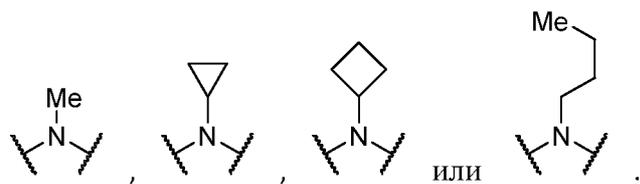
12. Конъюгат по п. 8, в котором R^5 представляет собой



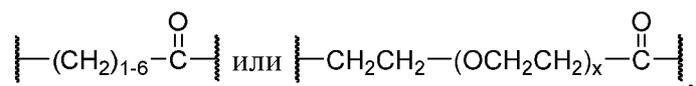
13. Конъюгат по п. 11, в котором R^5 представляет собой



14. Конъюгат по п. 8, в котором R^3 представляет собой NH,

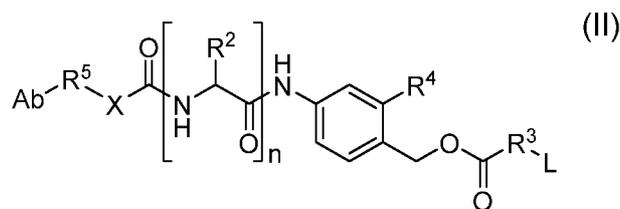


15. Конъюгат по п. 8, в котором X представляет собой

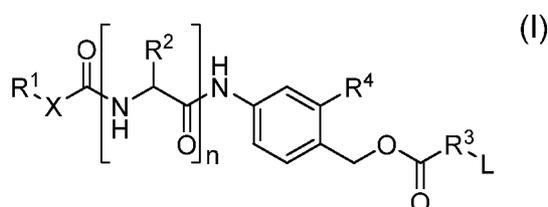


где x представляет собой целое число в диапазоне от 2 до 24, включительно.

16. Способ получения конъюгата, представленного формулой (II),



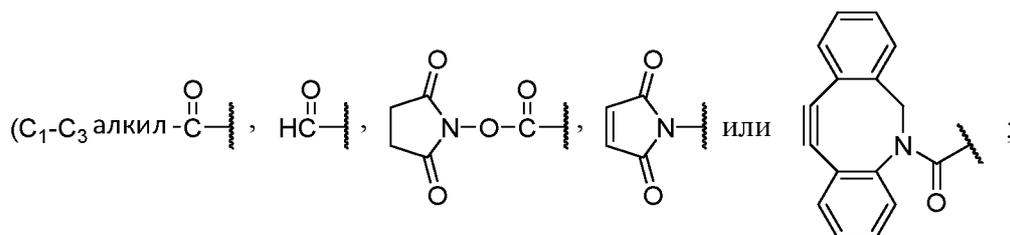
включающий конъюгирование антитела Ab с соединением формулы (I)



где

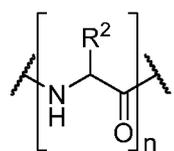
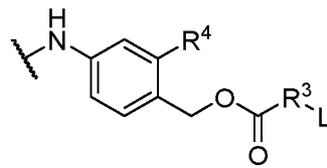
Ab представляет собой антитело;

R¹ представляет собой C₁-C₅-алкил, N₃, OH, SH, ONH₂, NH₂, CO₂H,

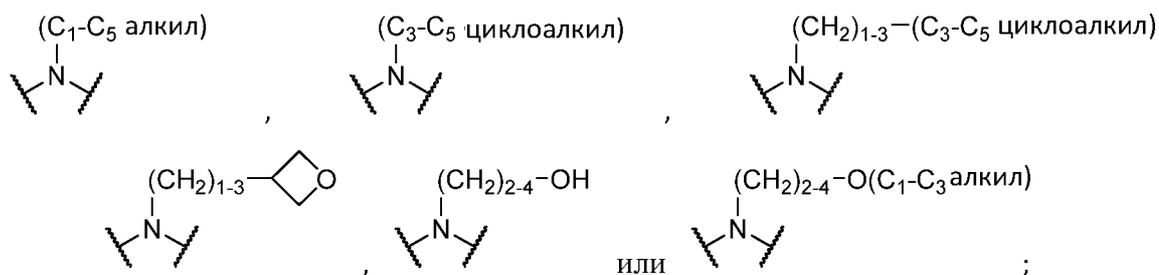


R² представляет собой боковую цепь остатка аминокислоты, выбранной из группы, состоящей из аланина, β-аланина, γ-аминомасляной кислоты, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, γ-карбоксиглутаминовой кислоты, цитруллина, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, норлейцина, норвалина, орнитина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина;

