(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202191430 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.29

(22) Дата подачи заявки
2019.11.19

(51) Int. Cl. ***C07D 233/64*** (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 47/69 (2017.01)
C07C 233/90 (2006.01)
C07D 249/16 (2006.01)
C07H 17/02 (2006.01)
C07K 5/06 (2006.01)
C07K 5/08 (2006.01)

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ БИС-ОКТАГИДРОФЕНАНТРЕНКАРБОКСАМИДА И ИХ БЕЛКОВЫЕ КОНЪЮГАТЫ

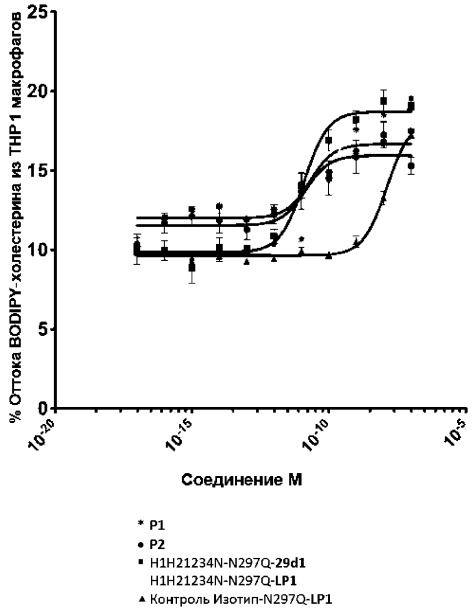
(31) **62/769,946**
(32) **2018.11.20**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/062302**
(87) **WO 2020/106780 2020.05.28**

(71) Заявитель:
РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Громада Джеспер, Гусарова Виктория, Хан Эми, Хаксхинасто Сокол, Мёрфи Эндрю Дж., Олсон Вильям, Слиман Мэтью (US)

(74) Представитель:
Безрукова О.М. (RU)

(57) В изобретении представлены соединения или полезные нагрузки, линкер-полезные нагрузки, конъюгаты антитело-лекарственное средство и композиции, а также способы лечения заболеваний и нарушений, связанных с печеночным рецептором X, включая их бис-октагидрофенантренкарбоксамиды и белковые (например, антитела) конъюгаты лекарственного средства.



202191430 A1

202191430 A1

ПРОИЗВОДНЫЕ БИС-ОКТАГИДРОФЕНАНТРЕНКАРБОКСАМИДА И ИХ БЕЛКОВЫЕ КОНЪЮГАТЫ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] В настоящем документе предложены новые карбоксамиды бис-октагидрофенантрена и их белковые конъюгаты, а также способы лечения различных заболеваний, нарушений и состояний, включая введение карбоксамидов бис-октагидрофенантрена и их белковых конъюгатов.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

[0002] Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) представляют собой антитела, которые прикрепляются к биологически активным низкомолекулярным лекарственным средствам, таким образом комбинируя нацеленную специфичность антител с механизмом действия и эффективностью низкомолекулярных лекарственных средств. Терапевтическая ценность ADC была подтверждена при лечении рака и является основным постоянным объектом исследований. АДЦЕТРИС (ADCETRIS®) (брентуксимаб ведотин) и КАДСИЛА (KADCYLA®) (адо-трастузумаб эмтанзин) – два ADC, одобренных для лечения определенных типов рака, и по крайней мере сорок ADC в настоящее время находятся в стадии клинической разработки.

[0003] Рецептор X печени (LXR) включает LXRα и LXRβ лиганд-зависимые факторы транскрипции, которые контролируют экспрессию генов, участвующих в гомеостазе холестерина, липидов и глюкозы, воспалении и врожденном иммунитете. LXRα в основном выделяется в печени, кишечнике, жировой ткани и дифференцированных макрофагах; и LXRβ выделяется повсеместно. LXR выполняют различные биологические функции, включая (i) стимуляцию экспрессии переносчиков холестерина, например, ABCA1 и ABCG1, оба из которых опосредуют отток клеточного холестерина; и (ii) негативное регулирование экспрессии гена воспаления в макрофагах посредством репрессии активации NF-kB. LXR также вовлечены в атеросклероз, пролиферативные расстройства, нейродегенеративные расстройства и воспаление. Пролиферативные расстройства включают меланомы, рак легких, плоскоклеточный рак полости рта и рак простаты. (Пенчева и *др.* 2004 г.; Ву и *др.* 2015 г.; Канеко и *др.* 2015 г.; Чуу и *др.* 2006 г.) Нейродегенеративные расстройства включают болезнь Альцгеймера и экспрессию гена миелина. (Тервел и *др.* 2011; Сандовал-Эрнандез и *др.* 2016 г.; Меффре и *др.* 2014 г.) Воспаление включает воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, болезнь Крона и артрит. (Андерсон и *др.*, 2011 г.; Хуан и *др.*, 2015 г.; Цуй и *др.*, 2012 г.). Известно,

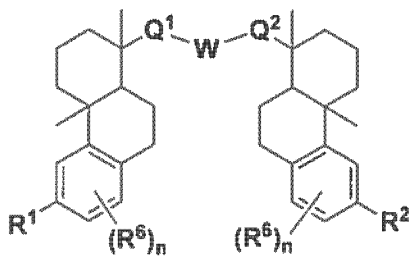
что LXR макрофагов обладают антиатерогенной активностью. Считается, что агонисты LXR способны (i) ингибировать начало и задерживать прогрессирование атеросклероза; (ii) смягчать атеросклероз и стабилизировать сформировавшиеся атеросклеротические поражения; и (iii) уменьшать содержание макрофагов в поражении за счет апоптоза.

[0004] Терапевтический потенциал низкомолекулярных модуляторов LXR ограничен, например, нежелательной модуляцией LXR в нецелевых клетках и/или низкой биодоступностью. Модуляция LXR в клетках, не являющихся мишенями, может приводить к нежелательным побочным эффектам, а низкая биодоступность может проявляться по множеству причин, включая, помимо прочего, низкую растворимость, которая еще больше усугубляет плохие терапевтические окна для лечения. Разработка ADC, содержащих модуляторы LXR, позволила бы специфичную для мишени модуляцию LXR, тем самым избегая побочных эффектов, вызванных модуляцией LXR со смещением от цели. Кроме того, такие ADC обеспечат улучшенную модуляцию биологических мишеней, улучшенную биодоступность и улучшенное терапевтическое окно. Следовательно, существует постоянная потребность в эффективном лечении, например, метаболических заболеваний с использованием низкомолекулярных ADC модуляторов LXR.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ

[0005] В настоящем документе предложены соединения, которые можно использовать, например, для лечения метаболических заболеваний, включая, без ограничения, дислипидемию. В настоящем документе также представлены соединения, полезные, например, для лечения воспаления или нейродегенеративного заболевания.

[0006] В одном варианте осуществления в настоящем документе представлены соединения Формулы I:



(I)

или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где

каждый из Q^1 и Q^2 независимо представляет собой $–CH_2–$, –C(O)–, –C(H)(OH)–, $–C(OH)_2–$, $–SO_2–$, –SO–, $–PO(OR^3)–$, $–PO(NR^3NR^4)–$, $–NR^3–$ или –N=;

W представляет собой -CH_2-, -N(H)- или -O-;

$\mathbf{R^1}$ представляет собой –N(H)$\mathbf{R^4}$ или –N($\mathbf{R^5}$)$_2$;

$\mathbf{R^2}$ представляет собой –N(H)$\mathbf{R^4}$;

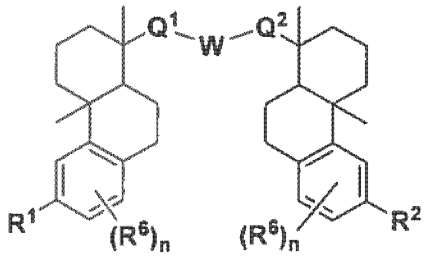
каждый $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент, алкил, замещенный алкил, ацил или замещенный ацил;

$\mathbf{R^5}$ представляет собой алкил, арил, арилалкил, гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил, где каждый гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил содержит один, два или три гетероатома, выбранных из азота и кислорода, и, когда он замещен, включает, по крайней мере, один –OH и –CH_2OH, или, по крайней мере, один первичный или вторичный азот;

каждый $\mathbf{R^6}$ независимо представляет собой галоген, $C_{1\text{-}6}$ алкил, $C_{1\text{-}6}$ алкокси, –CN, O-глюкозу, O-аминокислотный остаток или O-PEG_{n1}, где каждый **n** представляет собой целое число от 0 до 14, и каждый **n1** представляет собой целое число от 1 до 12; а также

каждый $\mathbf{R^3}$ независимо представляет собой водород, алкил или арил.

[0007] В одном варианте осуществления в настоящем документе представлены соединения согласно Формуле I:



(I)

или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где

каждый из $\mathbf{Q^1}$ и $\mathbf{Q^2}$ независимо представляет собой –CH_2–, –C(O)–, –C(H)(OH)–, –C(OH)$_2$–, –SO_2–, –SO–, –PO(O$\mathbf{R^3}$)–, –PO(N$\mathbf{R^3}$N$\mathbf{R^4}$)–, –N$\mathbf{R^3}$– или –N=;

W представляет собой -CH_2-, -N(H)- или -O-;

$\mathbf{R^1}$ представляет собой –N(H)$\mathbf{R^4}$ или –N($\mathbf{R^5}$)$_2$;

$\mathbf{R^2}$ представляет собой –N(H)$\mathbf{R^4}$;

каждый R^4 независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент или алкил;

R^5 представляет собой алкил, арил, арилалкил, гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил, где каждый гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил содержит один, два или три гетероатома, выбранных из азота и кислорода, и, когда он замещен, включает, по крайней мере, один –OH и $–CH_2OH$, или, по крайней мере, один первичный или вторичный азот;

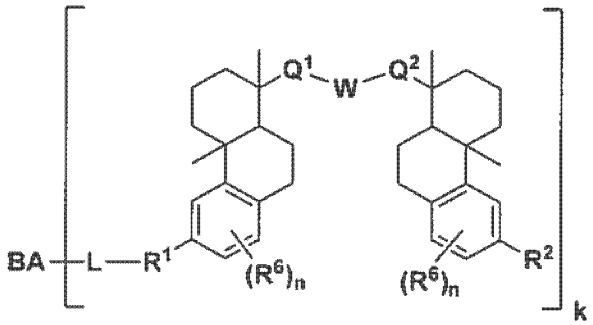
каждый R^6 независимо представляет собой галоген, C_{1-6} алкил, C_{1-6} алкокси, –CN, O-глюкозу, O-аминокислотный остаток или $O\text{-}PEG_{n1}$, где каждый **n** представляет собой целое число от 0 до 14, и каждый **n1** представляет собой целое число от 1 до 12; а также

каждый R^3 независимо представляет собой водород, алкил или арил.

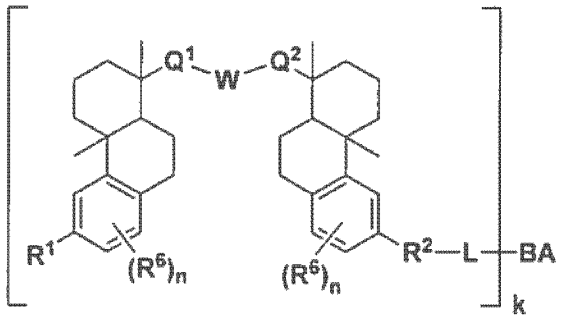
[0008] Другой вариант осуществления, изложенный в данном документе, представляет собой полезную нагрузку линкера, содержащую соединение согласно Формуле I, приведенное выше, связанное с линкером.

[0009] В другом варианте осуществления в настоящем документе представлен конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий соединение согласно Формуле I или полезную нагрузку линкера, связанные с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

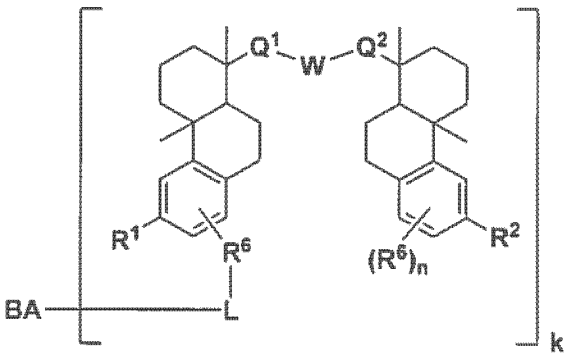
[0010] В одном варианте осуществления в настоящем документе представлены соединения согласно формулам **A**, **B**, **C** или **D**:



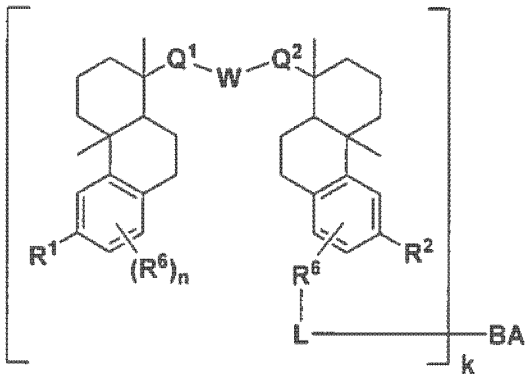
(A)



(B)



(C)



(D)

или фармацевтически приемлемая соль или стереоизомерная форма, где

L представляет собой линкер;

BA представляет собой связующий агент;

k представляет собой целое число от 1 до 30;

каждый из $\mathbf{Q^1}$ и $\mathbf{Q^2}$ независимо представляет собой $–CH_2–$, –C(O)–, –C(H)(OH)–, $–C(OH)_2–$, $–SO_2–$, –SO–, $–PO(OR^3)–$, $–PO(NR^3NR^4)–$, $–NR^3–$ или –N=;

W представляет собой $-CH_2-$, -N(H)- или -O-;

$\mathbf{R^1}$ представляет собой $–N(H)\mathbf{R^4}$, $–N(H)\mathbf{R^4}–$, –N(H)–, $–N(\mathbf{R^5})_2$ или $–N(\mathbf{R^5})_2–$;

R^2 представляет собой –N(H)R^4, –N(H)R^4– или –N(H)–;

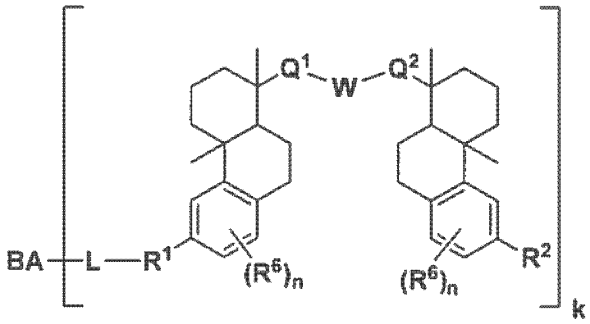
каждый R^4 независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент, алкил, замещенный алкил, ацил, замещенный ацил или -алкилен-;

R^5 представляет собой алкил, арил, арилалкил, гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил, где каждый гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил содержит один, два или три гетероатома, выбранных из азота и кислорода, и, когда он замещен, включает, по крайней мере, один –OH и $–CH_2OH$, или, по крайней мере, один первичный или вторичный азот;

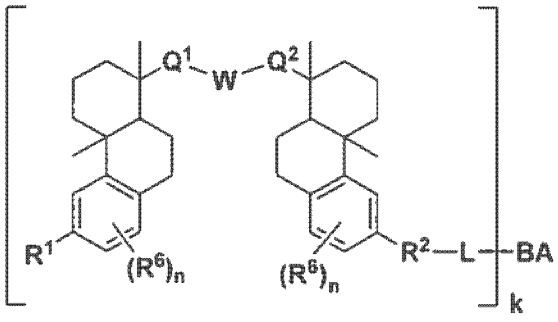
каждый R^6 независимо представляет собой галоген, C_{1-6} алкил, C_{1-6} алкилен, C_{1-6} алкокси, –CN, O-глюкозу, O-аминокислотный остаток или O-PEG_{n1}, где каждый n представляет собой целое число от 0 до 14, и каждый **n1** представляет собой целое число от 1 до 12; а также

каждый R^3 независимо представляет собой водород, алкил или арил.

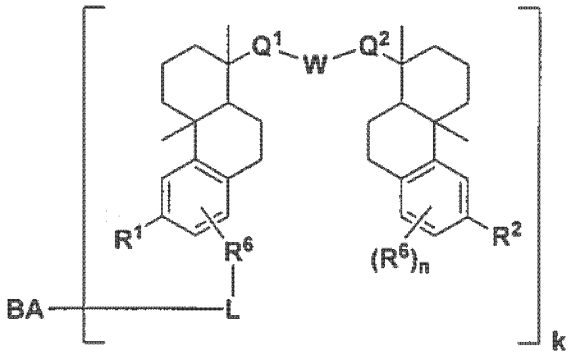
[0011] В другом варианте осуществления в настоящем документе представлены соединения согласно формулам **A**, **B**, **C** или **D**:



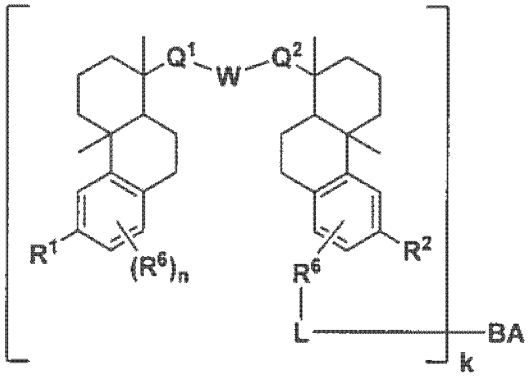
(A)



(B)



(C)



(D)

или фармацевтически приемлемая соль или стереоизомерная форма, где

L представляет собой линкер;

BA представляет собой связующий агент;

k представляет собой целое число от 1 до 30;

каждый из Q^1 и Q^2 независимо представляет собой –CH_2–, –C(O)–, –C(H)(OH)–, –$C(OH)_2$–, –SO_2–, –SO–, –$PO(OR^3)$–, –$PO(NR^3NR^4)$–, –NR^3– или –N=;

W представляет собой -CH_2-, -N(H)- или -O-;

R^1 представляет собой –$N(H)R^4$, –$N(H)R^4$–, –N(H)–, –$N(R^5)_2$ или –$N(R^5)_2$–;

R^2 представляет собой –$N(H)R^4$, –$N(H)R^4$– или –N(H)–;

каждый R^4 независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент, алкил или -алкилен-;

R^5 представляет собой алкил, арил, арилалкил, гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил, где каждый гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил содержит один, два или три гетероатома, выбранных из азота и кислорода, и, когда он

замещен, включает, по крайней мере, один –OH и $–CH_2OH$, или, по крайней мере, один первичный или вторичный азот;

каждый R^6 независимо представляет собой галоген, C_{1-6} алкил, C_{1-6} алкилен, C_{1-6} алкокси, –CN, O-глюкозу, O-аминокислотный остаток или $O\text{-}PEG_{n1}$, где каждый **n** представляет собой целое число от 0 до 14, и каждый **n1** представляет собой целое число от 1 до 12; а также

каждый R^3 независимо представляет собой водород, алкил или арил.

[0012] В другом варианте осуществления в настоящем документе изложена фармацевтическая композиция, включающая соединение, линкер-полезная нагрузка или конъюгат антитело-лекарственное средство, описанные в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель.

[0013] В другом варианте осуществления в настоящем документе изложен способ лечения дислипидемии, метаболического заболевания, воспаления или нейродегенеративного заболевания у субъекта, включая введение субъекту эффективного лечебного количества соединения, линкера-полезной нагрузки или конъюгата антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

[0014] В другом варианте осуществления в настоящем документе представлены способы получения соединений, линкеров-полезных нагрузок или конъюгатов антитело-лекарственное средство и композиций, описанных в данном документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0015] На ФИГ. 1 и 2 показаны схемы химического синтеза полезных нагрузок, соединений и карбоксамидов бис-октагидрофенантрена.

[0016] На ФИГ. 3-9 показаны схемы синтетической химии для полезных нагрузок линкера, полезных нагрузок линкера на основе циклодекстрина, полезных нагрузок линкера на основе PEG_4-таурина и полезных нагрузок линкера на основе мальтозы.

[0017] На ФИГ. 10-12 показаны схемы химического синтеза циклодекстрин-азидов, азидо-PEG_4-тауринов и мальтоза-азидов.

[0018] На ФИГ. 13 показаны графики EC_{50} для активации оттока холестерина ADC с анти-MSR1, имеющим полезную нагрузку P2.

ОПИСАНИЕ ПРИМЕРНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0019] В данном документе представлены соединения или полезные нагрузки, линкер-полезные нагрузки, конъюгаты антитело-лекарственное средство, композиции и способы, полезные для лечения, например, дислипидемии, метаболического заболевания, воспаления или нейродегенеративного заболевания у субъекта.

[0020] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, что обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Используемый здесь термин «примерно, около», когда он используется по отношению к конкретному приведенному числовому значению, означает, что значение может отличаться от указанного значения не более чем на 1%. Например, используемое здесь выражение «около 100» включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1; 99,2; 99,3; 99,4 и т. д.).

[0021] Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, также могут быть использованы на практике или при испытании настоящего изобретения, на данный момент описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в этом описании, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Определения

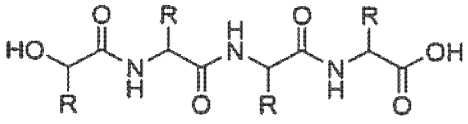
[0022] При ссылке на соединения или полезные нагрузки, линкер-полезные нагрузки (LP) или конъюгаты антитело-лекарственное средство, представленные в настоящем документе, следующие термины имеют следующие значения, если не указано иное. Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники. В случае наличия нескольких определений термина, упомянутого в данном документе, следует руководствоваться определением, представленным в данном разделе, если не указано иное.

[0023] Используемый здесь термин «алкил» относится к одновалентному и насыщенному углеводородному радикальному фрагменту. Алкил необязательно является замещенным и может быть линейным, разветвленным или циклическим, *то есть* циклоалкилом. Алкил включает, но не ограничивается ими, те радикалы, которые имеют 1-20 атомов углерода, *то есть* C_{1-20} алкил; 1-12 атомов углерода, *т.е.* C_{1-12} алкил; 1-8 атомов углерода, *т.е.* C_{1-8} алкил; 1-6 атомов углерода, *то есть* C_{1-6} алкил; и 1-3 атома

углерода, *то есть* C_{1-3} алкил. Примеры алкильных групп включают, но не ограничиваются этим: метил, этил, *н*-пропил, изопропил, *н*-бутил, *втор*-бутил, *трет*-бутил, изобутил, пентильную группу, гексильную группу и их структурные изомеры, циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил.

[0024] Используемый здесь термин «структурные изомеры» относится к соединениям, которые имеют одинаковую молекулярную формулу, но разные химические структуры, обусловленные расположением атомов. Примеры структурных изомеров включают *н*-пропил и изопропил; *н*-бутил, *втор*-бутил и *трет*-бутил; и *н*-пентил, изопентил и неопентил и тому подобное.

[0025] Используемый здесь термин «алкилен» относится к двухвалентной алкильной группе. Если не указано иное, алкилен включает, но не ограничивается ими, 1-20 атомов углерода. Алкиленовая группа необязательно замещена, как описано здесь для алкила. В некоторых вариантах осуществления алкилен является незамещенным.

[0026] Используемый здесь термин «О-аминокислота» или «НО-аминокислота» обозначает аминокислоту, в которой нативная аминогруппа на N-конце аминокислоты или аминокислотной последовательности заменена кислородом или гидроксильной группой соответственно. Например, «О-АААА» или «НО-АААА» предназначены для обозначения аминокислотной последовательности (АААА), в которой нативная аминогруппа на N-конце заменена на кислород или гидроксильную группу, соответственно (например,  , где каждый R представляет собой боковую цепь аминокислоты). Точно так же термины «О-аминокислотный остаток» или «НО-аминокислотный остаток» относятся к химическому фрагменту в соединении, который остается после химической реакции. Например, «О-аминокислотный остаток» или «НО-аминокислотный остаток» относится к продукту амидного связывания или пептидного связывания О-аминокислоты или НО-аминокислоты с подходящим партнером связывания; где, например, молекула воды удаляется после амидного или пептидного связывания О-аминокислоты или НО-аминокислоты, в результате чего получается продукт, содержащий включенный в него О-аминокислотный остаток или НО-аминокислотный остаток.

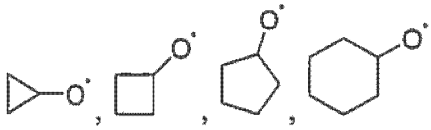
[0027] Предполагается, что обозначение аминокислоты или аминокислотного остатка без указания его стереохимии охватывает L-форму аминокислоты, D-форму аминокислоты или их рацемическую смесь.

[0028] Используемый здесь термин «галогеналкил» относится к алкилу, как определено выше, где алкил включает по меньшей мере один заместитель, выбранный из галогена, например, фтор (F), хлор (Cl), бром (Br) или йод (I). Примеры галогеналкила включают, но не ограничиваются ими, $-CF_3$, $-CH_2CF_3$, $-CCl_2F$ и $-CCl_3$.

[0029] Используемый здесь термин «алкенил» относится к одновалентному углеводородному радикальному фрагменту, содержащему по меньшей мере два атома углерода и одну или несколько неароматических углерод-углеродных двойных связей. Алкенил необязательно замещен и может быть линейным, разветвленным или циклическим. Алкенил включает, но не ограничивается ими, те радикалы, которые имеют 2-20 атомов углерода, *т.е.* C_{2-20} алкенил; 2-12 атомов углерода, *т.е.* C_{2-12} алкенил; 2-8 атомов углерода, *т.е.* C_{2-8} алкенил; 2-6 атомов углерода, *то есть* C_{2-6} алкенил; и 2-4 атома углерода, *то есть* C_{2-4} алкенил. Примеры алкенильных групп включают, но не ограничиваются этим, винил, пропенил, бутенил и циклогексенил.

[0030] Используемый здесь термин «алкинил» относится к одновалентному углеводородному радикальному фрагменту, содержащему по меньшей мере два атома углерода и одну или несколько тройных связей углерод-углерод. Алкинил необязательно замещен и может быть линейным, разветвленным или циклическим. Алкинил включает, но не ограничивается ими, те радикалы, которые имеют 2-20 атомов углерода, *т.е.* C_{2-20} алкинил; 2-12 атомов углерода, *т.е.* C_{2-12} алкинил; 2-8 атомов углерода, *т.е.* C_{2-8} алкинил; 2-6 атомов углерода, *то есть* C_{2-6} алкинил; и 2-4 атома углерода, *то есть* C_{2-4} алкинил. Примеры алкинильных групп включают, но не ограничиваются этим, этинил, пропинил и бутинил.

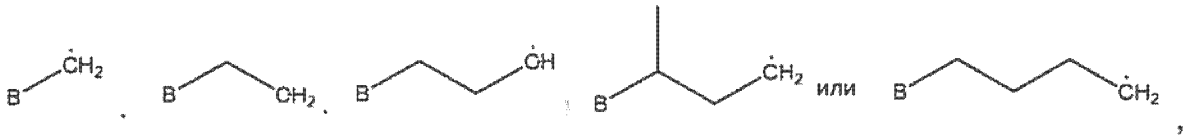
[0031] Используемый здесь термин «алкокси» относится к одновалентному и насыщенному углеводородному радикальному фрагменту, где углеводород включает в себя одинарную связь с атомом кислорода и где радикал локализован на атоме кислорода, *например,* $CH_3CH_2-O\cdot$ для этокси. Алкоксизаместители связываются с соединением, которое они замещают через этот атом кислорода алкоксизаместителя. Алкокси необязательно замещен и может быть линейным, разветвленным или циклическим, *т.е.* циклоалкокси. Алкокси включает, но не ограничивается ими, те радикалы, которые содержат 1-20 атомов углерода, *т.е.* C_{1-20} алкокси; 1-12 атомов углерода, *т.е.* C_{1-12} алкокси; 1-8 атомов углерода, *т.е.* C_{1-8} алкокси; 1-6 атомов углерода, *т.е.* C_{1-6} алкокси; и 1-3 атома углерода, *т.е.* C_{1-3} алкокси. Примеры алкоксигруппы включают, но не ограничиваются ими, метокси, этокси, *н*-пропокси, изопропокси, *н* -бутокси, *втор*-бутокси, *трет*-бутокси,

изобутокси, пентоксигруппу и гексоксигруппу, циклопропокси, циклобутокси, циклопентокси и циклогексокси (т.е.  , соответственно).

[0032] Используемый здесь термин «галогеналкокси» относится к алкокси, как определено выше, где алкокси включает по меньшей мере один заместитель, выбранный из галогенов, *например,* F, Cl, Br или I.

[0033] Используемый здесь термин «арил» относится к одновалентному фрагменту, который является радикалом ароматического соединения, где атомы кольца представляют собой атомы углерода. Арил необязательно замещен и может быть моноциклическим или полициклическим, *например*, бициклическим или трициклическим. Примеры арильных фрагментов включают, но не ограничиваются ими, те, которые имеют от 6 до 20 кольцевых атомов углерода, *то есть* C_{6-20} арил; от 6 до 15 атомов углерода в кольце, *т.е.* C_{6-15} арил, и от 6 до 10 атомов углерода в кольце, *т.е.* C_{6-10} арил. Примеры арильных фрагментов включают, но не ограничиваются ими, фенил, нафтил, флуоренил, азуленил, антрил, фенантрил и пиренил.

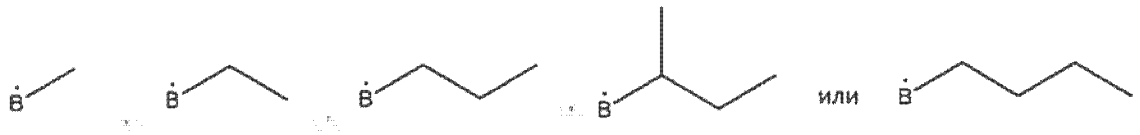
[0034] Используемый здесь термин «арилалкил» относится к одновалентному фрагменту, который является радикалом алкильного соединения, где алкильное соединение замещено ароматическим заместителем, *то есть* ароматическое соединение включает одинарную связь с алкильной группой, и где радикал представляет собой локализован на алкильной группе. Арилалкильная группа связывается с показанной химической структурой через алкильную группу. Арилалкил может быть представлен структурой, *например,*



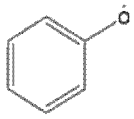
где B представляет собой ароматическую группу, *например*, фенил. Арилалкил необязательно замещен, *то есть* арильная группа и/или алкильная группа могут быть замещены, как описано в настоящем документе. Примеры арилалкила включают, но не ограничиваются ими, бензил.

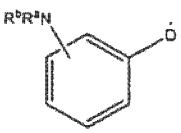
[0035] Используемый здесь термин «алкиларил» относится к одновалентному фрагменту, который является радикалом арильного соединения, где арильное соединение замещено алкильным заместителем, *то есть* арильное соединение включает одинарную связь с алкильной группой, и где радикал представляет собой локализован на арильной

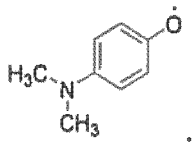
группе. Алкиларильная группа связывается с показанной химической структурой через арильную группу. Алкиларил может быть представлен структурой, *например,*



, где B представляет собой ароматическую группу, *например*, фенил. Алкиларил необязательно замещен, *то есть* арильная группа и/или алкильная группа могут быть замещены, как описано в настоящем документе. Примеры алкиларила включают, но не ограничиваются, толуил.

[0036] Используемый здесь термин «арилокси» относится к одновалентному фрагменту, который является радикалом ароматического соединения, где атомы кольца представляют собой атомы углерода и где кольцо замещено радикалом кислорода, *то есть* ароматическое соединение включает простую связь с атомом кислорода и где радикал локализован на атоме кислорода, *например*,  для фенокси. Арилокси заместители связываются с соединением, которое они замещают через этот атом кислорода. Арилокси необязательно замещен. Арилокси включает, но не ограничивается ими, те радикалы, которые имеют от 6 до 20 атомов углерода в кольце, *то есть* $C_{6\text{-}20}$ арилокси; от 6 до 15 атомов углерода в кольце, *т.е.* $C_{6\text{-}15}$ арилокси, и от 6 до 10 атомов углерода в кольце, *т. е.* $C_{6\text{-}10}$ арилокси. Примеры арилокси групп включают, но не ограничиваются ими, фенокси, нафтокси и антрокси.

[0037] Используемый здесь термин «$\mathbf{R^aR^b}$N-арилокси» относится к одновалентному фрагменту, который является радикалом ароматического соединения, где атомы кольца представляют собой атомы углерода и где кольцо замещено по меньшей мере одним заместителем $\mathbf{R^aR^b}$N– и по меньшей мере одним радикалом кислорода, *т.е.* ароматическое соединение включает в себя одинарную связь с заместителем $\mathbf{R^aR^b}$N- и одинарную связь с атомом кислорода и где радикал локализован на атоме кислорода, *например*,  . $\mathbf{R^aR^b}$N-арилокси заместители связываются с соединением, которое они замещают через этот атом кислорода. $\mathbf{R^aR^b}$N-арилокси необязательно замещен. $\mathbf{R^aR^b}$N-арилокси включает, но не ограничивается ими, те, которые имеют от 6 до 20 атомов углерода в кольце, например, $C_{6\text{-}20}$ $(\mathbf{R^aR^b}N)_{nn}$-арилокси, от 6 до 15 атомов углерода в кольце, например, $C_{6\text{-}15}$ $(\mathbf{R^aR^b}N)_{nn}$-арилокси и от 6 до 10 атомов углерода в кольце,

например, C_{6-10} $(R^aR^bN)_{nn}$-арилокси, где **nn** представляет собой количество заместителей R^aR^bN– . Пример R^aR^bN-арилокси-фрагмента включает, но не ограничивается ими, 4-(диметиламино)-фенокси,  .

[0038] Используемый здесь термин «арилен» относится к двухвалентному фрагменту ароматического соединения, в котором атомы кольца представляют собой только атомы углерода. Арилен необязательно замещен и может быть моноциклическим или полициклическим, *например*, бициклическим или трициклическим. Примеры ариленовых фрагментов включают, но не ограничиваются ими, те, которые имеют от 6 до 20 кольцевых атомов углерода, *то есть* C_{6-20} арилен; от 6 до 15 атомов углерода в кольце, *т.е.* C_{6-15} арилен, и от 6 до 10 атомов углерода в кольце, *т.е.* C_{6-10} арилен.

[0039] Используемый здесь термин «гетероалкил» относится к алкилу, в котором один или несколько атомов углерода заменены гетероатомами. Используемый здесь термин «гетероалкенил» относится к алкенилу, в котором один или несколько атомов углерода заменены гетероатомами. Используемый здесь термин «гетероалкинил» относится к алкинилу, в котором один или несколько атомов углерода заменены гетероатомами. Подходящие гетероатомы включают, но не ограничиваются ими, атомы азота, кислорода и серы. Гетероалкил является необязательно замещенным. Примеры гетероалкильных групп включают, но не ограничиваются ими, аминоалкил, сульфонилалкил и сульфинилалкил. Примеры гетероалкильных групп также включают, но не ограничиваются ими, метиламино, метилсульфонил и метилсульфинил. Используемые здесь термины «гетероалкилен», «гетероалкенилен» и «гетероалкинилен» представляют собой двухвалентные формы гетероалкила, гетероалкенила и гетероалкинила соответственно.

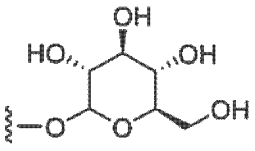
[0040] Используемый здесь термин «гетероарил» относится к одновалентному фрагменту, который является радикалом ароматического соединения, в котором атомы кольца содержат атомы углерода и по меньшей мере один атом кислорода, серы, азота или фосфора. Примеры гетероарильных фрагментов включают, но не ограничиваются ими, те, которые имеют от 5 до 20 кольцевых атомов; от 5 до 15 кольцевых атомов; и от 5 до 10 кольцевых атомов. Гетероарил необязательно замещен.

[0041] Используемый здесь термин «гетероарилен» относится к арилену, в котором один или несколько кольцевых атомов ароматического кольца заменены атомом кислорода, серы, азота или фосфора. Гетероарилен необязательно замещен.

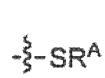
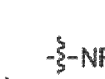
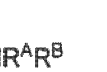
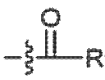
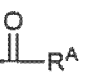
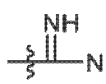
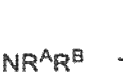
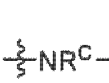
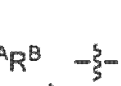
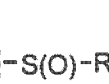
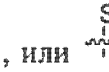
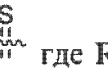
[0042] Используемый здесь термин «гетероциклоалкил» относится к циклоалкилу, в котором один или несколько атомов углерода замещены гетероатомами. Подходящие гетероатомы включают, но не ограничиваются ими, атомы азота, кислорода и серы. Гетероциклоалкил является необязательно замещенным. Примеры гетероциклоалкильных групп включают, но не ограничиваются ими, морфолинил, пиперидинил, тетрагидропиранил, пирролидинил, имидазолидинил, оксазолидинил, тиазолидинил, диоксоланил, дитиоланил, оксанил или тианил.

[0043] Используемый здесь термин «кислота Льюиса» относится к молекуле или иону, который принимает неподеленную пару электронов. Кислоты Льюиса, используемые в описанных здесь способах, не являются протонными. Кислоты Льюиса включают, но не ограничиваются ими, кислоты неметаллов, кислоты металлов, твердые кислоты Льюиса и мягкие кислоты Льюиса. Кислоты Льюиса включают, но не ограничиваются ими, кислоты Льюиса алюминия, бора, железа, олова, титана, магния, меди, сурьмы, фосфора, серебра, иттербия, скандия, никеля и цинка. Иллюстративные кислоты Льюиса включают, но не ограничиваются ими, $AlBr_3$, $AlCl_3$, BCl_3, метилсульфид трихлорида бора, BF_3, метилэфират трифторида бора, метилсульфид трифторида бора, тетрагидрофуран трифторида бора, дициклогексилбор-трифторметансульфонат (III) хлорид, хлорид олова (IV), хлорид титана (IV), изопропоксид титана (IV), $Cu(OTf)_2$, $CuCl_2$, $CuBr_2$, хлорид цинка, галогениды алкилалюминия (R_nAlX_{3-n}, где R представляет собой гидрокарбил), $Zn(OTf)_2$, $ZnCl_2$, $Yb(OTf)_3$, $Sc(OTf)_3$, $MgBr_2$, $NiCl_2$, $Sn(OTf)_2$, $Ni(OTf)_2$ и $Mg(OTf)_2$.

[0044] Используемый здесь термин «*N*-содержащий гетероциклоалкил» относится к циклоалкилу, в котором один или несколько атомов углерода замещены гетероатомами и где по меньшей мере один гетероатом представляет собой атом азота. Подходящие гетероатомы в дополнение к азоту включают, но не ограничиваются ими, атомы кислорода и серы. *N*-содержащий гетероциклоалкил является необязательно замещенным. Примеры *N*-содержащих гетероциклоалкильных групп включают, но не ограничиваются ими, морфолинил, пиперидинил, пирролидинил, имидазолидинил, оксазолидинил или тиазолидинил.

[0045] В данном контексте «О-глюкоза» относится к одновалентному фрагменту, присоединенному через экзоциклический атом кислорода глюкозы. Подходящие фрагменты О-глюкозы включают, без ограничения,  и т.п.

[0046] В данном контексте «O-PEG$_{n1}$» относится к одновалентному фрагменту, присоединенному через концевой атом кислорода, где **n1** составляет от 1 до 100. Например, когда **n1** равно 1, тогда O-PEG$_{n1}$ представляет собой –O–CH_2CH_2OH; когда **n1** равно двум, то O-PEG$_{n1}$ представляет собой –O–CH_2CH_2O–CH_2CH_2OH; а когда **n1** равно трем, то O-PEG$_{n1}$ представляет собой –O–CH_2CH_2O–CH_2CH_2O–CH_2CH_2OH.

[0047] Используемый здесь термин «необязательно замещенный», когда он используется для описания радикального фрагмента, например, необязательно замещенного алкила, означает, что такой фрагмент необязательно связан с одним или несколькими заместителями. Примеры таких заместителей включают, но не ограничиваются ими, галоген, циано, нитро, необязательно замещенный галогеналкил, азидо, эпокси, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклоалкил, ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , оксо или  , или  где R^A, R^B и R^C независимо в каждом случае представляют собой атом водорода, алкил, алкенил, алкинил, арил, алкиларил, арилалкил, гетероалкил, гетероарил или гетероциклоалкил, или R^A и R^B вместе с атомами, с которыми они связаны, образуют насыщенное или ненасыщенное карбоциклическое кольцо, где кольцо необязательно замещено, и где один или несколько кольцевых атомов необязательно замещены гетероатомом. В некоторых вариантах осуществления, когда радикальный фрагмент необязательно замещен необязательно замещенным гетероарилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом или необязательно замещенным насыщенным или ненасыщенным карбоциклическим кольцом, заместители необязательно замещенного гетероарила, необязательно замещенного гетероциклоалкила или необязательно замещенного насыщенного или ненасыщенного карбоциклического кольца если они замещены, не замещены заместителями, которые дополнительно необязательно замещены дополнительными заместителями. В некоторых вариантах осуществления, когда группа, описанная в данном документе, является необязательно замещенной, заместитель, связанный с группой, является незамещенным, если не указано иное.

[0048] Используемый здесь термин «ацил» относится к  , где R^A представляет собой алкил или необязательно замещенный алкил. Как также используется здесь, «необязательно замещенный ацил» относится к случаю, когда R^A необязательно замещен.

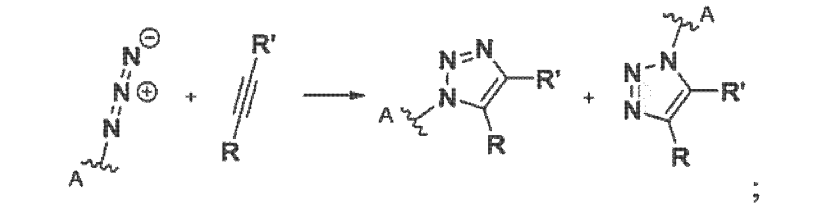
[0049] Используемый здесь термин «связывающий агент» относится к любой молекуле, *например* белку, способному специфически связываться с данным партнером по связыванию, *например* антигену.

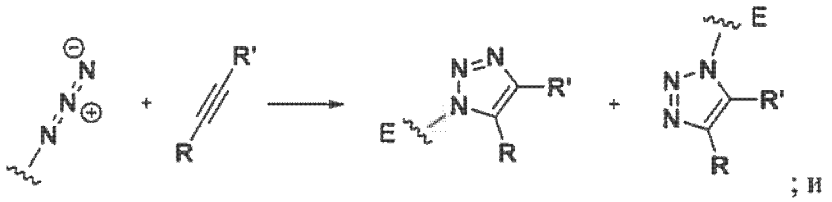
[0050] Используемый здесь термин «линкер» относится к двухвалентному, трехвалентному или многовалентному фрагменту, который ковалентно связывает связывающий агент с одним или несколькими соединениями, описанными здесь, например соединениями с полезной нагрузкой и усиливающими агентами.

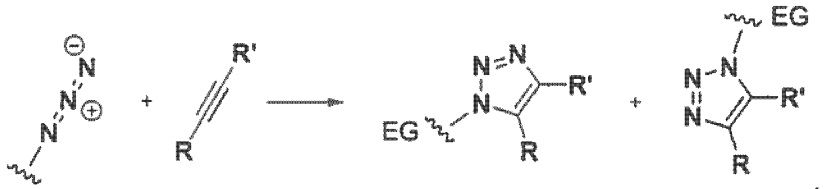
[0051] Используемый здесь термин «условия синтеза амида» относится к условиям реакции, подходящим для образования амида, *например*, путем реакции карбоновой кислоты, активированной карбоновой кислоты или ацилгалогенида с амином. В некоторых примерах условия синтеза амида относятся к условиям реакции, подходящим для осуществления образования амидной связи между карбоновой кислотой и амином. В некоторых из этих примеров карбоновая кислота сначала превращается в активированную карбоновую кислоту до того, как активированная карбоновая кислота вступает в реакцию с амином с образованием амида. Подходящие условия для осуществления образования амида включают, но не ограничиваются ими, условия, в которых используются реагенты для осуществления реакции между карбоновой кислотой и амином, включая, но не ограничиваясь этим, дициклогексилкарбодиимид (DCC), диизопропилкарбодиимид (DIC), (бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфони (BOP), (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинфосфония гексафторфосфат (PyBOP), (7-азабензотриазол-1-илокси) трипирролидинфосфония гексафторфосфат (PyAOP), гексафторфосфата бромтрипирролидинфосфоний (PyBrOP), O-(бензотриазол-1-ил)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-тетраметилуронийгексафторфосфат (HBTU), O-(бензотриазол-1-ил)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-тетраметилуроний тетрафторборат (TBTU), 1-[бис(диметиламино)метилен]-1H-1,2,3-триазоло [4,5-b]пиридиния, 3-оксид гексафторфосфата (HATU), N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2- дигидрохинолин (EEDQ), N-этил-N'-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC), 2-хлор-1,3-диметилимидазолидиния гексафторфосфат (CIP), 2-хлор-4,6-диметокси-1,3,5-триазин (CDMT) и карбонилдиимидазол (CDI). В некоторых примерах карбоновую кислоту сначала превращают в активированный эфир карбоновой кислоты перед обработкой активированного эфира карбоновой кислоты амином с образованием амидной связи. В определенных вариантах осуществления карбоновую кислоту обрабатывают реагентом. Реагент активирует карбоновую кислоту, депротонируя карбоновую кислоту, а затем образуя комплекс продуктов с депротонированной карбоновой кислотой в результате нуклеофильной атаки депротонированной карбоновой кислоты на

протонированный реагент. Активированные сложные эфиры карбоновых кислот для определенных карбоновых кислот впоследствии более восприимчивы к нуклеофильной атаке амина, чем карбоновая кислота до ее активации. Это приводит к образованию амидной связи. Как таковая, карбоновая кислота описана как активированная. Типичные реагенты включают DCC и DIC.

[0052] Используемый здесь термин «региоизомер», «региоизомер» или «смесь региоизомеров» относится к продукту (ам) 1,3-циклоприсоединения или активированным штаммом алкиназидным циклоприсоединением (SPAACs), иначе называемым клик-реакциями, которые получают из подходящих азидов (например, $-N_3$ или антител, полученных из PEG-N_3), обработанных подходящими алкинами. В определенных вариантах осуществления, например, региоизомеры и смеси региоизомеров характеризуются продуктами клик-реакции, показанными ниже:







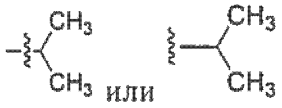
В некоторых вариантах осуществления более одного подходящего азида и более чем одного подходящего алкина можно использовать в схеме синтеза на пути к продукту, где каждая пара азид-алкин может участвовать в одной или нескольких независимых клик-реакциях, чтобы получить смесь региоизомерных продуктов клик-реакции. Например, специалист в данной области техники поймет, что первый подходящий азид может независимо реагировать с первым подходящим алкином, а второй подходящий азид может независимо реагировать со вторым подходящим алкином по пути к продукту, что приводит к образованию четырех возможных региоизомеров клик-реакции или смеси четырех возможных региоизомеров клик-реакции в образце ADC, описанном в данном документе. В качестве примера, специалист в данной области техники поймет, что первый

подходящий азид может независимо реагировать с первым подходящим алкином, а второй подходящий азид может независимо реагировать со вторым подходящим алкином по пути к продукту, что приводит к образованию четырех возможных региоизомеров клик-реакции или смеси четырех возможных региоизомеров клик-реакции в образце LP, описанном в данном документе.

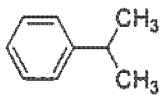
[0053] Используемый здесь термин «остаток» относится к химическому фрагменту в соединении, которое остается после химической реакции. Например, термин «аминокислотный остаток» или «*N*-алкильный аминокислотный остаток» относится к продукту амидного сочетания или пептидного сочетания аминокислоты или *N*-алкиламинокислоты с подходящим партнером связывания; где, например, молекула воды удаляется после амидного или пептидного сочетания аминокислоты или *N*-алкиламинокислоты, что приводит к продукту, содержащему аминокислотный остаток или *N*-алкиламинокислотный остаток, включенный в него.

[0054] Используемый здесь термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству (например, соединения или полезной нагрузки), которое является достаточным для обеспечения терапевтической пользы для пациента при лечении или ведении заболевания или расстройства, или для задержки или минимизации одного или нескольких симптомы, связанные с заболеванием или расстройством.

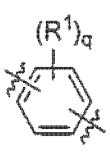
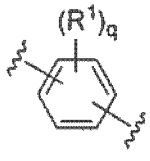
[0055] Некоторые группы, фрагменты, заместители и атомы изображены волнистой линией, которая пересекает связь или связи, чтобы указать атом, через который связаны группы, фрагменты, заместители, атомы. Например, фенильная группа, которая замещена пропильной группой, обозначена как:

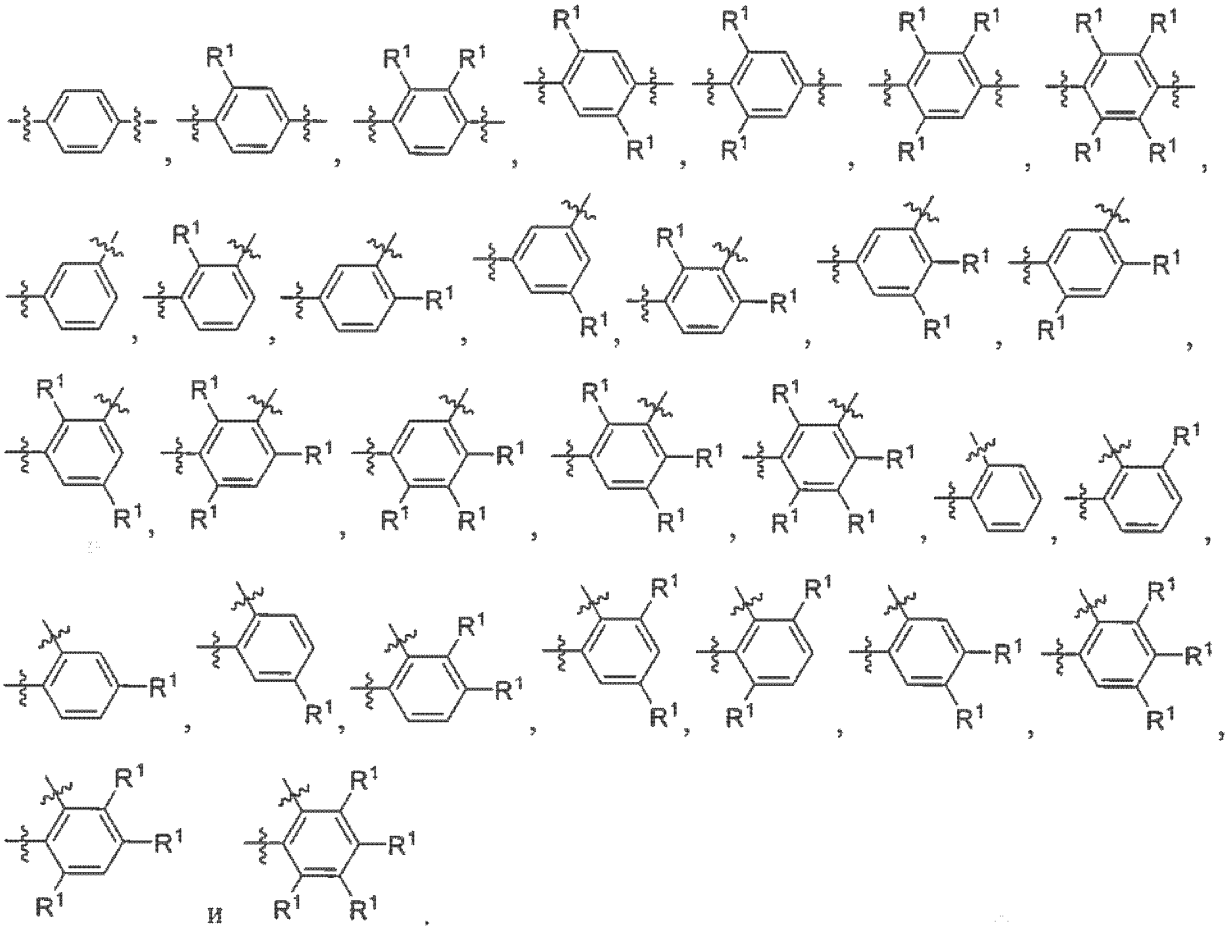


и имеет следующую структуру:



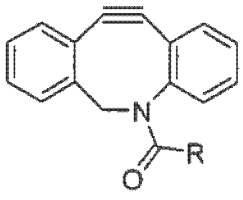
. Как используется в данном документе, иллюстрации, показывающие заместители, связанные с циклической группой (*например*, ароматическим, гетероароматическим, конденсированным кольцом и насыщенным или ненасыщенным циклоалкилом или гетероциклоалкилом) через связь между атомами кольца, предназначены для указания, если не указано иное, что циклическая группа может быть замещенным этим заместителем в любом положении кольца в циклической группе или в любом кольце в группе с конденсированным кольцом в соответствии с методиками,

изложенными в настоящем документе, или известными в области, к которой относится настоящее раскрытие. Например, группа  или  , в которой индекс q представляет собой целое число от 0 до 4 и в котором положения заместителя R^1 описаны в общем, *т.е.* не связаны непосредственно с какой-либо вершиной структуры линии связи, *т.е.* кольцевой атом углерода включает следующие неограничивающие примеры групп, в которых заместитель R^1 связан с определенным кольцевым атомом углерода:

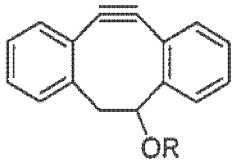


[0056] Используемое здесь выражение «реакционноспособный линкер» или сокращение «**RL**» относится к одновалентной группе, которая включает реакционноспособную группу и спейсерную группу, изображенные, например, как  , в которой **RG** представляет собой реакционноспособную группу, а SP представляет собой спейсерную группу. Как описано здесь, реакционноспособный линкер может включать более одной реакционноспособной группы и более одной спейсерной группы. Спейсерная группа представляет собой любой двухвалентный фрагмент, который связывает реакционноспособную группу с другой группой, такой как полезная нагрузка. Реакционноспособные линкеры (**RL**) вместе с полезными нагрузками,

с которыми они связаны, обеспечивают промежуточные соединения («линкер-полезные нагрузки»), используемые в качестве синтетических предшественников для получения конъюгатов антител, описанных здесь. Реакционноспособный линкер включает реакционноспособную группу («**RG**»), которая представляет собой функциональную группу или фрагмент, который способен реагировать с реакционноспособной частью другой группы, например, антителом, модифицированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или усиливающей группой. Часть, полученная в результате реакции реакционноспособной группы с антителом, модифицированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, вместе со связывающей группой, включает в себя часть «линкер связывающего агента» («**BL**») конъюгата, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления «реакционноспособная группа» представляет собой функциональную группу или фрагмент (*например*, сложный эфир малеимида или *N*-гидроксисукцинимида (NHS)), который реагирует с остатком цистеина или лизина антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления «реакционноспособная группа» представляет собой функциональную группу или группу, которая способна подвергаться химической клик-реакции (*см., например*, клик-химию, Huisgen *Proc. Chem. Soc.* **1961 г.**, Ван *и др. J. Am. Chem.* **2003** и Агард и *др. J. Am. Chem. Soc.* **2004 г.**). В некоторых вариантах осуществления указанной химической клик-реакции реакционноспособной группой является алкин, который способен подвергаться реакции 1,3-циклоприсоединения с азидом. Такие подходящие реакционноспособные группы включают, но не ограничиваются ими, напряженные алкины, *например*, те, которые подходят для активированных штаммами алкиназидных циклоприсоединений (SPAAC), циклоалкины, *например*, циклооктины, бензанулированные алкины и алкины, способные подвергаться 1,3-циклоприсоединению реакции с алкинами в отсутствие медных катализаторов. К подходящим алкинам относятся, в частности, дибензоазациклооктины или

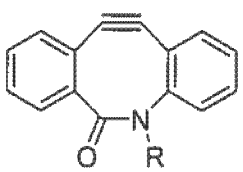


(DIBAC), дибензоциклооктины или

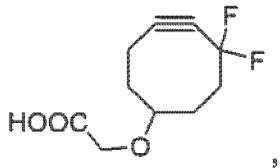
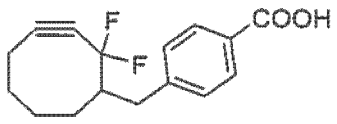
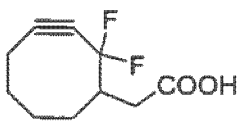
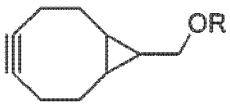
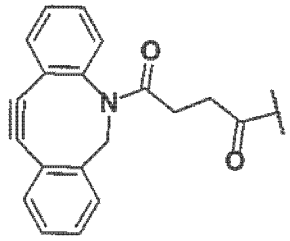
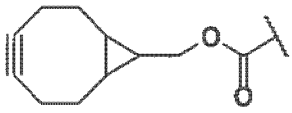


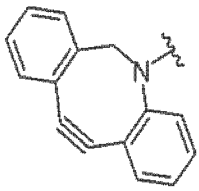
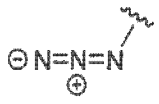
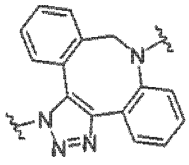
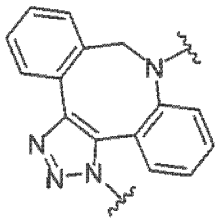
(DIBO),

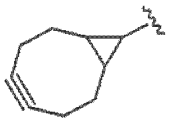
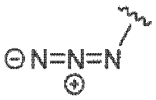
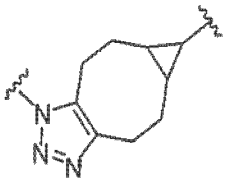
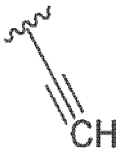
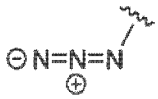
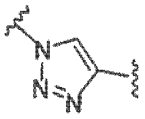
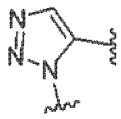
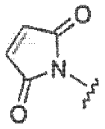
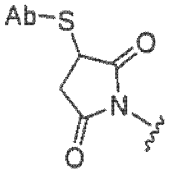
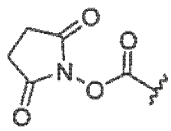
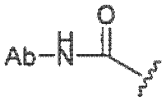
биарилазациклооктинон или



(BARAC), дифторированные циклооктины,

или  , или  , или  (DIFO), замещенные, *например*, фторированные алкины, аза-циклоалкины, бицикло[6.1.0]нонин или  (BCN, где **R** представляет собой алкил, алкокси или ацил), а также его производные. Особенно полезные алкины включают  и  . Полезные нагрузки линкера, включающие такие реакционноспособные группы, полезны для конъюгирования антител, которые были функционализированы азидогруппами. Такие функционализированные антитела включают антитела, функционализированные азидо-полиэтиленгликолевыми группами. В некоторых вариантах осуществления такое функционализированное антитело получают обработкой антитела, имеющего по меньшей мере один остаток глутамина, *например*, тяжелую цепь Gln295, с соединением, содержащим аминогруппу и азидную группу, в присутствии фермента трансглютаминазы.

[0057] В некоторых примерах реакционноспособной группой является алкин, *например*,  , который может реагировать посредством клик-химической реакции с азидом, *например*,  , с образованием клик-химического продукта, *такого как*  или  . В некоторых примерах группа реагирует с азидом на модифицированном антителе или его антигенсвязывающем фрагменте. В некоторых примерах реакционноспособная группа представляет собой алкин, *например*,

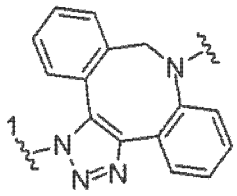
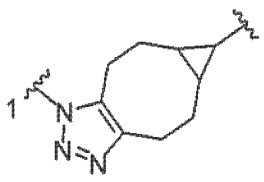
 , который может реагировать посредством клик-химической реакции с азидом, *например*,  с образованием клик-химического продукта, *например*,  . В некоторых примерах реакционноспособной группой является алкин, *например*,  , который может реагировать посредством клик-химической реакции с азидом, *например*,  , с образованием клик-химического продукта, *такого как*  или  . В некоторых примерах реакционноспособная группа представляет собой функциональную группу, *например*,  , которая реагирует с остатком цистеина на антителе или его антигенсвязывающим фрагментом, образуя с ним связь, *например*,  , где **Ab** относится к антителу или его антигенсвязывающий фрагмент, и S относится к атому S остатка цистеина, через который функциональная группа связывается с **Ab**. В некоторых примерах реакционноспособная группа представляет собой функциональную группу, *например*,  , которая реагирует с остатком лизина на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте с образованием с ним связи, *например*,  , где **Ab** относится к антителу или антигенсвязывающему его фрагмент и NH относится к атому NH остатка боковой цепи лизина, через который функциональная группа связывается с **Ab**.

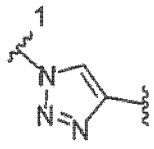
[0058] Используемый здесь термин «биоразлагаемый фрагмент» относится к фрагменту, который разлагается in vivo до нетоксичных, биосовместимых компонентов, которые могут быть выведены из организма обычными биологическими процессами. В некоторых вариантах осуществления биоразлагаемый фрагмент полностью или в значительной степени разлагается in vivo в течение примерно 90 дней или меньше, примерно 60 дней или меньше, или примерно 30 дней или меньше, где степень разложения основана на процентной потере массы биоразлагаемого фрагмента, и где полное разложение соответствует потере массы 100 %. Примеры биоразлагаемых фрагментов включают, без ограничения, алифатические полиэфиры, такие как поли(□-капролактон) (PCL), поли(3-гидроксибутират) (PHB), поли(гликолевая кислота) (PGA), поли(молочная кислота) (PLA) и ее сополимеры с гликолевой кислотой (например, поли(D, L-лактид-когликолид) (PLGA) (Vert M, Schwach G, Engel R и Coudane J (1998) J Control Release 53 (1-3): 85-92; Jain RA (2000) Biomaterials 21 (23): 2475-2490; Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS и Shakesheff KM (1999) Chemical Reviews 99 (11): 3181-3198; и Park TG (1995) Biomaterials 16 (15): 1123-1130, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

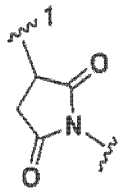
[0059] Используемые здесь фразы «эффективное количество», «физиологически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» относятся к тому количеству соединения, которое достаточно для осуществления лечения при введении субъекту, нуждающемуся в таком лечении. «Физиологически эффективное количество» активного вещества указывает на эффективное количество активных веществ для оказания значительного, наблюдаемого извне воздействия на пациента. Таким образом, физиологически эффективное количество влияет на одну или несколько характеристик (например, фенотип) пациента без необходимости в специальном оборудовании для определения эффекта. Например, физиологически эффективное количество соединения, описанного в данном документе, оказывает значительное, наблюдаемое извне влияние на поведение пациента, уменьшая один или несколько симптомов состояния, подлежащего лечению. Соответственно, можно определить, было ли введено эффективное количество активного вещества, наблюдая за пациентом и наблюдая, произошли ли у пациента изменения из-за активного вещества.

[0060] Используемый здесь термин «линкер связывающего агента» или «**BL**» относится к любой двухвалентной, трехвалентной или многовалентной группе или фрагменту, который связывает или соединяет связывающий агент (*например*, антитело или фрагмент антигенсвязывающего вещества) с указанным здесь соединением полезной

нагрузки (*например*, бис-октагидрофенантренкарбоксамиды) и, необязательно, с одним или несколькими соединениями боковой цепи. Как правило, подходящие линкеры связывающего агента для конъюгатов антител, описанных в настоящем документе, представляют собой те, которые являются достаточно стабильными, чтобы использовать циркулирующий период полужизни антитела, и в то же время способны высвобождать его полезную нагрузку после опосредованной антигеном интернализации конъюгата. Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Расщепляемые линкеры представляют собой линкеры, которые расщепляются посредством внутриклеточного метаболизма после интернализации, *например*, расщепления посредством гидролиза, восстановления или ферментативной реакции. Нерасщепляемые линкеры представляют собой линкеры, которые высвобождают присоединенную полезную нагрузку посредством лизосомальной деградации антитела после интернализации. Подходящие линкеры включают, но не ограничиваются ими, кислотолабильные линкеры, гидролизно-лабильные линкеры, ферментативно расщепляемые линкеры, восстанавливающие лабильные линкеры,- саморасщепляющиеся линкеры и нерасщепляемые линкеры. Подходящие линкеры также включают, но не ограничиваются ими, те, которые являются или включают пептиды, глюкурониды, сукцинимид-тиоэфиры, полиэтиленгликолевые (ПЭГ) звенья, гидразоны, малькапроильные звенья, дипептидные звенья, валин-цитруллиновые звенья и пара-аминобензил (PAB) единицы. В некоторых вариантах осуществления линкер связывающего агента (**BL**) включает фрагмент, который образуется в результате реакции реакционноспособной группы (**RG**) реакционноспособного линкера (**RL**) и реакционноспособной части связывающего агента, *например*, антитела, модифицированного антитела или его антигенсвязывающий фрагмент.

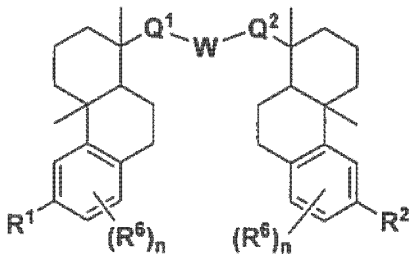
[0061] В некоторых примерах **BL** включает следующую группу:  или триазолил региоизомер, в котором - это связь со связывающим агентом. В некоторых примерах **BL** включает следующую группу:  , где - это связь со

связующим агентом. В некоторых примерах **BL** включает следующую группу: 

или триазолил региоизомер, в котором  - это связь со связывающим агентом. В некоторых примерах **BL** включает следующую группу:  где  представляет собой связь с цистеином антитела или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых примерах BL включает следующую группу:  , где  представляет собой связь с лизином антитела или его антигенсвязывающим фрагментом.

Соединения или полезные нагрузки

[0062] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлено соединение, имеющее структуру Формулы (I):



(I)

или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где

каждый из Q^1 и Q^2 независимо представляет собой $-CH_2-$, $-C(O)-$, $-C(H)(OH)-$ или $-C(OH)_2-$;

W представляет собой $-CH_2-$, -N(H)- или -O-;

R^1 представляет собой $-N(H)R^4$ или $-N(R^5)_2$;

R^2 представляет собой $-N(H)R^4$;

каждый R^4 независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент, алкил, замещенный алкил, ацил или замещенный ацил;

$\mathbf{R^5}$ представляет собой алкил, арил, арилалкил, гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил, где каждый гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил содержит один, два или три гетероатома, выбранных из азота и кислорода, и, когда он замещен, включает, по крайней мере, один –OH и $–CH_2OH$, или, по крайней мере, один первичный или вторичный азот; и

каждый $\mathbf{R^6}$ независимо представляет собой галоген, $C_{1\text{-}6}$ алкил, $C_{1\text{-}6}$ алкокси, –CN, O-глюкозу, O-аминокислотный остаток или O-PEG_{n1}, где каждый **n** представляет собой целое число от 0 до 14, и каждый **n1** представляет собой целое число от 1 до 12.

[0063] В одном варианте осуществления Формулы I $\mathbf{Q^1}$ представляет собой $–CH_2–$, $\mathbf{Q^2}$ представляет собой –C(O)– и **W** представляет собой$–CH_2–$. В одном варианте осуществления Формулы I $\mathbf{Q^1}$ представляет собой $–CH_2–$, $\mathbf{Q^2}$ представляет собой –C(O)– и **W** представляет собой –O–. В одном из вариантов осуществления Формулы I $\mathbf{Q^1}$ представляет собой $–CH_2–$, $\mathbf{Q^2}$ представляет собой –C(O)– и **W** представляет собой –NH–. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $\mathbf{R^1}$ представляет собой $–N(H)\mathbf{R^4}$ или $–N(\mathbf{R^5})_2$ и $\mathbf{R^2}$ представляет собой $–N(H)\mathbf{R^4}$. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $\mathbf{R^1}$ представляет собой $–N(H)\mathbf{R^4}$ и $\mathbf{R^2}$ представляет собой $–N(H)\mathbf{R^4}$. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $\mathbf{R^1}$ представляет собой $–N(\mathbf{R^5})_2$, а $\mathbf{R^2}$ представляет собой $–N(H)\mathbf{R^4}$. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент, алкил, замещенный алкил, ацил или замещенный ацил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент или алкил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый $\mathbf{R^4}$ представляет собой водород. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой аминокислотный остаток. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой *N*-алкильный аминокислотный остаток. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой пептидный остаток. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой биоразлагаемый фрагмент. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой алкил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой замещенный алкил. В

любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^4 независимо в каждом случае представляет собой ацил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^4 независимо в каждом случае представляет собой замещенный ацил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце один R^4 представляет собой водород, а другой R^4 представляет собой аминокислотный остаток. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце один R^4 представляет собой водород, а другой R^4 представляет собой пептидный остаток. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце один R^4 представляет собой водород, а другой R^4 представляет собой замещенный алкил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце один R^4 представляет собой водород, а другой R^4 представляет собой ацил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце один R^4 представляет собой водород, а другой R^4 представляет собой замещенный ацил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой алкил, арил, арилалкил, гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил, где каждый гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил содержит один, два или три гетероатома, выбранных из азота и кислорода, и, когда он замещен, включает, по крайней мере, один –OH и $–CH_2OH$, или, по крайней мере, один первичный или вторичный азот. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой алкил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой арил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой арилалкил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой гетероциклоалкил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой гетероциклоалкил, а гетероциклоалкил включает один гетероатом, выбранный из азота и кислорода. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой гетероциклоалкил, а гетероциклоалкил включает один атом азота. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой гетероциклоалкил, а гетероциклоалкил включает один атом кислорода. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой гетероциклоалкил, а гетероциклоалкил включает два гетероатома, выбранных из азота и кислорода. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой гетероциклоалкил, а гетероциклоалкил включает два атома азота. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой гетероциклоалкил, а гетероциклоалкил включает два атома кислорода. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой гетероциклоалкил, а гетероциклоалкил включает один атом азота и один атом кислорода. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой гетероциклоалкил, а

гетероциклоалкил включает три гетероатома, выбранных из азота и кислорода. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой гетероциклоалкил, а гетероциклоалкил включает три атома азота. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой гетероциклоалкил, а гетероциклоалкил включает два атома азота и один атом кислорода. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает один гетероатом, выбранный из азота и кислорода. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает один атом азота. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает один атом кислорода. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает два гетероатома, выбранных из азота и кислорода. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает два атома азота. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает два атома кислорода. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает один атом азота и один атом кислорода. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает три гетероатома, выбранных из азота и кислорода. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает три атома азота. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает два атома азота и один атом кислорода. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает один гетероатом, выбранный из азота и кислорода, как указано выше, и включает по меньшей мере один –OH и $–CH_2OH$. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает два гетероатома, выбранных из азота и кислорода, как указано выше, и включает по меньшей мере один –OH и $–CH_2OH$. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает три гетероатома, выбранных из азота и кислорода, как указано выше, и включает по меньшей мере один –OH и $–CH_2OH$. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает один гетероатом, выбранный из азота и кислорода, как указано выше, и включает по меньшей мере один первичный азот. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает два гетероатома, выбранных из азота и кислорода, как

указано выше, и включает по меньшей мере один первичный азот. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает три гетероатома, выбранных из азота и кислорода, как указано выше, и включает по меньшей мере один первичный азот. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает один гетероатом, выбранный из азота и кислорода, как указано выше, и включает по меньшей мере один вторичный азот. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает два гетероатома, выбранных из азота и кислорода, как указано выше, и включает по меньшей мере один вторичный азот. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^5 представляет собой замещенный гетероциклоалкил и включает три гетероатома, выбранных из азота и кислорода, как указано выше, и включает по меньшей мере один вторичный азот. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой галоген, $C_{1\text{-}6}$ алкил, $C_{1\text{-}6}$ алкокси, –CN, O-глюкозу, O-аминокислотный остаток или O-PEG_{n1}, где каждый **n** представляет собой целое число от 0 до 14, и каждый **n1** представляет собой целое число от 1 до 12. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой галоген. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой $C_{1\text{-}6}$ алкил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой $C_{1\text{-}6}$ алкокси. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 представляет собой –CN. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой O-глюкозу. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой O-аминокислотный остаток. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой O-PEG_{n1}, где каждый **n1** представляет собой целое число от 1 до 12. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой O-PEG_{n1}, где каждый **n1** равен 1. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой O-PEG_{n1}, где каждый **n1** равен 2. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой O-PEG_{n1}, где каждый **n1** равен 3. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой O-PEG_{n1}, где каждый **n1** равен 4. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой O-PEG_{n1}, где каждый **n1** равен 5. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой O-PEG_{n1}, где каждый **n1** равен 6. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой O-PEG_{n1}, где

каждый **n1** равен 7. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой O-PEG_{n1}, где каждый **n1** равен 8. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой O-PEG_{n1}, где каждый **n1** равен 9. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой O-PEG_{n1}, где каждый **n1** равен 10. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой O-PEG_{n1}, где каждый **n1** равен 11. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой O-PEG_{n1}, где каждый **n1** равен 12. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^6 независимо представляет собой галоген, C_{1-6} алкил, C_{1-6} алкокси, –CN, O-глюкозу, O-аминокислотный остаток или O-PEG_{n1}, где каждый **n** представляет собой целое число от 0 до 14, и каждый **n1** представляет собой целое число от 1 до 12 и любую их комбинацию. Например, в одном варианте осуществления один R^6 представляет собой галоген, а другой R^6 представляет собой C_{1-6} алкил. Предусмотрены другие примерные варианты осуществления комбинации R^6, что будет понятно специалисту в данной области техники. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце подходящие аминокислоты в качестве аминокислотных остатков или для объединения в качестве пептидных остатков включают аланин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, триптофан, тирозин, валин, серин, треонин, аспарагин, глутамин, цистеин, селеноцистеин, глицин, пролин, аргинин, гистидин, лизин, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота и любая их комбинация в виде пептидных остатков, что будет понятно специалисту в данной области. Специалистам в данной области будет понятно, что аминокислотный остаток может быть ахиральным или хиральным, например, L-аминокислотные остатки или D-аминокислотные остатки. Специалистам в данной области будет понятно, что пептидные остатки могут быть ахиральными или хиральными, например, включая рацемические DL-аминокислоты или нерацемические D- или L-аминокислоты и их диастереомерные смеси. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце подходящие арилалкильные фрагменты включают бензил, фенэтил, фенилпропил, α-метилбензил и каждый его стереоизомер, а также 2-фенилпропил и каждый его стереоизомер. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце арилалкил представляет собой бензил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце арилалкил представляет собой фенэтил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце арилалкил представляет собой фенилпропил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце арилалкил представляет собой α-метилбензил и каждый его стереоизомер. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце арилалкил представляет собой (*R*)α-метилбензил. В любом из вариантов осуществления в этом

абзаце арилалкил представляет собой (*S*)α-метилбензил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце арилалкил представляет собой 2-фенилпропил (т.е. $CH_3CH(Ph)CH_2$–) и каждый его стереоизомер. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце арилалкил представляет собой (*R*)-2-фенилпропил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце арилалкил представляет собой (*S*)-2-фенилпропил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце галоген выбран из группы, состоящей из фтора, хлора, брома и йода. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце галоген представляет собой фтор. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце галоген представляет собой хлор. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце галоген представляет собой бром. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце галоген представляет собой йод. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $C_{1\text{-}6}$ алкил выбран из группы, состоящей из метила, этила, пропила, бутила, пентила и гексила, а также их структурных изомеров. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $C_{1\text{-}6}$ алкил представляет собой метил или $–CH_3$. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $C_{1\text{-}6}$ алкил представляет собой этил или $–CH_2CH_3$. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $C_{1\text{-}6}$ алкил представляет собой пропил или его структурные изомеры. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $C_{1\text{-}6}$ алкил представляет собой бутил или его структурные изомеры. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $C_{1\text{-}6}$ алкил представляет собой пентил или его структурные изомеры. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $C_{1\text{-}6}$ алкил представляет собой гексил или его структурные изомеры. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $C_{1\text{-}6}$ алкокси выбран из группы, состоящей из метокси, этокси, пропилокси, бутилокси, пентилокси и гексилокси и их структурных изомеров. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $C_{1\text{-}6}$ алкил представляет собой метокси или $–OCH_3$. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $C_{1\text{-}6}$ алкил представляет собой этокси или $–OCH_2CH_3$. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $C_{1\text{-}6}$ алкил представляет собой пропилокси или его структурные изомеры. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $C_{1\text{-}6}$ алкил представляет собой бутилокси или его структурные изомеры. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $C_{1\text{-}6}$ алкил представляет собой пентилокси или его структурные изомеры. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце $C_{1\text{-}6}$ алкил представляет собой гексилокси или его структурные изомеры.

[0064] В одном из вариантов осуществления Формулы I $\mathbf{Q^1}$ представляет собой –C(H)(OH)–, $\mathbf{Q^2}$ представляет собой –C(O)– и **W** представляет собой $–CH_2–$. В одном из вариантов осуществления Формулы I $\mathbf{Q^1}$ представляет собой –C(H)(OH)–, $\mathbf{Q^2}$ представляет собой –C(O)– и **W** представляет собой –O–. В одном из вариантов осуществления

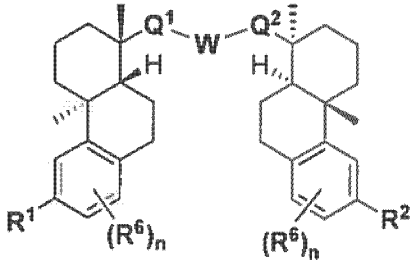
Формулы I Q^1 представляет собой –C(H)(OH)–, Q^2 представляет собой –C(O)– и W представляет собой –NH–. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные выше в контексте формулы I.

[0065] В одном из вариантов осуществления Формулы I Q^1 представляет собой –C(O)–, Q^2 представляет собой –C(O)– и W представляет собой $–CH_2–$. В одном из вариантов осуществления Формулы I Q^1 представляет собой –C(O)–, Q^2 представляет собой –C(O)– и W представляет собой –O–. В одном из вариантов осуществления Формулы I Q^1 представляет собой –C(O)–, Q^2 представляет собой –C(O)– и W представляет собой –NH–. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные выше в контексте формулы I.

[0066] В одном из вариантов осуществления Формулы I Q^1 представляет собой –C(O)–, Q^2 представляет собой $–CH_2–$ и W представляет собой $–CH_2–$. В одном из вариантов осуществления Формулы I Q^1 представляет собой –C(O)–, Q^2 представляет собой $–CH_2–$ и W представляет собой –O–. В одном варианте осуществления Формулы I Q^1 представляет собой –C(O)–, Q^2 представляет собой $–CH_2–$ и W представляет собой –NH–. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные выше в контексте формулы I.

[0067] В одном из вариантов осуществления Формулы I Q^1 представляет собой –C(O)–, Q^2 представляет собой –C(H)(OH)– и W представляет собой $–CH_2–$. В одном из вариантов осуществления Формулы I Q^1 представляет собой –C(O)–, Q^2 представляет собой –C(H)(OH)– и W представляет собой –O–. В одном из вариантов осуществления Формулы I Q^1 представляет собой –C(O)–, Q^2 представляет собой –C(H)(OH)– и W представляет собой –NH–. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные выше в контексте формулы I.

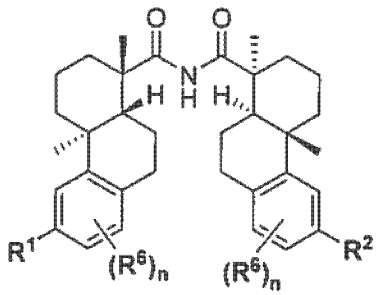
[0068] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлено соединение или полезная нагрузка, имеющее структуру Формулы (II):



(II)

или ее фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные выше в контексте формулы I.

[0069] В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлено соединение или полезная нагрузка, имеющее структуру Формулы (III):



(III)

или ее фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные выше в контексте формулы I.

[0070] В некоторых вариантах осуществления, изложенных в настоящем документе, представлено соединение или полезная нагрузка по формуле I, II или III, где R^1 представляет собой $-N(H)R^4$. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлено соединение или полезная нагрузка по формуле I, II или III, где R^1 представляет собой $-N(R^5)_2$. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные выше в контексте формулы I.

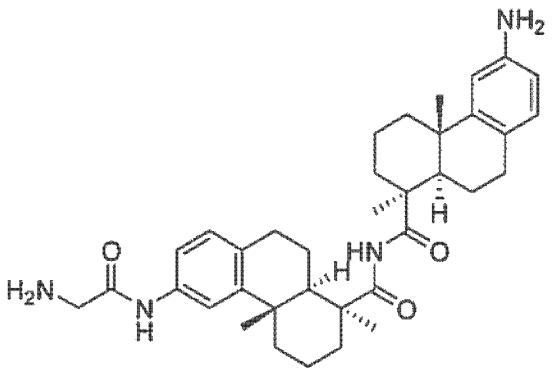
[0071] В некоторых вариантах осуществления, изложенных в настоящем документе, представлено соединение или полезная нагрузка Формулы I, II или III, где R^1 представляет собой $-NH_2$; и R^4 представляет собой аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент, алкил, замещенный алкил, ацил или замещенный ацил. В одном варианте осуществления, изложенном в настоящем документе, представлено соединение или полезная нагрузка по формуле I, II или III, где R^1 представляет собой $-NH_2$; и R^4 представляет собой аминокислотный остаток. В одном варианте осуществления, изложенном в настоящем документе, представлено соединение или полезная нагрузка по формуле I, II или III, где R^1 представляет собой $-NH_2$; и R^4 представляет собой *N*-алкильный аминокислотный остаток. В одном варианте осуществления, изложенном в настоящем документе, представлено соединение или полезная нагрузка по формуле I, II или III, где R^1 представляет собой $-NH_2$; и R^4 представляет собой пептидный остаток. В одном варианте

осуществления, изложенном в настоящем документе, представлено соединение или полезная нагрузка по формуле I, II или III, где $\mathbf{R^1}$ представляет собой $-NH_2$; и $\mathbf{R^4}$ представляет собой биоразлагаемый фрагмент. В одном варианте осуществления, изложенном в настоящем документе, представлено соединение или полезная нагрузка по формуле I, II или III, где $\mathbf{R^1}$ представляет собой $-NH_2$; и $\mathbf{R^4}$ представляет собой алкил. В одном варианте осуществления, изложенном в настоящем документе, представлено соединение или полезная нагрузка по формуле I, II или III, где $\mathbf{R^1}$ представляет собой $-NH_2$; и $\mathbf{R^4}$ представляет собой замещенный алкил. В одном варианте осуществления, изложенном в настоящем документе, представлено соединение или полезная нагрузка по формуле I, II или III, где $\mathbf{R^1}$ представляет собой $-NH_2$; и $\mathbf{R^4}$ представляет собой ацил. В одном варианте осуществления, изложенном в настоящем документе, представлено соединение или полезная нагрузка по формуле I, II или III, где $\mathbf{R^1}$ представляет собой $-NH_2$; и $\mathbf{R^4}$ представляет собой замещенный ацил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце подходящие аминокислотные остатки являются такими, как описано выше в контексте формулы I. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце подходящие пептидные остатки имеют значения, описанные выше в контексте Формулы I. В одном варианте осуществления, изложенном в настоящем документе, представлено соединение или полезная нагрузка, где $\mathbf{R^1}$ представляет собой $-NH_2$; и $\mathbf{R^4}$ представляет собой остаток аминокислоты, причем остаток аминокислоты выбран из группы, состоящей из аланина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, тирозина, валина, серина, треонина, аспарагина, глутамина, цистеина, селеноцистеина, глицина, пролина, аргинина, гистидина, лизина, аспаргиновой кислоты и глутаминовой кислоты. В одном варианте осуществления, изложенном в настоящем документе, представлено соединение или полезная нагрузка, где $\mathbf{R^1}$ представляет собой $-NH_2$; и $\mathbf{R^4}$ представляет собой пептидный остаток, где пептидный остаток включает аминокислотные остатки, выбранные из группы, состоящей из аланина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, тирозина, валина, серина, треонина, аспарагина, глутамина, цистеина, селеноцистеина, глицина, пролина, аргинина, гистидина, лизина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце, $\mathbf{R^6}$ имеют значения, описанные выше в контексте формулы I.

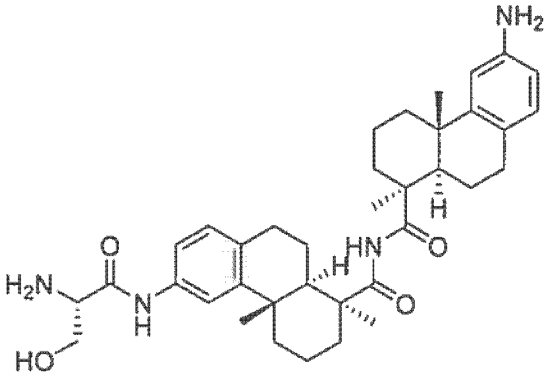
[0072] В некоторых вариантах реализации, изложенных в настоящем документе, представлено соединение или полезная нагрузка, в которых $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ представляют собой $-N(H)R^4$. В одном варианте воплощения в настоящем документе представлено соединение или полезная нагрузка, где $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ представляют собой $-N(H)R^4$, и $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой аминокислотный остаток; и аминокислотный остаток

выбран из группы, состоящей из аланина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, тирозина, валина, серина, треонина, аспарагина, глутамина, цистеина, селеноцистеина, глицина, пролина, аргинина, гистидина, лизина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты.

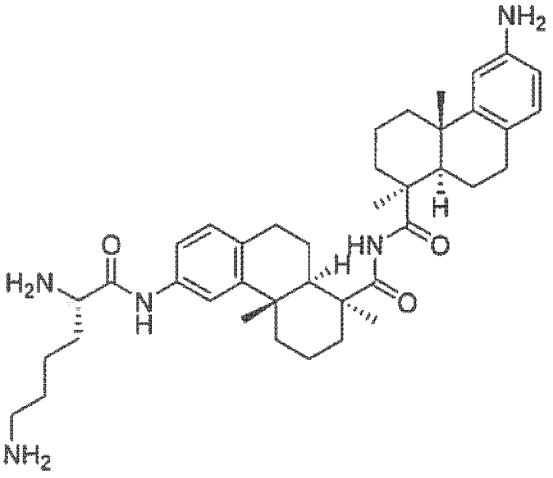
[0073] В определенных вариантах осуществления в настоящем документе представлены соединения или полезные нагрузки, выбранные из группы, состоящей из:



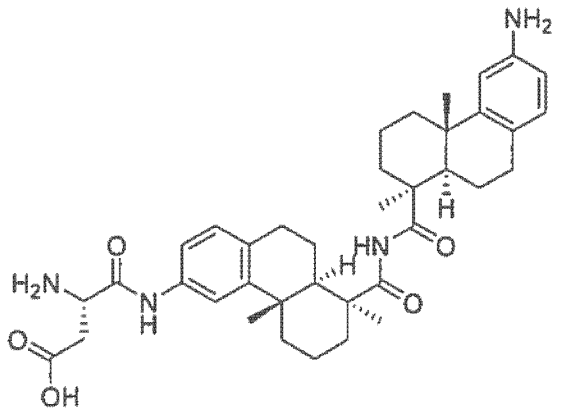
P4;



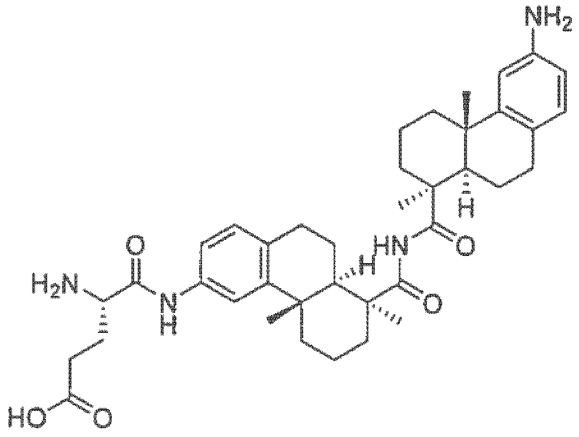
P5;



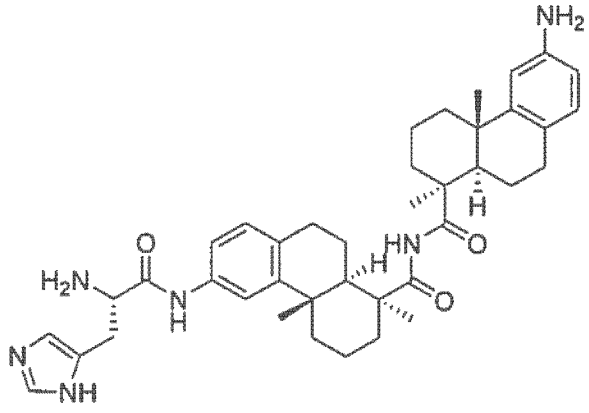
P6;



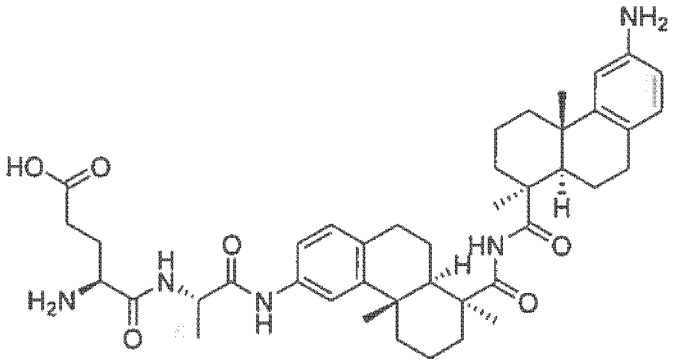
P7;



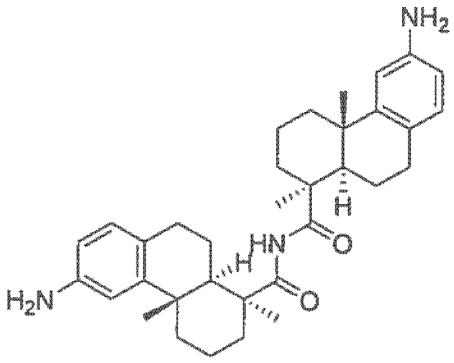
P8;



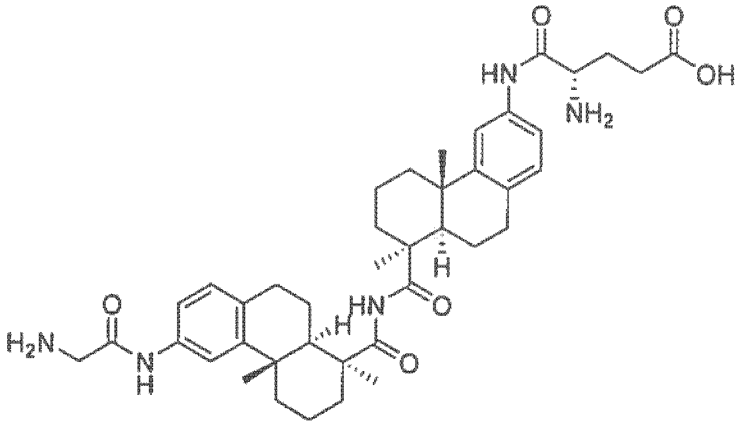
P9;



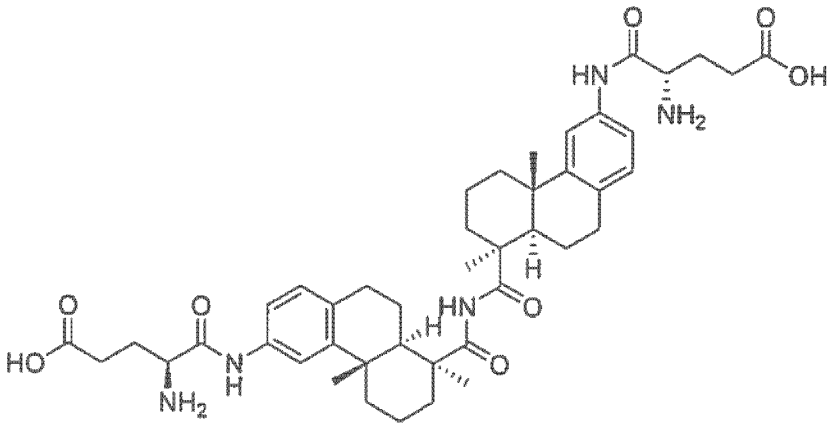
P12;



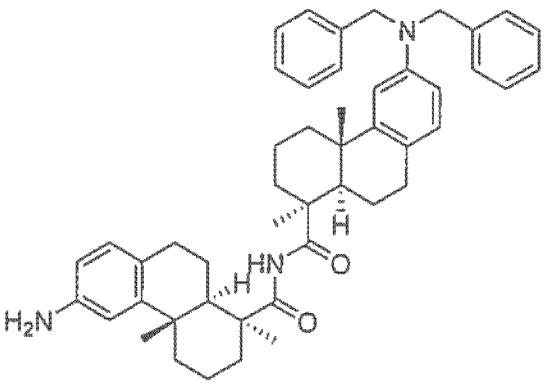
P2;



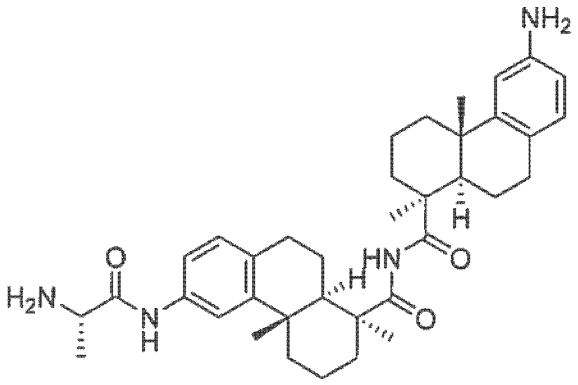
P10;



P11; и



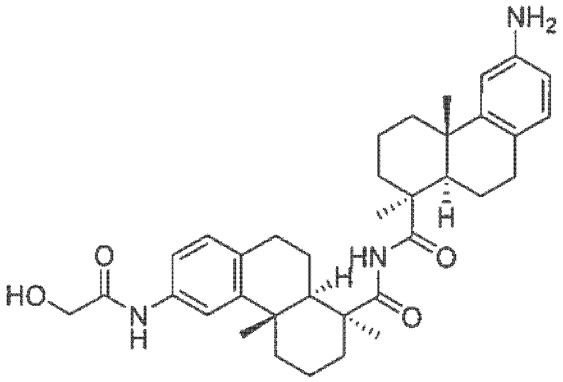
P3;



P13; или

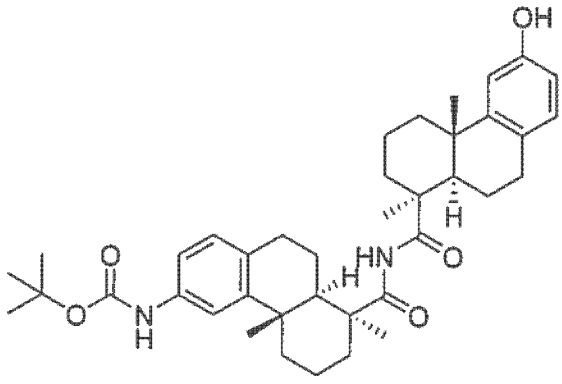
его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

[0074] В одном варианте осуществления в настоящем документе предусмотрено соединение, имеющее следующую структуру,

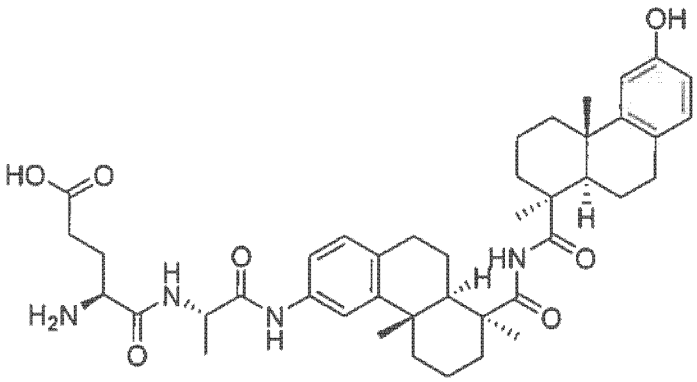


P14; или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

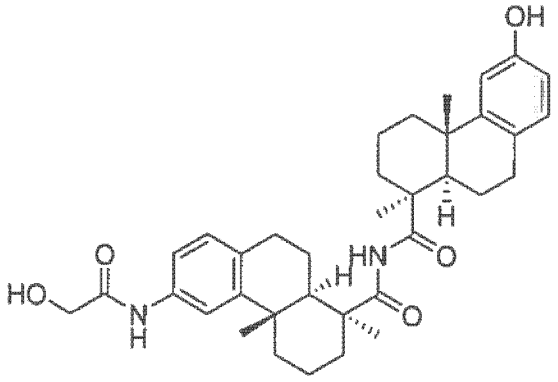
[0075] Кроме того, в настоящем документе представлены соединения или полезные нагрузки, выбранные из группы, состоящей из:



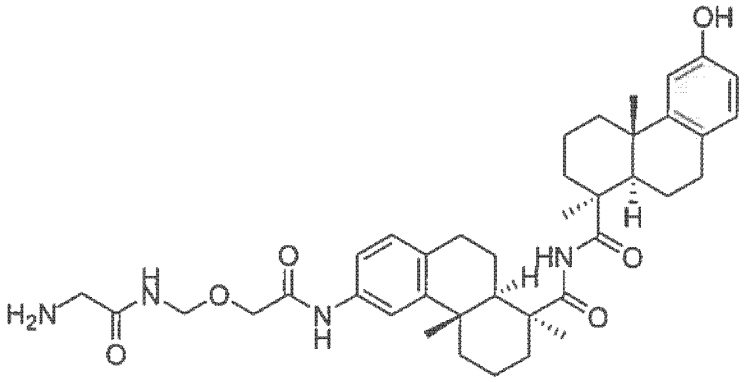
P15;



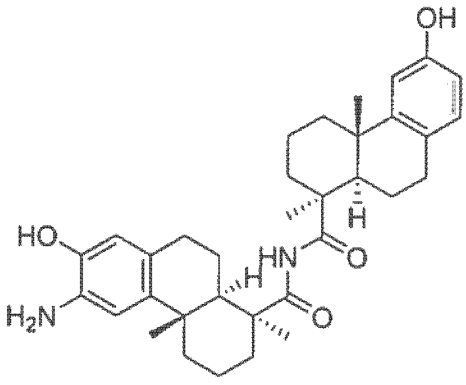
P16;



P17;



P18; и



P19.