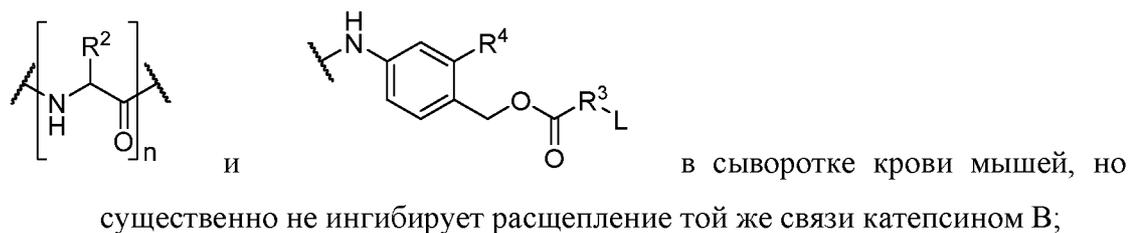
n равно 2, 3, 4 или 5;

 , содержащий полипептид, связь которого с  расщепляется катепсином B;

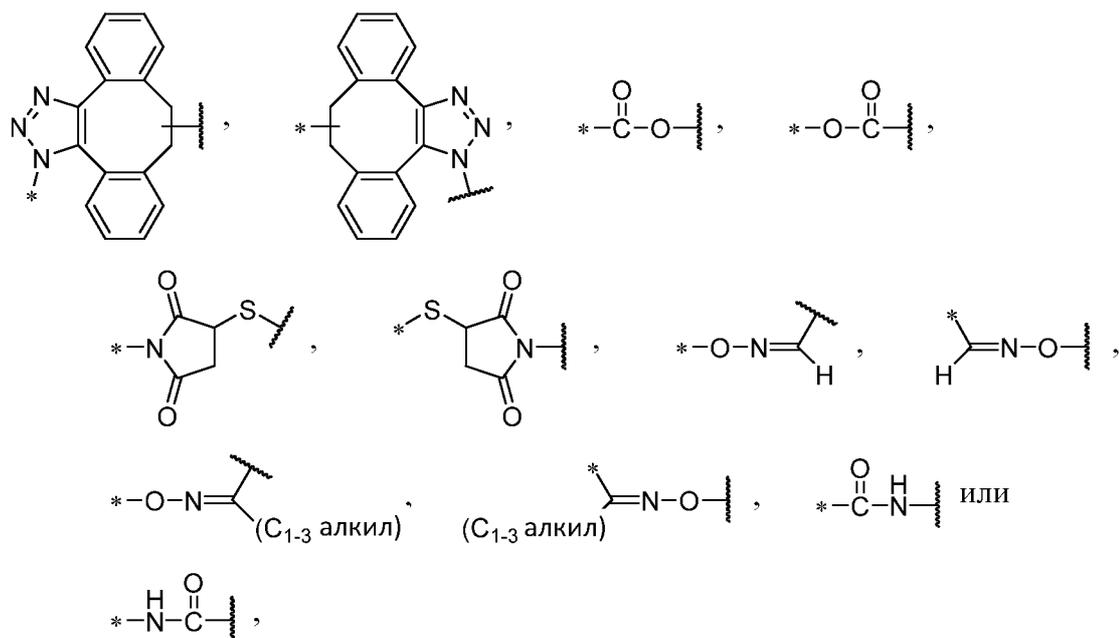
R³ представляет собой O, NH,



R⁴ представляет собой фрагмент, который существенно ингибирует расщепление связи между



R⁵ представляет собой

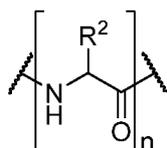


где валентное положение связывания с Ab обозначено звездочкой и валентное положение связывания с X обозначено волнистой линией;

L представляет собой остаток биоактивной молекулы формулы L-R³H; и

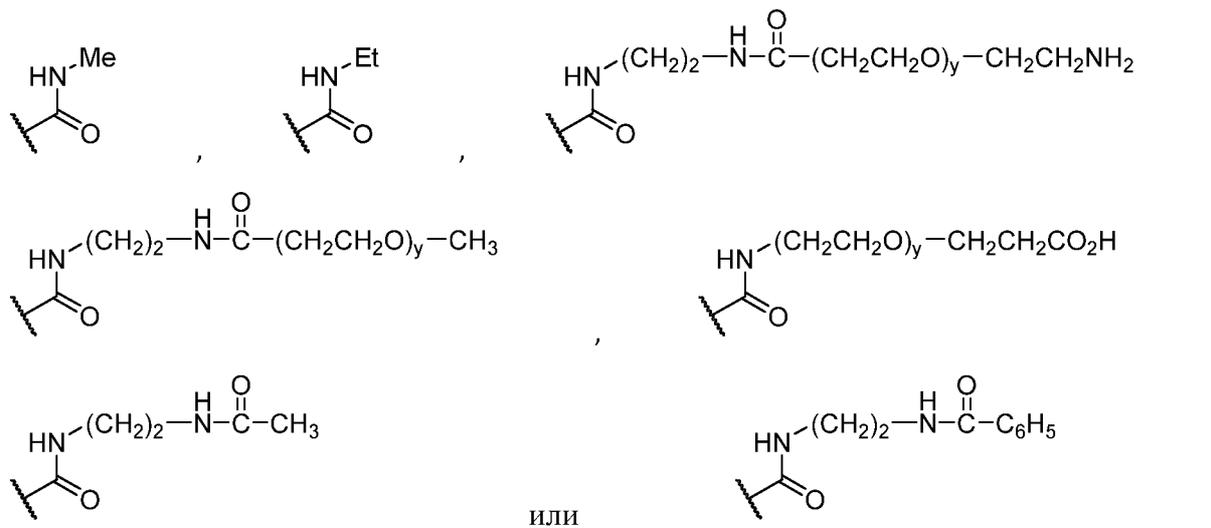
X представляет собой спейсерную группу.

17. Способ по п. 16, где



представляет собой Val-Cit, Glu-Val-Cit, Phe-Lys, Phe-Arg, Val-Lys, Ala-Lys, Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Val-Ala, Ala-Val-Cit или Val-Gly.

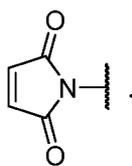
18. Способ по п. 17, где R⁴ представляет собой

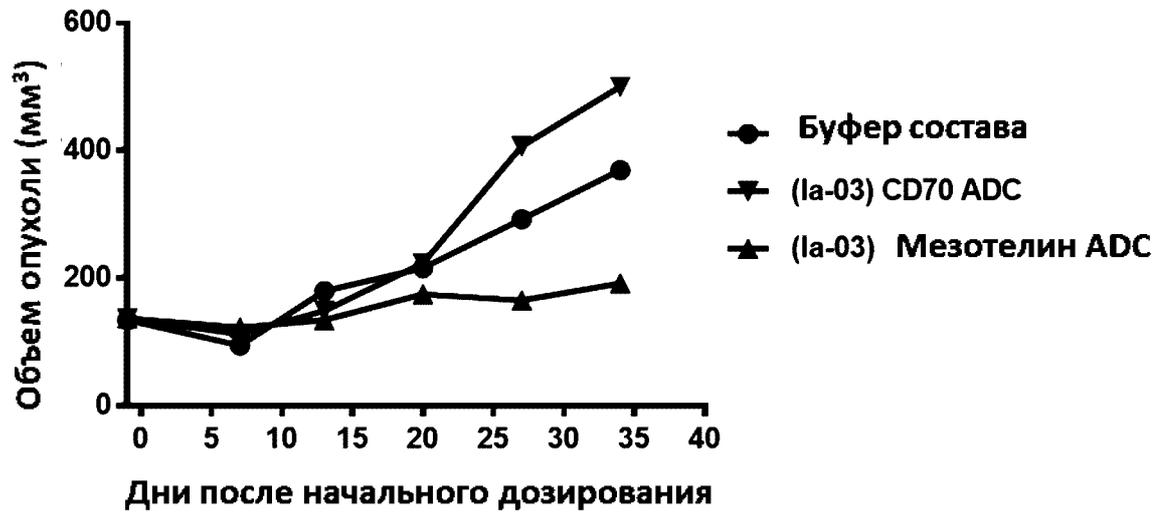


где y равно 4, 8, 12 или 24.

19. Способ по п. 16, где R¹ представляет собой NH₂.