Связывающие агенты

[0076] Подходящие связывающие вещества для любого из конъюгатов, представленных в мгновенном раскрытии, включают, но не ограничиваются антителами, лимфокинами, гормонами, факторами роста, вирусными рецепторами, интерлейкинами или любыми другими связывающими клетки или пептидными связывающими молекулами или

веществами.

[0077] В некоторых вариантах реализации связывающий агент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитело может быть в любой форме, известной специалистам в данной области. Используемый здесь термин «антитело» относится к любой антигенсвязывающей молекуле или молекулярному комплексу, содержащему по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается с конкретным антигеном или взаимодействует с ним. Термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (*например*, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (в настоящем описании используется сокращение HCVR или V_H) и константную области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три константных домена, C_H1, C_H2 и C_H3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (в настоящем описании используется сокращение LCVR и V_L) и константную области легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_L1). Указанные области V_H и V_L можно дополнительно разделить на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), разделенные более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждый V_H и V_L содержит три CDR и четыре FR, расположенные от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В различных вариантах осуществления настоящего раскрытия FR антител (или их антигенсвязывающей части), подходящие для соединений или полезных нагрузок, описанных здесь, могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR. Используемый здесь термин «антитело» также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и тому подобное, используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, ферментативно полученный, синтетический или генно-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген для образования комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, *например*, из полных молекул антитела, используя любые подходящие стандартные методы, такие как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной генной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК,

кодирующей вариабельные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, *например*, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, *например*, библиотеки фаг-антитело) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и манипулировать химически или с помощью методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или нескольких вариабельных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F (ab') 2 фрагмента; (iii) Fd-фрагменты; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (*например*, CDR, такую как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как доменно-специфические антитела, однодоменные антитела, доменно-делеционные антитела, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (*например* , моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т. д.), малые модульные иммунофармацевтические препараты (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акул также включены в выражение «антигенсвязывающий фрагмент», как используется в данном документе. Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом или в рамке с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H, связанный с доменом V_L, домены V_H и V_L могут быть размещены относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный с, по меньшей мере, одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; и (xiv) V_L-C_L. В любой

конфигурации вариабельного и константного доменов, включая любую из примерных конфигураций, перечисленных выше, вариабельный и константный домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (*например*, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними вариабельными и/или константными доменами в одном полипептиде молекулы. Как и в случае полных молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (*например*, биспецифичными). Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере два разных вариабельных домена, где каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифических антител, включая примеры форматов биспецифических антител, раскрытых в данном документе, может быть адаптирован для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием рутинных методик, доступных в данной области. В определенных вариантах осуществления, описанных в данном документе, описанные здесь антитела являются человеческими антителами. Предполагается, что термин «человеческое антитело» в контексте настоящего описания включает антитела, имеющие вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человеческого иммуноглобулина зародышевой линии (*например*, мутациями, введенными случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако, указанный термин «человеческое антитело», как используется в данном документе, не подразумевает включения антител, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, присоединены к каркасной человеческой последовательности зародышевого типа. Термин «человеческое антитело» не включает встречающиеся в природе молекулы, которые обычно существуют без модификации или вмешательства/манипуляции человека во встречающемся в природе немодифицированном живом организме. Антитела этого изобретения могут, в некоторых вариантах реализации, быть рекомбинантными человеческими антителами. Термин «рекомбинантное человеческое антитело», как используется в данном документе, предназначен для включения всех человеческих антител, которые получают, экспрессируют, создают или

выделяют рекомбинантными способами, такими как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описано ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител (описано далее ниже), антитела, выделенные от животного (*например*, мыши), которое трансгенно для генов человеческого иммуноглобулина (см., *например*, Taylor *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, когда используется трансгенное для человеческих Ig-последовательностей животное, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, следовательно, аминокислотным последовательностям областей V_H и V_L рекомбинантного антитела представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и связаны с ними, в естественных условиях не могут существовать в репертуаре зародышевой линии человеческого антитела *in vivo*. Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе дисульфидной связью тяжелой цепи между цепями. Во второй форме димеры не связаны через межцепные дисульфидные связи, и образуется молекула около 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепи (полуантитела). Эти формы чрезвычайно трудно разделить, даже после аффинной очистки. Частота появления второй формы в различных интактных изотипах IgG обусловлена, но не ограничивается структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирной области шарнира IgG4 человека может значительно уменьшить появление второй формы (Angal *et al.* (1993) Molecular Immunology 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых с использованием шарнира человеческого IgG1. Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие одну или несколько мутаций в области петли, области C_H2 или C_H3, которые могут быть желательны, например, при производстве, для улучшения выхода желаемой формы антитела. Описанные здесь антитела могут быть изолированными антителами. «Выделенное антитело», как используется в настоящем документе, означает

антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено, по меньшей мере, из одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое было отделено или удалено, по меньшей мере, из одного компонента организма или из ткани или клетки, в которой антитело существует в природе или продуцируется естественным путем, является «выделенным антителом» для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело может быть по существу не содержащим другого клеточного материала и/или химических веществ. Антитела, используемые в данном документе, могут включать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации можно легко установить путем сравнения раскрытых здесь аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или несколько аминокислот в одной или нескольких каркасных и/или CDR-областях мутированы в соответствующий остаток (-ки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или к соответствующему остатку (ам) другой последовательности зародышевой линии человека, или к консервативной аминокислотной замене соответствующего остатка (ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности упоминаются в настоящем документе совместно как «мутации зародышевой линии»). Специалист в данной области, начиная с описанных здесь последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, может продуцировать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все остатки каркаса и/или CDR в доменах V_H и/или V_L мутируют обратно в остатки, обнаруженные в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки мутируют обратно в исходную последовательность зародышевой линии, *например*, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки,

обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или несколько остатков каркаса и/или CDR мутируют в соответствующий остаток(-и) другой последовательности зародышевой линии (*то есть* последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально было получено антитело). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркаса и/или областей CDR, *например*, в которых определенные отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или мутируют до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно проверить на одно или несколько желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или улучшенные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств быть), снижена иммуногенность и др. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом, включены в настоящее изобретение. Антитела, применимые для соединений или полезных нагрузок по настоящему изобретению, также включают антитела, содержащие варианты любой из раскрытых здесь аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющих одну или несколько консервативных замен. Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с различными участками антигена и могут иметь разные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно сопоставленными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных вариантах осуществления эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

[0078] В определенных вариантах осуществления антитело содержит легкую цепь. В определенных вариантах осуществления легкая цепь представляет собой легкую каппа-цепь. В определенных вариантах осуществления легкая цепь представляет собой легкую

лямбда-цепь. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь представляет собой IgA. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь представляет собой IgD. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь представляет собой IgE. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь представляет собой IgG. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь представляет собой IgM. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь представляет собой IgG1. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь представляет собой IgG2. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь представляет собой IgG3. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь представляет собой IgG4. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь представляет собой IgA1. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь представляет собой IgA2.

[0079] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fv. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой Fab-фрагмент. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой Fab'-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент scFv (sFv). В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент scFv-Fc.

[0080] В некоторых вариантах осуществления антитело является моноклональным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является поликлональным антителом.

[0081] В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является гуманизированным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является антителом человека.

[0082] Антитело может обладать специфичностью связывания для любого антигена, который считается подходящим для специалистов в данной области. В определенных вариантах осуществления антиген представляет собой трансмембранную молекулу (*например*, рецептор) или фактор роста. Примеры антигенов включают, но не ограничиваются ими, такие молекулы, как рецепторы скавенджера класса A, включая рецептор скавенджера A (SR-A или MSR1), рецептор макрофага с коллагеновой структурой (MARCO), рецептор скавенджера с лектином C-типа (SRCL), и рецептор скавенджера A-5 (SCARA5), COLEC12, рецепторы скавенджера макрофагов класса B,

включая CD36, LIMPII, SRBI, SRBII, рецептор скавенджера класса D CD68 и гликопротеин лизосомальной мембраны (LAMP), рецептор скавенджера класса E, включая лектин-подобный окисленный низкий рецептор липопротеина 1 плотности LOX-1 и Dectin-1, рецепторы скавенджера класса F, включая рецептор скавенджера, экспрессируемый эндотелиальными клетками-I (SREC-I) и SREC-II, а также множественные эпидермальные факторы роста (EGF)-подобные домены (MEGF)10, рецептор скавенджера класса G CXC, хемокиновый лиганд 16 (CXCL16), рецепторы скавенджера класса H, включая фасциклин, EGF-подобный, ламинный тип EGF-подобный и содержащий связывающий домен рецептор-скавенджер-1 (FEEL-1) и -2 (FEEL 2), рецептор скавенджера класса I CD163 и clas s рецептор скавенджера J для конечных продуктов гликирования (RAGE), другие члены суперсемейства лектинов C-типа, включая DEC205, CD206, Dectin-2, Mincle, DC-SIGN и DNGR-1, а также другие мембранные белки, такие как семейство B7- родственный член, включая V-набор и содержащий домен Ig 4 (VSIG4), рецептор колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R), рецептор асиалогликопротеина (ASGPR) и белок, подобный предшественнику бета-амилоида 2 (APLP-2). В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой PRLR или HER2. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело против PRLR или против HER2. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело против MSR1. Примеры антител против MSR1 описаны здесь.

[0083] Линкеры связывающего агента могут быть связаны со связывающим агентом, *например*, антителом или антигенсвязывающей молекулой, посредством присоединения к определенной аминокислоте внутри антитела или антигенсвязывающей молекулы. Типичные аминокислотные присоединения, которые можно использовать в контексте этого аспекта раскрытия, включают, *например*, лизин (*см.*, например, US5,208,020; US 2010/0129314; Hollander *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19: 358- 361; WO 2005/089808; US 5714586; US 2013/0101546 и US 2012/0585592), цистеин (*см.*, *например,* US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546 и US 7 750 116), селеноцистеин (*см.*, *например*, WO 2008/122039; и Hofer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2008, 105*: 12451-12456), формилглицин (*см.*, *например*, Carrico *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321-322; Agarwal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., США, 2013, 110*:46-51, и Rabuka *et al.*, *Nat. Protocols*, 2012, *10*: 1052-1067), неприродные аминокислоты (*см.*, *например*, WO 2013/068874 и WO 2012/166559) и кислые аминокислоты (*см.*, *например*, WO 2012/05982). Линкеры также могут быть конъюгированы с антигенсвязывающим белком посредством присоединения к углеводам

(*см.*, *например*, US 2008/0305497, WO 2014/065661 и Ryan *et al.*, *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, *13*:127-130).

[0084] В некоторых примерах связывающий агент представляет собой антитело или антигенсвязывающую молекулу, и антитело связано с линкером через остаток лизина. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающая молекула связаны с линкером через остаток цистеина.

[0085] Линкеры также могут быть конъюгированы с одним или несколькими глутаминовыми остатками посредством химио-ферментативного конъюгирования на основе трансглютаминазы (*см.*, *например*, *Dennler et al.*, *Bioconjugate Chem.* 2014, 25, 569-578 и WO 2017/147542). Например, в присутствии трансглютаминазы один или несколько остатков глутамина антитела могут быть связаны с соединением первичного амина. Вкратце, в некоторых вариантах осуществления антитело, имеющее остаток глутамина (*например*, остаток Gln295), обрабатывают соединением первичного амина, более подробно описанным ниже, в присутствии фермента трансглютаминазы. Первичные аминные соединения включают, *например*, полезные нагрузки или линкер-полезные нагрузки, которые непосредственно обеспечивают конъюгаты антител с лекарственными средствами посредством опосредованного трансглютаминазой связывания. Соединения первичного амина также включают линкеры и спейсеры, которые функционализированы реакционноспособными группами, которые впоследствии можно обрабатывать другими соединениями в направлении синтеза конъюгатов лекарственное средство-антитело. Антитела, содержащие остатки глутамина, могут быть выделены из природных источников или сконструированы так, чтобы содержать один или несколько остатков глутамина. Методики встраивания остатков глутамина в полипептидную цепь антитела (антитела, модифицированные глутаминилом или антигенсвязывающие молекулы) известны специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления антитело является агликозилированным.

[0086] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит остаток глутамина в одном или нескольких положениях тяжелой цепи, пронумерованных 295 в системе нумерации ЕС. В настоящем раскрытии эта позиция упоминается как глутамин 295, или как Gln295, или как Q295. Специалистам в данной области понятно, что это консервативный глутаминовый остаток в последовательности многих антител дикого типа. В других полезных вариантах осуществления антитело может быть сконструировано так, чтобы оно содержало остаток глутамина. Способы модификации последовательности

антитела для включения остатка глютамина известны специалистам в данной области (см., например, Ausubel *et al. Current Protoc. Mol. Biol.*).

[0087] В определенных вариантах осуществления антитело или глутаминил-модифицированное антитело или антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере один остаток глутамина по меньшей мере в одной последовательности полипептидной цепи. В определенных вариантах осуществления антитело или глутаминил-модифицированное антитело или антигенсвязывающая молекула содержит два полипептида тяжелой цепи, каждый с одним остатком Gln295. В других вариантах осуществления антитело или глутаминил-модифицированное антитело или антигенсвязывающая молекула содержит один или несколько остатков глутамина в сайте, отличном от тяжелой цепи 295. Сюда включены антитела этого раздела, несущие описанные здесь мутации Asn297Gln (N297Q). Сюда включены антитела этого раздела, содержащие остатки Gln55 (Q55). Как описано в данном документе, нумерация остатков соответствует системе нумерации EC.

Первичные аминные соединения

[0088] В некоторых вариантах осуществления соединения первичного амина, полезные для опосредованного трансглютаминазой связывания антитела (или антигенсвязывающего соединения), содержащего глутамин, могут быть любым соединением первичного амина, которое может быть признано практикующим специалистом в данной области техники обычным. Обычно соединение первичного амина имеет формулу H_2N-R, где R может быть любой группой, совместимой с антителом и условиями реакции. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой алкил, замещенный алкил, гетероалкил или замещенный гетероалкил.

[0089] В некоторых вариантах осуществления первичное аминное соединение содержит реакционноспособную группу или защищенную реакционноспособную группу. Полезные реакционноспособные группы включают азиды, алкины, циклоалкины, тиолы, спирты, кетоны, альдегиды, кислоты, сложные эфиры, гидразиды, анилины и амины. В определенных вариантах осуществления реакционноспособная группа выбрана из группы, состоящей из азида, алкина, сульфгидрила, циклоалкина, альдегида и карбоксила.

[0090] В некоторых вариантах осуществления соединение первичного амина соответствует формуле H_2N-**LL**-**X**, где **LL** представляет собой двухвалентный спейсер, а **X** представляет собой реакционноспособную группу или защищенную реакционноспособную группу. В конкретных вариантах осуществления **LL** представляет собой двухвалентную группу полиэтиленгликоля (PEG). В некоторых вариантах

осуществления **X** выбран из группы, состоящей из -SH, $-N_3$, алкина, альдегида и тетразола. В конкретных вариантах осуществления **X** представляет собой $-N_3$.

[0091] В некоторых вариантах реализации соединение первичного амина имеет одну из следующих формул:

$H_2N-(CH_2)_n-\mathbf{X}$;

$H_2N-(CH_2CH_2O)_n-(CH_2)_p-\mathbf{X}$;

$H_2N-(CH_2)_n-N(H)C(O)-(CH_2)_m-\mathbf{X}$;

$H_2N-(CH_2CH_2O)_n-N(H)C(O)-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-\mathbf{X}$;

$H_2N-(CH_2)_n-C(O)N(H)-(CH_2)_m-\mathbf{X}$;

$H_2N-(CH_2CH_2O)_n-C(O)N(H)-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-\mathbf{X}$;

$H_2N-(CH_2)_n-N(H)C(O)-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-\mathbf{X}$;

$H_2N-(CH_2CH_2O)_n-N(H)C(O)-(CH_2)_m-\mathbf{X}$;

$H_2N-(CH_2)_n-C(O)N(H)-(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-\mathbf{X}$; и

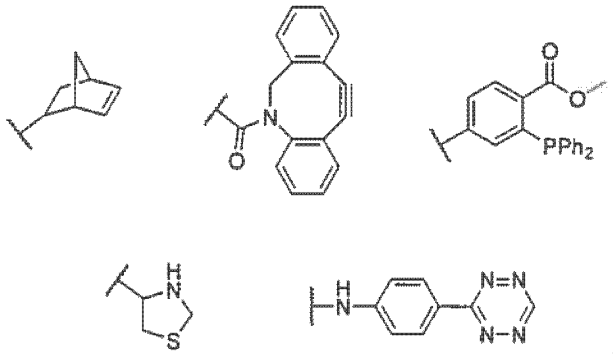
$H_2N-(CH_2CH_2O)_n-C(O)N(H)-(CH_2)_m-\mathbf{X}$;

где **n** представляет собой целое число от 1 до 12;

m представляет собой целое число от 0 до 12;

p представляет собой целое число от 0 до 2;

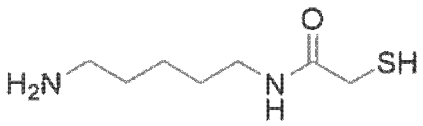
и **X** выбран из группы, состоящей из –SH, $-N_3$, –C≡CH, –C(O)H, тетразола и любого из

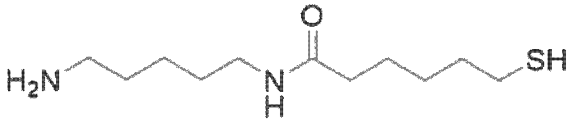


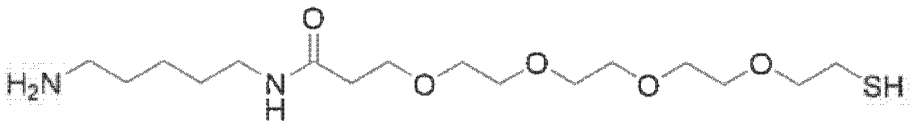
.

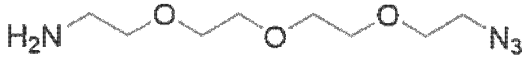
[0092] Как указано выше, любая из алкильных (т.е. $-CH_2-$) групп может быть необязательно замещена, например, C_{1-8} алкилом, метилформилом или $-SO_3H$. В определенных вариантах осуществления алкильные группы являются незамещенными.

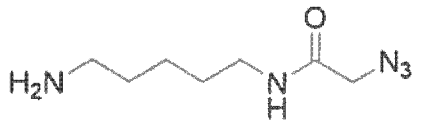
[0093] В определенных вариантах осуществления соединение первичного амина выбирают из группы, состоящей из:



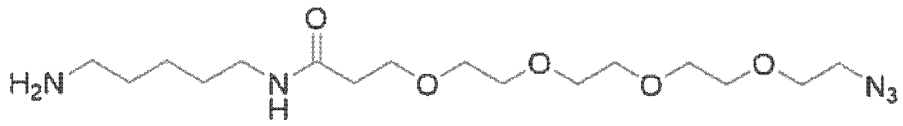








и



[0094] В конкретных вариантах осуществления первичное соединение амина представляет собой  .

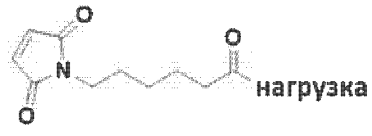
Примерные условия для вышеуказанных реакций представлены в Примерах ниже.

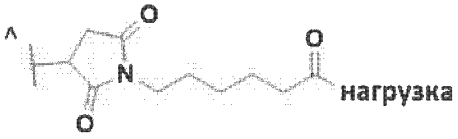
Линкеры

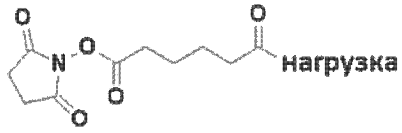
[0095] В некоторых вариантах осуществления линкерная часть L конъюгатов, описанных в настоящем документе, представляет собой группу, например двухвалентную группу, которая ковалентно связывает связывающий агент с соединением полезной нагрузки, описанным в данном документе. В других случаях линкер **L** представляет собой трехвалентный или многовалентный фрагмент, который ковалентно связывает связующий агент с соединением полезной нагрузки, описанным в настоящем документе. Подходящие линкеры можно найти, например, в *конъюгатах антитело-лекарственное средство и иммунотоксинах*; Phillips, G.L., Ed.; Springer Verlag: Нью-Йорк, 2013; *Конъюгаты антитело-лекарственное средство*; Ducry, L., Ed.; Humana Press, 2013; *Конъюгаты антитело-лекарственное средство*; Wang, J., Shen, W.-C., and Zaro, J.L., Eds.; Springer International Publishing, 2015, содержание каждого из которых полностью включено в

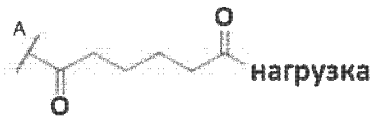
настоящий документ посредством ссылки. Соединения полезной нагрузки включают соединения формул I, II и III, указанных выше, и их остатки после связывания или включения с линкером **L**, где комбинация соединений или полезных нагрузок с линкером **L** представляет собой полезные нагрузки линкера (LP). Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что определенные функциональные группы соединения или фрагментов полезной нагрузки удобны для связывания с линкерами и/или связующими агентами. Эти группы включают амины, гидроксилы, фосфаты и сахара.

[0096] В определенных вариантах осуществления линкеры являются стабильными в физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления линкеры расщепляются, например, способны высвобождать, по меньшей мере, соединение или часть полезной нагрузки в присутствии фермента или при конкретном диапазоне или значении pH. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит расщепляемый ферментом фрагмент. Иллюстративные расщепляемые ферментами фрагменты включают, но не ограничиваются ими, пептидные связи, сложноэфирные связи, гидразоны и дисульфидные связи. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит расщепляемый катепсином линкер.

[0097] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит нерасщепляемый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер происходит от 

или его остатка. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемое соединение линкер-полезная нагрузка представляет собой 

или его региоизомер. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемый линкер происходит от 

или его остатка. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемое соединение линкер-полезная нагрузка представляет собой 

или его региоизомер. В одном варианте осуществления линкер представляет собой малеимид циклогексанкарбоксилат или 4-(*N*-малеимидометил) циклогексанкарбоновую кислоту

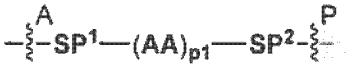
(MCC). В структурах  указывает на связь со связующим агентом. В структурах, в некоторых примерах,  указывает клик-химический остаток, который является результатом реакции, например, связующего агента и полезной нагрузки линкера.

[0098] В некоторых вариантах осуществления подходящие линкеры включают, но не ограничиваются ими, те, которые химически связаны с двумя остатками цистеина одного связывающего агента, *например*, антитела. Такие линкеры могут служить для имитации дисульфидных связей антитела, которые разрушаются в результате процесса конъюгации.

[0099] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит одну или несколько аминокислот. Подходящие аминокислоты включают природные, ненатуральные, стандартные, нестандартные, протеиногенные, небелиногенные и L- или D-α-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер включает аланин, валин, глицин, лейцин, изолейцин, метионин, триптофан, фенилаланин, пролин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, гистидин или цитруллин, его производное или их комбинация. В определенных вариантах осуществления одна или несколько боковых цепей аминокислот связаны с группой боковой цепи, описанной ниже. В некоторых вариантах осуществления линкер включает валин и цитруллин. В некоторых вариантах осуществления линкер включает лизин, валин и цитруллин. В некоторых вариантах осуществления линкер включает лизин, валин и аланин. В некоторых вариантах осуществления линкер включает валин и аланин.

[00100] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит саморасщепляющуюся группу. Саморасщепляющейся группой может быть любая такая группа, известная специалистам в данной области. В конкретных вариантах осуществления саморасщепляющаяся группа представляет собой *p*-аминобензил (PAB) или его производное. Полезные производные включают *p*-аминобензилоксикарбонил (PABC). Специалистам в данной области техники будет понятно, что саморасщепляющаяся группа способна проводить химическую реакцию, которая освобождает оставшиеся атомы линкера от полезной нагрузки.

[00101] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:



где:

SP^1 представляет собой спейсер;

SP^2 представляет собой спейсер;

 одна или несколько связей со связующим агентом;

 одна или несколько связей с полезной нагрузкой;

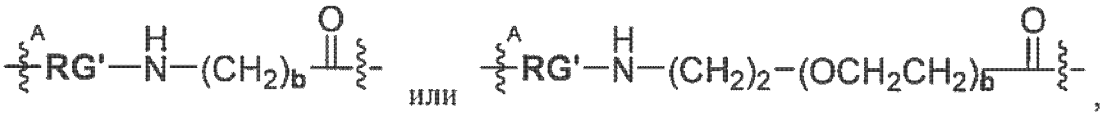
каждый **AA** представляет собой аминокислоту; а также

p1 представляет собой целое число от 0 до 10.

[00102] Спейсер **SP**^{1} представляет собой фрагмент, который связывает фрагмент $(\mathbf{AA})_{\mathbf{p1}}$ со связывающим агентом (**BA**) или с остатком реактивной группы, который связан с **BA**. Подходящие спейсеры **SP**^{1} включают, но не ограничиваются ими, те, которые содержат алкилен или простой полиэфир, или и то, и другое. Концы спейсеров, *например*, часть спейсера, связанная со связывающим агентом или **AA**, могут быть фрагментами, полученными из реакционноспособных фрагментов, которые используются для целей связывания антитела или **AA** со спейсером во время химического синтеза конъюгата. В некоторых вариантах осуществления **p1** равен 0, 1, 2, 3 или 4. В конкретных вариантах осуществления **p1** равен 0. В конкретных вариантах осуществления **p1** равен 2. В конкретных вариантах осуществления **p1** равен 3. В конкретных вариантах осуществления **p1** равен 4.

[00103] В некоторых вариантах осуществления спейсер **SP**^{1} содержит алкилен. В некоторых вариантах реализации спейсер **SP**^{1} содержит $C_{5\text{-}7}$алкилен. В некоторых вариантах реализации спейсер **SP**^{1} содержит простой полиэфир. В некоторых вариантах реализации спейсер **SP**^{1} содержит полимер этиленоксида, такой как полиэтиленгликоль.

[00104] В некоторых вариантах реализации спейсер **SP**^{1} представляет собой:



где:

RG' представляет собой остаток реакционноспособной группы после реакции реакционноспособной группы **RG** со связывающим агентом;

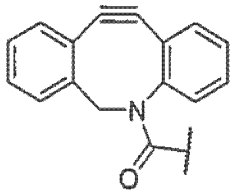
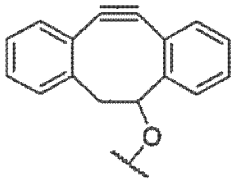
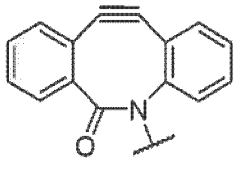
 представляет собой связь со связующим агентом;

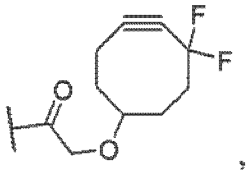
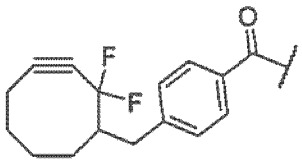
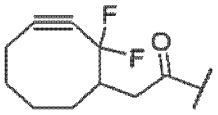
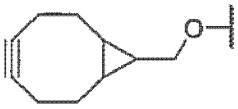
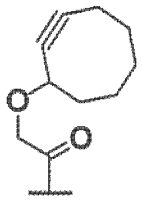
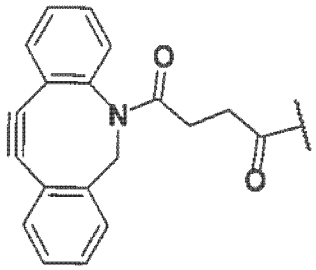
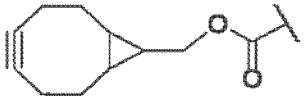
 представляет собой связь с $(AA)_{p1}$;

b представляет собой целое число от 2 до 8; а также

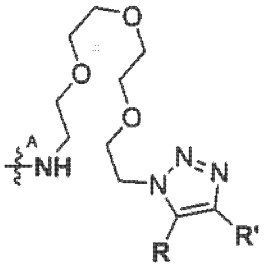
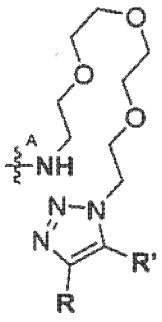
p1 представляет собой целое число от 0 до 4.

[00105] Реакционноспособная группа **RG** может быть любой реакционноспособной группой, известной специалистам в данной области техники, которая способна образовывать одну или несколько связей со связующим агентом. Реакционноспособная группа **RG** представляет собой фрагмент, содержащий в своей структуре часть, которая способна реагировать со связывающим агентом (*например*, реагировать с антителом по его остаткам цистеина или лизина или по азидному фрагменту, например, PEG-N_3 функционализированное антитело в одном или нескольких остатках глутамина) с образованием соединения формулы **A**, **B**, **C**, **D**, **A'**, **B'**, **C'**, **D'** или **A''**. После сопряжения со связующим агентом реакционноспособная группа становится реакционноспособной группой (**RG'**). Иллюстративные реакционноспособные группы включают, но не ограничиваются ими, группы, которые включают галоацетил, изотиоцианат, сукцинимид, N-гидроксисукцинимид или малеимид, участки, которые способны реагировать со связующим агентом.

[00106] В некоторых вариантах осуществления реакционноспособные группы включают, но не ограничиваются ими, алкины. В некоторых вариантах осуществления алкины представляют собой алкины, способные подвергаться реакциям 1,3-циклоприсоединения с азидами в отсутствие медных катализаторов, таких как напряженные алкины. Напряженные алкины пригодны для активируемых штаммами алкиназидных циклоприсоединений (SPAAC), циклоалкинов, *например*, циклооктинов, бензобензилированных алкинов. Подходящие алкины включают, но не ограничиваются ими, дибензоазациклооктин или  (DIBAC), дибензоциклооктин или  (DIBO), биарилазациклооктинон или  (BARAC),

дифторированный циклооктин или  , или  , или  (DIFO), замещенный, *например*, фторированные алкины, аза-циклоалкины, бицикло[6.1.0]нонин или  (BCN) и их производные. Особенно полезные алкины включают  ,  и  .

[00107] В определенных вариантах осуществления связующий агент связан непосредственно с **RG'**. В некоторых вариантах реализации связывающий агент связан с **RG'** через спейсер, например **SP**[4], как показано ниже. В конкретных вариантах осуществления связывающий агент связан с **RG'** через спейсер PEG. Как подробно обсуждается ниже, в определенных вариантах осуществления связующий агент получают функционализацией с одной или несколькими азидогруппами. Каждая азидогруппа способна реагировать с **RG** с образованием **RG'**. В конкретных вариантах осуществления связующий агент дериватизируется с помощью -PEG-N_3, связанного с остатком глутамина. Приведенные в качестве примера дериватизированные связующие агенты -N_3, способы их получения и способы их применения при взаимодействии с **RG** представлены здесь. В некоторых вариантах осуществления **RG** представляет собой алкин, подходящий для участия в 1,3-циклоприсоединении, и **RG'** представляет собой 1,2,3-триазолильную группу, образованную в результате реакции **RG** с азидо-функционализированным связывающим агентом. В качестве дополнительного примера, в некоторых вариантах

осуществления **RG'** связан со связующим агентом, как показано в  или  , или смесью каждого региоизомера. Каждый **R** и **R'** является таким, как описано в настоящем документе.

[00108] Спейсер SP^2 представляет собой фрагмент, который соединяет фрагмент $(AA)_{p1}$ с полезной нагрузкой. Подходящие спейсеры включают, помимо прочего, спейсеры, описанные выше как прокладки SP^1 . Другие подходящие спейсеры SP^2 включают, но не ограничиваются ими, те, которые содержат алкилен или простой полиэфир, или и то, и другое. Концы спейсеров SP^2, *например*, часть спейсера, непосредственно связанная с полезной нагрузкой или **AA**, могут быть фрагментами, полученными из реакционноспособных фрагментов, которые используются для целей связывания полезной нагрузки или **AA** со спейсером SP^2 во время химического синтеза конъюгата. В некоторых примерах концы спейсеров SP^2, *например*, часть спейсера SP^2, непосредственно связанная с полезной нагрузкой или **AA**, могут быть остатками реактивных фрагментов, которые используются для присоединения полезной нагрузки или **AA** к спейсеру во время химического синтеза конъюгата.

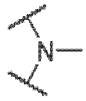
[00109] В некоторых вариантах реализации спейсер SP^2 выбран из группы, состоящей из –O–, –N($R^{6'}$)–, –$R^{4'}$–, –$R^{5'}$–, –$OR^{5'}$– и –OP(O)($OR^{6'}$)O–, при этом:

$R^{4'}$ представляет собой –**Z'**–**Y**–**X**–;

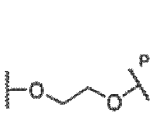
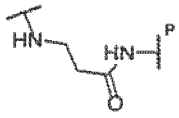
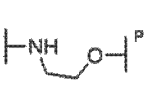
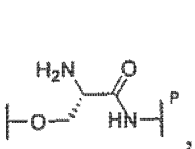
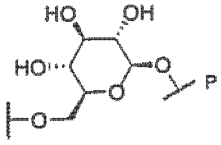
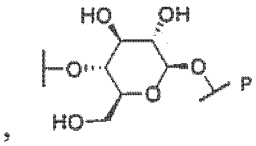
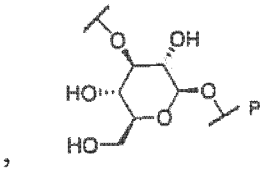
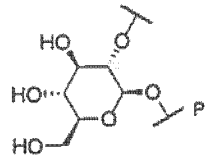
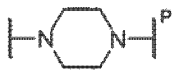
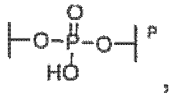
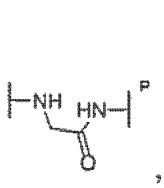
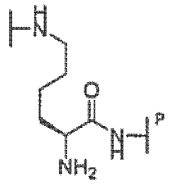
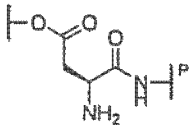
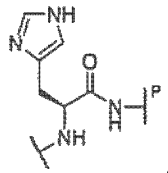
X выбран из группы, состоящей из -O- и -N(H)-;

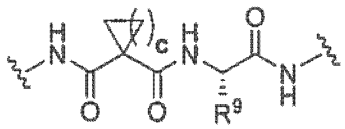
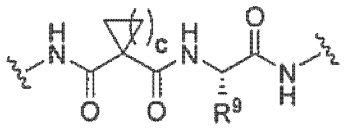
Y выбран из группы, состоящей из алкилена, замещенного алкилена (включая, без ограничения, оксозамещение, т.е. =O), гетероалкилена и замещенного гетероалкилена;

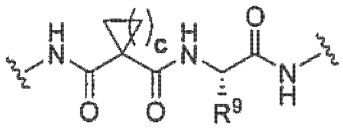
Z' выбран из группы, состоящей из -O- и -N(H)-;

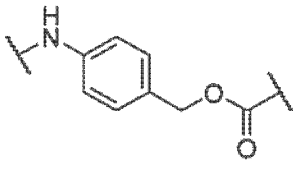
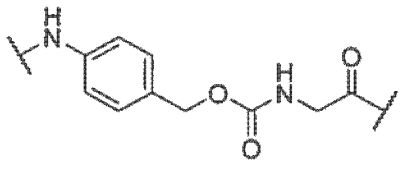
R^{5t} представляет собой гетероциклоалкилен или замещенный гетероциклоалкилен, где каждый гетероциклоалкилен или замещенный гетероциклоалкилен включает один, два или три гетероатома, выбранных из азота и кислорода, включая по меньшей мере два фрагмента, выбранные из группы, состоящей из –O–, –N(H)- и  , полезных для связывания с остальной частью молекулы; а также

каждый R^{6t} представляет собой –H, аминокислотный остаток, пептид или алкил.

[00110] В некоторых вариантах реализации спейсер SP^2 выбран из группы, состоящей из –O–, –N(H) –,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , и  . В некоторых вариантах осуществления каждый  является связью с полезной нагрузкой, и каждый  является связью с $(AA)_{pl}$.

[00111] В приведенных выше формулах каждый **AA** представляет собой аминокислоту или, необязательно, *p*-аминобензилоксикарбонильный остаток (PABC), или  , где **c** равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Если присутствует PABC, предпочтительно присутствует только один PABC. Предпочтительно, остаток PABC, если он присутствует, связан с терминалом **AA** в группе $(AA)_{pl}$, ближайшей к полезной нагрузке. Если присутствует  , то предпочтительно **c** равно 2.

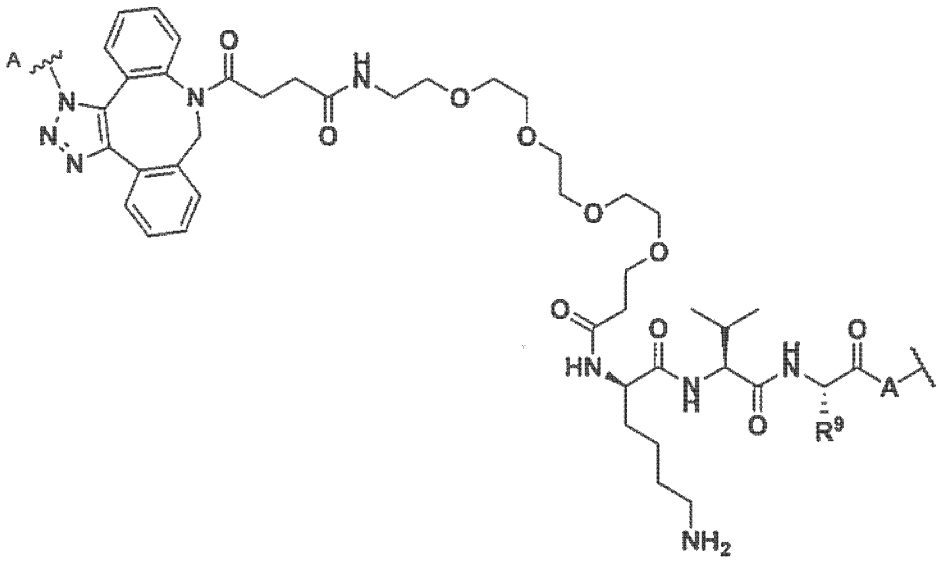
Предпочтительно остаток  , если он присутствует и **c** равно 2, связан с концом **AA** в группе $(AA)_{p1}$, удаленной от полезной нагрузки. Подходящие аминокислоты для каждой **AA** включают природные, ненатуральные, стандартные, нестандартные, протеиногенные, небелиногенные и L-, или D-α-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер **AA** включает аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, триптофан, фенилаланин, пролин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, гистидин или цитруллин, его производное или их комбинация. В определенных вариантах осуществления одна или несколько боковых цепей аминокислот связаны с группой боковой цепи, описанной ниже. В некоторых вариантах осуществления **p1** равен нулю. В некоторых вариантах осуществления **p1** равен двум. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_{p1}$ представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_{p1}$ представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_{p1}$ представляет собой валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_{p1}$ представляет собой аланин-валин. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_{p1}$ представляет собой валин-глицин. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_{p1}$ представляет собой глицин-валин. В некоторых вариантах осуществления **p1** равен трем. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_{p1}$ представляет собой валин-цитруллин-PABC. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_{p1}$ представляет собой цитруллин-валин-PABC. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_{p1}$ представляет собой лизин-валин-цитруллин-PABC. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_{p1}$ представляет собой глутамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_{p1}$ представляет собой глутамин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_{p1}$ представляет собой лизин-валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_{p1}$ представляет собой лизин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления **p1** равен четырем. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_{p1}$ представляет собой глутамат-валин-цитруллин-PAB. В некоторых вариантах осуществления $(AA)_{p1}$ представляет собой глутамин-валин-цитруллин-PABC. Специалисты в данной области распознают PABC как остаток *p*-аминобензилоксикарбонила со следующими типичными структурами:

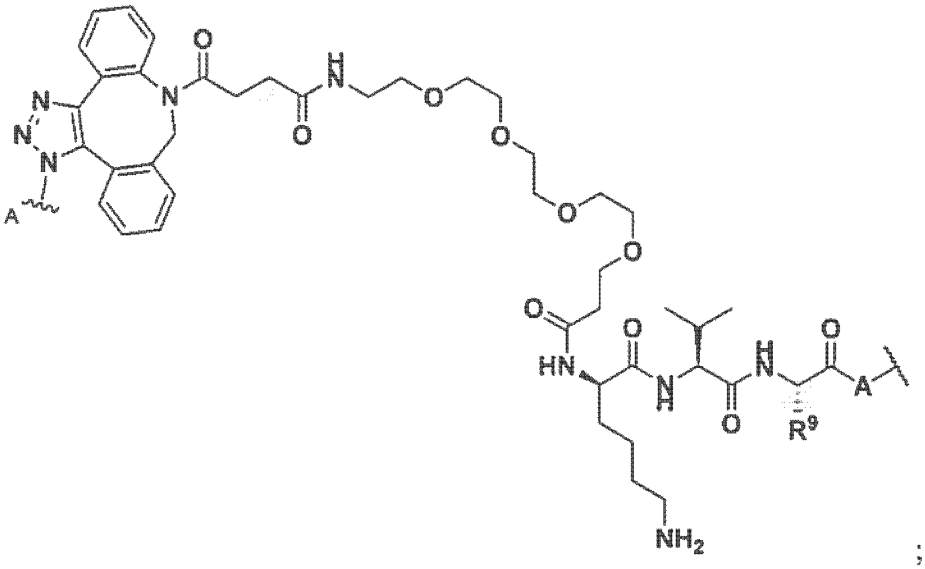
или .

Было показано, что остаток PABC облегчает расщепление определенных линкеров *in vitro* и *in vivo*.

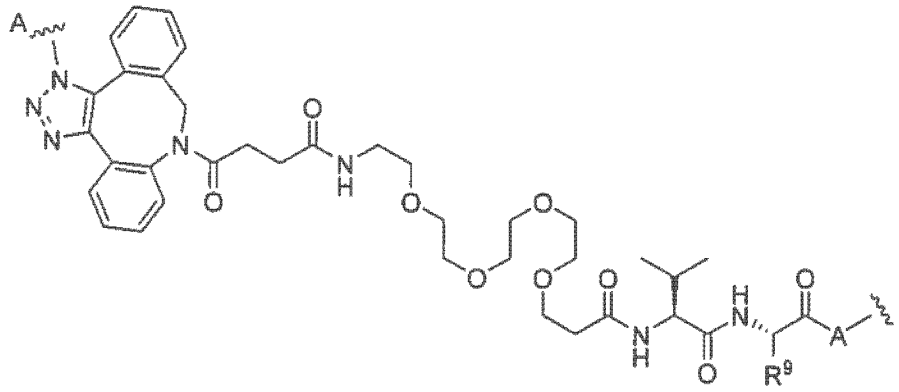
[00112] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:



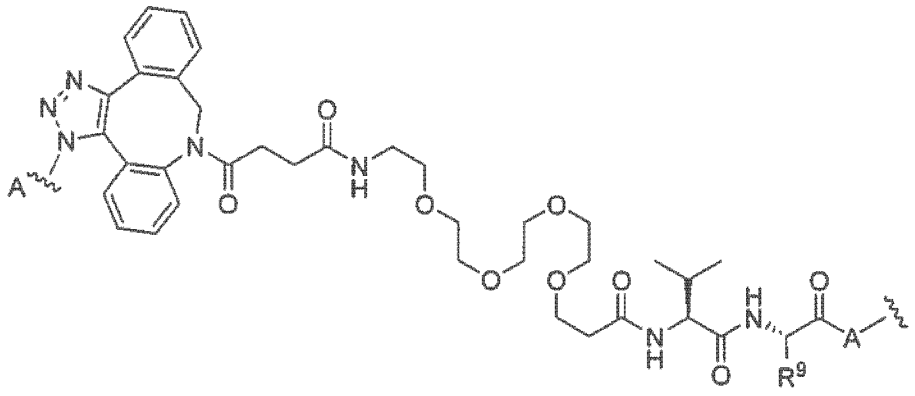
или



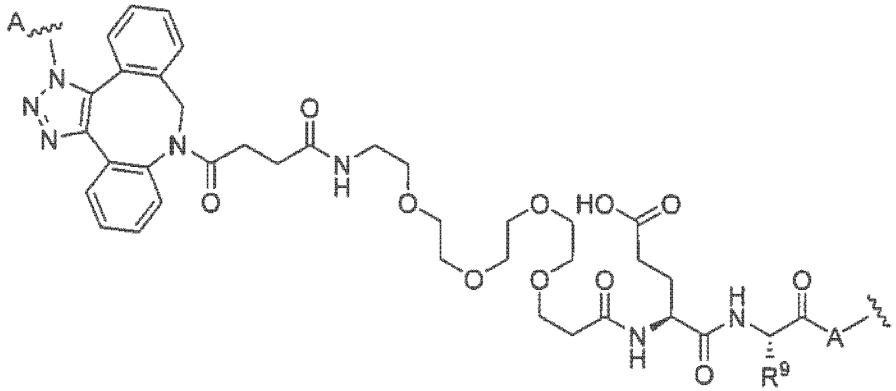
;



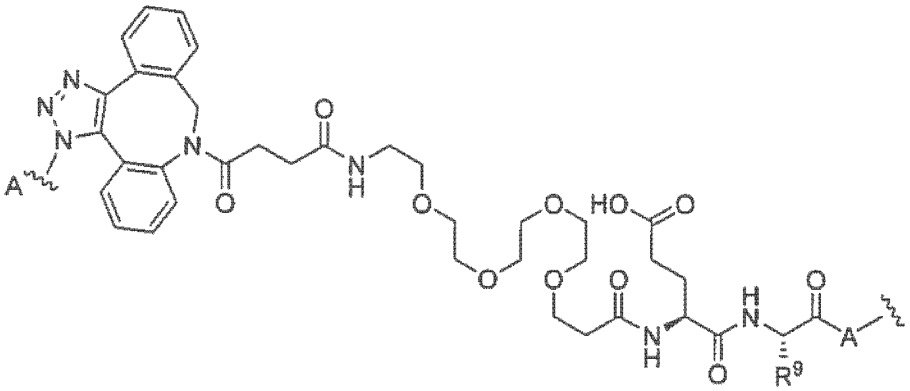
или



; или



или

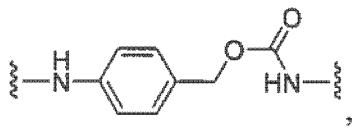


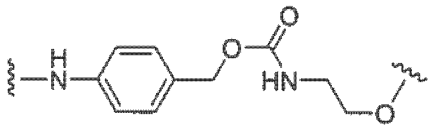
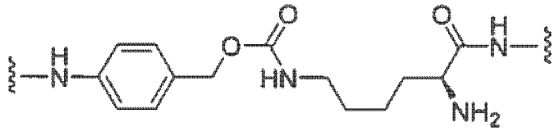
где:

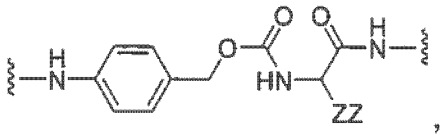
каждый  представляет собой связь со связующим агентом;

каждый  является связью с полезной нагрузкой;

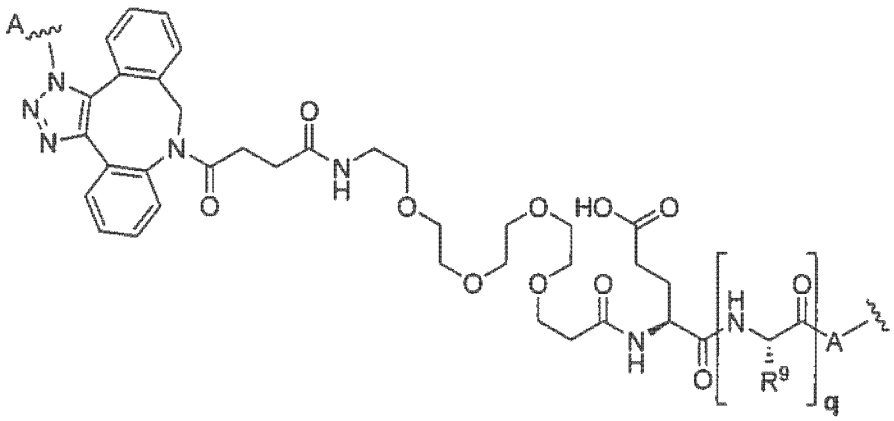
каждый $\mathbf{R^9}$ представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждый **A** представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

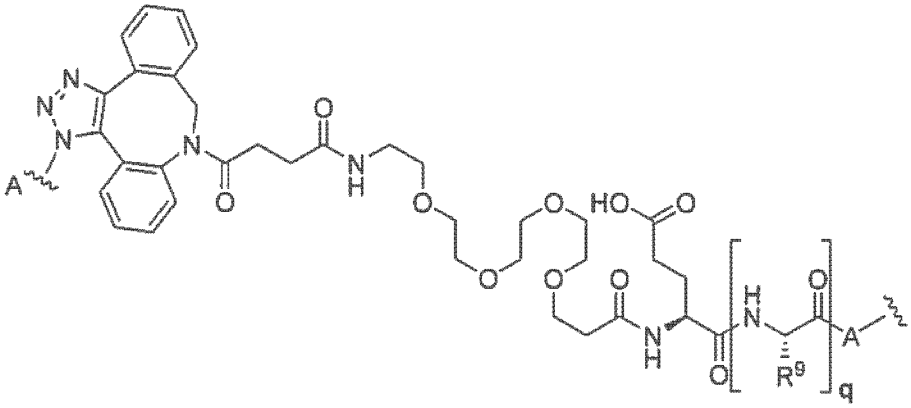
 ,  или

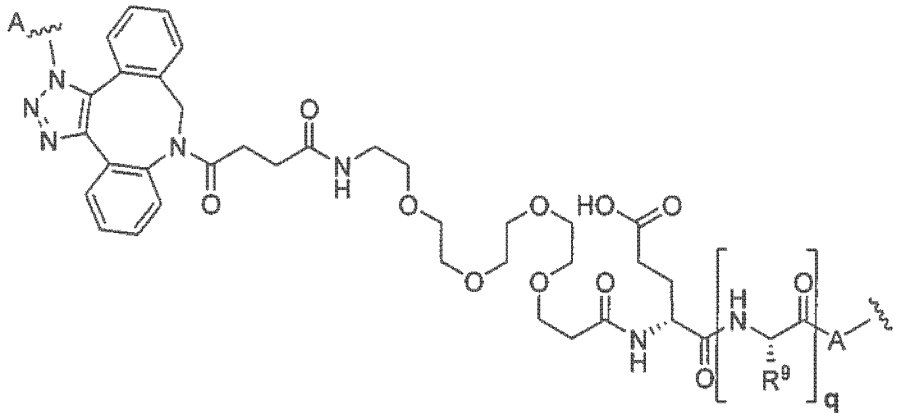
 , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил. Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах реализации связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина связывающего агента.

[00113] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:

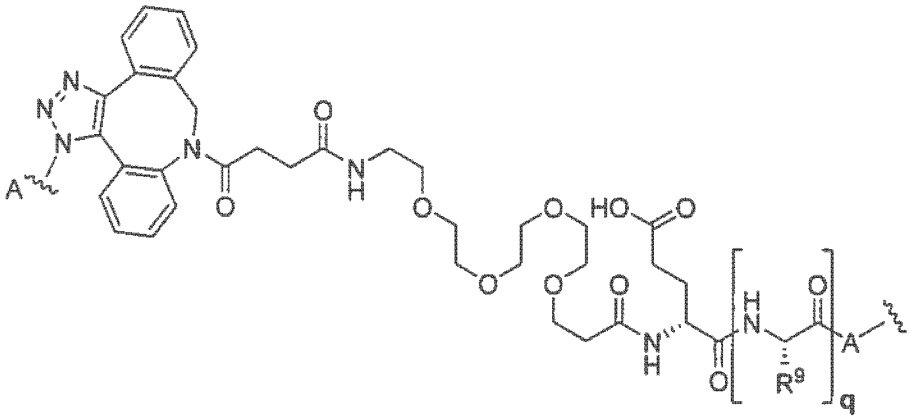


или





или



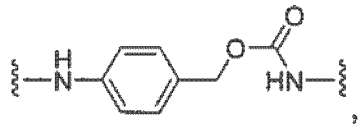
где:

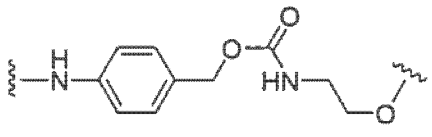
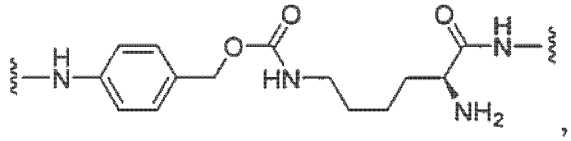
каждый  представляет собой связь со связующим агентом;

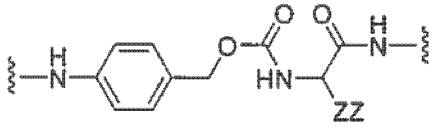
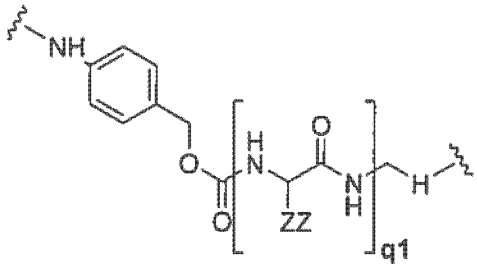
каждый  является связью с полезной нагрузкой;

каждый $\mathbf{R^9}$ представляет собой $–CH_3$, $–CH(CH_3)_2$ или $–(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$;

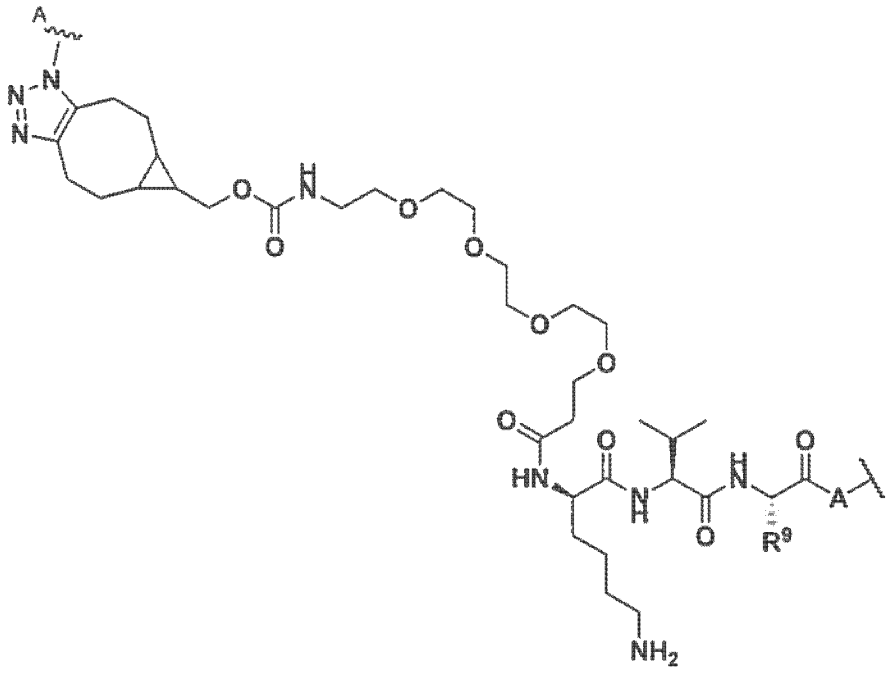
q представляет собой целое число от одного до трех; а также

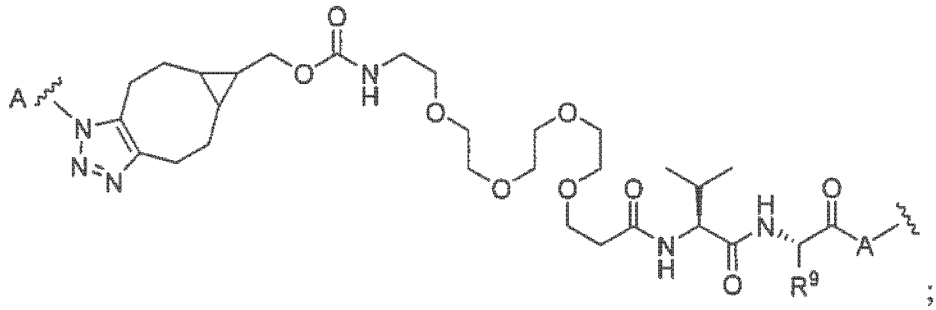
каждый A представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

 ,  ,

 или  , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа; **q1** - целое число от одного до пяти; и **H** представляет собой –O– или –NH–. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил. В одном варианте осуществления **H** представляет собой –O–. В одном варианте осуществления **H** представляет собой –NH–. Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах реализации связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина связывающего агента.

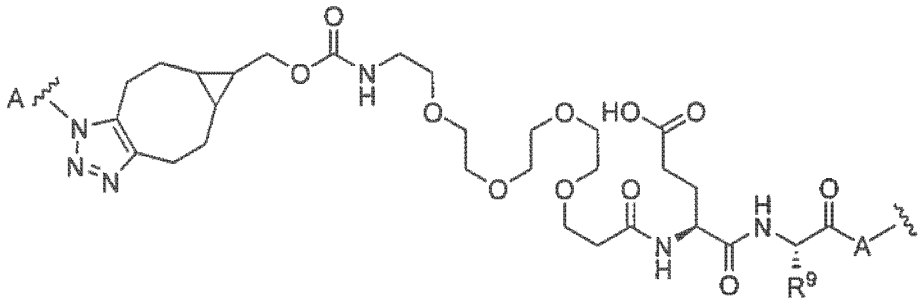
[00114] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:

 ;



;

или

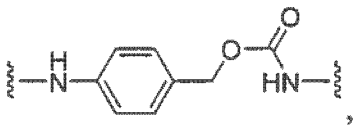


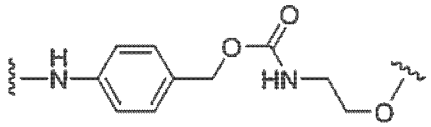
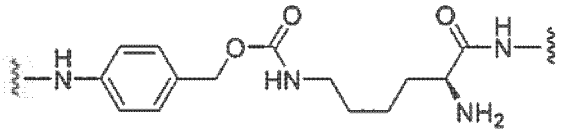
где:

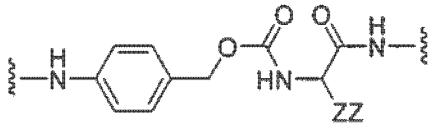
каждый  представляет собой связь со связующим агентом;

каждый  является связью с полезной нагрузкой;

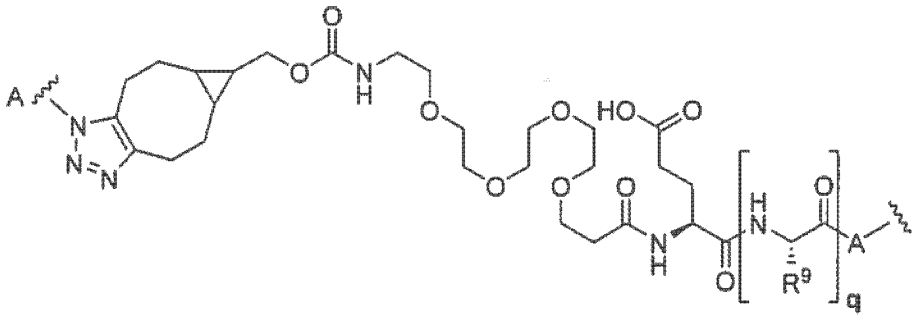
каждый R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждый A представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

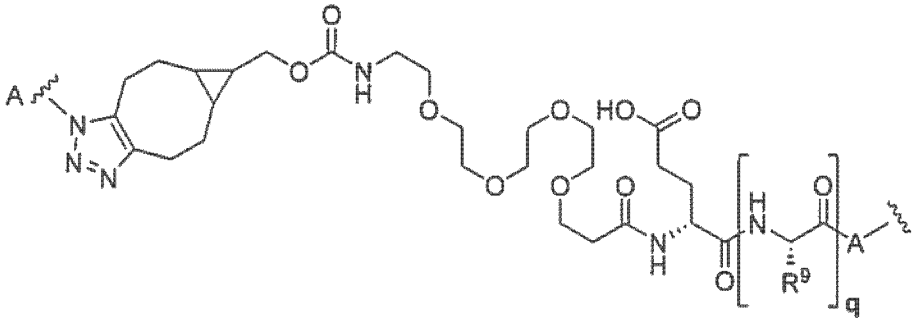
 ,  или

 , где ZZ представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте ZZ представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте ZZ представляет собой C_{1-6} гетероалкил. Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах реализации связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина связывающего агента.

[00115] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:



или



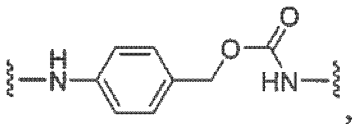
, где:

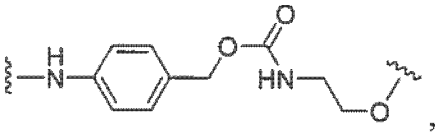
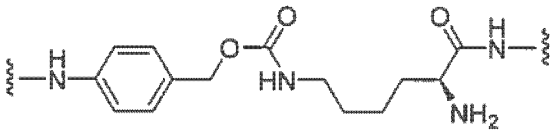
каждый  представляет собой связь со связующим агентом;

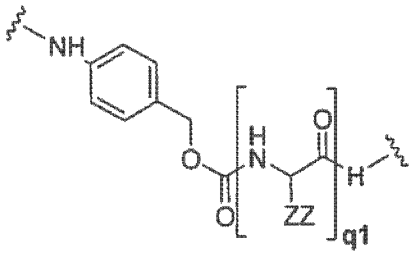
каждый  является связью с полезной нагрузкой;

каждый **R**^{9} представляет собой $-CH_3$, $-CH(CH_3)_2$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$;

q представляет собой целое число от одного до трех; а также

каждый **A** представляет собой –O–, –N (H) -,  ,

 ,  или

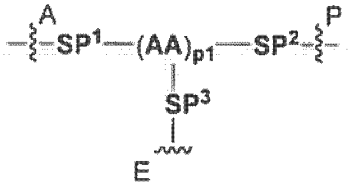


, где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа; **q1** - целое число от одного до пяти; и **H** представляет собой –O– или –NH–. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил. В одном варианте осуществления **H** представляет собой –O–. В одном варианте осуществления **H** представляет собой –NH–.

Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах реализации связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина связывающего агента.

[00116] В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления группа $(AA)_{p1}$ может быть модифицирована одной или несколькими усиливающими группами. Преимущественно усиливающая группа может быть связана с боковой цепью любой аминокислоты в $(AA)_{p1}$. Полезные аминокислоты для связывания усиливающих групп включают лизин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутамат и цитруллин. Связь с усиливающей группой может быть прямой связью с боковой цепью аминокислоты, либо связь может быть непрямой через спейсер и/или реактивную группу. Полезные спейсеры и реакционные группы включают все, что описано выше. Усиливающая группа может быть любой группой, которую специалисты сочтут полезной. Например, усиливающая группа может быть любой группой, которая придает положительный эффект соединению, полезной нагрузке, полезной нагрузке линкера или конъюгату антитела, включая, помимо прочего, биологические, биохимические, синтетические, солюбилизирующие, визуализирующие, детектирующие и реактивные эффекты, и тому подобное. В некоторых вариантах реализации усиливающая группа представляет собой гидрофильную группу. В некоторых вариантах реализации усиливающая группа представляет собой циклодекстрин. В некоторых вариантах реализации усиливающая группа представляет собой алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновую кислоту. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалистам. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин, бета-циклодекстрин или гамма-циклодекстрин или их смеси. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой гамма-циклодекстрин. В некоторых вариантах реализации усиливающая группа способна улучшать растворимость оставшейся части конъюгата. В некоторых вариантах реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота является замещенной или незамещенной. В некоторых вариантах реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, или $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5, а **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В одном

варианте осуществления алкил- или алкиленилсульфоновая кислота представляет собой –$(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$. В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой –$(CH_2)_{n2}$–NH-$(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой –$(CH_2)_{n2}$–C(O)NH-$(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой –$(CH_2CH_2O)_{m2}$–C(O)NH-$(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой –$(CH_2)_{n2}$–N$((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой –$(CH_2)_{n2}$–C(O)N$((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой –$(CH_2CH_2O)_{m2}$–C(O)N$((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:



где:

SP1 представляет собой спейсер;

SP2 представляет собой спейсер;

SP3 представляет собой спейсер, связанный с одним **AA** из $(AA)_{p1}$;



одна или несколько связей со связующим агентом;



одна или несколько связей с полезной нагрузкой;



представляет собой одну или несколько связей с усиливающей группой **EG**;

каждый **AA** представляет собой аминокислоту; а также

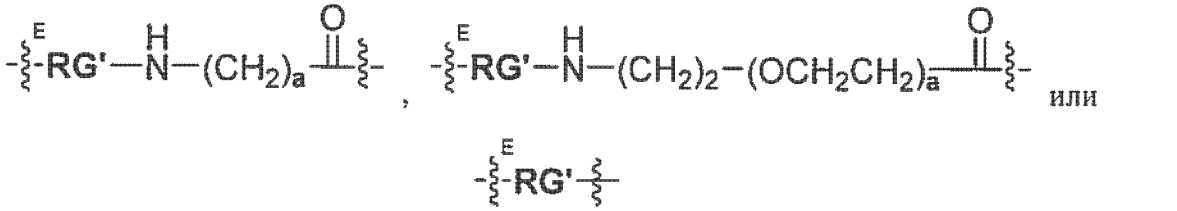
P1 представляет собой целое число от 1 до 10.

Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах реализации связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина связывающего агента.

[00117] Спейсерная группа **SP**^{1} как описано выше. Спейсерная группа **SP**^{2} как описано выше. Каждая группа $(\mathbf{AA})_{p1}$ как описано выше.

[00118] Спейсер **SP**^{3} представляет собой фрагмент, который связывает фрагмент $(\mathbf{AA})_{p1}$ с усиливающей группой (**EG**). Подходящие спейсеры **SP**^{3} включают, но не ограничиваются ими, те, которые содержат алкилен или простой полиэфир, или и то, и другое. Концы спейсеров **SP**^{3} , *то* есть часть спейсера **SP**^{3}, непосредственно связанная с усиливающей группой или **AA**, могут быть фрагментами, полученными из реакционноспособных фрагментов, которые используются для целей связывания усиливающей группы или **AA** со спейсером **SP**^{3} во время химического синтеза конъюгата. В некоторых примерах концы спейсеров **SP**^{3}, *то есть* часть спейсера, непосредственно связанная с усиливающей группой или **AA**, могут быть остатками реакционноспособных фрагментов, которые используются для целей связывания усиливающей группы или **AA** со спейсером во время химического синтеза конъюгата. В некоторых вариантах реализации **SP**^{3} представляет собой спейсер, связанный с одним и только одним **AA** из $(\mathbf{AA})_{p1}$. В некоторых вариантах реализации спейсер **SP**^{3} связан с боковой цепью остатка лизина $(\mathbf{AA})_{p1}$.

[00119] В некоторых вариантах реализации спейсер **SP**^{3} представляет собой:



где:

RG' представляет собой остаток реакционной группы после реакции реакционноспособной группы **RG** с усиливающим агентом **EG**;

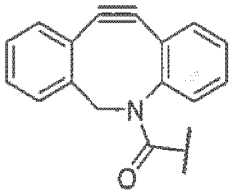
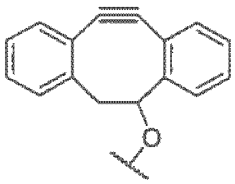
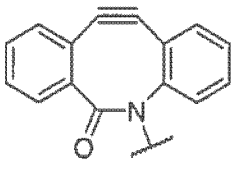
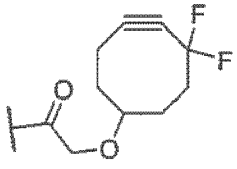
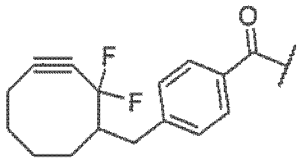
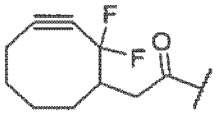
 является связью с усиливающим агентом;

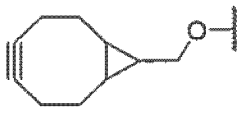
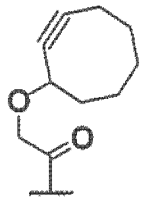
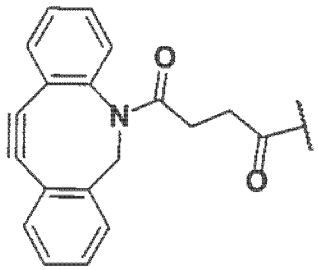
 представляет собой связь с $(\mathbf{AA})_{p1}$;

a представляет собой целое число от 2 до 8; а также

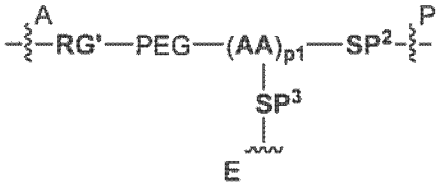
p1 представляет собой целое число от 1 до 4.

[00120] Реакционноспособная группа **RG** может быть любой реакционноспособной группой, известной специалистам в данной области техники, которая способна образовывать одну или несколько связей с усиливающим агентом. Реакционноспособная группа **RG** представляет собой фрагмент, содержащий часть в своей структуре, которая способна реагировать с усиливающей группой с образованием соединения формулы **LPa**, **LPb**, **LPc**, **LPd**, **LPa'**, **LPb'**, **LPc'**, **LPd'**, **A**, **B**, **C**, **D**, **A'**, **B'**, **C'**, **D'** или **A''**. После конъюгации с усиливающей группой реакционноспособная группа становится остатком реакционноспособной группы (**RG'**). Реакционноспособная группа **RG** может быть любой реакционноспособной группой, описанной выше. Иллюстративные реакционноспособные группы включают, но не ограничиваются ими, группы, которые включают галоацетил, изотиоцианат, сукцинимид, N-гидроксисукцинимид или малеимид, участки, которые способны реагировать со связующим агентом.

[00121] В некоторых вариантах осуществления реакционноспособные группы включают, но не ограничиваются ими, алкины. В некоторых вариантах осуществления алкины представляют собой алкины, способные подвергаться реакциям 1,3-циклоприсоединения с азидами в отсутствие медных катализаторов, таких как напряженные алкины. Напряженные алкины пригодны для активируемых штаммами алкиназидных циклоприсоединений (SPAAC), циклоалкинов, *например*, циклооктинов, бензобензилированных алкинов. Подходящие алкины включают, но не ограничиваются ими, дибензоазациклооктин или  (DIBAC), дибензоциклооктин или  (DIBO), биарилазациклооктинон или  (BARAC), дифторированный циклооктин или  , или  , или  (DIFO), замещенный, *например*, фторированные алкины, аза-

циклоалкины, бицикло[6.1.0]нонин или  (BCN) и их производные. Особенно полезные алкины включают  ,  и  .

[00122] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:



где:

RG' представляет собой остаток реакционноспособной группы после реакции реакционноспособной группы **RG** со связывающим агентом;

PEG представляет собой –NH–PEG4–C(O)–;

SP^2 представляет собой спейсер;

SP^3 представляет собой спейсер, связанный с одним остатком **AA** из **(AA)$_{p1}$**;

 одна или несколько связей со связующим агентом;

 одна или несколько связей с полезной нагрузкой;

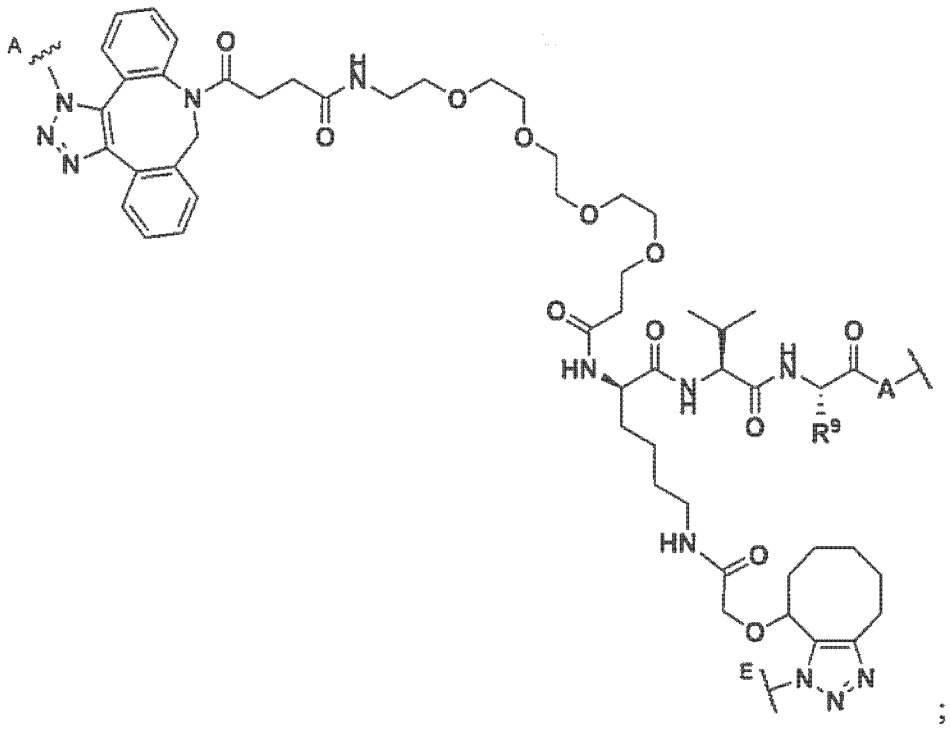
 представляет собой одну или несколько связей с усиливающей группой **EG**;

каждый **AA** представляет собой аминокислотный остаток; а также

p1 представляет собой целое число от 1 до 10.

Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах реализации связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина связывающего агента.

[00123] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:



;

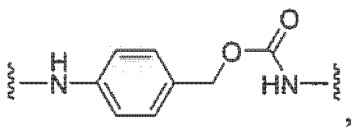
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или их смесь региоизомеров, где:

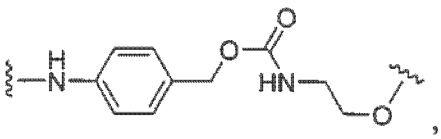
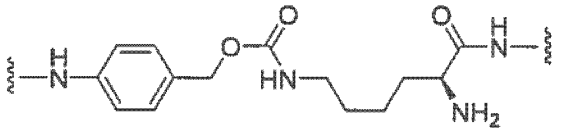
каждый  представляет собой связь со связующим агентом;

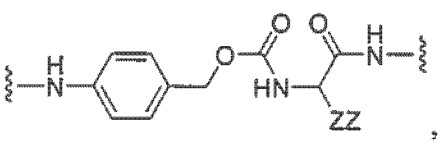
каждый  является связью с полезной нагрузкой;

каждый  является связью с усиливающим агентом;

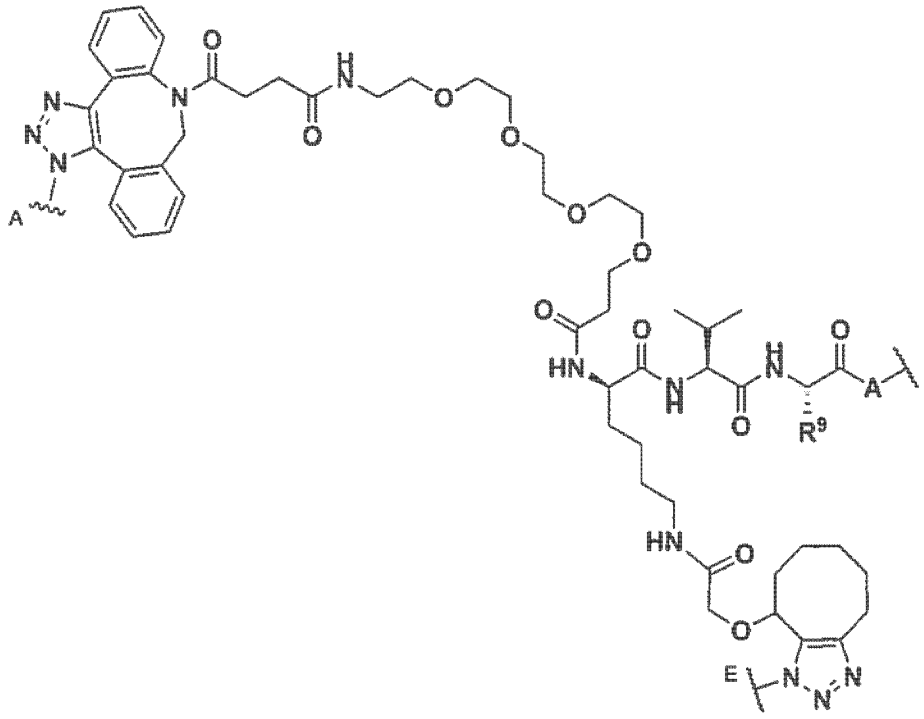
каждый $\mathbf{R^9}$ представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждый **A** представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

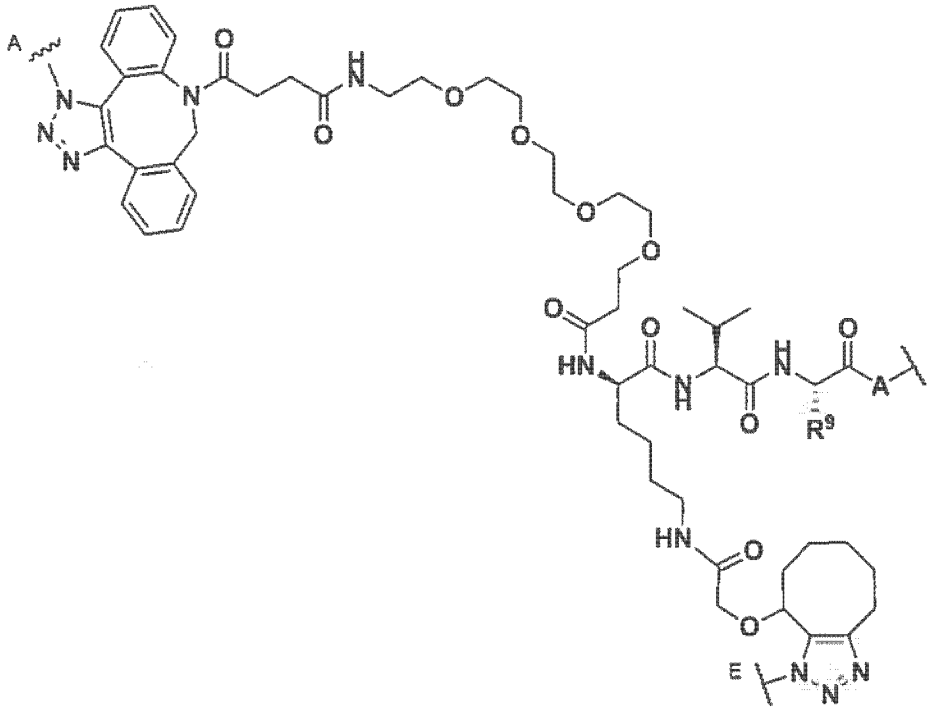
 ,  или

 , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой $C_{1\text{-}6}$ алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой $C_{1\text{-}6}$ гетероалкил. В некоторых вариантах

реализации 1,3-циклоприсоединение или региоизомеры SPAAC, или смесь региоизомеров являются производными антител,дериватизированных PEG-N_3, обработанных подходящими алкинами. Например, в одном варианте линкер представляет собой:

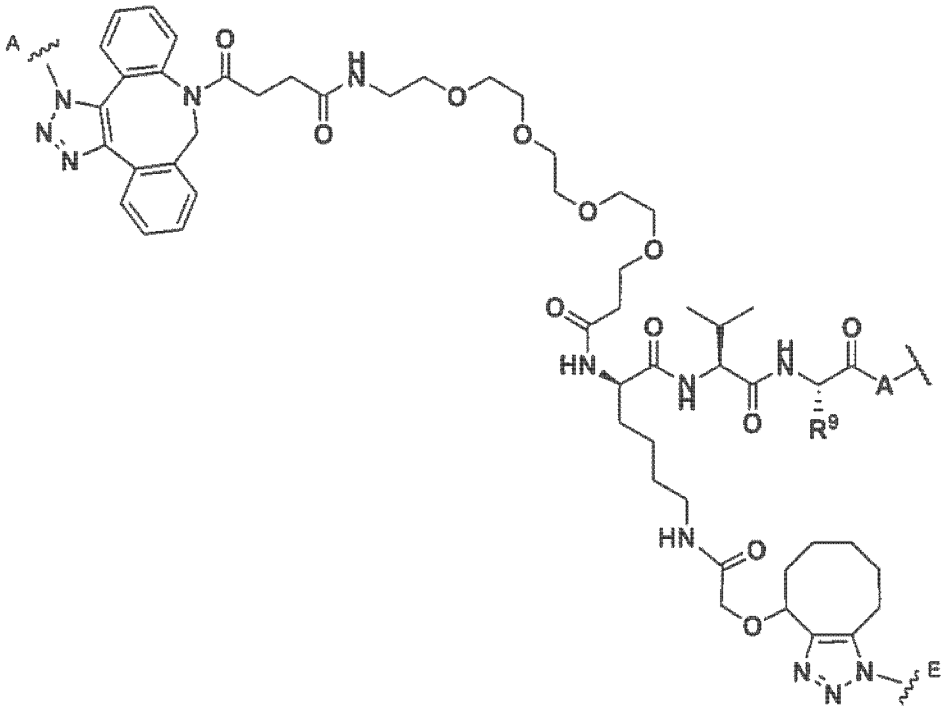


или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомерную форму, или его региоизомер, или их смесь региоизомеров. В качестве дополнительного примера, в одном варианте осуществления линкер представляет собой:

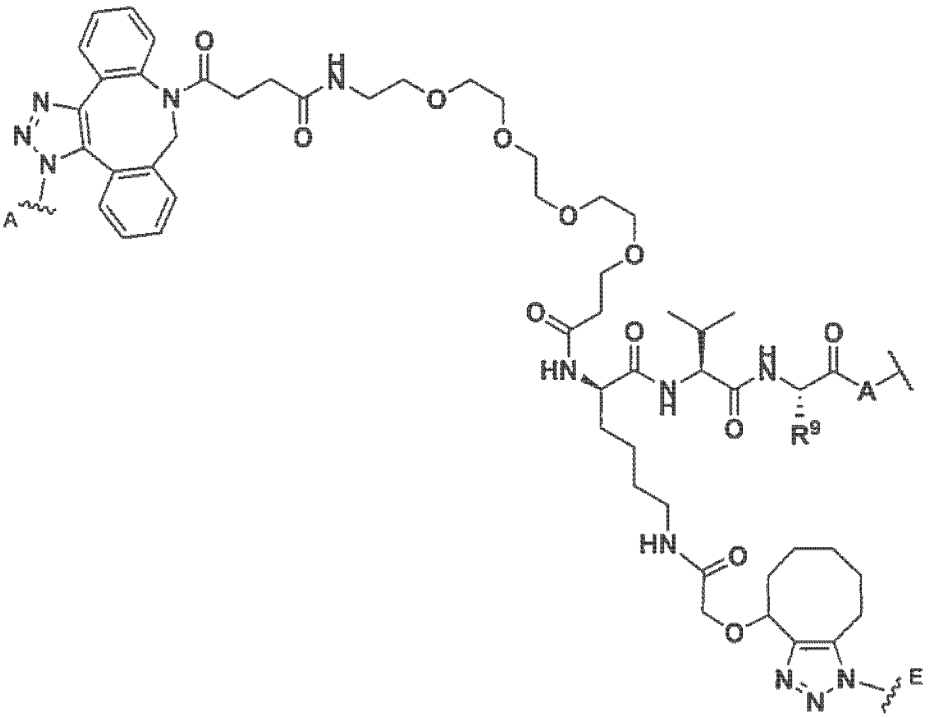


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или их смесь региоизомеров.

В качестве дополнительного примера линкер представляет собой:



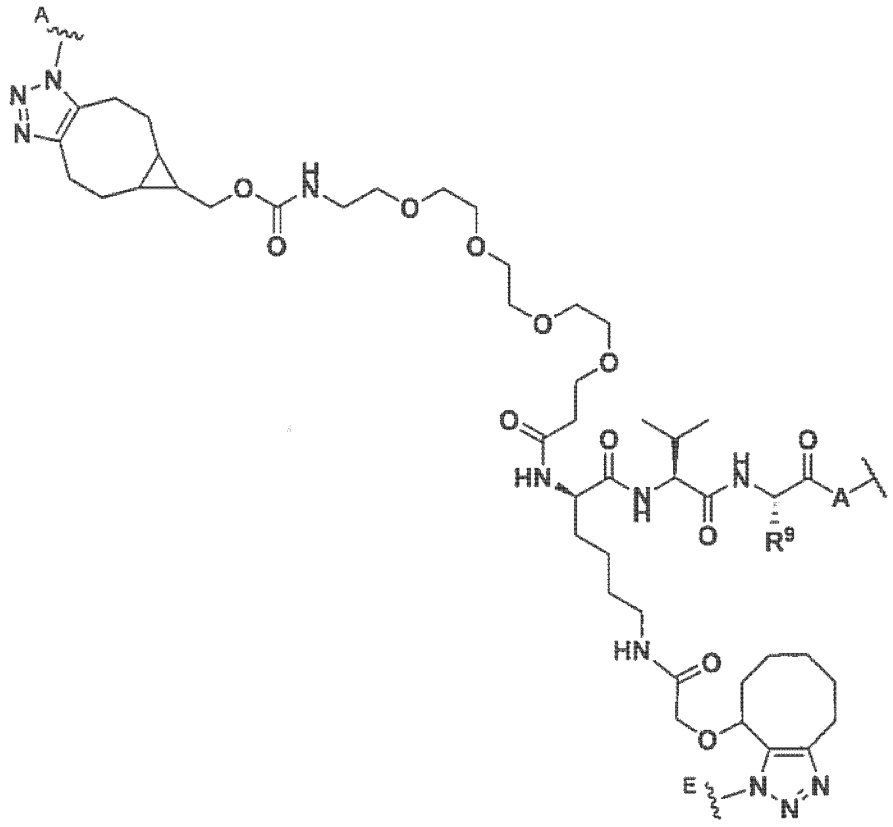
или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомерную форму, или его региоизомер, или их смесь региоизомеров. В качестве дополнительного примера, в одном варианте осуществления линкер представляет собой:



или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомерную форму, или его региоизомер, или их смесь региоизомеров. Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах реализации связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина

связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой гидрофильную группу. В некоторых вариантах осуществления усиливающий агент представляет собой циклодекстрин. В некоторых вариантах реализации усиливающая группа представляет собой алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновую кислоту. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалистам. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин, бета-циклодекстрин или гамма-циклодекстрин или их смеси. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой гамма-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, или $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5 и **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил- или алкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$. В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5.

[00124] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:



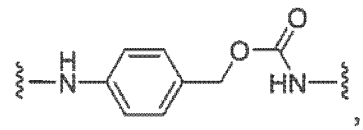
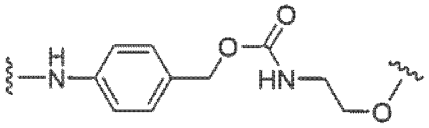
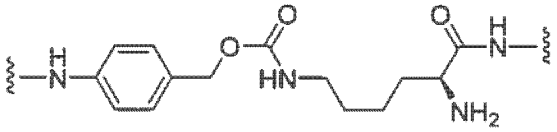
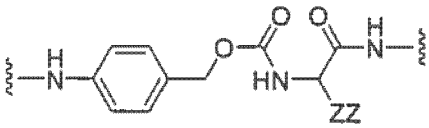
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или их смесь региоизомеров, где:

каждый  представляет собой связь со связующим агентом;

каждый  является связью с усиливающим агентом;

каждый  является связью с полезной нагрузкой;

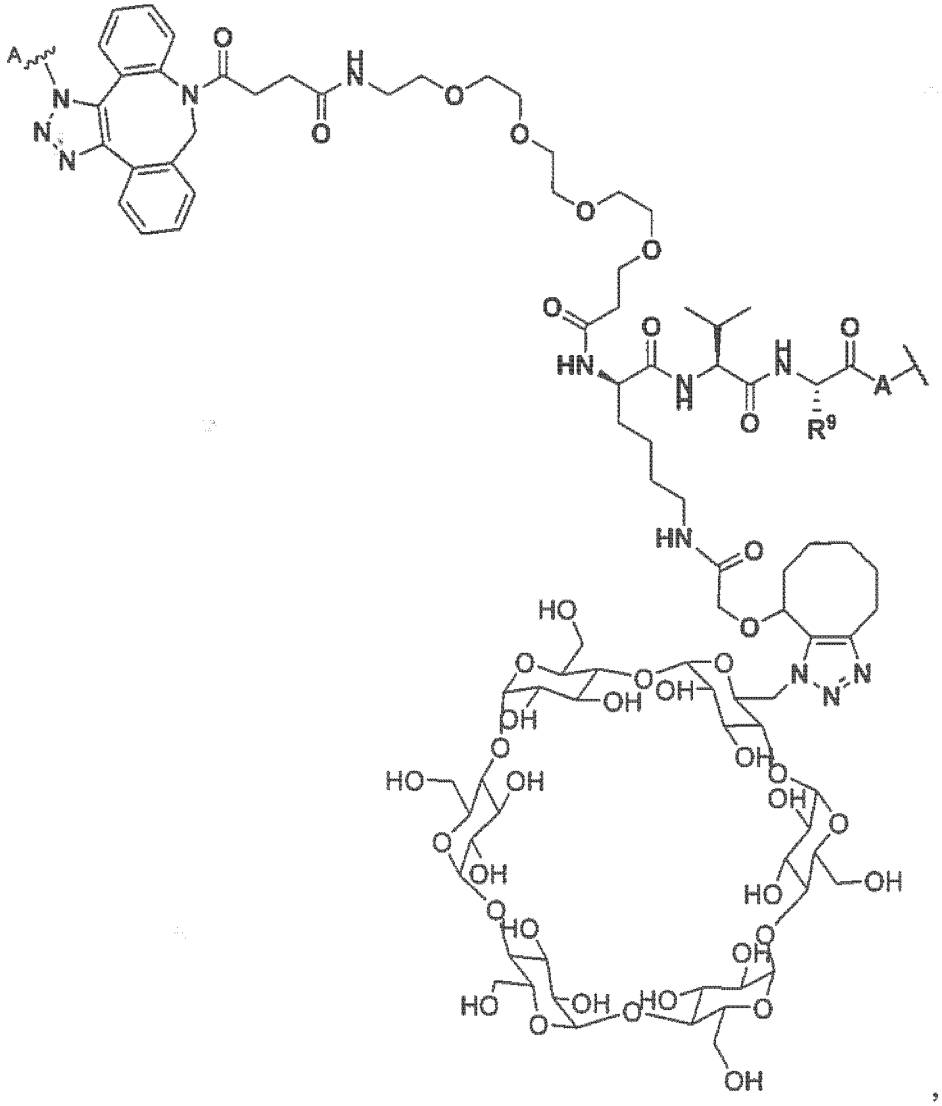
каждый R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждый **A** представляет собой –O–, –N(H)-,  ,  ,  или  , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в

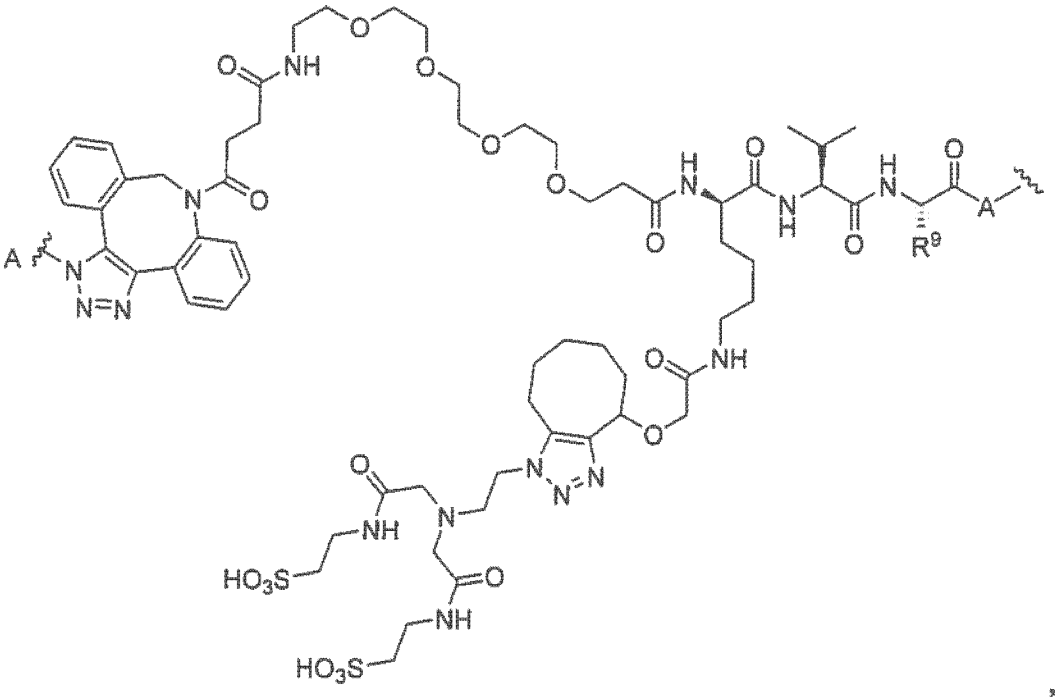
одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил. Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах реализации связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой гидрофильную группу. В некоторых вариантах осуществления усиливающий агент представляет собой циклодекстрин. В некоторых вариантах реализации усиливающая группа представляет собой алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновую кислоту. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалистам. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин, бета-циклодекстрин или гамма-циклодекстрин или их смеси. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой гамма-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, или $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5 и **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил- или алкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1-5}SO_3H$. В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или

гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5.