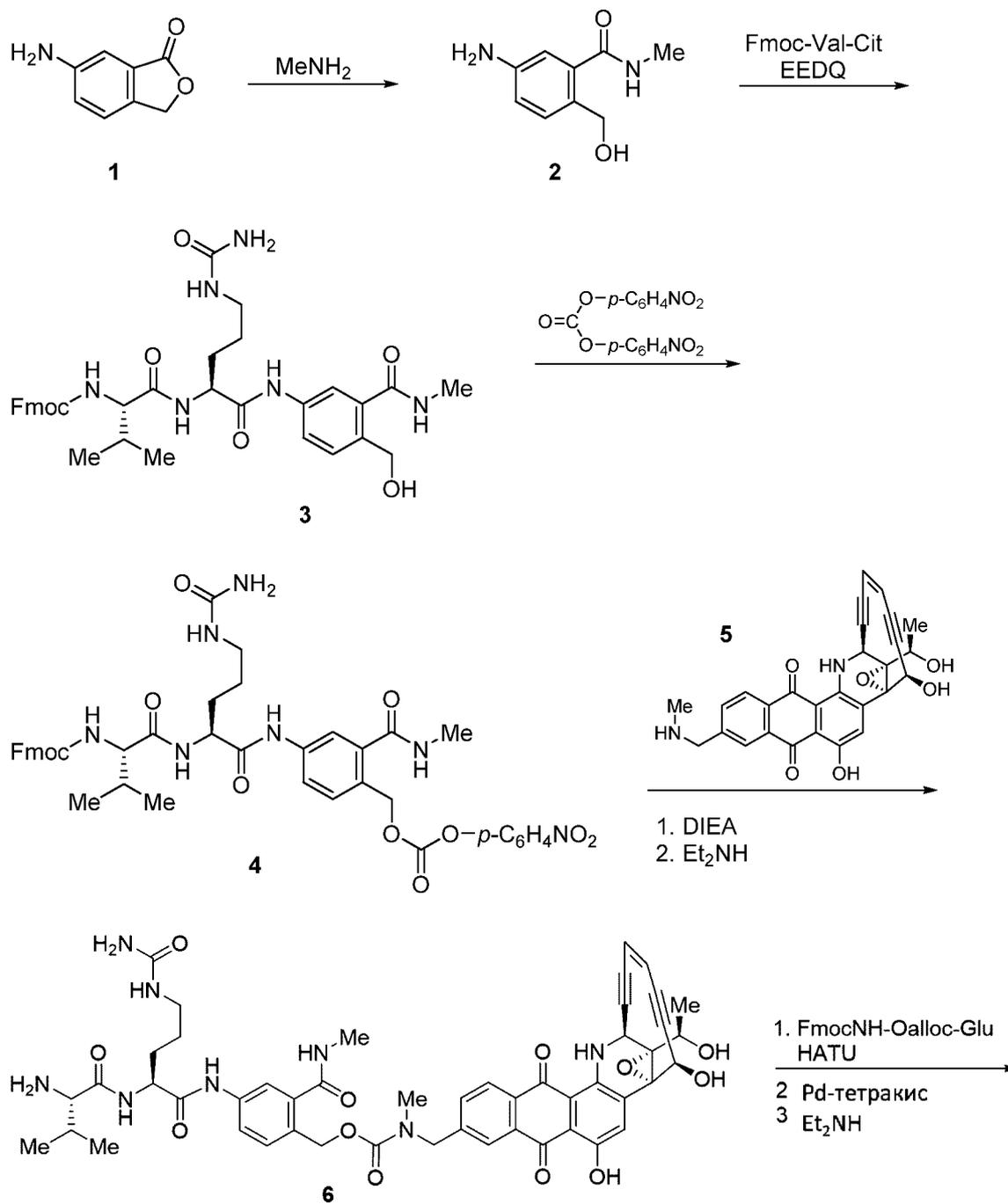
20. Способ по п. 16, где R¹ представляет собой