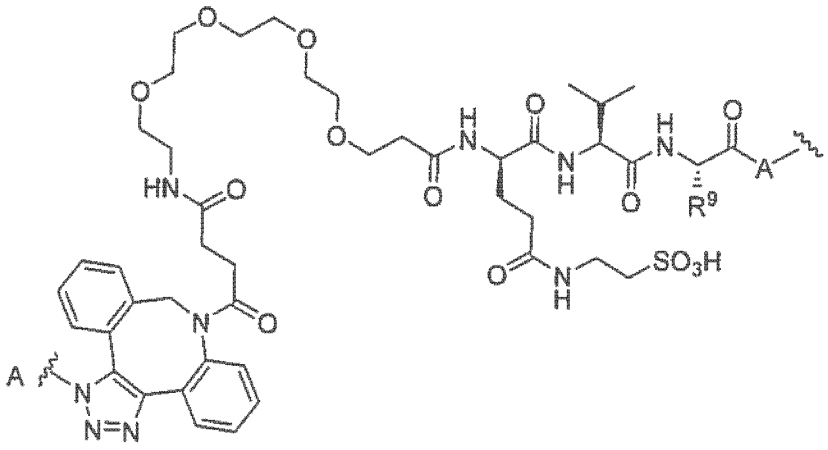
[00125] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:



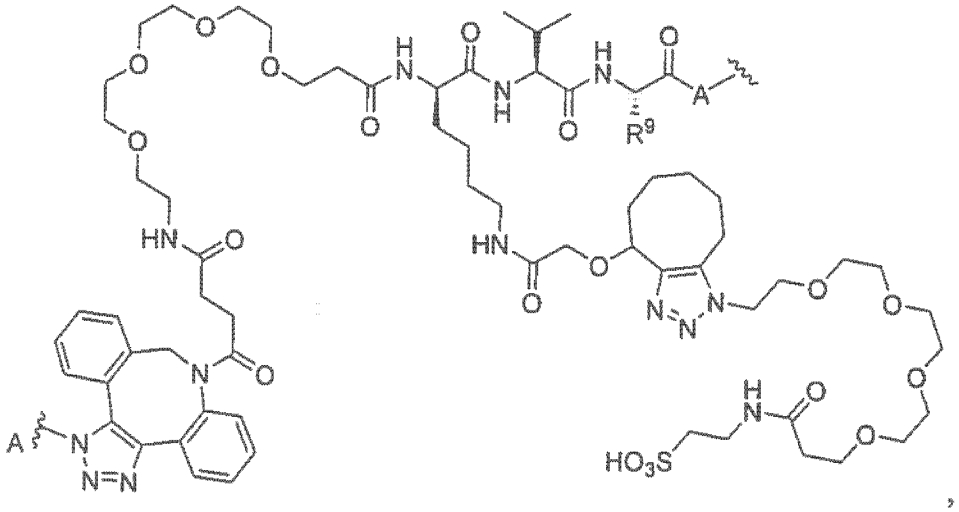
,



,



,



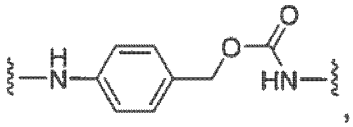
,

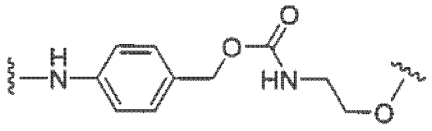
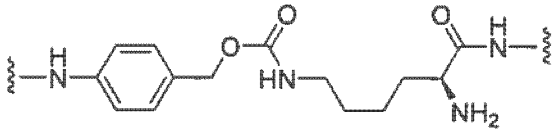
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или их смесь региоизомеров, где:

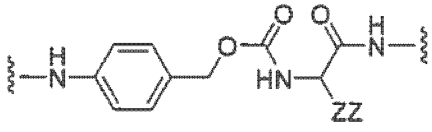
каждый  представляет собой связь со связующим агентом;

каждый  является связью с полезной нагрузкой;

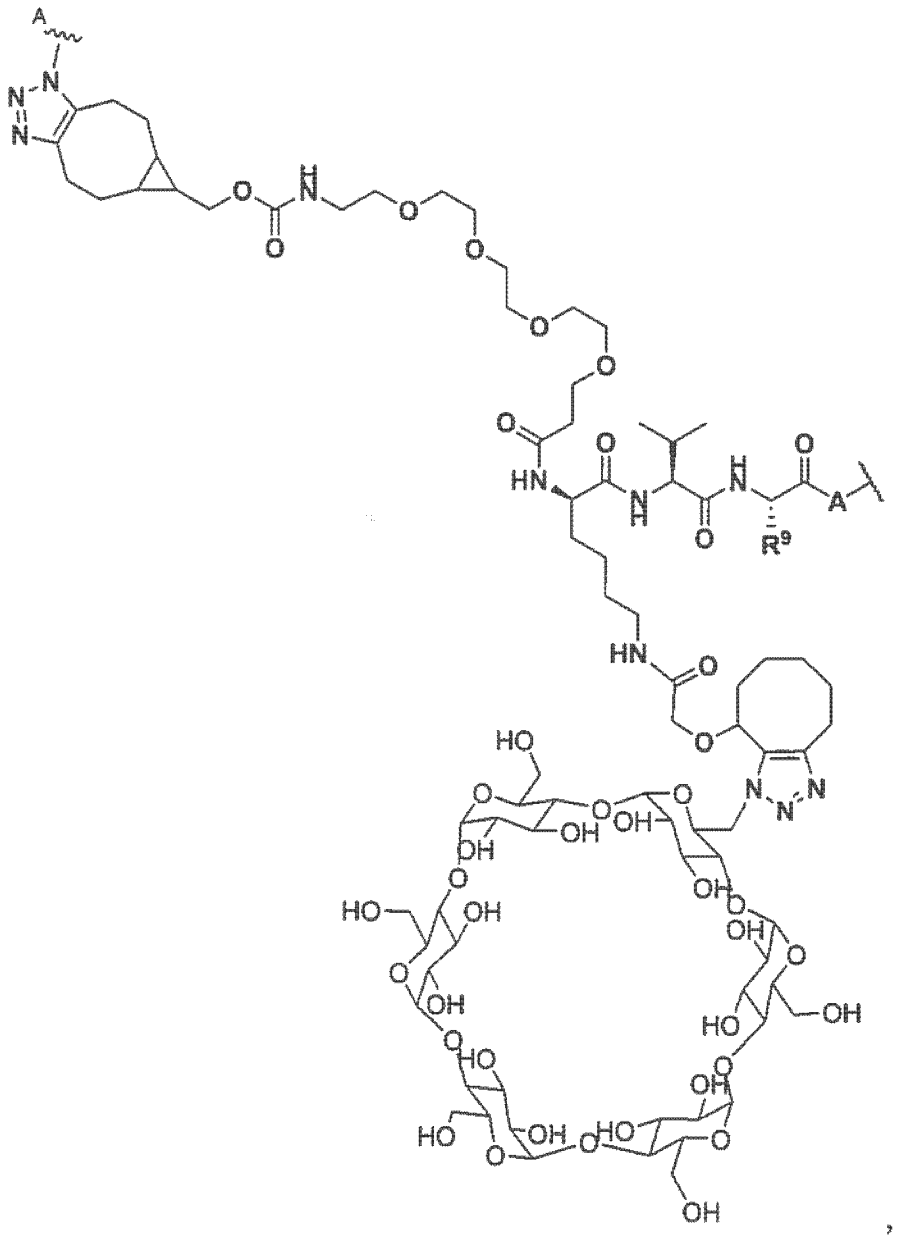
R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

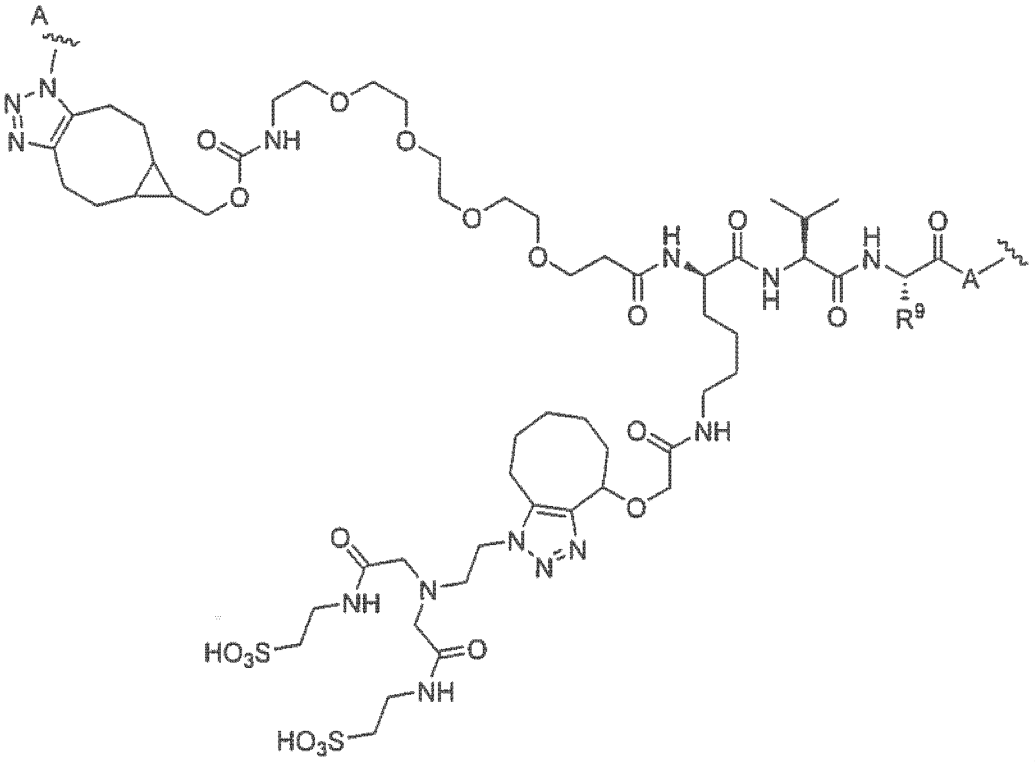
A представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

 ,  или

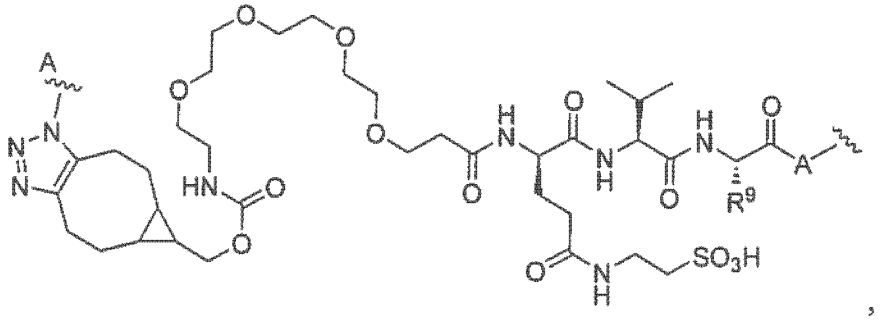
 , где ZZ представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте ZZ представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте ZZ представляет собой C_{1-6} гетероалкил. Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах реализации связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина связывающего агента.

[00126] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:

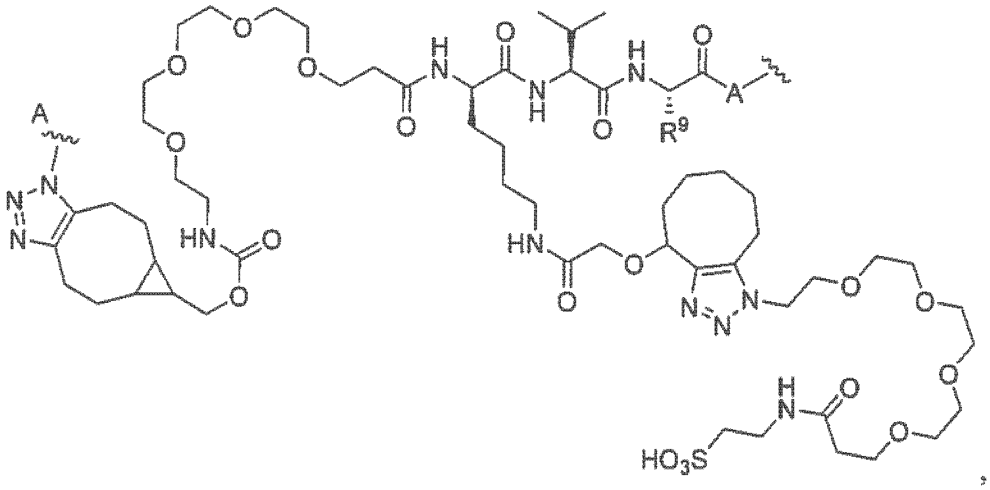




,



,



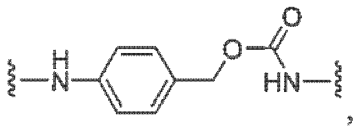
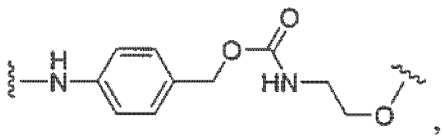
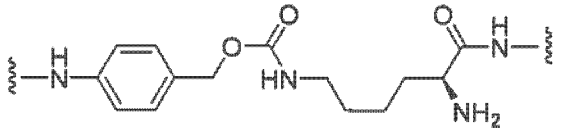
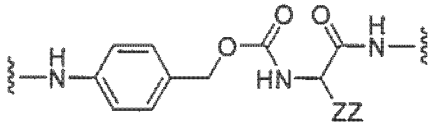
,

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или их смесь региоизомеров, где:

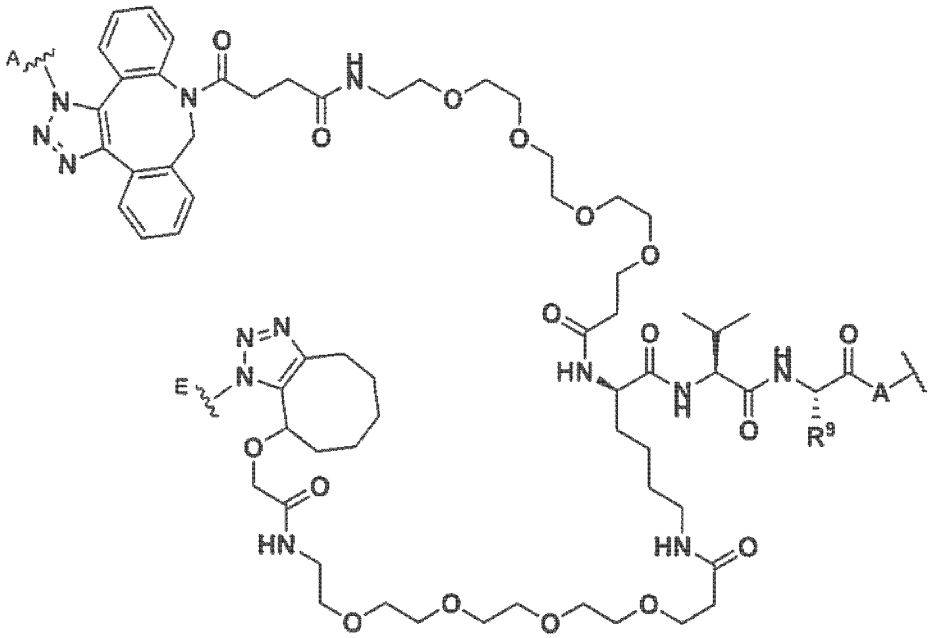
каждый представляет собой связь со связующим агентом;

каждый $-\!\!\sim\!\!-$ является связью с полезной нагрузкой;

R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

A представляет собой –O–, –N(H)-,  ,  ,  , или  , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой $C_{1\text{-}6}$ алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой $C_{1\text{-}6}$ гетероалкил. Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах реализации связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина связывающего агента.

[00127] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:



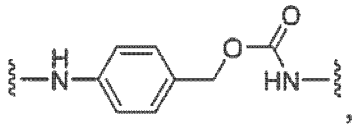
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или их смесь региоизомеров, где:

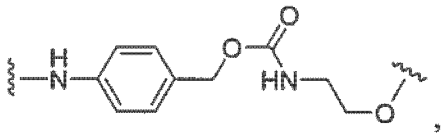
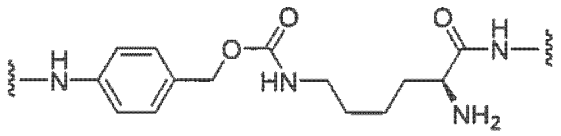
каждый $-\!\!\sim\!\!-^{A}$ представляет собой связь со связующим агентом;

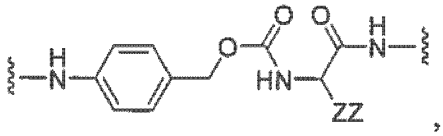
каждый  является связью с полезной нагрузкой;

каждый является связью с усиливающей группой;

каждый $\mathbf{R^9}$ представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

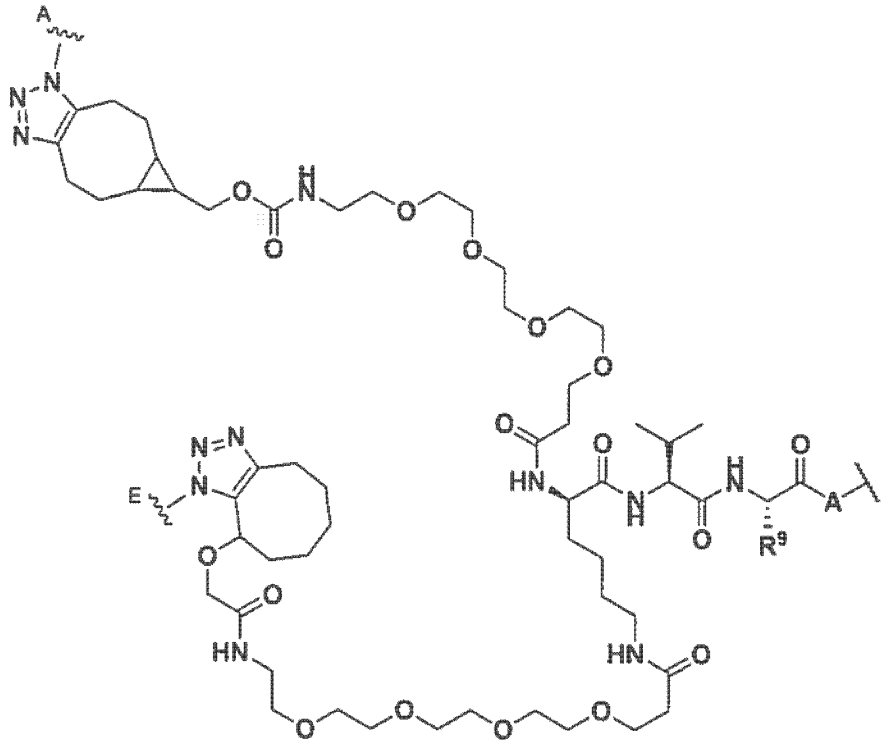
каждый **A** представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

 ,  или

 , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой $C_{1\text{-}6}$ алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой $C_{1\text{-}6}$ гетероалкил. Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах реализации связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой гидрофильную группу. В некоторых вариантах осуществления усиливающий агент представляет собой циклодекстрин. В некоторых вариантах реализации усиливающая группа представляет собой алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновую кислоту. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалистам. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин, бета-циклодекстрин или гамма-циклодекстрин или их смеси. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой гамма-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, или $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5 и **m2**

равно 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил- или алкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$. В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5.

[00128] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:

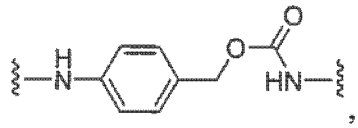
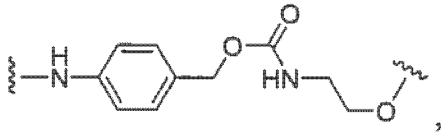
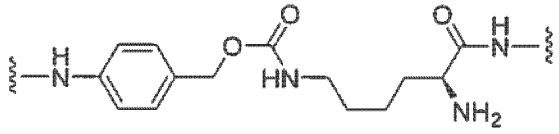
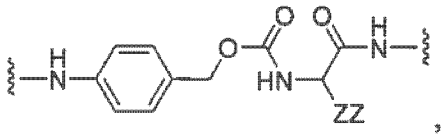


или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или их смесь региоизомеров, где:

каждый  представляет собой связь со связующим агентом;

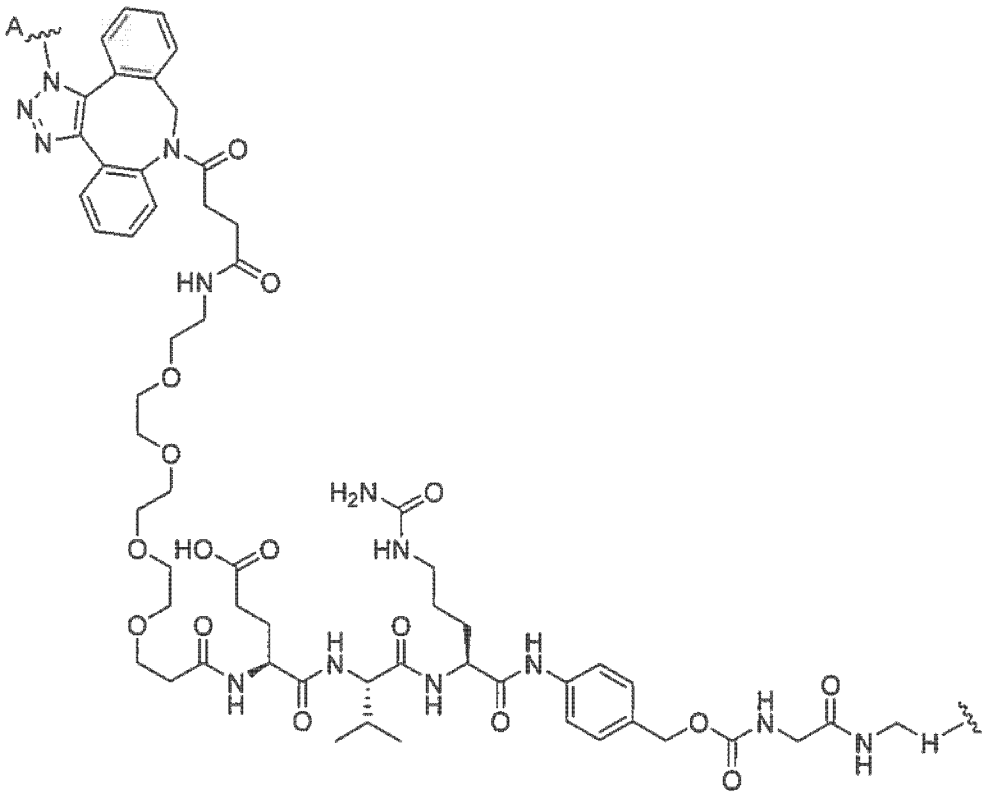
каждый  является связью с полезной нагрузкой;

каждый R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

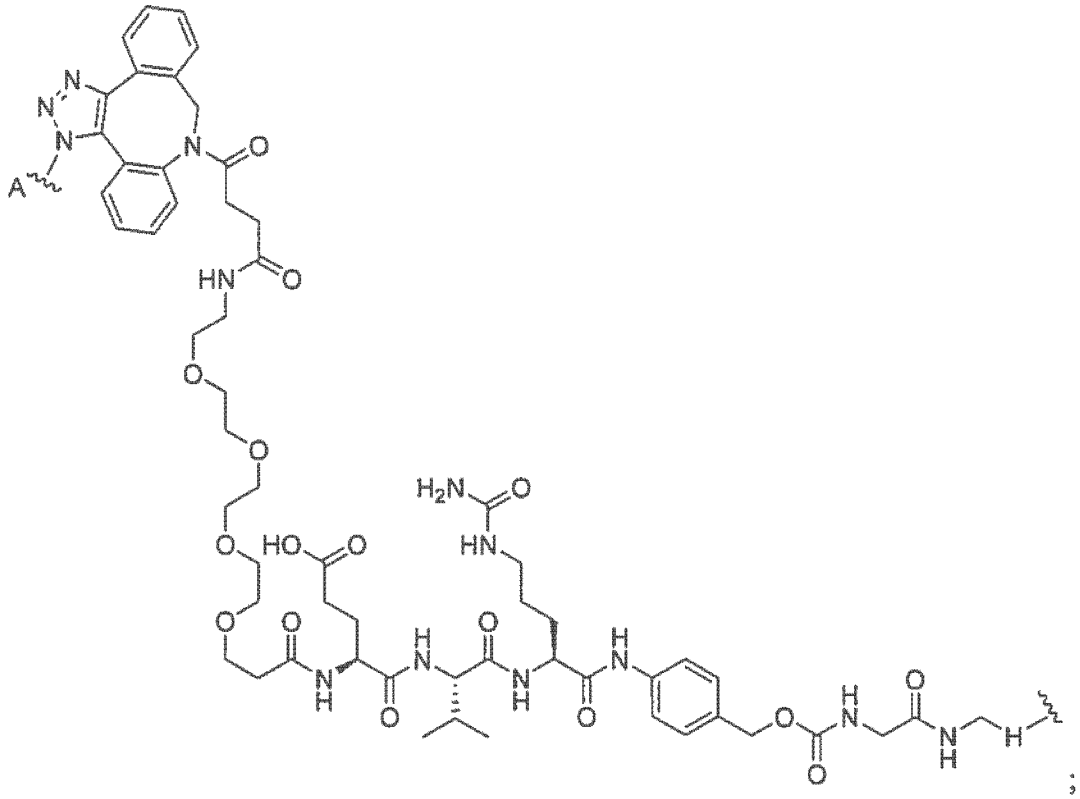
каждый A представляет собой –O–, –N(H)-,  ,  ,  или  , где ZZ представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте ZZ представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте ZZ представляет собой C_{1-6} гетероалкил. Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах реализации связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой гидрофильную группу. В некоторых вариантах осуществления усиливающий агент представляет собой циклодекстрин. В некоторых вариантах реализации усиливающая группа представляет собой алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновую кислоту. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалистам. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин, бета-циклодекстрин или гамма-циклодекстрин или их смеси. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин. В некоторых вариантах реализации циклодекстрин представляет собой гамма-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, или $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5 и **m2**

равно 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил- или алкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$. В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте реализации алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5.

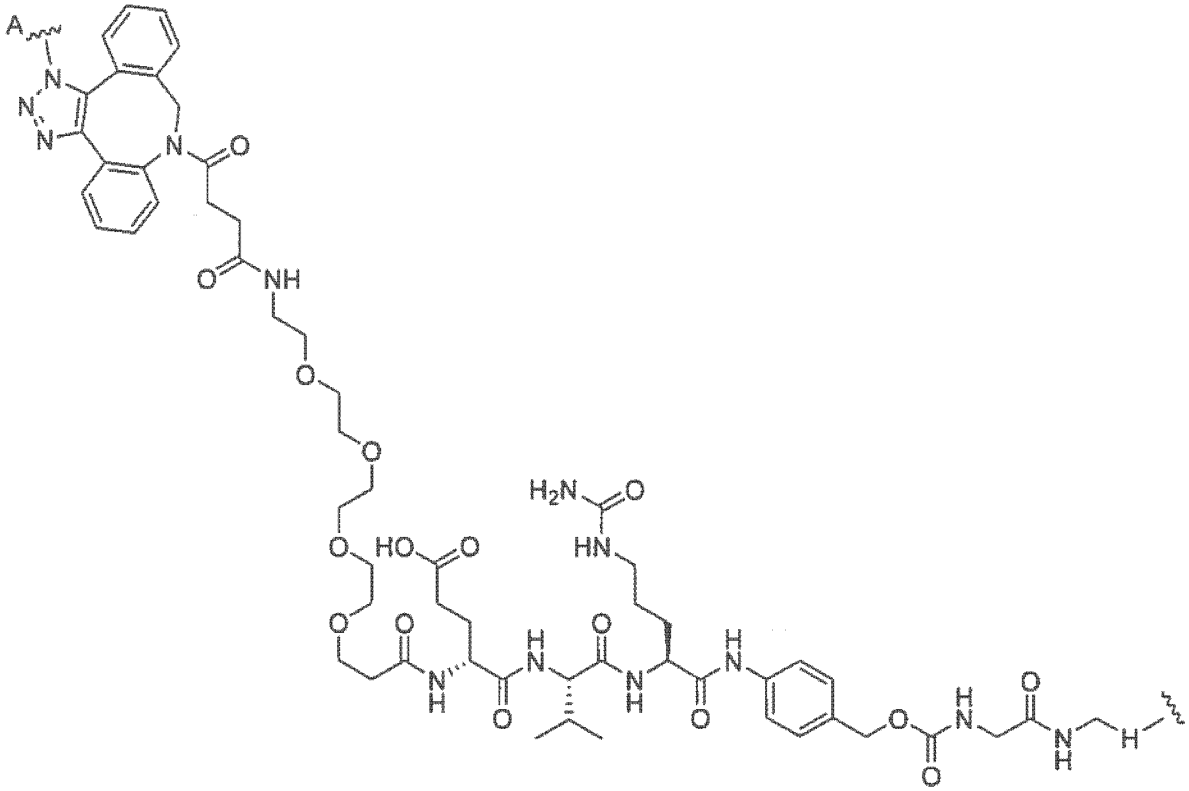
[00129] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:



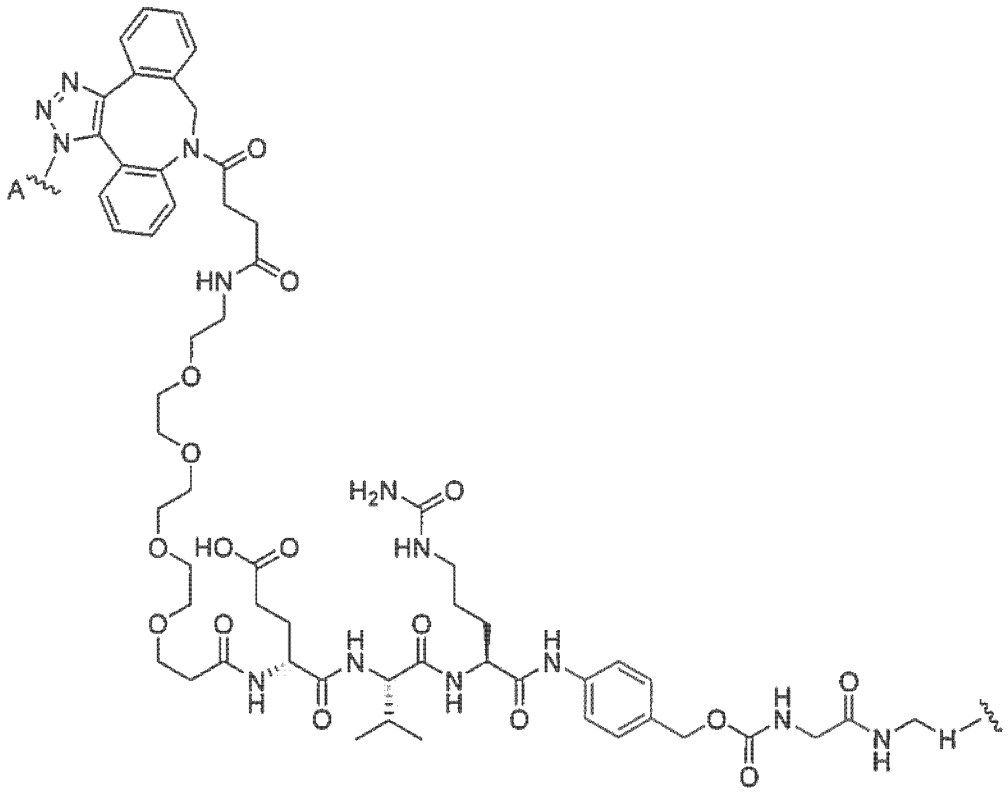
или



;



или

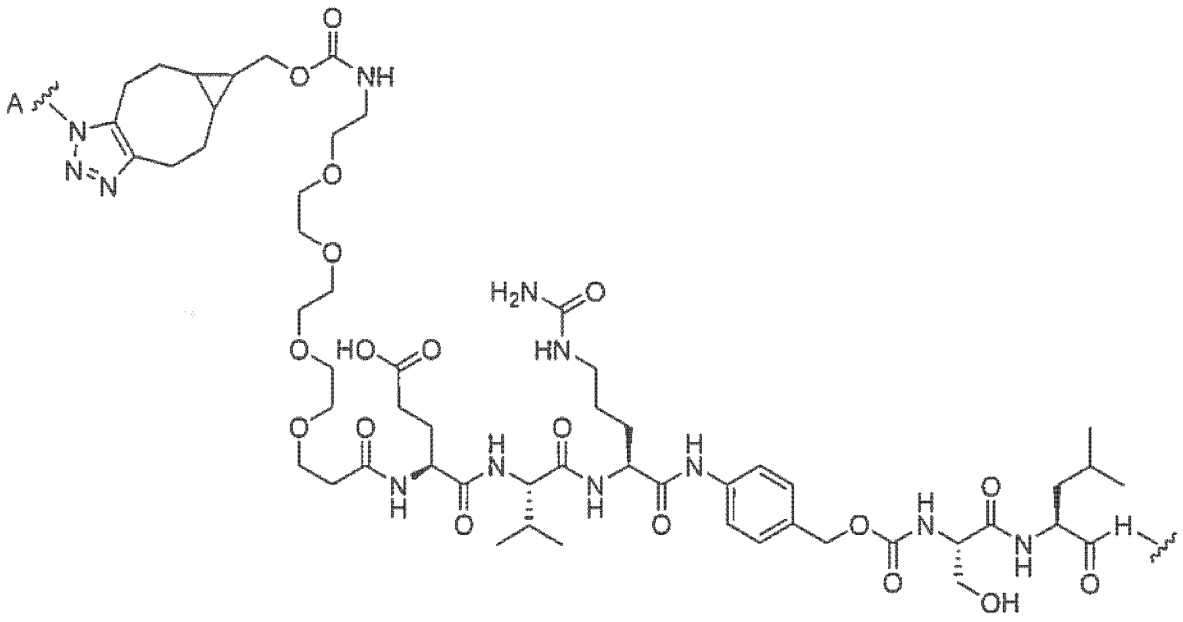


; или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или их смесь региоизомеров, где:

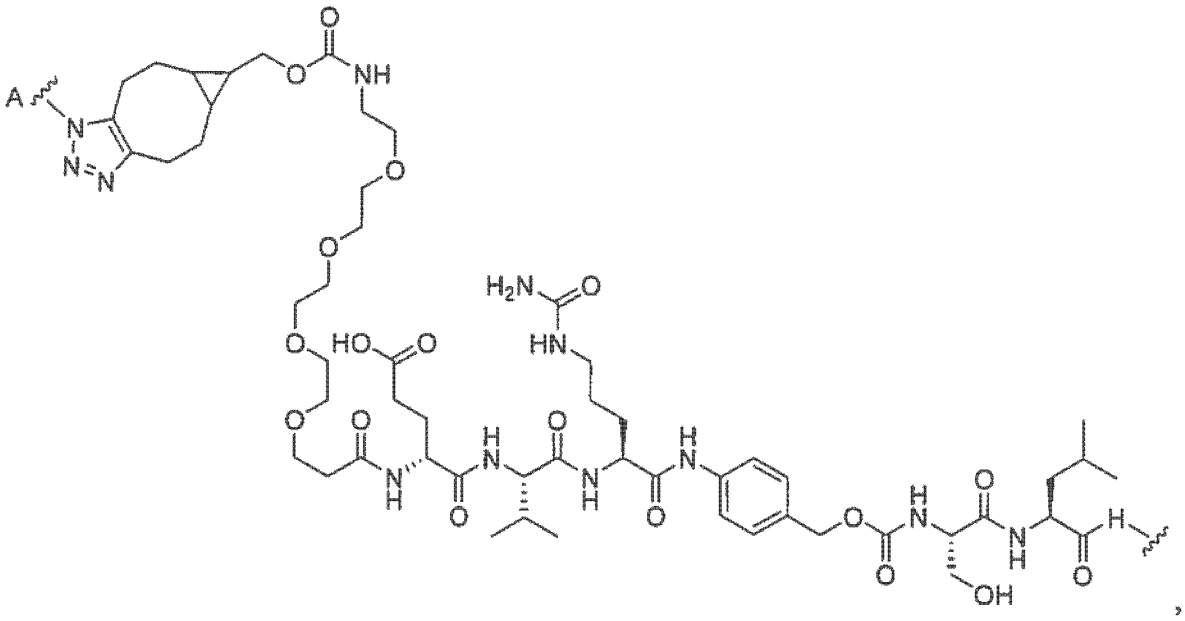
каждый  представляет собой связь со связующим агентом;

каждый  является связью с полезной нагрузкой; и **H** представляет собой –O– или –NH–.

[00130] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:



или

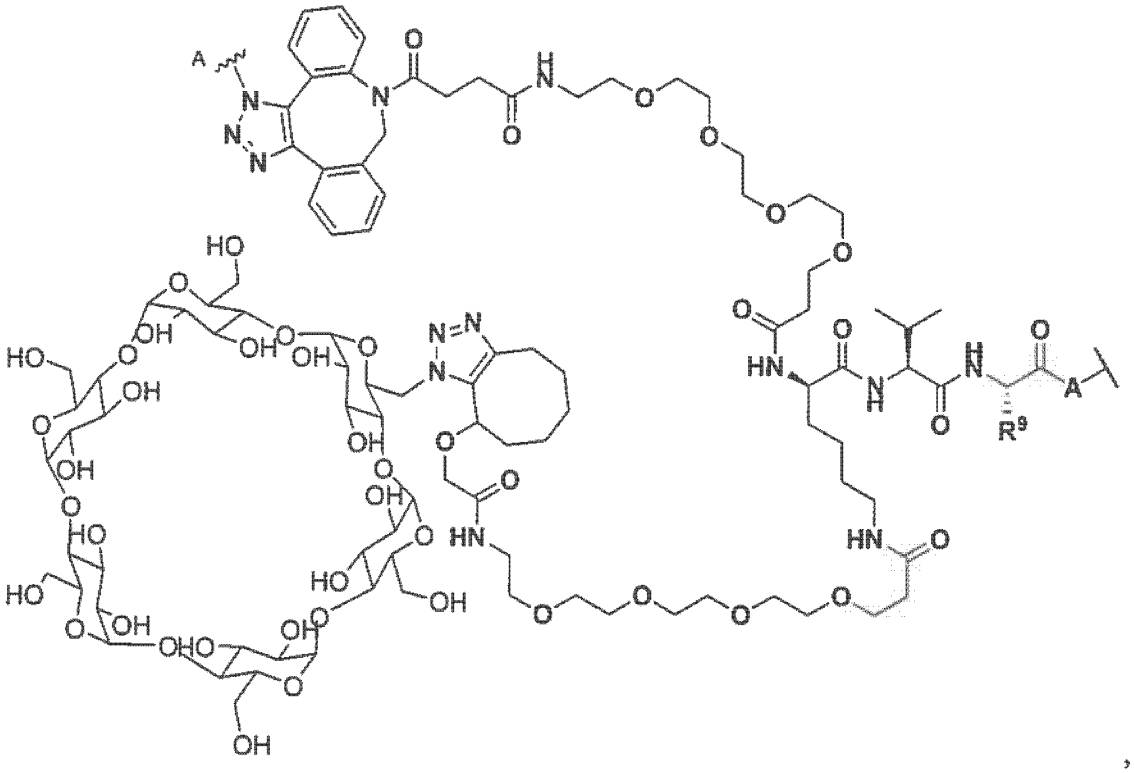


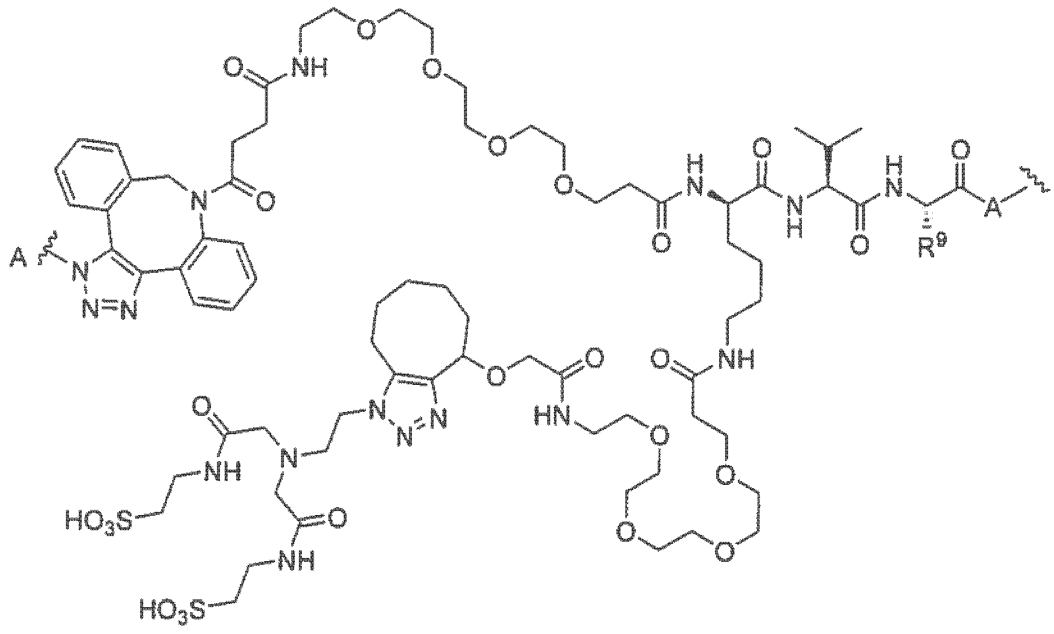
где:

каждый $-\overset{A}{\sim}-$ представляет собой связь со связующим агентом;

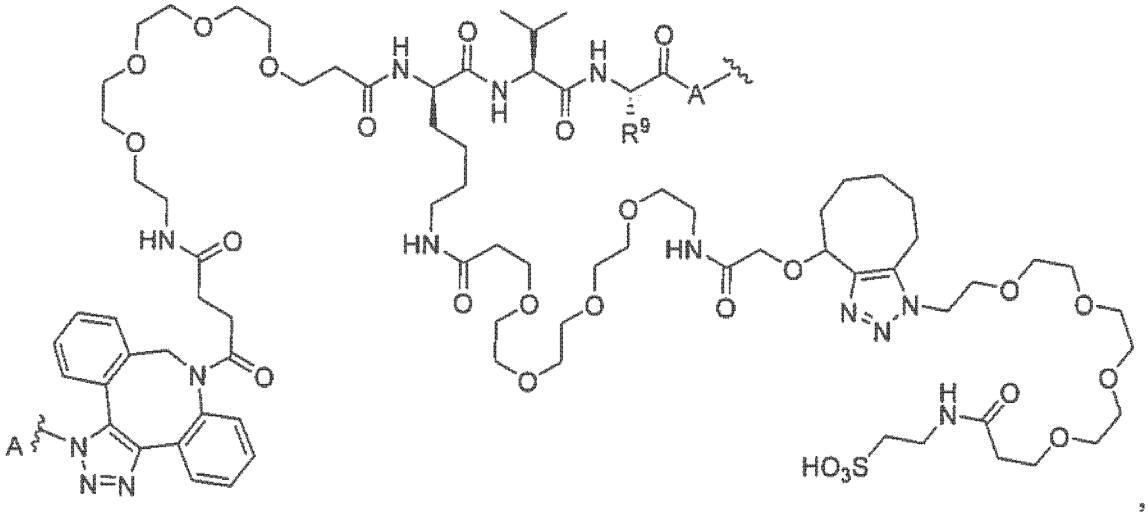
каждый $-\overset{}{\sim}-$ является связью с полезной нагрузкой; и **H** представляет собой –O– или –NH–.

[00131] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:





,



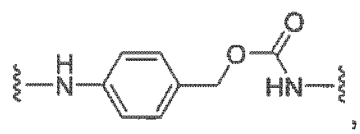
,

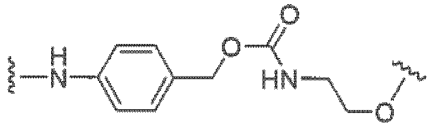
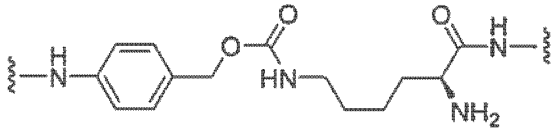
или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или их смесь региоизомеров, где:

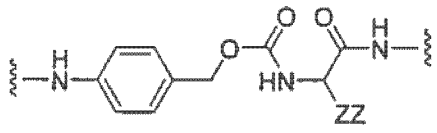
каждый  представляет собой связь со связующим агентом;

каждый  является связью с полезной нагрузкой;

R^9 представляет собой $–CH_3$ или $–(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

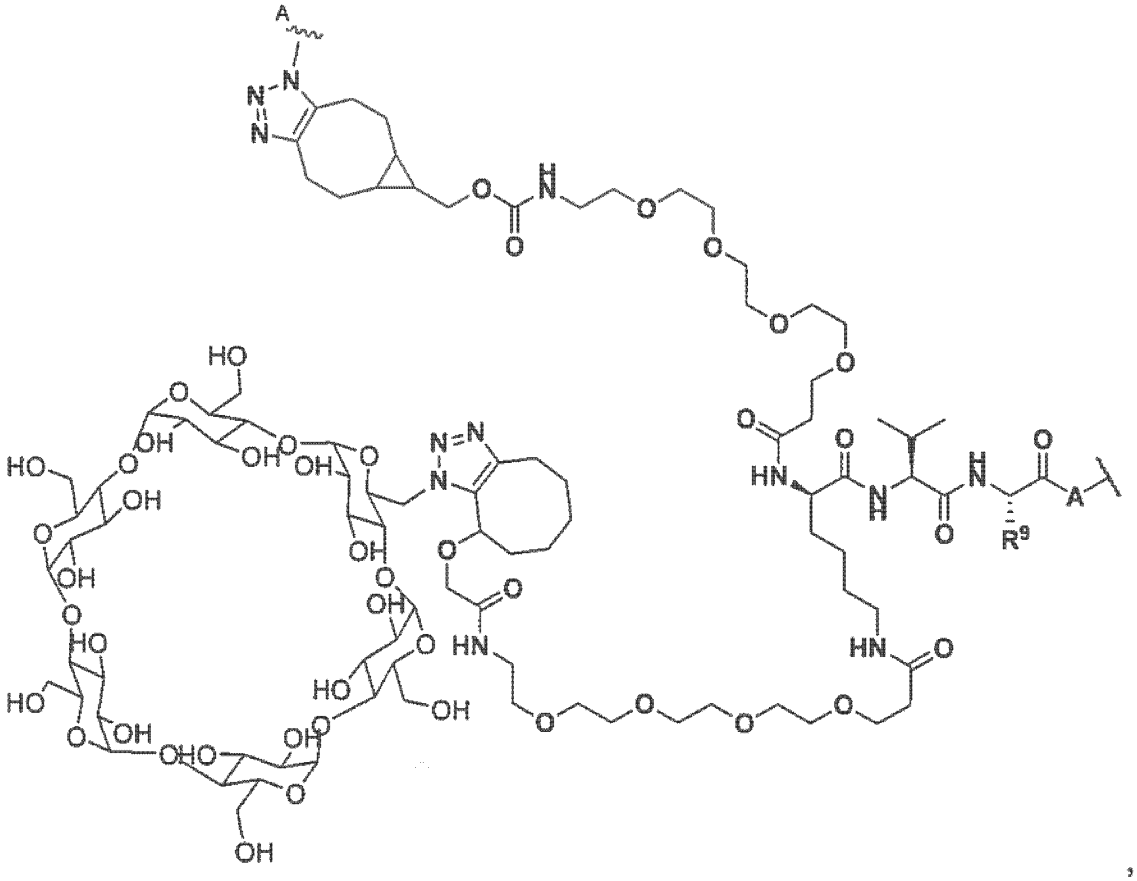
A представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

 ,  или

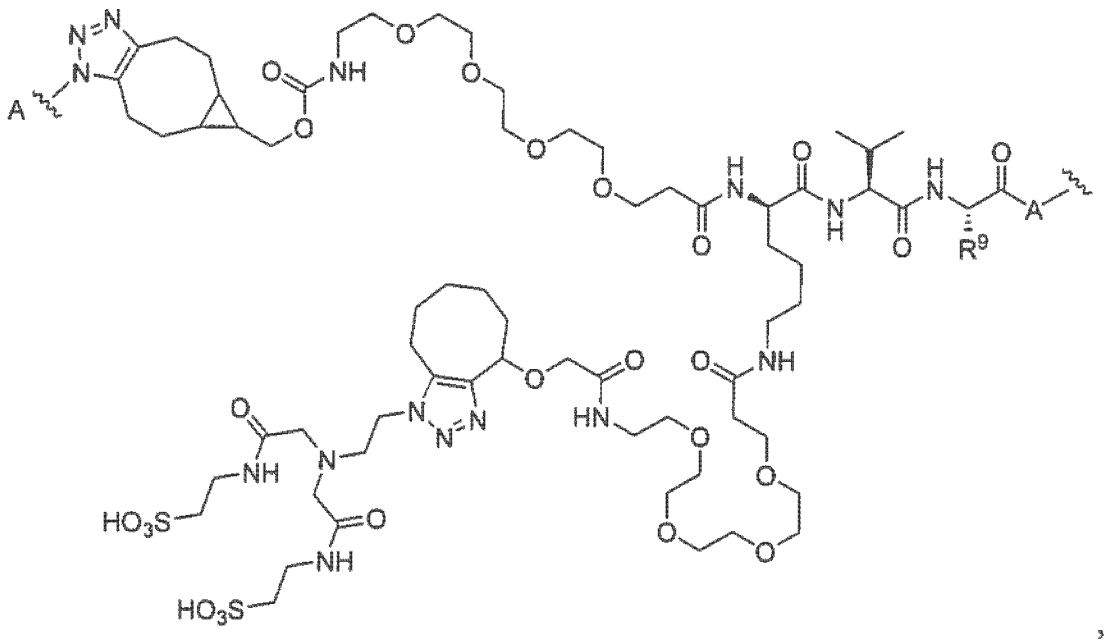


, где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил. Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах реализации связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина связывающего агента.

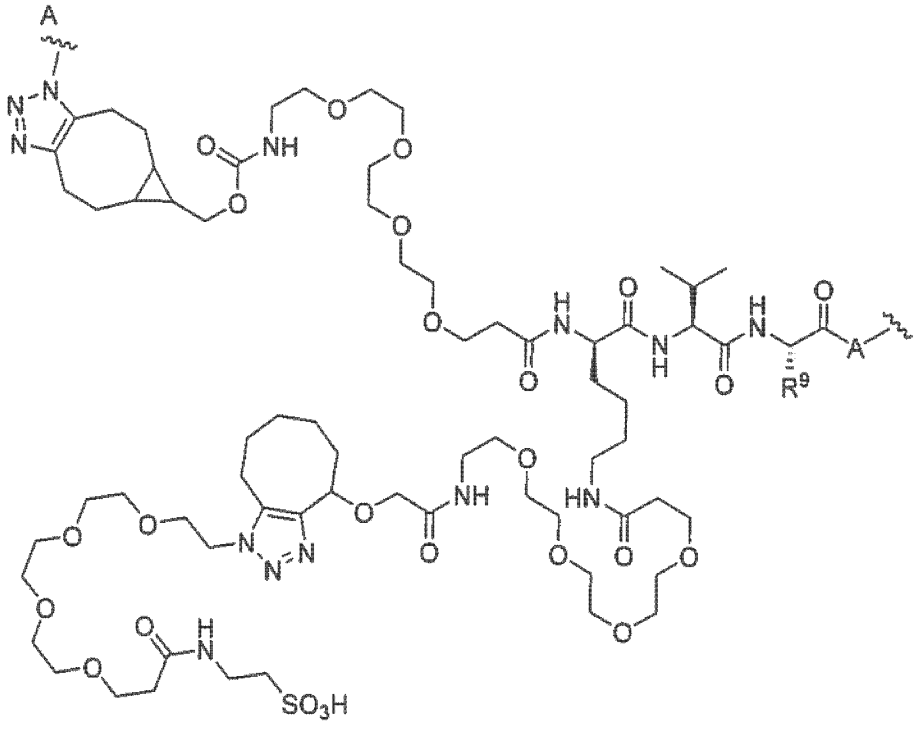
[00132] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:



,



,



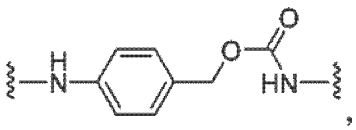
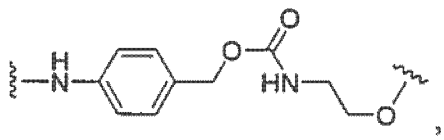
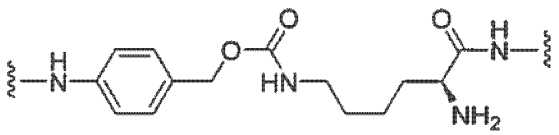
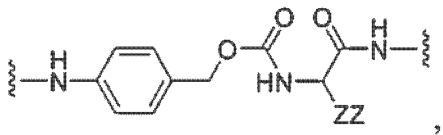
,

или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, или его региоизомер, или их смесь региоизомеров, где:

каждый  представляет собой связь со связующим агентом;

каждый  является связью с полезной нагрузкой;

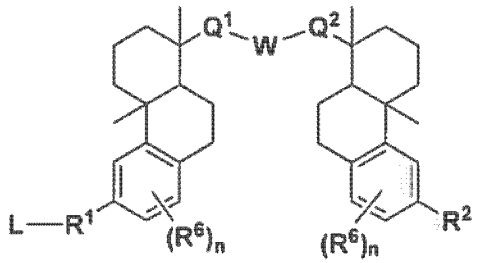
R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

A представляет собой –O–, –N(H)-,  ,  ,  или  , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил. Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах реализации связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина связывающего агента.

Линкер-полезная нагрузка или Реакционноспособный линкер-полезная нагрузка

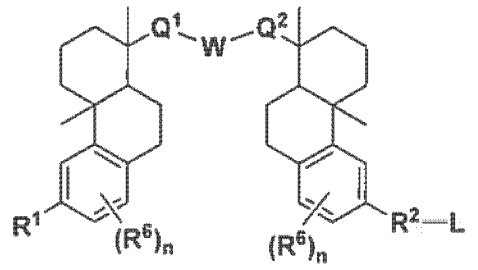
[00133] Предоставлены полезные нагрузки линкеров или реактивные полезные нагрузки линкеров, полученные из любого из соединений или полезных нагрузок (например, соединений или полезных нагрузок формул I, II или III), и линкеры, описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления, описанных ниже, конъюгаты, представленные в настоящем документе, могут быть получены из полезных нагрузок линкера или реактивных полезных нагрузок линкера, имеющих реактивные группы **RG**, как описано выше. Полезные нагрузки линкера или реактивные полезные нагрузки линкера могут быть связаны с группами улучшения и/или связывающими агентами согласно способам, описанным ниже.

[00134] В некоторых вариантах реализации линкер-полезная нагрузка включает любые конкретные полезные нагрузки, охватываемые любой одной или более из формул I, II или III, указанных выше, связанных с линкером (-ами), где линкер (-ы), описанный в данном документе, включает фрагмент, который является реакционноспособным со связывающим агентом, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и/или усиливающей группой, описанной в данном документе. В конкретных вариантах реализации линкер связан с R^1, R^2 или R^6 или двухвалентными формами R^1, R^2 или R^6, как в любой одной или нескольких формулах I, II или III полезной нагрузки, приведенных выше. В одном варианте осуществления полезная нагрузка линкера имеет структуру формулы **LPa**:



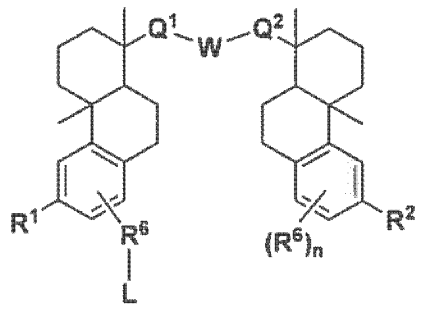
(LPa)

где L представляет собой линкер, как описано выше, и Q^1, Q^2, W, $–R^1–$, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I выше. В одном варианте осуществления полезная нагрузка линкера имеет структуру формулы LPb:



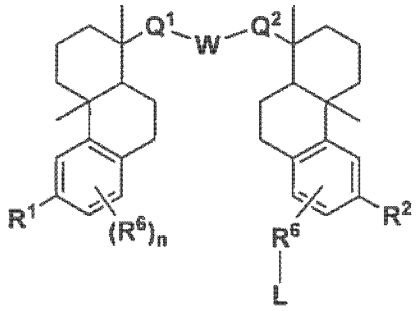
(LPb)

где L представляет собой линкер, как описано выше, и Q^1, Q^2, W, R^1, $–R^2–$, R^4, R^5, и R^6 имеют значения, описанные в контексте Формулы I выше. В одном варианте осуществления полезная нагрузка линкера имеет структуру формулы LPc:



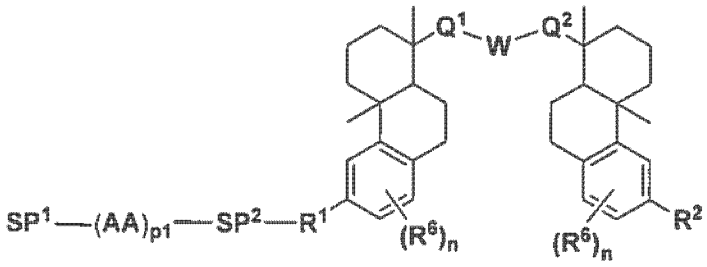
(LPc)

где L представляет собой линкер, как описано выше, и Q^1, Q^2, W, R^1, R^2, R^4, R^5, и $–R^6–$ такие, как описано в контексте Формулы I выше. В одном варианте осуществления полезная нагрузка линкера имеет структуру формулы LPd:



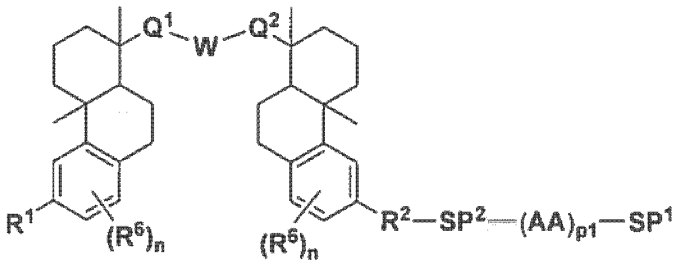
(LPd)

где L представляет собой линкер, как описано выше, и Q^1, Q^2, W, R^1, R^2, R^4, R^5, и $–R^6–$ такие, как описано в контексте формулы I выше. В одном варианте осуществления полезная нагрузка линкера имеет структуру формулы LPa':



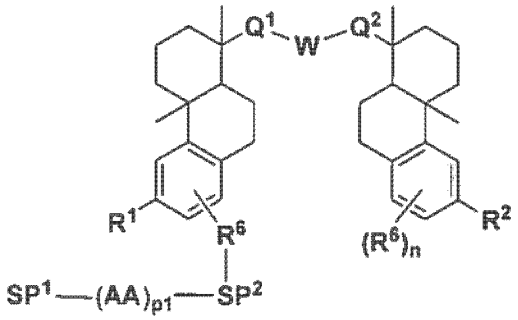
(LPa')

где SP^1 и SP^2 представляют собой спейсеры, как описано выше, каждый AA представляет собой аминокислотный остаток, как описано выше, Q^1, Q^2, W, $–R^1–$, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I, и p1 представляет собой целое число от 1 до 10. В одном варианте осуществления полезная нагрузка линкера имеет структуру формулы LPb':



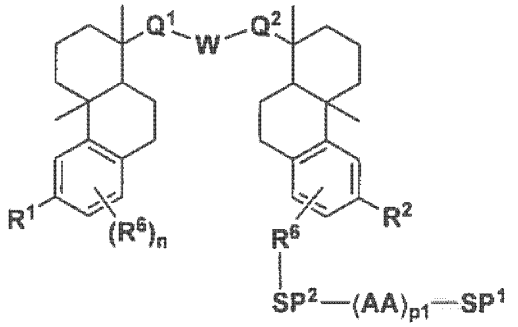
(LPb')

где SP^1 и SP^2 представляют собой спейсеры, как описано выше, каждый AA представляет собой аминокислотный остаток, как описано выше, Q^1, Q^2, W, R^1, $–R^2–$, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I, и p1 представляет собой целое число от 1 до 10. В одном варианте осуществления полезная нагрузка линкера имеет структуру формулы LPc':



(LPc')

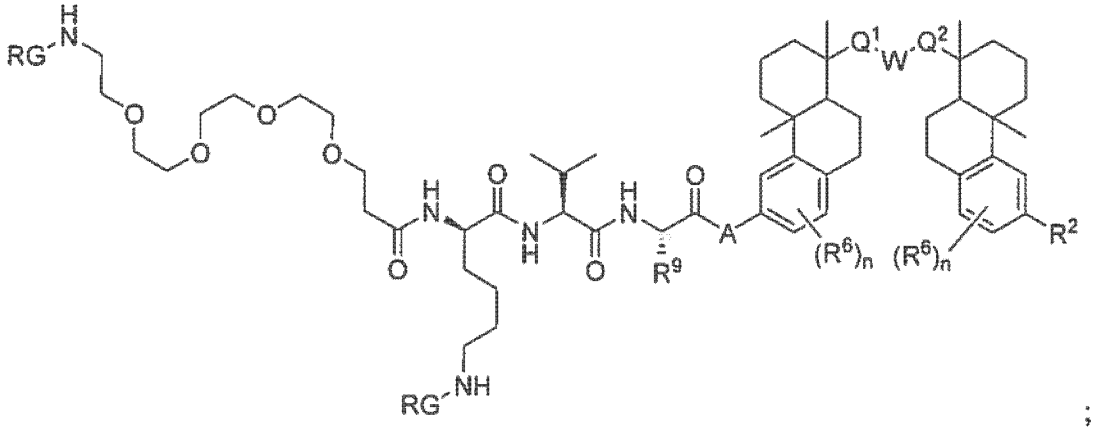
где SP^1 и SP^2 представляют собой спейсеры, как описано выше, каждый **AA** представляет собой аминокислотный остаток, как описано выше, Q^1, Q^2, **W**, R^1, R^2, R^4, R^5 и $-R^6-$ имеют значения, описанные в контексте формулы I, и **p1** - целое число от 1 до 10. В одном варианте осуществления полезная нагрузка линкера имеет структуру формулы **LPd'**:



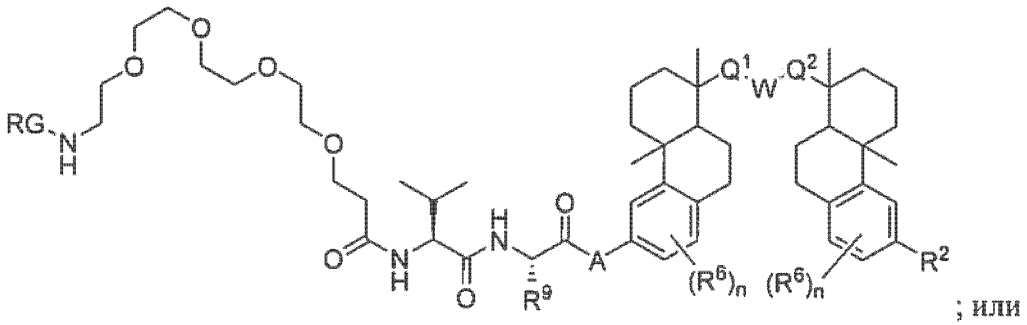
(LPd')

где SP^1 и SP^2 представляют собой спейсеры, как описано выше, каждый **AA** представляет собой аминокислотный остаток, как описано выше, Q^1, Q^2, **W**, R^1, R^2, R^4, R^5 и $-R^6-$ имеют значения, описанные в контексте формулы I, и **p1** представляет собой целое число от 1 до 10. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **p1** равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце линкер **L** или спейсер SP^2 связан с арильным азотом или аминокислотным остатком отдельно или внутри пептида. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^4 независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент, алкил, замещенный алкил, ацил или замещенный ацил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^4 независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент или алкил.

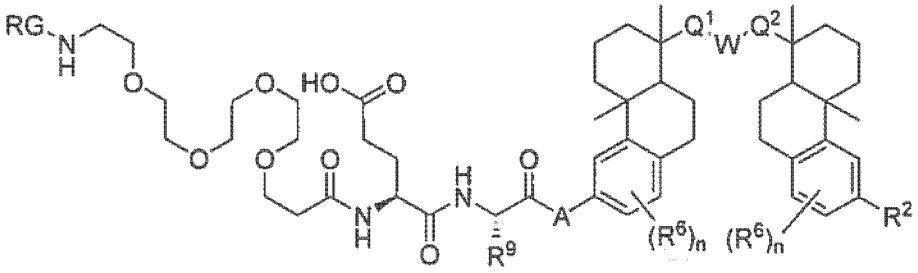
[00135] В некоторых вариантах осуществления линкер-полезная нагрузка или реакционноспособный линкер-полезная нагрузка:



;



; или

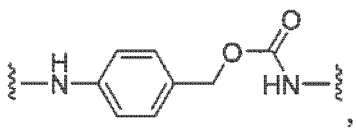


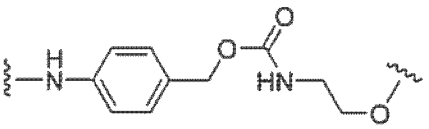
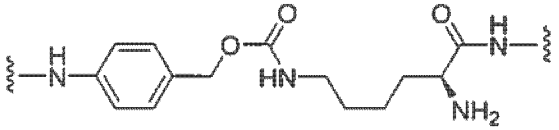
или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где:

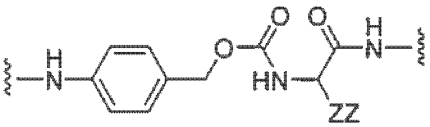
каждый **RG** представляет собой реакционноспособную группу, как описано здесь;

Q^1, **Q^2**, **W**, **R^1**, **R^2**, **R^4**, **R^5** и **R^6** имеют значения, описанные в контексте формулы I;

каждый **R^9** представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

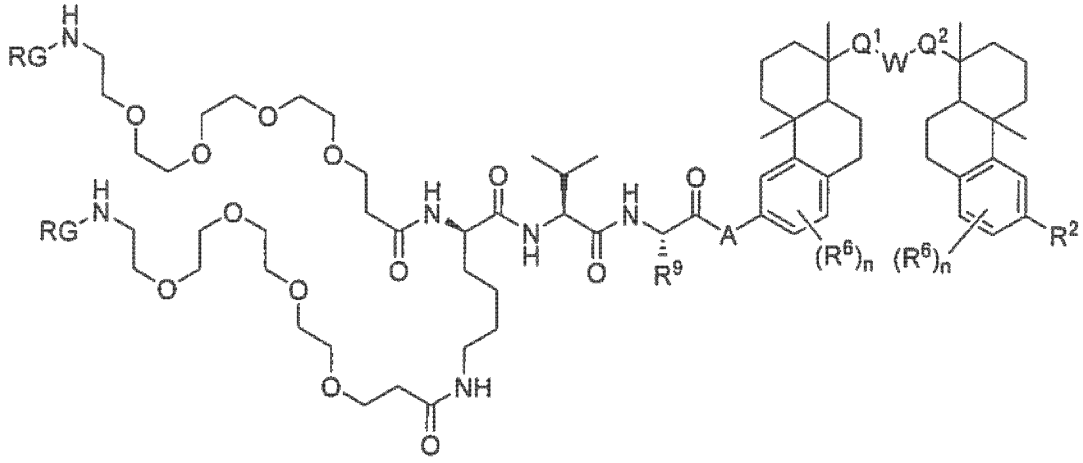
каждый **A** представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

 ,  или

 , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в

одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил.

[00136] В некоторых вариантах осуществления линкер-полезная нагрузка или реакционноспособный линкер-полезная нагрузка:

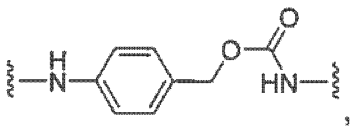
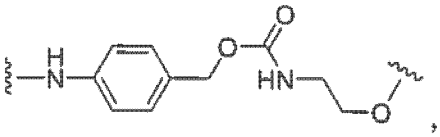
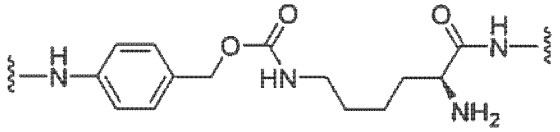
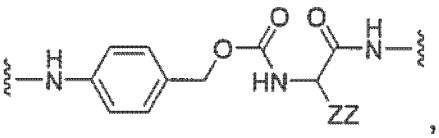


или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где:

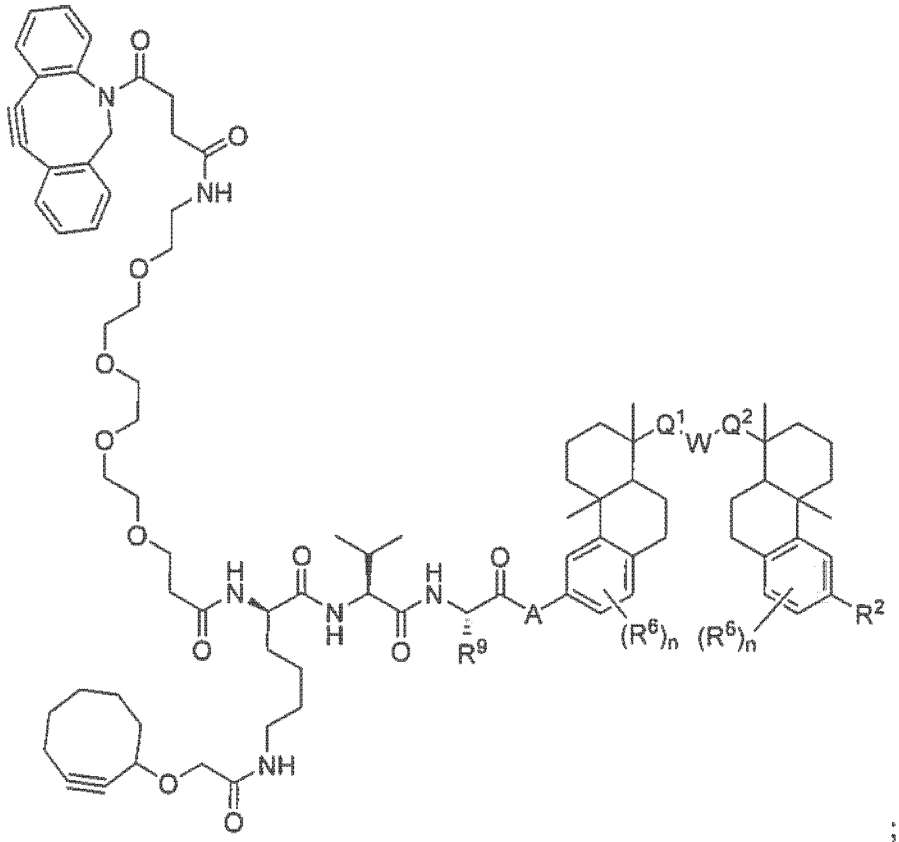
каждый **RG** представляет собой реакционноспособную группу, как описано здесь;

Q^1, Q^2, **W**, R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I;

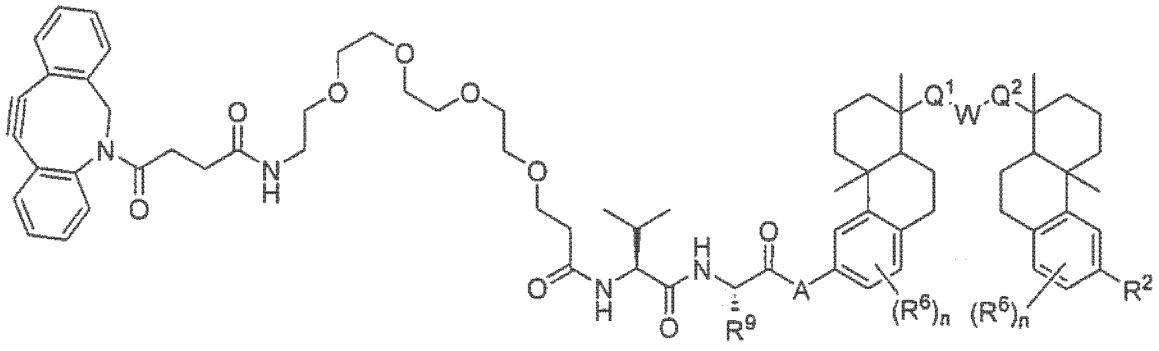
каждый R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждый **A** представляет собой –O–, –N(H)-,  ,  ,  или  , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил.

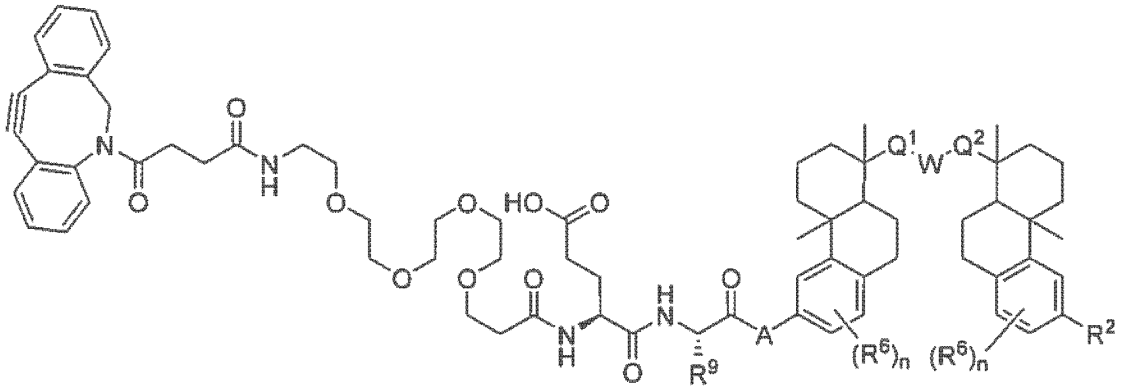
[00137] В некоторых вариантах осуществления линкер-полезная нагрузка или реакционноспособный линкер-полезная нагрузка:



;



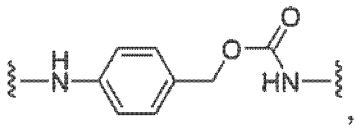
; или

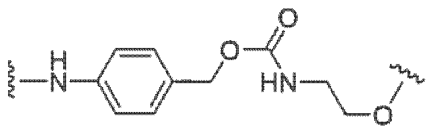
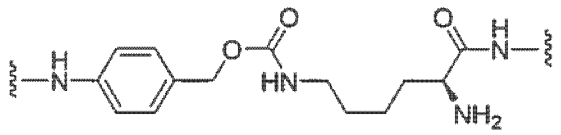


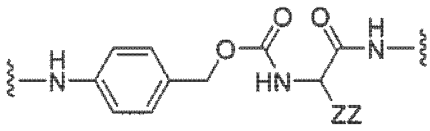
или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где:

Q^1, Q^2, W, R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I;

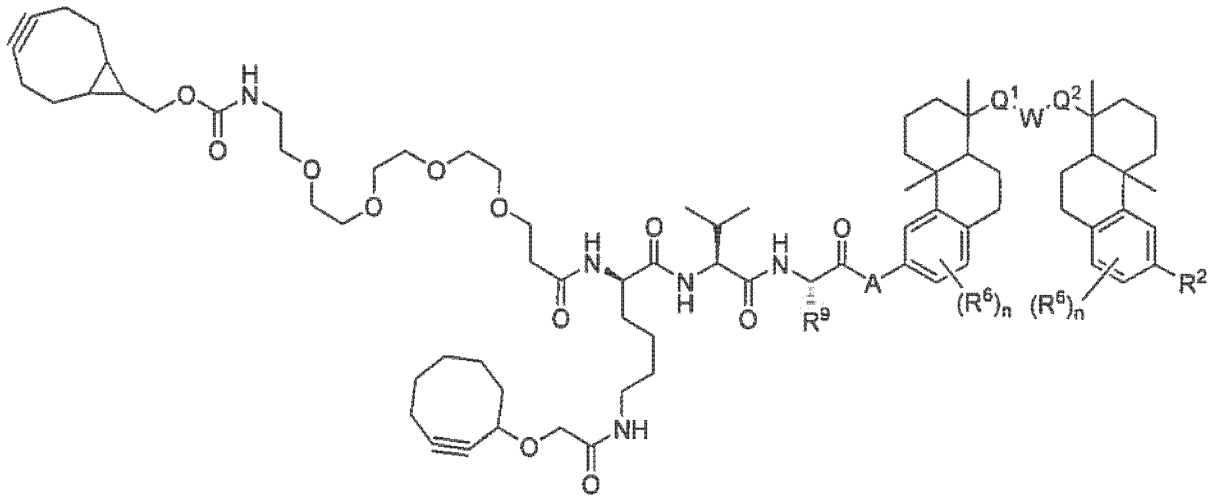
каждый R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

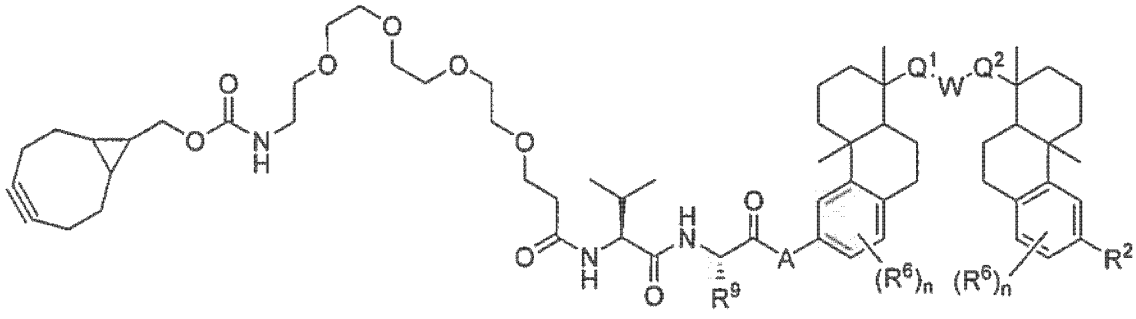
каждый **A** представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

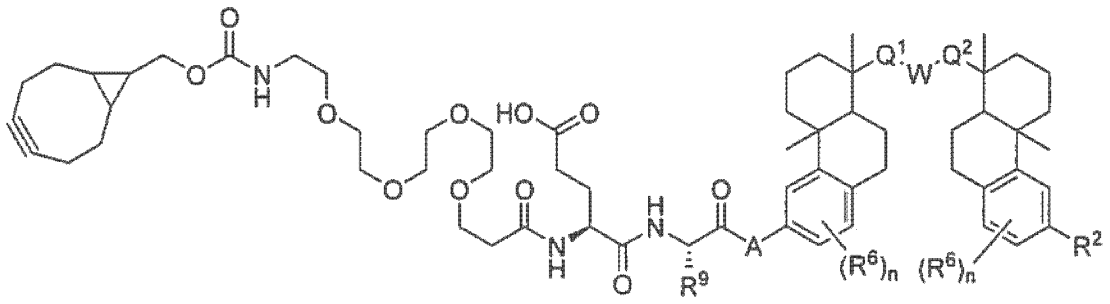
 ,  или

 , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил.

[00138] В некоторых вариантах осуществления линкер-полезная нагрузка или реакционноспособный линкер-полезная нагрузка:

 ;

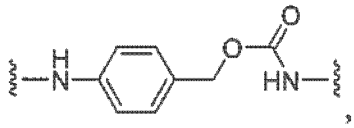
 ; или

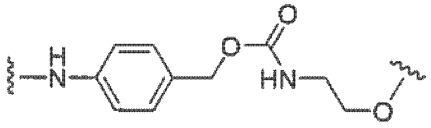
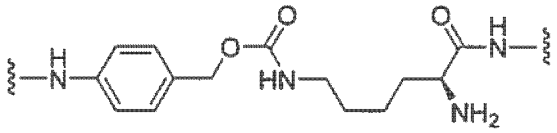


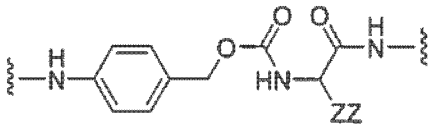
или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где:

Q^1, Q^2, W, R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I;

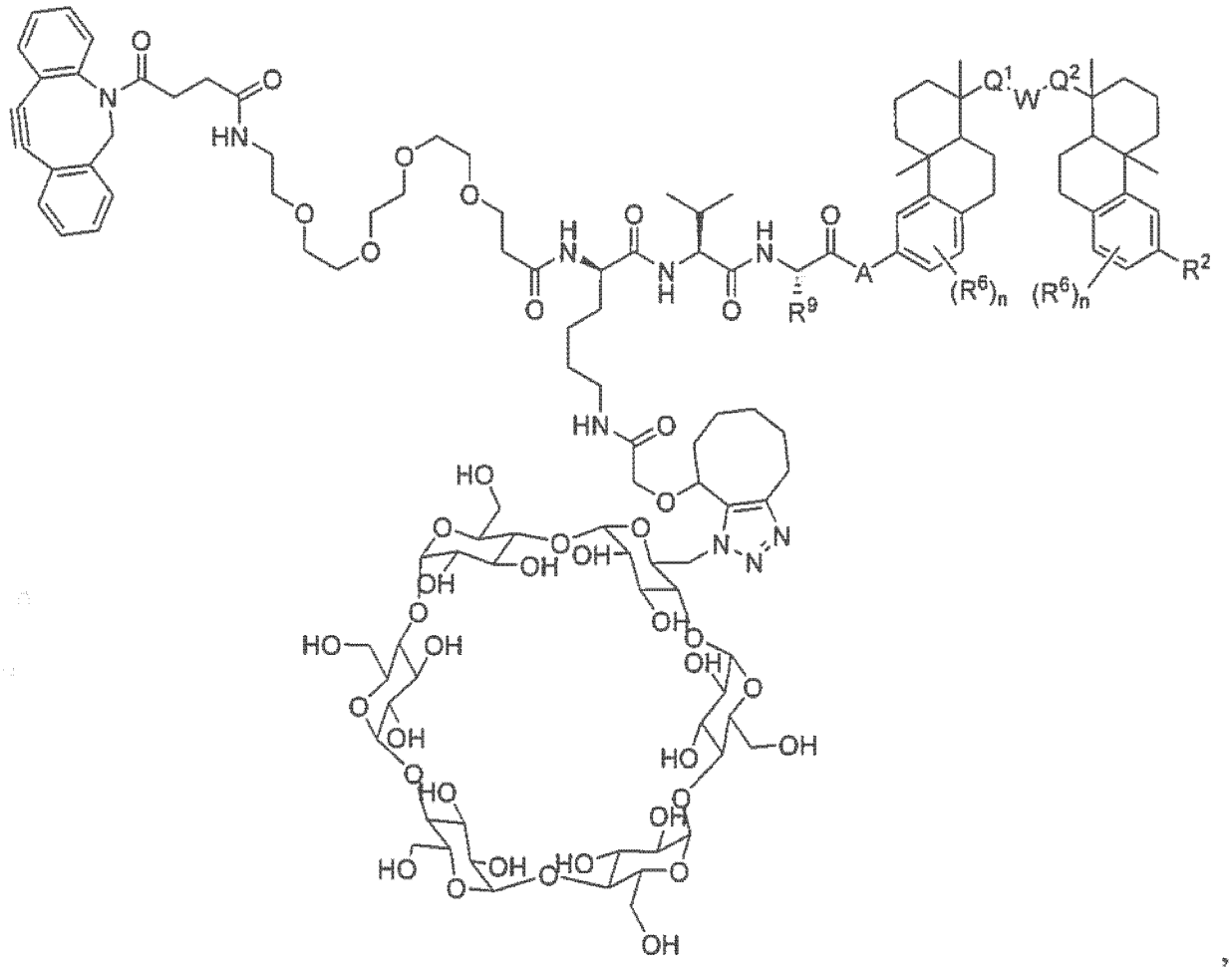
каждый R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждый A представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

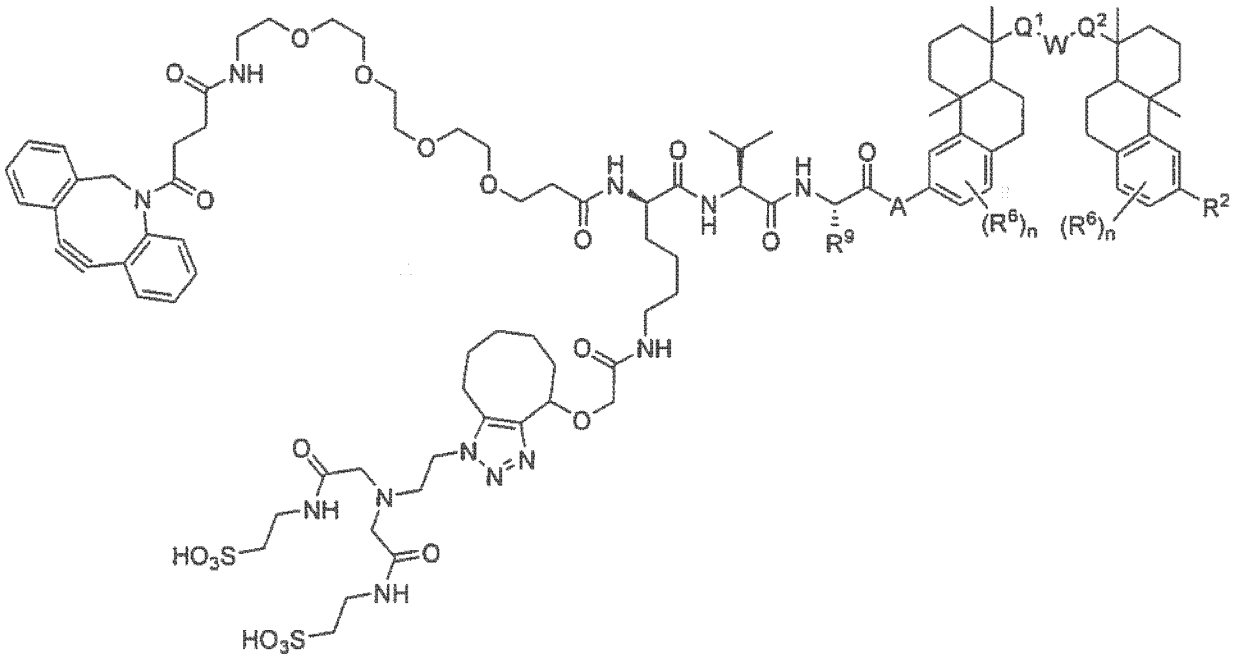
 ,  или

 , где ZZ представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте ZZ представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте ZZ представляет собой C_{1-6} гетероалкил.

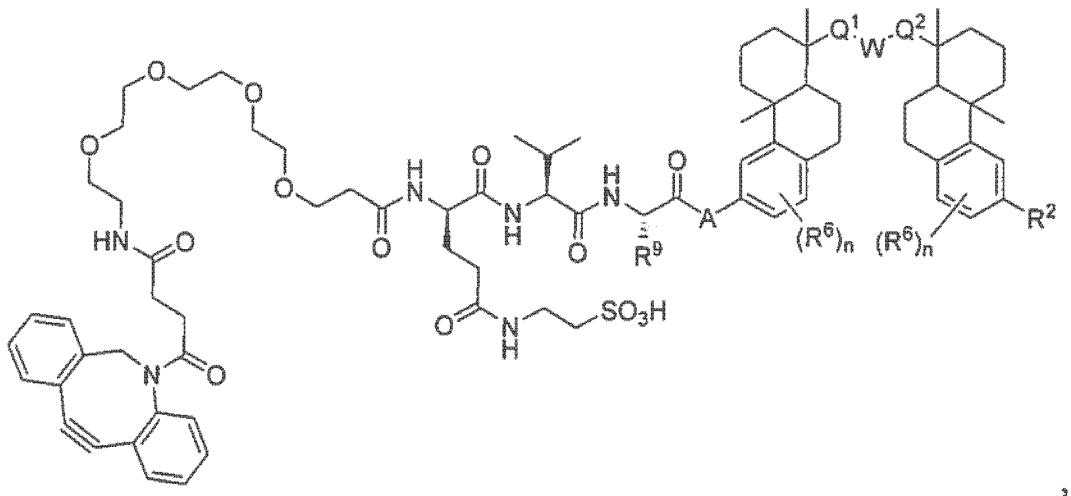
[00139] В некоторых вариантах осуществления реакционноспособный линкер-полезная нагрузка представляет собой:



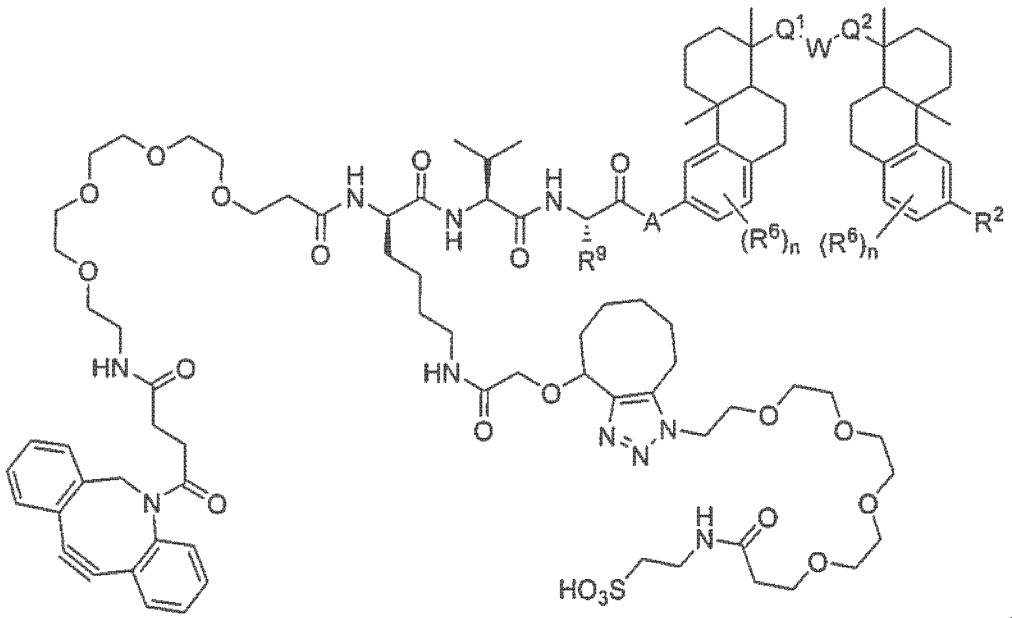
,



,



,

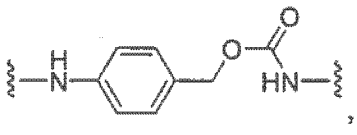


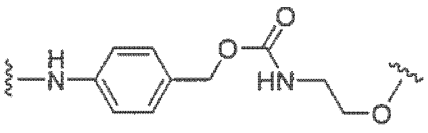
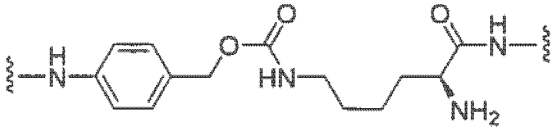
,

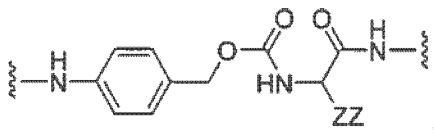
или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где:

Q^1, **Q^2**, **W**, **R^1**, **R^2**, **R^4**, **R^5** и **R^6** имеют такие значения, как описано в контексте формулы I;

каждый **R^9** представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

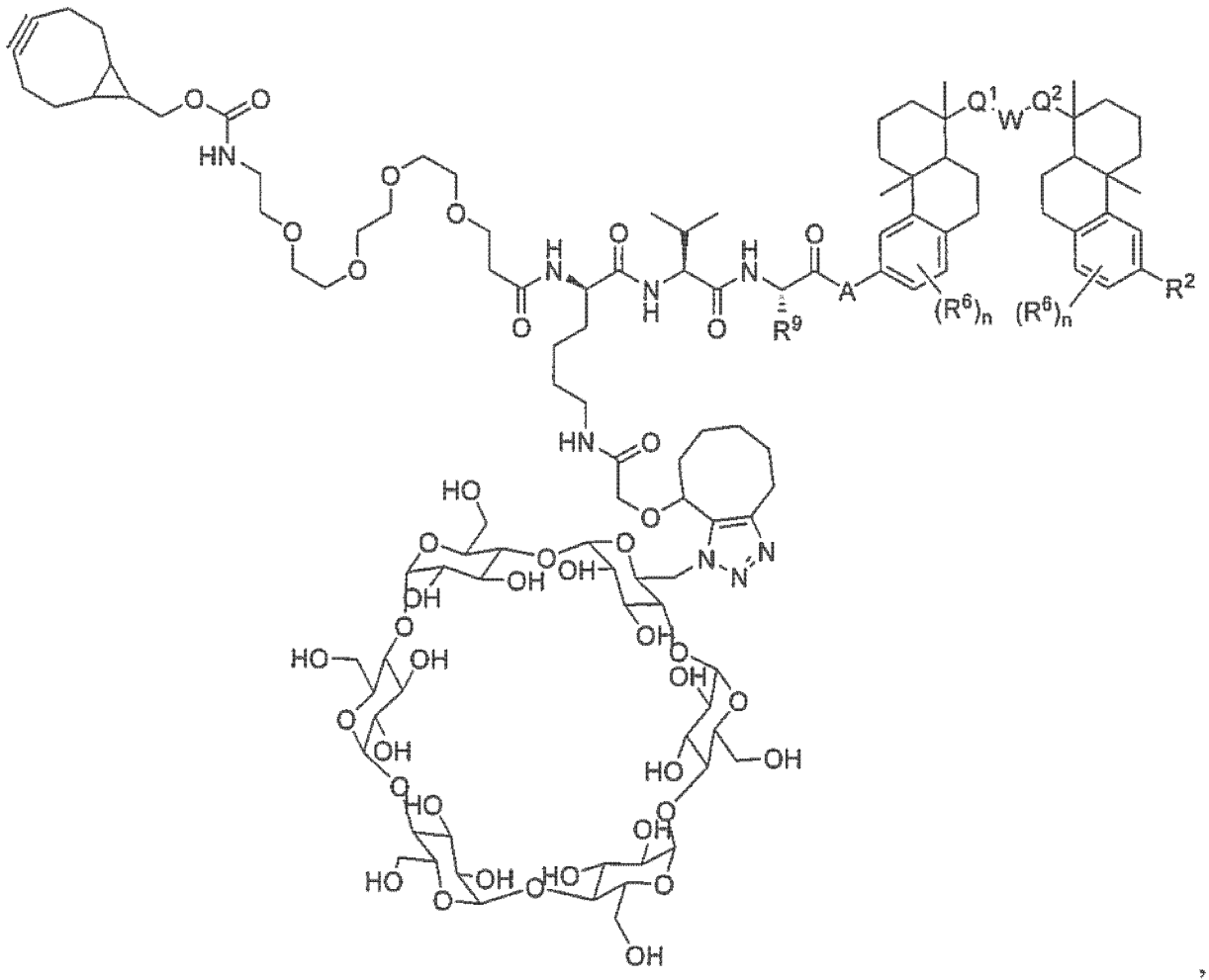
каждый **A** представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

 ,  или

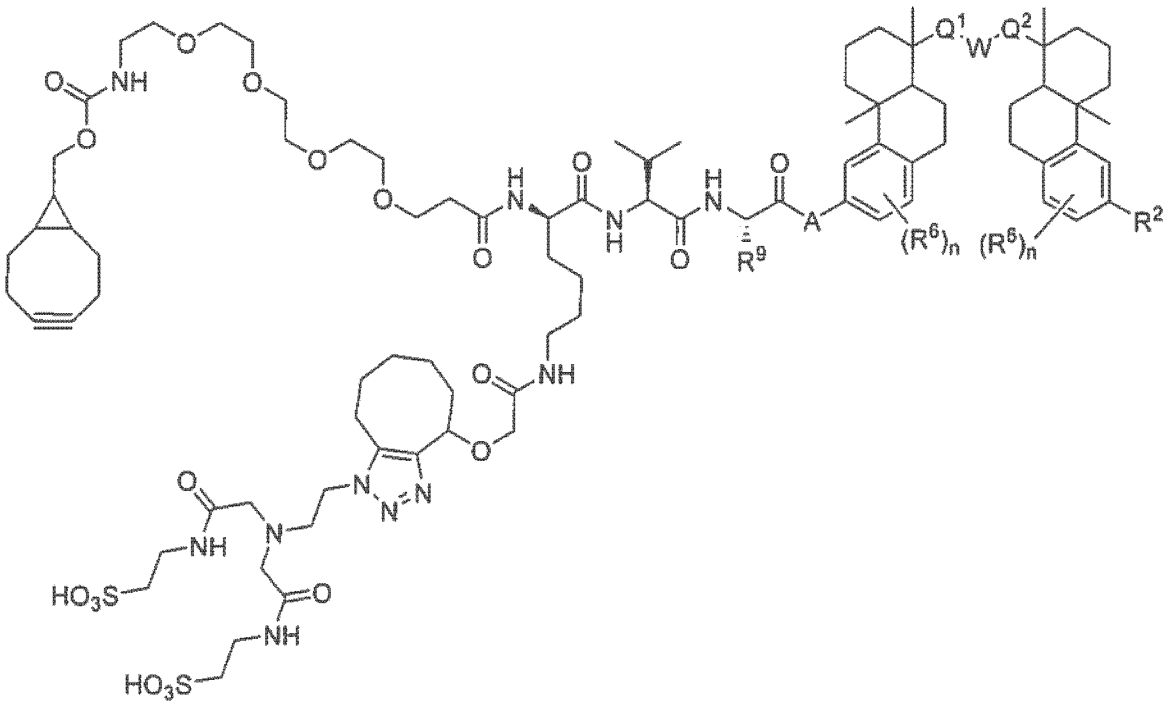


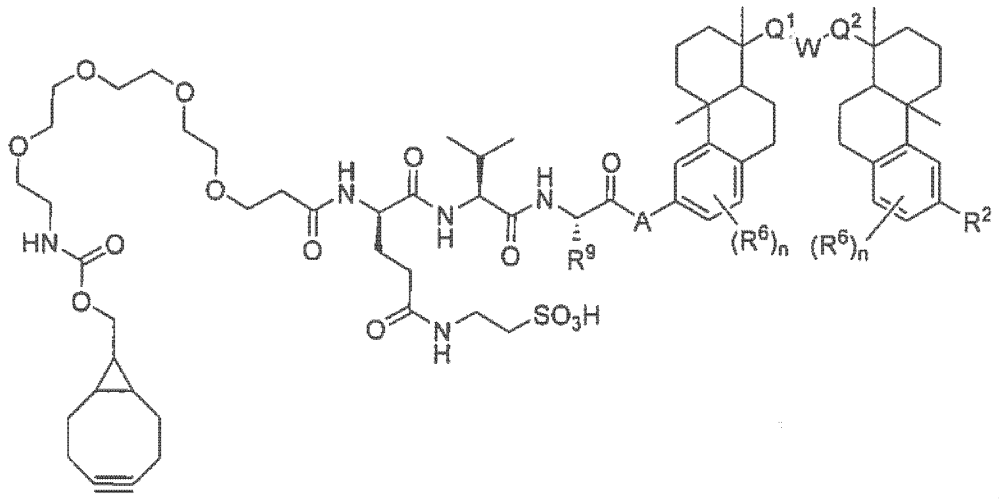
, где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил.

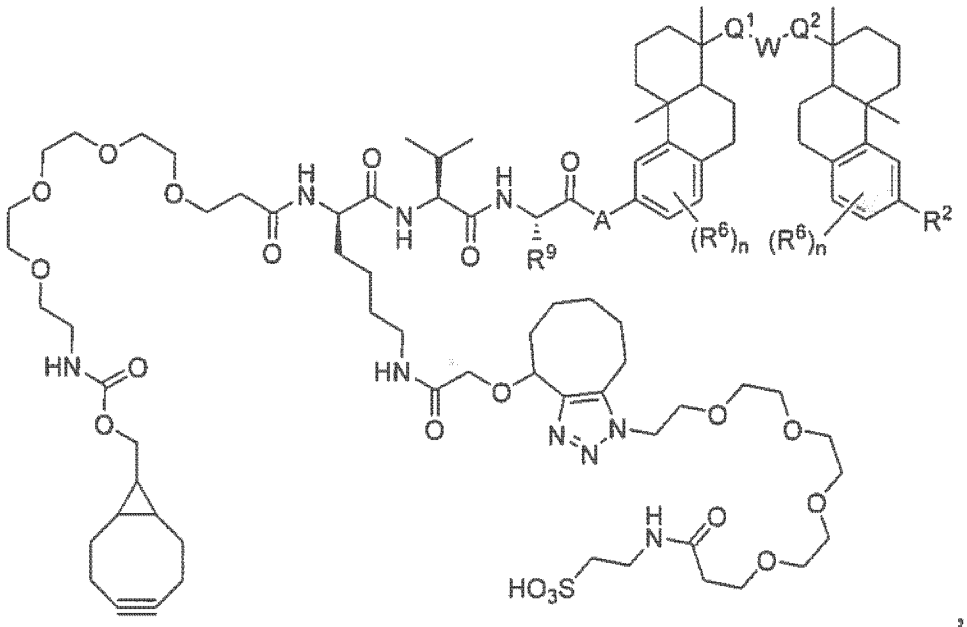
[00140] В некоторых вариантах осуществления реакционноспособный линкер-полезная нагрузка представляет собой:



,



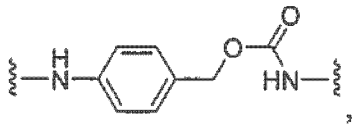
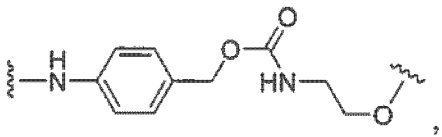
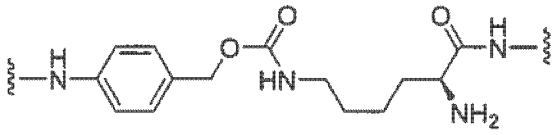
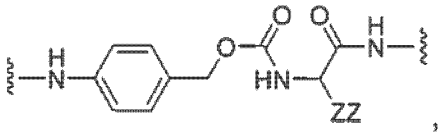




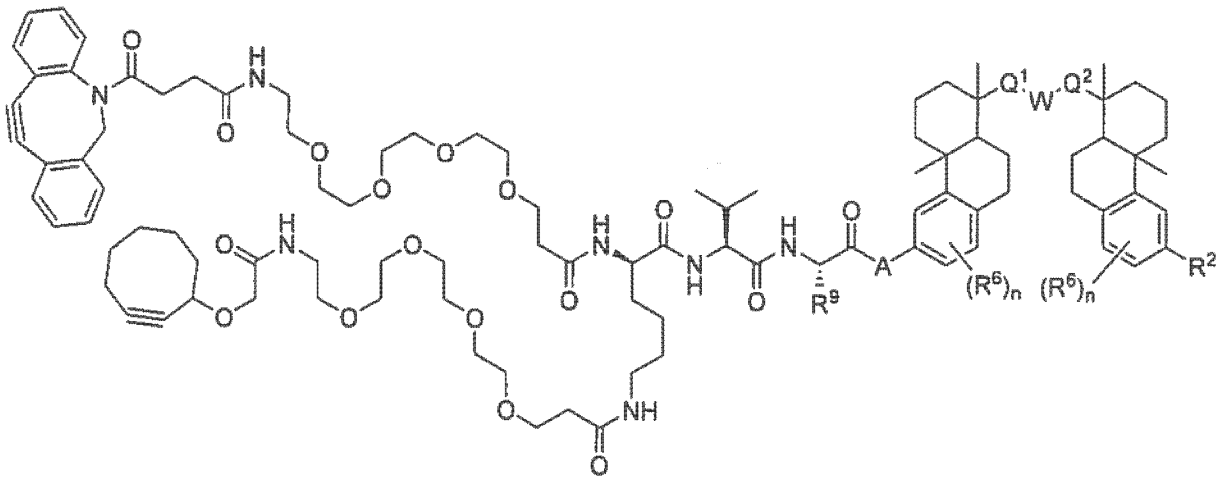
или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где:

Q^1, Q^2, W, R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I;

каждый R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждый A представляет собой –O–, –N(H)-,  ,  ,  или  , где ZZ представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте ZZ представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте ZZ представляет собой C_{1-6} гетероалкил.

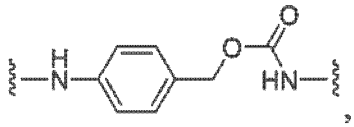
[00141] В некоторых вариантах осуществления линкер-полезная нагрузка или реакционноспособный линкер-полезная нагрузка:

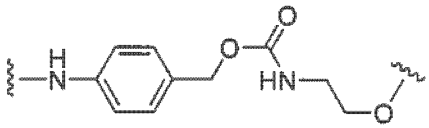
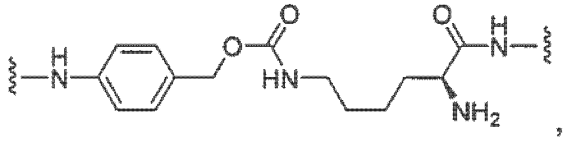


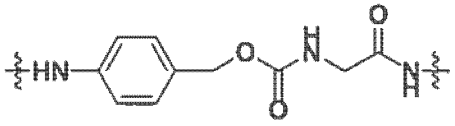
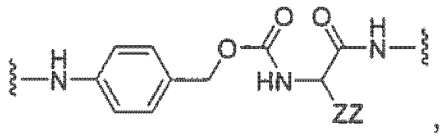
или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где:

Q^1, Q^2, W, R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I;

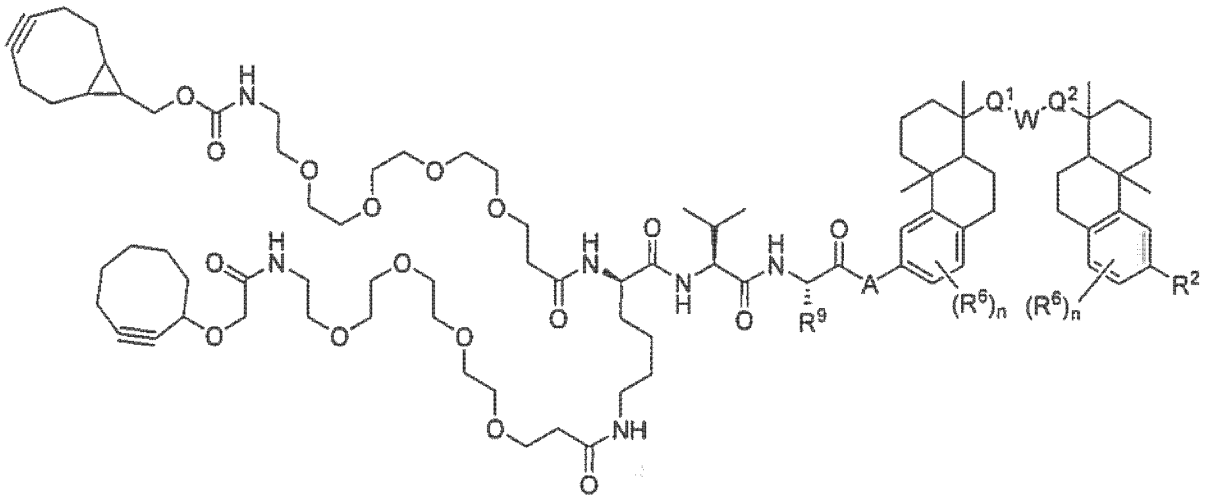
каждый R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждый **A** представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

 ,  ,

 или  , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил.

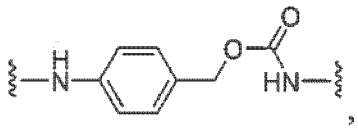
[00142] В некоторых вариантах осуществления линкер-полезная нагрузка или реакционноспособный линкер-полезная нагрузка:

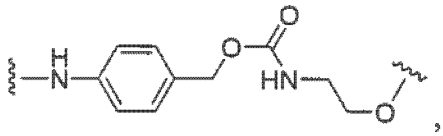
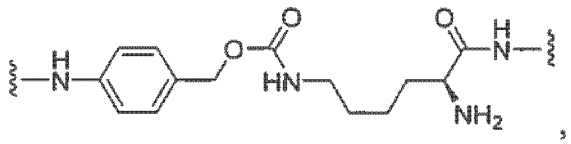


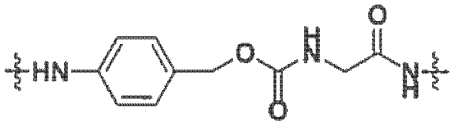
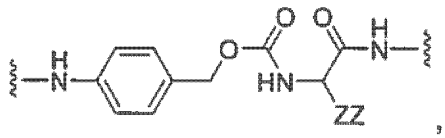
или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где:

$\mathbf{Q^1}$, $\mathbf{Q^2}$, **W**, $\mathbf{R^1}$, $\mathbf{R^2}$, $\mathbf{R^4}$, $\mathbf{R^5}$ и $\mathbf{R^6}$ имеют значения, описанные в контексте формулы I;

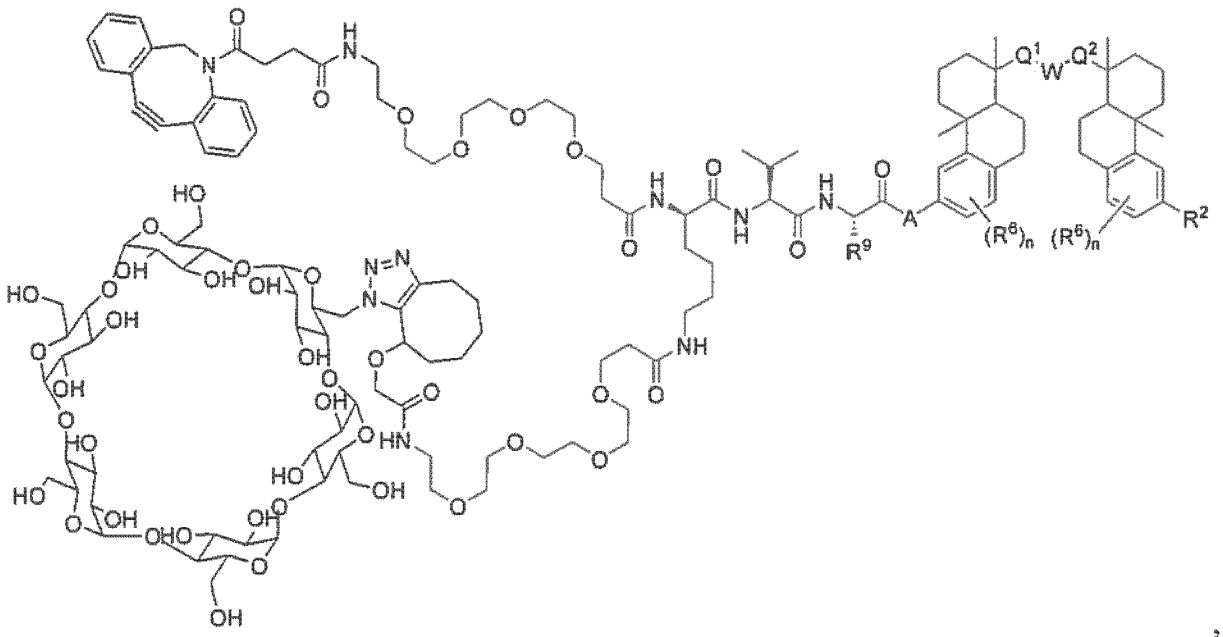
каждый $\mathbf{R^9}$ представляет собой $–CH_3$ или $–(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

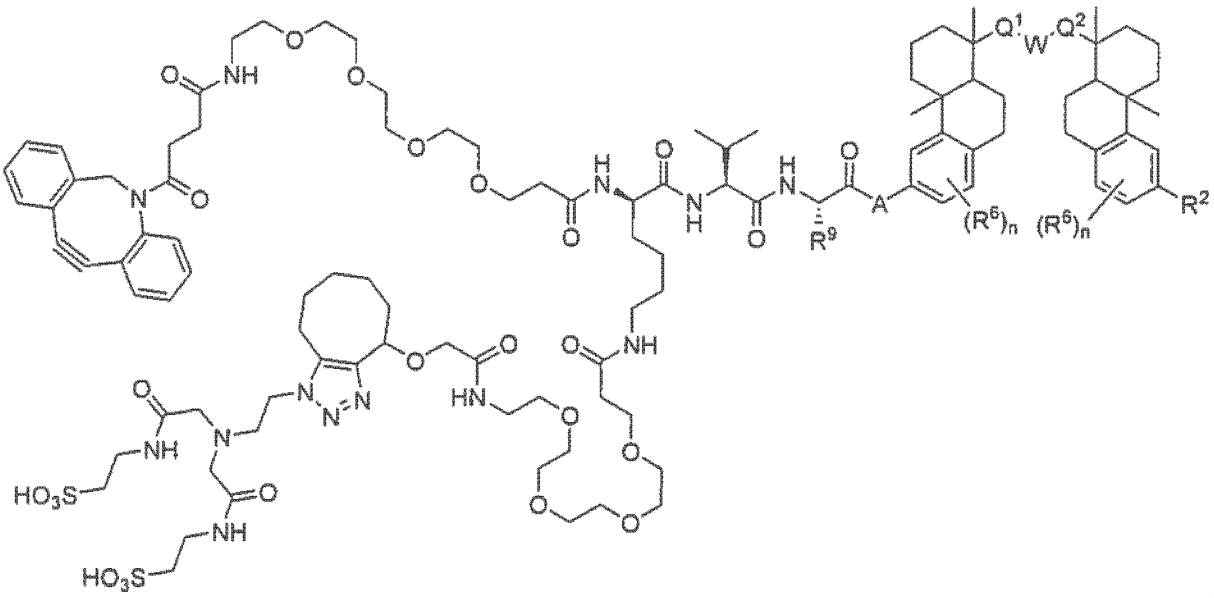
каждый A представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

 ,  ,

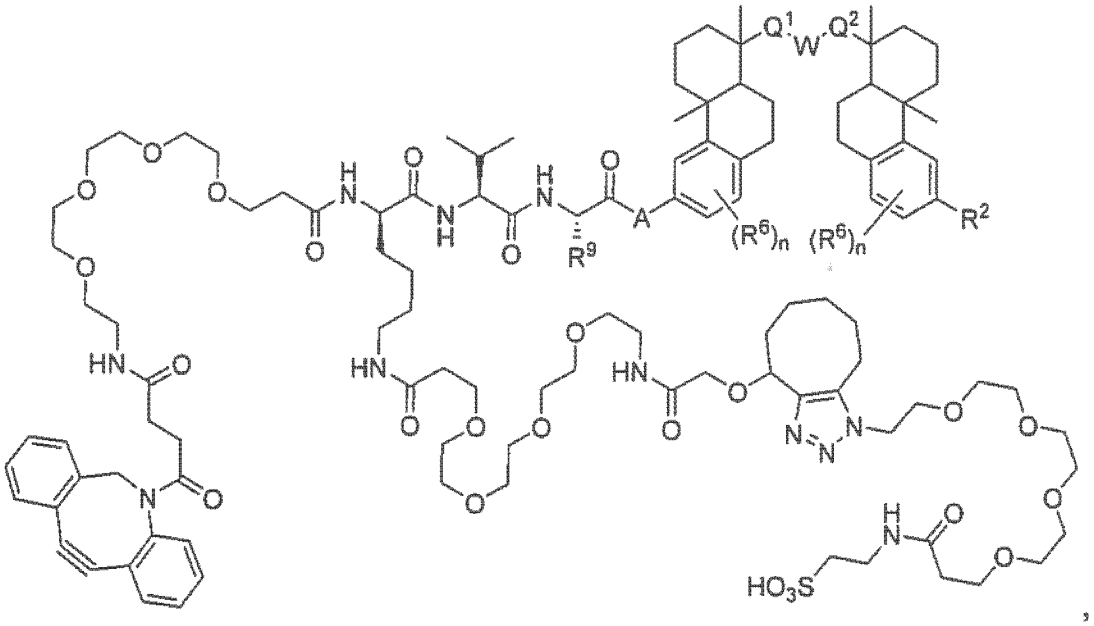
 или  , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил.

[00143] В некоторых вариантах осуществления линкер-полезная нагрузка или реакционноспособный линкер-полезная нагрузка:

 ,



,

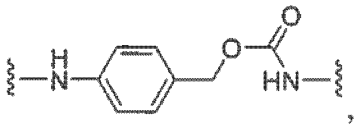


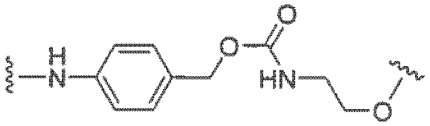
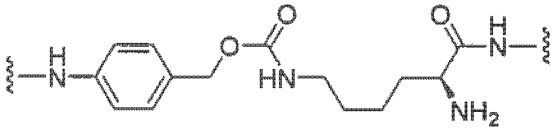
,

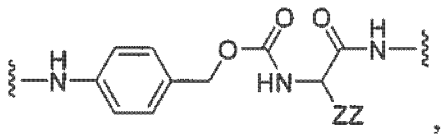
или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где:

Q^1, **Q^2**, **W**, **R^1**, **R^2**, **R^4**, **R^5** и **R^6** имеют значения, описанные в контексте формулы I;

каждый **R^9** представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

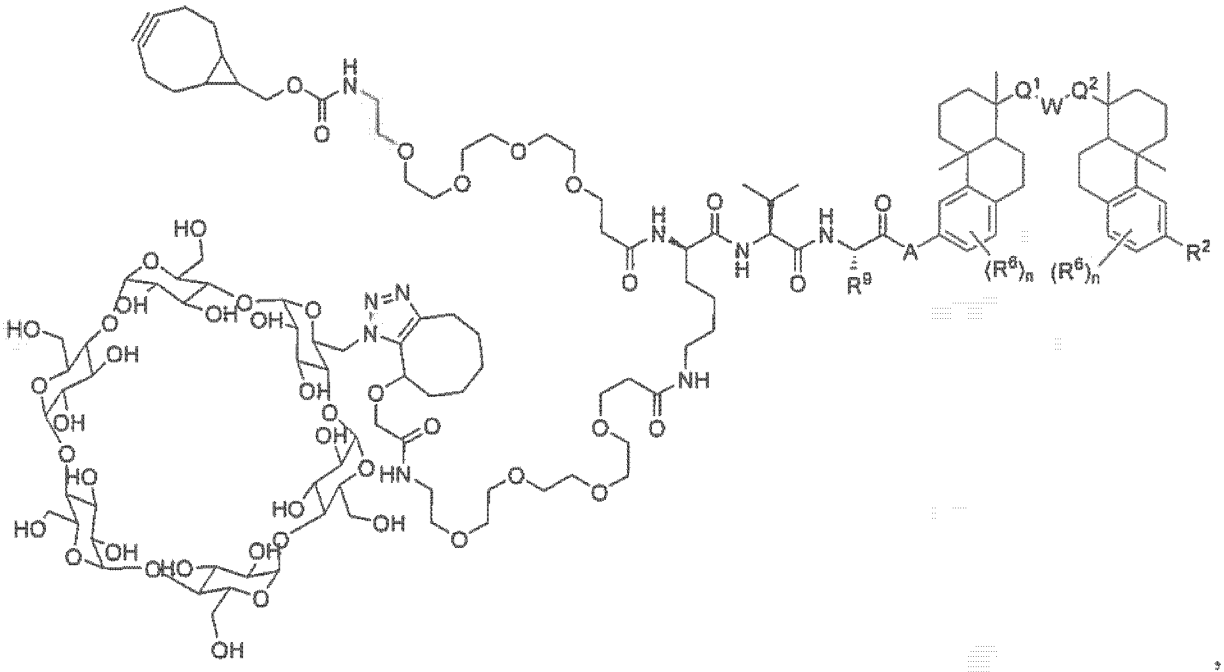
каждый **A** представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

 ,  или

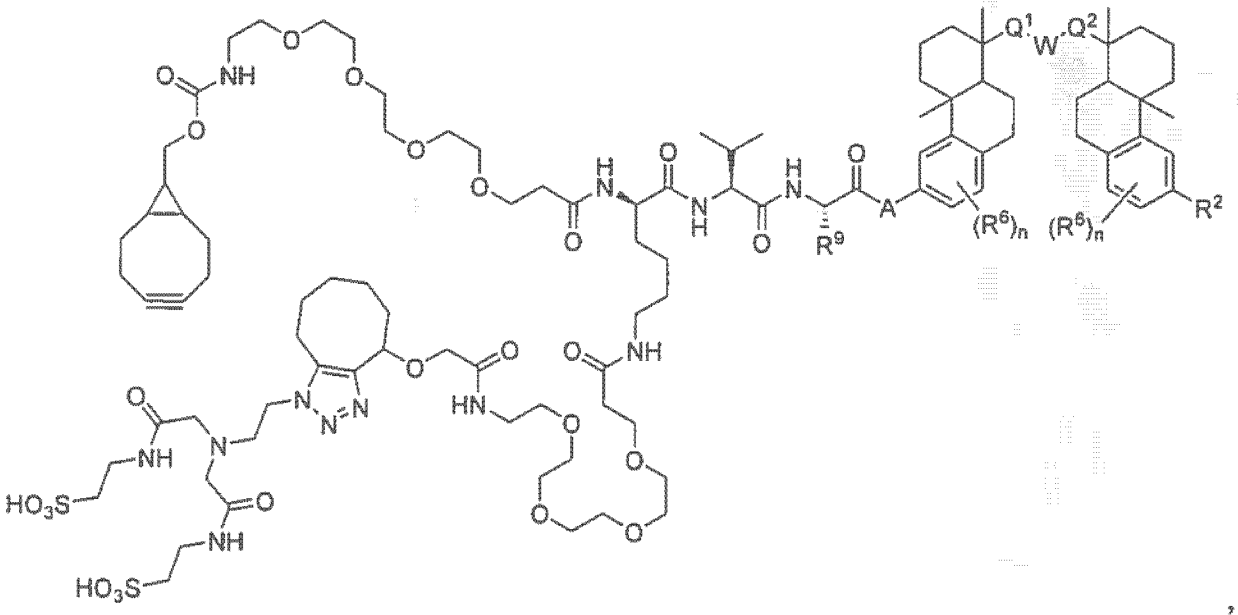


, где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил.

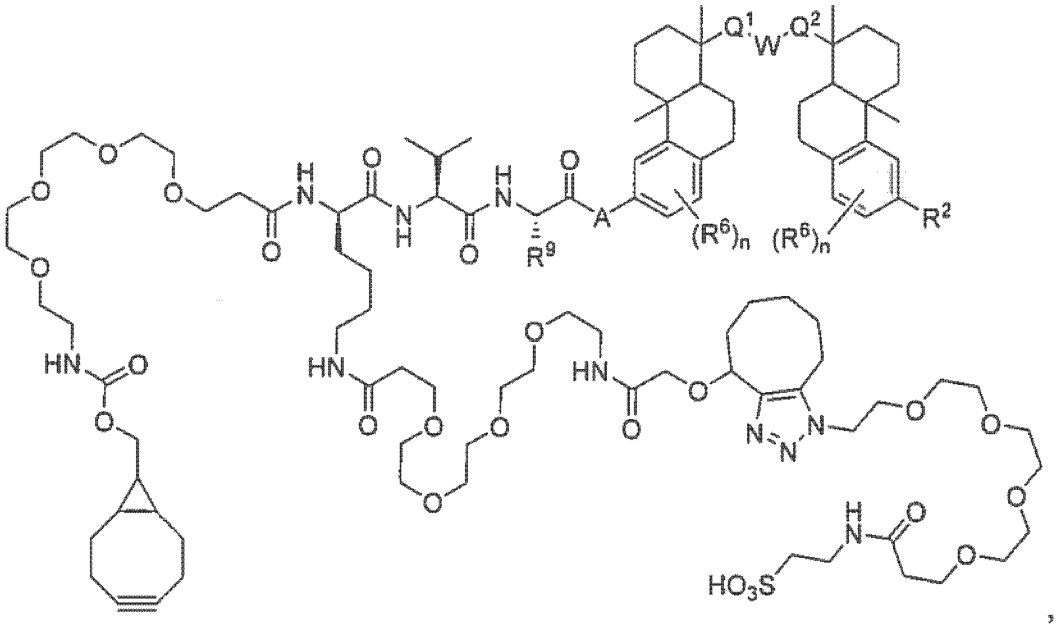
[00144] В некоторых вариантах осуществления линкер-полезная нагрузка или реакционноспособный линкер-полезная нагрузка:



,



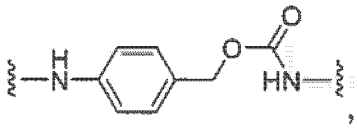
,

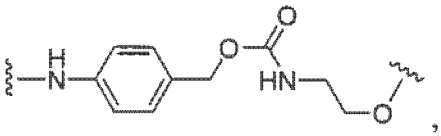
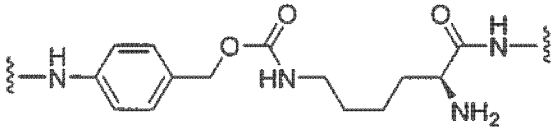


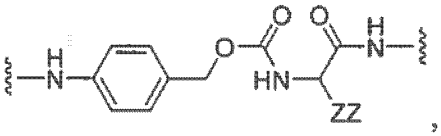
или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где:

Q^1, Q^2, W, R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I;

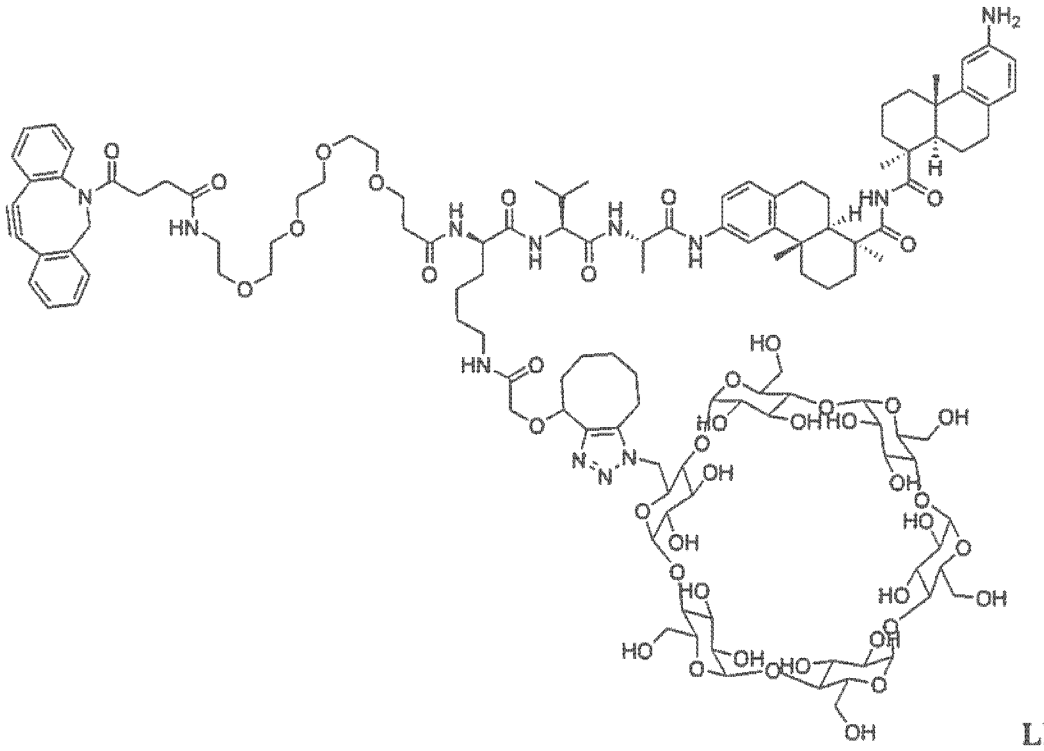
каждый R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждый A представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

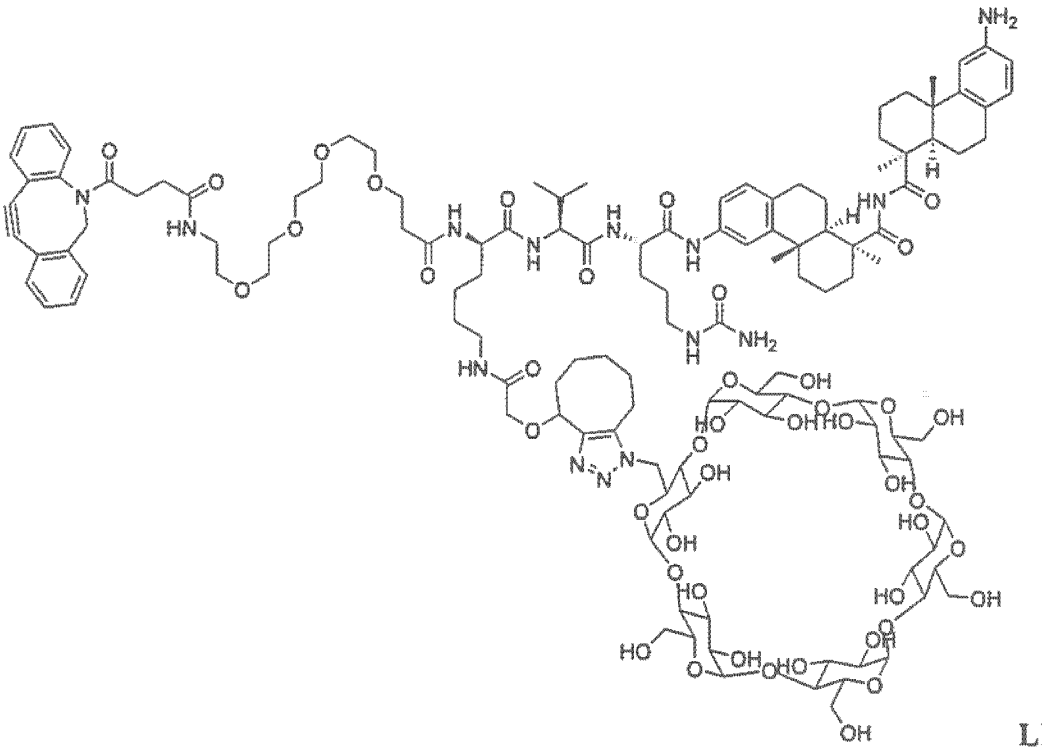
 ,  или

 , где ZZ представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте ZZ представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте ZZ представляет собой C_{1-6} гетероалкил.

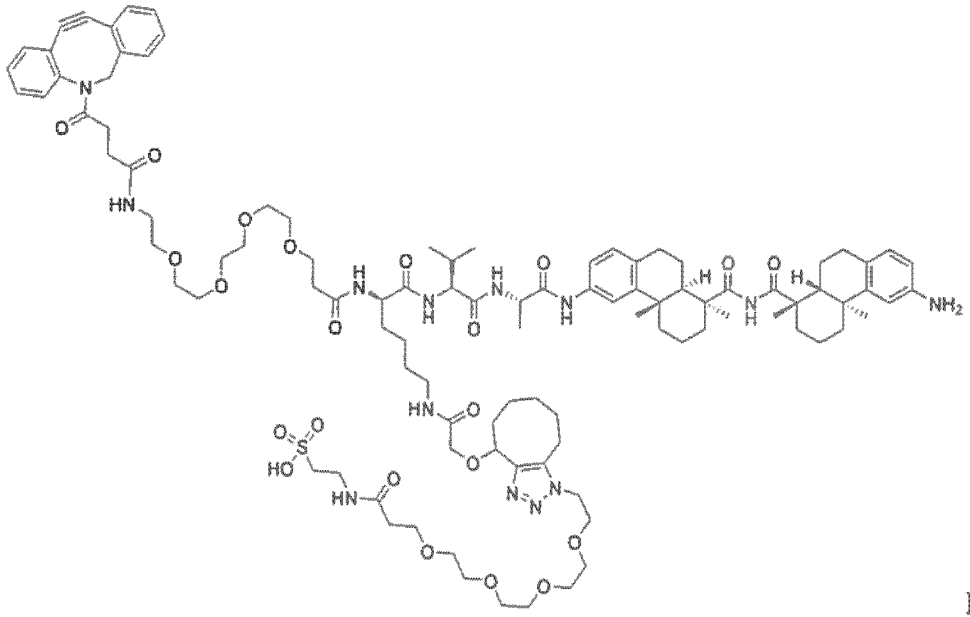
[00145] В некоторых вариантах осуществления линкер-полезная нагрузка или реакционноспособный линкер-полезная нагрузка выбираются из:



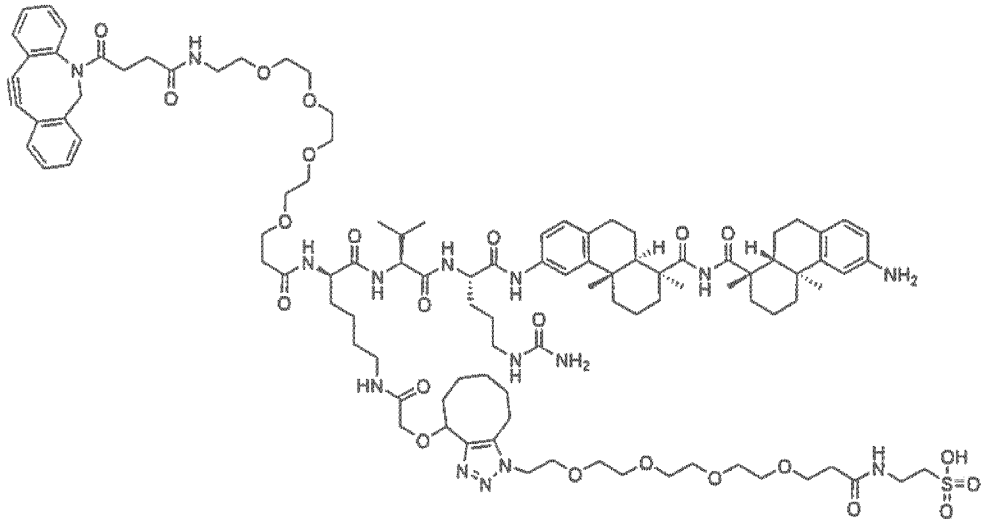
LP1;



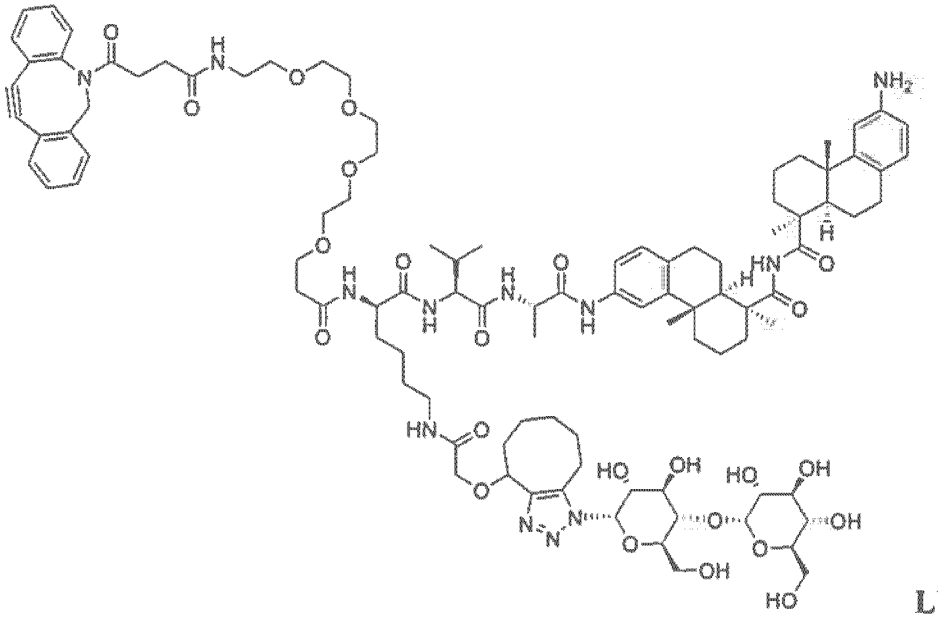
LP2;



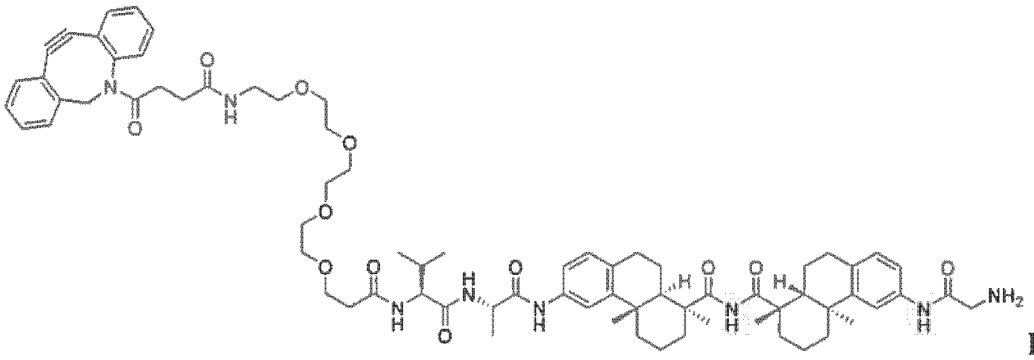
LP3;



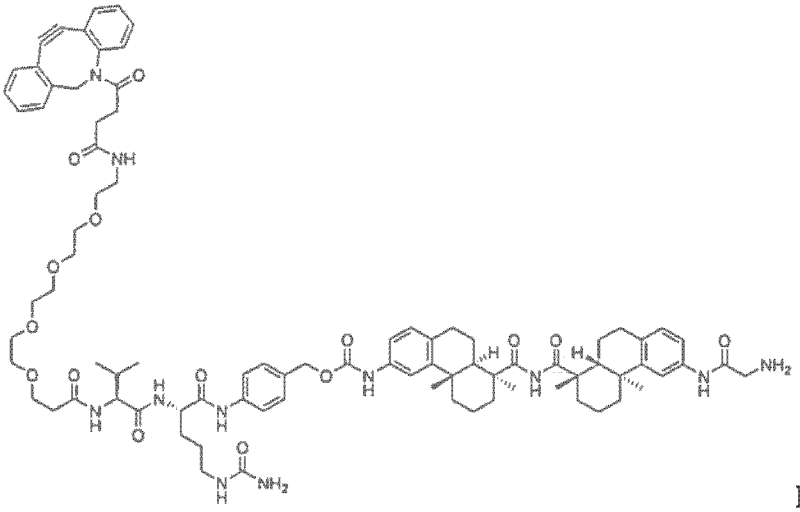
LP4;



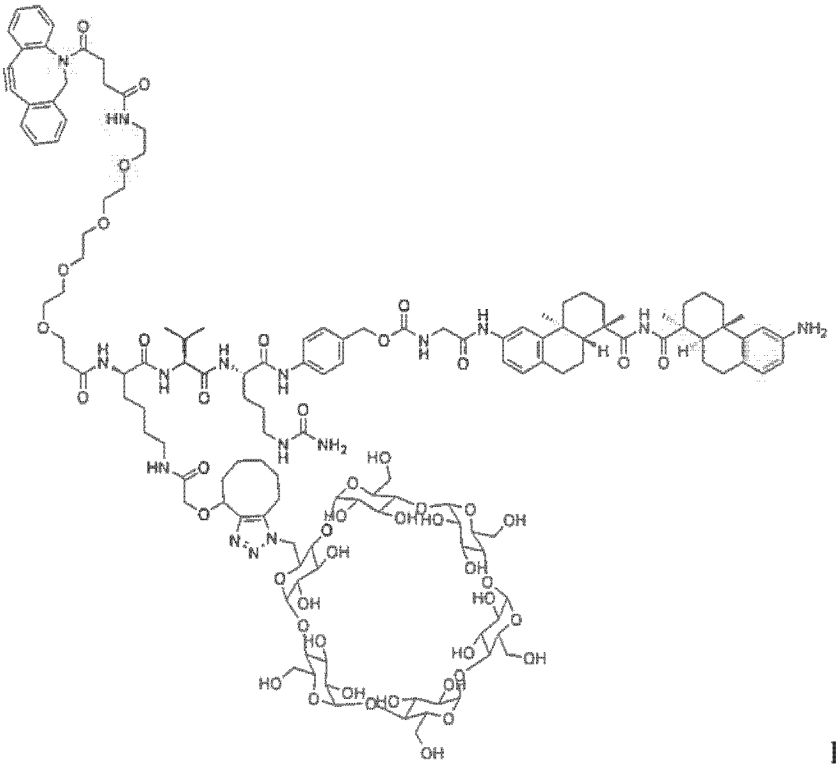
LP5;



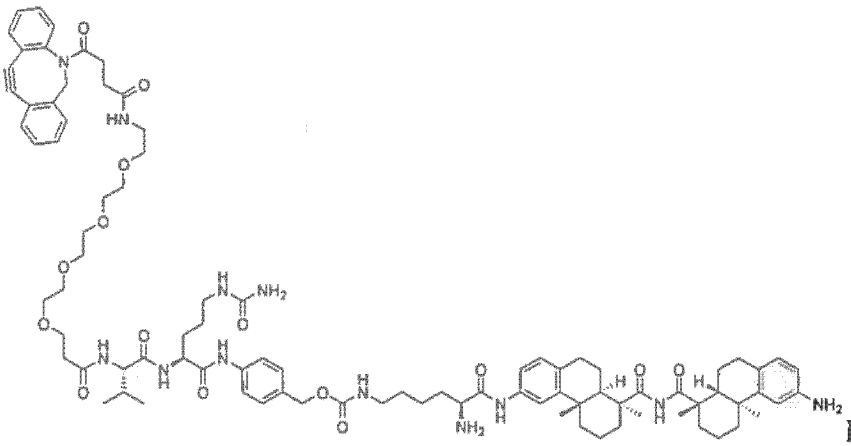
LP6;



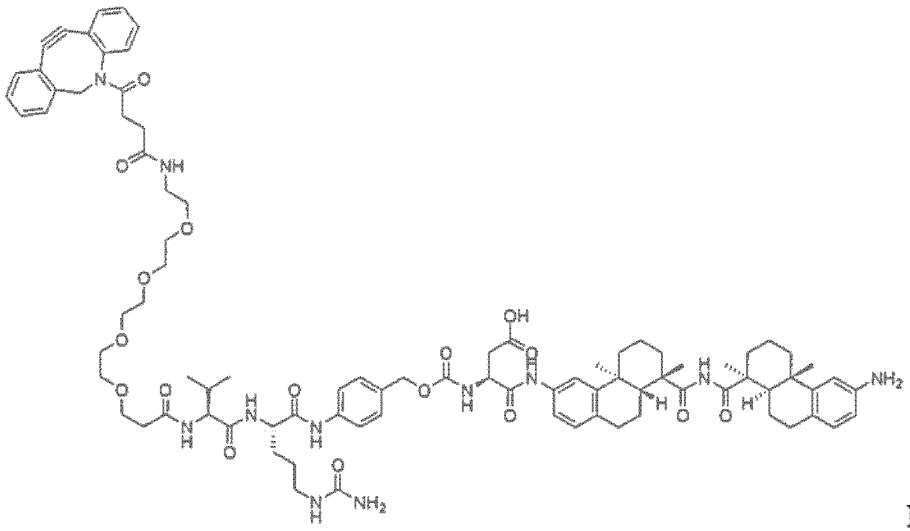
LP7;



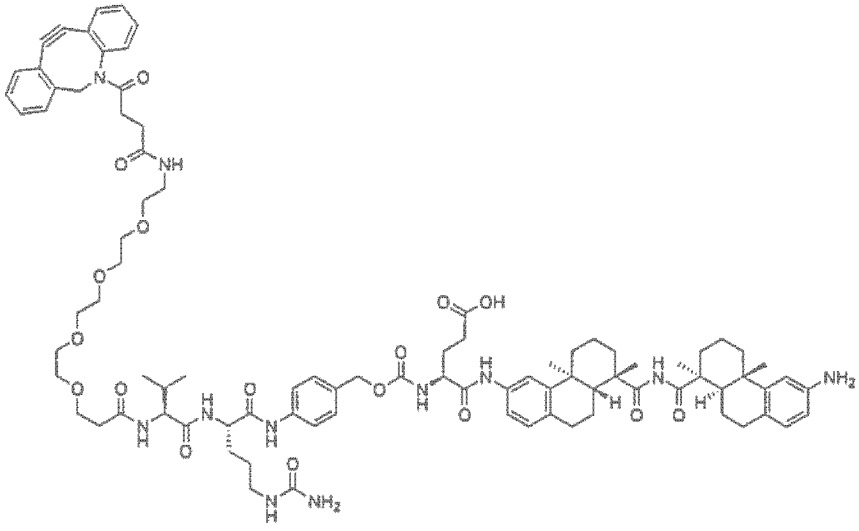
LP8;



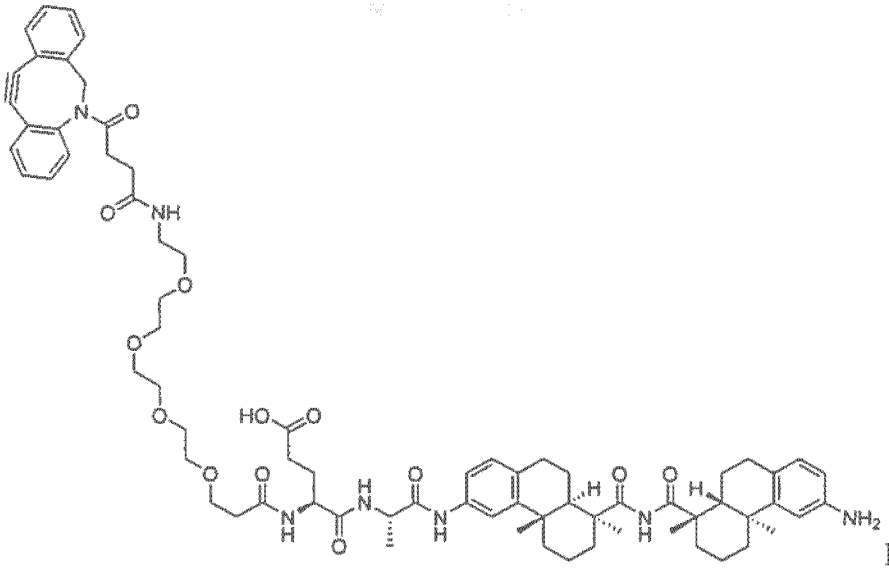
LP9;



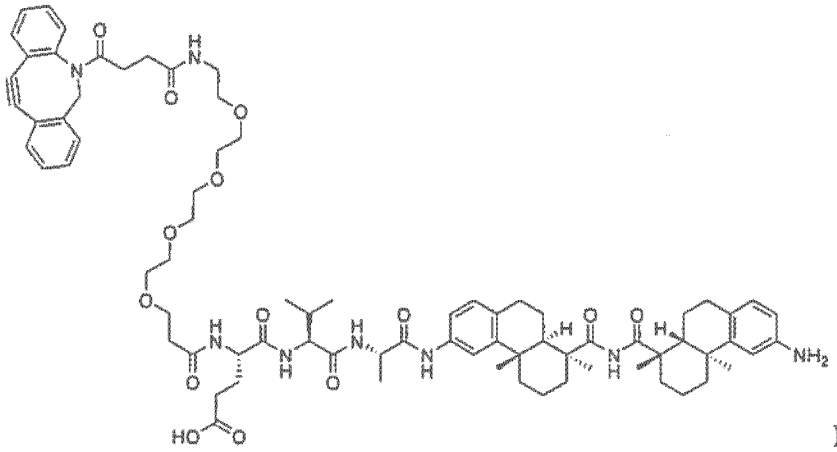
LP10;



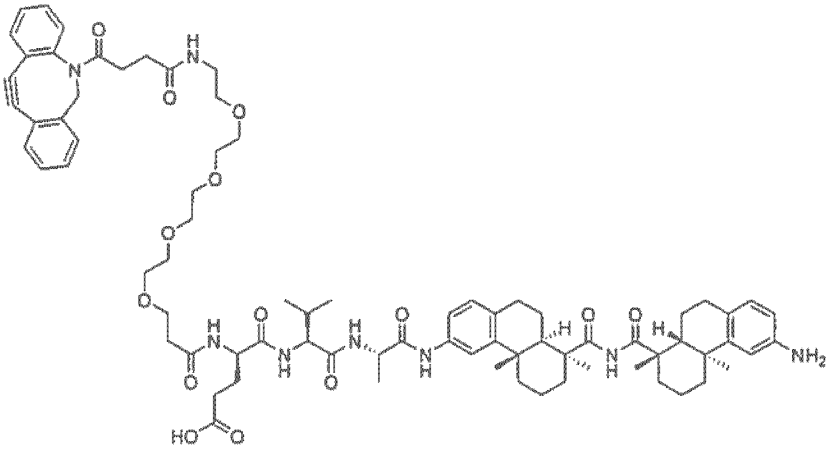
LP11; и



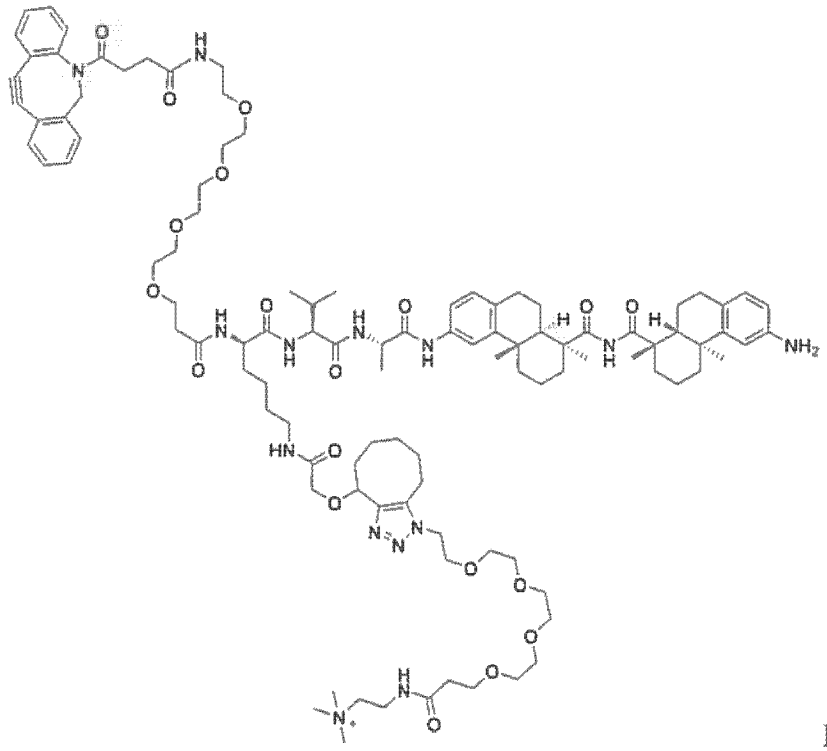
LP12;



LP13;



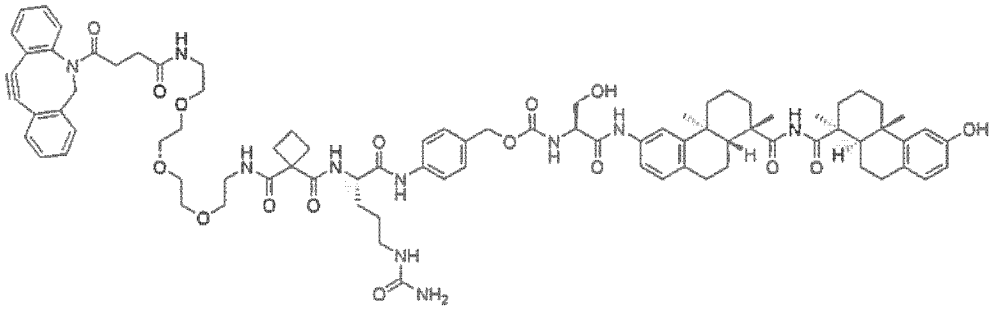
LP14;



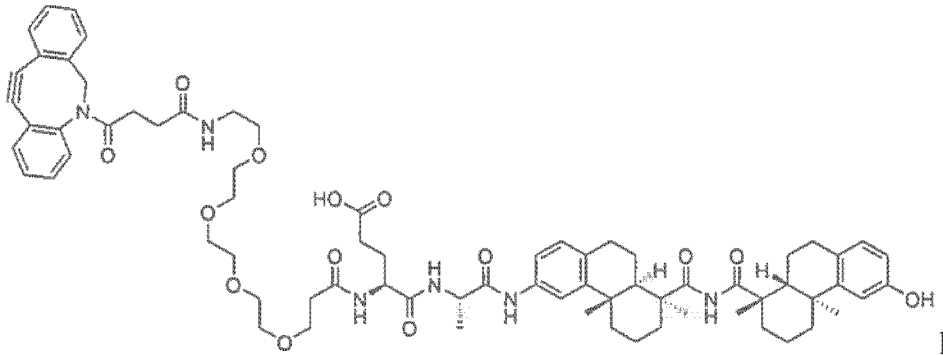
LP20; или

его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

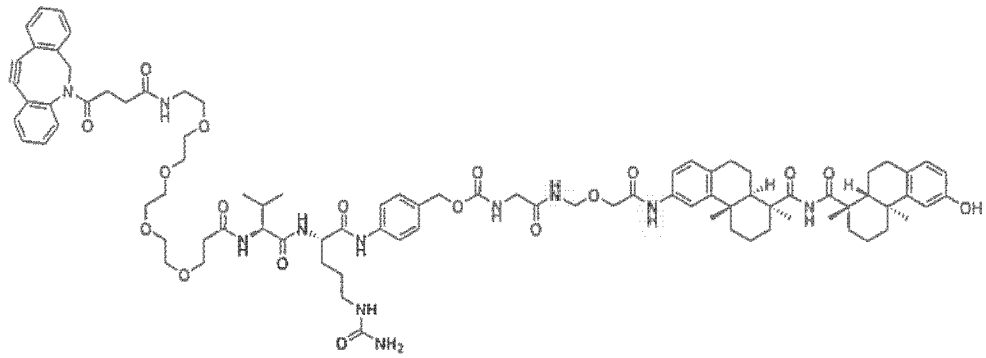
[00146] Кроме того, в настоящем документе представлены сочетания линкер-полезных нагрузок, выбранные из группы, состоящей из:



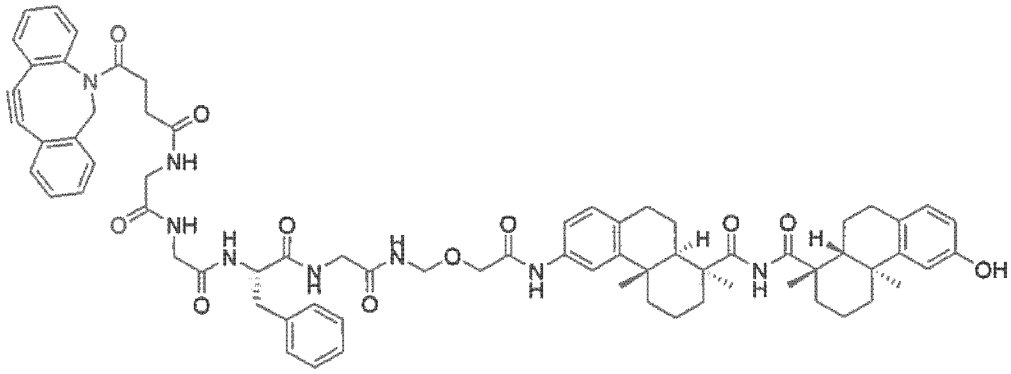
LP15;



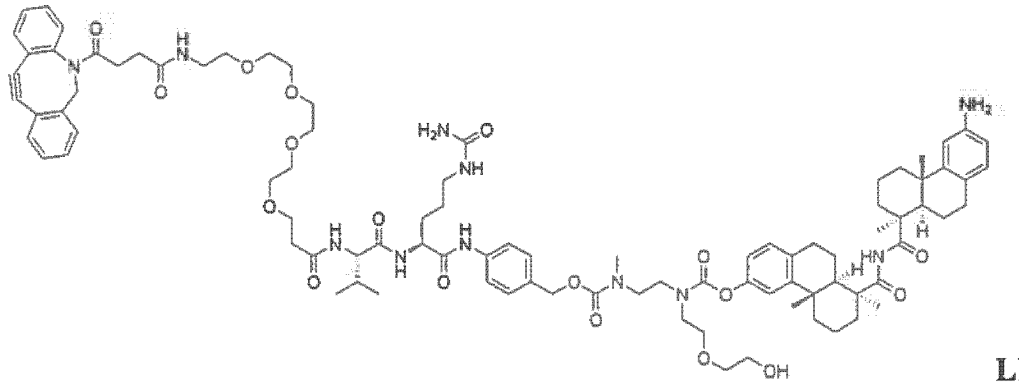
LP16;



LP17;



LP18;



LP19; и

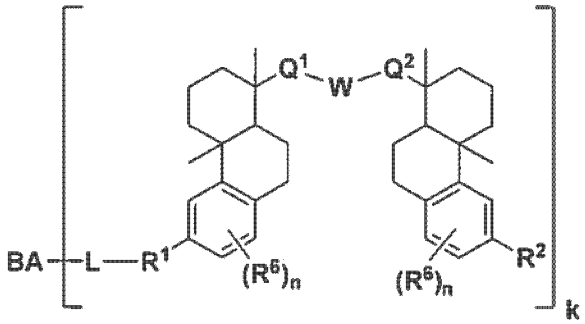
его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

[00147] Вышеуказанные линкеры, линкер-полезные нагрузки или реакционноспособные линкер-полезные нагрузки полезны для обеспечения следующих конъюгатов.

Конъюгаты/Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC)

[00148] В настоящем документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, при этом указанные антитела конъюгированы с одним или несколькими соединениями формулы I, II или III, как описано в данном документе.

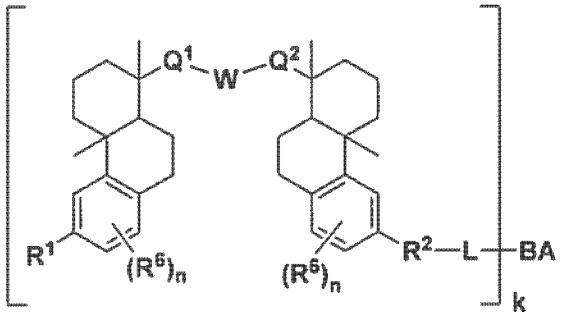
[00149] В настоящем документе предусмотрены соединения или конъюгаты формулы A:



(A)

или его фармацевтически приемлемая соль, или его стереоизомерная форма, где **BA** представляет собой связывающий агент, **L** представляет собой линкер, Q^1, Q^2, **W**, $-R^1-$, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные выше в контексте формулы I, а **k** равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления соединения или полезные нагрузки, конъюгированные с **-L-BA** в Формуле A, включают одно или несколько соединений формул I, II и/или III, как описано выше, где **BA** представляет собой связывающий агент; **L** представляет собой линкер; а **k** равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В любом варианте осуществления в этом абзаце **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы I, как описано выше. В любом варианте осуществления в этом абзаце **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы II, как описано выше. В любом варианте осуществления в этом абзаце **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы III, как описано выше. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 или 1-4. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 1. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 2. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 3. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 4. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^4 независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент, алкил, замещенный алкил, ацил или замещенный ацил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^4 независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент или алкил.

[00150] В настоящем документе предусмотрены соединения или конъюгаты формулы **B**:

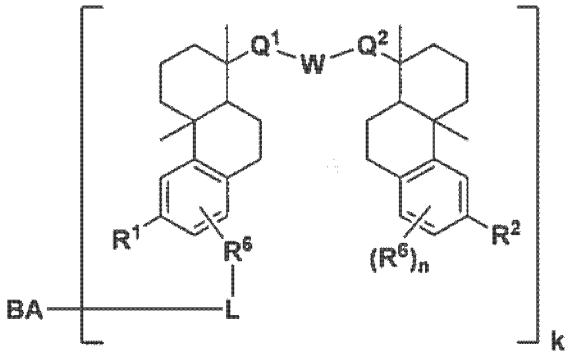


(B)

или его фармацевтически приемлемая соль, или его стереоизомерная форма, где **BA** представляет собой связывающий агент, **L** представляет собой линкер, Q^1, Q^2, **W**, R^1, $-R^2-$, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные выше в контексте формулы I, а **k** равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления соединения или полезные нагрузки, конъюгированные с **-L-BA** в Формуле B, включают одно или несколько соединений формул I, II и/или III, как описано выше, где **BA** представляет собой связывающий агент; **L** представляет собой линкер; а **k** равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В любом варианте осуществления в этом абзаце **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы I, как описано выше. В любом варианте осуществления в этом абзаце **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы II, как описано выше. В любом варианте осуществления в этом абзаце **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы III, как описано выше. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 или 1-4. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 1. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 2. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 3. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 4. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^4 независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент, алкил, замещенный алкил, ацил или замещенный ацил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^4 независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный

аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент или алкил.

[00151] В настоящем документе предусмотрены соединения или конъюгаты формулы C:



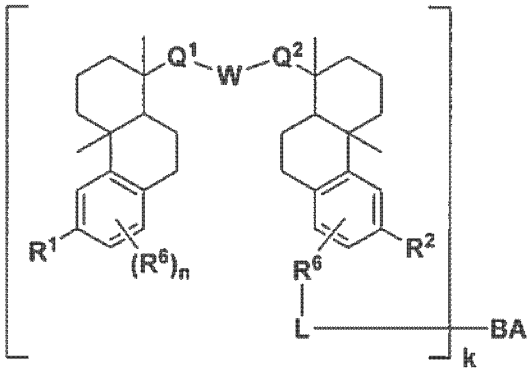
(C)

или его фармацевтически приемлемая соль, или его стереоизомерная форма, где **BA** представляет собой связывающий агент, **L** представляет собой линкер, Q^1, Q^2, **W**, R^1, R^2, R^4, R^5 и $-R^6-$ имеют значения, описанные выше в контексте формулы I, а **k** равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления соединения или полезные нагрузки, конъюгированные с **-L-BA** в Формуле C, включают одно или несколько соединений формул I, II и/или III, как описано выше, где **BA** представляет собой связывающий агент; **L** представляет собой

линкер; а **k** равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В любом варианте осуществления в этом абзаце **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы I, как описано выше. В любом варианте осуществления в этом абзаце **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы II, как описано выше. В любом варианте осуществления в этом абзаце **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы III, как описано выше. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 или 1-4. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 1. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 2. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 3. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 4. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^4 независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент, алкил, замещенный алкил, ацил или замещенный ацил. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^4 независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-

алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент или алкил.

[00152] В настоящем документе предусмотрены соединения или конъюгаты формулы **D**:



(D)

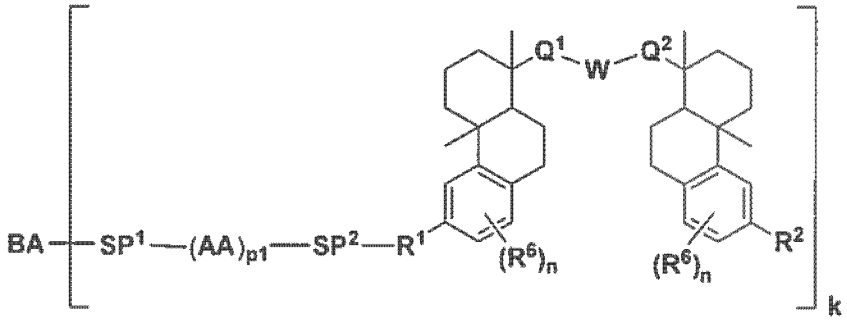
или его фармацевтически приемлемая соль, или его стереоизомерная форма, где **BA** представляет собой связывающий агент, **L** представляет собой линкер, Q^1, Q^2, **W**, R^1, R^2, R^4, R^5 и $-R^6-$ имеют значения, описанные выше в контексте формулы I, а **k** равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления соединения или полезные нагрузки, конъюгированные с **-L-BA** в Формуле D, включают одно или несколько соединений формул I, II и/или III, как описано выше, где **BA** представляет собой связывающий агент; **L** - линкер; а **k** равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В любом варианте осуществления в этом абзаце **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы I, как описано выше. В любом варианте осуществления в этом абзаце **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы II, как описано выше. В любом варианте осуществления в этом абзаце **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы III, как описано выше. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 или 1-4. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 1. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 2. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 3. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 4. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце каждый R^4 независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент, алкил, замещенный алкил, ацил или замещенный ацил. В любом из вариантов осуществления в

этом абзаце каждый $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент или алкил.

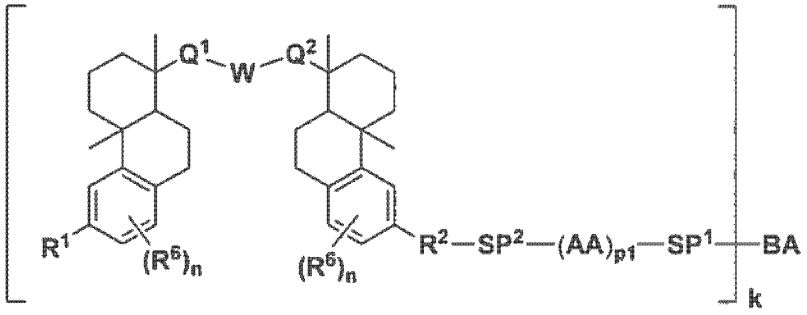
[00153] В любом из вариантов осуществления в предыдущих четырех абзацах **L** представляет собой линкер или **X-Y-Z**, где **X** представляет собой –NH– или –O–; **Y** представляет собой ферментативно расщепляемую группу, саморазрушающуюся группу, кислотолабильный фрагмент, PEG_{n1}, фрагмент сахара или усиливающую группу; и **Z** представляет собой линкер связывающего агента (**BL**), где **Z** ковалентно связан с **BA**. Примеры ферментативно расщепляемых фрагментов включают, но не ограничиваются ими, любые ди- или трипептиды (например, VC-PAB и VA, как описано в другой части настоящего документа). Примеры саморасщепляющихся групп описаны в другом месте в данном документе. Примеры неустойчивых к кислотам фрагментов включают, но не ограничиваются ими, алкоксамины, кетоксамины, карбонаты или фосфонаты. Примерные группы улучшения описаны в другом месте в данном документе. Примеры реакционноспособных группировок описаны в другом месте. В некоторых вариантах осуществления **Y** не включает PEG_{n1}, где **n1** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления аминокислота может быть использована для соединения полезной нагрузки, группы усиления и антитела (каждое из которых описано в другом месте в данном документе) друг с другом, как описано и очевидно в другом месте в данном документе. Соединение полезной нагрузки, группы усиления и антитела через аминокислоту может быть осуществлено реакциями амидного сочетания, присоединения Михаэля или анилин-NH-алкилированием, что будет понятно специалистам в данной области. Например, аминокислота, которая связывает полезную нагрузку, группу усиления и антитело, представляет собой лизин. В качестве дополнительного примера, в одном варианте осуществления аминокислота, которая связывает полезную нагрузку, группу усиления и антитело, представляет собой D-лизин. В качестве дополнительного примера, в одном варианте осуществления аминокислота, которая связывает полезную нагрузку, группу усиления и антитело, представляет собой аспарагиновую кислоту. В качестве дополнительного примера, в одном варианте осуществления аминокислота, которая связывает полезную нагрузку, группу усиления и антитело, представляет собой глутаминовую кислоту. В качестве дополнительного примера, в одном варианте осуществления аминокислота, которая связывает полезную нагрузку, группу усиления и антитело, представляет собой серин. В качестве дополнительного примера, в одном варианте осуществления аминокислота, которая связывает полезную нагрузку, группу

усиления и антитело, представляет собой цистеин. В качестве дополнительного примера, в одном варианте осуществления аминокислота, которая связывает полезную нагрузку, группу усиления и антитело, представляет собой тирозин.

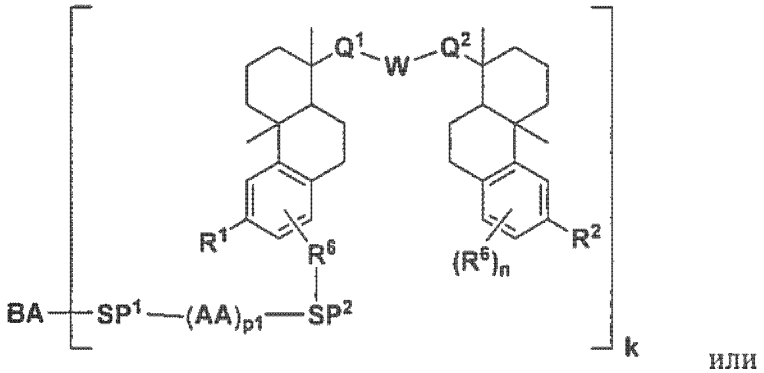
[00154] В настоящем документе предложены соединения или конъюгаты представляющие собой соединение по Формуле A', B', C' или D':



(A')

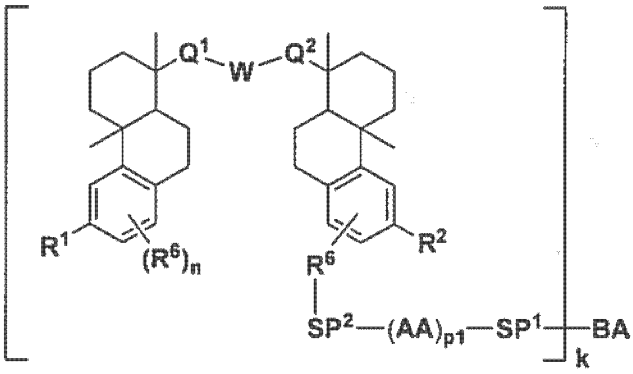


(B')



(C')

или

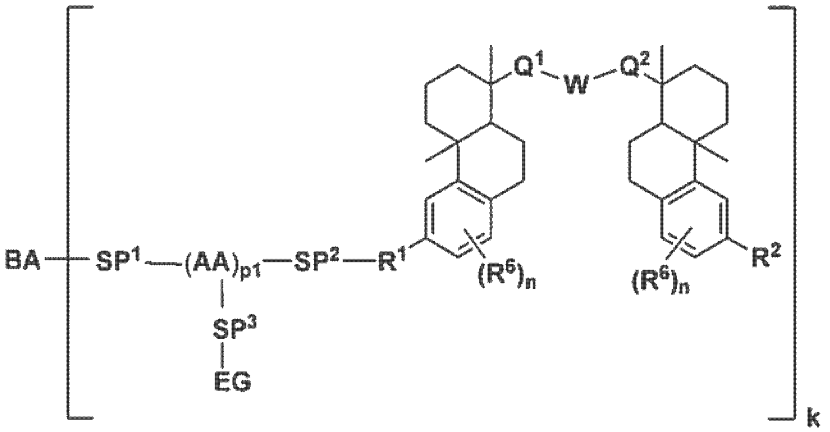


(D')

или его фармацевтически приемлемая соль, или его стереоизомерная форма, где BA представляет собой связывающий агент, Q^1, Q^2, W, R^1, $-R^1-$, R^2, R^2-, R^4, R^5 и R^6 или $-R^6-$ имеют значения, описанные выше в контексте формулы I, SP^1 и SP^2, если они присутствуют, представляют собой спейсерные группы, каждый AA представляет собой аминокислотный остаток, а p1 представляет собой целое число от 1 до 10. В одном из вариантов осуществления соединение или конъюгат представляет собой соединение по формуле A', или его фармацевтически приемлемую соль, или его стереоизомерную форму, где BA представляет собой связывающий агент, Q^1, Q^2, W, $-R^1-$, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют следующие значения: описанные выше в контексте формулы I, SP^1 и SP^2, если они присутствуют, представляют собой спейсерные группы, каждый AA представляет собой аминокислотный остаток, а p1 представляет собой целое число от 1 до 10. В одном из вариантов осуществления соединение или конъюгат представляет собой соединение по формуле B', или его фармацевтически приемлемую соль, или его стереоизомерную форму, где BA представляет собой связывающий агент, Q^1, Q^2, W, R^1, $-R^2-$, R^4, R^5 и R^6 имеют следующие значения: описанные выше в контексте формулы I, SP^1 и SP^2, если они присутствуют, представляют собой спейсерные группы, каждый AA представляет собой аминокислотный остаток, а p1 представляет собой целое число от 1 до 10. В одном варианте осуществления соединение или конъюгат представляет собой соединение по формуле C', или его фармацевтически приемлемую соль, или его стереоизомерную форму, где BA представляет собой связывающий агент, Q^1, Q^2, W, R^1, R^2, R^4, R^5, и $-R^6-$ имеют следующие значения: описанные выше в контексте формулы II, SP^1 и SP^2, если они присутствуют, представляют собой спейсерные группы, каждый AA представляет собой аминокислотный остаток, а p1 представляет собой целое число от 1 до 10. В одном варианте осуществления соединение или конъюгат представляет собой соединение по формуле D', или его фармацевтически приемлемую соль, или стереоизомерную форму, где BA представляет собой связывающий агент, Q^1, Q^2, W, R^1, R^2, R^4, R^5 и $-R^6-$ имеют

следующие значения: описанные выше в контексте формулы I, SP^1 и SP^2, если они присутствуют, представляют собой спейсерные группы, каждый AA представляет собой аминокислотный остаток, а p1 представляет собой целое число от 1 до 10. В любом варианте осуществления в этом абзаце BA представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы I, как описано выше. В любом варианте осуществления в этом абзаце BA представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы II, как описано выше. В любом варианте осуществления в этом абзаце BA представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы III, как описано выше. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце p1 равно 1, 2, 3, 4 или 5. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце k равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце k находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 или 1-4. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце k равно 1. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце k равно 2. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце k равно 3. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце k равно 4.

[00155] В некоторых вариантах осуществления соединение или конъюгат представляет собой соединение по формуле A'':



(A'')

или фармацевтически приемлемую соль, или его стереоизомерную форму, или его региоизомер, где:

BA представляет собой связующий агент;

каждый SP^1, SP^2, и SP^3 представляет собой спейсерную группу, как описано выше, где SP^3 связан с одним аминокислотным остатком AA в $(AA)_{p1}$;

p1 представляет собой целое число от 1 до 10;

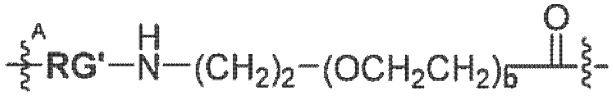
EG представляет собой усиливающий агент;

k представляет собой целое число от 1 до 30;

Q^1, Q^2, W, $-R^1-$, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I.

[00156] Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах осуществления связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой гидрофильную группу. В некоторых вариантах осуществления усиливающий агент представляет собой циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновую кислоту. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалистам. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин, бета-циклодекстрин или гамма-циклодекстрин или их смеси. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой гамма-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, или $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5 и **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил- или алкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$. В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или

гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления спейсер SP^1 представляет собой:

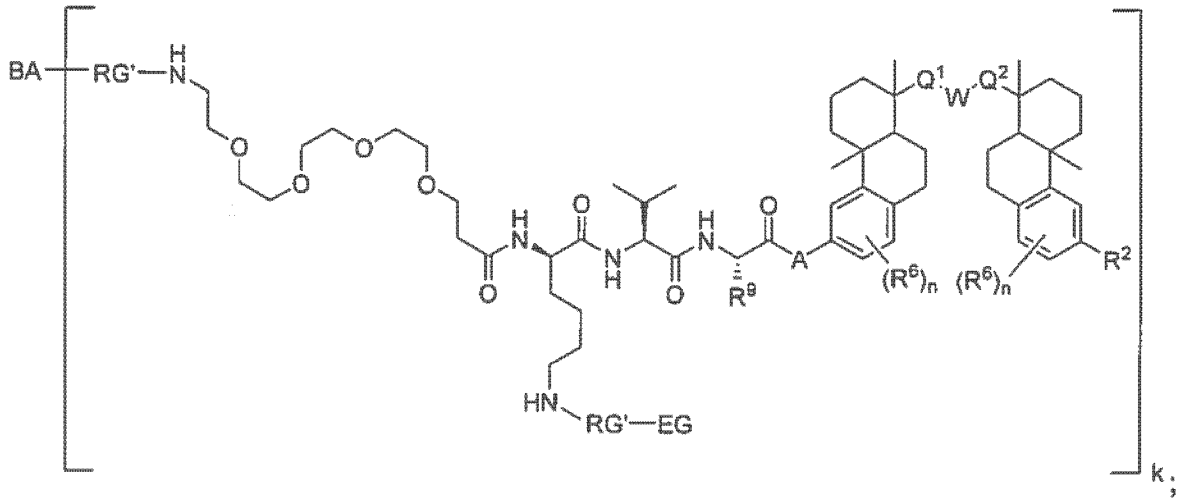


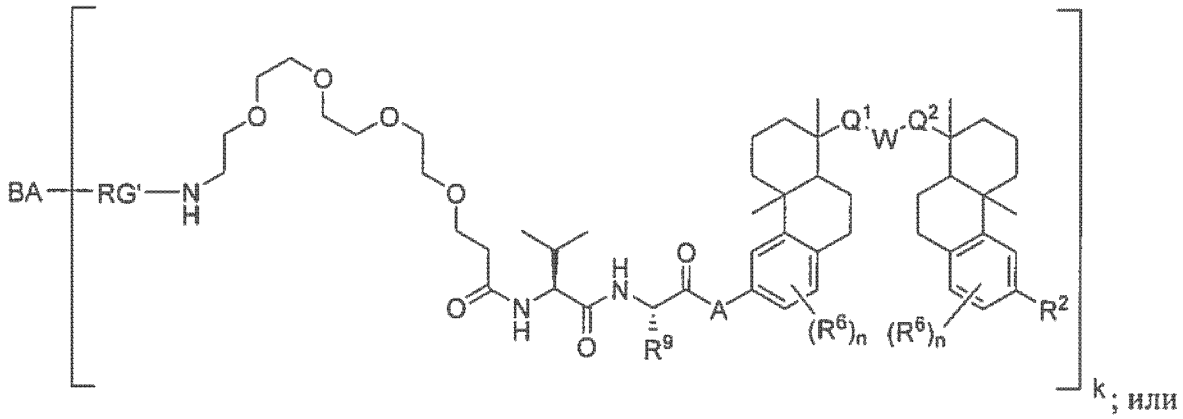
,

где **RG'** представляет собой остаток реакционноспособной группы после реакции реакционноспособной группы **RG** со связывающим агентом;  является связью, прямой или косвенной, со связующим агентом; и **b** - целое число от 1 до 4; $(AA)_{p1}-SP^2-$ представляет собой –NH-лизин-валин-аланин–, –NH-лизин-валин-цитруллин– или –NH-лизин-валин-цитруллин-PABC–; спейсер SP^3 представляет собой:  , где **RG'** представляет собой остаток реакционной группы после реакции реакционноспособной группы **RG** с усиливающим агентом **EG**;  является связью с усиливающим агентом; и является связью с $(AA)_{p1}$. В любом варианте осуществления в этом абзаце **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы I, как описано выше. В любом варианте осуществления в этом абзаце **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы II, как описано выше. В любом варианте осуществления в этом абзаце **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело конъюгировано с соединением формулы III, как описано выше. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **p1** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 или 1-4. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 1. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 2. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 3. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце **k** равно 4.

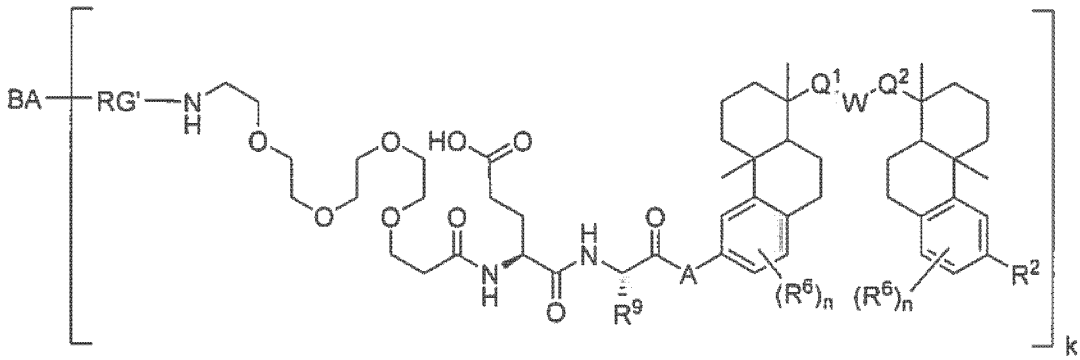
[00157] В некоторых вариантах осуществления соединение или конъюгат представляет

собой:





; или



или фармацевтически приемлемую соль, сольват, или его стереоизомерную форму, или его региоизомер, где:

BA представляет собой связующий агент;

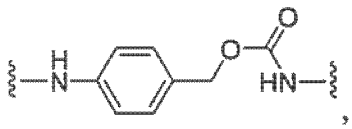
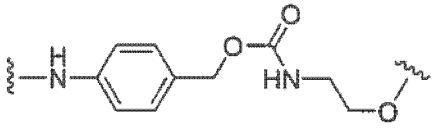
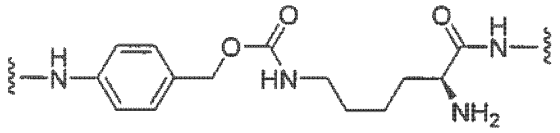
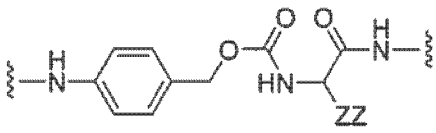
каждый **RG'** представляет собой остаток реакционноспособной группы, как описано в данном документе;

EG представляет собой усиливающий агент;

k представляет собой целое число от 1 до 30;

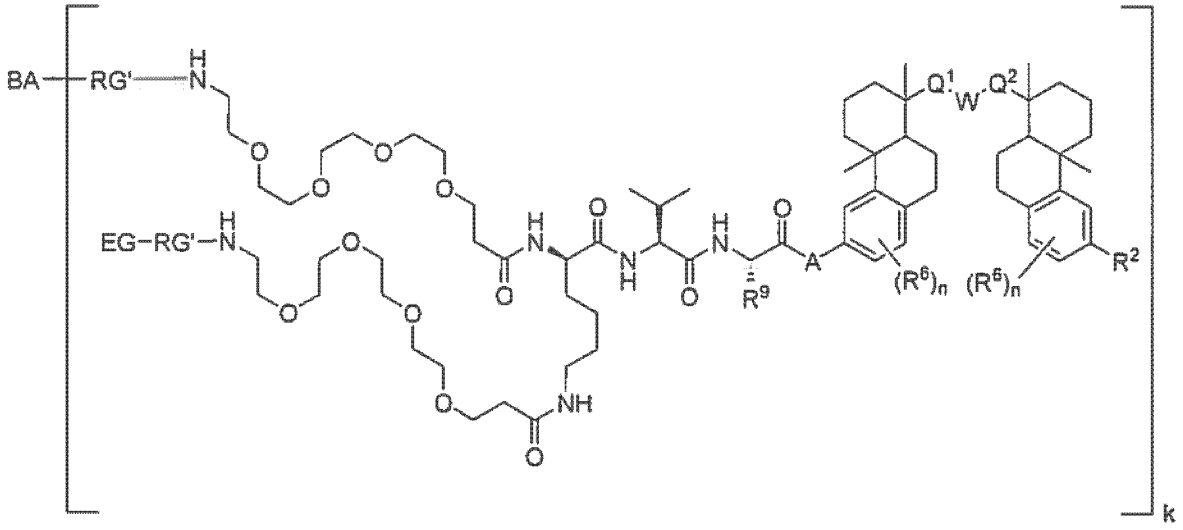
Q^1, Q^2, W, R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I;

каждый R^9 представляет собой $–CH_3$ или $–(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждый A представляет собой –O–, –N(H)-,  ,  ,  или  , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой $C_{1\text{-}6}$ алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой $C_{1\text{-}6}$ гетероалкил. Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах осуществления связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой гидрофильную группу. В некоторых вариантах осуществления усиливающий агент представляет собой циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновую кислоту. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалистам. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин, бета-циклодекстрин или гамма-циклодекстрин или их смеси. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой гамма-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $–(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $–(CH_2)_{n2}–NH–(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $–(CH_2)_{n2}–C(O)NH–(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $–(CH_2CH_2O)_{m2}–C(O)NH–(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $–(CH_2)_{n2}–N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, $–(CH_2)_{n2}–C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, или $–(CH_2CH_2O)_{m2}–C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5 и **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил- или алкиленилсульфоновая кислота представляет собой $–(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$. В другом варианте

осуществления гетероалкил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5.

[00158] В некоторых вариантах осуществления соединение или конъюгат представляет собой:



или фармацевтически приемлемую соль, сольват, или его стереоизомерную форму, или его региоизомер, где:

BA представляет собой связующий агент;

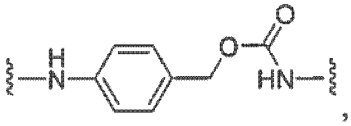
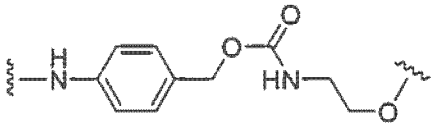
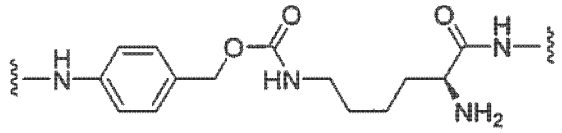
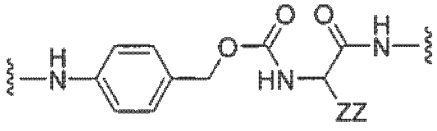
каждый **RG '** представляет собой остаток реакционноспособной группы, как описано в данном документе;

EG представляет собой усиливающий агент;

k представляет собой целое число от 1 до 30;

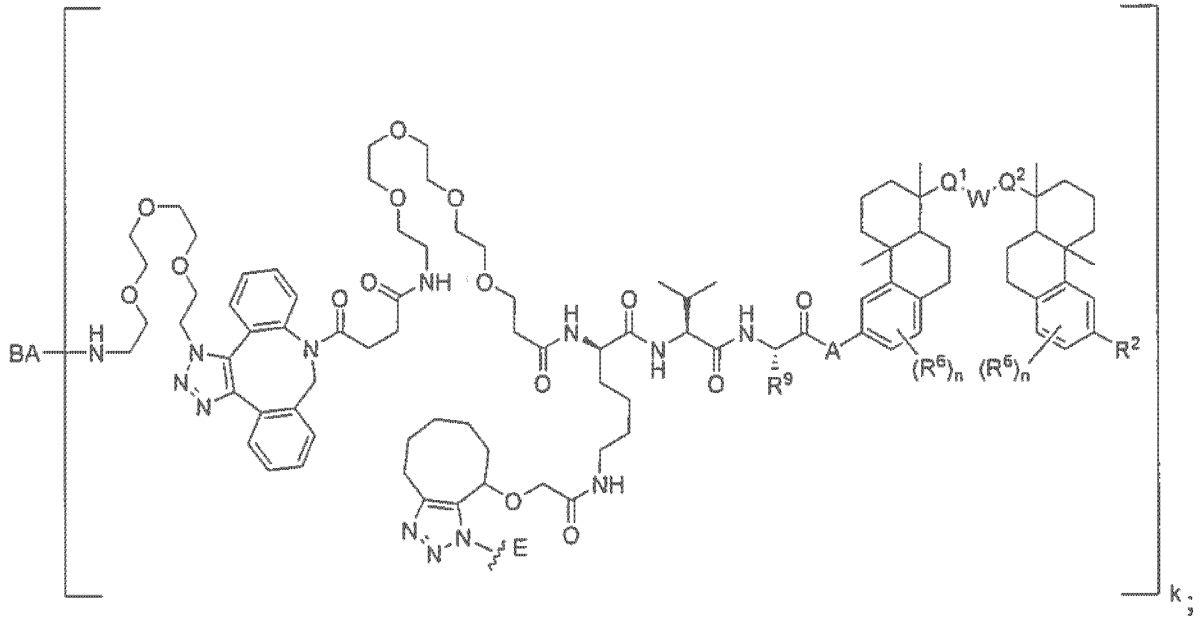
Q^1, Q^2, **W**, R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I;

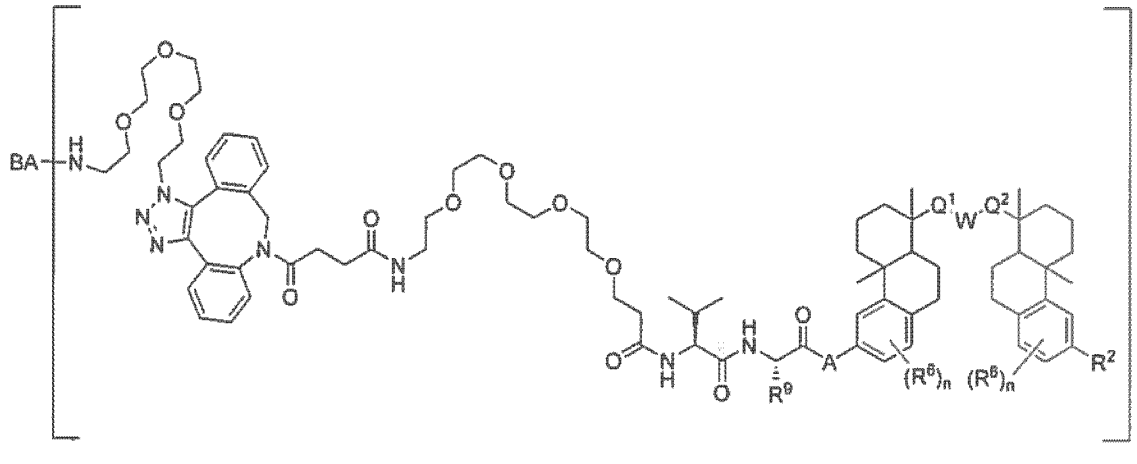
каждый R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждый **A** представляет собой –O–, –N(H)-,  ,  ,  или  , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой $C_{1\text{-}6}$ алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой $C_{1\text{-}6}$ гетероалкил. Как обсуждалось выше, связь со связующим агентом может быть прямой или через спейсер. В некоторых вариантах осуществления связь со связывающим агентом осуществляется через спейсер PEG с остатком глутамина связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой гидрофильную группу. В некоторых вариантах осуществления усиливающий агент представляет собой циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновую кислоту. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалистам. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин, бета-циклодекстрин или гамма-циклодекстрин или их смеси. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой гамма-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, или $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5 и **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил- или

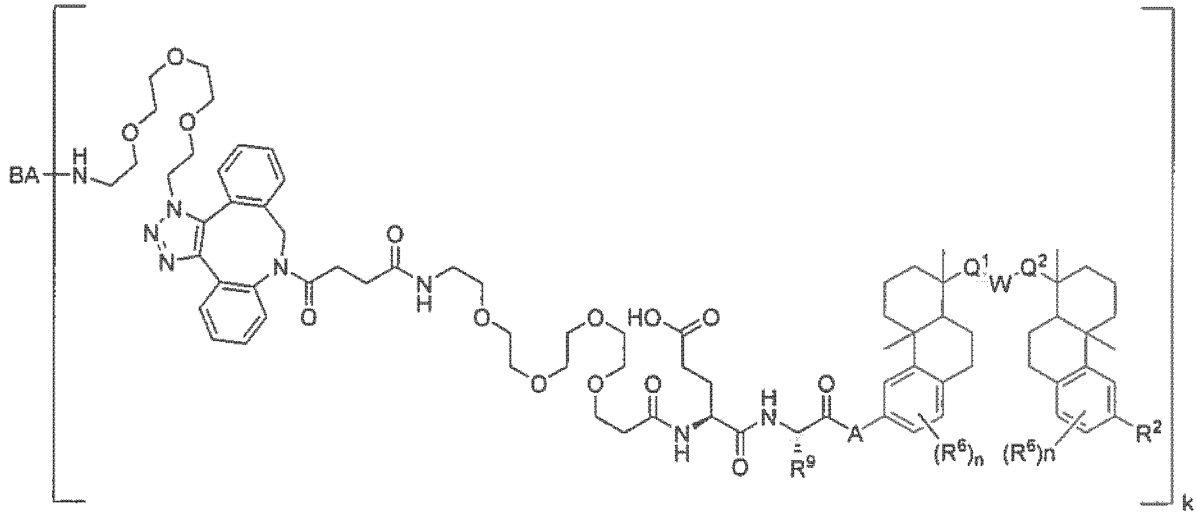
алкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$. В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5.

[00159] В некоторых вариантах осуществления соединение или конъюгат представляет собой:





; или



или фармацевтически приемлемую соль, сольват, или его стереоизомерную форму, или его региоизомер, где:

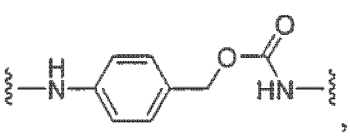
BA представляет собой связующий агент;

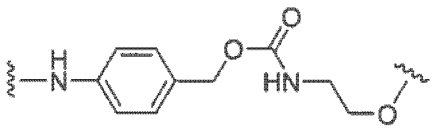
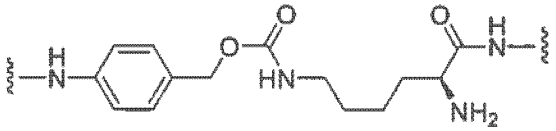
k представляет собой целое число от 1 до 30;

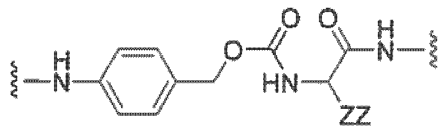
Q^1, **Q^2**, **W**, **R^1**, **R^2**, **R^4**, **R^5** и **R^6** имеют значения, описанные в контексте формулы I;

каждый $-\!\!\sim\!\!\overset{E}{\sim}\!\!-$ является связью с усиливающей группой;

каждый **R^9** представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждый **A** представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

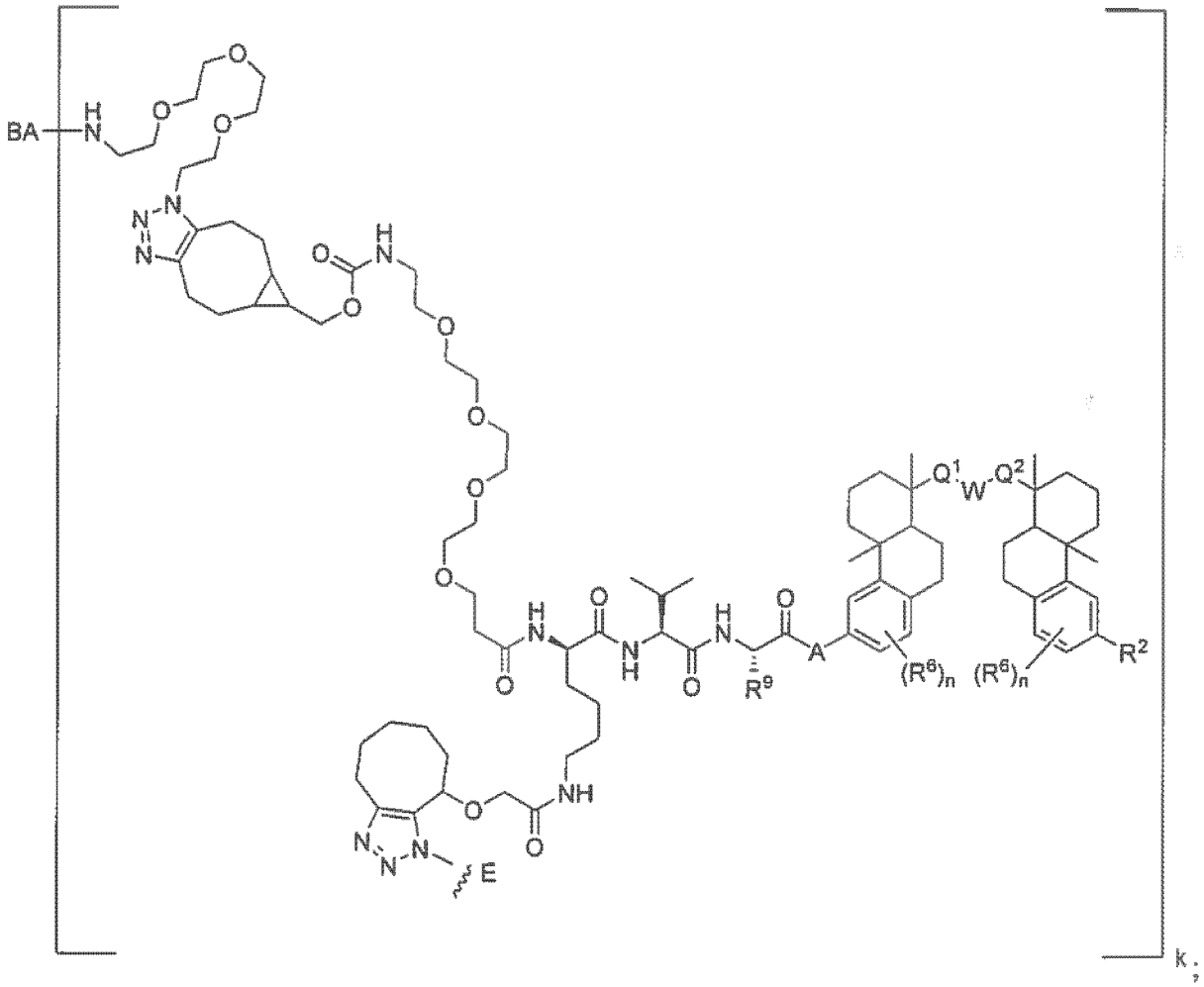
 ,  или

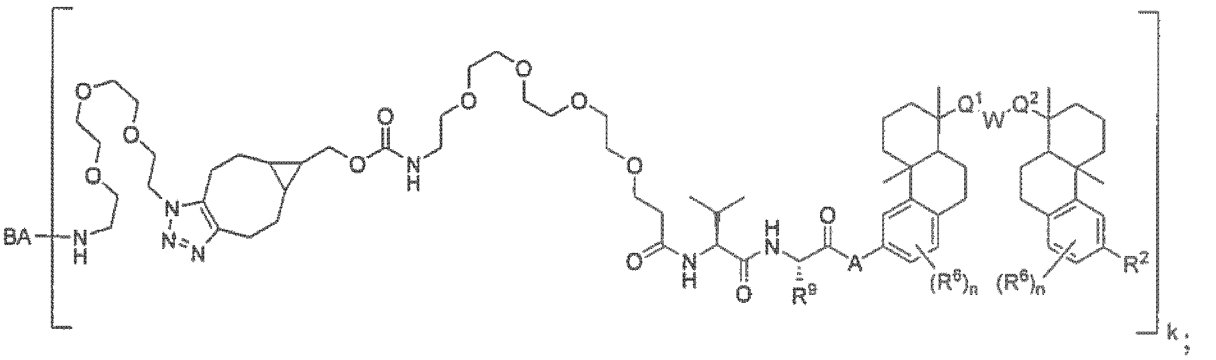


, где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой гидрофильную группу. В некоторых вариантах осуществления усиливающий агент представляет собой циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновую кислоту. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалистам. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин, бета-циклодекстрин или гамма-циклодекстрин или их смеси. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой гамма-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, или $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5 и **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил- или алкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1-5}SO_3H$. В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1-5}SO_3H$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой

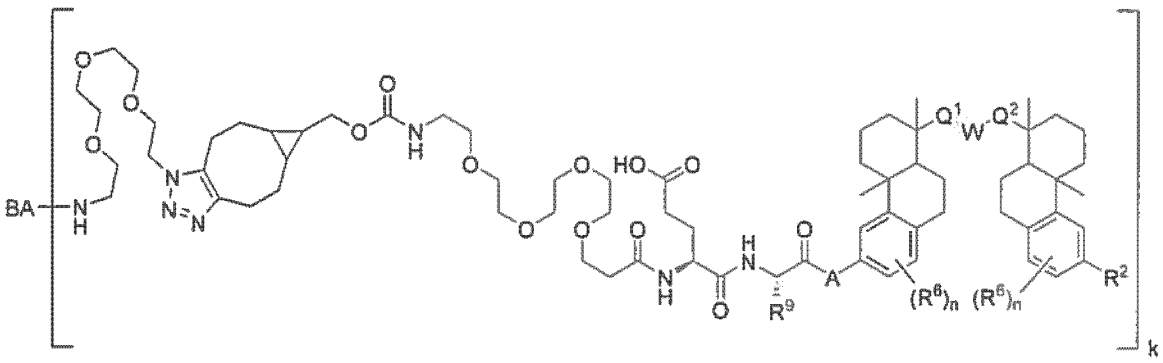
$-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1-5}C(O)NH(CH_2)_{1-5}SO_3H)_2$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5.