ФИГ. 1**Эффективность против опухолей H226 (мезотелиома)**

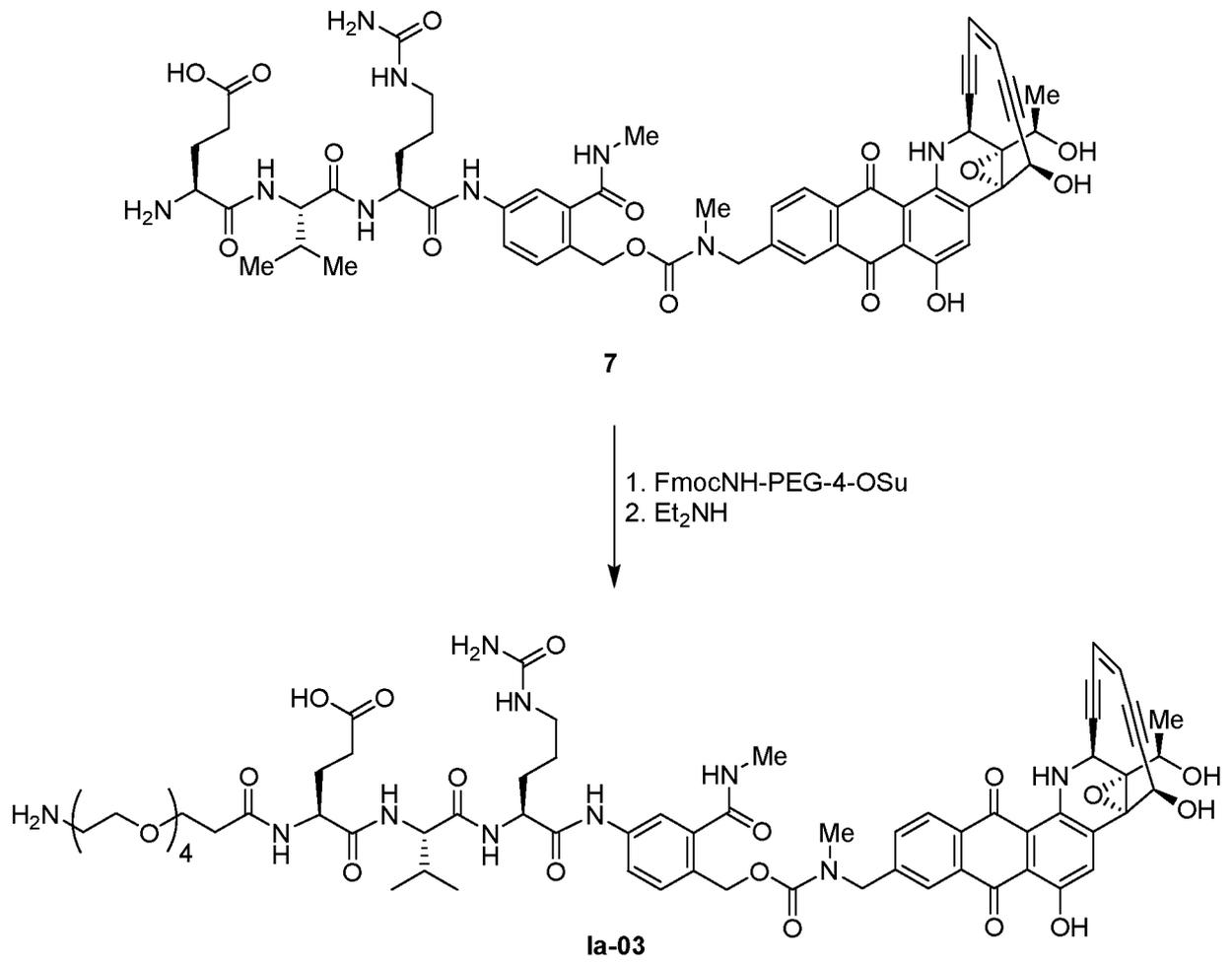