[00160] В некоторых вариантах осуществления конъюгат представляет собой:





или



или фармацевтически приемлемую соль, сольват, или его стереоизомерную форму, или его региоизомер, где:

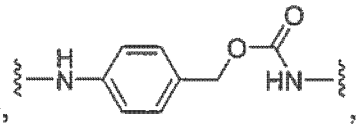
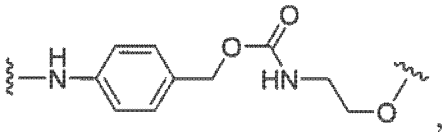
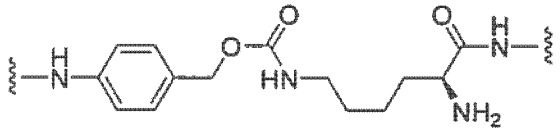
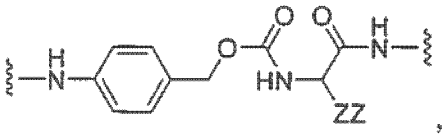
BA представляет собой связующий агент;

k представляет собой целое число от 1 до 30;

$\mathbf{Q^1}$, $\mathbf{Q^2}$, **W**, $\mathbf{R^1}$, $\mathbf{R^2}$, $\mathbf{R^4}$, $\mathbf{R^5}$ и $\mathbf{R^6}$ имеют значения, описанные в контексте формулы I;

каждый  является связью с усиливающей группой;

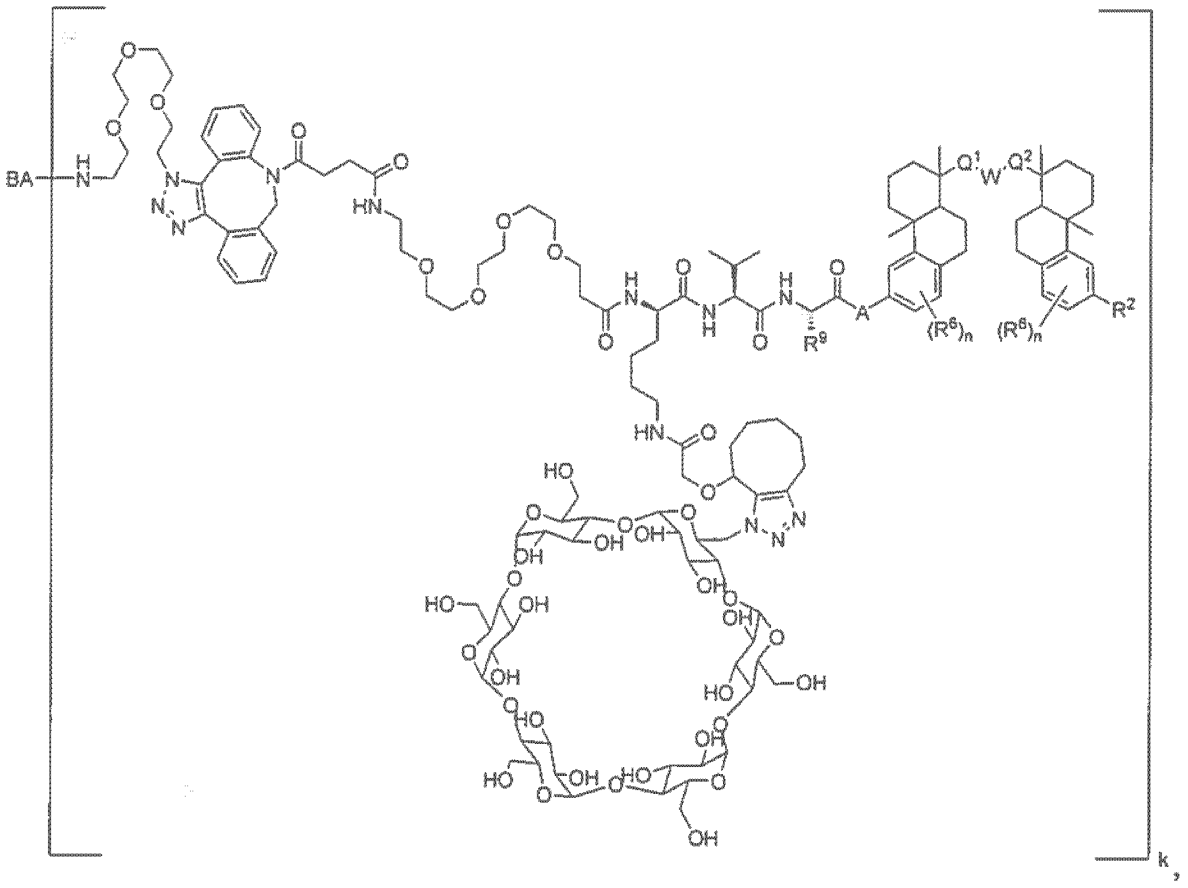
каждый $\mathbf{R^9}$ представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

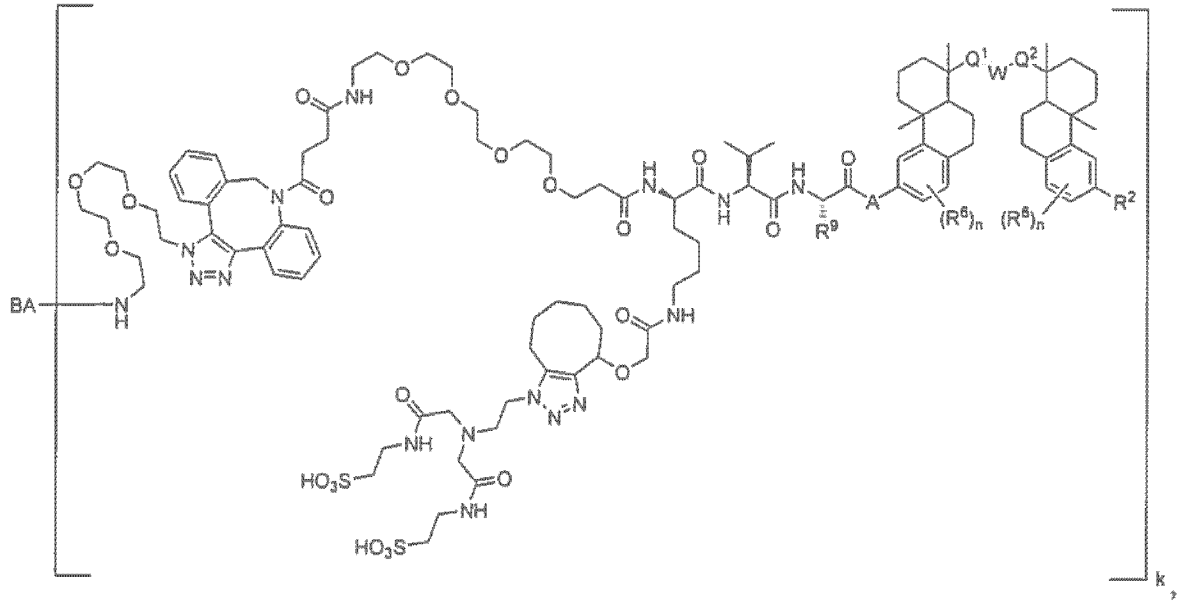
каждый A представляет собой –O–, –N(H)-,  ,  ,  или  , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой $C_{1\text{-}6}$ алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой $C_{1\text{-}6}$ гетероалкил.

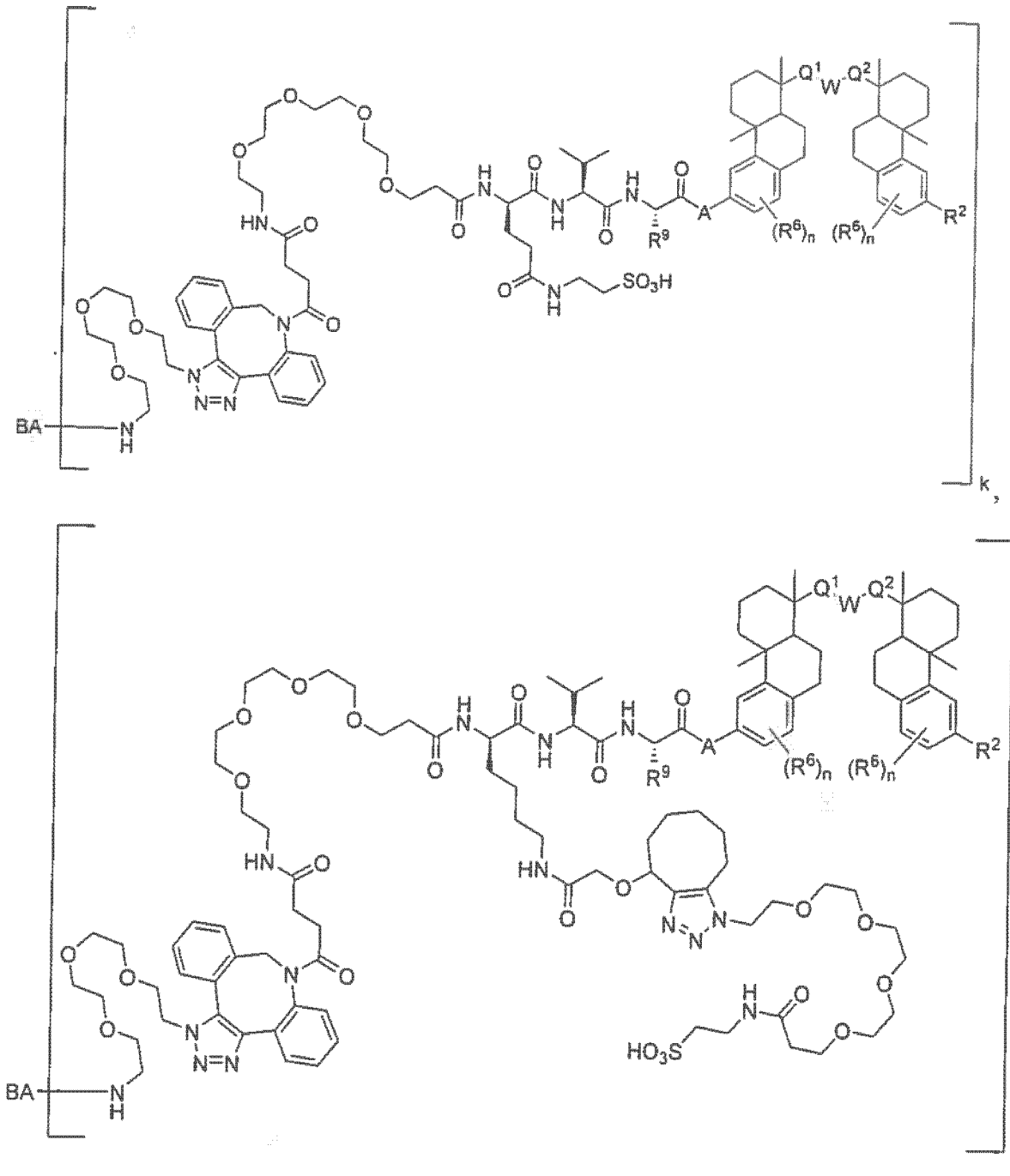
[00161] В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой гидрофильную группу. В некоторых вариантах осуществления усиливающий агент представляет собой циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновую кислоту. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалистам. В некоторых вариантах осуществления

циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин, бета-циклодекстрин или гамма-циклодекстрин или их смеси. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой гамма-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, или $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5 и **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил- или алкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$. В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5.

[00162] В некоторых вариантах осуществления соединение или конъюгат представляет собой:







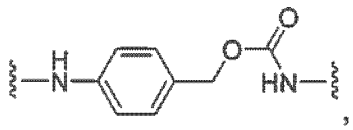
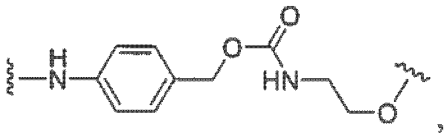
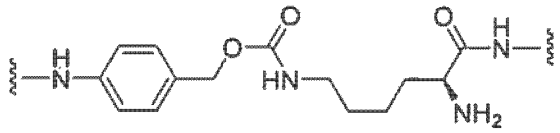
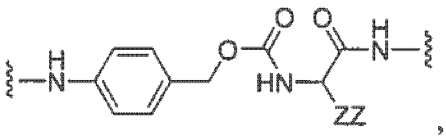
или фармацевтически приемлемую соль, сольват, или его стереоизомерную форму, или его региоизомер, где:

BA представляет собой связующий агент;

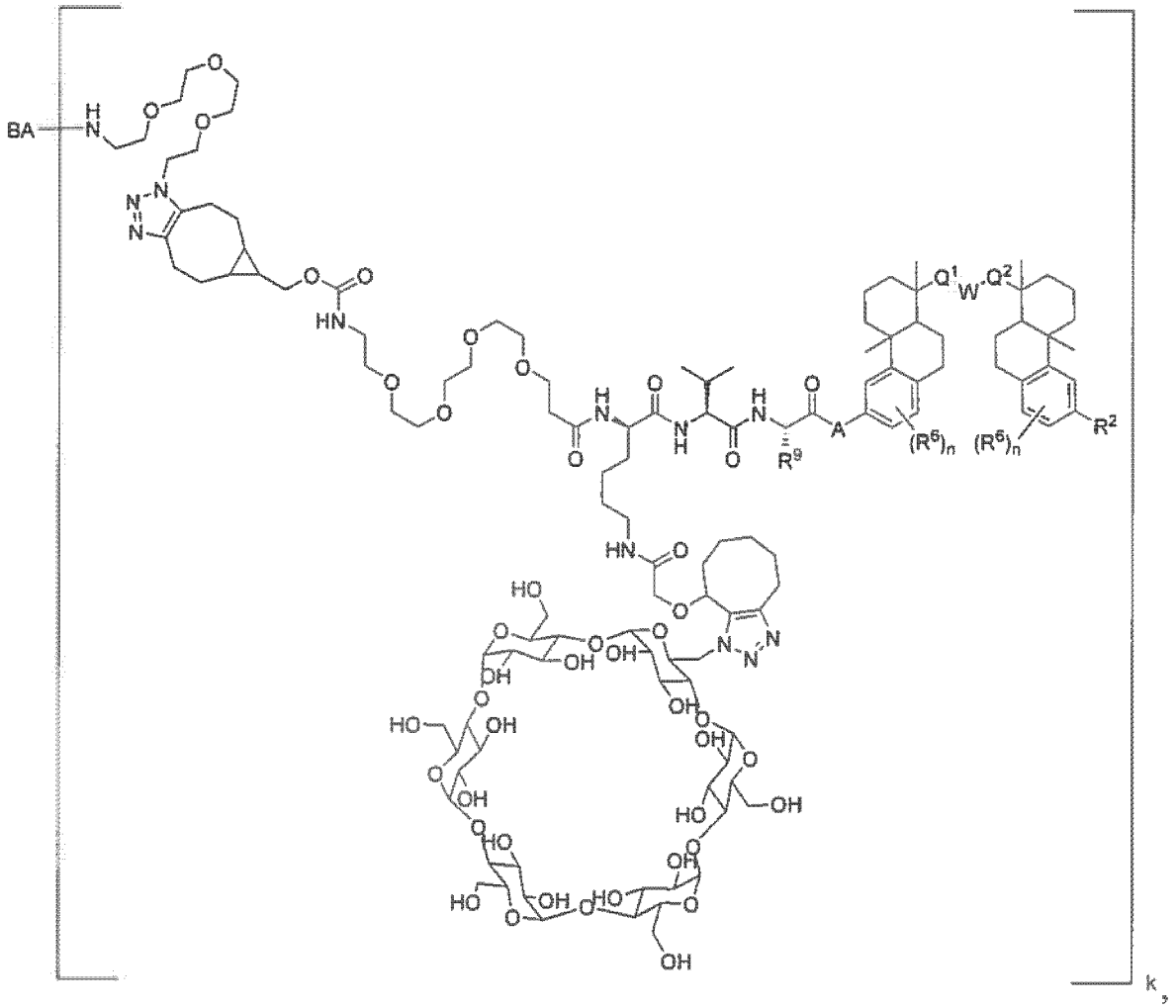
k представляет собой целое число от 1 до 30;

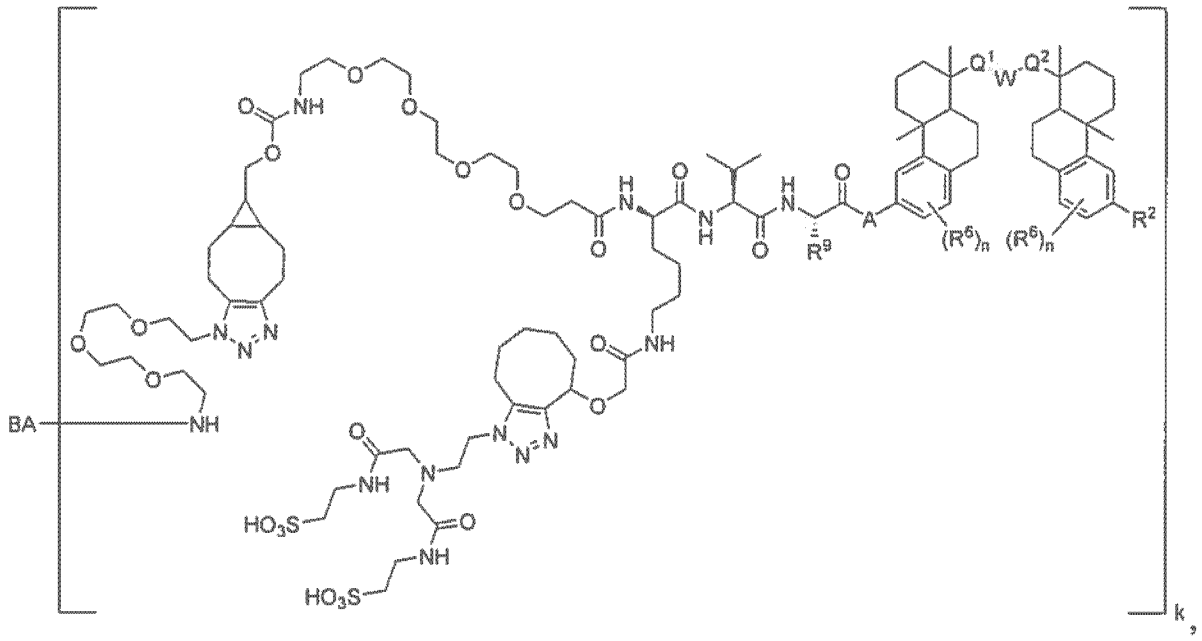
Q^1, Q^2, W, R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I;

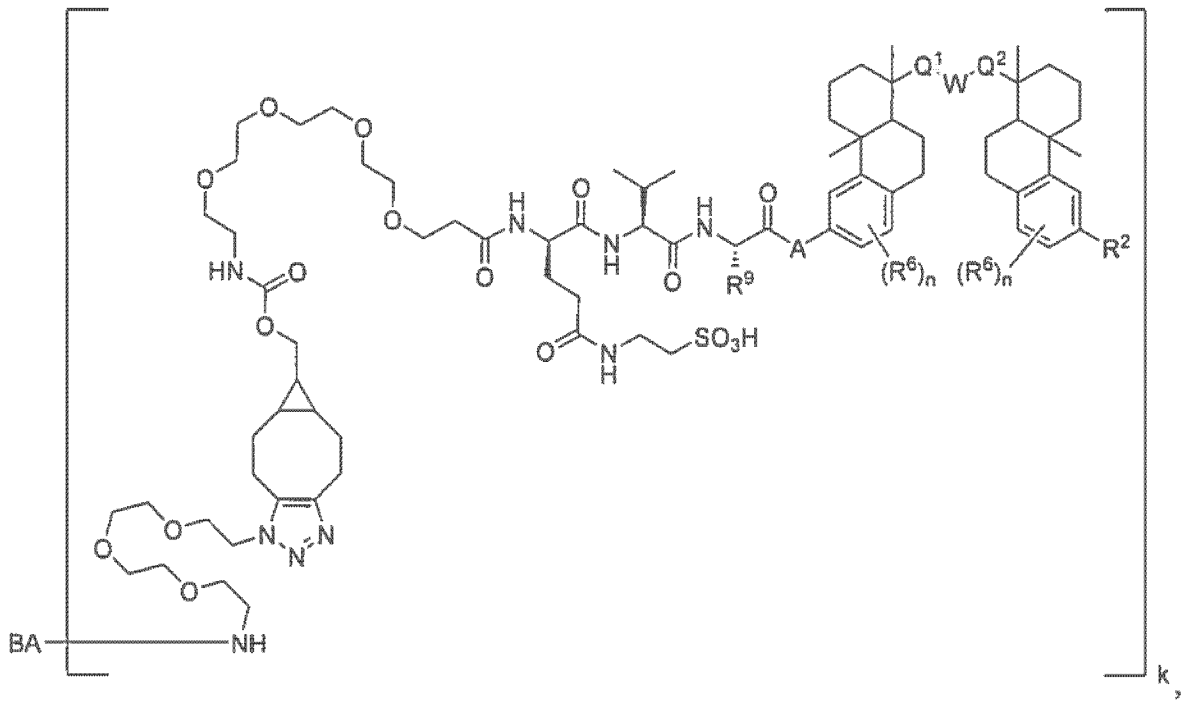
каждый R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

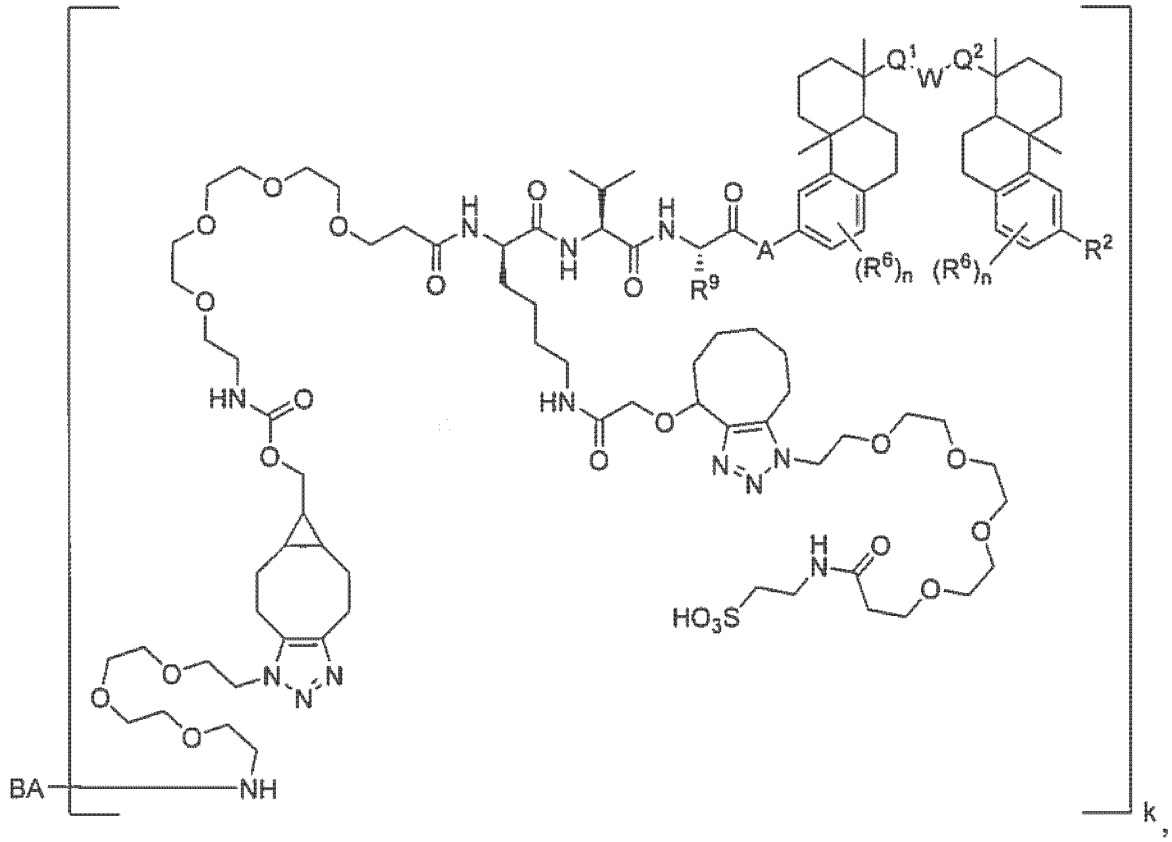
каждый A представляет собой –O–, –N(H)-,  ,  ,  или  , где ZZ представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте ZZ представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте ZZ представляет собой C_{1-6} гетероалкил.

[00163] В некоторых вариантах осуществления соединение или конъюгат представляет собой:









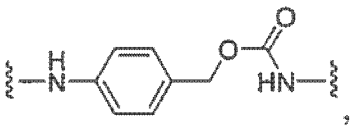
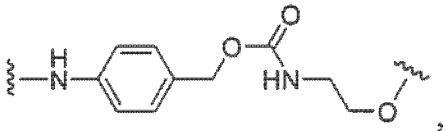
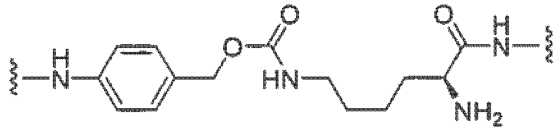
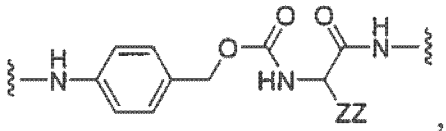
или фармацевтически приемлемую соль, сольват, или его стереоизомерную форму, или его региоизомер, где:

BA представляет собой связующий агент;

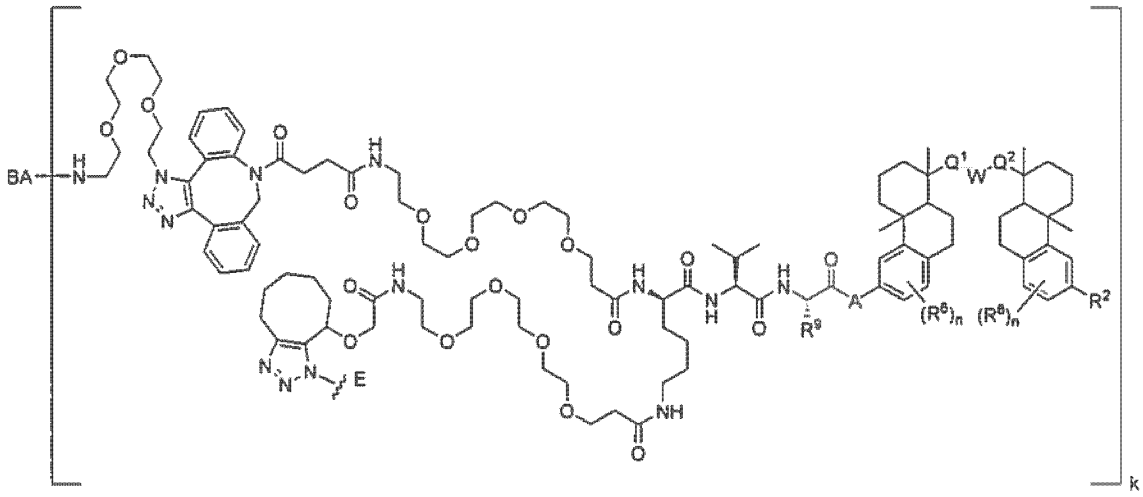
k представляет собой целое число от 1 до 30;

Q^1, Q^2, **W**, R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I;

каждый R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждый **A** представляет собой –O–, –N(H)-,  ,  ,  или  , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил.

[00164] В некоторых вариантах осуществления соединение или конъюгат представляет собой:



или фармацевтически приемлемую соль, сольват, или его стереоизомерную форму, или его региоизомер, где:

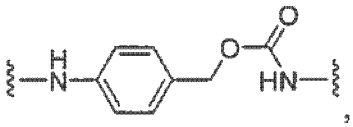
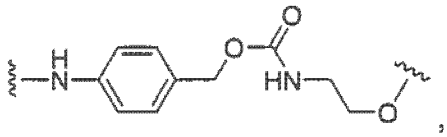
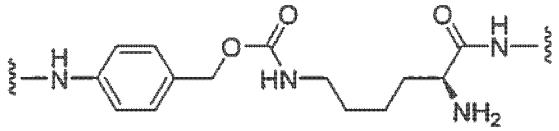
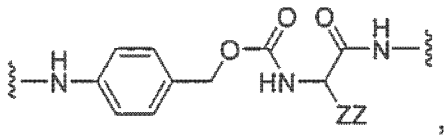
BA представляет собой связующий агент;

k представляет собой целое число от 1 до 30;

Q^1, Q^2, **W**, R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I;

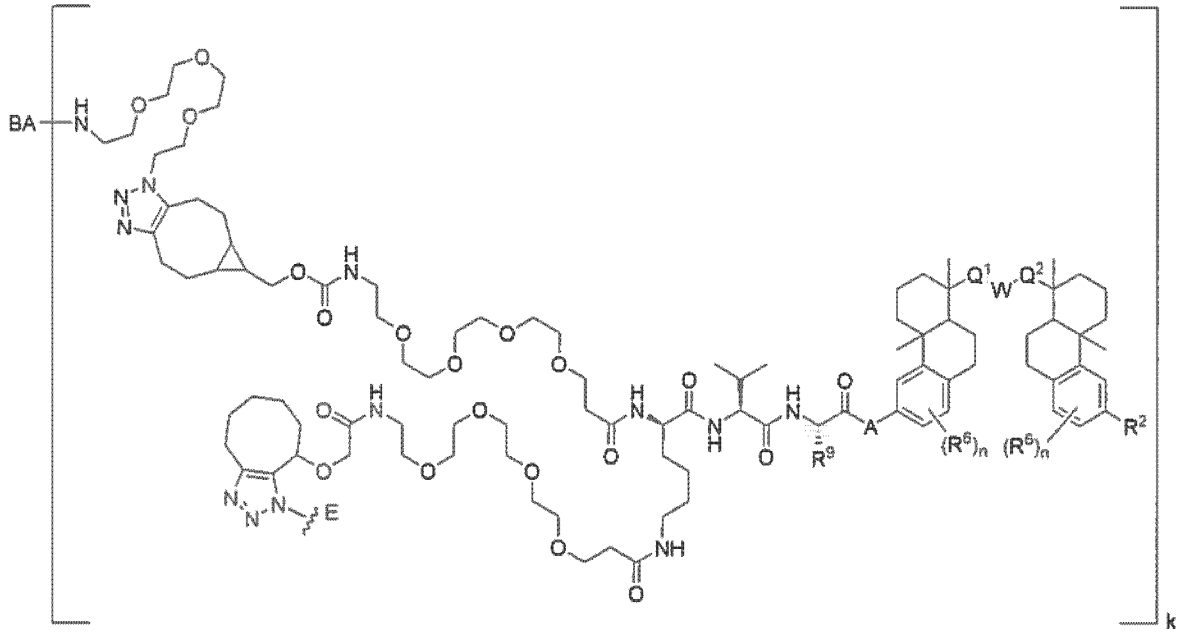
каждый  является связью с усиливающей группой;

каждый R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждый **A** представляет собой –O–, –N(H)-,  ,  ,  или  , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой гидрофильную группу. В некоторых вариантах осуществления усиливающий агент представляет собой

циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновую кислоту. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалистам. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин, бета-циклодекстрин или гамма-циклодекстрин или их смеси. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой гамма-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, или $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5 и **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил- или алкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$. В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5.

[00165] В некоторых вариантах осуществления соединение или конъюгат представляет собой:



или фармацевтически приемлемую соль, сольват, или его стереоизомерную форму, или его региоизомер, где:

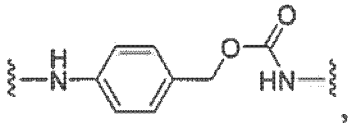
BA представляет собой связующий агент;

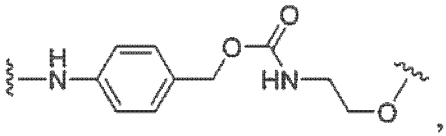
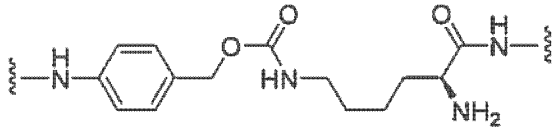
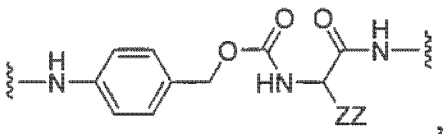
k представляет собой целое число от 1 до 30;

Q^1, Q^2, **W**, R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I;

каждый  является связью с усиливающей группой;

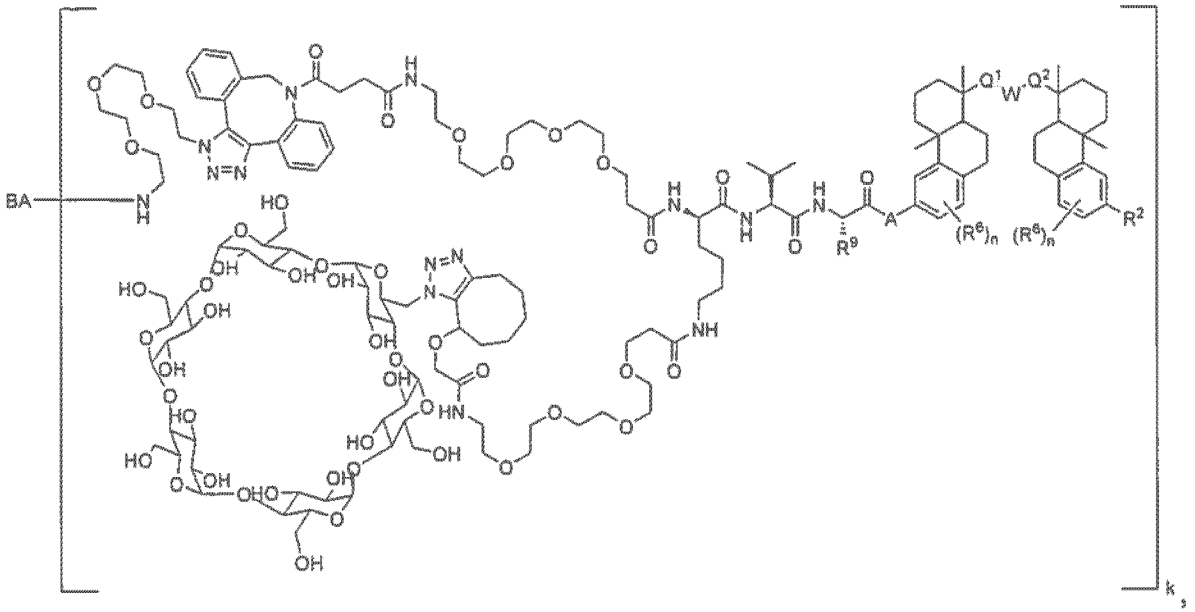
каждый R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

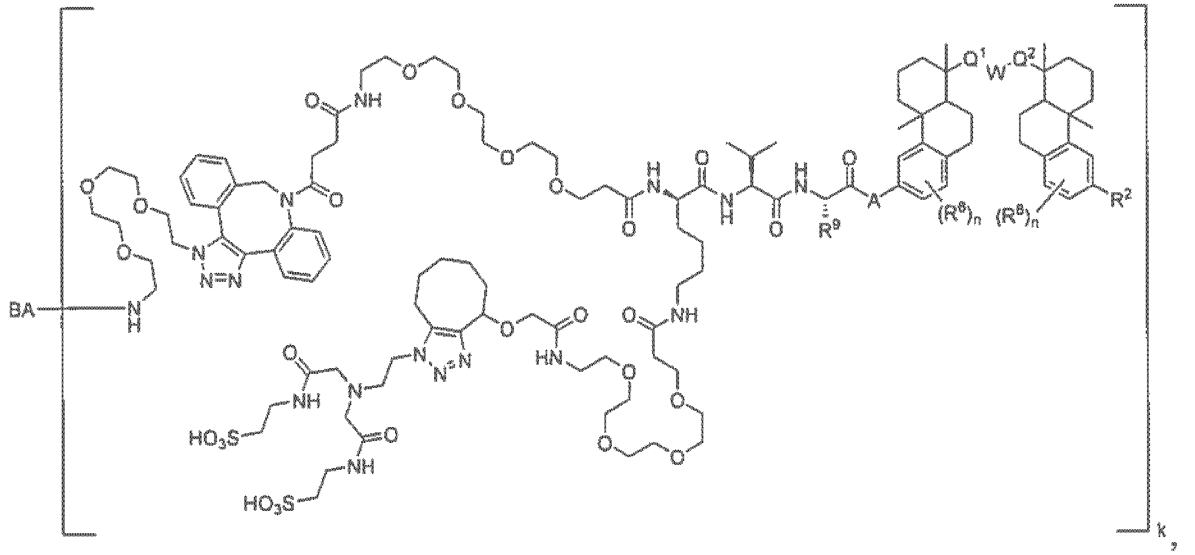
каждый **A** представляет собой –O–, –N(H)-,  ,

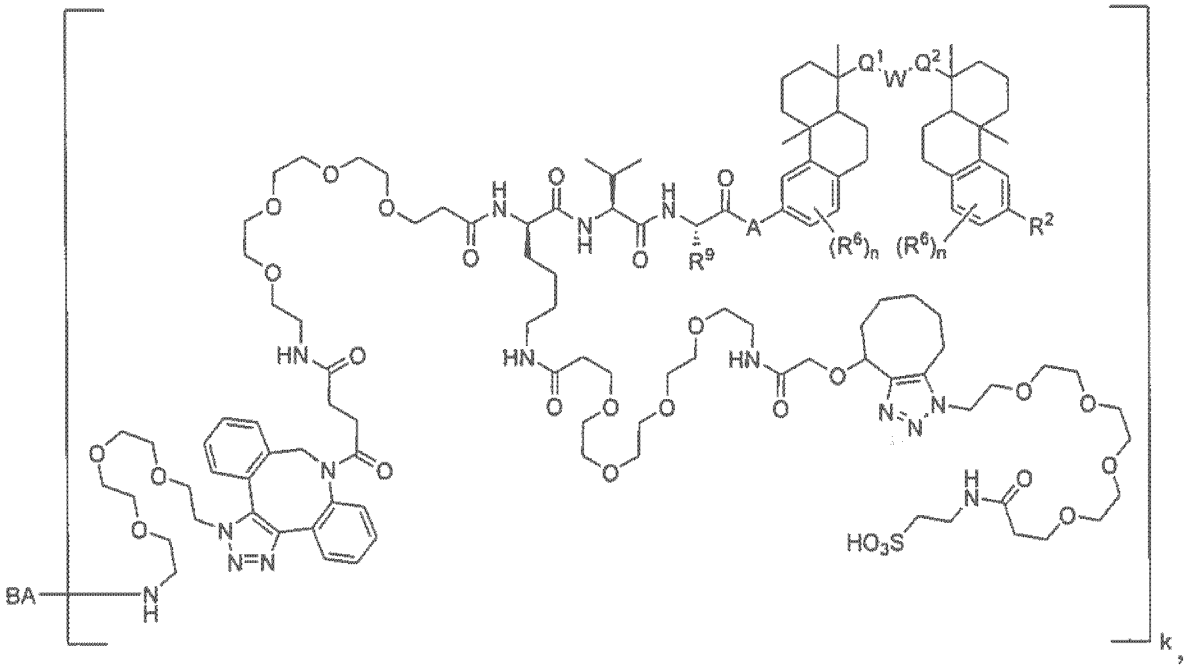
 ,  или  , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой гидрофильную группу. В некоторых вариантах осуществления усиливающий агент представляет собой

циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления усиливающая группа представляет собой алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновую кислоту. Циклодекстрин может быть любым циклодекстрином, известным специалистам. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин, бета-циклодекстрин или гамма-циклодекстрин или их смеси. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой альфа-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представляет собой гамма-циклодекстрин. В некоторых вариантах осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, или $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5 и **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В одном варианте осуществления алкил- или алкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$. В другом варианте осуществления гетероалкил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)NH-(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2)_{n2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **n2** равно 1, 2, 3, 4 или 5. В другом варианте осуществления алкил, гетероалкил, алкиленил или гетероалкиленилсульфоновая кислота представляет собой $-(CH_2CH_2O)_{m2}-C(O)N((CH_2)_{1\text{-}5}C(O)NH(CH_2)_{1\text{-}5}SO_3H)_2$, где **m2** равно 1, 2, 3, 4 или 5.

[00166] В некоторых вариантах осуществления соединение или конъюгат представляет собой:







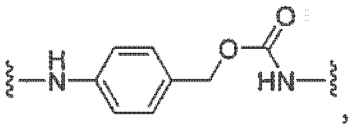
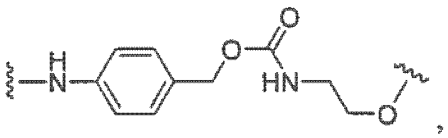
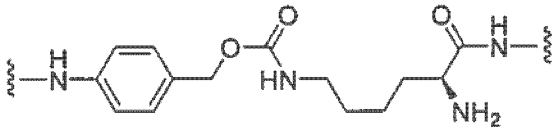
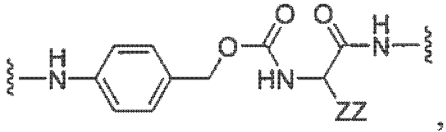
или фармацевтически приемлемую соль, сольват, или его стереоизомерную форму, или его региоизомер, где:

BA представляет собой связующий агент;

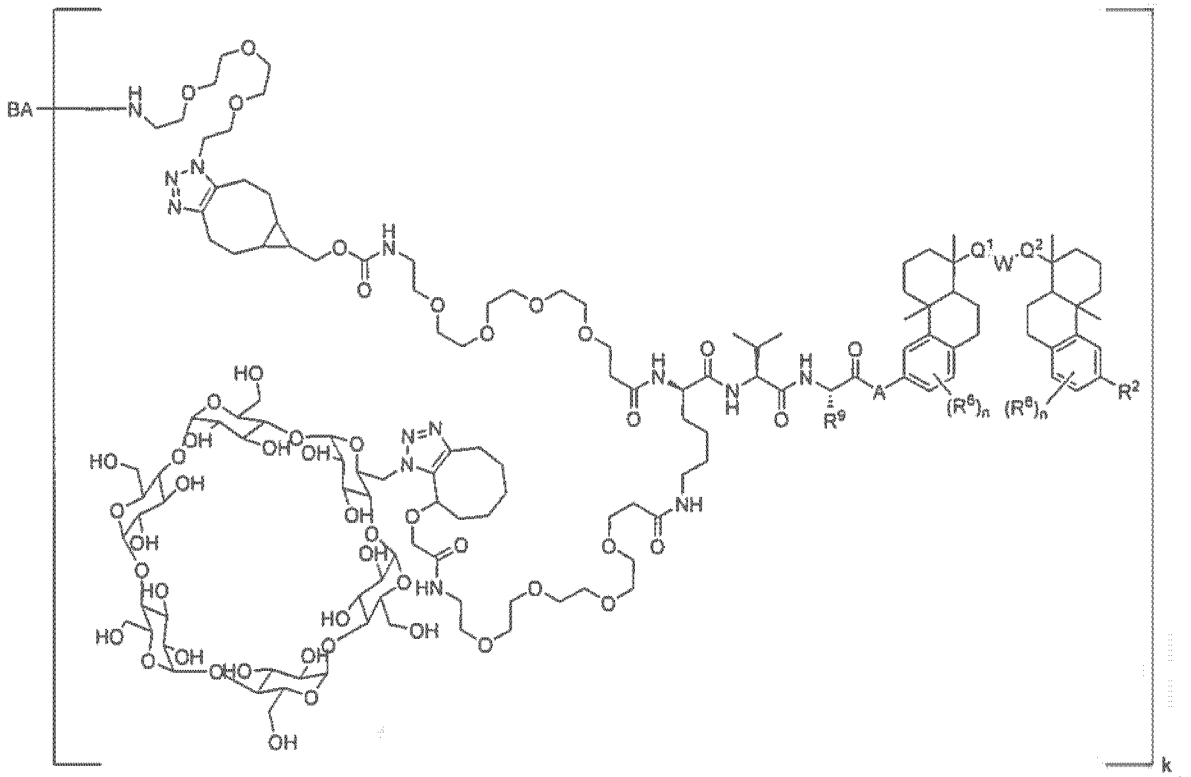
k представляет собой целое число от 1 до 30;

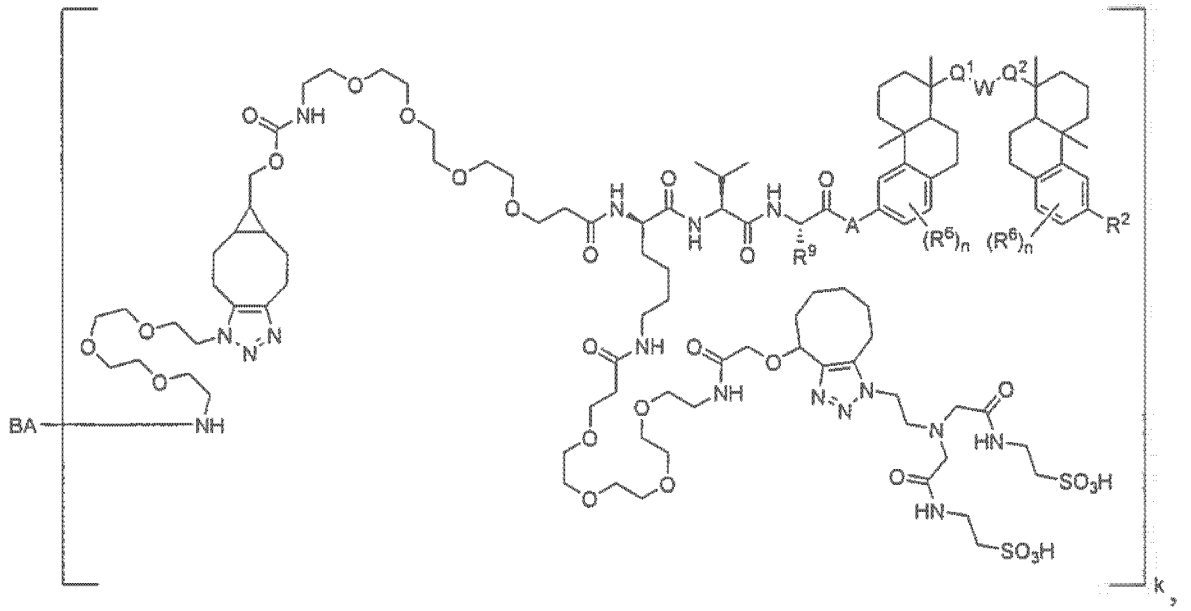
Q^1, Q^2, **W**, R^1, R^2, R^4, R^5 и R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I;

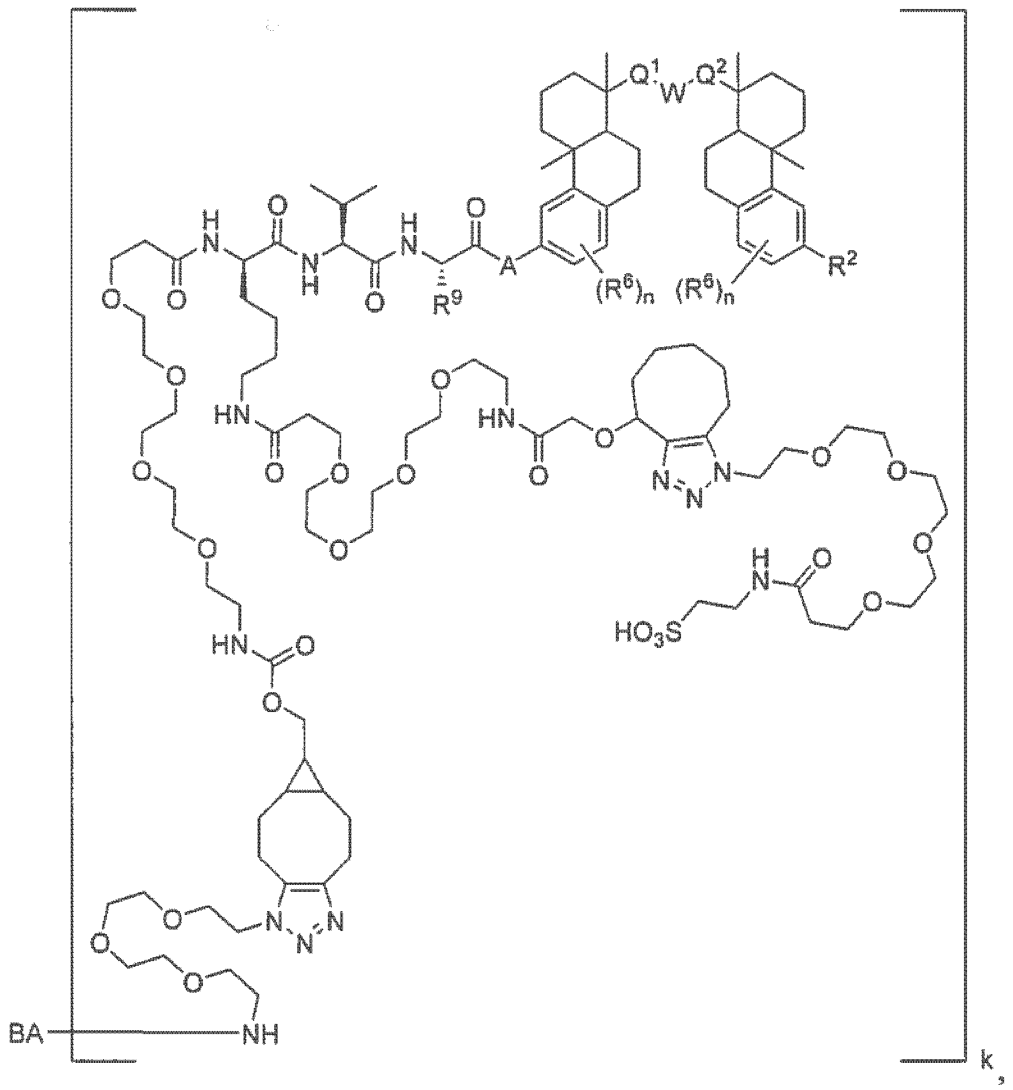
каждый R^9 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

каждый **A** представляет собой –O–, –N(H)-,  ,  ,  или  , где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил.

[00167] В некоторых вариантах осуществления соединение или конъюгат представляет собой:







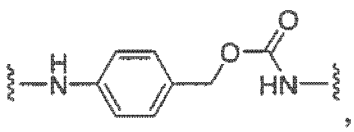
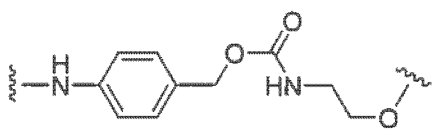
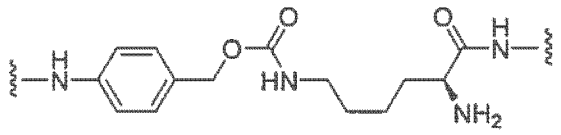
или фармацевтически приемлемую соль, сольват, или его стереоизомерную форму, или его региоизомер, где:

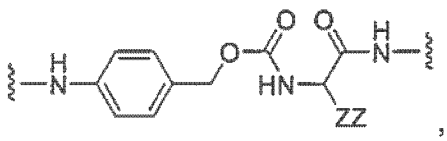
BA представляет собой связующий агент;

k представляет собой целое число от 1 до 30;

Q^1, Q^2, W, R^1, R^2, R^4, R^5, R^6 имеют значения, описанные в контексте формулы I;

каждый R^9 представляет собой $–CH_3$ или $–(CH_2)_3N(H)C(O)NH_2$; и

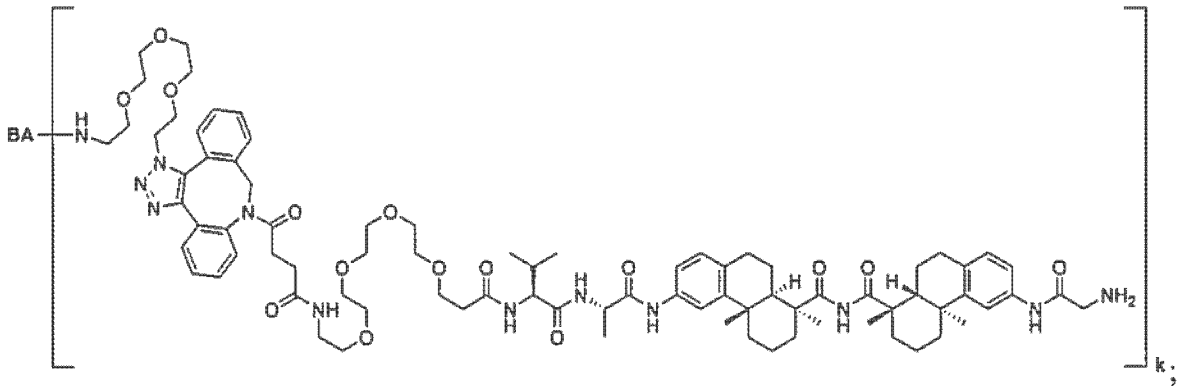
каждый A представляет собой –O–, –N(H)-,  ,  ,  или

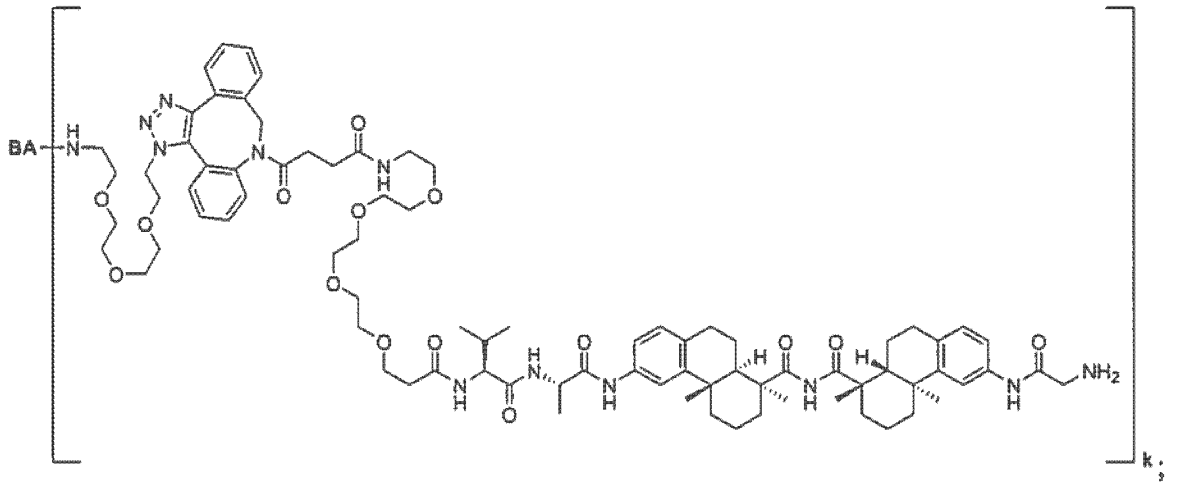


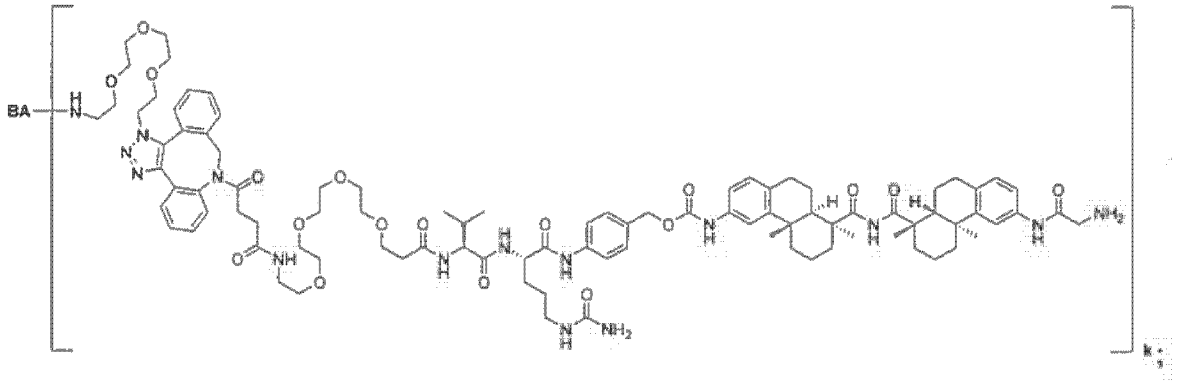
, где **ZZ** представляет собой водород или боковую цепь для аминокислоты, как обсуждается в другой части настоящего документа. Например, в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} алкил. В качестве дополнительного примера в одном варианте **ZZ** представляет собой C_{1-6} гетероалкил.

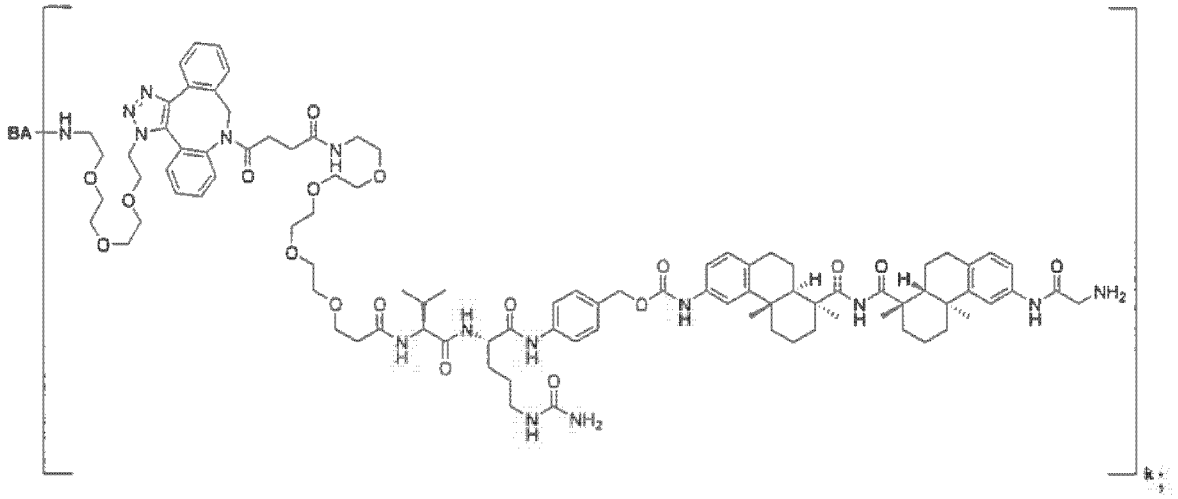
[00168] В каждом из вышеуказанных вариантов осуществления конъюгаты могут быть получены из связывающих агентов, функционализированных азидными группами и их остатками, как описано в разделах ниже. Для удобства остаток триазола в нескольких приведенных выше структурах показан в скобках. Специалисты поймут, что триазол может быть образован из азидной группы связующего агента, дериватизированного азидом, и алкина соединения линкер-полезная нагрузка.

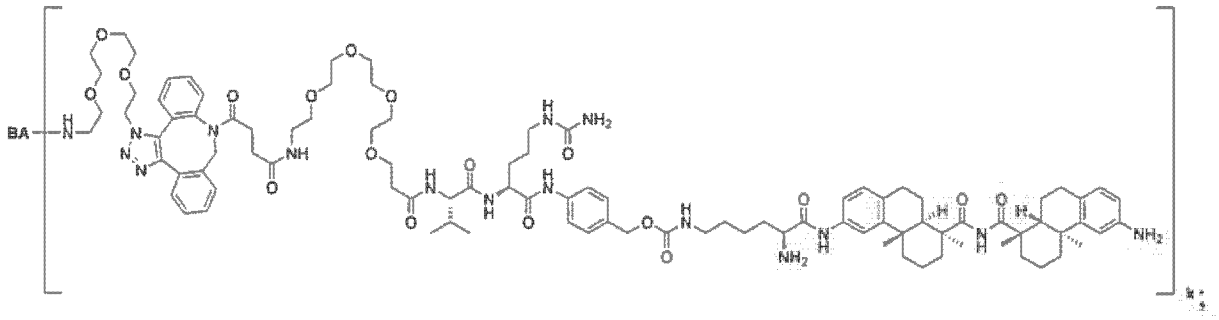
[00169] В некоторых вариантах осуществления соединение или конъюгат выбирают из:

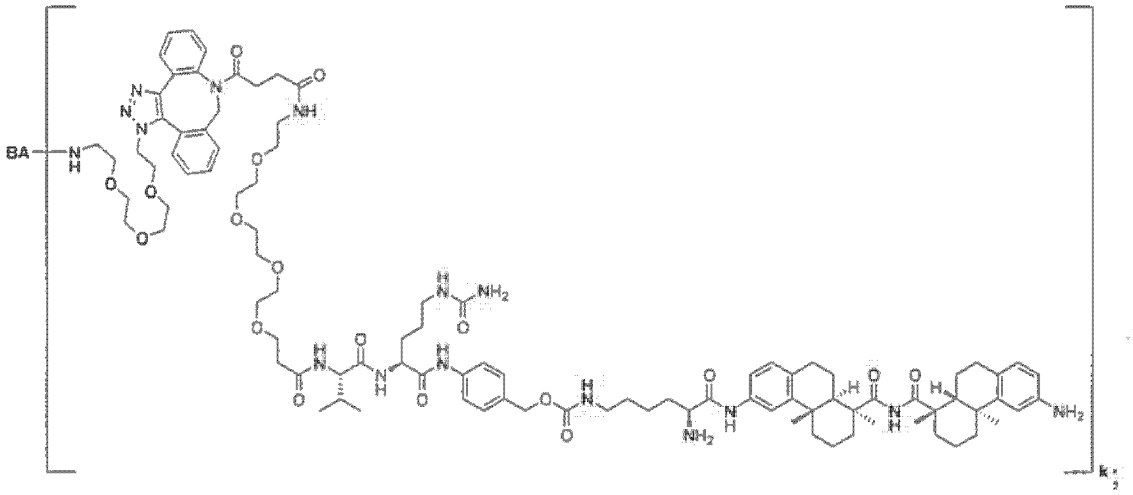


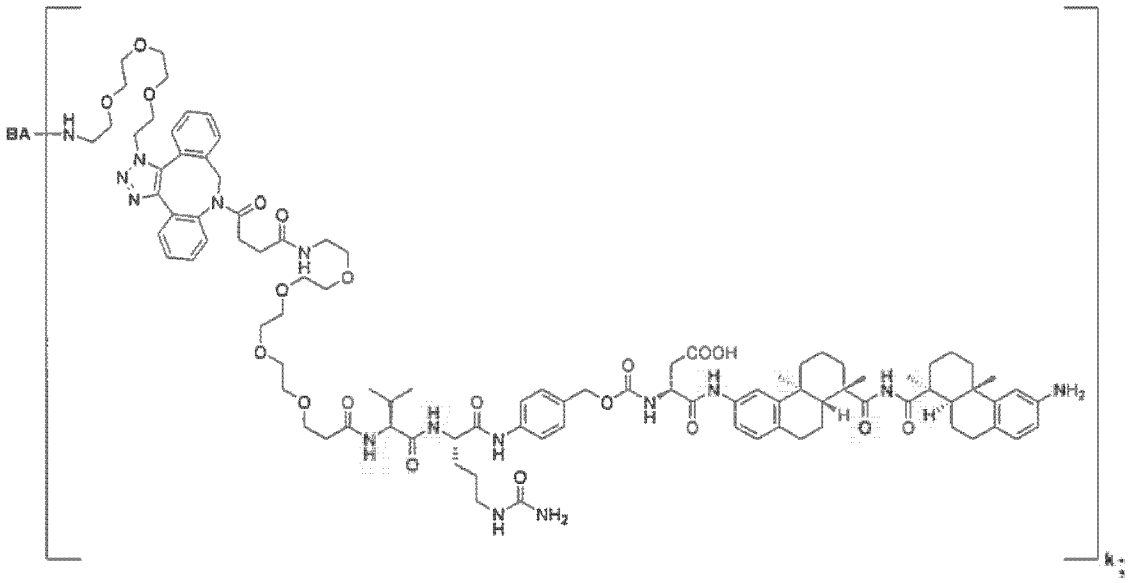


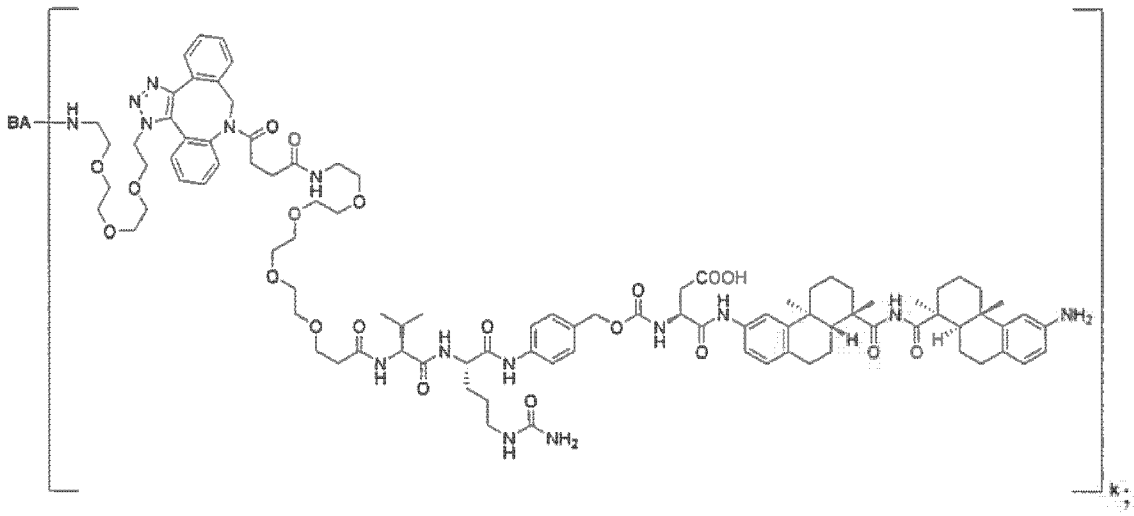

BA
k

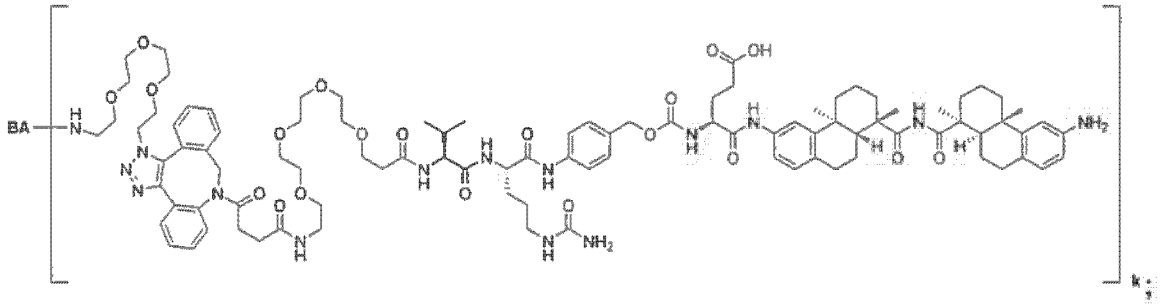

BA
k

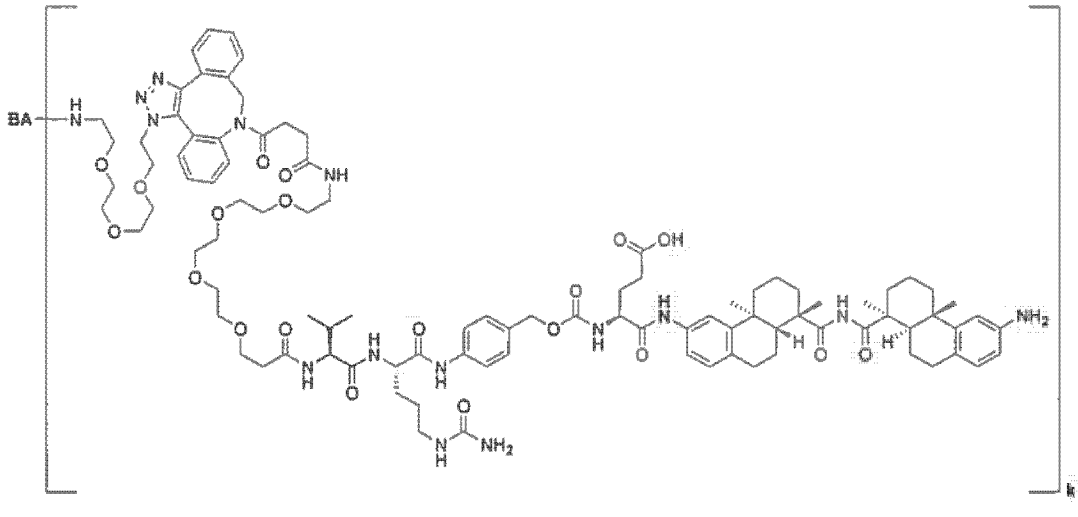

BA
k

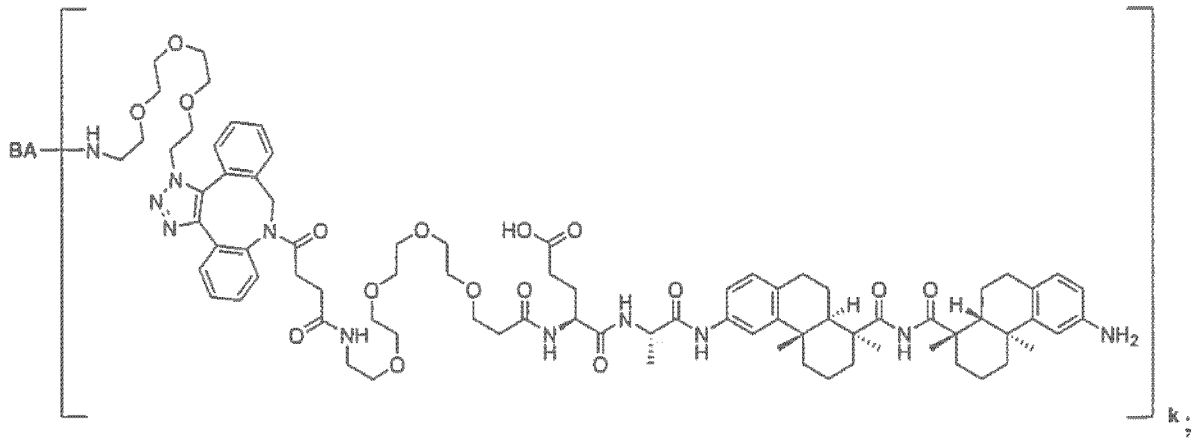


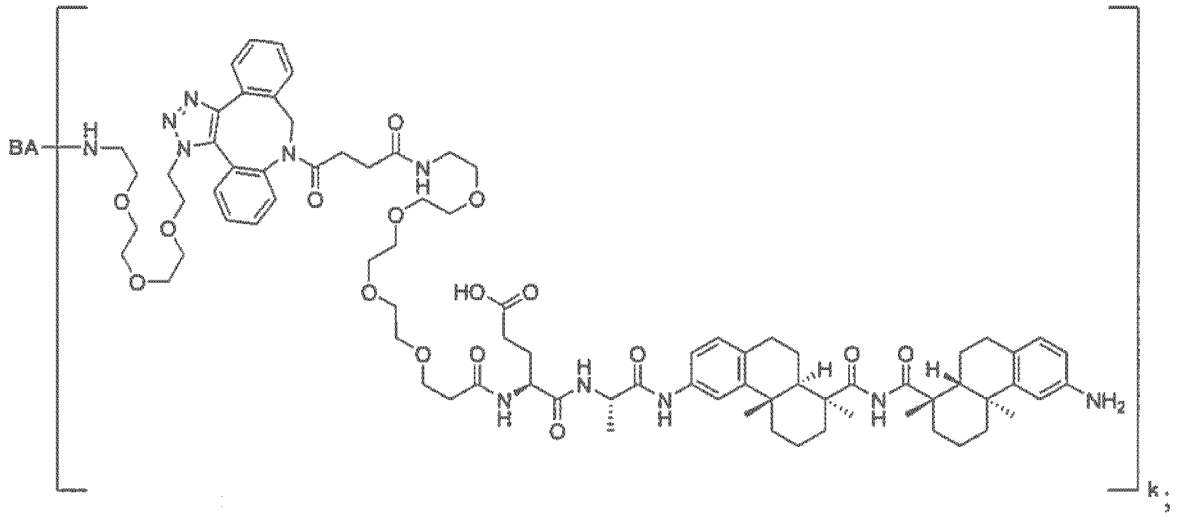


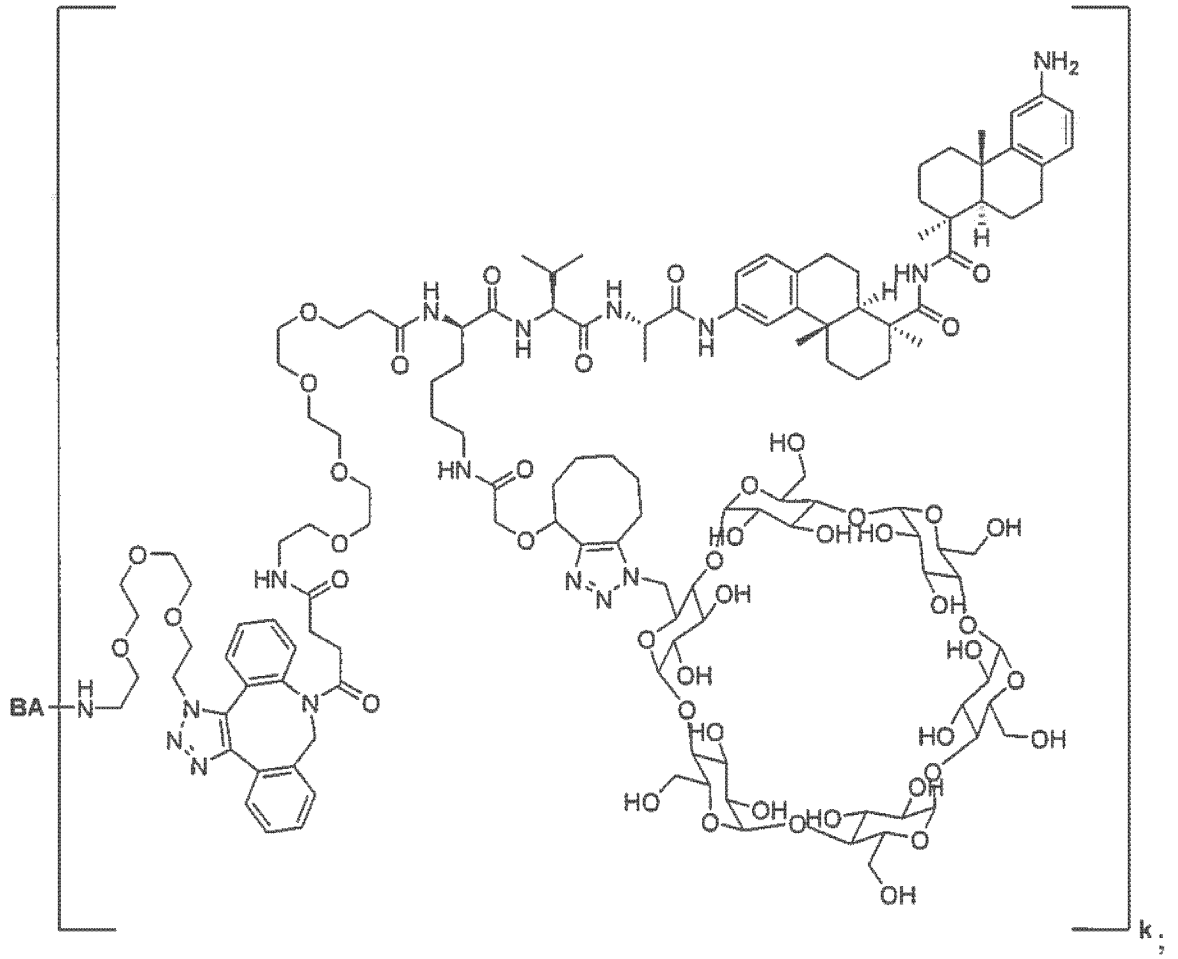


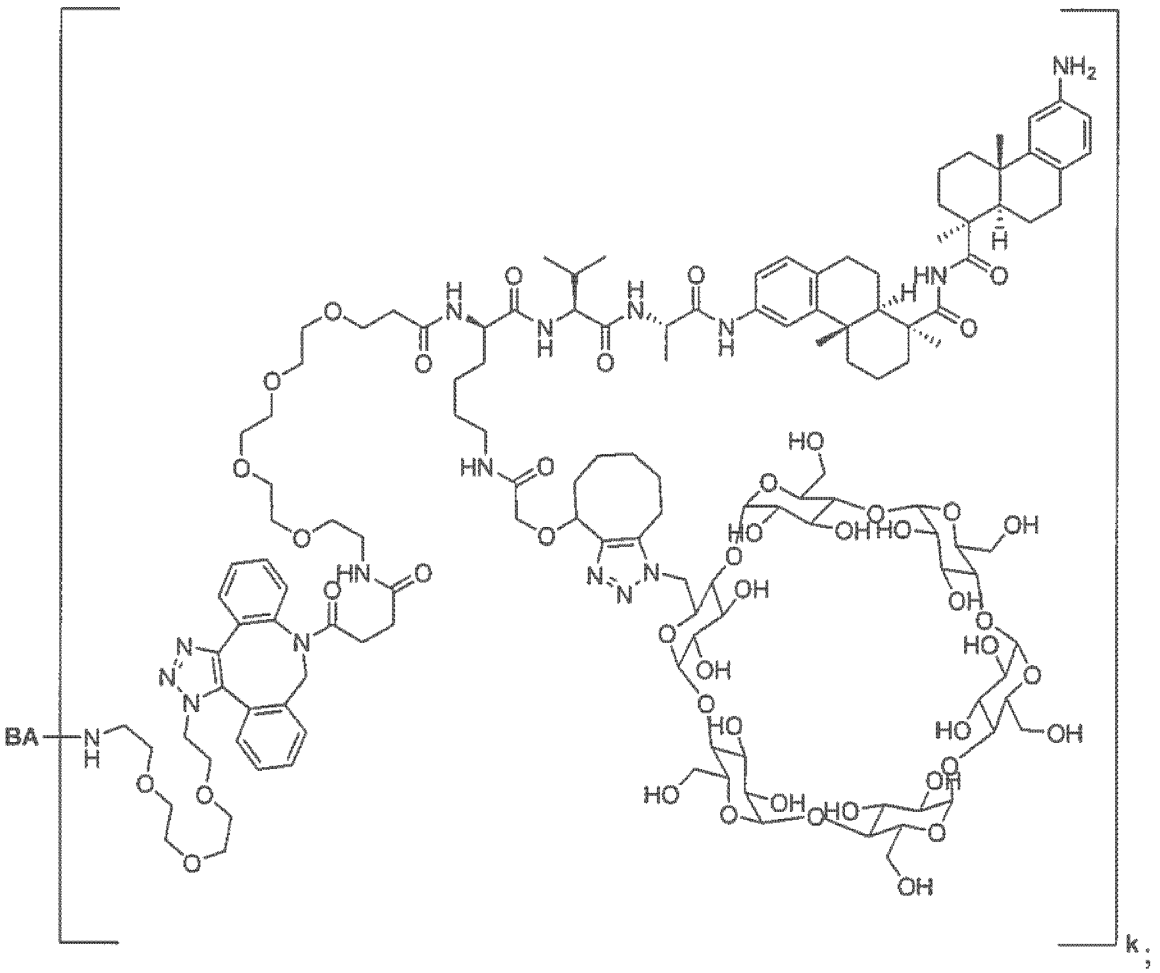


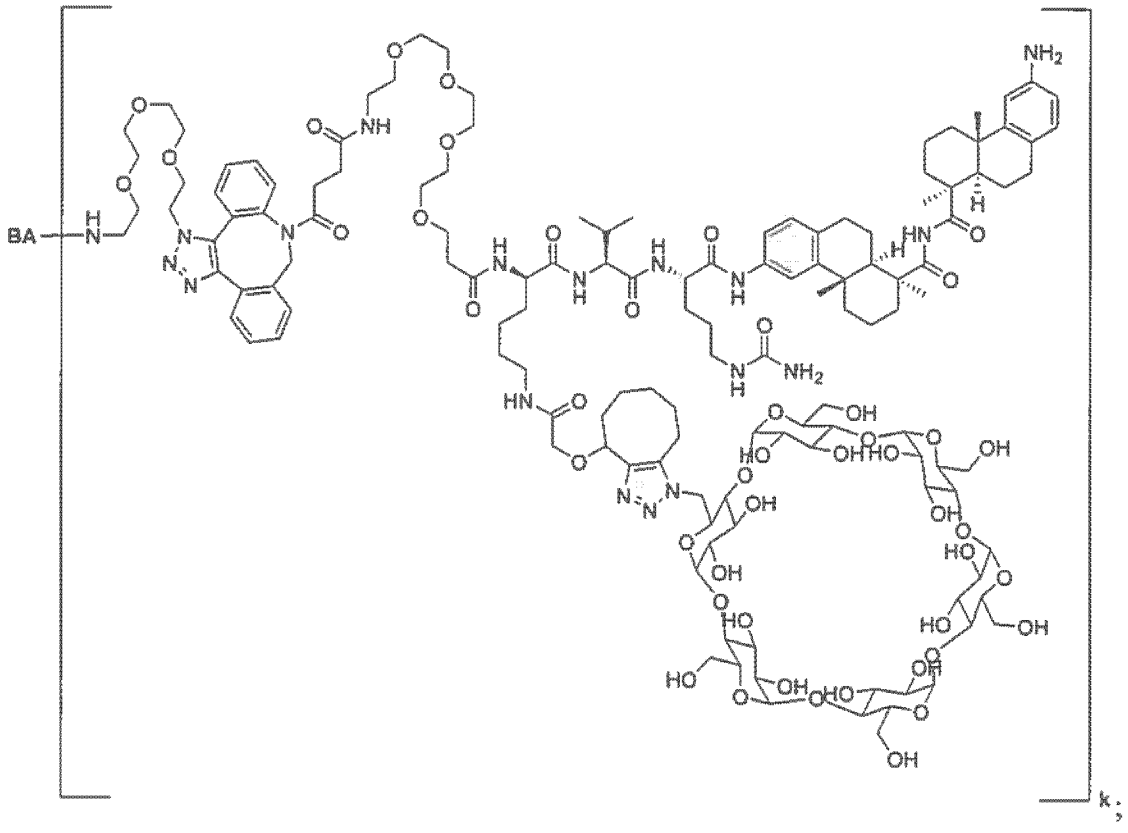


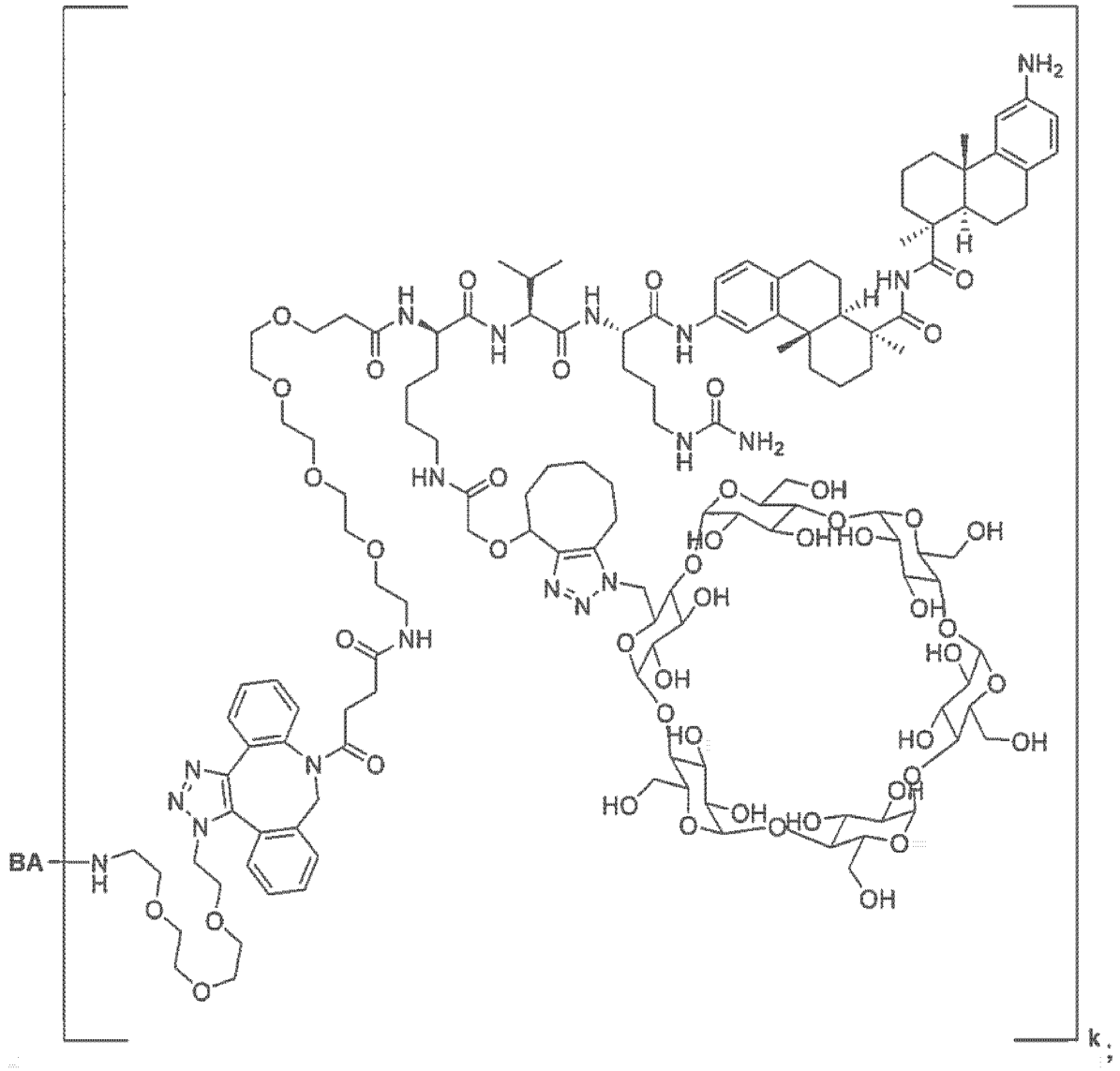


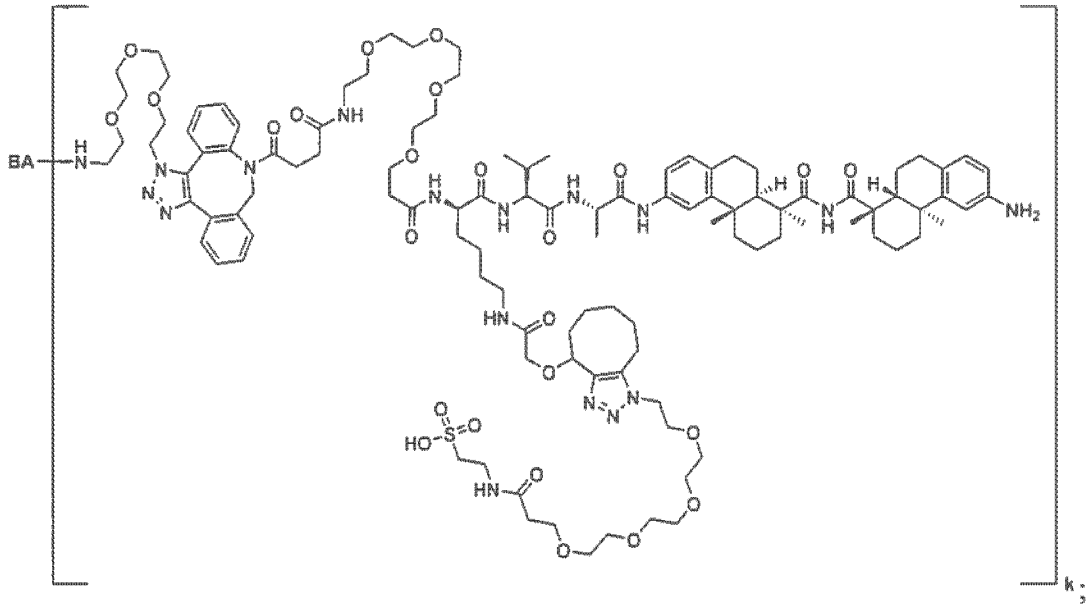


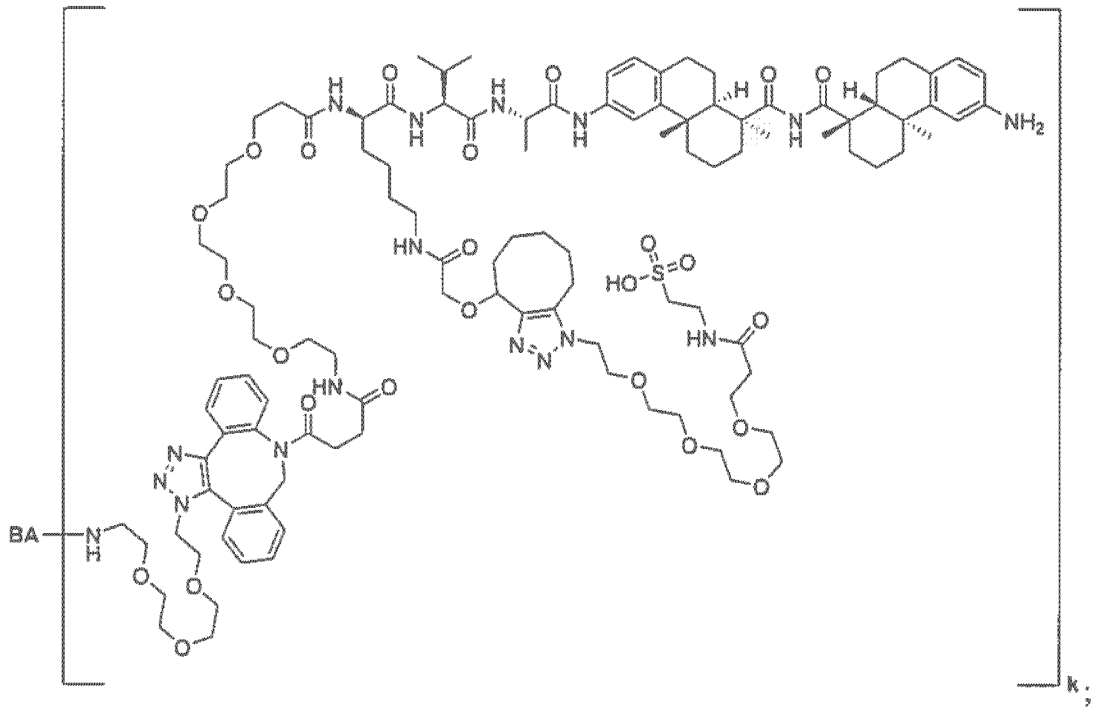


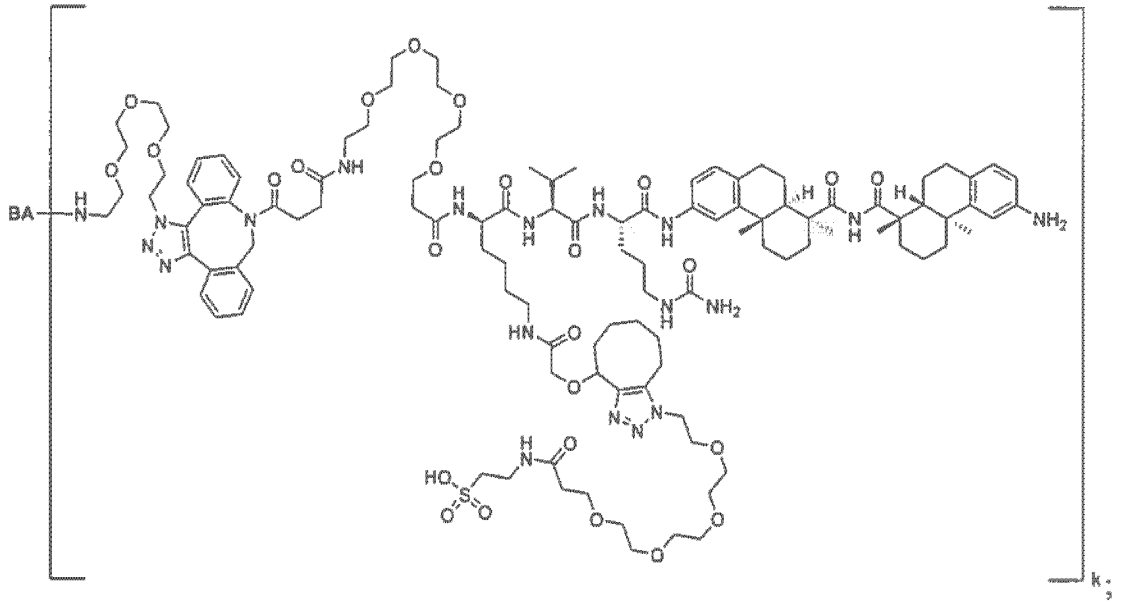


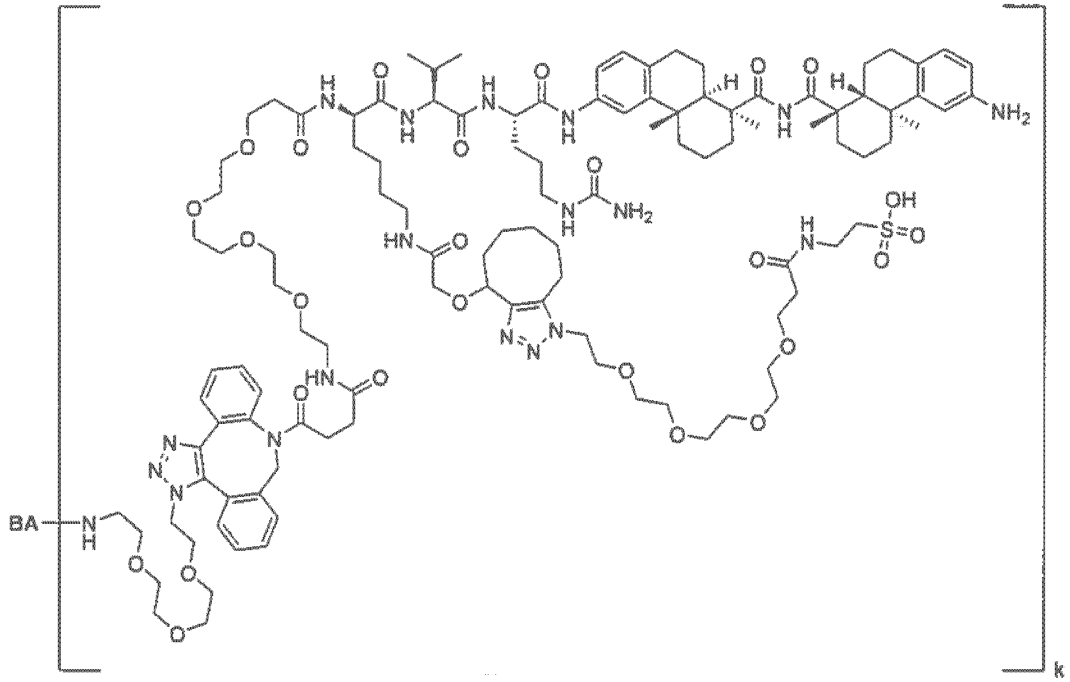



BA
NH2
OH
HO
NH
HN
O
N
k;

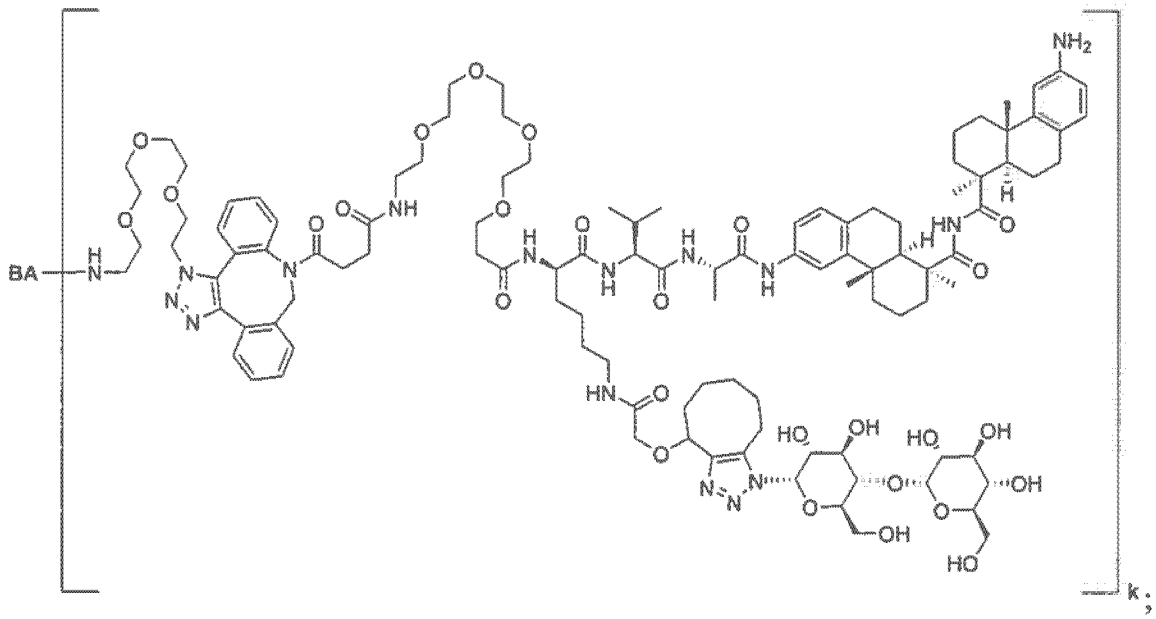

BA
NH2
HO-S
HN
NH
O
N
k;


BA
HN
HO
S
NH2
k;

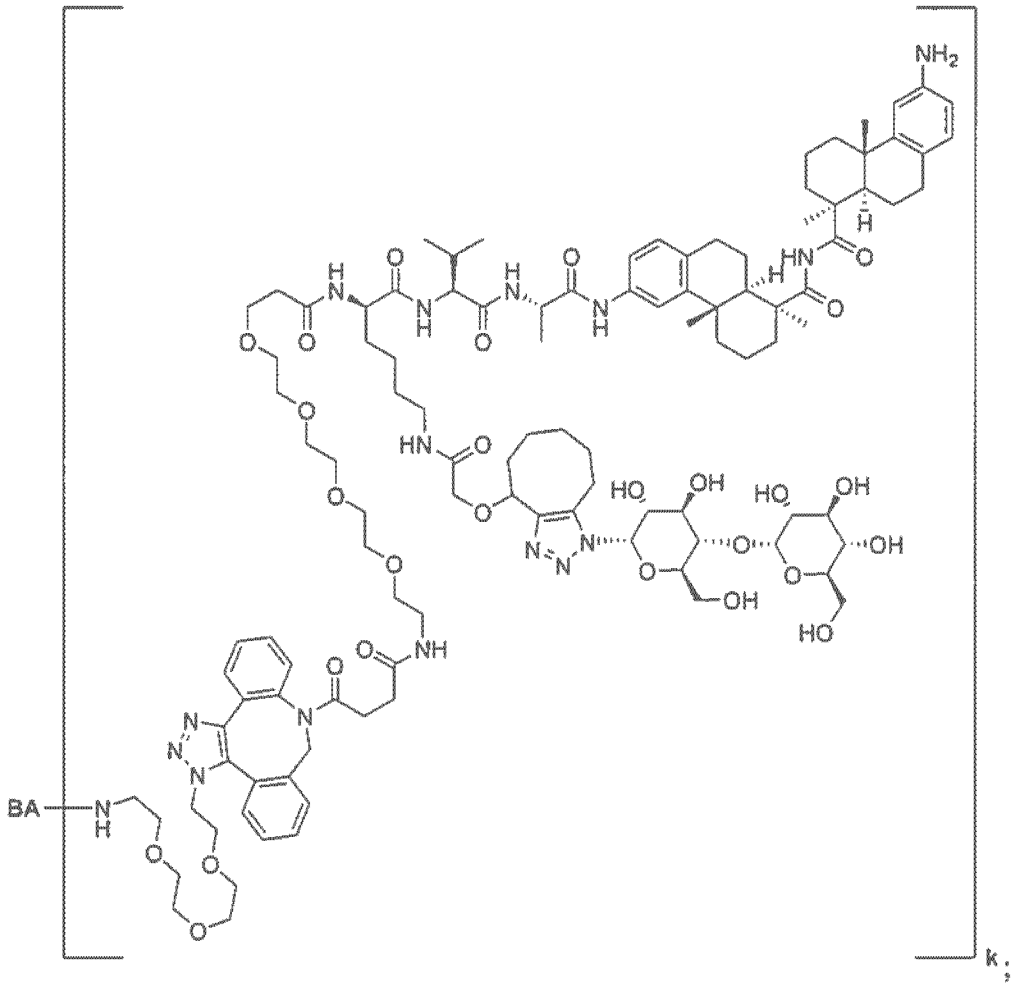

BA
NH
HN
NH2
HO
S
k;

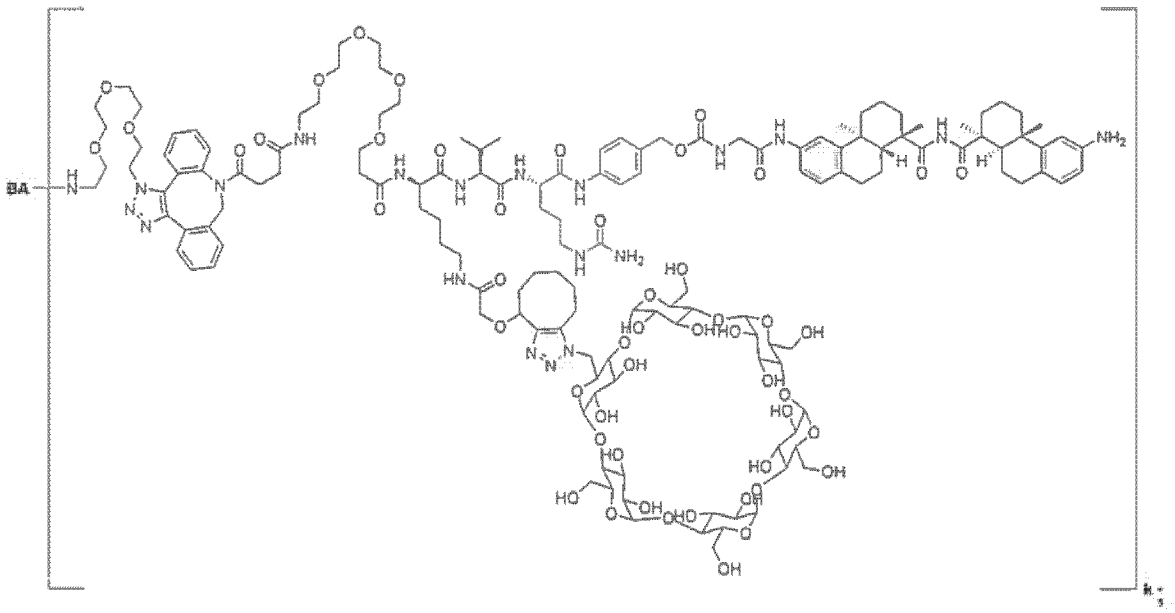


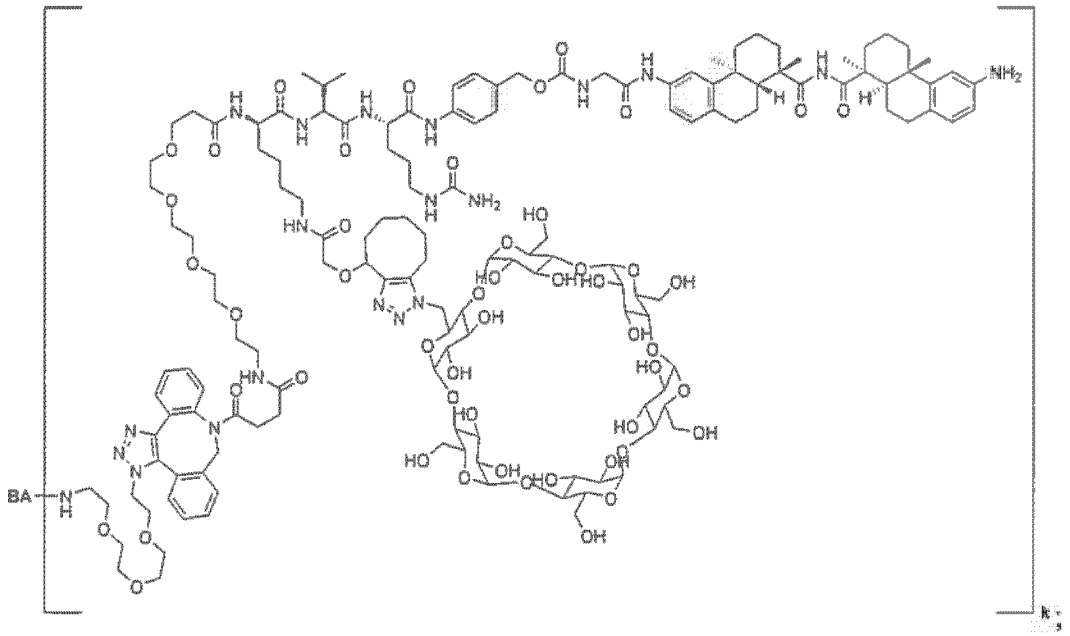
;

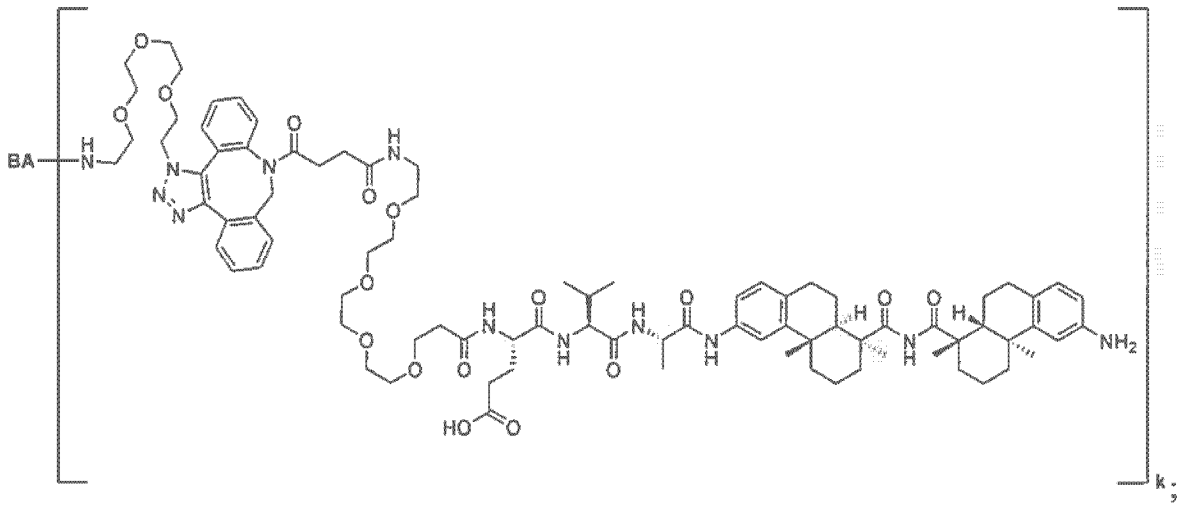


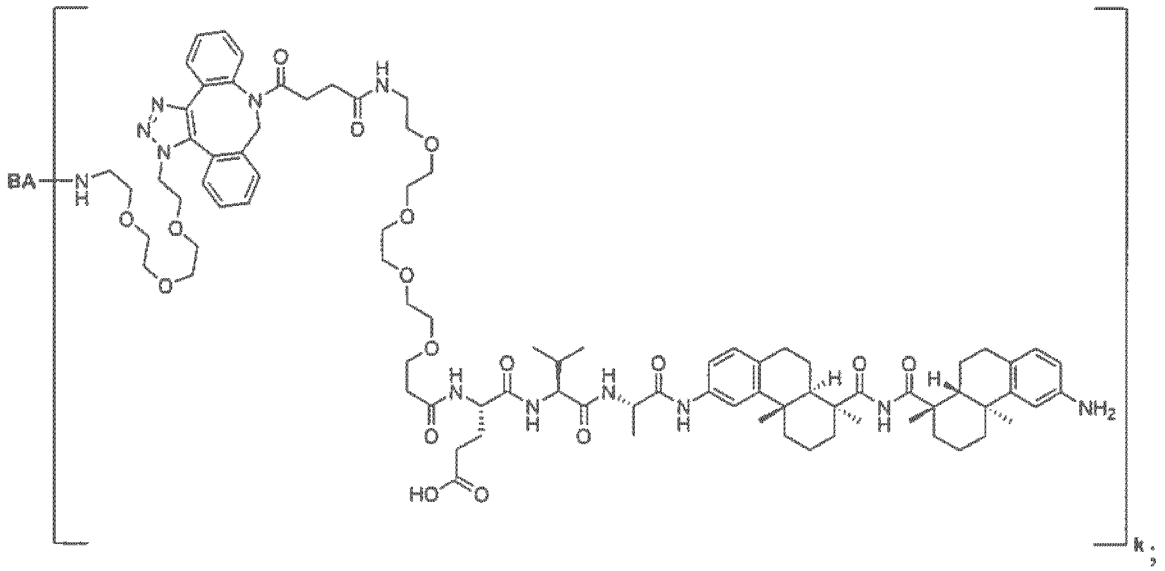
;

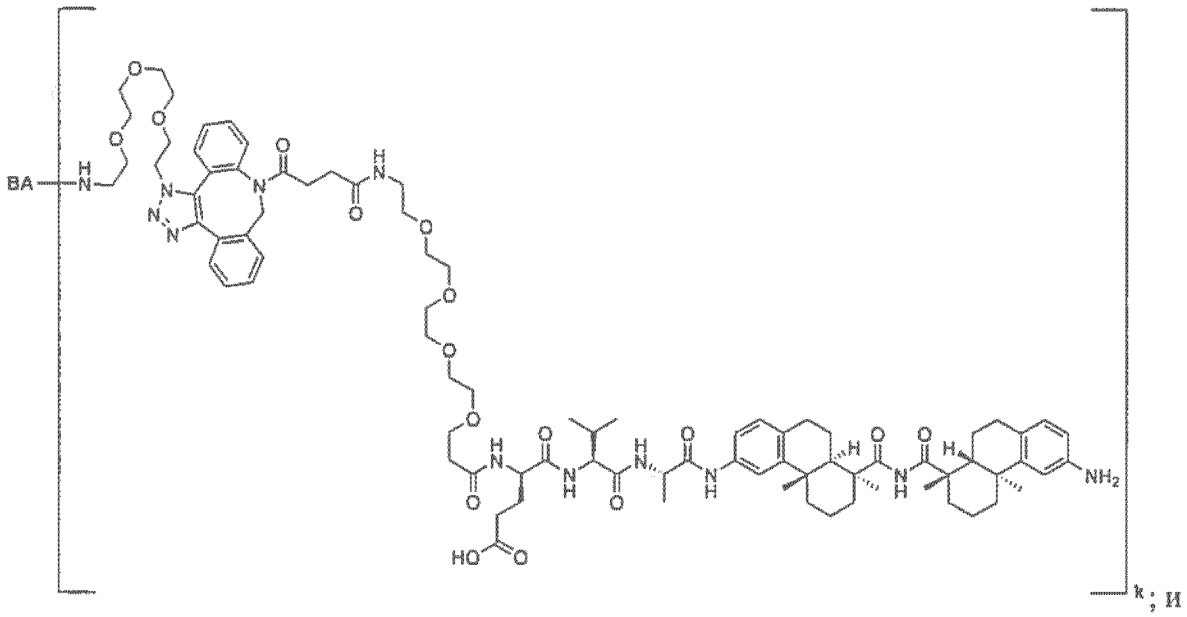


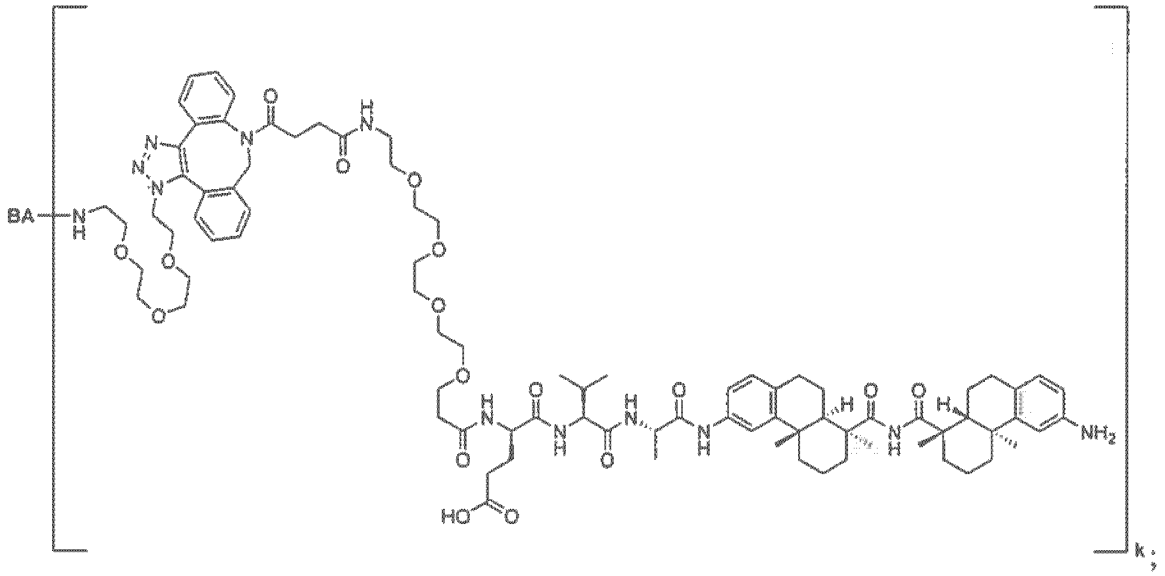


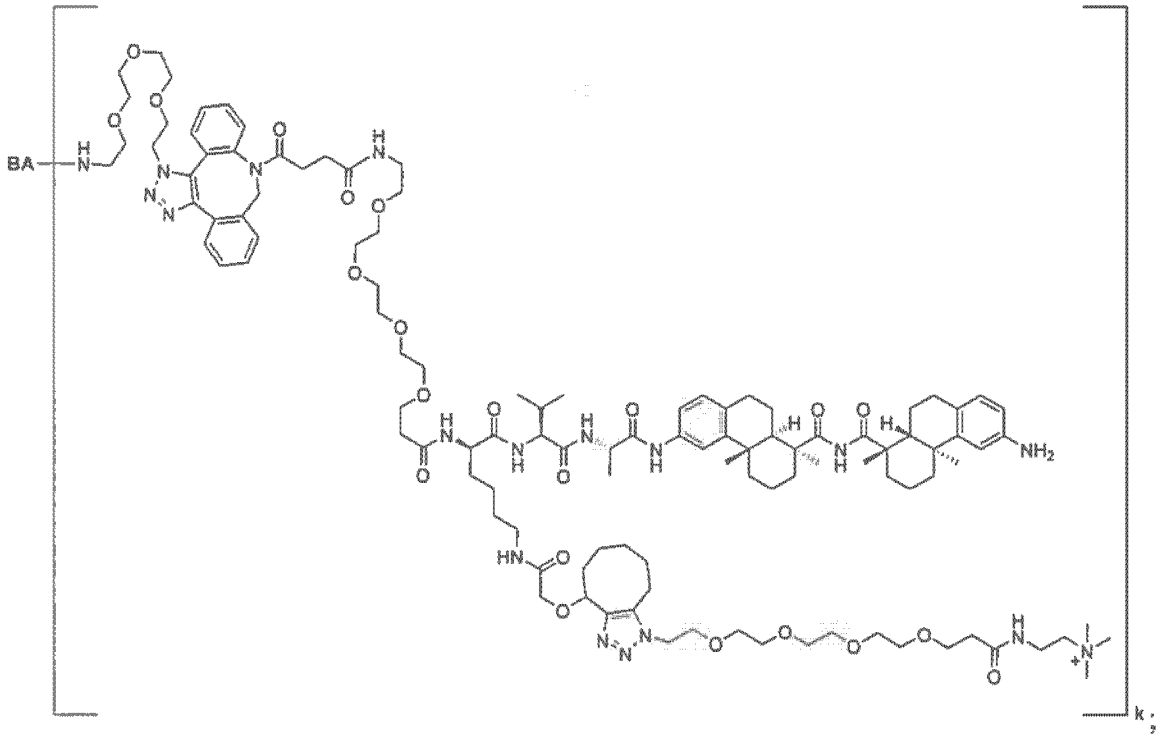


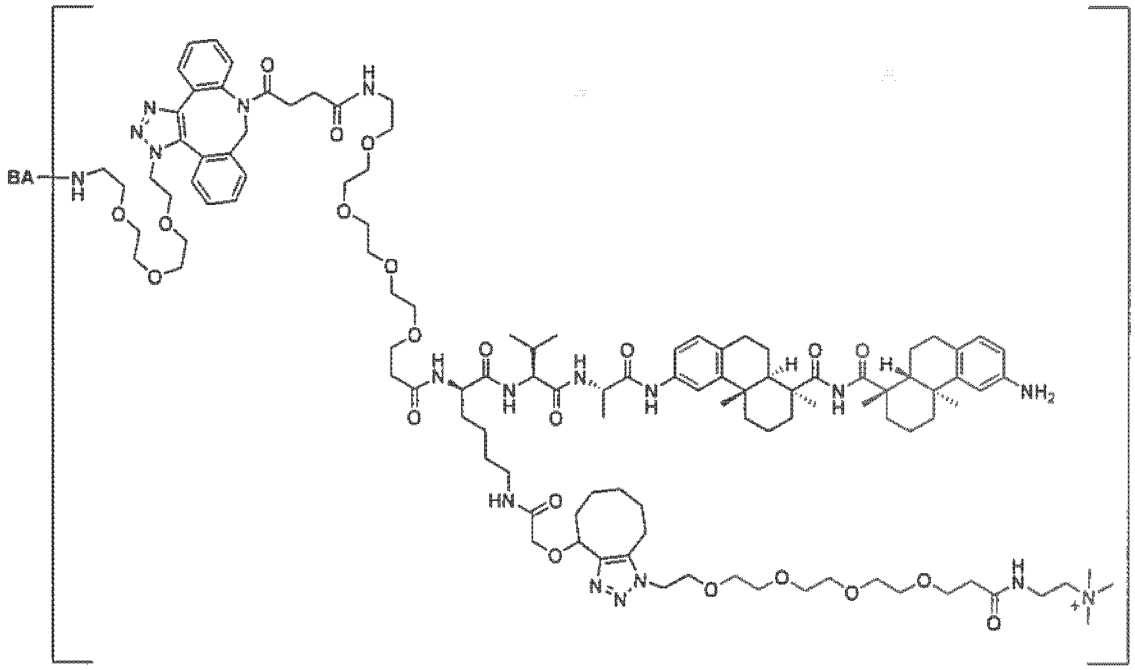








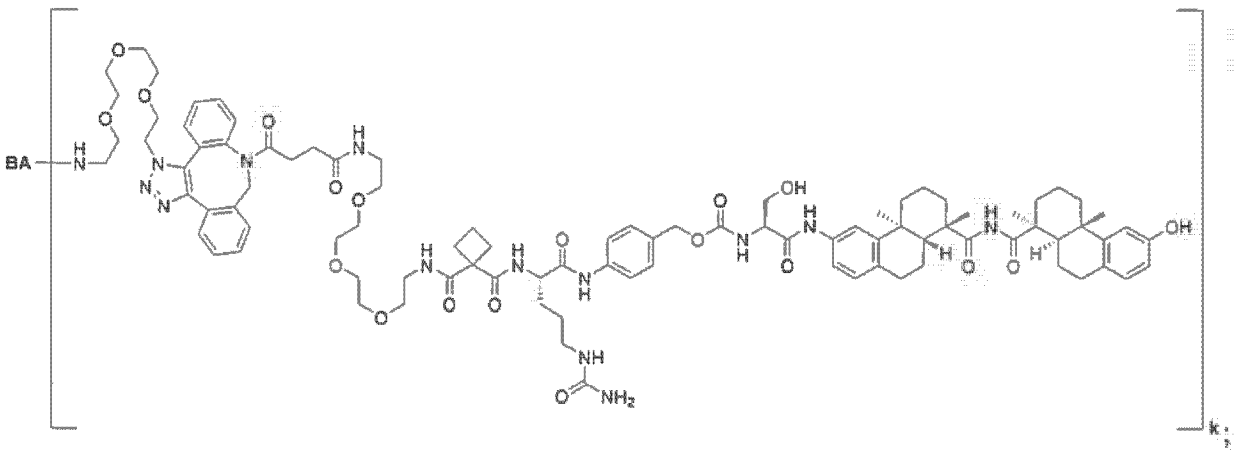


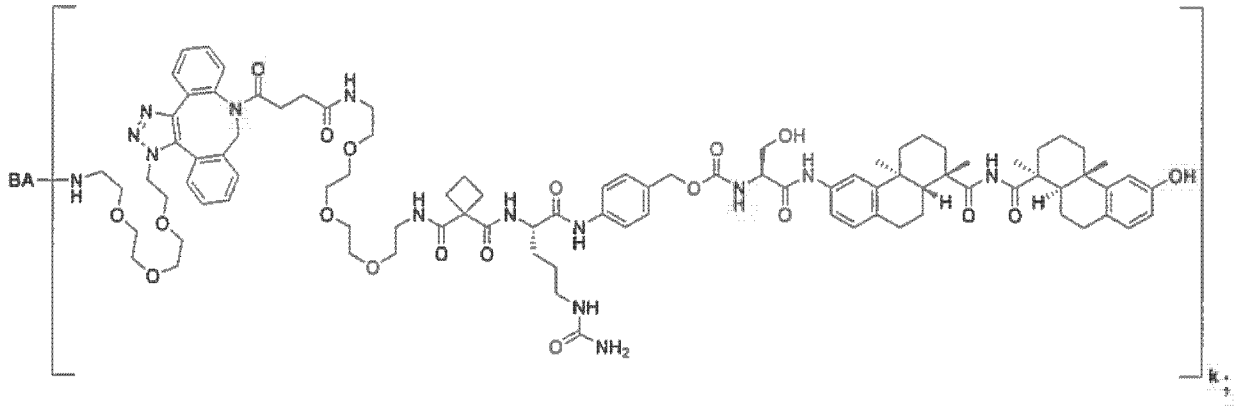


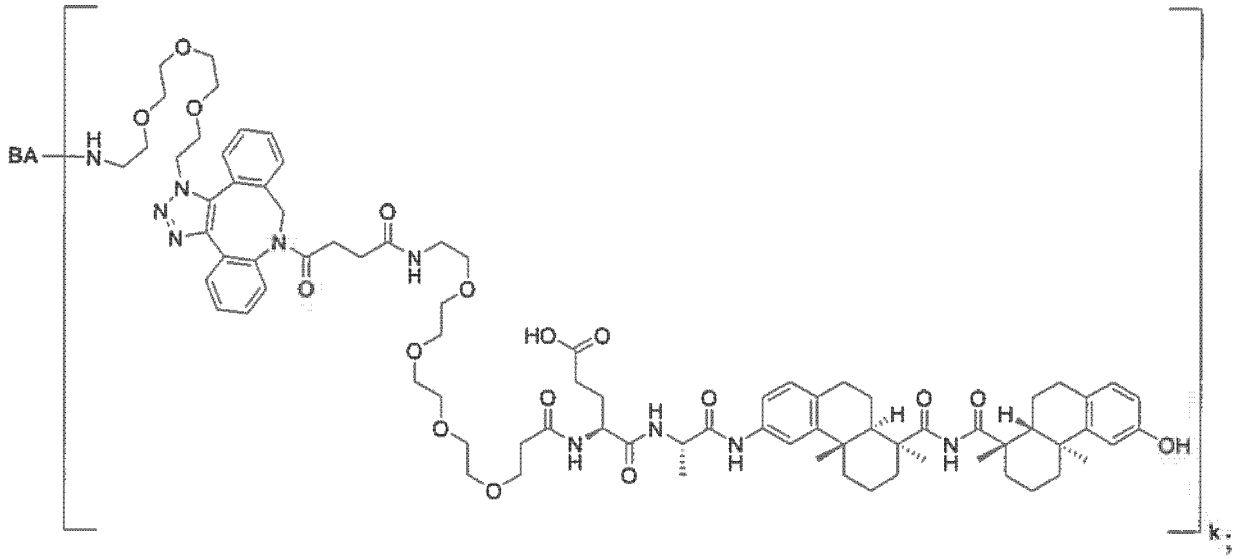
; или

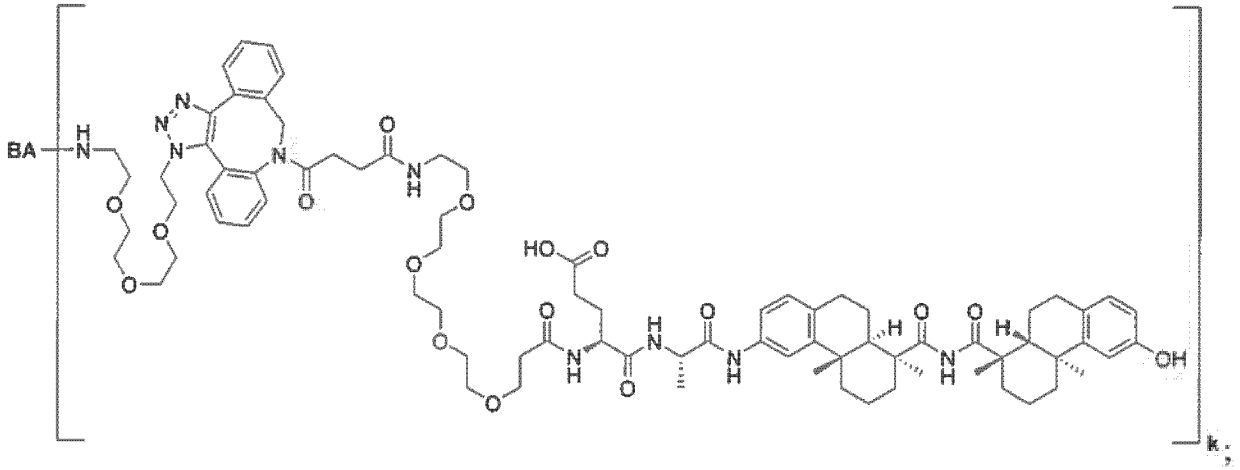
его региоизомера, или его стереоизомерной формы. В любом варианте осуществления в этом абзаце BA представляет собой связывающий агент. В любом варианте осуществления в этом абзаце BA представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце k представляет собой целое число от 1 до 30. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце k равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце k находится в диапазоне 1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4 или 1-4. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце k равно 1. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце k равно 2. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце k равно 3. В любом из вариантов осуществления в этом абзаце k равно 4.

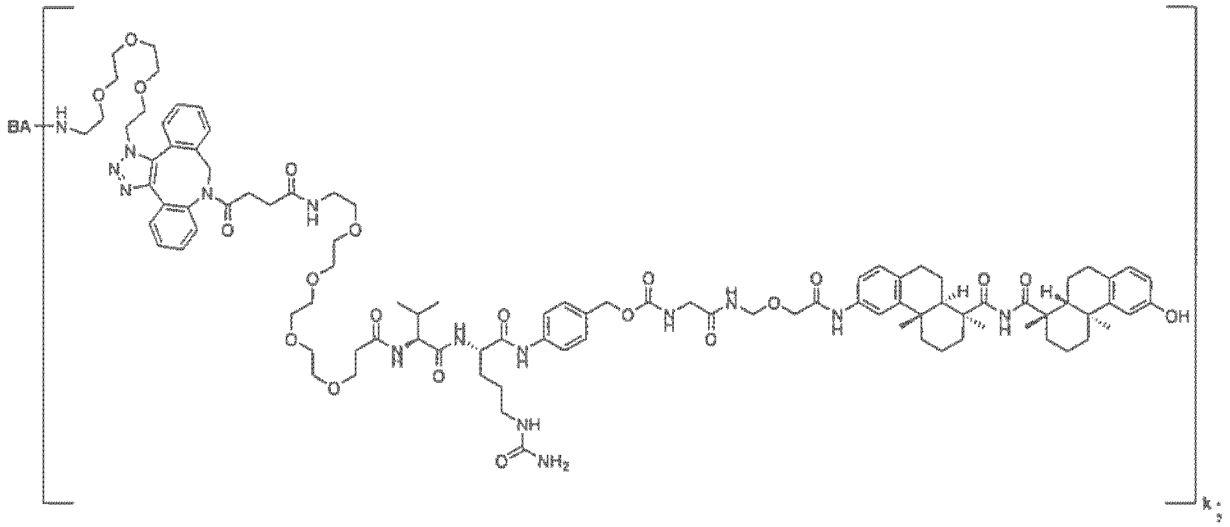
[00170] В данном документе также представлены ADC, выбранные из группы, состоящей из:

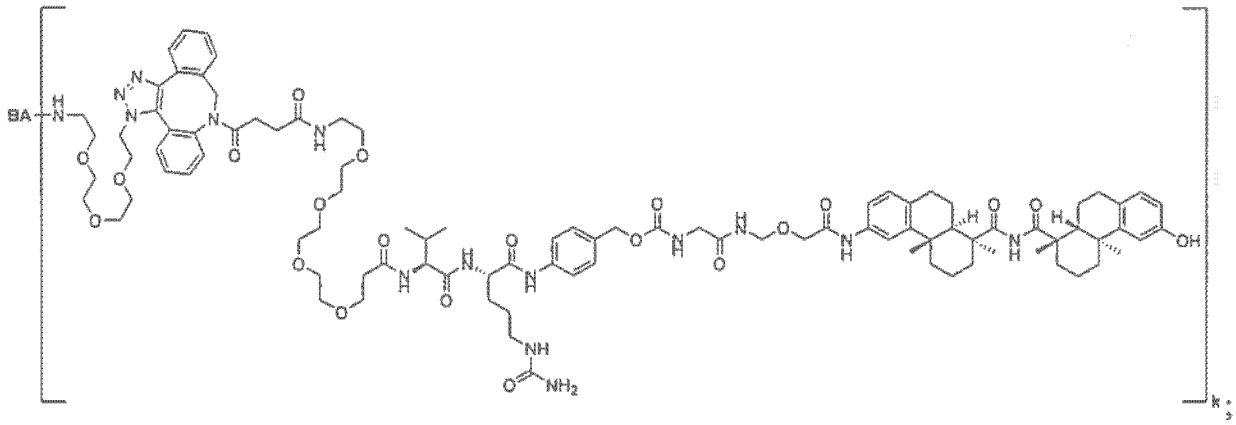


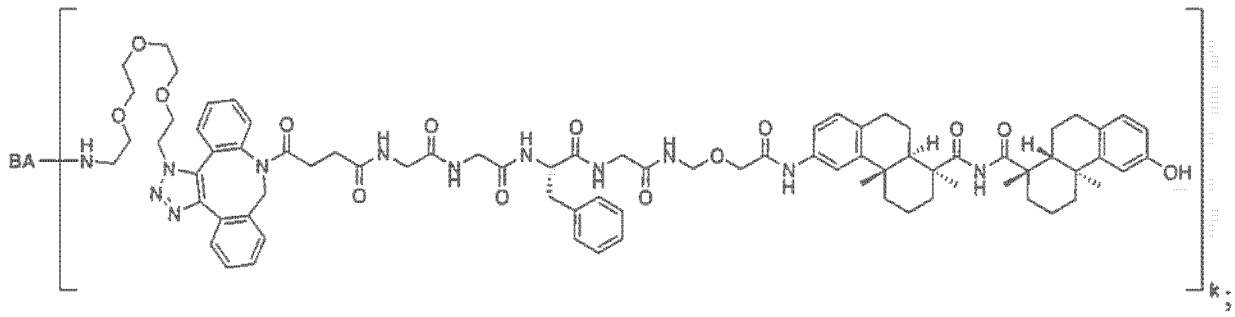

BA
OH
NH
NH2
k;

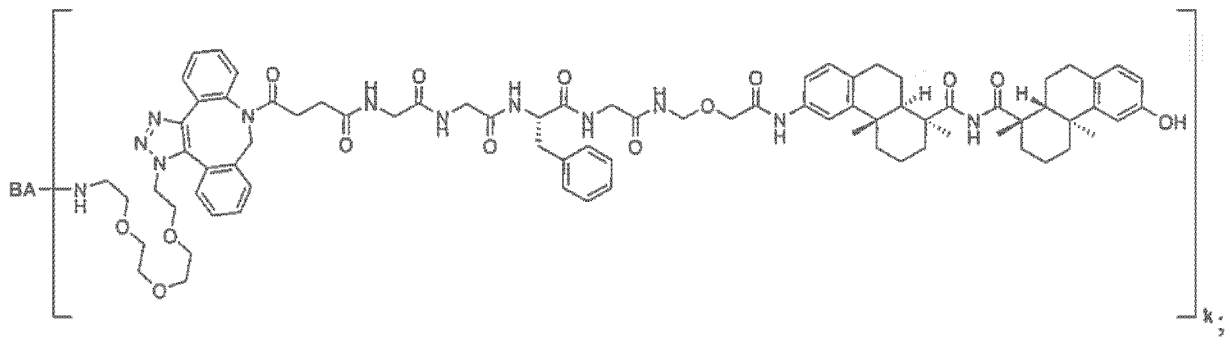

BA
HO
OH
k;

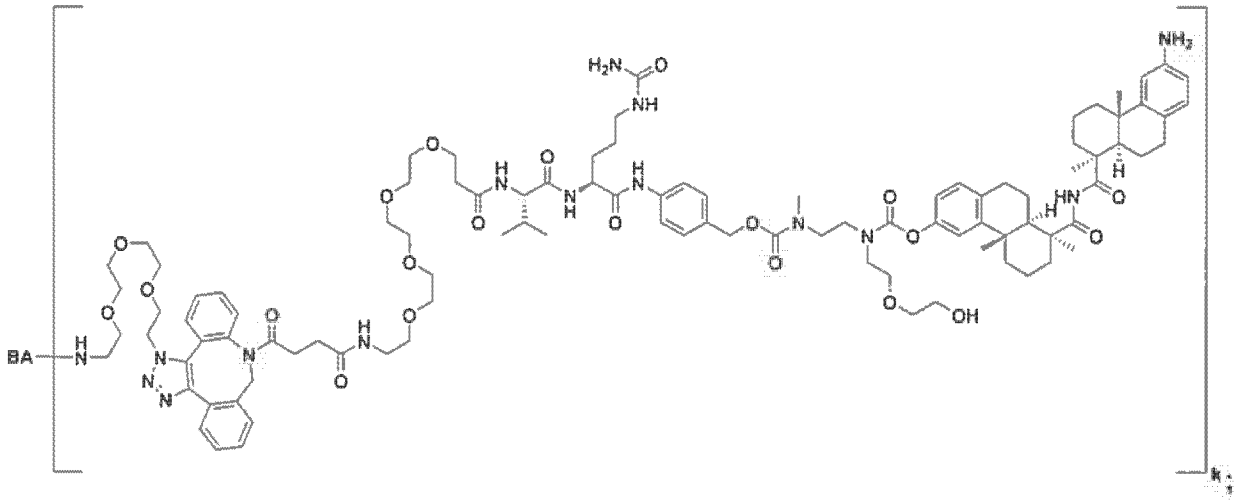

BA
HO
OH
k;



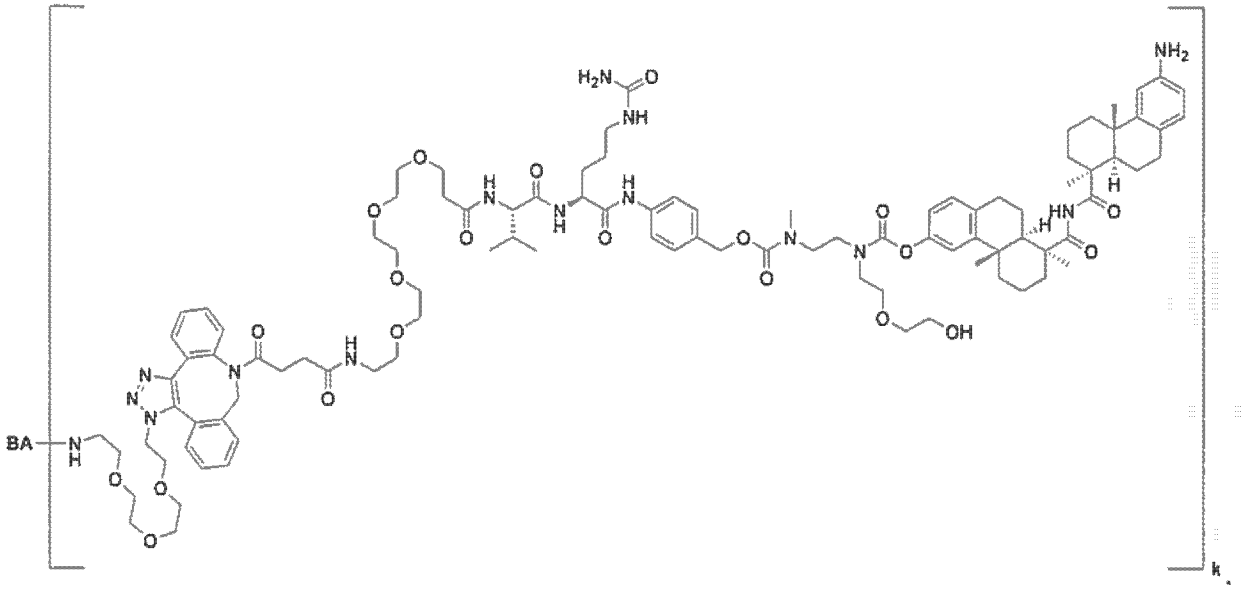








и



[00171] В любом из представленных вариантов реализации соединения или конъюгата **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает HER2. В любом из представленных вариантов соединения или конъюгата **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает PRLR. В любом из представленных вариантов соединения или конъюгата **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и конъюгация осуществляется через по меньшей мере один остаток Q295. В любом из представленных вариантов соединения или конъюгата **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и конъюгация осуществляется через два остатка Q295. В любом из представленных вариантов соединения или конъюгата **BA** представляет собой антитело N297Q или его антигенсвязывающий фрагмент. В любом из представленных вариантов соединения или конъюгата **BA** представляет собой антитело N297Q или его антигенсвязывающий фрагмент, и конъюгация осуществляется через по крайней мере

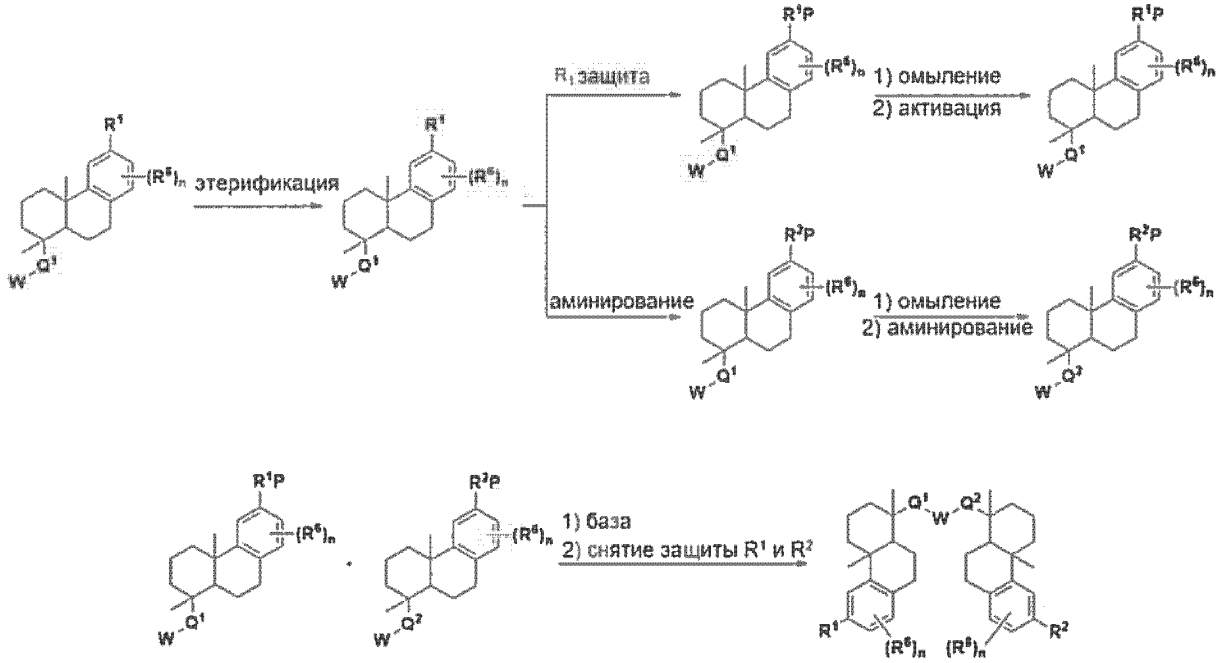
один Q295 и по крайней мере один остаток Q297. В любом из представленных вариантов соединения или конъюгата **BA** представляет собой антитело N297Q или его антигенсвязывающий фрагмент, и конъюгация осуществляется через два остатка Q295 и два остатка Q297. В конкретных вариантах осуществления нумерация соответствует системе нумерации EC.

[00172] В любом из приведенных выше вариантов осуществления **BA** представляет собой антитело против MSR1. В некоторых вариантах реализации **BA** представляет собой антитело H1H21234N против MSR1, описанное в примерах ниже. В некоторых вариантах реализации **BA** представляет собой антитело H1H21234N N297Q против MSR1, описанное в примерах ниже. В некоторых вариантах реализации **BA** представляет собой антитело против MSR1, содержащее HCVR согласно Ид. № последовательности: 2 и LCVR согласно Ид. № последовательности: 10. В некоторых вариантах реализации **BA** представляет собой антитело против MSR1, содержащее одно, два, три, четыре, пять или шесть из HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно Ид. № последовательности: 4, 6, 8, 12, 14 и 16 соответственно. В некоторых вариантах реализации HCVR кодируется Ид. № последовательности: 1. В некоторых вариантах реализации LCVR кодируется Ид. № последовательности: 9. В некоторых вариантах реализации один, два, три, четыре, пять или шесть из HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 кодируются полинуклеотидными последовательностями с Ид.№ последовательности: 3, 5, 7, 11, 13 и 15 соответственно. N297Q указывает на то, что один или несколько остатков 297 мутированы с аспарагина (N) на глутамин (Q). Предпочтительно каждый повторный остаток 297 мутирован на Q. В предпочтительных вариантах осуществления нумерация соответствует системе нумерации EC. В некоторых вариантах осуществления в этом абзаце k равно от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления k равно 1, 2, 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления k равно 4. В некоторых вариантах осуществления **BA** представляет собой антитело против MSR1, описанное в патентной заявке WO 2019/217591, поданной 8 мая 2019 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Способы приготовления соединений

[00173] Представленные здесь соединения могут быть получены, выделены или получены любым способом, очевидным для специалистов в данной области. Примерные способы приготовления подробно описаны в приведенных ниже примерах. В определенных вариантах осуществления соединения, представленные в настоящем документе, могут быть получены согласно схемам A и B.

Схема A. Примерная схема получения



Формула I

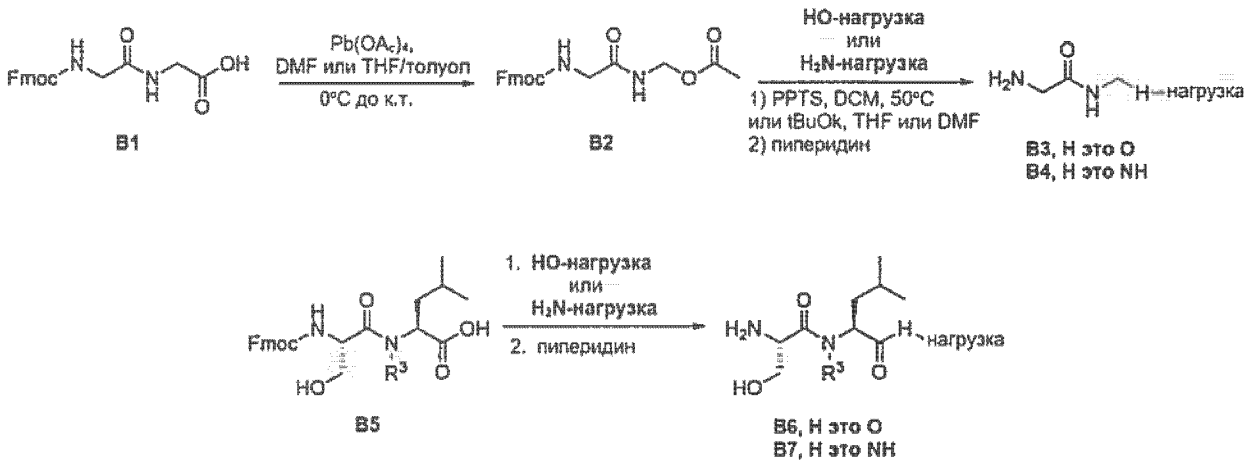
[00174] В примерной схеме получения A, Q^1, Q^2, W, R^1, R^2, R^6 и n определены, как описано в контексте формулы (I). За начальной этерификацией следует либо защита R^1, либо аминирование R^1 с образованием R^2P. После защиты R^1 омыление и активация, например, фрагмента карбоновой кислоты дает первого партнера связывания, имеющего Q^1. После аминирования, омыления и амидирования, например, фрагмента карбоновой кислоты получается второй партнер сочетания, имеющий Q^2. Объединение партнеров связывания, имеющих Q и Q^2, соответственно, с последующим снятием защиты с R^1 и R^2, соответственно, дает соединения формулы I. Типичные способы получения подробно описаны в примерах ниже.

[00175] В некоторых вариантах осуществления одна или несколько стадий защиты или снятия защиты могут быть включены в способы получения, описанные на схеме A выше.

[00176] Описанные здесь полезные нагрузки линкера могут быть синтезированы с помощью ряда этапов связывания. Например, полезная нагрузка на правой стороне может

быть связана с SP^2 через одну или несколько стандартных реакций связывания. В предпочтительных вариантах осуществления соединения полезной нагрузки, описанные в данном документе, включают свободные аминогруппы, доступные для связывания в условиях синтеза амида, описанных в данном документе. Аминокислоты $(AA)_{p1}$ могут быть добавлены в условиях синтеза амида, например в условиях синтеза пептида. Спейсер SP^2 может быть связан с $(AA)_{p1}$ посредством одной или нескольких стандартных реакций сочетания. В предпочтительных вариантах реализации группы SP^2 и $(AA)_{p1}$, описанные в данном документе, включают свободные амино- или карбоксильные группы, доступные для связывания в условиях синтеза амида, описанных в данном документе. Когда он присутствует, спейсер SP^3 может быть связан с $(AA)_{p1}$ посредством одной или нескольких стандартных реакций сочетания. В предпочтительных вариантах реализации группы SP^3 и $(AA)_{p1}$, описанные в данном документе, включают свободные амино- или карбоксильные группы, доступные для связывания в условиях синтеза амида, описанных в данном документе.

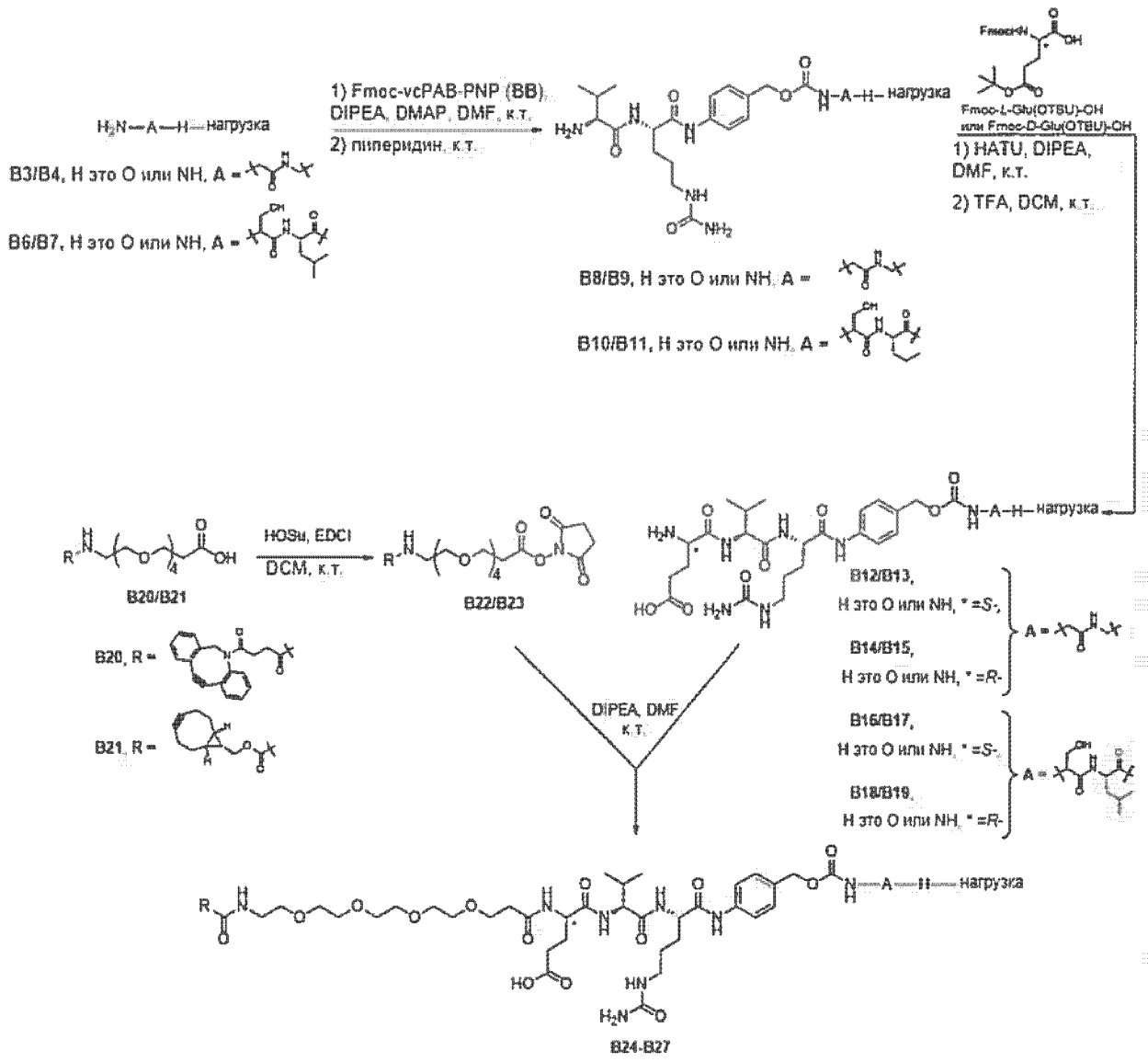
Схема B1. Примерная схема получения



[00177] В примерной схеме получения B1, B1 окислительно декарбоксилируется с получением **B2**, а затем **B2** заменяется полезными нагрузками (полезными нагрузками HO или полезными нагрузками H_2N) с получением **B3** или **B4**. Альтернативно, **B5**

этерифицирован или пептид соединен с полезной нагрузкой (полезной нагрузкой HO или полезной нагрузкой H_2N, соответственно) с получением **B6** или **B7**.

Схема B2. Примерная схема получения



[00178] В иллюстративной схеме получения **B2**, **B3**, **B4**, **B6** или **B7** представляют собой пептид, связанный с **BB**, а затем снимают защиту с получением **B8**, **B9**, **B10** или **B11**. **B8-B11** представляют собой независимо пептид, связанный с любым антиподом защищенной глутаминовой кислоты с образованием **B12-B19**. Карбоксилаты **B20** или **B21** активируются для получения **B22** или **B23**, которые затем независимо связываются с одним из **B12-B19**, чтобы получить **B24-B27**.

[00179] Спейсер SP^3, если он присутствует, оканчивается реактивной группой **RG**. Эта реакционноспособная группа может быть связана с усиливающим агентом **EG**

посредством условий связывания, которые специалисты в данной области считают подходящими. В некоторых вариантах осуществления спейсер SP^3 связан с усиливающим агентом **EG** в условиях синтеза амида. В некоторых вариантах осуществления спейсер SP^3 связан с усиливающим агентом **EG** посредством щелочной химии. В этих вариантах осуществления спейсер SP^3 оканчивается реакционной группой, подходящей для реакции щелчка, например, азидом или алкином, а усиливающий агент **EG** содержит комплементарную реактивную группу, подходящую для реакции щелчка, например, алкин или азид. В предпочтительных вариантах осуществления SP^3 оканчивается напряженным алкином, а **EG** содержит азид; или SP^3 оканчивается карбоновой кислотой, а **EG** содержит амин. Когда **EG** представляет собой фрагмент циклодекстрина, циклодекстрин может содержать азид. Азидоциклодекстрины можно получить синтетически или получить из коммерческих источников. Когда **EG** представляет собой фрагмент сульфоновой кислоты, один конец(-нцы) **EG** заканчивается группой(-ами) сульфоновой кислоты, а другой конец заканчивается первичным или вторичным амином.

[00180] Описанные здесь конъюгаты могут быть синтезированы путем сочетания линкер-полезных нагрузок, описанных здесь, со связующим агентом, например, антителом в стандартных условиях конъюгации (см., *например*, Doronina *et al. Nature Biotechnology* 2003, 21, 7, 778, которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки). Когда связывающий агент представляет собой антитело, антитело может быть связано с полезной нагрузкой линкера через один или несколько остатков цистеина или лизина антитела. Полезные нагрузки линкера могут быть связаны с остатками цистеина, например, путем воздействия на антитело восстанавливающего агента, например дитиотерита, для расщепления дисульфидных связей антитела, очистки восстановленного антитела, например, гель-фильтрацией, и затем обработку антитела линкером-полезной нагрузкой, содержащей подходящий реакционноспособный фрагмент, например малеимидогруппу. Подходящие растворители включают, но не ограничиваются ими, воду, DMA, DMF и DMSO. Линкер-полезные нагрузки, содержащие реакционноспособную группу, например активированную сложноэфирную или кислотно-галогенидную группу, могут быть связаны с остатками лизина антитела. Подходящие растворители включают, но не ограничиваются ими, воду, DMA, DMF и DMSO. Конъюгаты могут быть очищены с использованием известных белковых технологий, включая, например, эксклюзионную хроматографию по размеру, диализ и ультрафильтрацию/диафильтрацию.

[00181] Связующие агенты, например антитела, также могут быть конъюгированы посредством клик-химических реакций. В некоторых вариантах осуществления упомянутых клик-химических реакций линкер-полезная нагрузка включает реакционноспособную группу, например, алкин, которая способна подвергаться реакции 1,3-циклоприсоединения с азидом. Такие подходящие реакционноспособные группы описаны выше. Антитело включает одну или несколько азидных групп. Такие антитела включают антитела, функционализированные, например, азидо-полиэтиленгликолевыми группами. В некоторых вариантах осуществления такое функционализированное антитело получают обработкой антитела, имеющего по меньшей мере один остаток глутамина, например тяжелой цепи Gln295 или Gln55, соединением первичного амина в присутствии фермента трансглутаминазы. В некоторых вариантах осуществления такое функционализированное антитело получают обработкой антитела, имеющего по меньшей мере один остаток глутамина, например тяжелой цепи Gln55, соединением первичного амина в присутствии фермента трансглутаминазы. Такие антитела включают мутанты Asn297Gln (N297Q). В некоторых вариантах осуществления такое функционализированное антитело получают обработкой антитела, имеющего по меньшей мере два остатка глутамина, например, тяжелой цепи Gln295 и тяжелой цепи Gln297, первичным соединением амина в присутствии фермента трансглутаминазы. Такие антитела включают мутанты Asn297Gln (N297Q). В некоторых вариантах осуществления антитело имеет две тяжелые цепи, как описано в этом параграфе, всего два или четыре остатка глутамина.

[00182] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит два остатка глутамина, по одному в каждой тяжелой цепи. В конкретных вариантах осуществления антитело содержит остаток Q295 в каждой тяжелой цепи. В других вариантах осуществления антитело содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь или более остатков глутамина. Эти глутаминовые остатки могут быть в тяжелых цепях, легких цепях или как в тяжелых цепях, так и в легких цепях. Типичные остатки глутамина включают Q55. Эти глутаминовые остатки могут быть остатками дикого типа или сконструированными остатками. Антитела могут быть получены в соответствии со стандартными методиками.

[00183] Специалистам в данной области понятно, что антитела часто гликозилированы по остатку N297, около остатка Q295 в последовательности тяжелой цепи. Гликозилирование по остатку N297 может влиять на трансглютаминазу по остатку Q295 (Dennler *et al.*, *выше*). Соответственно, в предпочтительных вариантах осуществления антитело не гликозилировано. В определенных вариантах осуществления антитело является

дегликозилированным или агликозилированным. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь антитела имеет мутацию N297. В качестве альтернативы указано, что антитело мутировано, чтобы больше не иметь остатка аспарагина в положении 297. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь антитела имеет мутацию N297Q. Такое антитело можно получить с помощью сайт-направленного мутагенеза для удаления или отключения последовательности гликозилирования или с помощью сайт-направленного мутагенеза для вставки остатка глутамина в сайт без нарушения функции или связывания антитела. В некоторых вариантах реализации антитело, имеющее остаток Q295 и/или мутацию N297Q, содержит один или несколько дополнительных встречающихся в природе остатков глутамина в своих вариабельных областях, которые могут быть доступны для трансглютаминазы и, следовательно, способны к конъюгации с линкером или полезной нагрузкой линкера. Типичный природный остаток глутамина можно найти, *например*, в Q55 легкой цепи. В таких случаях антитело, конъюгированное через трансглютаминазу, может иметь более высокое, чем ожидалось, значение отношения лекарственное средство:антитело (DAR) (*например*, DAR выше 4). Любые такие антитела можно выделить из естественных или искусственных источников.

[00184] Антитело, не препятствующее гликозилированию, затем реагирует с соединением первичного амина. В некоторых вариантах осуществления агликозилированное антитело реагирует с соединением первичного амина для получения модифицированного глутаминилом антитела. В определенных вариантах осуществления дегликозилированное антитело реагирует с соединением первичного амина с образованием глутаминил-модифицированного антитела.

[00185] Аминокислотная последовательность антитела может быть пронумерована с использованием любых известных схем нумерации, включая схемы, описанные Kabat et al. (Схема нумерации «Kabat»);- AlLazikaniet al., 1997, *J. Mol. Biol.*, 273:927-948 (схема нумерации «Chothia»); MacCallum et al., 1996, *J. Mol. Биол.* 262:732-745(схема нумерации «Контакт»); Lefranc et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 2003, 27:55-77 (схема нумерации «IMGT»); и Honegge and Plückthun, *J. Mol. Biol.*, 2001, 309:657-70 (схема нумерации «AHo»). Если не указано иное, используемая здесь схема нумерации является схемой нумерации Kabat. Однако выбор схемы нумерации не предназначен для обозначения различий в последовательностях, где они не существуют, и специалист в данной области может легко подтвердить положение последовательности, исследуя аминокислотную последовательность одного или нескольких антител. Если не указано иное, «схема

нумерации ЕС» обычно используется для обозначения остатка в константной области тяжелой цепи антитела (например, как описано у Kabat et al. выше).

[00186] Термин «агликозилированное антитело» относится к антителу, которое не содержит последовательности гликозилирования, которая может препятствовать реакции трансглютаминирования, например антителу, которое не имеет сахаридной группы в N297 на одной или нескольких тяжелых цепях. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь антитела имеет мутацию N297. Другими словами, антитело мутировано так, что больше не имеет остатка аспарагина в положении 297 в соответствии с системой нумерации ЕС, описанной Kabat et al. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь антитела имеет мутацию N297Q. Такое антитело может быть получено путем сайт-направленного мутагенеза для удаления или отключения последовательности гликозилирования или путем сайт-направленного мутагенеза для вставки остатка глютамина в сайт, отличный от любого мешающего сайта гликозилирования или любой другой мешающей структуры. Такое антитело также может быть выделено из природных или искусственных источников.

[00187] Термин «деглиозилированное антитело» относится к антителу, в котором сахаридная группа по N297 была удалена, тем самым открывая Q295 для трансглютаминирования. В конкретных вариантах осуществления в настоящем документе представлены процессы, которые включают дополнительную стадию дегликозилирования антитела, например антитела N297.

[00188] Первичный амин может быть любым первичным амином, который способен образовывать ковалентную связь с остатком глютамина в присутствии трансглютаминазы. Полезные первичные амины описаны выше. Трансглютаминаза может представлять собой любую трансглютаминазу, которая считается подходящей для специалистов в данной области. В некоторых вариантах осуществления трансглютаминаза представляет собой фермент, который катализирует образование изопептидной связи между свободной аминогруппой на первичном аминном соединении и ацильной группой на боковой цепи глутаминового остатка. Трансглютаминаза также известна как белок-глутамин-γ-глутамилтрансфераза. В конкретных вариантах осуществления трансглютаминаза классифицируется как ЕС 2.3.2.13. Трансглютаминаза может быть из любого источника, который считается подходящим. В определенных вариантах осуществления трансглютаминаза является микробной. Полезные трансглютаминазы были выделены из *Streptomycesmobaraense, Streptomyces cinnamoneum, Streptomyces griseo-carneum, Streptomyces lavendulae* и *Bacillus subtilis.* Также можно использовать немикробные

трансглютаминазы, включая трансглютаминазы млекопитающих. В определенных вариантах осуществления трансглютаминаза может быть получена любым способом или получена из любого источника, который считается подходящим для специалиста в данной области. В конкретных вариантах осуществления трансглютаминаза получена из коммерческого источника.

[00189] В конкретных вариантах осуществления соединение первичного амина содержит реакционноспособную группу, способную к дальнейшей реакции после трансглютаминирования. В этих вариантах осуществления антитело, модифицированное глутаминилом, может реагировать или обрабатываться с помощью реакционноспособного соединения полезной нагрузки, линкера-полезной нагрузки или соединения реакционноспособного линкера-полезной нагрузки с образованием конъюгата антитело-полезная нагрузка. В определенных вариантах осуществления первичное аминное соединение содержит азид.

[00190] В некоторых вариантах осуществления антитело, модифицированное глутаминилом, подвергают взаимодействию или обрабатывают линкером-полезной нагрузкой или реакционноспособным линкером-полезной нагрузкой с образованием конъюгата антитело-полезная нагрузка. Реакция может протекать в условиях, которые специалисты в данной области считают подходящими. В определенных вариантах осуществления антитело, модифицированное глутаминилом, контактирует с соединением линкер-полезная нагрузка или реакционноспособным соединением линкер-полезная нагрузка в условиях, подходящих для образования связи между антителом, модифицированным глутаминилом, и соединением линкер-полезная нагрузка. Подходящие условия реакции хорошо известны специалистам в данной области.

[00191] Примерные реакции представлены в Примерах ниже.

Фармацевтические композиции и методы лечения

[00192] Здесь предоставлены способы лечения и профилактики заболеваний, состояний или расстройств, включающие введение терапевтически или профилактически эффективного количества одного или нескольких соединений или полезных нагрузок, раскрытых здесь, например, одного или нескольких соединений формулы, представленных здесь. Заболевания, расстройства и/или состояния включают, но не ограничиваются ими, заболевания, связанные с антигенами, перечисленными здесь.

[00193] Соединения, описанные в настоящем документе, можно вводить отдельно или вместе с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами. Один или несколько дополнительных терапевтических агентов могут быть введены непосредственно перед, одновременно или вскоре после введения соединений, описанных здесь. Настоящее раскрытие также включает фармацевтические композиции, содержащие любое из соединений, описанных в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, и способы лечения, включающие введение таких комбинаций субъектам, нуждающимся в этом.

[00194] Подходящие дополнительные терапевтические агенты включают, но не ограничиваются ими: второй глюкокортикоид, аутоиммунное терапевтическое средство, гормон, биологическое или моноклональное антитело. Подходящие терапевтические агенты также включают, но не ограничиваются ими, любые фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные соединения, изложенного здесь.

[00195] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, множественные дозы соединения, описанного в настоящем документе (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию соединения, описанного в настоящем документе, и любого из дополнительных терапевтических агентов, упомянутых в настоящем документе), можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы в соответствии с этим аспектом раскрытия включают последовательное введение субъекту множества доз соединения, описанного здесь. Используемый здесь термин «последовательное введение» означает, что каждая доза соединения вводится субъекту в разные моменты времени, например в разные дни, разделенные заданным интервалом (*например*, часы, дни, недели или месяцы). Настоящее раскрытие включает способы, которые включают в себя последовательное введение пациенту одной начальной дозы соединения, описанного в данном документе, с последующим введением одной или нескольких вторичных доз соединения и, необязательно, с последующим введением одной или нескольких третичных доз соединения.

[00196] Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения соединений, описанных здесь. Таким образом, «начальная доза» - это доза, которая вводится в начале схемы лечения (также называемая «базовой дозой»); «вторичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и «третичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут включать одинаковое

количество соединения, описанного в настоящем документе, но, как правило, могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. В некоторых вариантах осуществления количество соединения, включенное в начальную, вторичную и/или третичную дозы, изменяется друг от друга (*например*, корректируется в зависимости от ситуации) в течение курса лечения. В некоторых вариантах осуществления две или более (*например*, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале схемы лечения в виде «нагрузочных доз» с последующими дозами, которые вводят реже (*например*, «поддерживающие дозы»).

[00197] В некоторых примерных вариантах осуществления настоящего раскрытия каждая вторичная и/или третичная доза вводится от 1 до 26 (*например*, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза «непосредственно предшествующая доза», используемая в настоящем документе, означает в последовательности многократных введений дозу соединения, которое вводят пациенту до введения самой следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

[00198] Способы согласно этому аспекту раскрытия могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз соединения. Например, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. В других вариантах осуществления пациенту вводят две или более (*например*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогично, в определенных вариантах осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах осуществления две или более (*например*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз вводят пациенту. Схема введения может проводиться в течение неопределенного времени в течение жизни конкретного субъекта или до тех пор, пока такое лечение более не является терапевтически необходимым или выгодным.

[00199] В вариантах осуществления, включающих множество вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может вводиться пациенту через 1-2 недели или через 1-2 месяца после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих множественные третичные дозы, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту через 2-12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В определенных вариантах осуществления изобретения частота, с

которой вторичные и/или третичные дозы вводятся пациенту, может варьироваться в течение курса лечения. Частота введения может также регулироваться врачом в течение курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

[00200] Настоящее раскрытие включает схемы введения, в которых от 2 до 6 нагрузочных доз вводят пациенту с первой частотой (*например*, один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз в месяц, один раз каждые два месяца и т.д.) с последующим введением пациенту двух или более поддерживающих доз реже. Например, согласно этому аспекту раскрытия, если нагрузочные дозы вводят с частотой один раз в месяц, то поддерживающие дозы могут вводиться пациенту один раз каждые шесть недель, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца, и т.п.

[00201] Настоящее раскрытие включает фармацевтические композиции соединений, полезных нагрузок, линкеров-полезных нагрузок и/или конъюгатов, описанных здесь, *например*, соединений формулы I, II и/или III, *например, композиции,* включающие соединение, описанное здесь, соль, стереоизомер, их полиморф и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель и/или наполнитель. Примеры подходящих носителей, разбавителей и эксципиентов включают, но не ограничиваются ими, буферы для поддержания надлежащего pH композиции (*например*, цитратные буферы, сукцинатные буферы, ацетатные буферы, фосфатные буферы, лактатные буферы, оксалатные буферы и тому подобное), носитель белки (*например*, человеческий сывороточный альбумин), физиологический раствор, полиолы (*например*, трегалоза, сахароза, ксилит, сорбит и тому подобное), поверхностно-активные вещества (*например*, полисорбат 20, полисорбат 80, полиоксолат и тому подобное), противомикробные препараты и антиоксиданты.

[00202] В некоторых примерах в настоящем документе изложен способ лечения заболевания, нарушения или состояния, включающий введение пациенту, страдающему указанным нарушением, терапевтически эффективного количества соединения формулы I, II и/или III или его фармацевтической композиции.

[00203] В некоторых примерах в настоящем документе изложен способ предотвращения заболевания, нарушения или состояния, включающий введение пациенту, страдающему указанным нарушением, профилактически эффективного количества соединения формулы I, II и/или III или его фармацевтической композиции.

[00204] В некоторых примерах, изложенных в настоящем документе, представлены способы лечения или профилактики любого заболевания, расстройства или состояния, реагирующего на модуляцию передачи сигналов LXR. В некоторых примерах

заболевание или нарушение связано с функцией LXR, полиморфизмом LXR, активностью агониста LXR или активностью антагониста LXR. В некоторых примерах, изложенных в настоящем документе, представляет собой способ лечения или профилактики заболевания, расстройства или состояния, выбранного из группы, состоящей из пролиферативного расстройства, нейродегенеративного расстройства, иммунологического расстройства, аутоиммунного заболевания, воспалительного расстройства, дерматологического заболевания, нарушение обмена веществ, сердечно-сосудистые заболевания и желудочно-кишечные заболевания.

[00205] Пролиферативное расстройство может быть любым пролиферативным расстройством, известным специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления пролиферативные расстройства включают, без ограничения, онкологические расстройства, где онкологическим расстройством может быть любое раковое заболевание, известное специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики меланомы. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики метастатической меланомы. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики рака легких. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики рака легких, устойчивого к ингибитору EGFR-тирозинкиназы. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики рака полости рта. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики плоскоклеточного рака полости рта. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики рака предстательной железы. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики лимфомы Ходжкина. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики рака молочной железы.

[00206] Нейродегенеративное расстройство может быть любым нейродегенеративным расстройством, известным специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики болезни Альцгеймера. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики болезни Паркинсона. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или

профилактики болезни Хантингтона. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики бокового амиотрофического склероза. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или предотвращения экспрессии гена миелина. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики состояний, заболеваний или нарушений миелинизации и ремиелинизации.

[00207] Иммунологическим расстройством может быть любое иммунологическое расстройство, известное специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики воспалительного заболевания кишечника. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики язвенного колита. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики болезни Крона.

[00208] Воспалительным расстройством может быть любое воспалительное расстройство, известное специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики артрита. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики ревматоидного артрита.

[00209] Метаболическим заболеванием может быть любое метаболическое заболевание, известное специалистам в данной области. В некоторых вариантах реализации нарушение обмена веществ представляет собой дислипидемию. Дислипидемия может быть любой дислипидемией, известной специалистам. В некоторых вариантах осуществления дислипидемия выбрана из группы, состоящей из гиперлипидемии, гиперхолестеринемии, гипертриглицеридемии, гиперлипопротеинемии, дефицита HDL, дефицита ApoA-I и сердечно-сосудистых заболеваний, таких как заболевание коронарной артерии (включая, например, лечение и профилактику стенокардии, инфаркт миокарда). и внезапная сердечная смерть); атеросклероз (включая, например, лечение и профилактику атеросклероза); и рестеноз (включая, например, предотвращение или лечение атеросклеротических бляшек, которые развиваются в результате медицинских процедур, таких как баллонная ангиопластика). В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики диабета.

[00210] Сердечно-сосудистое заболевание может представлять собой любое сердечно-сосудистое заболевание, известное специалистам в данной области. В определенных

вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики атеросклероза. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики атеросклероза, вызванного аномальной обработкой макрофагов. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения или профилактики атеросклероза, возникающего в результате образования окисленных липопротеинов низкой плотности (oxLDLs), в которых макрофаги не способны обрабатывать oxLDLs. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики ишемической болезни сердца. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики инсульта. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики гипертонической болезни сердца. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики аневризмы аорты. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики эндокардита. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики заболевания периферических артерий. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения или предотвращения сочетаний любых заболеваний, представленных в этом параграфе.

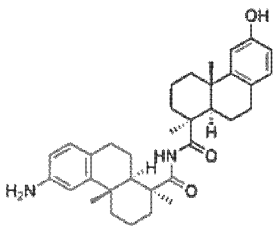
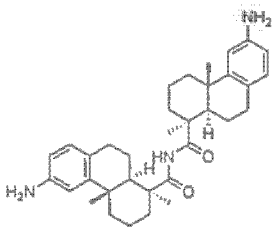
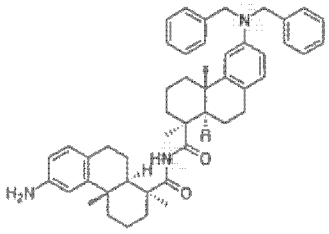
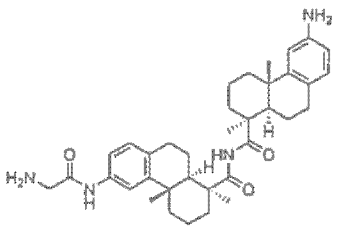
[00211] В некоторых примерах, изложенных в настоящем документе, представляет собой способ модуляции функции ядерного рецептора. В качестве неограничивающего примера, функция может быть выбрана из экспрессии/секреции медиаторов воспаления (например, цитокинов, хемокинов), регуляции холестерина, потребления холестерина, оттока холестерина, окисления холестерина, миграции, хемотаксиса, апоптоза и некроза, воспалительной активности, липидная регуляция, апоптоз, миграция, хемотаксис, транскрипция генов и экспрессия белка.

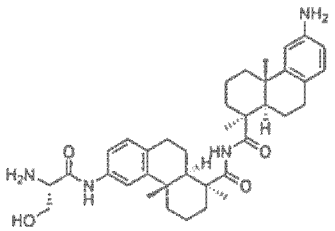
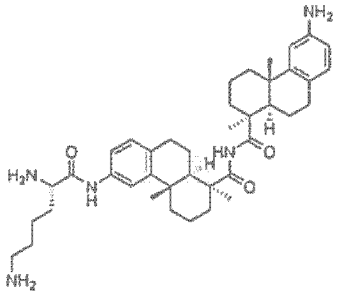
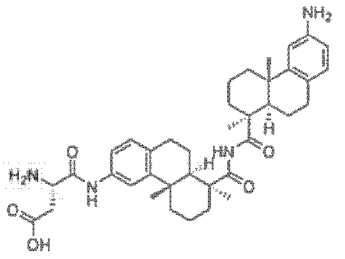
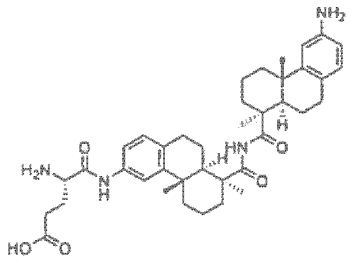
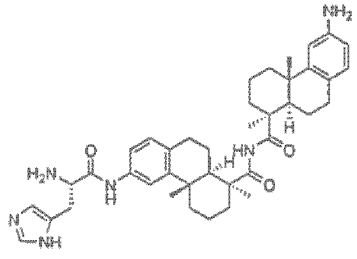
ПРИМЕРЫ

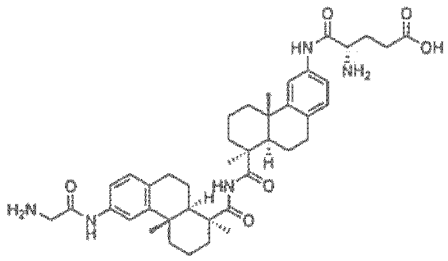
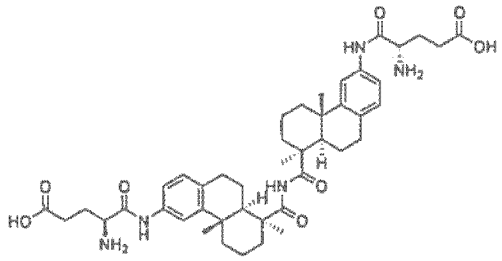
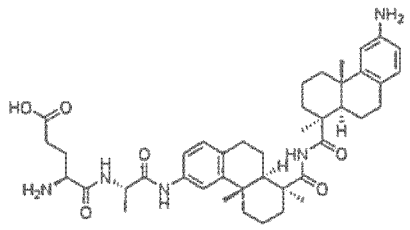
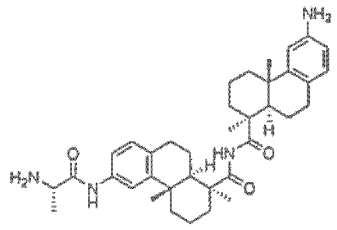
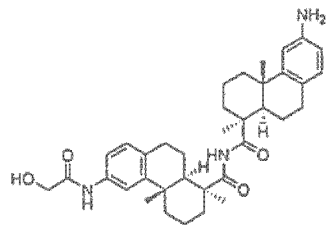
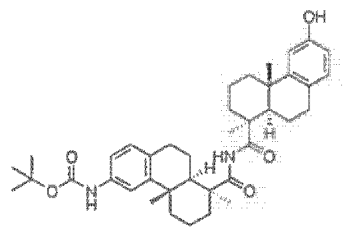
[00212] В настоящем документе предложены новые карбоксамиды бис-октагидрофенантрена, их белковые конъюгаты и способы лечения заболеваний, нарушений и состояний, включая введение карбоксамидов бис-октагидрофенантрена и конъюгатов.

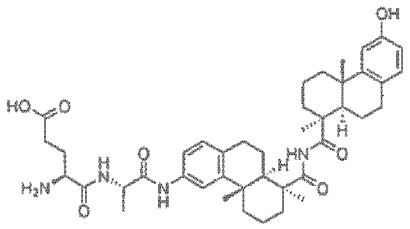
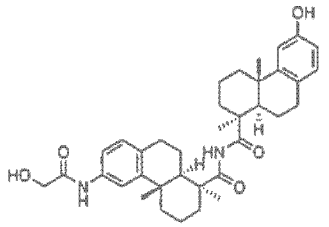
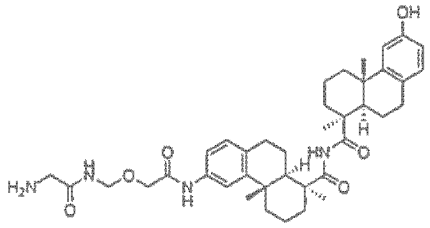
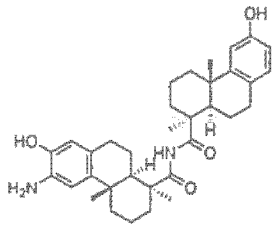
[00213] В некоторых примерах соединение формулы (I) представляет собой соединение, указанное в таблице 1.

Таблица 1. Список полезных нагрузок

Код CPD	Структуры	MF	FW	Точная масса
P1		$C_{34}H_{44}N_2O_3$	528,72	528,72
P2		$C_{34}H_{45}N_3O_2$	527,74	527,74
P3		$C_{48}H_{57}N_3O_2$	707,99	707,45
P4		$C_{36}H_{48}N_4O_3$	584,79	584,37

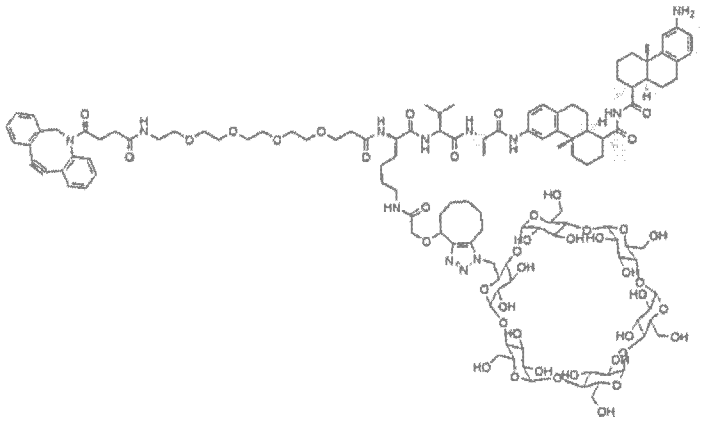
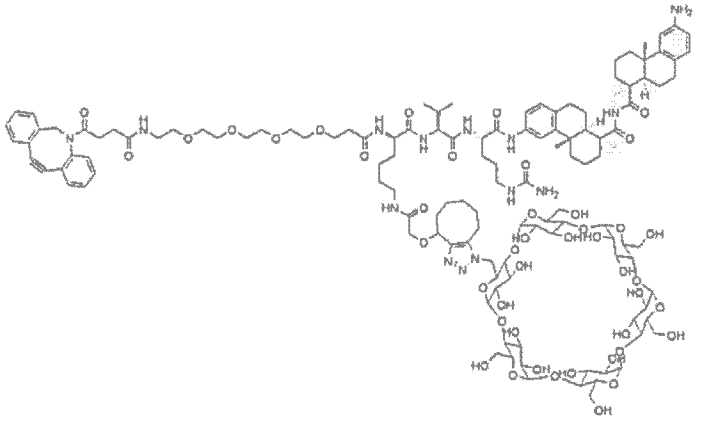
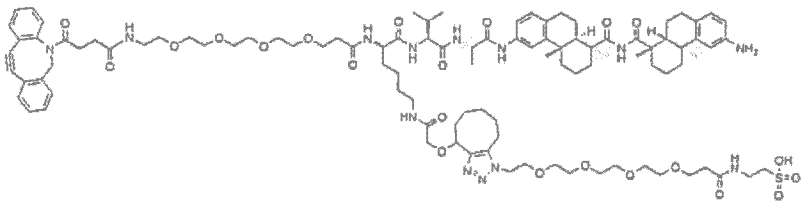
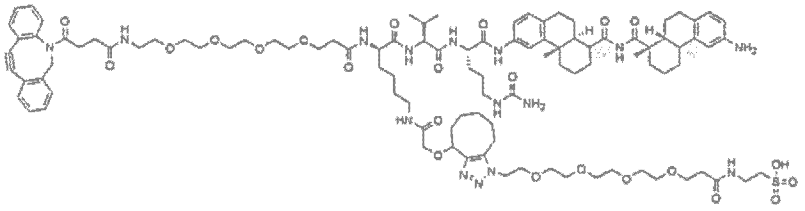
Код CPD	Структуры	MF	FW	Точная масса
P5		$C_{37}H_{50}N_4O_4$	614,82	614,38
P6		$C_{40}H_{57}N_5O_3$	655,91	655,45
P7		$C_{38}H_{50}N_4O_5$	642,83	642,38
P8		$C_{39}H_{52}N_4O_5$	656,85	656,39
P9		$C_{40}H_{52}N_6O_3$	664,88	664,41

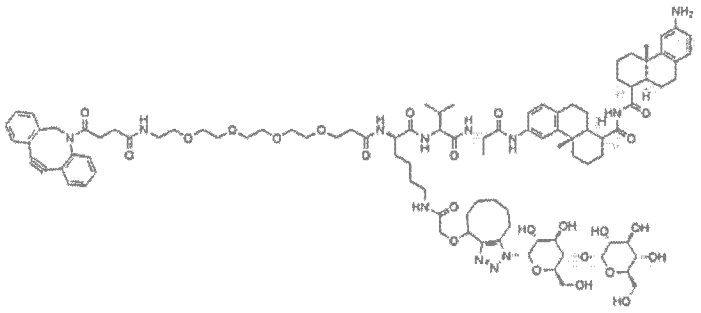
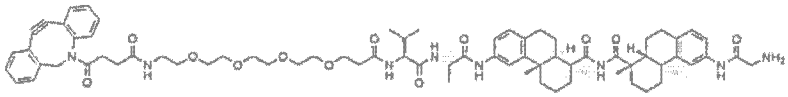
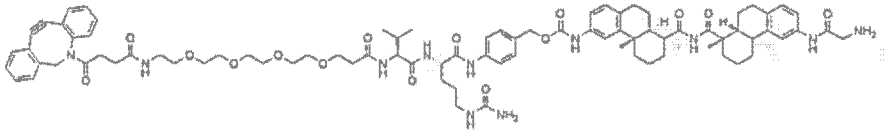
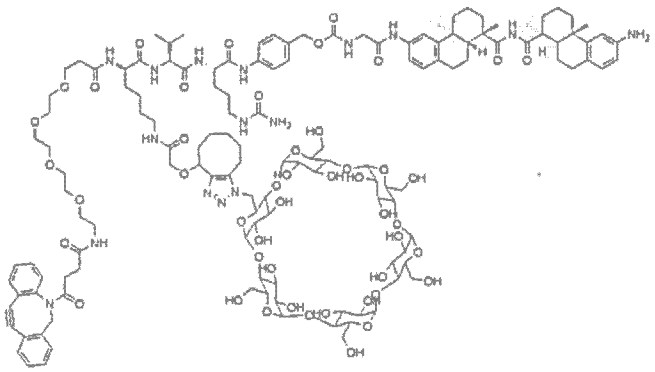
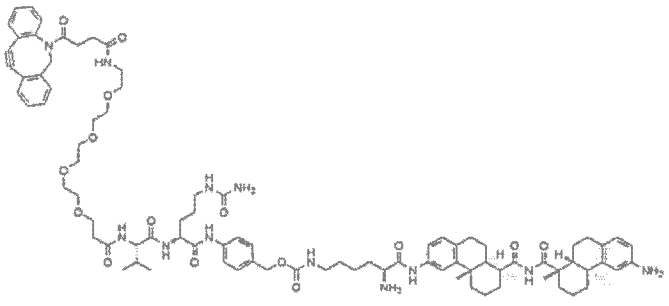
Код CPD	Структуры	MF	FW	Точная масса
P10		$C_{41}H_{55}N_5O_6$	713,91	713,42
P11		$C_{44}H_{59}N_5O_8$	785,97	785,44
P12		$C_{42}H_{57}N_5O_6$	727,93	727,43
P13		$C_{37}H_{50}N_4O_3$	598,82	398,39
P14		$C_{36}H_{47}N_3O_4$	585,78	585,36
P15		$C_{39}H_{52}N_2O_5$	628,84	628,39

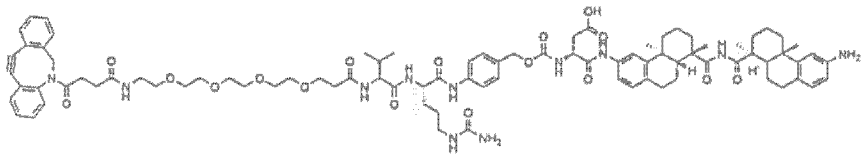
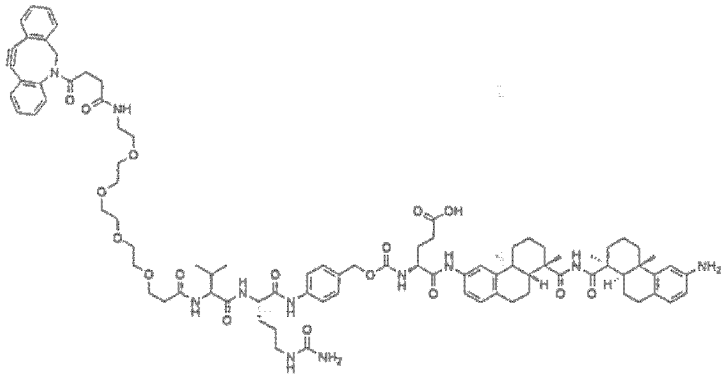
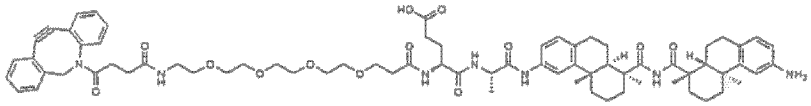
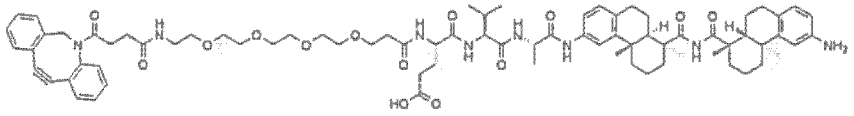
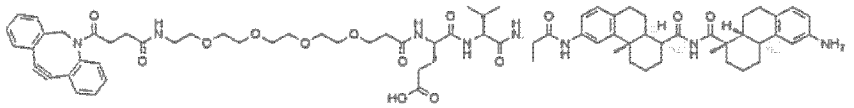
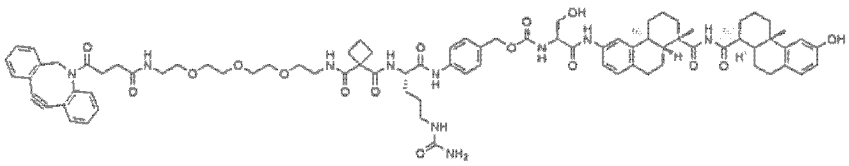
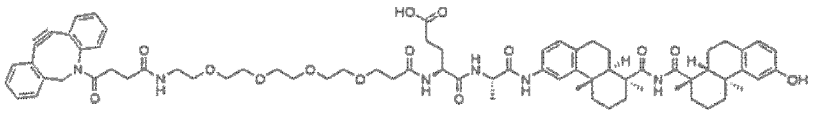
Код CPD	Структуры	MF	FW	Точная масса
P16		$C_{42}H_{56}N_4O_7$	728,92	728,41
P17		$C_{36}H_{46}N_2O_5$	586,77	586,34
P18		$C_{39}H_{52}N_4O_6$	672,87	672,39
P19		$C_{34}H_{44}N_2O_4$	544,74	544,33

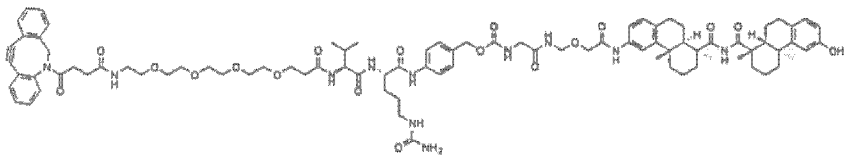
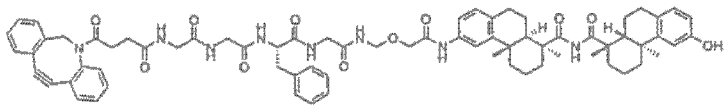
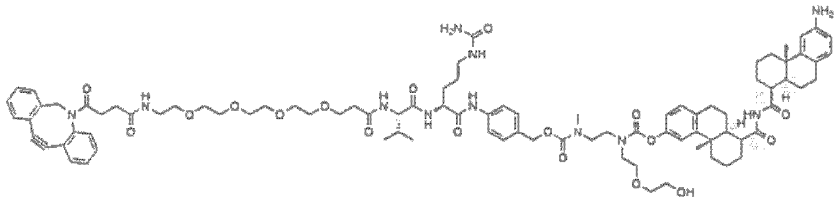
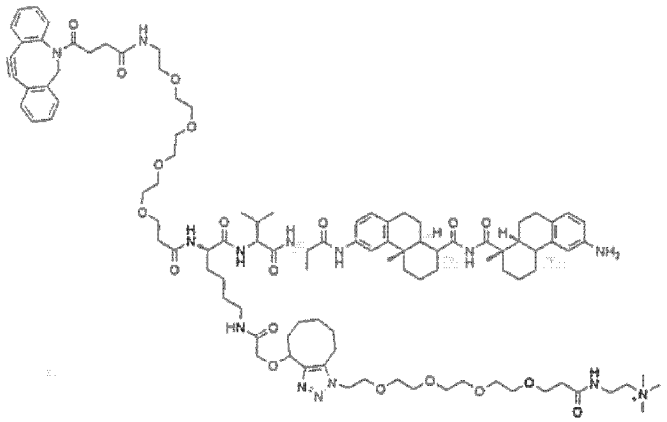
[00214] Примеры линкера-полезной нагрузки настоящего раскрытия включают, но не ограничиваются, те, которые описаны в Таблице 2 ниже.

Таблица 2. Список соединений линкер-полезная нагрузка

LP	Название линкера	Структуры
LP1	DIBAC-suc-PEG4-dLys(COT-CD)-VA	
LP2	DIBAC-suc-PEG4-dLys(COT-CD)-vc	
LP3	DIBAC-suc-PEG4-dLys(COT-PEG4-taurine)-VA	
LP4	DIBAC-suc-PEG4-dLys(COT-PEG4-taurine)-vc	

LP	Название линкера	Структуры
LP5	DIBAC-suc-PEG4-dLys(COT-PEG4-Maltose)-VA	
LP6	DIBAC-suc-PEG4-VA	
LP7	DIBAC-suc-PEG4-vcPABC	
LP8	DIBAC-suc-PEG4-dLys(COT-CD)-vcPABC	
LP9	DIBAC-suc-PEG4-vcPABC	

LP	Название линкера	Структуры
LP10	DIBAC-suc-PEG4-vcPABC	
LP11	DIBAC-suc-PEG4-vcPABC	
LP12	DIBAC-suc-PEG4-EA	
LP13	DIBAC-suc-PEG4-Glu-VA	
LP14	DIBAC-suc-PEG4-dGlu-VA	
LP15	DIBAC-suc-PEG3-CDBCA-Cit-PAB	
LP16	DIBAC-suc-PEG4-Glu-Ala	

LP	Название линкера	Структуры
LP17	DIBAC-suc-PEG4-vcPAB-Gly-NCO-GLA	
LP18	DIBAC-suc-GGFG-NCO-GLA	
LP19	DIBAC-suc-PEG4-vcPABC-MeEDA(PEG)	
LP20	DIBAC-suc-PEG4-dLys(COT-PEG4-taurine)-VA	

[00215] Некоторые варианты реализации данного изобретения проиллюстрированы следующими неограничивающими примерами.

[00216] Реагенты и растворители были получены из коммерческих источников, таких как Sinopharm Chemical Reagent Co. (SCRC), Sigma-Aldrich, Alfa или других поставщиков, если явно не указано иное.

[00217] Спектры ^{1}H ЯМР и другие спектры ЯМР регистрировали на Bruker AVIII 400 или Bruker AVIII 500. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Nuts или программного обеспечения MestReNova, измеряя сдвиги протонов в частях на миллион (ppm) ниже по сравнению с внутренним стандартом - тетраметилсиланом.

[00218] Измерение ВЭЖХ-МС проводилось в системе Agilent 1200 HPLC/6100 SQ с использованием следующих условий:

[00219] Метод А для измерения ВЭЖХ-МС включает в качестве подвижной фазы: А: воду (0,01% трифторуксусной кислоты (TFA)), В: ацетонитрил (0,01% TFA). Фаза градиента составляла от 5 % В до 95 % В за 15 минут (мин) при 1,0 мл/мин. Используемая колонка представляла собой SunFire C18, 4,6 × 50 мм, 3,5 мкм. Температура колонки составляла 50 °С. Детекторы включали аналого-цифровой преобразователь испарительного светорассеяния (далее «ADC ELSD»), детектор с диодной матрицей (DAD, 214 нм и 254 нм) и ионизация электрораспылением - ионизация при атмосферном давлении (ES-API).

[00220] Метод В для измерения ВЭЖХ-МС включал в качестве подвижной фазы: А: вода (10 мМ NH_4HCO_3) и В: ацетонитрил. Фаза градиента составляла от 5 % В до 95 % В за 15 мин при 1,0 мл/мин. Используемая колонка представляла собой XBridge C18, 4,6 × 50 мм, 3,5 мкм. Температура колонки составляла 50 °С. Детекторы включали ADC ELSD, DAD (214 нм и 254 нм) и масс-селективный детектор (MSD ES-API).

[00221] Измерение ЖХ-МС проводилось в системе Agilent 1200 HPLC/6100 SQ с использованием следующих условий:

[00222] Метод А для измерения ЖХ-МС выполняли на приборе WATERS 2767. Колонка представляла собой Shimadzu Shim-Pack, PRC-ODS, 20 x 250 мм, 15 мкм, две соединенные последовательно. Подвижная фаза представляла собой А: воду (0,01% TFA) и В: ацетонитрил (0,01% TFA). Фаза градиента составляла от 5 % В до 95 % В за 3 мин при 1,8-2,3 мл/мин. Используемая колонка представляла собой SunFire C18, 4,6 × 50 мм, 3,5 мкм. Температура колонки составляла 50 °С. Детекторы включали ADC ELSD, DAD (214 нм и 254 нм) и MSD ES-API.

[00223] Метод В для измерения ЖХ-МС выполняли на приборе Gilson GX-281. Колонка представляла собой Xbridge Prep C18 10 мкм OBD, 19 x 250 мм. Подвижная фаза представляла собой А: воду (10 мМ NH_4HCO_3) и В: ацетонитрил. Фаза градиента составляла от 5 % В до 95 % В за 3 мин при 1,8-2,3 мл/мин. Используемая колонка представляла собой XBridge C18, 4,6 × 50 мм, 3,5 мкм. Температура колонки составляла 50 °С. Детекторы включали ADC ELSD, DAD (214 нм и 254 нм) и MSD ES-API.

[00224] Препаративную жидкостную хроматографию высокого давления (Prep-HPLC) выполняли на приборе Gilson GX-281. Использовали две системы растворителей: кислотную и основную. Кислотная система растворителей (метод А) включала колонку Waters Sunfire 10 мкм C18 (100 Å, 250 x 19 мм). Растворителем А для препаративной ВЭЖХ был 0,05% TFA в воде, а растворителем В был ацетонитрил. Условием элюирования был линейный градиент, который увеличивал растворитель В от 5% до 100%

в течение 20 минут при 30 мл/мин. Основная система растворителей (метод B) включала колонку Waters Xbridge 10 мкм C18 (100 Å, 250 x 19 мм). Растворителем A для препаративной ВЭЖХ был 10 мМ бикарбонат аммония (NH_4HCO_3) в воде, а растворителем B был ацетонитрил. Условием элюирования был линейный градиент, который увеличивал растворитель B от 5% до 100% в течение 20 минут при 30 мл/мин.