ФИГ. 2А

Схема А



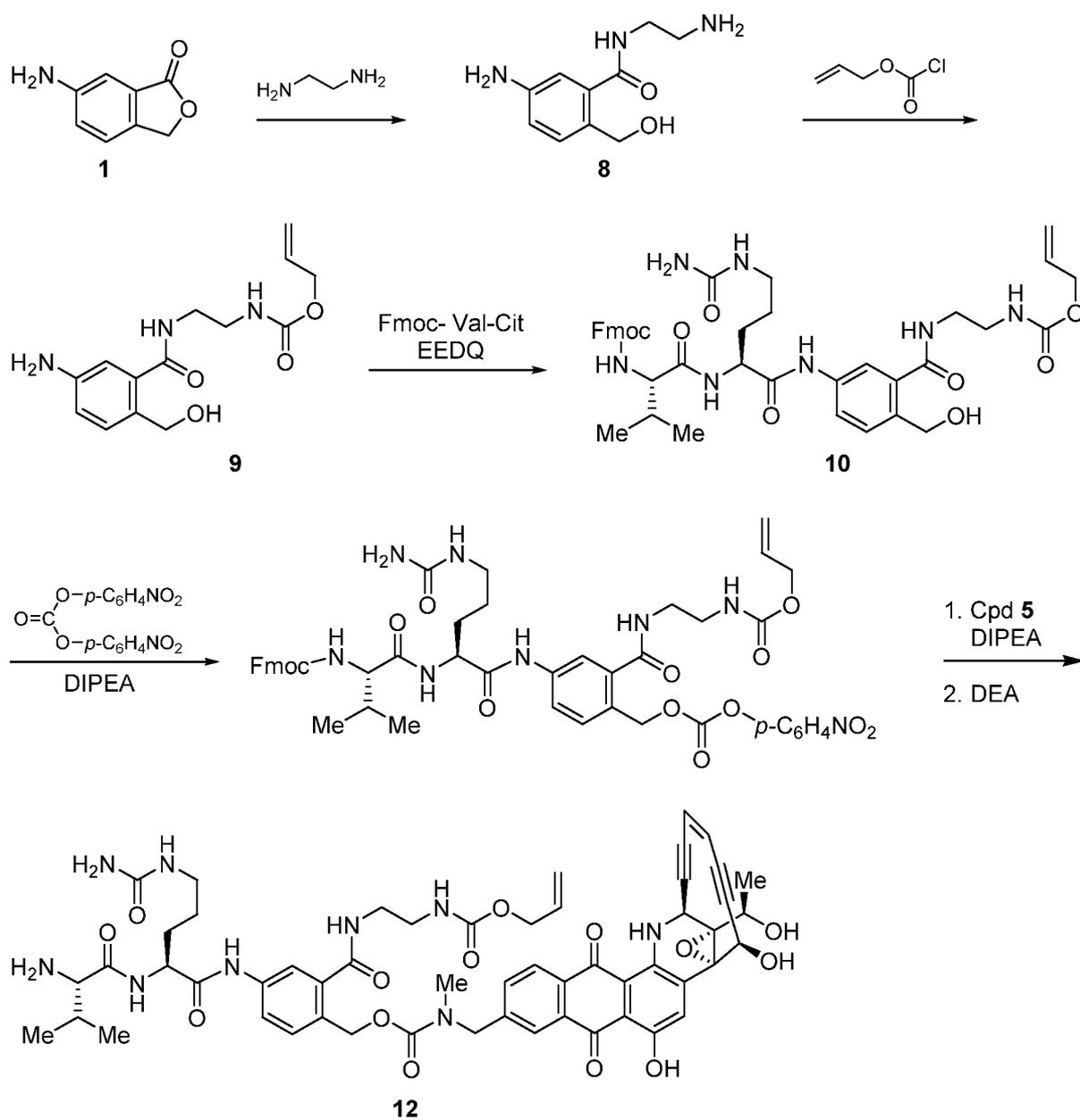
ФИГ. 2В

Схема А (продолжение)



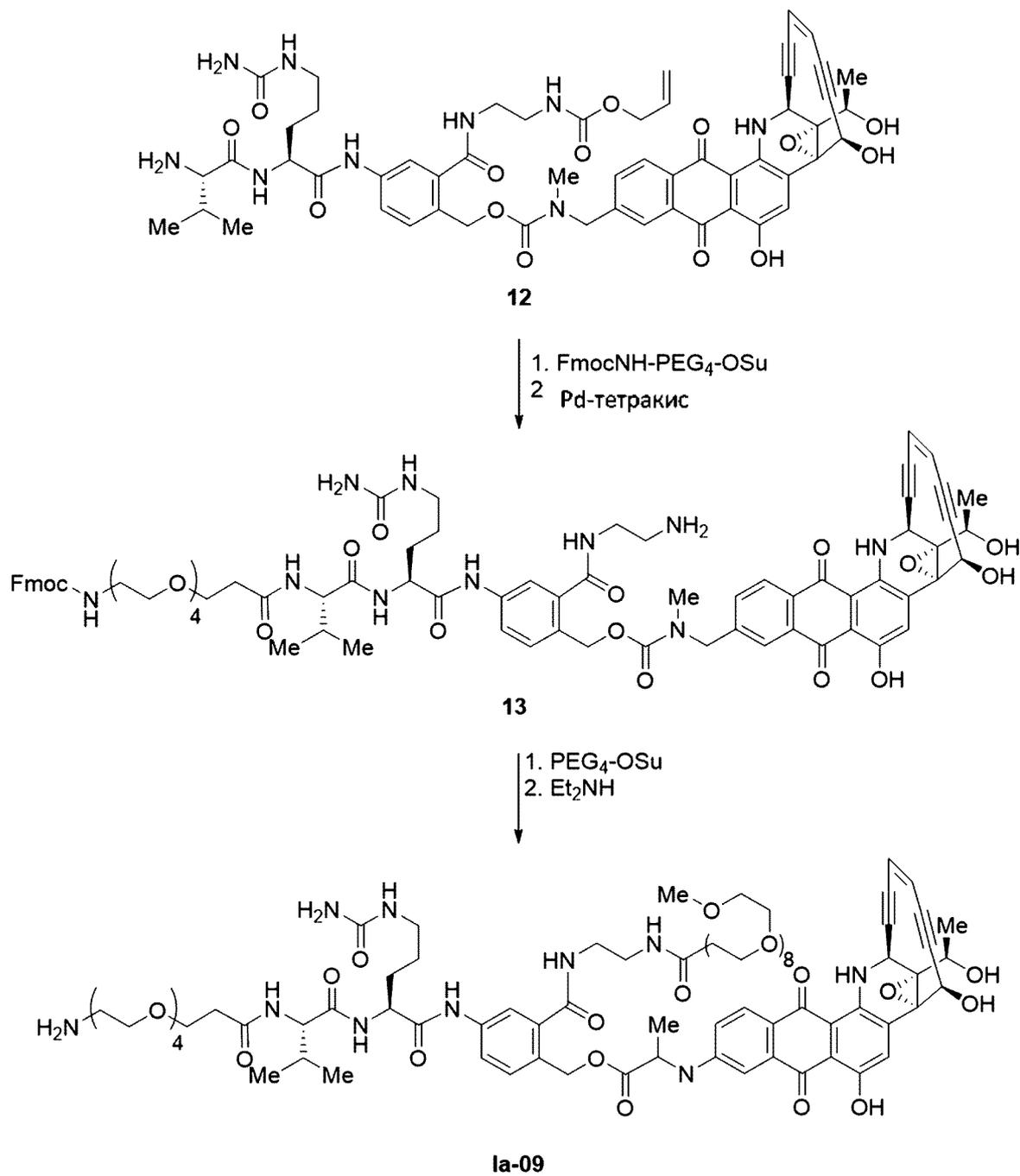
ФИГ. 3А

Схема В



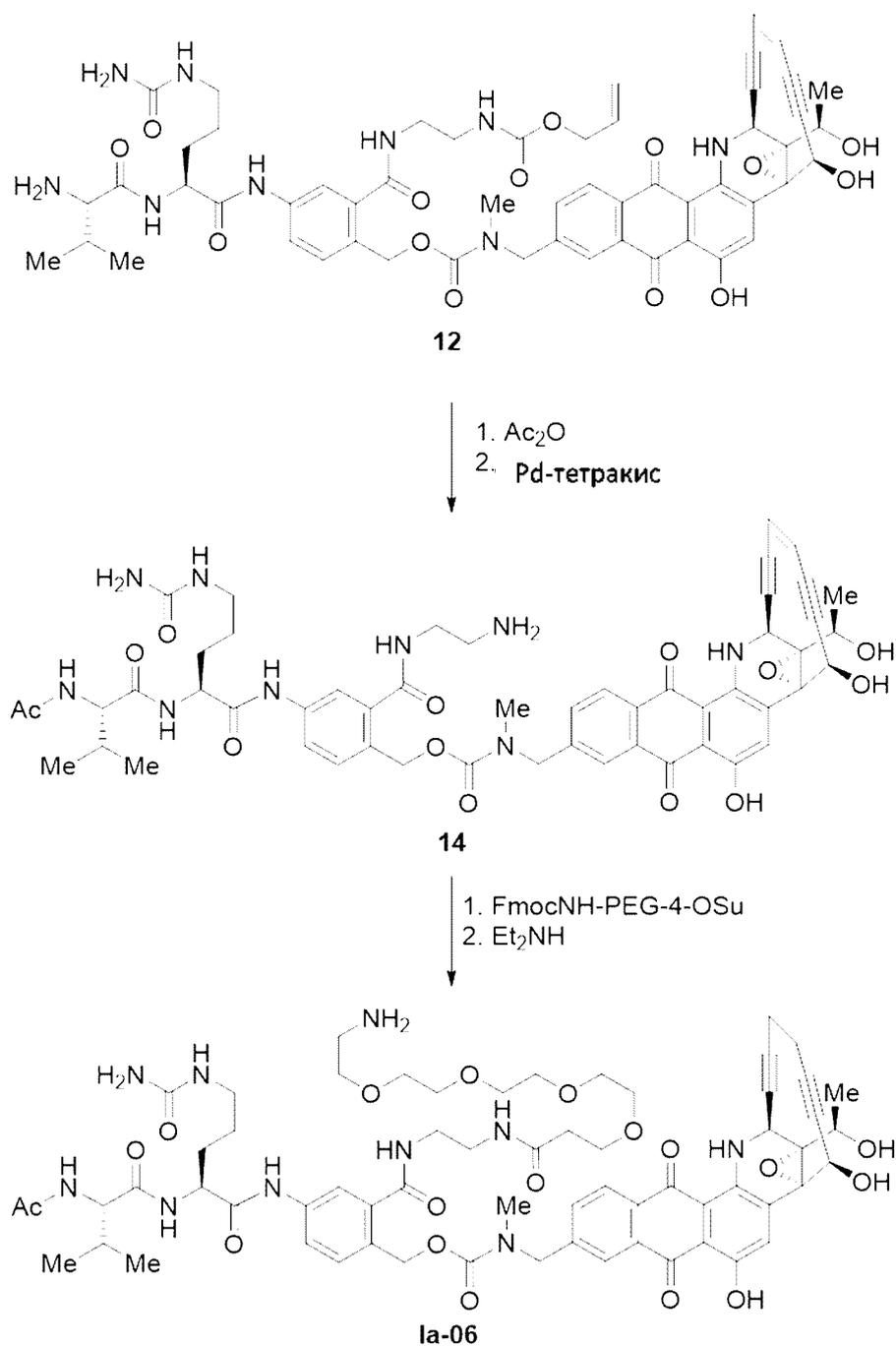
ФИГ. 3В