[00225] Флэш-хроматографию выполняли на приборе Biotage с колонкой Agela Flash Silica-CS. Обращенно-фазовую флэш-хроматографию выполняли на приборе Biotage с Boston ODS или Agela C18, если явно не указано иное.

[00226] Используемые здесь символы и условные обозначения, используемые в этих процессах, схемах и примерах, независимо от того, определена ли конкретная аббревиатура, соответствуют тем, которые используются в современной научной литературе, например, в Журнале Американского химического общества или Журнале биологической химии. В частности, но без ограничения, следующие сокращения могут быть использованы в примерах и во всем описании:

Сокращение	Термин
ADC	Конъюгат антитело-лекарственное средство
Агликозилированное антитело	Антитело, не имеющее гликана
Водн.	Водный
Boc	*N-трет*-бутоксикарбонил
BupH	Термическое наукоёмкое изделие № 28372, содержащее 100 мМ фосфата натрия и 150 мМ хлорида натрия, без калия, pH доводили до 7,2-7,6-7,8 Мк, если не указано иное.
CD	Циклодекстрин
COT	Циклооктинол
Da	Дальтон
DAR	Отношение лекарственного средства к антителу
DCM	Дихлорметан или хлористый метилен
DIBAC	Дибенз[b,f]азоцин, 11,12-дидегидро-5,6-дигидро-
DIBAC–Suc	Дибенз[b,f]азоцин-5(6H)-бутановая кислота, 11,12-дидегидро
DIBACT	3H-бензо[c]-1,2,3-триазоло[4,5-e][1]бензазоцин, 8,9-дигидро-

Сокращение	Термин
DIPEA	Диизопропилэтиламин
DMF	*N*,*N*-диметилформамид
ДМСО	Диметилсульфоксид
EC	Ферментная комиссия
ELSD	Испарительный детектор рассеяния света
ESI	Электрораспылительная ионизация
g	Грамм
HATU	2-(7-Аза-1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат
HC	Тяжелая цепь иммуноглобулина
HEK	Эмбриональные клетки почек человека
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ч, час или часы	Часы
LC	Легкая цепь иммуноглобулина
LCh	Газожидкостная хроматография
MALDI	Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
MC	Малеимидокапроил
мг	миллиграммы
мин.	минуты
мл	миллилитры
mmh	тег myc-myc-гексагистидин
мкл	микролитры
мМ	миллимоляр
мкм	микромоляр
MMAE	Монометил ауристатин Е
MC (MS)	Масс-спектрометрия
MsCl	Метансульфонилхлорид

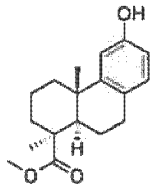
Сокращение	Термин
MSD	Масс-селективный детектор
м.м.	Молекулярная масса
NHS	*N*-гидроксисукцинимид
нМ	наномоль
ЯМР	Ядерно-магнитный резонанс
PAB	Пара-аминобезилоксикарбонил
PBS	10 мМ натрий-фосфатный буфер и 150 мМ хлорид натрия
PBSg	10 мМ фосфат натрия, 150 мМ хлорид натрия, 5% глицерин
PEG	Полиэтиленгликоль
ч./млн	Частей на миллион (химический сдвиг)
RP	Обращенная фаза
RT или rt	Комнатная температура
ДСН-ПААГ-электрофорез	Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия
SEC	Гель-фильтрация
Suc	Сукциновая кислота
TCEP	Трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид
TEA	Триэтиламин
TFA	Трифторуксусная кислота
TG	Трансглютаминаза
THF	Тетрагидрофуран
TOF	Время пролета
UPLC	Ультраэффективная жидкостная хроматография
УФ	Ультрафиолет
VA	Валин-аланин
VC	Валин-цитруллин

МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ

ПРИМЕР 1

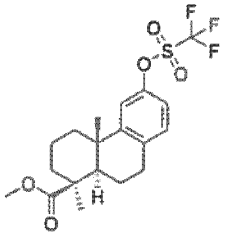
[00227] Этот пример демонстрирует общие методы синтеза производных подокарповой кислоты **P1**, P15 и **P2** в таблице 1 выше. Этот пример относится к соединениям, пронумерованным от **1** до **12a-b** и **P1**, **P15** и **P2** на фиг. 1.

Метил (1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (2)



[00228] К раствору подокарповой кислоты (**1**, 90 г, 0,33 моль) в метаноле (200 мл) и толуоле (600 мл) добавляли (триметилсилил) диазометан (2 М в гексане, 200 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Подокарповая кислота была полностью израсходована в соответствии с ЖХМС. Летучие вещества удаляли *в вакууме* и остаток растирали с петролейным эфиром (2 л), получая соединение **2** (91 г, выход 96%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 289 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 8,95 (с, 1H), 6,79 (д, J = 8,2 Гц, 1H), 6,63 (д, J = 2,4 Гц, 1H), 6,48 (дд, J = 8,2, 2,4 Гц, 1H), 3,58 (с, 3H), 2,80-2,55 (м, 2H), 2,20-2,02 (м, 3H), 1,96-1,71 (м, 2H), 1,56-1,45 (м, 2H), 1,27 (т, J = 13,5 Гц, 1H), 1,21 (с, 3H), 1,09 (тд, J = 13,5, 4,1 Гц, 1H), 0,91 (с, 3H) м.д.

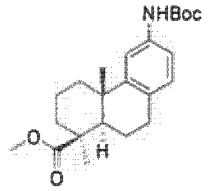
Метил (1*S*,4a*S*,10a*R*)-1,4a-диметил-6-(трифторметансульфонилокси)-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (3)



[00229] К раствору соединения **2** (10 г, 35 ммоль) в метиленхлориде (200 мл) добавляли пиридин (3,3 г, 42 ммоль) и DMAP (0,84 г, 6,9 ммоль) в атмосфере азота. Смесь охлаждали до -78 ℃ и добавляли трифликовый ангидрид (12 г, 42 ммоль). Полученной смеси давали нагреться до 25 ℃ и перемешивали при 25 ℃ еще 4 часа. Реакционную смесь разбавляли

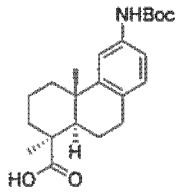
DCM (500 мл), промывали водой (100 мл), *водн.* гидрохлорида (1 н., 150 мл) и рассола (100 мл), сушили над сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*, получая неочищенное соединение **3** (14 г, выход сырого продукта 97%) в виде вязкого масла, которое является достаточно чистым для следующей стадии. Неочищенное соединение **3** может быть очищено флэш-хроматографией (0-10% этилацетат в петролейном эфире) с получением чистого соединения 3 в виде вязкого масла. ESI масса/заряд: 421,2 $(M + 1)^+$. 1H ЯМР (400 МГц, CDCl3) δ 7,12 (d, J = 2,5 Гц, 1H), 7,10 (d, J = 8,5 Гц, 1H), 6,97 (dd, J = 8,5, 2,5 Гц, 1H), 3,67 (s, J = 3,4 Гц, 3H), 2,93 (dd, J = 17,2, 4,4 Гц, 1H), 2,85-2,71 (м, 1H), 2,29 (d, J = 13,5 Гц, 1H), 2,25-2,14 (m, 2H), 2,03-1,89 (m, 2H), 1,71-1,61 (m, 1H), 1,56-1,48 (m, 1H), 1,40 (td, J = 13,4, 4,2 Гц, 1H), 1,30-1,22 (m, 3H), 1,09 (td, J = 13,6, 4,2 Гц, 1H), 1,02 (s, 3H) м.д.

Метил (1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-((*трет*-бутоксикарбонил)амино)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (4)



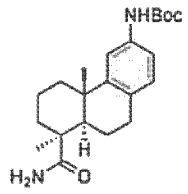
[00230] К раствору соединения **3** (14 г, 34 ммоль) и *трет-бутилкарбамата* ($_{Boc}NH_2$, 7,9 г, 68 ммоль) в *трет*-бутаноле (100 мл) последовательно добавляли карбонат цезия (22 г, 68 ммоль), трис(дибензилиденацетон)дипалладий(0) ($Pd_2(dba)_3$, 1,8 г, 2,0 ммоль) и X-Phos (1,8 г, 4,0 ммоль) при комнатной температуре. Смесь дегазировали и продували аргоном 3 раза, а затем перемешивали при 80 °C в баллоне с аргоном в течение ночи до полного израсходования соединения **3**, по данным ТСХ. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли этилацетатом и фильтровали через целит. Твердые частицы промывали этилацетатом 3 раза. Объединенный фильтрат концентрировали *в вакууме* и остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-6,25% этилацетат в петролейном эфире) с получением соединения **4** (11 г, выход 82%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 410 $(M + 23)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.07 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.13 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.87 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 3.59 (s, 3H), 2.76 (dd, J = 16.4, 4.5 Гц, 1H), 2.70-2.61 (m, 1H), 2.16-2.05 (m, 3H), 2.00-1.75 (m, 2H), 1.65-1.50 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.31-1.25 (m, 1H), 1.21 (s, 3H), 1.10 (td, J = 13.5, 4.1 Гц, 1H), 0.92 (s, 3H) м.д.

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-{[(*трет*-бутокси)карбонил]амино}-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоновая кислота (5)



[00231] К раствору соединения 4 (4,9 г, 13 ммоль) в DMSO добавляли *трет*-бутоксид калия (15 г, 0,13 моль) одной порцией при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при 60 °C в течение 3 ч в атмосфере аргона до завершения реакции согласно ЖХМС. После охлаждения до КТ реакционную смесь выливали на лед и медленно подкисляли *водн.* гидрохлоридом (0,5 М) до pH 5, в течение которого температуре не позволяли подниматься выше 25 °C. Осадки собирали фильтрованием и несколько раз промывали водой. Неочищенный продукт дополнительно очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-20% этилацетат в петролейном эфире), получая соединение **5** (4,5 г, выход 93%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 318 (M - 55)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 12.08 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.87 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 2.79-2.68 (m, 1H), 2.65 (d, J = 12.6 Гц, 1H), 2.17-2.03 (m, 4H), 1.94-1.76 (m, 2H), 1.53 (d, J = 13.7 Гц, 1H), 1.46 (d, J = 7.4 Гц, 9H), 1.29-1.14 (m, 5H), 1.04 (s, 3H) ppm.

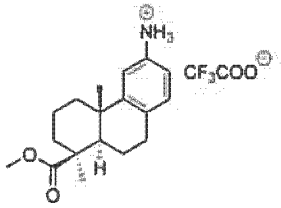
***трет*-бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-карбамоил-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (6)**



[00232] К раствору **5** (4,5 г, 12 ммоль) и HATU (4,9 г, 13 ммоль) в DMF (50 мл) добавляли диизопропилэтиламин (20 мл, 0,12 моль) и смесь перемешивали при 25 °C в течение часа. Затем к смеси добавляли хлорид аммония (16 г, 0,30 моль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Полученную смесь разбавляли этилацетатом, промывали водой и рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали флэш-хроматографией (0-20% этилацетат в петролейном эфире), получая соединение **6** (4,2 г, выход 94%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 373.3 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, methanol$_{d4}$) δ 7.20 (s, 1H),

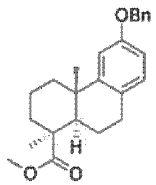
6.97 (d, J = 7.7 Гц, 1H), 6.80 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 2.77-2.68 (m, 2H), 2.66-2.55 (m, 1H), 2.20 (d, J = 12.9 Гц, 1H), 2.13 (dd, J = 13.2, 5.3 Гц, 1H), 2.08 (d, J = 14.0 Гц, 1H), 2.03-1.86 (m, 2H), 1.54 (d, J = 11.1 Гц, 1H), 1.40 (s, 9H), 1.26 (t, J = 26.7Гц, 1H), 1.18 (s, 3H), 1.14-1.03 (m, 4H) ppm.

Соль трифторуксусной кислоты метил(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксилата (7)



[00233] К раствору соединения **4** (6,0 г, 15 ммоль) в DCM (60 мл) добавляли TFA (12 мл) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч до полного удаления Boc по данным ТСХ. Реакционную смесь концентрировали *в вакууме*, получая неочищенное соединение **7** в виде соли TFA, которую использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ESI масса/заряд: 288 $(M + 1)^+$.

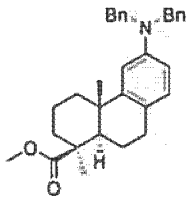
Метил (1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(бензилокси)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (8a)



[00234] Смесь соединения **2** (12 г, 40 ммоль) и карбоната цезия (14 г, 44 ммоль) в DMF (100 мл) перемешивали при 20-25 °C в течение 15 минут. К смеси добавляли бензилбромид (7,1 мл, 60 ммоль) при комнатной температуре. После перемешивания при комнатной температуре в течение 4 часов полученную смесь выливали в холодную воду и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический раствор промывали водой и рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*. Сырой продукт очищают флэш-хроматографией (0-10% этилацетат в петролейном эфире), получая указанное в заголовке соединение **8a** (13 г, выход 89%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 379 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, метанол$_{d4}$) δ 7.60-7.20 (m, 5H), 7.00-6.82 (m, 2H), 6.73 (d, J = 7.1 Гц, 1H), 5.03 (s, 2H), 3.66 (s, 3H), 2.95-2.58 (m, 2H), 2.36-2.10 (m,

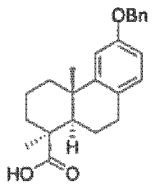
3H), 2.10-1.85 (m, 2H), 1.70-1.48 (m, 2H), 1.44-1.21 (m, 4H), 1.15 (t, *J* = 17.2 Гц, 1H), 1.01 (s, 3H) ppm.

Метил (1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(диаминобензилокси)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (8b)



[00235] К раствору неочищенного соединения 7, полученного выше (*расч.* 15 ммоль) в DMF (60 мл), добавляли карбонат калия (6,4 г, 46 ммоль) и бензилбромид (5,8 г, 34 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при 80 °C в течение ночи до завершения реакции, по данным ТСХ. После охлаждения до КТ смесь выливали в холодную воду (300 мл) и экстрагировали этилацетатом (х 3). Объединенный органический раствор промывали водой и рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме* с получением сырого продукта **8b**, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ESI масса/заряд: 468 $(M + 1)^+$.

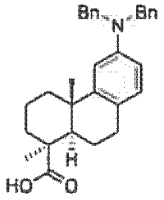
(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(бензилокси)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоновая кислота (9a)



[00236] Смесь соединения **8a** (11 г, 29 ммоль) и *трет*-бутоксида калия (33 г, 0,29 моль) в DMSO (0,19 л) перемешивали при 100 °C в течение часа до полного израсходования сложного эфира, что контролировали с помощью ЖХМС и ТСХ. После охлаждения до 25 °C смесь гасили водным гидрохлоридом (1 N) и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический раствор промывали рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-24% этилацетат в петролейном эфире), получая соединение **9a** (7,5 г, выход 71%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 365 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, метанол$_{d4}$) δ 7.42 (d, *J* = 7.4 Гц, 2H), 7.36 (t, *J* = 7.5 Гц, 2H), 7.30 (t, *J* = 7.3 Гц, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.4 Гц, 1H), 6.87 (d, *J* = 2.5 Гц, 1H), 6.72 (dd, *J* = 8.4, 2.5 Гц, 1H), 5.02 (s, 2H), 2.82 (dd, *J* =

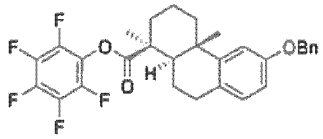
16.3, 4.4 Гц, 1H), 2.77-2.65 (m, 1H), 2.24 (d, *J* = 13.2 Гц, 2H), 2.19 (dd, *J* = 13.8, 6.0 Гц, 1H), 2.11-1.96 (m, 2H), 1.64-1.56 (m, 1H), 1.53 (d, *J* = 11.0 Гц, 1H), 1.35 (td, *J* = 13.3, 3.7 Гц, 1H), 1.30 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.11-1.05 (m, 1H) ч/млн.

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(дибензиламино)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоновая кислота (9b)



[00237] К раствору неочищенного соединения **8b**, полученного выше (*расч.* 15 ммоль) в DMSO (100 мл), добавляли *трет*-бутоксид калия (17 г, 0,15 моль) одной порцией при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при 100 °C в течение 2 ч в атмосфере аргона до завершения реакции согласно ЖХМС. После охлаждения до КТ реакционную смесь выливали на лед и медленно подкисляли *води.* гидрохлоридом (4 М) до pH 5, в течение которого температуре не позволяли подниматься выше 25 °C. Смесь экстрагировали этилацетатом, и объединенный органический раствор промывали водой и рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*. Неочищенный продукт очищали хроматографией на колонке с силикагелем (0-20% этилацетата в петролейном эфире) с получением соединения **9b** (6,8 г, выход 99% в 3 стадии от соединения 4) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 454 $(M + 1)^+$.

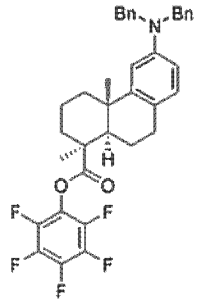
Пентафторфенил (1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(бензилокси)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (10a)



[00238] К раствору **9a** (9,6 г, 26 ммоль) в DMF (100 мл) добавляли DIPEA (14 мл, 79 ммоль) и перфторфенил 2,2,2-трифторацетат (15 г, 53 ммоль). Эту смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и контролировали с помощью ЖХМС. Затем реакционную смесь разбавляли эфиром (200 мл) и промывали водой (300 мл) и солевым раствором (200 мл). Органический раствор сушили над сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали флэш-хроматографией (0-10% этилацетат в петролейном эфире), получая соединение **10a** (12 г, выход 88%) в виде белого твердого

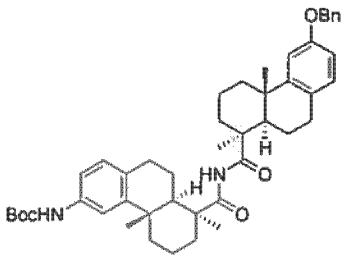
вещества. ESI масса/заряд: 531 $(M + H)^+$. ^1H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 7.43 (d, J = 7.1 Гц, 2H), 7.38 (t, J = 7.4 Гц, 2H), 7.31 (t, J = 7.2 Гц, 1H), 6.93 (dd, J = 10.2, 5.5 Гц, 2H), 6.76 (dd, J = 8.4, 2.5 Гц, 1H), 5.05 (s, 2H), 2.81 (dd, J = 16.3, 4.5 Гц, 1H), 2.77-2.68 (m, 1H), 2.28-2.19 (m, 2H), 2.18 (dd, J = 13.4, 5.6 Гц, 1H), 2.00-1.83 (m, 2H), 1.74 (d, J = 11.8 Гц, 1H), 1.65 (d, J = 14.1 Гц, 1H), 1.47 (s, 3H), 1.38-1.27 (m, 2H), 1.08 (s, 3H) ч/млн.

Пентафторфенил (1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(диаминобензилокси)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (10b)



[00239] К раствору **9b** (6,8 г, 15 ммоль) в DMF (100 мл) добавляли DIPEA (10 мл, 0,61 моль) и перфторфенил-2,2,2-трифторацетат (10 мл, 58 ммоль). Эту смесь перемешивали при 25 °C в течение ночи в атмосфере азота, а затем разбавляли эфиром. Органический слой промывали водой и рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-10% этилацетат в петролейном эфире), получая соединение **10b** (7,5 г, выход 81%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 620 $(M + 1)^+$. ^1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7.36-7.25 (m, 10H), 6.92 (d, J =8.4 Гц, 1H), 6.67 (d, J =2.8 Гц, 1H), 6.63 (dd, J = 8.4, 2.6 Гц, 1H), 4.63 (m, 4H), 2.85-2.73 (m, 2H), 2.41-2.37(m, 1H), 2.22-2.20 (m, 1H), 2.15-1.91 (m, 3H), 1.71-1.65 (m, 2H), 1.51 (s, 3H), 1.37-1.19 (m, 2H), 1.10 (s, 3H) ч/млн.

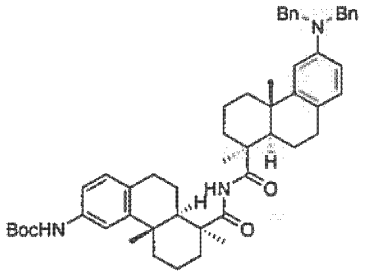
***трет*-бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(бензилокси)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо} карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (11a)**



[00240] К раствору соединения **6** (2,3 г, 6,2 ммоль) в THF (20 мл) по каплям добавляли н-BuLi (2,5 М в гексане, 5,5 мл, 14 ммоль) при -78 °C. Реакционную смесь перемешивали при -78 °C в течение 1 часа. К смеси добавляли раствор **10a** (3,0 г, 5,6 ммоль) в THF (20 мл), и полученную смесь затем перемешивали при 10-20 °C в течение ночи, пока соединение **10a** не израсходовалось, что контролировали с помощью ЖХМС. Реакцию гасили *насыщ. водн.* хлоридом аммония и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический раствор промывали водой и рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали флэш-хроматографией (0-30% этилацетат в петролейном эфире), получая соединение **11a** (1,59 г, выход 51%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 719 $(M + 1)^+$.

[00241] *(По сравнению с процедурой **11b** ниже, здесь использовался n-BuLi вместо LiHMDS. Хотя **6** не был полностью израсходован, эта процедура привела к меньшему количеству побочного продукта, и выход **11a** был увеличен прибл. от 40% до 51%. Было выделено непрореагировавшее соединение **6** (выход извлеченного продукта: 10-20%).*

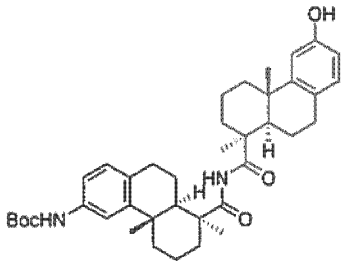
***трет*-бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(дибензиламино)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо} карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (11b)**



[00242] К раствору соединения **6** (1 г, 2,7 ммоль) в THF (15 мл) по каплям добавляли бис (триметилсилил) амид лития (1 М в гексане, 8,0 мл) при 0 °C. Реакционную смесь перемешивали при 0 °C в течение часа. К смеси добавляли раствор соединения **10b** (2,5 г, 4,0 ммоль) в THF (10 мл), и полученную смесь затем перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакцию затем гасили *насыщ. водн.* хлоридом аммония и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический раствор промывали водой и рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали флэш-хроматографией (0-35% этилацетат в петролейном эфире) с получением соединения **11b** (0,95 г, выход 44%) в виде белого твердого вещества; и извлеченное соединение **6** (выход полезного компонента 37%). ESI масса/заряд: 808 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8.16 (s, 1H), 7.35-7.24 (m, 10H), 7.12 (d, J = 8 Гц, 1H), 7.00 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.91

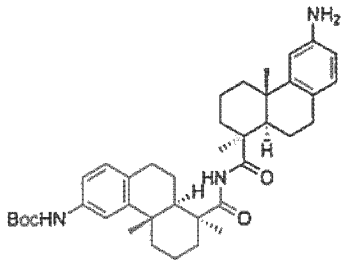
(d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.62-6.59 (m, 2H), 6.42 (s, 1H), 4.62 (s, 3H), 2.98-2.75 (m, 4H), 2.31-2.22 (m, 5H), 2.10-1.97 (m, 5H), 1.69-1.63 (m, 4H), 1.56 (s, 9H), 1.32-1.27 (m, 9H), 1.43-1.27 (m, 5H), 1.05 (s, 3H) ч/млн.

***трет*-бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо} карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (P15)**



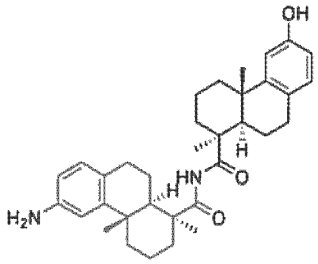
[00243] К раствору **11a** (2,0 г, 2,78 ммоль) в этилацетате (40 мл) добавляли влажный палладий на угле (10% Pd, 0,9 г) в атмосфере азота. Смесь дегазировали, продували водородом и перемешивали при комнатной температуре в баллоне с водородом в течение ночи до полного израсходования **11a**, что контролировалось с помощью ЖХМС. Смесь фильтровали через целит и фильтрат концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-55% этилацетат в петролейном эфире), получая **12a** (**P15**; 1,06 г, выход 61%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 629 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.10 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.15 (d, J = 7.5 Гц, 1H), 6.90 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.81 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 6.63 (d, J = 2.3 Гц, 1H), 6.50 (dd, J = 8.2, 2.4 Гц, 1H), 2.84 (td, J = 16.3, 3.8 Гц, 2H), 2.77-2.64 (m, 2H), 2.30-2.22 (m, 2H), 2.14 (t, J = 10.9 Гц, 4H), 2.00-1.80 (m, 4H), 1.65-1.54 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.34-1.28 (m, 2H), 1.27 (d, J = 2.5 Гц, 6H), 1.15-1.08 (m, 2H), 0.99 (s, 6H) ч/млн.

***трет*-бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо} карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (12b)**



[00244] К раствору **11b** (0,45 г, 0,56 ммоль) в этилацетате (5 мл) добавляли влажный палладий на угле (10% Pd, 50 мг) в атмосфере азота. Смесь дегазировали, продували водородом 3 раза и перемешивали при комнатной температуре в баллоне с водородом в течение ночи. Смесь фильтровали через целит, и фильтрат концентрировали *в вакууме*, получая соединение **12b** (0,33 г, выход 94%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 628 $(M + 1)^+$.

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-*N*-[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P1)



[00245] К раствору соединения **12a** (0,17 г, 0,27 ммоль) в DCM (10 мл) по каплям добавляли TFA (3 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до удаления Boc в соответствии с ЖХМС. Летучих компоненты удаляли *в вакууме* и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (метод B), получая **P1** (0,10 г, выход 70%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 529.3 $(M + 1)^+$. Оптическое вращение (α): + 2,53° (1,7 г/100 мл THF, 25 °C).

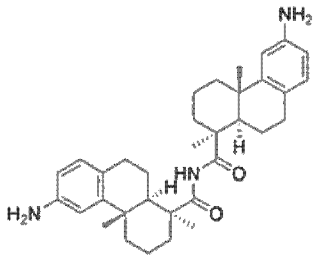
[00246] ^{1}H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 8.14 (s, 1H), 6.92 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 6.86 (d, J = 8.1 Гц, 1H), 6.73 (d, J = 2.5 Гц, 1H), 6.65-6.57 (m, 2H), 6.50 (dd, J = 8.1, 2.3 Гц, 1H), 4.75 (s, 1H), 3.49 (s, 1H), 2.99-2.85 (m, 2H), 2.79 (tt, J = 11.6, 5.8 Гц, 2H), 2.34-2.14 (m, 6H), 2.15-1.95 (m, 4H), 1.74-1.51 (m, 5H), 1.46-1.34 (m, 2H), 1.30 (s, 6H), 1.21-1.06 (m, 8H) ч/млн.

[00247] ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 8.99 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 6.81 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.68 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.63 (d, J = 2.5 Гц, 1H), 6.50 (dd, J = 8.0, 2.5 Гц, 1H), 6.48 (d, J = 2.5 Гц, 1H), 6.34 (dd, J = 8.0, 2.5 Гц, 1H), 4.69 (s, 2H), 2.86-2.60 (m, 4H), 2.28-2.10 (m, 6H), 1.94-1.75 (m, 4H), 1.65-1.53 (m, 4H), 1.35-1.20 (m, 8H), 1.20-1.06 (m, 2H), 0.98 (s, 6H) ч/млн.

[00248] ^{13}C ЯМР (100 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 174.03, 173.92, 155.34, 148.39, 147.63, 146.43, 129.56, 129.09, 124.60, 121.65, 113.23, 112.58, 111.81, 110.77, 52.32, 52.09, 45.56, 45.52, 39.20, 39.36, 38.23, 38.17, 37.18, 37.12, 31.08, 31.00, 27.65, 27.64, 23.08, 23.03, 21.43, 21.27, 19.64, 19.61 ч/млн.

[00249] ВЭЖХ (метод B): время удерживания: 8,92 мин, чистота: 99,4%. хиральная ВЭЖХ: > 99,9% (в колонке AD, AS, OD и OJ).

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-*N*-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P2)

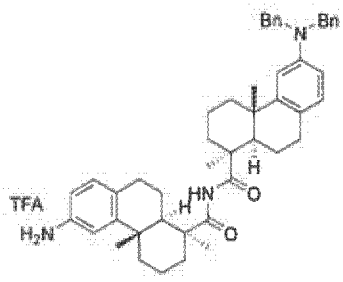


[00250] К раствору соединения **12b** (0,63 г, 1,0 ммоль) в DCM (10 мл) по каплям добавляли TFA (3 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов до удаления Boc в соответствии с ЖХМС. Смесь очищали непосредственно препаративной ВЭЖХ (метод B), получая **P2** (0,42 г, выход 79%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 528.2 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 8.28 (s, 1H), 6.67 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 6.47 (d, J = 2.0 Гц, 2H), 6.33 (dd, J = 8.0, 2.0 Гц, 2H), 4.69 (s, 4H), 2.80-2.75 (m, 2H), 2.70-2.60 (m, 2H), 2.26-2.20 (m, 2H), 2.19-2.05 (m, 4H), 1.95-1.75 (m, 4H), 1.62-1.50 (m,4H), 1.33-1.20 (m, 8H), 1.12 (t, J = 8.8 Гц, 2H), 0.98 (s, 6H) ч/млн.

ПРИМЕР 2

[00251] Этот пример демонстрирует общие методы синтеза производного **P3** подокарповой кислоты в таблице 1 выше. Этот пример относится к соединениям, пронумерованным **11b** и **P3** на фиг. 2A.

(3*S*,8*R*,9*S*,10*R*,13*S*,14*S*)-17-имино-10,13-диметил-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16, 17-тетрадекагидро-1*H*-циклопента[a]фенантрен-3-ол, соль трифторуксусной кислоты (P3)



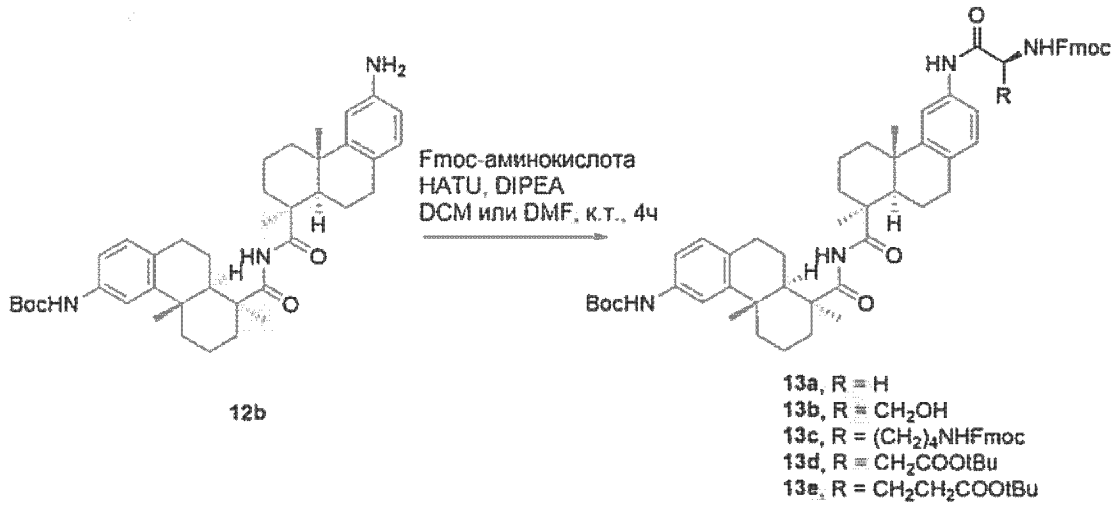
[00252] К раствору соединения **11b** (10 мг, 12 мкмоль) в DCM (2 мл) добавляли TFA (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до удаления Boc в соответствии с ЖХМС. Летучие вещества удаляли *в вакууме*, а остаток растворяли в 5% ацетонитриле в воде. Раствор лиофилизировали с получением соединения **P3** (7 мг, выход 80%) в виде светло-желтого твердого вещества. ESI масса/заряд: 354.8 $(M/2 + H)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.38 (br s, 2H), 8.08 (s, 1H), 7.35-7.06 (m, 12H), 6.97 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 6.73 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.46 (d, J = 6.4 Гц, 1H), 4.68-4.55 (m, 4H), 3.00-2.50 (m, 4H), 2.40-2.00 (m, 6H), 1.94-1.73 (m, 5H), 1.70-1.50 (m, 3H), 1.50-1.00 (m, 11H), 0.98 (s, 3H), 0.83 (s, 3H) ч/млн. ^{19}F ЯМР (376 МГц, $DMSO_{d6}$) δ -74.08 ч/млн.

ПРИМЕР 3

[00253] Этот пример демонстрирует общие способы синтеза производных подокарповой кислоты **P4-P8** в таблице 1 выше. Этот пример относится к соединениям, пронумерованным **12b** и **P4-P9, P13, P14 и P17** на фиг. 2A.

Пример 3a

Промежуточные продукты 13a-e

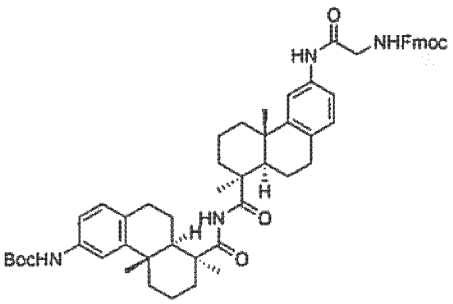


[00254] К раствору соединения **12b** (1,0 экв.) в DMF или DCM последовательно добавляли Fmoc-аминокислоту (1,1-1,2 экв.), HATU (1,2-1,5 экв.) и DIPEA (2,0-3,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, что контролировали с помощью ЖХМС. Смесь концентрировали *в вакууме* (когда растворителем был DCM) и остаток очищали хроматографией на колонке с силикагелем (0-90% этилацетат в петролейном эфире); или реакционную смесь (если в качестве растворителя использовался DMF) непосредственно очищали с помощью флэш-

хроматографии с обращенной фазой (50-90% ацетонитрил в водном *бикарбонате* аммония (10 мМ)) с получением соединения **13** в виде белого твердого вещества.

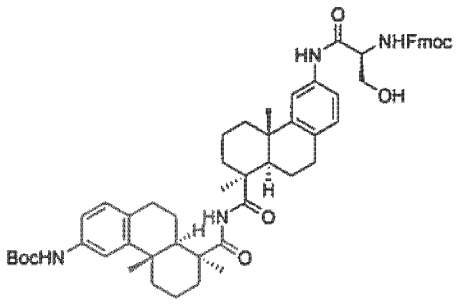
12b g (ммоль)	Fmoc-аминокислота		HATU g (ммоль)	DIPEA g (ммоль)	Растворитель (мл)	Время, (h)	Очистка	Продукт		
	R	g (ммоль)						#	g	Выход (%)
0,13 (0,20)	H	0,071 (0,24)	0,11 (0,29)	0,077 (0,60)	DMF (10)	4	RP-B	**13a**	0,14	78
0,31 (0,50)	CH_2OH	0,18 (0.55)	0,23 (0,60)	0,19 (1,50)	DCM (20)	4	SGC	**13b**	0,39	83
0,20 (0.32)	$(CH_2)_4NHFmoc$	0,21 (0,35)	0,15 (0,38)	0,083 (0,64)	DMF (20)	4	RP-B	**13c**	0,30	78
0,31 (0,50)	$CH_2COOtBu$	0,22 (0.55)	0,23 (0,60)	0,19 (1,50)	DCM (20)	4	SGC	**13d**	0,43	85
0,31 (0,50)	$(CH_2)_2COOtBu$	0,23 (0.55)	0,23 (0,60)	0,19 (1,50)	DCM (20)	4	SGC	**13e**	0,42	82

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-{[(*трет*-бутокси)карбонил] амино} -1,4a -диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил] формамидо} карбонил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9, 10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} метил) карбамат (13a)



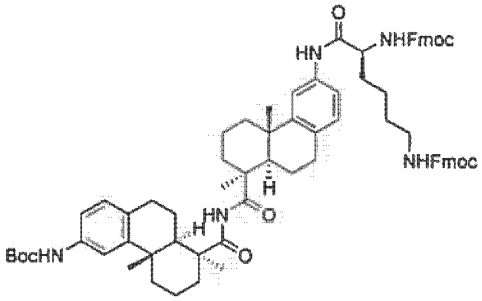
[00255] Следуя общей методике для промежуточных соединений **13a-e**, соединение **13a** (0,14 г, выход 78%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 907 $(M + H)^+$.

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-{[(*трет*-бутокси) карбонил] амино} -1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил] формамидо} карбонил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7, 8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} -2-гидроксиэтил] карбамат (13b)



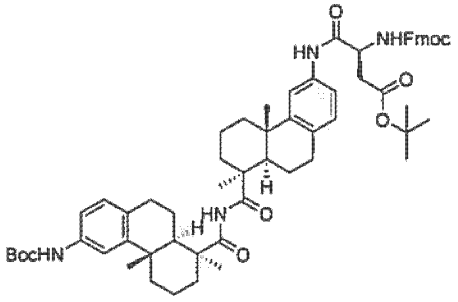
[00256] Следуя общей методике для промежуточных соединений **13a-e**, соединение **13b** (0,39 г, выход 83%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 938 (M + H)$^+$.

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-[(5*S*)-5-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-{[(*трет*-бутокси) карбонил] амино} -1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил] формамидо} карбонил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7, 8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} -5 - {[(9*H*-флуорен-9-илметокси) карбонил] амино} пентил] карбамат (13c)



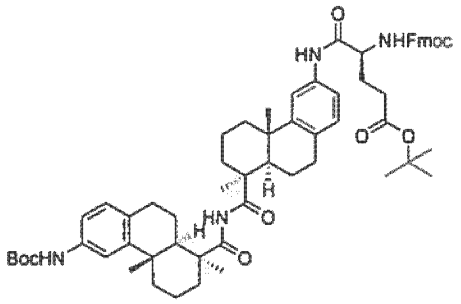
[00257] Следуя общей методике для промежуточных соединений **13a-e**, соединение **13c** (0,30 г, выход 78%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1201 (M + H)$^+$.

(*S*)-*трет*-Бутил-3-(((9*H*-флуорен-9-ил) метокси) карбониламино)-4-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(*трет*-бутоксикарбониламино)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8, 8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-4-оксобутаноат (13d)



[00258] Следуя общей методике для промежуточных соединений **13a-e**, соединение **13d** (0,43 г, выход 85%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1021 $(M+H)^+$.

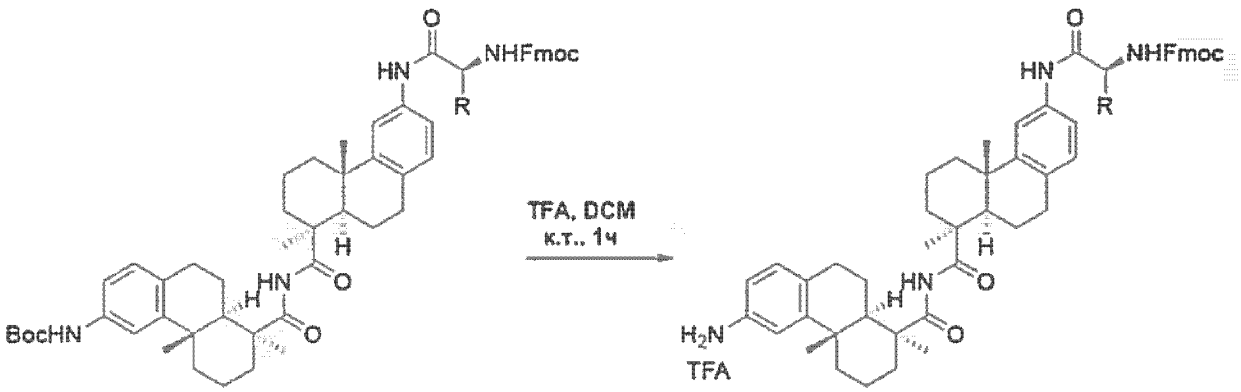
(*S*)-*трет*-Бутил-4-(((9*H*-флуорен-9-ил) метокси) карбониламино)-5-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(*трет*-бутоксикарбониламино)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8, 8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-5-оксопентаноат (13e)



[00259] Следуя общей методике для промежуточных соединений **13a-e**, соединение **13e** (0,42 г, выход 82%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1036 $(M+H)^+$.

Пример 3b

Промежуточные продукты 14a-e



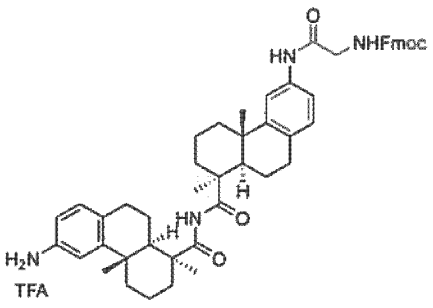
13a, R = H
13b, R = CH_2OH
13c, R = $(CH_2)_4NHFmoc$
13d, R = $CH_2COOtBu$
13e, R = $CH_2CH_2COOtBu$

14a, R = H
14b, R = CH_2OH
14c, R = $(CH_2)_4NHFmoc$
14d, R = CH_2COOH
14e, R = CH_2CH_2COOH

[00260] К раствору соединения **13** (1,0 экв.) в DCM добавляли TFA при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа и концентрировали *в вакууме* с получением сырого продукта **14** в виде бесцветного масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

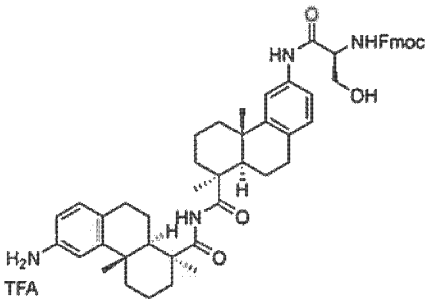
13			TFA (мл)	DCM (мл)	Сырой продукт 14		
#	R	g (ммоль)			#	R	g
13a	H	0,14 (0.16)	3	10	**14a**	H	0,13
13b	CH_2OH	0,10 (0,11)	3	10	**14b**	CH_2OH	0,09
13c	$(CH_2)_4NHFmoc$	0,24 (0,20)	3	10	**14c**	$(CH_2)_4NHFmoc$	0,22
13d	$CH_2COOtBu$	0,12 (0.12)	3	10	**14d**	CH_2COOH	0,10
13e	$(CH_2)_2COOtBu$	0,10 (0,10)	3	20	**14e**	$(CH_2)_2COOH$	0,08

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a -диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил] формамидо} карбонил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9, 10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} метил) карбамат (13a), соль трифторуксусной кислоты (14a)



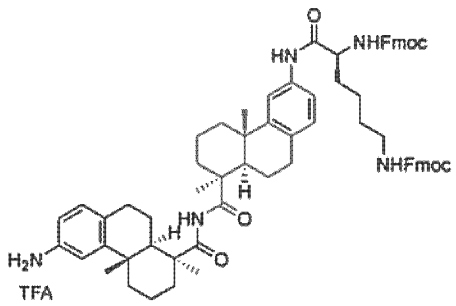
[00261] Следуя общей методике для промежуточных соединений **14a-e**, неочищенное соединение **14a** (0,14 г, выход 99%, соль TFA) получали в виде бесцветного масла. ESI масса/заряд: 807 $(M + 1)^+$.

9*H*-Флуорен-9-илметил (*S*)-1-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b, 8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-3-гидрокси-1-оксопропан-2-илкарбамат, соль трифторуксусной кислоты (14b)



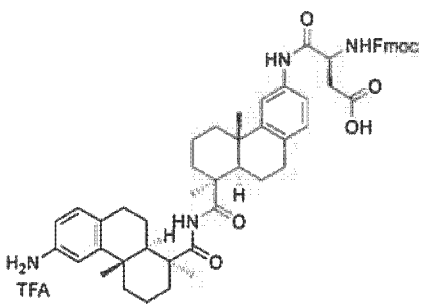
[00262] Следуя общей методике для промежуточных соединений **14a-e**, неочищенное соединение **14b** (0,14 г, выход 99%, соль TFA) получали в виде бесцветного масла. ESI масса/заряд: 837 $(M + 1)^+$.

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-[(5*S*)-5-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил] формамидо} карбонил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7, 8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} -5 - {[(9*H*-флуорен-9-илметокси) карбонил] амино} пентил] карбамат (13c), соль трифторуксусной кислоты (14c)



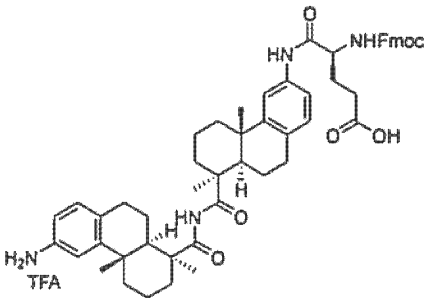
[00263] Следуя общей методике для промежуточных соединений **14a-c**, неочищенное соединение **14c** (0,22 г, выход 92%, соль TFA) получали в виде бесцветного масла. ESI масса/заряд: 1101 $(M + 1)^+$.

(*S*)-3-(((9*H*-Флуорен-9-ил) метокси) карбониламино)-4-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1, 4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен -3-иламино)-4-оксобутановая кислота, соль трифторуксусной кислоты (14d)



[00264] Следуя общей методике для промежуточных соединений **14a-e**, неочищенное соединение **14d** (0,10 г, выход 87%, соль TFA) получали в виде бесцветного масла. ESI масса/заряд: 866 $(M + 1)^+$.

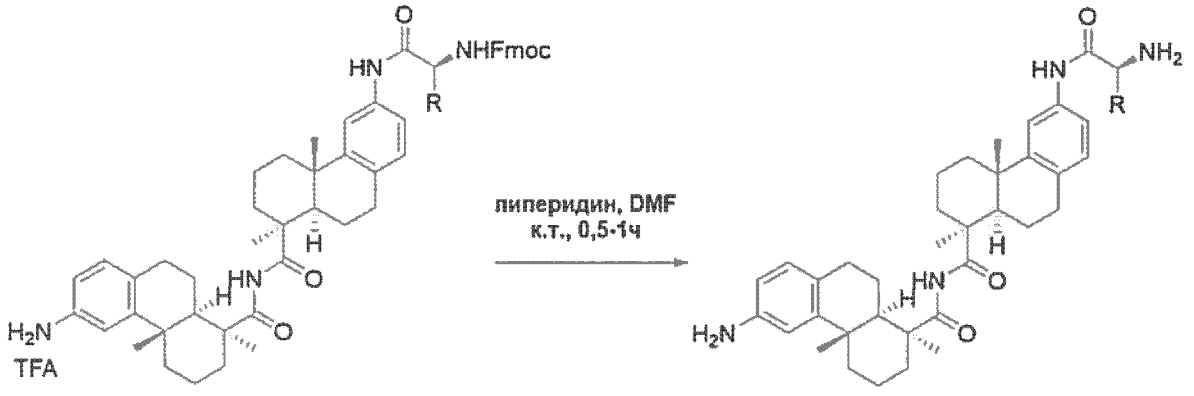
(*S*)-4-(((9*H*-Флуорен-9-ил) метокси) карбониламино)-5-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1, 4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен -3-иламино)-5-оксопентановая кислота, соль трифторуксусной кислоты (14e)



[00265] Следуя общей методике для промежуточных соединений **14a-e**, неочищенное соединение **14e** (84 мг, выход 86%, соль TFA) получали в виде бесцветного масла. ESI масса/заряд: 880 $(M + 1)^+$.

Пример 3c

Полезные нагрузки P4-9, 13, 14 и 17



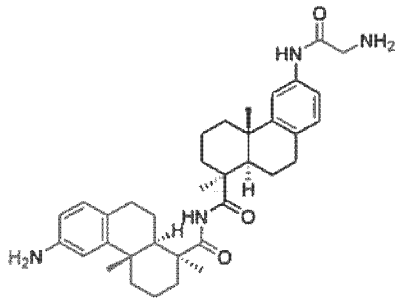
14a, R = H
14b, R = CH_2OH
14c, R = $(CH_2)_4NHFmoc$
14d, R = CH_2COOH
14e, R = CH_2CH_2COOH

P4, R = H
P5, R = CH_2OH
P6, R = $(CH_2)_4NH_2$
P7, R = CH_2COOH
P8, R = CH_2CH_2COOH

[00266] К раствору неочищенного **14**, полученного выше, в DMF добавляли пиперидин. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение получаса, что контролировали с помощью ЖХМС. Смесь очищали непосредственно с помощью препаративной ВЭЖХ (метод B) с получением полезных нагрузок **P4-8** в виде твердых веществ белого цвета.

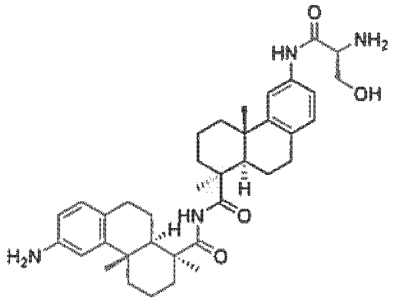
Сырой продукт **14**			пиперидин (мл)	DMF (мл)	Время (час)	очистка	Полезные нагрузки **P4-8**		
#	R	g (ммоль)					#	R	мг (выход)
14a	H	0,066 (0,073)	0,5	3	0,5	Prep-B	**P4**	H	12 (28%)
14b	CH_2OH	0,10 (0,11)	0,5	3	0,5	Prep-B	**P5**	CH_2OH	41 (67%)
14c	$(CH_2)_4NHFmoc$	0,050 (0,045)	0,5	5	1	Prep-B	**P6**	$(CH_2)_4NH_2$	5 (17%)
14d	CH_2COOH	0,10 (0.12)	0,5	3	0,5	Prep-B	**P7**	CH_2COOH	39 (51%)
14e	$(CH_2)_2COOH$	0,10 (0.12)	0,5	3	0,5	Prep-B	**P8**	$(CH_2)_2COOH$	44 (58%)

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-*N*-[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(2-аминоацетамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P4)



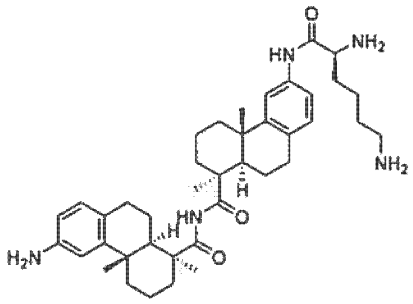
[00267] Следуя общей процедуре для полезных нагрузок **P4-8**, соединение **P4** (12 мг, выход 28%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 585 $(M + 1)^+$. ^1H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.79 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.41 (dd, J = 8.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 6.96 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.68 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.48 (d, J = 1.5 Гц, 1H), 6.34 (dd, J = 7.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 4. 70 (m, 2H), 3.20 (s, 3H), 2.95-2.83 (m, 1H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.70-2.60 (m, 1H), 2.30-2.20 (m, 2H), 2.20-2.10 (m, 4H), 2.05-1.70 (m, 4H), 1.70-1.50 (m, 4H), 1.31-1.25 (m, 8H), 1.20-1.10 (m, 2H), 1.05 (d, J = 7.5 Гц, 6H) ч/млн.

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-*N*-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-((*S*)-2-амино-3-гидроксипропанамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P5)



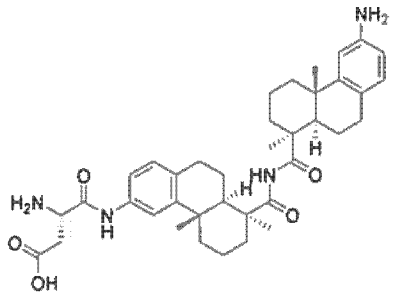
[00268] Следуя общей процедуре для полезных нагрузок **P4-8**, соединение **P5** (41 мг, выход 67%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 615 $(M + 1)^+$. ^1H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 8.09(s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.41 (dd, J = 8.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 6.96(d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.68(d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.48(d, J = 1.5 Гц, 1H), 6.34 (dd, J = 7.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 4.84-4.76 (m, 1H), 4.67 (s, 2H), 3.60-3.45 (m, 2H), 2.95-2.83 (m, 1H), 2.80-2.60 (m, 4H), 2.30-2.20 (m, 3H), 2.20-2.10 (m, 4H), 1.95-1.75 (m, 5H), 1.70-1.50 (m, 4H), 1.40-1.30 (m, 2H), 1.28 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.20-1.10 (m, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.98 (s, 3H) ч/млн.

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-*N*-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-((*S*)-2,6диаминогексанамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P6)



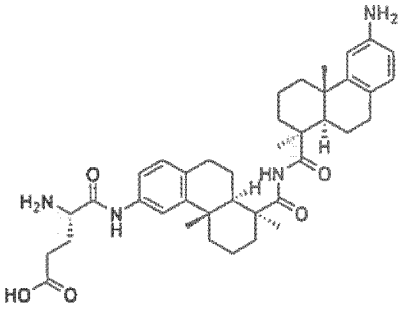
[00269] Следуя общей процедуре для полезных нагрузок **P4-8**, соединение **P6** (5 мг, выход 17%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 656 $(M + 1)^+$. ^1H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 8.09 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.41 (dd, J = 8.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 6.96 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.68 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.48 (d, J = 1.5 Гц, 1H), 6.34 (dd, J = 7.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 4. 70 (m, 2H), 3.20 (s, 2H), 2.95-2.83 (m, 2H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.70-2.60 (m, 2H), 2.37-2.35 (m, 1H), 2.30-2.20 (m, 3H), 2.20-2.10 (m, 5H), 2.05-1.95 (m, 2H), 1.95-1.75 (m, 5H), 1.70-1.50 (m, 6H), 1.31-1.25 (m, 8H), 1.20-1.10 (m, 3H), 1.05 (d, J = 7.5 Гц, 6H), 0.85 (t, J = 6.0 Гц, 1H) ч/млн.

(*S*)-3-амино-4-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-4-оксобутановая кислота (P7)



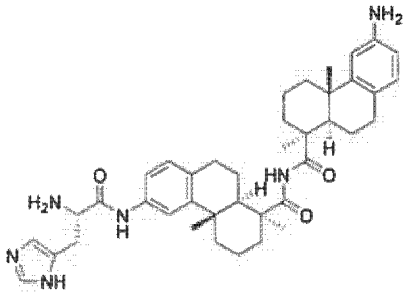
[00270] Следуя общей процедуре для полезных нагрузок **P4-8**, соединение **P7** (39 мг, выход 51%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 643 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 10.5-10.0 (br, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.41 (dd, J = 8.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 6.96 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.68 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.48 (d, J = 1.5 Гц, 1H), 6.34 (dd, J = 7.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 4.84-4.50 (m, 2H), 3.75-3.68 (m, 2H), 2.95-2.83 (m, 1H), 2.80-2.60 (m, 4H), 2.40-2.20 (m, 4H), 2.20-2.10 (m, 5H), 1.95-1.70 (m, 5H), 1.70-1.50 (m, 5H), 1.27 (d, J = 7.5 Гц, 6H), 1.20-1.10 (m, 2H), 1.01 (s, 3H), 0.98 (s, 3H) ч/млн.

(*S*)-4-амино-5-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-5-оксопентановая кислота (P8)



[00271] Следуя общей методике для полезных нагрузок **P4-8**, соединение **P8** (44 мг, выход 58%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 657 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 8.09 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.41 (dd, J = 8.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 6.96 (d, J = 8.5 Гц,1H), 6.68 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.48 (d, J = 1.5 Гц, 1H), 6.34 (dd, J = 7.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 4.70 (m, 2H), 2.95-2.83 (m, 1H), 2.80-2.60 (m, 5H), 2.30-2.20 (m, 4H), 2.20-2.10 (m, 5H), 1.95-1.75 (m, 5H), 1.70-1.50 (m, 5H), 1.50-1.40 (m, 4H), 1.27 (d, J =7.5 Гц, 6H), 1.20-1.10 (m, 2H), 1.01 (s, 3H), 0.98 (s, 3H) ч/млн.

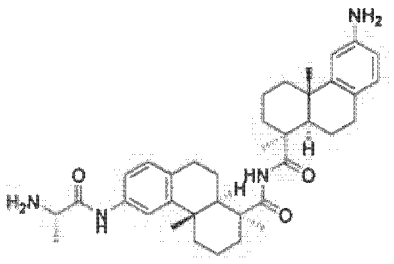
(1S, 4aS, 10aR)-6-амино-N-((1S, 4aS, 10aR)-6-((S)-2-амино-3-(1H-имидазол-4-ил) пропанамидо)-1, 4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P9)



[00272] К раствору Fmoc-His-OH (0,38 г, 1,0 ммоль) в DCM (5 мл) добавляли Fmoc-OSu (0,37 г, 1,1 ммоль) и DIPEA (0,26 г, 2,0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Летучие вещества удаляли *в вакууме* и остаток очищали флэш-хроматографией (5-10% метанола в DCM) с получением Fmoc-His (Fmoc)-OH (0,50 г, выход 84%, ESI масса/заряд: 600 $(M + 1)^+$) в виде белого твердого вещества.

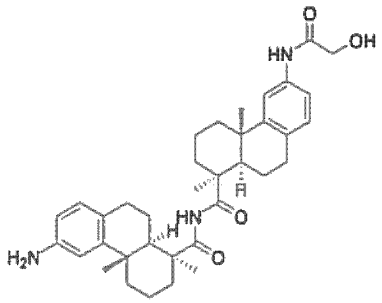
[00273] К раствору соединения **12b** (0,31 г, 0,50 ммоль) в DCM (20 мл) последовательно добавляли Fmoc-His (Fmoc)-OH (0,33 г, 0,55 ммоль), полученный выше, HATU (0,23 г, 0,60 ммоль) и DIPEA (0,19 г, 1,5 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, что контролировали с помощью ЖХМС. К реакционной смеси добавляли пиперидин (0,5 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Fmoc, что контролировалось с помощью ЖХМС. Смесь концентрировали *в вакууме* и остаток очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (50-80% ацетонитрил в воде) с получением **Boc-P9** (0,15 г) в виде белого твердого вещества, половину которого растворяли в DCM (20 мл). К раствору добавляли TFA (3 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до удаления Boc в соответствии с ЖХМС. Летучие вещества удаляли *в вакууме* и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (метод B) с получением соединения **P9** (17 мг, выход 12%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 665 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 11.82 (s, 1H), 9.75 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.52-7.50 (m, 2H), 7.41 (dd, J = 8.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 6.96 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.90-6.80 (m, 1H), 6.68 (d, J = 8.5 Гц,1H), 6.48 (d, J = 1.5 Гц, 1H), 6.34 (dd, J = 7.5 Гц, 1.5 Гц, 1H), 4.84-4.50 (m, 2H), 3.60-3.45 (m, 2H), 2.95-2.83 (m, 2H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.70-2.60 (m, 2H), 2.40-2.10 (m, 8H), 1.95-1.70 (m, 5H), 1.70-1.50 (m, 4H), 1.27 (d, J = 7.5 Гц, 6H), 1.20-1.10 (m, 2H), 1.01 (s, 3H), 0.98 (s, 3H) ч/млн.

(1S,4aS,10aR)-N-[(1S, 4aS, 10aR)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]-6-[(2S)-2-аминопропанамидо]-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P13)



[00274] Следуя процедуре, аналогичной **P9**, за исключением замены Fmoc-Ala-OH на Fmoc-His(Fmoc)-OH, получали полезную нагрузку **P13** (12 мг, выход 59%) в виде белого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.85 (br s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.54-7.51 (m, 1H), 7.41-7.39 (m, 1H), 6.95 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.68 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.48 (d, J = 1.6 Гц, 1H), 6.35-6.32 (m, 1H), 4.69 (s, 2H), 3.58-3.41 (m, 3H), 2.91-2.61 (m, 4H), 2.26-2.14 (m, 6H), 1.91-1.78 (m, 4H), 1.66-1.55 (m, 4H), 1.33-1.08 (m, 13H), 1.00 (s, 3H), 0.98 (s, 3H) ч/млн.

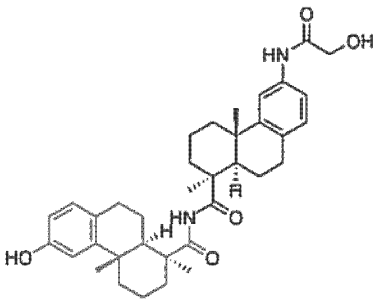
(1S, 4aS, 10aR)-N-[(1S, 4aS, 10aR)-6-(2-гидроксиацетамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P14)



[00275] К смеси гликолевой кислоты (2,2 мг, 29 мкмоль) и HATU (18,2 мг, 48 мкмоль) в DMF (2,0 мл) добавляли DIPEA (12 мкл, 72 мкмоль) и соединение **12b** (15 мг, 24 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водном* бикарбонате аммония (10 мМ)) с получением **Boc-P14**, который растворяли в DCM (2 мл). К раствору добавляли TFA (0,5 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Boc, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь концентрировали *в вакууме* и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (метод B) с получением полезной нагрузки **P14** (4,3 мг, выход 31%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 686.5 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.46 (s,

1H), 8.10 (s, 1H), 7.59 (d, J = 1.8 Гц, 1H), 7.49 (dd, J = 8.3, 1.9 Гц, 1H), 6.96 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 6.68 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 6.47 (d, J = 2.1 Гц, 1H), 6.33 (dd, J = 8.1, 2.1 Гц, 1H), 5.65 (t, J = 6.0 Гц, 1H), 4.70 (s, 2H), 3.94 (d, J = 6.0 Гц, 2H), 2.93-2.85 (m, 1H), 2.80-2.72 (m, 2H), 2.71-2.63 (m, 1H), 2.34-2.08 (m, 6H), 1.94-1.76 (m, 4H), 1.68-1.52 (m, 4H), 1.35-1.23 (m, 8H), 1.19-1.10 (m, 2H), 0.99 (d, J = 8.1 Гц, 6H) ч/млн.

(1S, 4aS, 10aR)-N-[(1S, 4aS, 10aR)-6-(2-гидроксиацетамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P14)

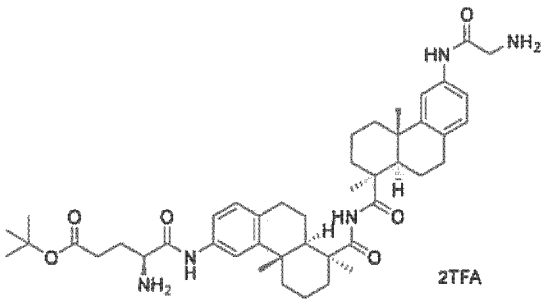


[00276] К раствору полезной нагрузки **P1** (10 мг, 0,019 ммоль) в DMF (2 мл) добавляли HATU (14 мг, 0,038 ммоль) и DIPEA (9,8 мг, 0,076 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут перед добавлением гликолевой кислоты (1,73 мг, 0,0228 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (метод B) с получением **P17** (5,7 мг, выход 51%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 587.4 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.46 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.53-7.45 (m, 1H), 6.96 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 6.82 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 6.63 (d, J = 2.3 Гц, 1H), 6.50 (dd, J = 8.2, 2.4 Гц, 1H), 5.64 (t, J = 6.0 Гц, 1H), 3.94 (d, J = 5.9 Гц, 2H), 2.93-2.66 (m, 4H), 2.29-2.10 (m, 6H), 2.00-1.80 (m, 4H), 1.72-1.50 (m, 4H), 1.30-0.90 (m, 16H) ч/млн.

ПРИМЕР 4

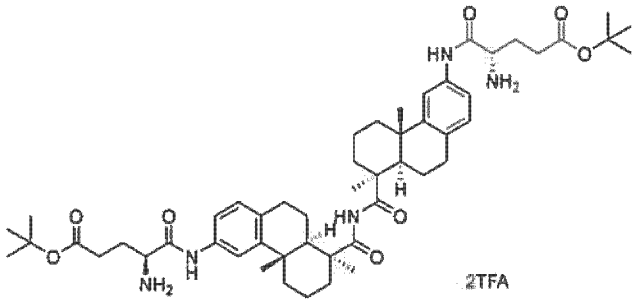
[00277] Этот пример демонстрирует общие методы синтеза производных подокарповой кислоты **P10** и **P11** в таблице 1 выше. Этот пример относится к соединениям, пронумерованным **14a**, **15a-b** и **P10** и P11 на ФИГ. 2Б.

(*S*)-*трет*-Бутил4-амино-5-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(2-аминоацетамидо)-1,4a-диметил-1,2, 3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-5-оксопентаноат, соль дитрифторуксусной кислоты (15a)



[00278] К раствору Fmoc-Glu (OtBu)-OH (74 мг, 0,17 ммоль) и DIPEA (55 мкл, 0,32 ммоль) в DMF (5,0 мл) добавляли HATU (91 мг, 0,24 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут перед добавлением соединения **14a** (0,14 г, 0,16 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, что контролировали с помощью ЖХМС. Затем к реакционной смеси по каплям добавляли пиперидин (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Fmoc в соответствии с ЖХМС. Полученную смесь непосредственно разделяли с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *води.* TFA (0,01%)) с получением соединения **15a** (0,13 г, выход 80%) в виде желтого твердого вещества. ESI масса/заряд: 770.5 $(M + 1)^+$.

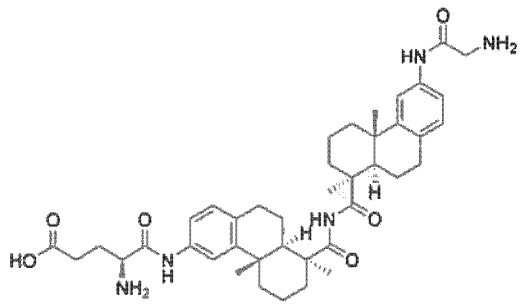
(4*S*,4'*S*)-*трет*-бутил 5,5'- (4b*S*,4b'*S*,8*S*,8a*R*,8'*S*,8a'*R*)-8,8'-(азандиилбис (оксометилен)) бис (4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, соль 9,10-октагидрофенантрен-8,3-диил) бис (азандиил) бис (4-амино-5-оксопентаноат) дитрифторуксусной кислоты (15b)



[00279] К раствору Fmoc-Glu (OtBu)-OH (0,15 г, 0,35 ммоль) и DIPEA (83 мкл, 0,48 ммоль) в DMF (5,0 мл) добавляли HATU (0,15 г, 0,40 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут перед добавлением соединения **P2** (0,10 г, 0,16 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, что контролировали с помощью ЖХМС. Затем к реакционной смеси по каплям добавляли пиперидин (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Fmoc в соответствии с ЖХМС. Полученную смесь непосредственно разделяли с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-

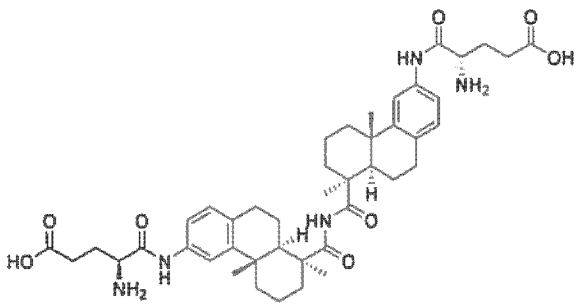
100% ацетонитрила в *води.* TFA (0,01%)) с получением соединения **15b** (0,14 г, выход 78%) в виде желтого твердого вещества. ESI масса/заряд: 899 $(M + 1)^+$.

(*S*)-4-амино-5-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(2-аминоацетамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-5-оксопентановая кислота (P10)



[00280] Смесь соединения **15a** (0,13 г, 0,13 ммоль) в чистом TFA (2,0 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение часа, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь разбавляли DCM (20 мл) и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водном* бикарбонате натрия (10 мМ)) с получением **P10** (20 мг, выход 22%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 358 $(M/2 + 1)^+$; 714.5 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.85 (br s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.51 (s, 2H), 7.42-7.36 (m, 2H), 6.96 (dd, J = 8.0 Гц и 3.0 Гц, 2H), 3.67 (br s, 8H), 3.36-3.33 (m, 1H), 3.22 (s, 2H), 2.91-2.87 (m, 2H), 2.80-2.71 (m, 2H), 2.31-2.28 (m, 4H), 2.17-2.14 (m, 4H), 1.91-1.82 (m, 5H), 1.69-1.58 (m, 5H), 1.34-1.23 (m, 6H), 1.19-1.12 (m, 2H), 1.01 (s, 6H) ч/млн.

(4*S*,4'*S*)-5,5'-(4b*S*,4b'*S*,8*S*,8a*R*,8'*S*,8a'*R*)-8,8'-(азандиилбис(оксометилен))бис(4b, 8-диметил-4b, 5, 6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-8,3-диил)бис(азандиил)бис(4-амино-5-оксопентановая кислота) (P11)



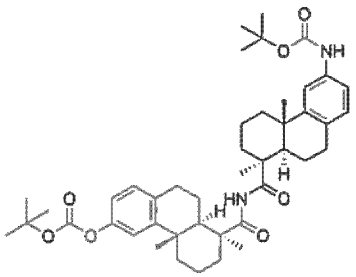
[00281] Смесь соединения **15b** (0,14 г, 0,14 ммоль) в чистом TFA (3,0 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение часа, что контролировали с помощью ЖХМС.

Полученную смесь разбавляли DCM (30 мл) и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водном* бикарбонате натрия (10 мМ)) с получением **P11** (20 мг, выход 18%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 394 $(M/2 + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.85 (br s, 2H), 8.12 (s, 1H), 7.51 (s, 2H), 7.9 (dd, J = 8.4 Гц и 1.6 Гц, 2H), 6.97 (d, J = 8.0 Гц, 2H), 3.5 (br s, 6H), 3.40-3.37 (m, 2H), 3.16 (s, 1H), 2.91-2.88 (m, 2H), 2.79-2.66 (m, 2H), 2.33-2.29 (m, 7H), 2.18-2.15 (m, 4H), 1.91-1.84 (m, 6H), 1.71-1.59 (m, 6H), 1.35-1.23 (m, 6H), 1.18-1.12 (m, 2H), 1.01 (s, 6H) ч/млн.

ПРИМЕР 4a

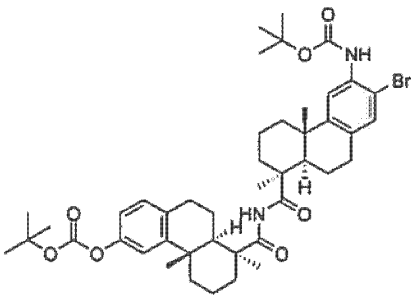
[00282] Этот пример демонстрирует общие методы синтеза производного **P19** подокарповой кислоты в таблице 1 выше. Этот пример относится к соединениям, изображенным на ФИГ. 2C.

(4bS,8S,8aR)-8-{[(1S,4aS,10aR)-6-{[(трет-бутокси)карбонил]амино}-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил] карбамоил}-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил-трет-бутилкарбонат (16)



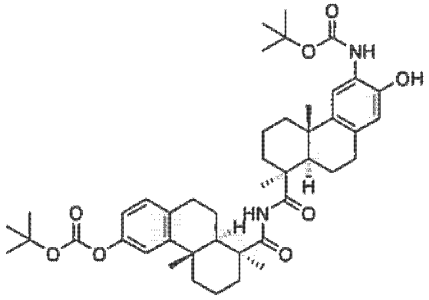
[00283] К смеси полезной нагрузки **P1** (0,10 г, 0,19 ммоль) в *трет*-бутаноле (2 мл) добавляли карбонат калия (78 мг, 0,57 ммоль) и Boc-ангидрид (0,12 г, 0,57 ммоль) при КТ, и реакционную смесь перемешивали при 60 °C в течение 3 часов, что контролировали с помощью ЖХМС. Затем полученную смесь охлаждали и концентрировали *в вакууме*. Остаток растворяли в DCM (100 мл), и раствор промывали водой и рассолом, сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме* с получением сырого продукта **16** (0,14 г, неочищенный) в виде белого твердого вещества, которое использовали для следующий шаг без дополнительной очистки. ESI масса/заряд: 729.4 $(M + 1)^+$.

(4bS,8S,8aR)-8-{[(1S,4aS,10aR)-7-бромо-6-{[(трет-бутокси)карбонил]амино}-8-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил] карбамоил}-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил-трет-бутилкарбонат (17)



[00284] К раствору неочищенного соединения **16** (0,14 г, полученного выше) в DMF (4 мл) добавляли NBS (50 мг, 0,28 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *води.* TFA (0,01%)) с получением соединения **17** (40 мг, выход 26% в 2 стадии) в виде желтого твердого вещества. ESI масса/заряд: 807,3 $(M + 1)^+$.

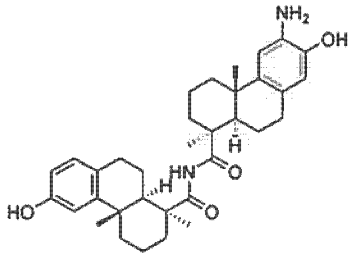
(4bS,8S,8aR)-8-{[(1S,4aS,10aR)-6-{[(трет-бутокси)карбонил]амино}-7-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил] карбамоил}-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил-трет-бутилкарбонат (19)



[00285] Смесь соединения **17** (**40** мг, 50 мкмоль), ацетата калия (12 мг, 0,12 ммоль) и бис(пинаколато)диборона **18** (50 мг, 0,20 ммоль) в сухом диоксане (5 мл) дегазировали и продували азотом 3 раза. К смеси добавляли $Pd(dppf)Cl_2$ (1,8 мг, 2,5 мкмоль) в атмосфере азота. Полученную суспензию перемешивали при 90 °C в атмосфере азота в течение получаса, что контролировали с помощью ЖХМС. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через целит. К фильтрату добавляли по каплям перекись водорода (30% *водн.*, 2,0 мл) в течение 10 минут при 0 °C. Реакционную смесь перемешивали при 0 °C еще полчаса, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь затем непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%)) с получением сырого соединения **19** (35 мг, чистота 50%, выход сырого продукта 95%) в виде твердого

вещества желтого цвета, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ESI масса/заряд: 745,5 $(M + 1)^+$.

(1S,4aS,10aR)-N-[(1S, 4aS, 10aR)-6-амино-7-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P19)



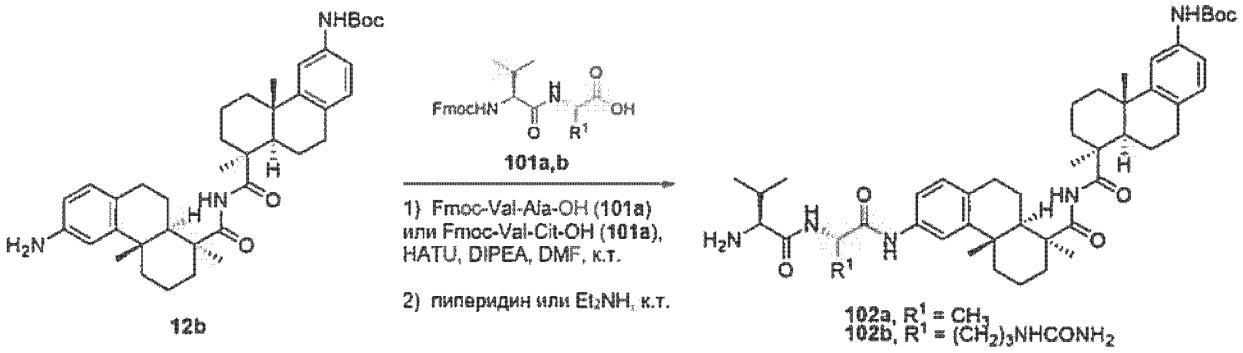
[00286] К раствору неочищенного соединения **19** (35 мг, полученного выше) в DCM (5 мл) по каплям добавляли TFA (2 мл) при 0 °C в течение 5 минут. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение получаса до полного удаления Boc, что контролировали с помощью ЖХМС. Летучие вещества удаляли *в вакууме* и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (метод A) с получением полезной нагрузки **P19** (6,5 мг, выход 24% из соединения **17**) в виде не совсем белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 545.3 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.03 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 6.81 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.62 (d, J = 2.4 Гц, 1H), 6.49 (dd, J = 8.4, 2.8 Гц, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.27 (s, 1H), 4.21 (s, 2H), 2.84-2.80 (m, 1H), 2.73-2.57 (m, 3H), 2.25-2.19 (m, 2H), 2.15-2.08 (m, 4H), 1.89-1.77 (m, 4H), 1.62-1.54 (m, 4H), 1.30 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.31-1.20 (m, 2H), 1.14-1.10 (m, 2H), 0.98 (s, 3H), 0.94 (s, 3H) ч/млн.

ПРИМЕР 5

[00287] Этот пример демонстрирует методы синтеза соединений линкер-полезная нагрузка **LP1-LP5** и **LP20** в Таблице 2 выше. Этот пример относится к соединениям с номерами **12b** и от **102a-b** до **106a-c** и соединениям линкер-полезная нагрузка **LP1-LP5** на ФИГ. 3.

Пример 5a

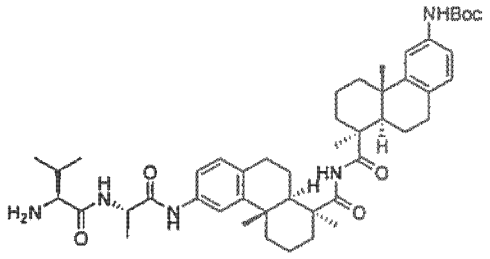
Промежуточные продукты 102a-b



[00288] К раствору кислоты (Fmoc-Val-Ala-OH (**101a**, 1,2 экв.) или Fmoc-Val-Cit-OH (**101b**, 1,2 экв.) в DMF добавляли HATU (1,2 экв.) и DIPEA (2,0- 3,0 экв.) при комнатной температуре. После перемешивания смеси при комнатной температуре в течение 5 минут добавляли соединение **12b** (1,0 эквив.). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4-20 ч до израсходования амина согласно ЖХМС. Затем к смеси добавляли пиперидин (избыток) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1-6 ч до полного удаления Fmoc, что контролировалось с помощью ЖХМС. Реакционную смесь фильтровали через мембрану, и фильтрат очищали непосредственно с помощью препаративной ВЭЖХ (метод B) или флэш-хроматографии с обращенной фазой с получением соединения **102** (выход 38-72%) в виде белого твердого вещества.

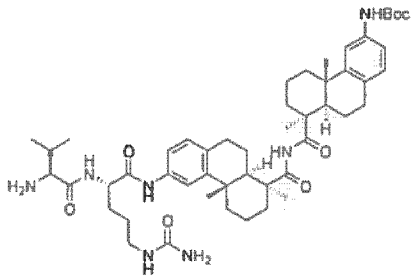
Амин г (ммоль)		**Кислота г (ммоль)**		**Шаг 1**				**Шаг 2**		**Очистка**	**Продукт**	
				HATU г (ммоль)	**DIPEA г (ммоль)**	**DMF (мл)**	**Время (час.)**	**Пиперидин (мл)**	**Время (ч)**		**#**	**g (выход)**
12b	0,31 (0,50)	**101a**	0,25 (0,60)	0,23 (0,60)	0,19 (1,5)	20	4	0,5	1	RP	102a	0,29 (72%)
12b	0,50 (0,80)	**101b**	0,48 (0,96)	0,36 (0,96)	0.28 мл (1,6)	6	20	0,5	6	Prep-B	102b	0,27 (38%)

***трет*-бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]пропанамидо]]-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил] карбонил} карбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамат (102a)**



[00289] Следуя общей методике для промежуточных соединений 102a, b, соединение **102a** (0,29 г, выход 72%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 799 $(M + 1)^+$.

***трет*-бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамонламино)пентанамидо]]-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил] карбонил}карбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (102a)**

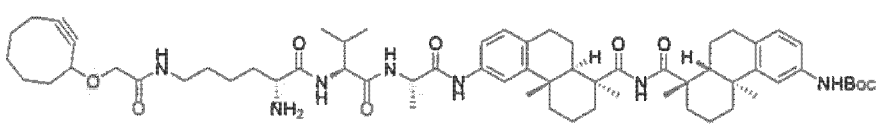


[00290] Следуя общей методике для промежуточных соединений 102a, b, соединение **102b** (0,27 г, выход 38%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 885 $(M + 1)^+$.

Пример 5b

Промежуточные продукты 104a-b

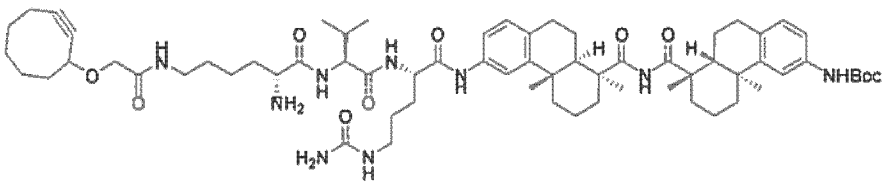
***трет*-бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-{2-амино-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]гексанамидо}-3-метилбутанамидо]пропанамидо]-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]карбонил} карбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамат (104a)**



[00291] К раствору соединения **103** (70 мг, 0,13 ммоль) в DMF (2 мл) добавляли HATU (68 мг, 0,18 ммоль) и DIPEA (44 мкл, 0,24 ммоль) при комнатной температуре. Смесь

перемешивали при комнатной температуре в течение 5 минут перед добавлением соединения **102a** (95 мг, 0,12 ммоль). Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч до полного израсходования соединения **102a**, что контролировалось с помощью ЖХМС. Затем к реакционной смеси добавляли пиперидин (0,5 мл, избыток). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем смесь фильтровали и фильтрат концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водном* бикарбонате аммония (10 мМ)) с получением соединения **104a** (0,13 г, выход 96%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 518.0 $((M-55)/2)^+$.

***трет*-бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-{2-амино-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]гексанамидо}-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]карбонил} карбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамат (104b)**



[00292] К раствору соединения **103** (0,27 г, 0,31 ммоль) и DIPEA (0,11 мл, 0,61 ммоль) в DMF (6 мл) добавляли соединение **102b** (0,18 г, 0,34 ммоль) с последующим добавлением HATU (0,14 г, 0,37 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученный раствор непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой с получением соединения **Fmoc-104b** (0,30 г, ESI масса/заряд: 711 $((M + Na)/2 +1)^+$) в виде бледно-желтого твердого вещества, которое растворяли в DCM (6,0 мл). К раствору добавляли пиперидин (0,5 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч до полного удаления Fmoc в соответствии с ЖХМС. Летучие вещества удаляли *в вакууме* и остаток растирали с петролейным эфиром, получая соединение **104b** (0,26 г, выход 65%) в виде светло-желтого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1177.6 $((M + H)^+$.

Пример 5c

Промежуточные продукты 105a-c

[00293] Промежуточный продукт азидо α-CD-N_3 (**105a**) синтезировали согласно *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134 (46), 19108-19117 (ФИГ. 10).

Азидо-15-оксо-3,6,9,12-тетраокса-16-азаоктадекан-18-сульфоновая кислота (105b) (ФИГ. 11)

[00294] К раствору 2,5-диоксопирролидин-1-ил 1-азидо-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-оата (N_3-PEG_4-OSu, 0,10 г, 0,26 ммоль) и таурина **105b-A** (39 мг, 0,31 ммоль) в безводном DMF (4 мл) добавляли DIPEA (15 мг, 0,52 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали и раствор очищали препаративной ВЭЖХ (метод A) с получением промежуточного соединения **105b** (0,80 г, выход 78%) в виде бесцветного масла. ESI масса/заряд: 399.1 $(M + H)^+$. ^1H ЯМР (500 МГц, D_2O) δ 3.69 (t, J = 6.0 Гц, 2H), 3.64-3.59 (m, 14H), 3.49 (t, J = 6.5 Гц, 2H), 3.41 (t, J = 4.5 Гц, 2H), 3.00 (t, J = 7.0 Гц, 2H), 2.45 (t, J = 6.0 Гц, 2H) ч/млн.

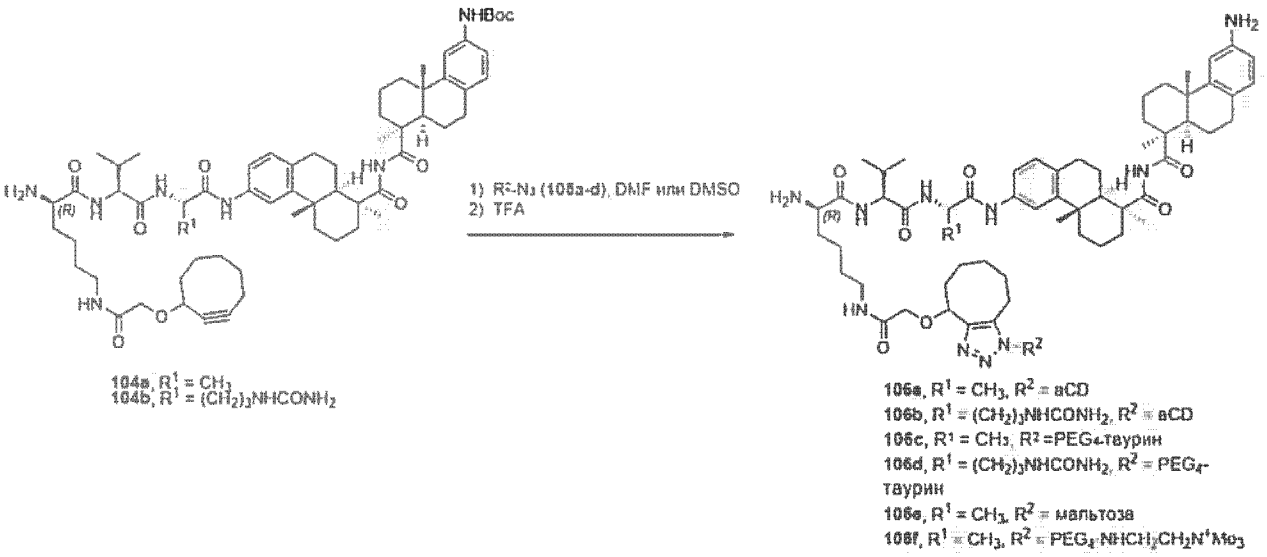
[2-(1-Азидо-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо)этил]триметилазанхлорид (105d)

[00295] Следуя аналогичной процедуре для **105b**, описанной выше, за исключением замены **105d-A** на **105b-A**, получали хлорид триметиламмония **105d** (0,13 г, выход 64%) в виде бесцветного масла. ESI масса/заряд: 376 $(M + H)^+$. ^1H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 3.65-3.58 (m, 4H), 3.58-3.45 (m, 16H), 3.45-3.30 (m, 12H), 2.35 (t, J = 6.5 Гц, 2H) ч/млн.

[00296] Промежуточный продукт азидо мальтоза-N_3 (**105c**) синтезировали согласно *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42 (7), 1325-1328 (ФИГ. 12).

Пример 5d

Промежуточные продукты 106a-f



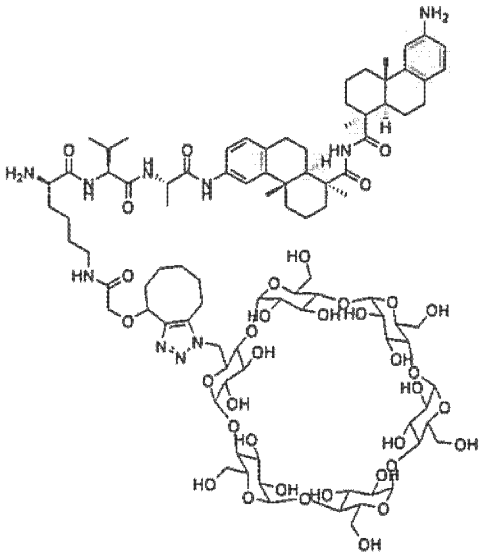
[00297] К раствору соединения **104** в DMF при комнатной температуре добавляли промежуточное азидо-соединение **105**. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3-48 ч до тех пор, пока ЖХМС не показала завершение реакции.

Реакционную смесь непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ с получением соединения **Boc-106** в виде белого твердого вещества, которое растворяли в растворе TFA (или чистом TFA). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 0,5-20 ч до удаления Boc согласно ЖХМС. Раствор концентрировали с получением **106** (в виде соли TFA).

Алкин г (ммоль)		Азид г (ммоль)		Шаг 1				Шаг 2			Продукт	
				DMF (мл)	T (°C)	Время (час.)	Очистка	TFA (мл)	растворитель (мл)	Время (ч)	#	g (выход)
104a	0,050 (0,045)	**105a**	0,11 (0.12)	4	RT	48	RP-A	1	DCM (3 мл)	1	**106a**	0,019* (69%)
104b	0,050 0,042	**105a**	0,085 (0,085)	4	RT	20	RP	2	/	0,5	**106b**	0,076 (87%)
104a	0,17 (0.16)	**105b**	0,12 (0,31)	6	RT	20	RP-A	2	/	1	**106c**	0,090 (39%)
104b	0,050 0,042	**105b**	0,034 (0,084)	2	RT	3	RP	1	MeOH (2 мл)	20	**106d**	0,022 (36%)
104a	0,035 (0,032)	**105c**	0,024 (0,064)	ДМСО 5 мл	RT	4	RP	3	/	2	**106e**	0,034 (77%)
104a	0,035 (0,032)	**105d**	0,026 (0,064)	4	RT	20	RP	1	DCM (9 мл)	2	**106f**	0,020 (42%)

*не все **Boc-106a** использовались для de-Boc.

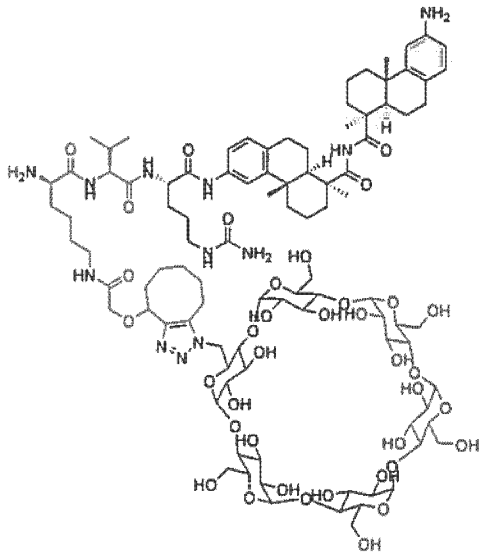
(1*S*,4a*S*,10a*R*)-*N*-[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-2,3,4,9,10,10a-гексагидрофенантрен-1-карбонил]-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-амино-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис (гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло [26.2.2.2^{3},^{6}.2^{8},^{11}.2^{13},^{16}.2^{18},^{21}.2^{23},^{26}]дотетраконтан-5-ил] метил}-4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклооктa[d][1,2,3]триазол-4 -ил) окси] ацетамидо} гексанамидо] -3-метилбутанамидо] пропанамидо] -1,4a-диметил-2,3,4,9,10,10a-гексагидрофенантрен-1-карбоксамидная соль трифторуксусной кислоты (106a)



[00298] Следуя общей методике для промежуточных соединений 106a-e, соединение **Boc-106a** (72 мг, выход 76%, в виде смеси региоизомеров триазола) получали в виде белого твердого вещества (ESI масса/заряд: 1045 $(M/2 + 1)^+$). Небольшое количество чистого основного изомера (7 мг) может быть получено после дополнительной очистки с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-60% ацетонитрила в *водн.* TFA (0.01%)), который был определен с помощью ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) ((с региоизомерами) δ 9.92 (s, 0.5H), 9.82 (s, 0.5H), 9.10 (s, 1H), 8.58-8.53 (m, 1H), 8.50-8.35 (m, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.04 (s, 3H), 7.88-7.82 (m, 1H), 7.55 (s, 0.5H), 7.46 (s, 0.5H), 7.41 (s, 1H), 7.40-7.26 (m, 1H), 7.14 (d, J = 7.0 Гц, 1H), 6.97 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.90 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 5.51 (br, 12H), 4.83-4.70 (m, 8H), 4.57-4.51 (m, 3H), 4.44-4.36 (m, 4H), 4.00-3.98 (m, 1H), 3.88-3.55 (m, 27H), 3.26-3.09 (m, 6H), 2.91-2.85 (m, 4H), 2.76-2.63 (m, 3H), 2.29-2.25 (m, 2H), 2.17-1.99 (m, 4H), 1.96-1.93 (m, 6H), 1.88-1.63 (m, 9H), 1.56-1.54 (m, 15H), 1.33-1.28 (m, 15H), 1.18-1.13 (m, 3H), 1.01-0.99 (m, 6H), 0.89-0.83 (m, 7H) ч/млн.). К смеси **Boc-106a** (в виде смеси региоизомеров) (20 мг, 9,6 мкмоль) в DCM (3 мл) добавляли TFA (1 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до удаления Boc, что контролировалось с помощью ЖХМС. Летучие компоненты удаляли *в вакууме*, получая соединение **106a** (19 мг, выход 69% от **104a**) в виде бледно-желтого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ESI масса/заряд: 995 $(M/2 + 1)^+$.

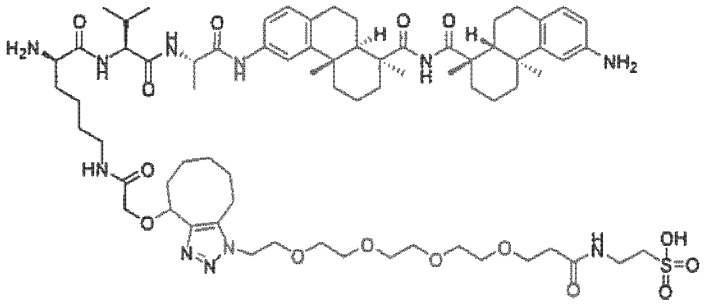
(1*S*,4a*S*,10a*R*)-*N*-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-амино-6- {2- [(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис (гидроксиметил)-2,4, 7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло [26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}] дотетраконтан-5-ил] метил}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d] [1,2,3] триазол-4-ил) окси] ацетамидо} гексанамидо] -3-

метилбутанамидо] -5- (карбамонламино) пентанамидо] -1,4a -диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил] карбонил} -6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамида соль трифторуксусной кислоты (106b)



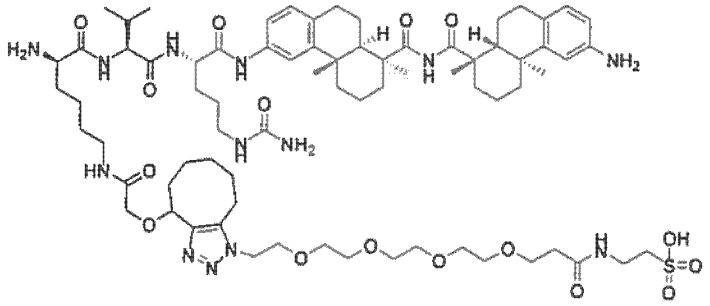
[00299] Следуя общей методике для промежуточных соединений 106a-e, соединение **106b** (76 мг, выход 87% от **104b**) получали в виде желтого твердого вещества. ESI масса/заряд: 692 $(M/3 + 1)^+$.

1-(4-(2-(((*R*)-5-амино-6-(((*S*)-1-(((*S*)-1-(((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-(((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил) карбамоил)-4b, 8-диметил-4b,5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил) амино)-1-оксопропан-2-ил) амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил) амино)- 6-оксогексил) амино)-2-оксоэтокси)-4,5,6,7,8,9-гексагидро-1*H*-циклоокта[d] [1,2,3] триазол-1-ил)-15-оксо- 3,6,9,12-тетраокса-16-азаоктадекан-18-сульфоновая кислота (106c)



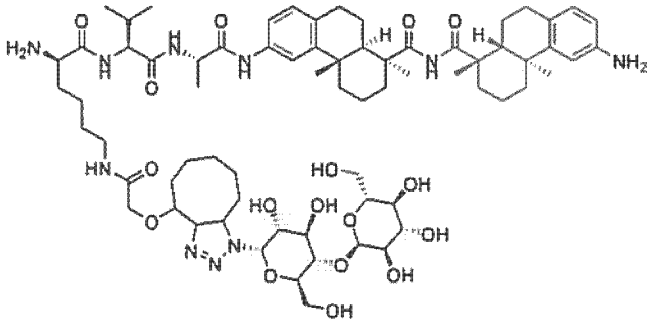
[00300] Следуя общей методике для промежуточных соединений 106a-e, соединение **106c** (90 мг, выход 39% от **104c**) получали в виде желтого твердого вещества. ESI масса/заряд: 463.8 $(M/3 + 1)^+$.

1-(4-(((6*S*,9*S*,12*R*)-1,12-диамино-6-(((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-(((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1), 4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил) карбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9, 10-октагидрофенантрен-3-ил) карбамоил)-9-изопропил-1,8,11,18-тетраоксо-2,7,10,17-тетраазанонадекан-19-ил) окси)-4,5,6,7, 8,9-гексагидро-1*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-1-ил)-15-оксо-3,6,9,12-тетраокса-16-азаоктадекан-18-сульфоновая кислота (106d)



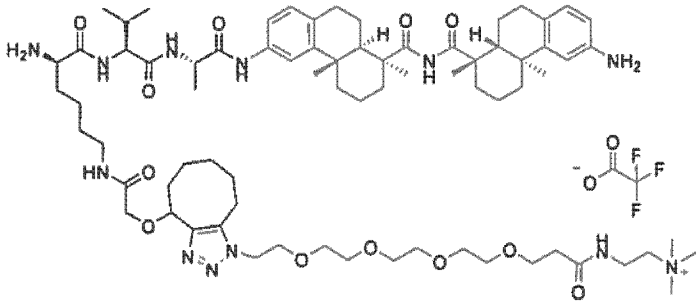
[00301] Следуя общей методике для промежуточных соединений 106a-e, соединение **106d** в виде его соли TFA (22 мг, выход 36%) получали в виде белого твердого вещества после очистки с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-80% ацетонитрила в воде в течение 25 минут). ESI масса/заряд: 788 $(M/2 + H)^+$.

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-Амино-*N*-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-((2*S*)-2-((2*S*)-2-((2*R*)-2-амино-6-(2-((1-((2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3, 4,5-тригидрокси-6- (гидроксиметил)*тетрагидро-2H-пиран-2-ил*) окси)тетрагидро-2*H*-пиран-2-ил)-3a, 4,5,6,7,8,9,9a- октагидро-1*H*-циклоокта[d] [1,2,3] триазол-4-ил) окси) ацетамидо) гексанамидо)-3-метилбутанамидо) пропанамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (106e)



[00302] Следуя общей методике для промежуточных соединений 106a-e, соединение **106e** в виде его соли TFA (34 мг, выход 77%) получали в виде бесцветного масла. ESI масса/заряд: 1358 $(M + H)^+$.