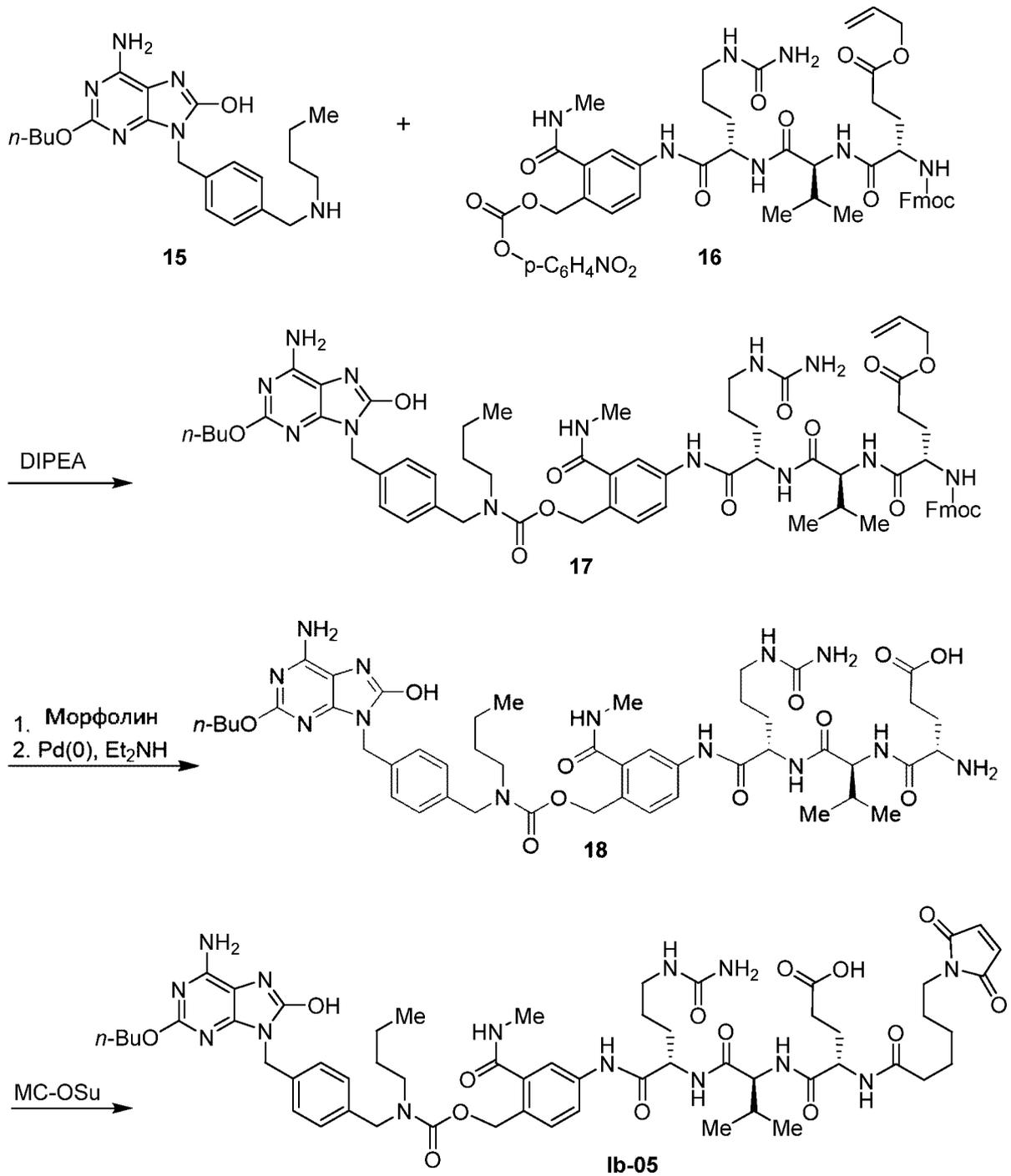
Схема В (продолжение)



ФИГ. 3С

Схема В (продолжение)



ФИГ. 4Схема С

ФИГ. 5

Схема D