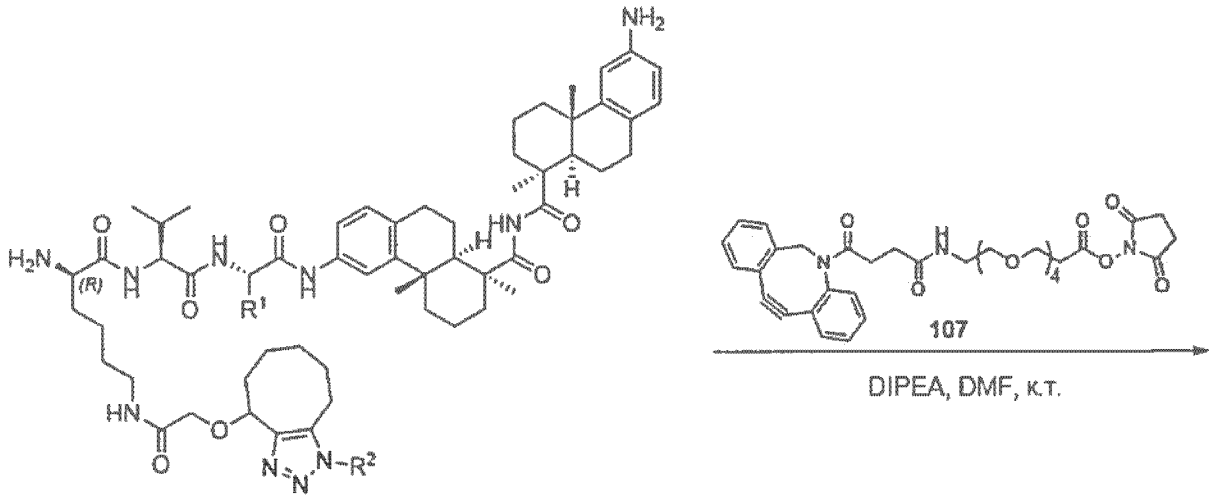
(2-карбонил{1-[4-({[(5R)-5-амино-5-{[(1S)-1-{[(1S)-1-{[(4bS,8S,8aR)-8-({[(1S,4aS,10aR)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо})-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} этил] карбамоил} -2-метилпропил] карбамоил} пентил] карбамоил } метокси)-1H, 4H, 5H, 6H, 7H, 8H, 9H-циклоокта[d][1,2,3] триазол-1-ил] -3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо} этил) триметилазан трифторацетат (106f)



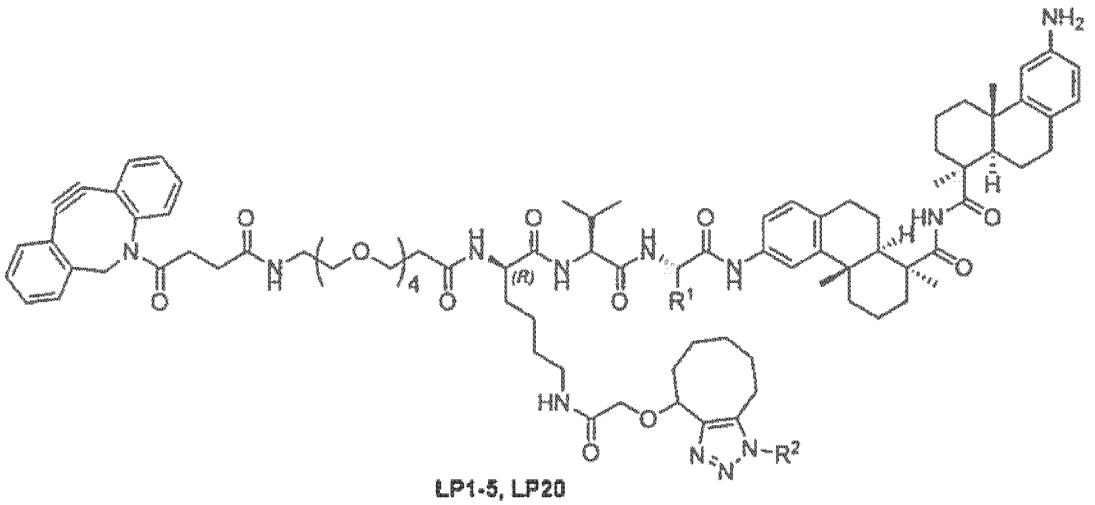
[00303] Следуя общей процедуре, соединение **106f** (20 мг, 42% выход из **104a**) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 455,8 $(M/3 + 1)^+$.

Пример 5e

Соединения линкер-полезная нагрузка LP1-LP5 и LP20



106a, $R^1 = CH_3$, R^2 = aCD
106b, $R^1 = (CH_2)_3NHCONH_2$, R^2 = aCD
106c, $R^1 = CH_3$, $R^2 = PEG_4$-таурин
106d, $R^1 = (CH_2)_3NHCONH_2$, $R^2 = PEG_4$-таурин
106e, $R^1 = CH_3$, R^2 = мальтоза
106f, $R^1 = CH_3$, $R^2 = PEG_4\text{-}NHCH_2CH_2N^+Me_3$



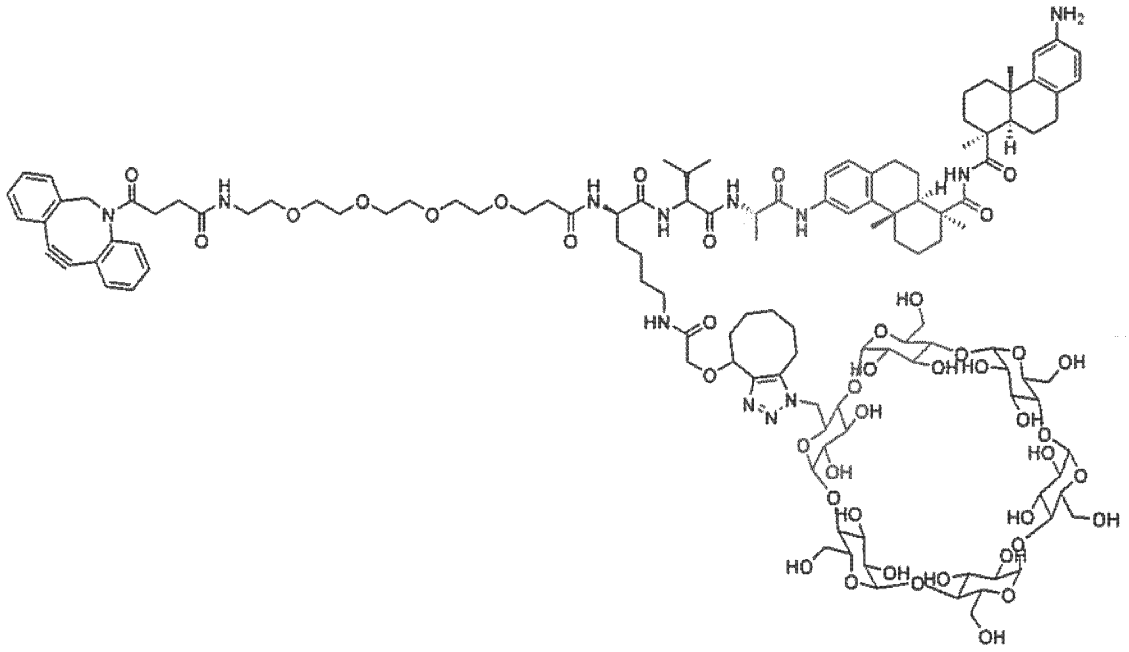
LP1-5, LP20

[00304] К раствору соединения **106** в DMF добавляли соединение DIBAC-PEG$_4$-NHS **107** и DIPEA при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Реакционную смесь непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (метод B) или флэш-хроматографией с обращенной фазой (метод B) с получением соединения **LP1-5** и **LP20**.

Амин **106**		NHS эфир **107** мг (мкмоль)	DIPEA (ммоль)	DMF (мл)	Время (час.)	Очистка	Продукт **LP**	
#	мг (мкмоль)						#	мг (выход)
106a	19 (8,7)	7,0 (11)	4,0 мг (0,031)	1,5	1,5	RP-B (дважды)	**LP1**	8 (36%)*
106b	76 (37)	24 (37)	12 мкл (0,073)	5	1,5	Prep-B (дважды)	**LP2**	20 (21%)
106c	90 (65)	39 (60)	0,02 мл (0,12)	5	1,5	Prep-B	**LP3**	60 (52%)
106d	22 (15)	9,7 (15)	5 мкл (0,030)	2	1,5	Prep-B	**LP4**	6 (20%)
106e	40 (29)	23 (35)	7,6 мг (59)	5	4	Prep-B	**LP5**	15 (27%)
106f	22 (15)	9,7 (15)	5 мкл (0,030)	2	1,5	RP	**LP20**	7 (24%)

* 7 мг соединения **106a** в виде свободного основания рециркулировали.

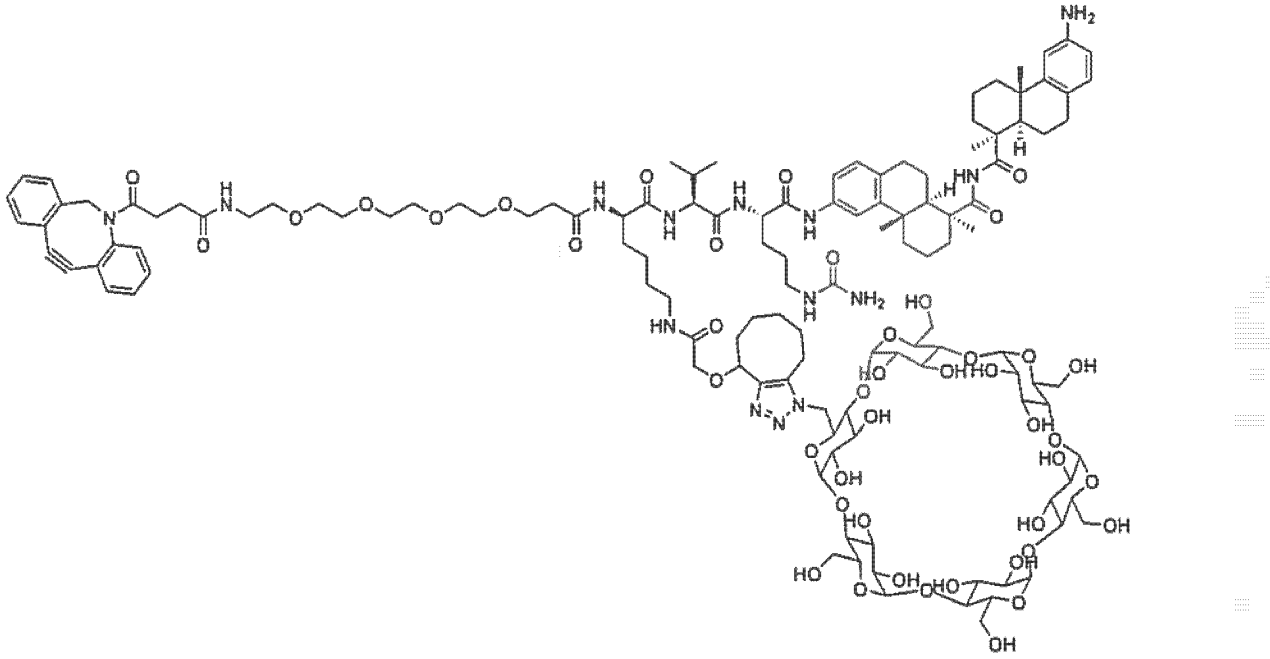
1- (4- {2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4-оксобутанамидо))-*N*-[(1*R*)-1-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-2,3,4,9,10,10a-гексагидрофенантрен-1-карбонил] карбамоил} -4b, 8-диметил-5,6,7,8a,9,10-гексагидрофенантрен- 3-ил] карбамоил} этил] карбамоил} -2-метилпропил] карбамоил} -5- {2 - [(1 - {[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41, 42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис (гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло [26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d] [1,2,3] триазол-4-ил) окси] ацетамидо} пентил] -3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (LP1)



[00305] Следуя общей процедуре для соединений линкер-полезная нагрузка LP1-5, линкер-полезную нагрузку **LP1** (8 мг, выход 36%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 842 (M/3 + 1)$^+$; 1262 (M/2 + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 9.69 (s, 0.5H), 9.28 (s, 0.5H), 8.20-8.00 (m, 5H), 7.81-7.75 (m, 2H), 7.66 (d, J = 7.6 Гц, 1H), 7.60 (d, J = 7.6 Гц, 1H), 7.53-7.27 (m, 9H), 6.96-6.92 (m, 1H), 6.67 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.32 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 5.57-5.47 (m, 14H), 5.13-4.99 (m, 2H), 4.81-4.68 (m, 11H), 4.59-4.52 (m, 5H), 4.36-4.29 (m, 3H), 4.16-4.08 (m, 1H), 3.99-3.98 (m, 1H), 3.84-3.53 (m, 30H), 3.45-3.38 (m, 12H), 3.13-3.03 (m, 4H), 2.90-2.66 (m, 5H), 2.36-2.32 (m, 1H), 2.26-2.20 (m, 3H), 2.15-2.12 (m, 4H), 2.00-1.99 (m, 2H), 1.88-1.72 (m, 6H), 1.64-1.40 (m, 14H), 1.33-1.24 (m, 17H), 1.14-1.09 (m, 3H), 1.00-0.97 (m, 7H), 0.89-0.81 (m, 8H) ч/млн.

[00306] *Анал. ВЭЖХ*: 95%, время удерживания: 7,93 мин (метод B).

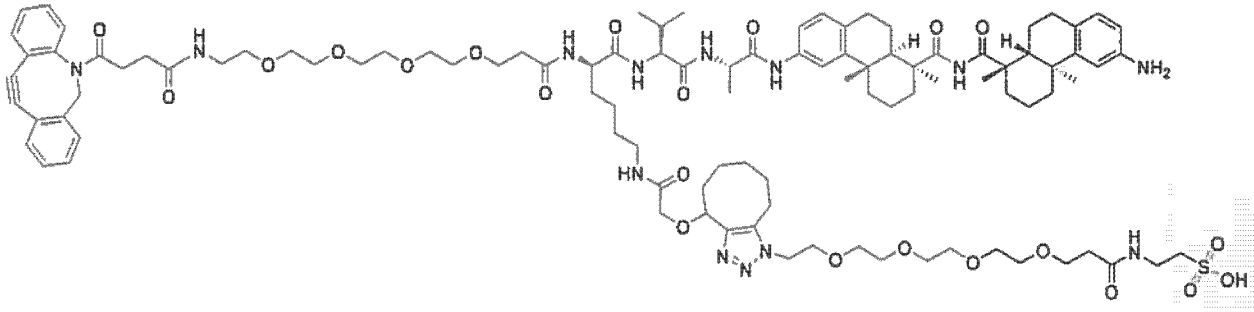
1- (4- {2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4-оксобутанамидо))-*N*-[(1*R*)-1-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил] формамидо} карбонил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} -4-(карбамоиламино) бутил] карбамоил} -2-метилпропил] карбамоил} -5- {2 - [(1 - {[31,32, 33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис (гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d] [1,2,3] триазол-4-ил) окси] ацетамидо} пентил] -3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (LP2)



[00307] Следуя общей процедуре для соединений линкер-полезная нагрузка LP1-5, линкер-полезную нагрузку **LP2** (20 мг, выход 21%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 870 (M/3 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 9.76 (s, 1H), 9.31 (s, 1H), 8.26-8.16 (m, 1H), 8.11-8.07 (m, 1H), 8.03-7.98 (m, 1H), 7.78-7.75 (m, 1H), 7.68-7.66 (m, 1H), 7.62-7.60 (d, J = 7.2 Гц, 1H), 7.55-7.52 (m, 1H), 7.48-7.44 (m, 4H), 7.39-7.30 (m, 4H), 6.96-6.93 (m, 1H), 6.68-6.77 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.47 (m, 1H), 6.34-6.32 (dd, J = 8.0 Гц, 1.6 Гц, 1H), 5.96 (br s, 1H), 5.59-5.56 (m, 5H), 5.52-5.45 (m, 7H), 5.38 (s, 2H), 5.13 (br s, 1H), 5.04-5.00 (d, J = 14.0 Гц, 1H), 4.81-4.69 (m, 10H), 4.60-4.51 (m, 5H), 4.36-4.11 (m, 5H), 3.98 (br s, 2H), 3.85-3.77 (m, 11H), 3.70-3.58 (m, 10H), 3.45-3.40 (m, 20H), 3.30-3.27 (m, 4H), 3.12-3.04 (m, 5H), 2.98-2.86 (m, 4H), 2.77-2.67 (m, 4H), 2.27-2.19 (m, 4H), 2.16-2.10 (m, 4H), 2.02-1.96 (m, 2H), 1.89-1.73 (m, 8H), 1.64-1.57 (m, 11H), 1.50-1.43 (m, 7H), 1.26-1.20 (m, 12H), 1.15-

1.10 (m, 4H), 1.01-0.97 (m, 6H), 0.89-0.82 (m, 6H) ч/млн. *Анал. ВЭЖХ*: 100%, время удерживания: 7,35 мин (метод B). Растворимость: <0,1 мг/мл воды.

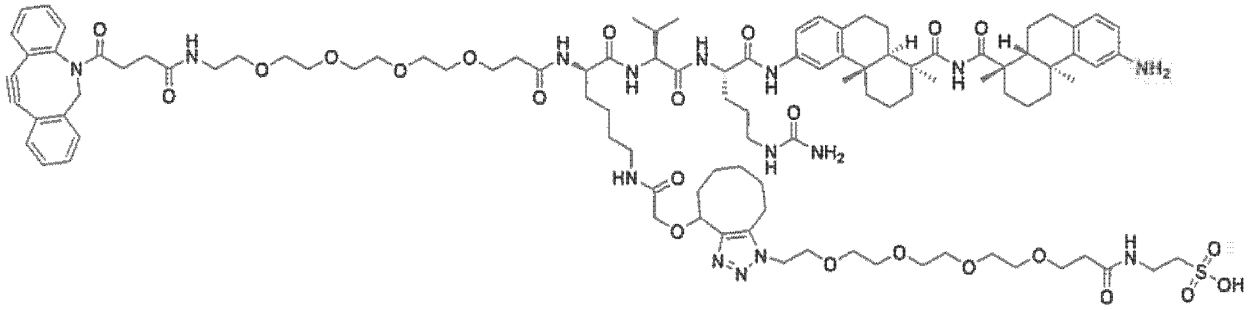
2- {1- [4 - ({[(5*R*)-5- [1- (4- {2-Азатрицикло [10.4.0.0^{4,9}] гексадека-1 (12), 4 (9),5,7, 13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо] -5-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10, 10a-октагидрофенантрен-1-ил] карбонил} карбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} этил] карбамоил} -2- метилпропил] карбамоил} пентил] карбамоил} метокси)-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d][1,2,3]триазол-1-ил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо} этан-1-сульфоновая кислота (LP3)



[00308] Следуя общей процедуре для соединений линкер-полезная нагрузка LP1-5, линкер-полезную нагрузку **LP3** (60 мг, выход 52%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 642 (M/3 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 9.68 (s, 0.6H), 9.25 (s, 0.4H), 8.22-8.07 (m, 3H), 8.02-7.86 (m, 2H), 7.77-7.72 (m, 2H), 7.68-7.60 (m, 2H), 7.54-7.52 (m, 1H), 7.50-7.42 (m, 4H), 7.39-7.27 (m, 4H), 7.22 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.97-6.94 (m, 2H), 6.74 (d, J = 10.5 Гц, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.43 (dd, J = 10.0 Гц, 2.0 Гц, 1H), 5.62 (br s, 1H), 5.04-5.00 (m, 1H), 4.93-4.90 (m, 0.4H), 4.76-4.72 (m, 0.6H), 4.52-4.26 (m, 4H), 4.16-4.08 (m, 1H), 3.81-3.75 (m, 4H), 3.61-3.55 (m, 4H), 3.46-3.44 (m, 24H), 3.30-3.27 (m, 5H), 3.08-3.06 (m, 5H), 2.97-2.89 (m, 2H), 2.80-2.74 (m, 4H), 2.54-2.52 (m, 2H), 2.40-2.31 (m, 2H), 2.27-2.22 (m, 4H), 2.16-2.13 (m, 4H), 2.02-1.71 (m, 8H), 1.69-1.45 (m, 10H), 1.40-1.21 (m, 14H), 1.17-1.08 (m, 4H), 1.01-0.98 (m, 6H), 0.89-0.82 (m, 6H) ч/млн.

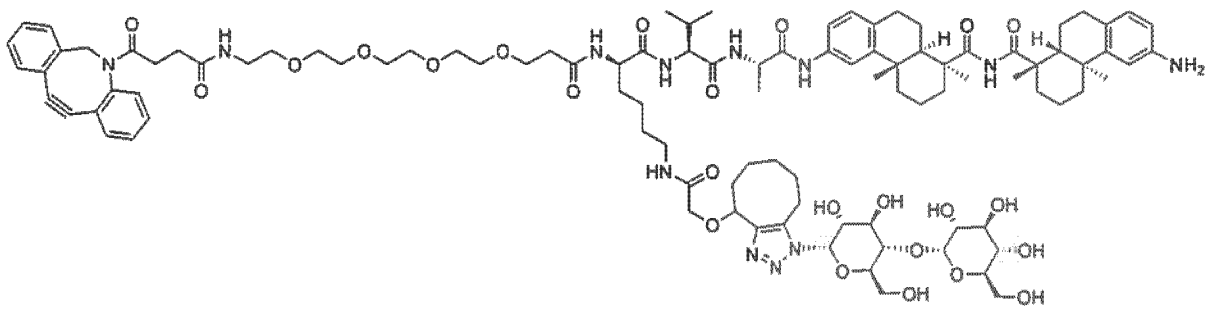
2- {1- [4 - ({[(5*R*)-5- [1- (4- {2-Азатрицикло [10.4.0.0^{4,9}] гексадека-1 (12), 4 (9),5,7, 13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо] -5-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10, 10a-октагидрофенантрен-1-ил] карбонил} карбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил}-4- (карбамоиламино) бутил] карбамоил}-2-метилпропил] карбамоил} пентил] карбамоил} метокси)-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-

циклоокта[d][1,2,3]триазол-1-ил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо} этан-1-сульфоновая кислота (LP3)



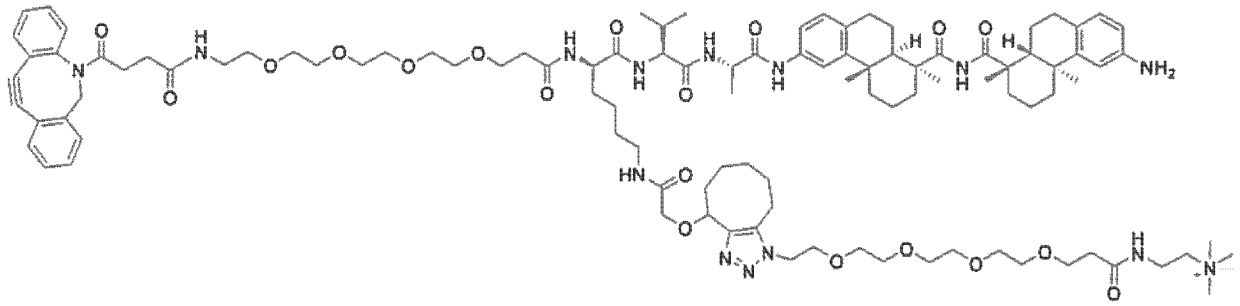
[00309] Следуя общей методике для соединений линкер-полезная нагрузка LP1-5, соединение **LP4** (6,0 мг, выход 20%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 671 $(M/3 + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $CDCl_3$) δ 9.37 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 8.24-8.22 (m, 1H), 8.18-8.17 (m, 2H), 8.09 (s, 2H), 8.01-7.99 (m, 1H), 7.97-7.94 (m, 2H), 7.89-7.84 (m, 1H), 7.76 (m, 5H), 7.68 (d, J = 7.5 Гц, 2H), 7.62 (d, J = 7.5 Гц, 2H), 7.55 (m, 2H), 7.51-7.43 (m, 7H), 7.39-7.28 (m, 7H), 7.08 (m, 4H), 6.96-6.93 (t, J = 7.0 Гц, 2H), 6.68 (d, J = 8.5 Гц, 2H), 6.48 (s, 2H), 6.35-6.33 (m, 2H), 5.97-5.95 (m, 2H), 5.37 (s, 4H), 5.04-5.01 (m, 2H), 4.74-4.69 (m, 5H), 4.52 (m, 1H), 4.42 (t, J = 5.5 Гц, 2H), 4.34-4.27 (m, 4H), 4.18 (m, 1H), 4.13-4.11 (m, 1H), 3.82-3.77 (m, 5H), 3.58-3.55 (m, 6H), 3.49-3.44 (m, 14H), 3.10-3.05 (m, 4H), 2.98-2.93 (m, 4H), 2.77-2.75 (m, 4H), 2.28-2.25 (m, 4H), 2.03-1.99 (m, 2H), 1.64-1.51 (m, 6H), 1.27-1.24 (m, 11H), 1.01-0.98 (m, 11H), 0.89-0.82 (m, 8H) ч/млн.

1-(4-{2-Азатрицикло [10.4.0.0^{4,9}] гексадека-1 (12), 4 (9), 5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4- оксобутанамидо)-*N*-[(1*R*)-1-{[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил] карбамоил} -4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8, 8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} этил] карбамоил} -2-метилпропил] карбамоил}-5-[2-({1-[(2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*R*)-3,4-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-5 - {[(2R, 3R, 4S, 5S, 6R)-3,4,5-тригидрокси-6- (гидроксиметил) оксан-2-ил] окси} оксан- 2-ил]-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d] [1,2,3] триазол-4-ил} окси) ацетамидо] пентил] -3,6,9,12 -тетраоксапентадекан-15-амид (LP5)



[00310] Следуя общей методике для соединений линкер-полезная нагрузка LP1-5, соединение **LP5** (15 мг, выход 27%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 947 $(M/2 + H)^+$. ^1H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.69 (s, 0.55H), 9.27 (s, 0.45H), 8.25-8.15 (m, 2H), 8.15-8.05 (m, 2H), 8.05-7.90 (m, 1H), 7.90-7.80 (m, 1H), 7.76 (t, J = 6.4 Гц, 1H), 7.66 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 7.60 (d, J = 6.8 Гц, 1H), 7.55-7.40 (m, 4H), 7.40-7.25 (m, 3H), 7.00-6.90 (m, 1H), 6.67 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.32 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 5.75-5.70 (m, 1H), 5.56 (d, J = 6.0 Гц, 1H), 5.50-5.40 (m, 2H), 5.20-4.92 (m, 4H), 4.80-4.70 (m, 1H), 4.70-4.65 (m, 2H), 4.65-4.55 (m, 2H), 4.40-4.25 (m, 2H), 4.20-3.95 (m, 2H), 3.80-3.75 (m, 2H), 3.75-3.45 (m, 23H), 3.30-3.20 (m, 3H), 3.20-2.90 (m, 5H), 2.90-2.65 (m, 3H), 2.60-2.55 (m, 1H), 2.40-1.95 (m, 12H), 1.90-1.70 (m, 5H), 1.70-1.35 (m, 14H), 1.35-1.20 (m, 15H), 1.15-1.05 (m, 3H), 1.00-0.90 (m, 7H), 0.90-0.80 (m, 7H) ч/млн.

(2- {1- [4- ({[(5R)-5- [1- (4- {2-Азатрицикло [10.4.0.0^{4,9}] гексадека-1 (12), 4 (9), 5,7, 13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо] -5-карбонил){[(1S)-1-{[(1S)-1-{[(4bS,8S,8aR)-8-({[(1S,4aS,10aR)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}-4b, 8-диметил-4b, 5, 6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} этил] карбамоил} -2-метилпропил] карбамоил} пентил] карбамоил} метокси)-1H, 4H, 5H, 6H, 7H, 8H, 9H-циклоокта [d] [1,2,3] триазол-1-ил] -3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо} этил) триметилазан трифторацетат (LP20)



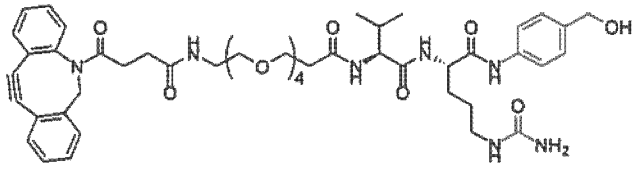
[00311] Следуя общей методике для соединений линкер-полезная нагрузка LP1-5, соединение **LP20** (7 мг, выход 24%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 950.8 $(M/2)^+$.

ПРИМЕР 6

Линкер-полезная нагрузка LP6

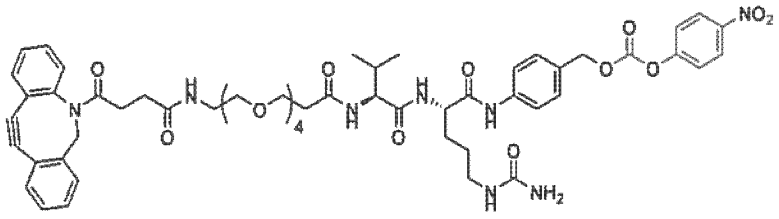
[00312] Этот пример демонстрирует методы синтеза линкера-полезной нагрузки **LP6** в Таблице 2 выше. Этот пример относится к соединениям с номерами от **109** до **113** и линкеру-полезной нагрузке **LP6** на ФИГ. 4.

1- (4- {2-Азатрицикло [10.4.0.0^{4,9}] гексадека-1 (12), 4 (9), 5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4- оксобутанамидо)-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{[4- (гидроксиметил) фенил] карбамоил} бутил] карбамоил} -2-метилпропил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (110)



[00313] К раствору соединения **108** (0,30 г, 0,54 ммоль) в DMF (10 мл) последовательно добавляли HATU (0,31 г, 0,81 ммоль) и DIPEA (0,14 г, 1,1 ммоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем к реакционному раствору добавляли VC-PAB-OH **109** (CAS: 159857-79-1, 0,21 г, 0,54 ммоль) при комнатной температуре, и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до тех пор, пока не израсходовалось соединение **108** или **109**, что контролировали с помощью ЖХМС. Затем реакционную смесь фильтровали через фильтрующую мембрану, и фильтрат концентрировали и непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрил в воде (с 10 ммоль/л бикарбоната аммония)) с получением соединения **110** (0,30 г, выход 60%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 617 $(M + H)^+$.

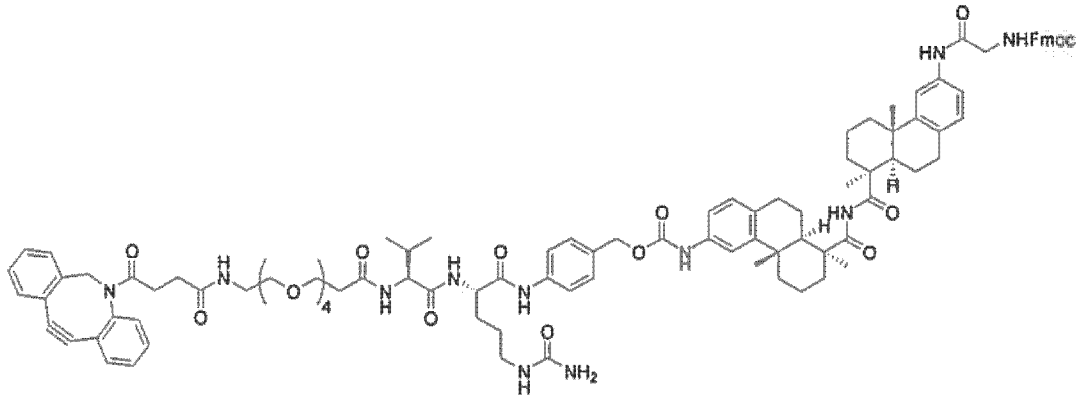
{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1- (4- {2-Азатрицикло [10.4.0.0^{4,9}] гексадека-1 (12), 4 (9), 5,7],13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино) пентанамидо] фенил} метил-4-нитрофенилкарбонат (112)



[00314] К раствору соединения **110** (0,15 г, 0,16 ммоль) в DMF (10 мл) добавляли последовательно при 0 °C бис (4-нитрофенил) карбонат **111** (0,15 г, 0,49 ммоль) и DIPEA (63 мг, 0,49 ммоль). Затем смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до тех пор, пока не было израсходовано соединение **110**, что контролировали с помощью ЖХМС. Реакционную смесь фильтровали через фильтрующую мембрану, и фильтрат концентрировали и непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрил в воде (с 10 ммоль/л бикарбоната аммония)) с

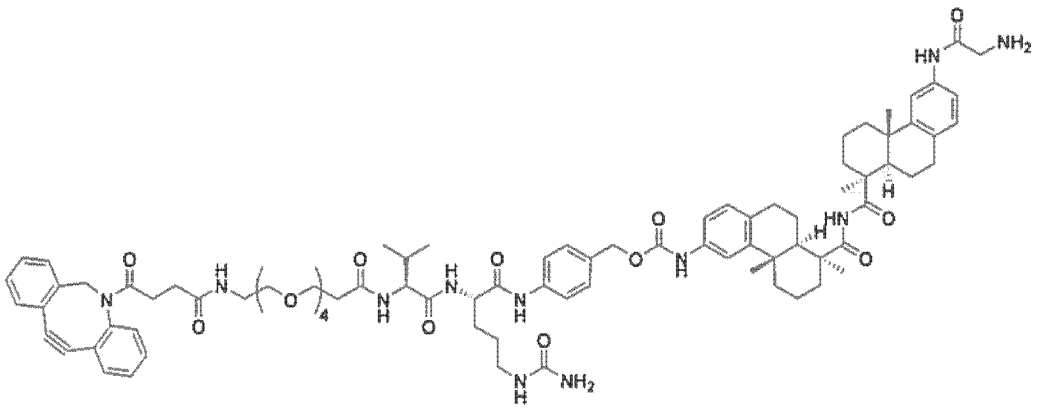
получением соединения 112 (50 мг, выход 28%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1079 $(M + H)^+$.

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-азатрицикло [10.4.0.0⁴,⁹] гексадека-1 (12), 4 (9), 5,7,13,15-гексаен-10-ин-2)-ил} -4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо] -3-метилбутанамидо] -5-(карбамонламино) пентанамидо] фенил} метокси) карбонил] амино} -1,4a-диметил -1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил] формамидо} карбонил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10- октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} метил) карбамат (113)



[00315] К смеси соединения **14a** (0,10 г, 0,12 ммоль) и соединения **112** (0,15 г, 0,14 ммоль) в DMF (5 мл) добавляли HOBt (20 мг, 0,15 ммоль) и DIPEA (48 мг, 0,37 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, что контролировали с помощью ЖХМС. Реакционную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (метод B) с получением соединения **113** (0,16 г, выход 72%) в виде светло-желтого твердого вещества. ESI масса/заряд: 874 $(M/2 + 1)^+$.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло [10.4.0.0⁴, ⁹] гексадека-1 (12), 4 (9), 5,7], 13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо] -3-метилбутанамидо] -5- (карбамонламино) пентанамидо] фенил} метил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(2-аминоацетамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9, 10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил] карбамоил} -4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамат (LP6)



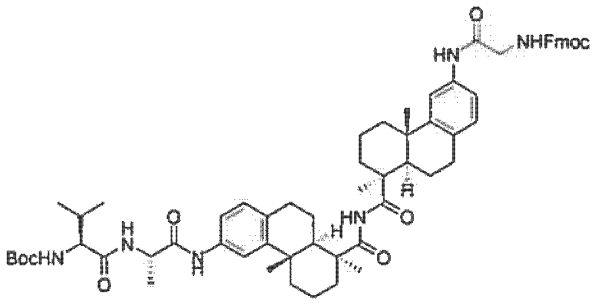
[00316] К раствору соединения **113** (0,10 г, 0,057 ммоль) в DMF (5 мл) добавляли пиперидин (1 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение получаса до полного удаления Fmoc в соответствии с ЖХМС. Реакционную смесь очищали непосредственно с помощью препаративной ВЭЖХ (метод B) с получением соединения **LP6** (35 мг, выход 23%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 763 $(M/2 + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.0 (s, 1H), 9.51 (s, 1H), 8.15-8.08 (m, 2H), 7.87 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 7.76 (t, J = 5.0 Гц, 1H), 7.70-7.65 (m, 1H), 7.61 (t, J = 8.5 Гц, 3H), 7.51-7.42 (m, 4H), 7.41-7.30 (m, 8H), 7.20-7.10 (m, 1H), 7.00-6.90 (m, 2H), 6.00-5.95 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.35-5.30 (m, 1H), 5.10-5.00 (m, 3H), 4.40-4.35 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 14H), 3.25 (s, 3H), 3.10-3.00 (m, 4H), 3.00-2.85 (m, 4H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.63-2.61 (m, 1H), 2.60-2.55 (m, 1H),2.45-2.35 (m, 3H), 2.31-2.20 (m, 3H), 2.20-2.10 (m,4H), 2.10-1.92 (m, 5H), 1.90-1.82 (m, 4H), 1.68-1.53 (m, 6H), 1.50-1.40 (m, 2H), 1.20-1.10 (m, 2H), 1.02-0.96 (m, 6H), 0.90-0.80 (m, 8H) ч/млн.

ПРИМЕР 7

Линкер-полезная нагрузка LP7

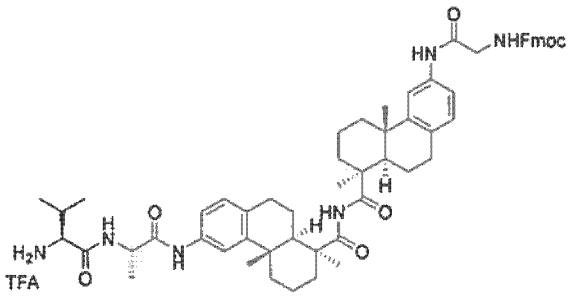
[00317] Этот пример демонстрирует методы синтеза линкера-полезной нагрузки LP7 в Таблице 2 выше. Этот пример относится к соединениям под номерами **14a**, **107**, **114** и **115** и линкеру-полезной нагрузке **LP7** на ФИГ. 5.

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-{[(*трет*-бутокси) карбонил] амино} -3-метилбутанамидо] пропанамидо] -1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил] формамидо} карбонил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} метил) карбамат (114)



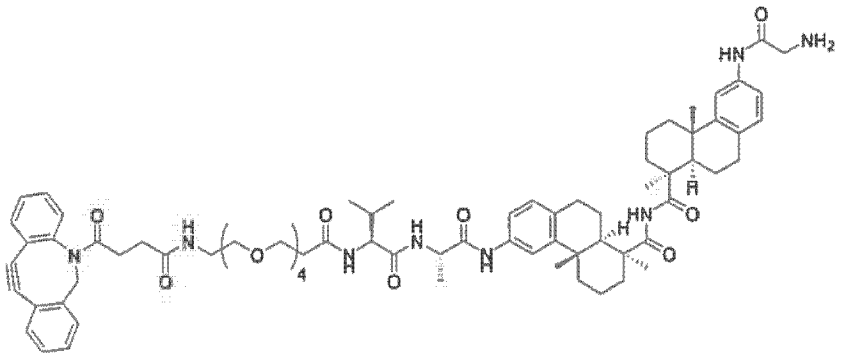
[00318] К раствору соединения **14a** (66 мг, 0,082 ммоль) в DMF (10 мл) добавляли Boc-Val-Ala-OH **101c** (28 мг, 0,098 ммоль), DIPEA (32 мг, 0,25 ммоль) и HATU (47 мг, 0,12 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, что контролировали с помощью ЖХМС. Смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (50-90% ацетонитрила в водном *бикарбонате* аммония (10 мМ)) с получением соединения **114** (74 мг, выход 84%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 978 (M – Boc + 1)$^+$.

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино -3-метилбутанамидо] пропанамидо] -1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил] формамидо} карбонил)-4b, 8-диметил-4b,5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} метил) карбамат соль трифторуксусной кислоты (115)



[00319] К раствору соединения **114** (74 мг, 0,069 ммоль) в DCM (3 мл) добавляли TFA (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Boc в соответствии с ЖХМС. Летучие вещества удаляли *в вакууме* с получением сырого продукта **115** (66 мг, 97% выход в виде соли TFA) в виде бесцветного масла. ESI масса/заряд: 978 (M + 1)$^+$.

1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-*N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(2-аминоацетамидо)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил] карбамоил} -4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} этил] карбамоил} -2-метилпропил] -3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (LP7)



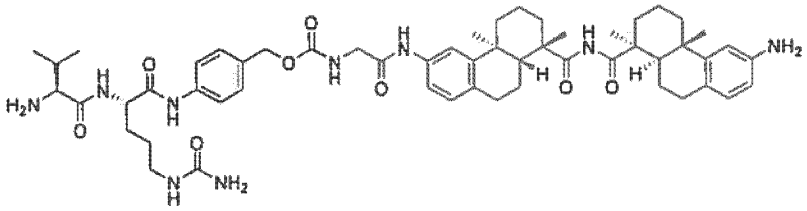
[00320] К раствору соединения **115** (60 мг, 61 мкмоль) в DMF (5 мл) добавляли DIBAC-suc-PEG4-OSu **107** (48 мг, 74 мкмоль) и DIPEA (24 мг, 0,18 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, что контролировали с помощью ЖХМС. Затем к реакционной смеси добавляли пиперидин (0,2 мл, избыток). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут до полного удаления Fmoc в соответствии с ЖХМС. Реакционную смесь очищали непосредственно с помощью препаративной ВЭЖХ (метод B), получая **LP7** (22 мг, выход 28%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1292 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) (с региоизомерами) δ 9.66 (s, 0.5H), 9.51 (s, 0.5H), 8.43 (d, J = 7.5 Гц, 0.5H), 8.15-8.10 (m, 1.5H), 8.05 (d, J = 7.5 Гц, 0.5H), 7.90 (d, J = 7.5 Гц, 0.5H), 7.77 (t, J = 5.5 Гц, 1H), 7.70-7.65 (m, 1H), 7.65-7.60 (m, 1H), 7.55-7.25 (m, 11H), 6.97 (d, J = 8.5 Гц, 2H), 5.02 (d, J = 14.5 Гц, 1H), 4.40-4.35 (m, 1H), 4.18 (t, J = 7.5 Гц, 0.5H), 4.04 (t, J = 7.5 Гц, 0.5H), 3.65-3.50 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 14H), 3.23 (s, 3H), 3.15-3.05 (m, 3H), 2.95-2.85 (m, 3H), 2.80-2.70 (m, 3H), 2.60-2.55 (m, 1H), 2.40-2.10 (m, 12H), 2.00-1.80 (m, 5H), 1.80-1.70 (m, 1H), 1.70-1.55 (m, 5H), 1.24 (s, 1H), 1.20-1.10 (m, 3H), 1.10-0.90 (m, 8H), 0.90-0.80 (m, 8H) ч/млн.

ПРИМЕР 8

Линкер-полезная нагрузка LP8

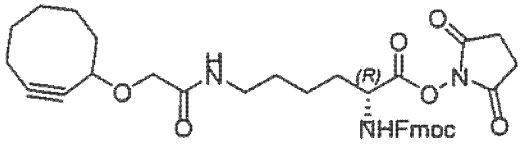
[00321] Этот пример демонстрирует методы синтеза линкера-полезной нагрузки **LP8** в Таблице 2 выше. Этот пример относится к соединениям с номерами **P4**, **117-120** и линкеру-полезной нагрузке **LP8** на ФИГ. 6.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо] -5- (карбамоиламино) пентанамидо] фенил} метил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил] карбамоил} -4b, 8-диметил- 4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} метил) карбамат (117)



[00322] К раствору Fmoc-vc-PAB-PNP **116** (0,14 г, 0,18 ммоль) и полезной нагрузки **P4** (0,11 г, 0,18 ммоль) в DMF (2 мл) добавляли HOBt (24 мг, 0,18 ммоль) и DIPEA (70 мг. 0,54 ммоль) при комнатной температуре шприцем. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, и соединение **P4** израсходовалось согласно ЖХМС. К полученной смеси добавляли пиперидин (42 мг, 0,50 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Fmoc, что контролировалось с помощью ЖХМС. После фильтрации через мембрану фильтрат концентрировали и непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (метод B) с получением соединения **117** (45 мг, выход 27%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 991 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.11 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 8.20-8.04 (m, 2H), 7.60 (d, J = 8.4 Гц, 2H), 7.52-7.44 (m, 2H), 7.36-7.20 (m, 3H), 6.96 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.68 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 6.48 (d, J = 1.7 Гц, 1H), 6.36-6.29 (m, 1H), 5.98 (t, J = 5.6 Гц, 1H), 5.41 (s, 2H), 4.97 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 4.52-4.42 (m, 1H), 3.75 (d, J = 6.0 Гц, 2H), 3.07-2.85 (m, 4H), 2.82-2.61 (m, 3H), 2.31-2.06 (m, 6H), 2.00-1.78 (m, 6H), 1.72-1.52 (m, 6H), 1.44-1.09 (m, 13H), 0.99 (d, J = 8.5 Гц, 6H), 0.87 (d, J = 8.1 Гц, 3H), 0.78 (d, J = 6.8 Гц, 3H) ч/млн.

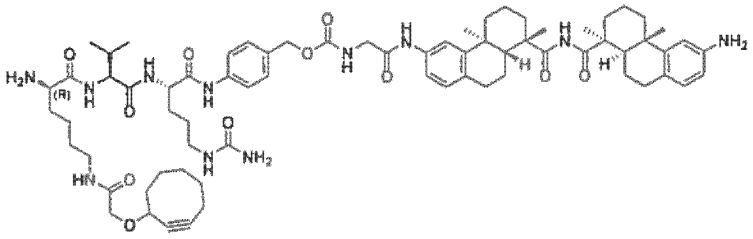
2,5-Диоксопирролидин-1-ил (2R)-*6*-[2-(циклоок-2-ин-1-илокси) ацетамидо]-2-{[(9*H*-флуорен-9-илметокси) карбонил] амино} гексаноат (118)



[00323] Смесь соединения **103** (0,10 г, 0,19 ммоль), EDCI (72 мг, 0,38 ммоль) и HOSu (43 мг, 0,38 ммоль) в DCM (3 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Реакционную смесь концентрировали и остаток очищали хроматографией на колонке с силикагелем (70% этилацетата в петролейном эфире) с получением промежуточного соединения **118** (55 мг, выход 47%) в виде белого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без очищения. ESI масса/заряд: 630 $(M + 1)^+$.

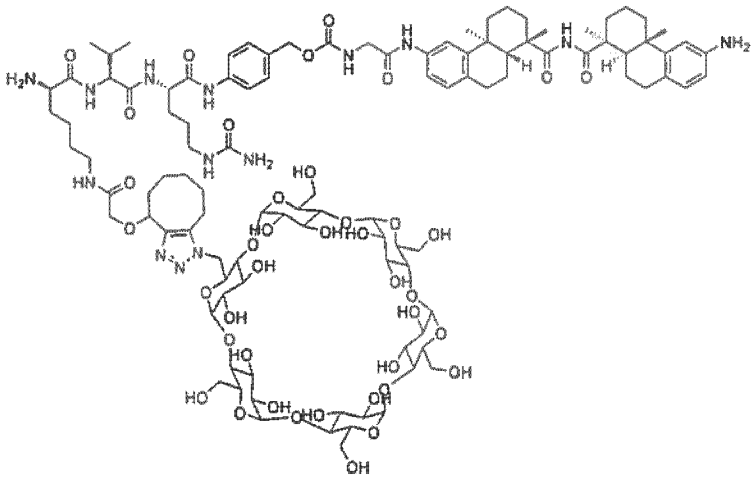
{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-амино-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-

4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}метил)карбамат (119)



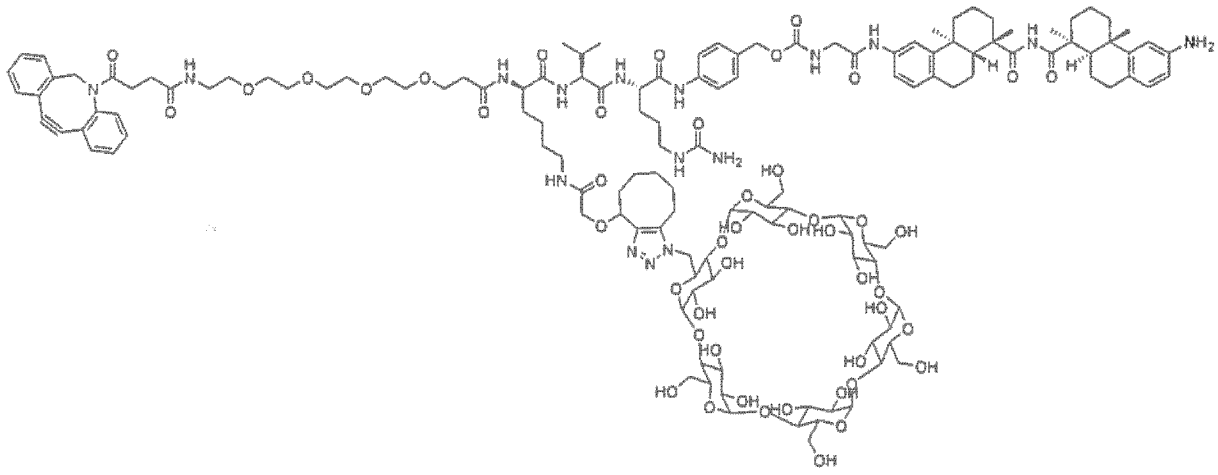
[00324] К раствору соединения **117** (55 мг, 56 мкмоль) и DIPEA (24 мг, 0,19 ммоль) в DMF (1,5 мл) добавляли неочищенное промежуточное соединение **118** (40 мг, 63 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч до израсходования **118** в соответствии с ЖХМС. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрил в воде) с получением **Fmoc-119** (60 мг, ESI масса/заряд: 753 $(M/2 + 1)^+$) в виде белого твердого вещества, которое растворяли в DMF (1,5 мл). К раствору добавляли диэтиламин (24 мг, 0,33 ммоль) и раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов до полного удаления Fmoc согласно ЖХМС. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водном* бикарбонате аммония) с получением соединения **119** (35 мг, выход 50% из соединения 117) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1282 $(M + H)^+$.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-амино--6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис (гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27, 29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}] дотетраконтан-5-ил]метил}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d] [1,2, 3] триазол-4-ил) окси] ацетамидо} гексанамидо] -3-метилбутанамидо] -5-(карбамоиламино) пентанамидо] фенил} метил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил] карбамоил} -4b, 8-диметил-4b, 5, 6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} метил) карбамат (120)



[00325] К раствору соединения **119** (70 мг, 54 мкмоль) в DMF (3 мл) добавляли α-CD-N_3 **105a** (0,16 г, 0,16 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 50 °C в течение 3 дней, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь затем непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водном* бикарбонате аммония (10 мМ) с получением соединения **120** (20 мг, выход 16%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1141 $(M/2 + 1)^+$.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[(2*R*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1 (12), 4 (9), 5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо] -6- {2 - [(1 - {[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис (гидроксиметил)-2,4,7, 9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил] метил}-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*,7*H*,8*H*,9*H*-циклоокта[d] [1,2,3] триазол-4-ил) окси] ацетамидо} гексанамидо] -3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино) пентанамидо] фенил} метил *N*-({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1 -карбонил] карбамоил} -4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} метил) карбамат (LP8)



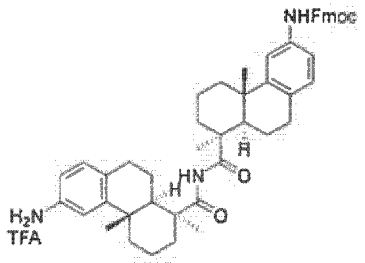
[00326] К раствору соединения **120** (10 мг, 4,4 мкмоль) и промежуточного соединения **107** (5 мг, 7,7 мкмоль) в DMF (2 мл) добавляли DIPEA (16 мг, 0,12 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь дважды очищали препаративной ВЭЖХ (метод B) с получением **LP8** (1,5 мг, выход 12%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 939 $(M/3 + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.87-9.66 (m, 1H), 8.22-8.08 (m, 4H), 7.91-7.76 (m, 2H), 7.71-7.61 (m, 4H), 7.56-7.45 (m, 4H), 7.40-7.28 (m, 5H), 6.96 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.68 (d, J = 8.1 Гц, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.34 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 6.03-5.96 (m, 1H), 5.67-5.31 (m, 12H), 5.06-4.95 (m, 3H), 4.87-4.66 (m, 7H), 4.63-4.50 (m, 3H), 4.38-4.29 (m, 3H), 4.22-4.13 (m, 1H), 4.06-3.93 (m, 1H), 3.86-3.40 (m, 54H), 3.30-3.19 (m, 4H), 3.17-2.85 (m, 4H), 2.81-2.62 (m, 2H), 2.60-2.54 (m, 3H), 2.41-1.95 (m, 11H), 1.92-1.71 (m, 5H), 1.68-1.40 (m, 13H), 1.33-1.09 (m, 22H), 1.02-0.93 (m, 10H), 0.89-0.78 (m, 9H) ч/млн. *Анал. ВЭЖХ* (смесь региоизомеров триазола): 63%, время удерживания: 6,03 мин; 36%, время удерживания: 6,13 мин (метод B).

ПРИМЕР 9

Линкер-полезная нагрузка LP9

[00327] Этот пример демонстрирует методы синтеза линкера-полезной нагрузки **LP9** в Таблице 2 выше. Этот пример относится к соединениям под номерами **12b**, **15**, **112**, **121** и **122** и линкеру-полезной нагрузке **LP9** на ФИГ. 7.

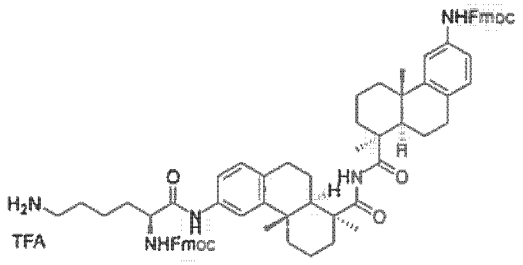
9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a -диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил] формамидо} карбонил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9, 10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамат (13a), соль трифторуксусной кислоты (14a)



[00328] К раствору соединения **12b** (0,63 г, 1,0 ммоль) в DCM (50 мл) добавляли Fmoc-OSu (0,40 г, 1,2 ммоль) и DIPEA (0,26 г, 2,0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч, что контролировали с помощью ЖХМС. Смесь концентрировали *в вакууме* и остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (50-80% этилацетат в петролейном эфире) с получением **Boc-15** (0,71 г) в виде

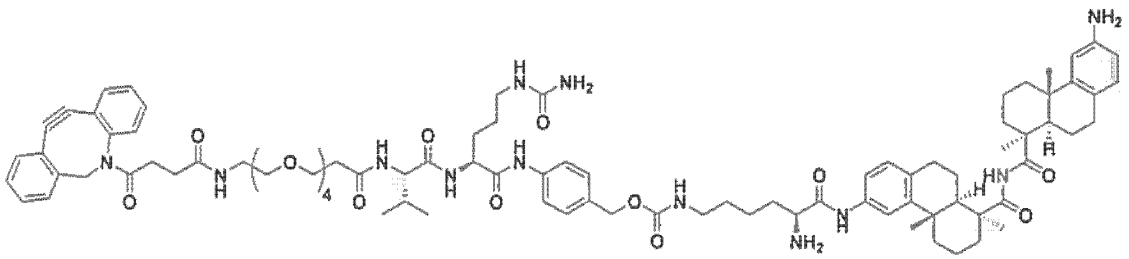
белого твердого вещества, которое растворяли в DCM (10 мл). К раствору добавляли TFA (3 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов до полного удаления Boc в соответствии с ЖХМС. Летучие вещества удаляли *в вакууме*, получая соединение **15** в виде соли TFA (0,62 г, выход 74%) и бесцветного масла. ESI масса/заряд: 751 $(M + H)^+$.

9*H*-Флуорен-9-илметил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[(2*S*)-6-амино-2 -{[(9*H*-флуорен -9-илметокси) карбонил] амино} гексанамидо] -1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил] формамидо} карбонил)-4b, 8-диметил -4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамат, соль трифторуксусной кислоты (122)



[00329] К раствору соединения **15** (0,30 г, 0,40 ммоль) в DMF (20 мл) добавляли Fmoc-Lys (Boc)-OH **121** (0,23 г, 0,48 ммоль), HATU (228 мг, 0,60 ммоль) и DIPEA (0,16 г, 1,2 ммоль) последовательно при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (50-90% ацетонитрила в *водном* бикарбонате аммония (10 мМ)) с получением **Boc-122** (0,41 г) в виде белого твердого вещества, 0,24 г которого растворяли в DCM (20 мл). К раствору добавляли TFA (3 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Boc в соответствии с ЖХМС. Летучие вещества удаляли *в вакууме*, получая соединение **122** в виде соли TFA (0,22 г, выход 79%) и бесцветного масла. ESI масса/заряд: 1101 $(M + H)^+$.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло [10.4.0.0⁴, ⁹] гексадека-1 (12), 4 (9), 5,7], 13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо] -3-метилбутанамидо] -5- (карбамонламино) пентанамидо] фенил} метил *N*-[(5*S*)-5-амино-5-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2, 3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил] карбамонл} -4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамонл} пентил] карбамат (LP9)



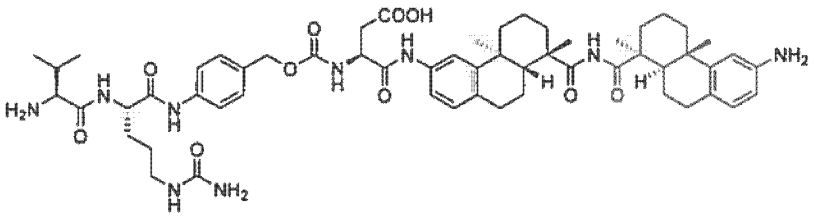
[00330] К смеси соединения **122** (14 мг, 12 мкмоль) и соединения **112** (15 мг, 14 мкмоль) в DMF (5 мл) добавляли HOBt (2 мг, 15 мкмоль) и DIPEA (5 мг, 37 мкмоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, что контролировали с помощью ЖХМС. Затем к реакционной смеси добавляли пиперидин (0,5 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 0,5 ч до полного удаления Fmoc в соответствии с ЖХМС. Затем реакционную смесь фильтровали через мембрану, и фильтрат концентрировали и непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (метод B), получая **LP9** (6 мг, выход 31%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 798 $(M/2 + H)^+$. ^{1}H ЯМР (500 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.0 (s, 1H), 8.15-8.08 (m, 2H), 7.87 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 7.76 (t, J = 5.0 Гц, 1H), 7.67 (d, J = 7.0 Гц, 1H), 7.61 (d, J = 7.0 Гц, 1H), 7.60-7.56 (m, 2H), 7.51-7.42 (m, 4H), 7.41-7.24 (m, 6H), 7.20-7.16 (m, 1H), 6.95 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.68 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.50-6.46 (m, 1H), 6.36-6.32 (m, 1H), 6.00-5.96 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.02 (d, J = 9.0 Гц, 1H), 4.91 (s, 2H), 4.69 (s, 2H), 4.40-4.35 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 14H), 3.24-3.20 (m, 2H), 3.10-3.05 (m, 2H), 3.00-2.92 (m, 3H), 2.92-2.85 (m, 1H), 2.80-2.70 (m, 2H), 2.65-2.55 (m, 2H), 2.45-2.35 (m, 2H), 2.31-2.20 (m, 4H), 2.20-2.10 (m,4H), 2.10-1.92 (m, 3H), 1.90-1.70 (m, 6H), 1.68-1.53 (m, 6H), 1.50-1.30 (m, 8H), 1.25-1.20 (m, 7H), 1.20-1.10 (m, 3H), 1.02-0.96 (m, 6H), 0.90-0.80 (m, 6H) ч/млн.

ПРИМЕР 10

Соединения линкер-полезная нагрузка LP10 и LP11

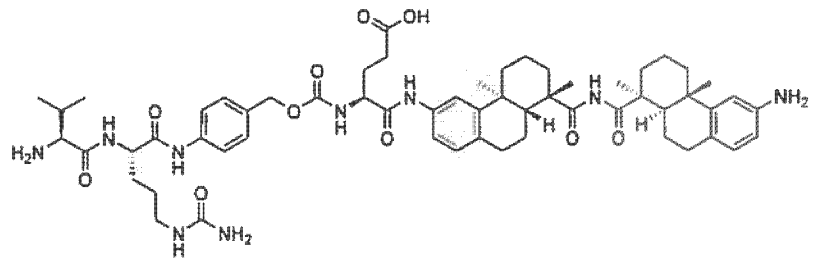
[00331] Этот пример демонстрирует методы синтеза соединений линкер-полезная нагрузка **LP10-LP11** в Таблице 2 выше. Этот пример относится к соединениям, пронумерованным **P7**, **P8**, **116**, **123a-b**, линкер-полезная нагрузка **LP10** и **LP11** на ФИГ. 8.

(*S*)-4-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10, 10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-3-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо) бензилокси) карбониламино)-4-оксобутановая кислота (123a)



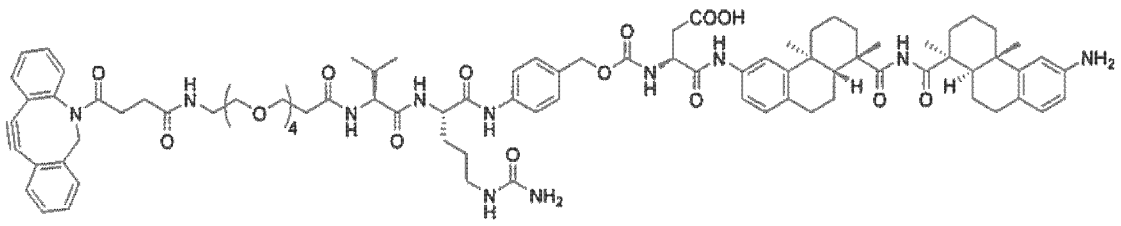
[00332] К раствору полезной нагрузки **P7** (64 мг, 0,10 ммоль) в DMF (5 мл) добавляли последовательно при комнатной температуре промежуточное соединение **116** (92 мг, 0,12 ммоль) и DIPEA (26 мг, 0,20 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, что контролировали с помощью ЖХМС. Затем к смеси добавляли пиперидин (0,5 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут до полного удаления Fmoc в соответствии с ЖХМС. Смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (40-70% ацетонитрила в *водном* бикарбонате аммония (10 мМ)) с получением соединения **123a** (41 мг, выход 39%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1049 $(M + H)^+$.

(*S*)-5-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10, 10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-4-((4-((*S*)-2-((*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо) бензилокси) карбониламино)-5-оксопентановая кислота (123b)



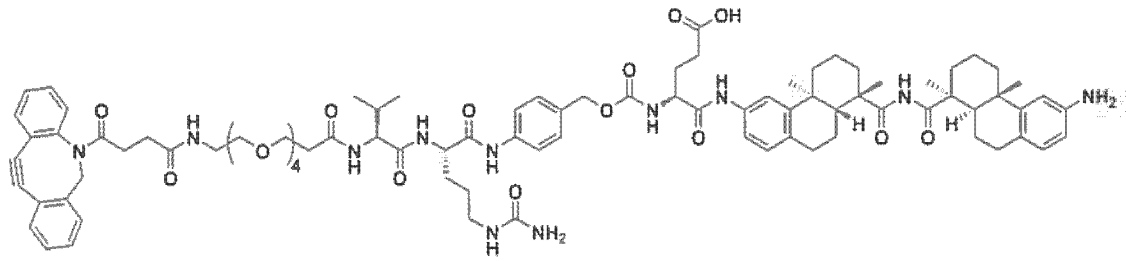
[00333] Следуя аналогичной процедуре для **123a**, за исключением замены **P8** (0,53 г, 0,81 ммоль) на **P7**, получают соединение **123b** (0,61 г, выход 71%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1063 $(M + H)^+$.

(3*S*)-3-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло [10.4.0.0⁴, ⁹] гексадека-1] (12), 4 (9), 5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо] -3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино) пентанамидо] фенил} метокси) карбонил] амино}-3-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил- 1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил] карбамоил} -4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3 -ил] карбамоил} пропановая кислота (LP10)



[00334] К раствору соединения **123** (21 мг, 20 мкмоль) в DMF (2 мл) добавляли последовательно промежуточное соединение **107** (16 мг, 24 мкмоль) и DIPEA (5 мг, 40 мкмоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь непосредственно очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (метод B) с получением соединения **LP10** (12 мг, выход 38%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 792 $(M/2 + H)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.0 (s,1H), 8.14 (d, J = 7.2 Гц, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.90 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 7.85-7.75 (m, 1H), 7.68 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 7.65-7.55 (m, 3H), 7.55-7.40 (m, 4H), 7.40-7.25 (m, 5H), 6.95 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 6.67 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.32 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.05-5.95 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.05-4.90 (m, 3H), 4.80-4.60 (m, 1H), 4.40-4.35 (m, 2H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 25H), 3.20-2.85 (m, 4H), 2.80-2.55 (m, 3H), 2.40-2.30 (m, 3H), 2.30-2.20 (m, 3H), 2.20-2.05 (m, 4H), 2.0-1.50 (m, 12H), 1.50-1.30 (m, 3H), 1.30-1.20 (m, 6H), 1.20-1.05 (m, 2H), 1.05-0.90 (m, 5H), 0.90-0.80 (m, 6H) ч/млн.

(4*S*)-4-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1] (12), 4 (9), 5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо] -3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино) пентанамидо] фенил} метокси) карбонил] амино}-4-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил- 1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил] карбамоил} -4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3 -ил] карбамоил} бутановая кислота (LP11)



[00335] Следуя аналогичной процедуре для **LP10**, за исключением замены **123b** (0,10 г, 94 мкмоль) на **123a**, получают соединение **LP11** (50 мг, выход 33%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 799 $(M/2 + H)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.0 (s, 1H), 9.91 (s, 1H), 8.14 (d, J = 7.2 Гц, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.90 (d, J = 8.8 Гц, 1H), 7.85-7.75 (m, 1H), 7.68 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 7.65-7.55 (m, 3H), 7.55-7.40 (m, 4H), 7.40-7.25 (m, 6H), 6.95 (d,

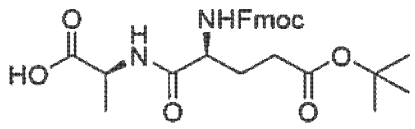
J = 8.8 Гц, 1H), 6.67 (d, *J* = 8.0 Гц, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.32 (d, *J* = 8.0 Гц, 1H), 6.05-5.95 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.05-4.90 (m, 3H), 4.40-4.35 (m, 2H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 4H), 3.50-3.40 (m, 25H), 3.20-2.85 (m, 4H), 2.80-2.55 (m, 3H), 2.40-2.30 (m, 3H), 2.30-2.20 (m, 3H), 2.20-2.05 (m, 4H), 2.00-1.50 (m, 12H), 1.50-1.30 (m, 3H), 1.30-1.20 (m, 6H), 1.20-1.05 (m, 2H), 1.05-0.90 (m, 5H), 0.90-0.80 (m, 6H) ч/млн.

ПРИМЕР 11

Полезная нагрузка P12 и P16; и линкер-полезная нагрузка LP12 и LP16

[00336] В этом примере демонстрируются методы синтеза полезной нагрузки **P12** и P16 в таблице 1 выше, а также соединений линкер-полезная нагрузка **LP12** и **LP16** в таблице 2 выше. Этот пример относится к соединениям под номерами**12b**, **107**, **124**, **125** и **126**; и полезной нагрузке **P12** и **P16**; и соединению линкер-полезная нагрузка **LP12** и **LP16** на ФИГ. 9

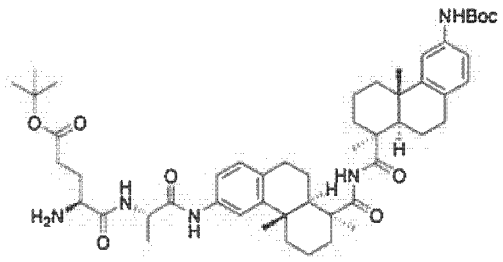
((*S*)-2-((((9*H*-Флуорен-9-ил) метокси) карбонил) амино)-5-(*трет*-бутокси)-5-оксопентаноил)-*L*-аланин (125)



[00337] К раствору Fmoc-Glu(OtBu)-OH (6,0 г, 14 ммоль) в DCM (300 мл) добавляли HOSu (3,2 г, 28 ммоль) и EDCI (5,4 г, 28 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь разбавляли DCM (200 мл) и промывали водой (100 мл x 2) и рассолом (100 мл). Органический раствор сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали *в вакууме* с получением сырого соединения **124** (8,5 г, ESI масса/заряд: 545 $(M + 23)^+$), которое растворяли в DMF (10 мл). К раствору добавляли аланин (4,2 г, 48 ммоль) и DIPEA (6,2 г, 48 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь выливали в воду (100 мл) и подкисляли уксусной кислотой до pH 5-6. Смесь экстрагировали этилацетатом, и объединенный органический раствор концентрировали *в вакууме*. Неочищенный продукт очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-60% ацетонитрила в *води.* TFA (0,01%)) с получением соединения **125** (1 г, выход 15%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 497 $(M + H)^+$.

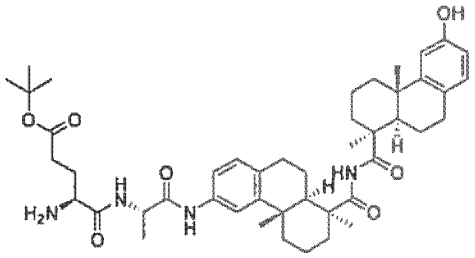
(*S*)-*трет*-Бутил4-амино-5-((*S*)-1-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-(*трет*-бутоксикарбониламино)-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-

карбонилкарбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен -3-иламино)-1-оксопропан-2-иламино)-5-оксопентаноат (126a)



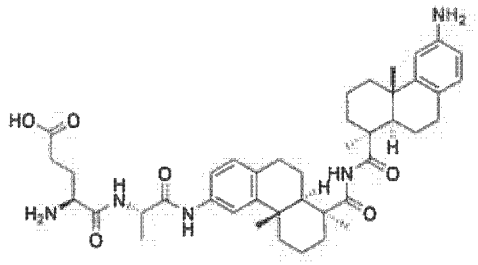
[00338] К раствору соединения **125** (42 мг, 84 мкмоль) и DIPEA (28 мкл, 0,16 ммоль) в DMF (3,0 мл) добавляли HATU (36 мг, 95 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 минут перед добавлением соединения **12b** (50 мг, 80 мкмоль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, что контролировали с помощью ЖХМС. Затем к реакционной смеси добавляли пиперидин (1,0 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч до полного удаления Fmoc в соответствии с ЖХМС. Полученную смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *води.* TFA (0,01%)) с получением соединения **126a** (20 мг, выход 28%) в виде желтого твердого вещества. ESI масса/заряд: 885 $(M + H)^+$.

***трет*-Бутил(4S)-4-амино-4-карбонил){[(1S)-1-{[(4bS,8S,8aR)-8-({[(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} этил] карбамоил} бутаноат (126b)**



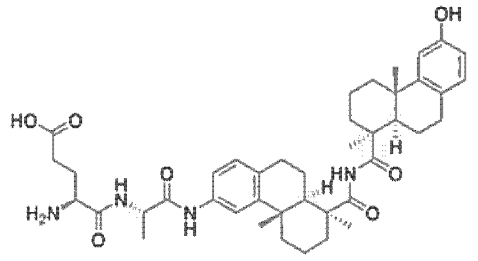
[00339] Следуя аналогичной процедуре для **126a**, за исключением замены **P1** на **12b**, получали соединение **126b** (37 мг, выход 47%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 393.4 $(M/2 + 1)^+$.

(*S*)-4-амино-5-((*S*)-1-((4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-иламино)-1-оксопропан-2-иламино)-оксопентановая кислота (P12)



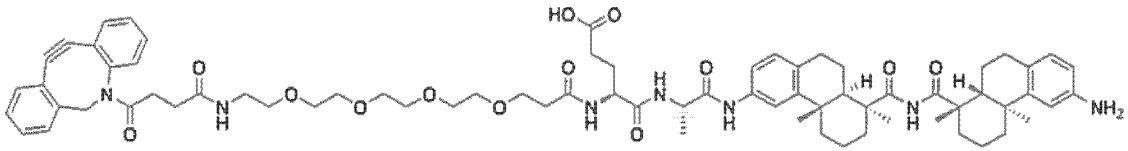
[00340] Смесь соединения **126a** (57 мг, 64 мкмоль) в чистой TFA (2,0 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение часа и контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь разбавляли DCM (20 мл) и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в *водном* бикарбонате натрия (10 мМ)) с получением **P12** (20 мг, выход 43%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 365 (M/2 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 9.90 (s, 1H), 8.30 (br s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.33 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.96 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.67 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.46 (s, 1H), 6.33 (dd, J = 7.6 Гц и 2.0 Гц, 1H), 4.70 (br s, 1H), 4.41-4.36 (m, 1H), 3.42-3.30 (m, 6H), 2.91-2.85 (m, 1H), 2.78-2.75 (m, 2H), 2.67-2.61 (m, 1H), 2.32-2.27 (m, 4H), 2.16-2.13 (m, 4H), 1.88-1.77 (m, 4H), 1.65-1.58 (m, 4H), 1.29-1.23 (m, 12H), 1.14-1.11 (m, 2H), 1.01 (d, J = 7.6 Гц, 6H) ч/млн.

(4S)-4-амино-4-карбонил{[(1S)-1-{[(4bS,8S,8aR)-8-({[(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо})-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} этил] карбамоил} бутановая кислота (P16)



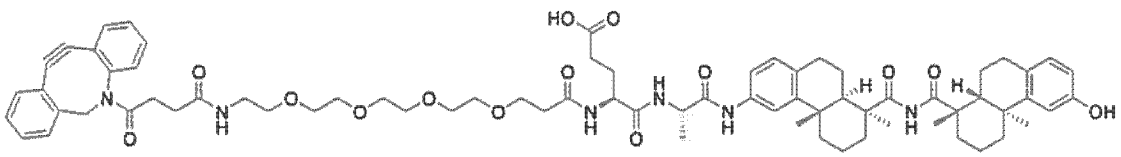
[00341] Следуя аналогичной процедуре для **P12**, за исключением замены **126b** на **126a**, полезную нагрузку **P16** (18 мг, выход 53%) получали в виде желтого твердого вещества. ESI масса/заряд: 729.5 (M + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 9.95-9.90 (d, J = 18.8 Гц, 1H), 8.30 (br s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.37-7.33 (m, 1H), 6.96 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.81 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.63 (d, J =2.8 Гц, 1H), 6.50 (dd, J = 8.0, 2.0 Гц, 1H), 4.39 (br s, 1H), 3.32-3.16 (m, 4H), 2.90-2.66 (m, 5H), 2.27-2.13 (m, 8H), 1.88-1.80 (m, 4H), 1.66-1.59 (m, 4H), 1.47 (br s, 1H), 1.31-1.23 (m, 11H), 1.17-1.10 (m, 2H), 1.00-0.98 (m, 6H) ч/млн.

(4*S*)-4-[1-(4-{2-Азатрицикло [10.4.0.0^{4,9}] гексадека-1 (12), 4 (9), 5,7,13,15-гексаен-10-ин-2)-ил} -4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-4-{[(1*S*)-1-{[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-({[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил] формамидо} карбонил)-4b, 8-диметил- 4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} этил] карбамоил} бутановая кислота (LP12)



[00342] К раствору соединения **P12** (10 мг, 14 мкмоль) в DMF (2,0 мл) добавляли DIPEA (6 мкл, 21 мкмоль) и соединение **107** (11 мг, 16 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь непосредственно очищали с помощью препаративной ВЭЖХ (метод B) с получением соединения **LP12** (3,5 мг, выход 20%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 632 (M/2 + H)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 9.64 (s, 1H), 9.49 (s, 1H), 8.41-8.39 (m, 1H), 8.12-8.09 (m, 1H), 7.79 (br s, 1H), 7.67 (d, J = 7.2 Гц, 1H), 7.61 (d, J = 7.2 Гц, 1H), 7.60 (br s, 1H), 7.52-7.27 (m, 8H), 6.95 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.67 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.33 (dd, J = 8.4 Гц и 1.6 Гц, 1H), 5.02 (d, J = 14.0 Гц, 1H), 4.70-4.67 (br s, 1H), 4.36-4.30 (m, 1H), 4.21-4.14 (m, 1H), 3.61-3.58 (m, 3H), 3.46-3.45 (m, 15H), 3.08-3.06 (m, 2H), 2.90-2.55 (m, 5H), 2.42-2.09 (m, 12H), 1.98-1.73 (m, 7H), 1.65-1.54 (m, 3H), 1.29-1.25 (m, 12H), 1.17-1.11 (m, 2H), 0.99-0.97 (m, 6H) ч/млн.

(4S)-4-[1-(4-{2-Азатрицикло [10.4.0.0^{4,9}] гексадека-1 (12),4(9), 5,7,13,15-гексаен-10-ин-2)-ил} -4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо] -4-карбонил{[(1S)-1-{[(4bS,8S,8aR)-8-({[(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо})-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10 -октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} этил] карбамоил} бутановая кислота (LP16)



[00343] Следуя аналогичной процедуре для **LP12**, за исключением замены **P16** на **P12**, было получено соединение линкер-полезная нагрузка **LP16** (12 мг, выход 69%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 632.5 (M/2 + 1)$^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, DMSO$_{d6}$) δ 9.63 (s, 1H), 9.49 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.38 (d, J = 5.6 Гц, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.78 (br s, 1H), 7.67 (d, J = 7.6 Гц, 1H), 7.61 (d, J = 6.4 Гц, 1H), 7.56-7.27 (m, 8H), 6.95 (d, J = 8.0 Гц, 1H), 6.81 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.63 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.51-6.48 (m, 1H), 5.02 (d, J = 13.6

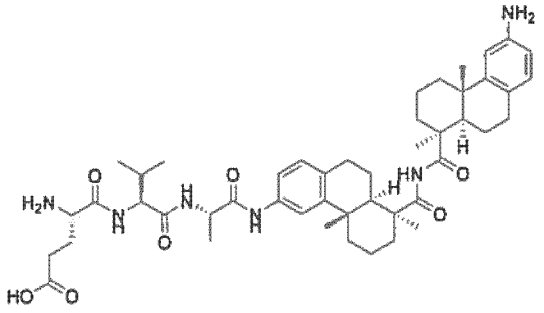
Гц, 1H), 4.36-4.30 (m, 1H), 4.20-4.15 (m, 1H), 3.61-3.54 (m, 3H), 3.46-3.43 (m, 14H), 3.10-3.06 (m, 2H), 2.89-2.66 (m, 5H), 2.44-2.11 (m, 12H), 2.02-1.73 (m, 7H), 1.65-1.56 (m, 3H), 1.31-1.22 (m, 12H), 1.17-1.09 (m, 2H), 1.00-0.98 (m, 6H) ч/млн.

ПРИМЕР 12

Линкер-полезная нагрузка LP13 и LP14

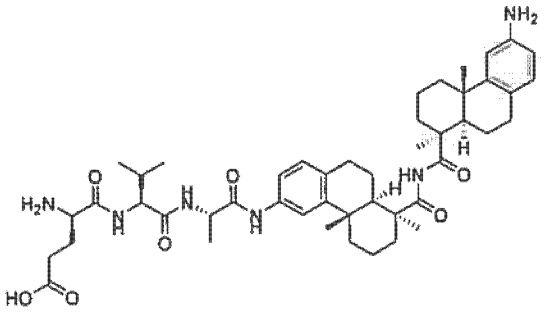
[00344] Этот пример демонстрирует методы синтеза соединений линкер-полезная нагрузка **LP13** и **LP14** в таблице 2 выше. Этот пример относится к соединениям под номерами **102a**, **127a/b**, **128a/b**, **107** и соединениям линкер-полезная нагрузка **LP13** и **LP14** на ФИГ. 9A.

(4S)-4-амино-4-{[(1S)-1-{[(1S)-1-{[(4bS,8S,8aR)-8-({[(1S,4aS,10aR)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}-карбонил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} этил] карбамоил} -2- метилпропил] карбамоил} бутановая кислота (128a)



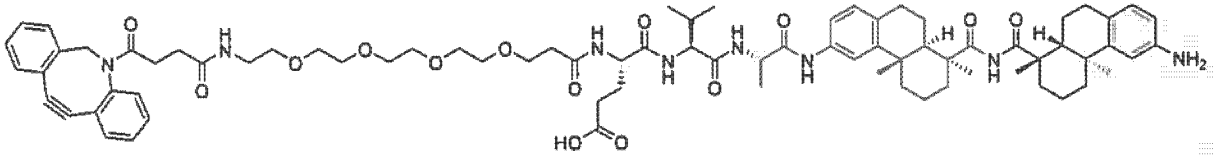
[00345] Раствор соединения **127a** (6,4 мг, 21 мкмоль) и HATU (8,0 мг, 21 мкмоль) в DMF (2,0 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут перед добавлением соединения **102a** (14 мг, 17,5 мкмоль) и DIPEA (6,8 мг, 52,5 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа, что контролировали с помощью ЖХМС. Смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрил в воде) с получением защищенного **128a** (12 мг) в виде белого твердого вещества, которое растворяли в DCM (4 мл). К перемешиваемому раствору добавляли TFA (0,5 мл), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в водном бикарбонате аммония (10 мМ)) с получением соединения **128a** (7,1 мг, выход 49%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 827,5 (M + 1)+.

(4R)-4-амино-4-карбонил){[(1S)-1-{[(1S)-1-{[(4bS,8S,8aR)-8-({[(1S,4aS,10aR)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}-4b,8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} этил] карбамоил}-2-метилпропил] карбамоил} бутановая кислота (128b)



[00346] Следуя аналогичной процедуре для **128a**, за исключением замены **127b** соединением **127b**, получали соединение **128b** (16 мг, выход 56%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 827,5 (M + 1)+.

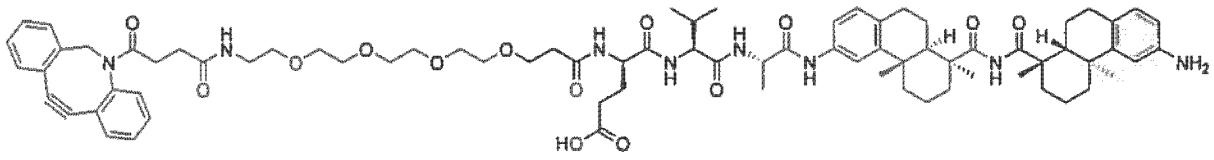
(4S)-4- [1- (4-{2-азатрицикло[10.4.0.04,9]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо] -4-карбонил{[(1S)-1-{[(1S)-1-{[(4bS,8S,8aR)-8-({[(1S,4aS,10aR)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо})-4b, 8-диметил-4b, 5,6, 7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} этил] карбамоил} -2-метилпропил] карбамоил} бутановая кислота (LP13)



[00347] К смеси соединения **128a** (7,1 мг, 8,6 мкмоль) в DMF (2,0 мл) добавляли соединение **107** (5,6 мг, 8,6 мкмоль) и DIPEA (3,3 мг, 26 мкмоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение час, за которым наблюдали с помощью ЖХМС. Полученную смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в водном бикарбонате аммония (10 мМ)) с получением соединения линкер-полезная нагрузка **LP13** (5,5 мг, выход 47%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 681.6 $(M/2 + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.75 (dd, J = 12, 0.6 Гц, 1H), 8.31 (dd, J = 12, 3.5 Гц, 1H), 8.19 (dd, J = 7.5, 2.1 Гц, 1H), 8.16-8.08 (m, 2H), 7.82-7.70 (m, 2H), 7.68 (dd, J = 7.5, 1.1 Гц, 1H), 7.64-7.59 (m, 1H), 7.56-7.44 (m, 4H), 7.41-7.27 (m, 4H), 6.96 (dd, J = 8.8, 3.2 Гц, 1H), 6.68 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 6.47 (d, J = 1.8 Гц, 1H), 6.33 (dd, J = 8.1, 2.1 Гц, 1H), 5.02 (d, J = 14.0 Гц, 1H), 4.43-4.26 (m, 3H), 4.22-4.08 (m, 2H), 3.62-3.55 (m, 3H), 3.51-3.42 (m, 12H), 3.30-3.20 (m, 2H),

3.12-2.84 (m, 3H), 2.80-2.55 (m, 4H), 2.47-2.10 (m, 12H), 2.04-1.52 (m, 13H), 1.37-1.23 (m, 10H), 1.17-1.08 (m, 2H), 0.99 (d, *J* = 7.7 Гц, 6H), 0.88-0.78 (m, 6H) ч/млн.

(4R)-4- [1- (4-{2-азатрицикло[10.4.0.04,9]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо] -4-карбонил{[(1S)-1-{[(1S)-1-{[(4bS,8S,8aR)-8-({[(1S,4aS,10aR)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо})-4b, 8-диметил-4b, 5,6, 7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} этил] карбамоил} -2-метилпропил] карбамоил} бутановая кислота (LP14)



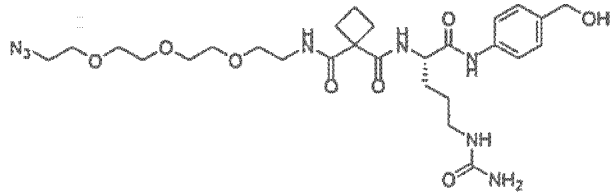
[00348] Следуя аналогичной процедуре для **LP13**, за исключением замены **P128b** на **128a**, было получено соединение линкер-полезная нагрузка **LP14** (10 мг, выход 76%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 681.5 $(M/2 + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.79 (br, 1H), 9.35 (s, 1H), 8.28-8.23 (m, 1H), 8.21 (d, *J* = 6.6 Гц, 1H), 8.17-8.13 (m, 1H), 8.12-8.03 (m, 2H), 8.02-7.95 (m, 1H), 7.76 (t, *J* = 5.8 Гц, 1H), 7.67 (dd, *J* = 7.3, 1.1 Гц, 1H), 7.64-7.60 (m, 1H), 7.51 (dd, *J* = 5.0, 1.9 Гц, 1H), 7.49-7.42 (m, 3H), 7.40-7.31 (m, 3H), 7.29 (dd, *J* = 7.4, 1.5 Гц, 1H), 6.95 (dd, *J* = 8.2, 4.7 Гц, 1H), 6.68 (d, *J* = 8.2 Гц, 1H), 6.48 (d, *J* = 2.1 Гц, 1H), 6.33 (dd, *J* = 7.9, 2.1 Гц, 1H), 5.02 (d, *J* = 14.0 Гц, 1H), 4.40-4.30 (m, 2H), 4.20-4.12 (m, 1H), 3.62-3.49 (m, 4H), 3.45-3.33 (m, 12H), 3.33-3.28 (m, 2H), 3.12-3.05 (m, 2H), 2.92-2.85 (m, 1H), 2.81-2.73 (m, 2H), 2.69-2.63 (m, 1H), 2.61-2.54 (m, 1H), 2.43-2.20 (m, 7H), 2.20-1.95 (m, 6H), 1.91-1.70 (m, 6H), 1.68-1.50 (m, 5H), 1.34-1.22 (m, 10H), 1.18-1.08 (m, 2H), 1.03-0.96 (m, 6H), 0.90 (d, *J* = 6.8 Гц, 2H), 0.86-0.80 (m, 4H) ч/млн.

ПРИМЕР 12A

Линкер-полезная нагрузка LP15

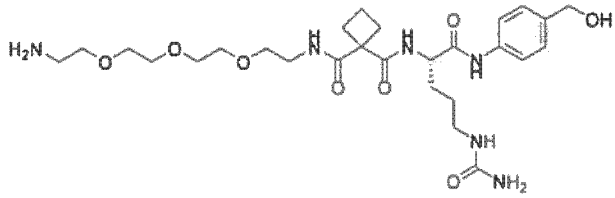
[00349] Этот пример демонстрирует методы синтеза линкера-полезной нагрузки **LP15** в Таблице 2 выше. Этот пример относится к соединениям под номерами **129**, **130**, **131**, **132**, **133**, **Ser-P1** и соединению линкер-полезная нагрузка **LP15** на ФИГ. 9B. Соединение **129** синтезировали согласно WO 2015/095124 A1.

1-N- (2-{2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси}этил)-1-N '- [(1S)-4- (карбамоиламино)-1-бутил{[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил}] циклобутан-1,1-дикарбоксамид (130)



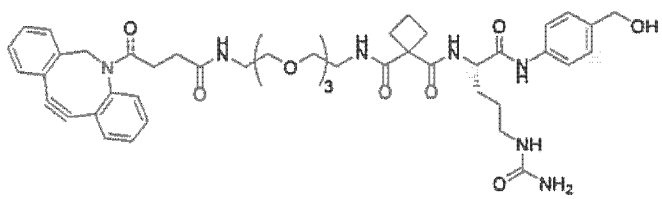
[00350] К раствору соединения **129** (0,18 г, 0,44 ммоль) в сухом DMF (6 мл) добавляли амино-PEG3-азид (0,10 г, 0,46 ммоль) и EDCI (0,13 г, 0,65 ммоль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 часов. Полученную смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрил в воде) с получением соединения **130** (0,19 г, выход 70%) в виде не совсем белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 607,3 $(M + 1)^+$.

1-N- (2-{2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]этокси}этил)-1-N'- [(1S)-4-(карбамонламино)-1-{[4-(гидроксиметил)фенил]карбамонл}бутил] циклобутан-1,1-дикарбоксамид (131)



[00351] К раствору соединения **130** (0,18 г, 0,30 ммоль) в метаноле (10 мл) добавляли 10% палладий на угле (20 мг) в атмосфере азота. Смесь дегазировали и продували водородом 3 раза, а затем перемешивали при комнатной температуре под водородом в течение 20 часов. Полученную смесь фильтровали через целит, и фильтрат концентрировали *в вакууме* с получением сырого соединения **131** (0,16 г, выход 92%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 581,4 $(M + 1)^+$.

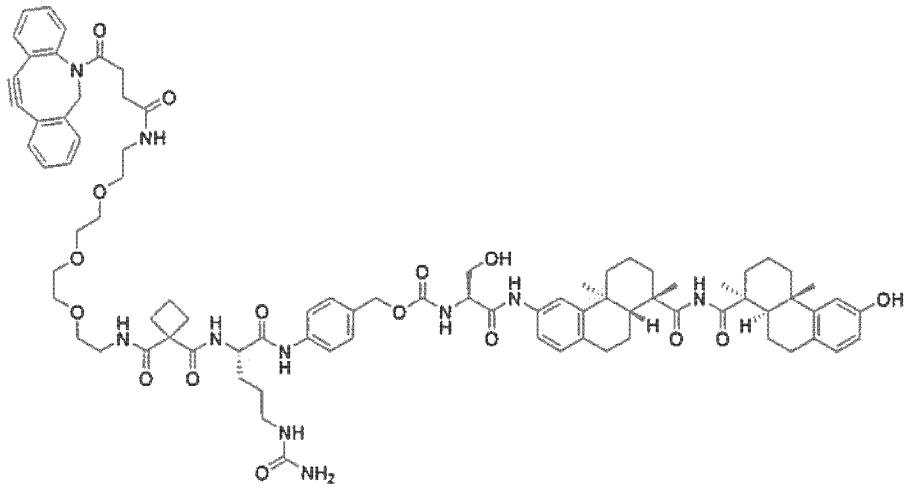
(2S)-2-[(1-{[2-(2-{2-[2-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1 (12), 4 (9), 5], 7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4-оксобутанамидо) этокси] этокси} этокси) этил] карбамонл} циклобутил) формамидо]-5-(карбамонламино)-N- [4- (гидроксиметил) фенил] пентанамид (133)



[00352] К раствору неочищенного соединения **131** (0,16 г, 0,28 ммоль) в DMF (4 мл) добавляли DIBAC-suc-OSu **132** (0,12 г, 0,30 ммоль) и DIPEA (0,2 мл, 0,83 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь непосредственно очищали с

помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрил в водном *бикарбонате* аммония (10 мМ)) с получением соединения **133** (50 мг, выход 21%) в виде желтого твердого вещества. ESI масса/заряд: 434.8 $(M/2 + 1)^+$.

{4-[(2S)-2-[(1-{[2-(2-{2-[2-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1 (12), 4 (9), 5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4-оксобутанамидо) этокси] этокси} этокси) этил] карбамоил} циклобутил) формамидо] -5- (карбамоиламино) пентанамидо] фенил} метил N - [(1S)-1-карбонил){[(4bS,8S,8aR)-8-({[(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} -2-гидроксиэтил] карбамат (LP15)



[00353] К раствору соединения **133** (50 мг, 58 мкмоль) в сухом DMF (3 мл) последовательно добавляли бис (4-нитрофенил) карбонат (PNPC) (35 мг, 0,12 ммоль) и DIPEA (45 мкл, 0,17 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрил в воде). Раствор лиофилизировали с получением желтого твердого вещества, 16 мг которого (16 мкмоль) растворяли в DMF (5 мл). К раствору добавляли **Px2** (**Ser-P1**, о котором сообщалось в WO 2018/213082 A1, включенном в настоящий документ посредством ссылки) (10 мг, 16 мкмоль) и DIPEA (10 мкл, 64 мкмоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, что контролировали с помощью ЖХМС. Смесь непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (метод B), получая соединение линкер-полезная нагрузка **LP15** (4,0 мг, выход 16% от **Px2**) в виде оранжевого твердого вещества. ESI масса/заряд: 755.5 $(M/2 + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ δ 10.0 (s, 1H), 9.84 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.89-7.84 (m, 2H), 7.78-7.75 (tm, 1H), 7.68-7.65 (m, 1H), 7.62-7.60 (m, 3H), 7.54 (s, 1H), 7.50-7.44 (m, 3H), 7.39-7.22 (m, 10H), 6.96 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.81 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.67 (br s, 1H), 6.63 (d, J = 2.0 Гц, 1H), 6.50 (dd, J = 2.0 Гц, 8.0 Гц, 1H), 6.04-6.02 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.32 (t, J = 4.8

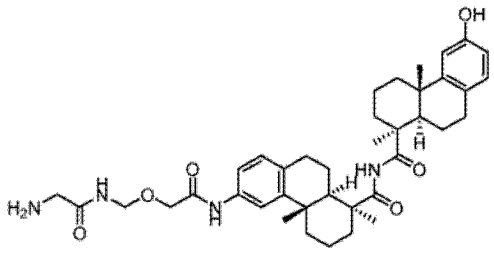
Гц, 2H), 5.04-4.95 (m, 3H), 4.44-4.37 (m, 1H), 4.20-4.15 (m, 1H), 3.71-3.62 (m, 2H), 3.53-3.48 (m, 12H), 3.34-3.25 (m, 2H), 2.47-2.37 (m, 3H), 2.16-2.13 (m, 4H), 2.03-1.95 (m, 8H), 1.79-1.71 (m, 4H), 1.66-1.54 (m, 6H), 1.49-1.42 (m, 4H), 1.27-1.26 (m, 8H), 1.00 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.87-0.83 (m, 6H) ч/млн.

ПРИМЕР 12B

Полезная нагрузка P18; и линкер-полезная нагрузка LP17 и LP18

[00354] В этом примере демонстрируются методы синтеза полезной нагрузки **P18** в таблице 1 выше и соединений линкер-полезная нагрузка **LP17** и **LP18** в таблице 2 выше. Этот пример относится к соединениям с номерами **134**, **P1**, **P18**, **112**, **135** и линкеру-полезной нагрузке **LP17** и **LP18** на ФИГ. 9C. Соединение **134** синтезировали согласно WO 2015/155998 A1.

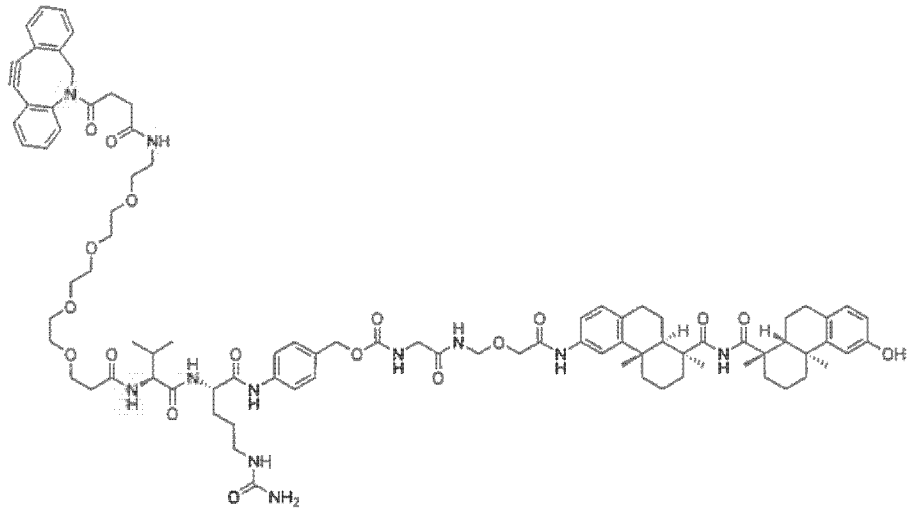
(1S, 4aS, 10aR)-N-[(1S, 4aS, 10aR){2-[(2-аминоацетамидо)метокси]ацетамидо}-6-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил] -6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (P18)



[00355] К раствору соединения **134** (42 мг, 0,11 ммоль) в DMF (5 мл) добавляли HATU (79 мг, 0,21 ммоль) и DIPEA (54 мг, 0,44 ммоль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут перед добавлением полезной нагрузки **P1** (63 мг, 0,12 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (метод B) с получением **Fmoc-P18** (47 мг, ESI масса/заряд: 895,4 $(M + 1)^+$), который растворяли в DMF (5 мл). К раствору добавляли пиперидин (13 мг, 0,15 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до полного удаления Fmoc, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (метод B) с получением соединения **P18** (34 мг, выход 47%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 673.5 $(M + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.54 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.85 (br s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.59 (d, J = 1.5 Гц, 1H), 7.45 (dd, J = 8.4, 1.5 Гц, 1H), 6.97 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.82 (d, J = 8.4 Гц, 1H), 6.63 (d, J = 2.2 Гц, 1H), 6.50 (dd, J = 8.4, 2.2 Гц, 1H), 4.66 (d, J =

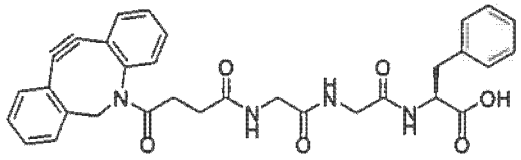
1.6 Гц, 2H), 4.00 (s, 2H), 3.14 (s, 2H), 2.94-2.64 (m, 4H), 2.35-2.32 (m, 1H), 2.32-2.22 (m, 2H), 2.22-2.09 (m, 4H), 1.95-1.78 (m, 4H), 1.68-1.52 (m, 4H), 1.36-1.28 (m, 2H), 1.28 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.20-1.09 (m, 2H), 1.01 (s, 3H), 0.99 (s, 3H) ч/млн.

{4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1 (12), 4 (9), 5,7, 13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо] -3-метилбутанамидо]-5-(карбамонламино) пентанамидо] фенил} метил *N*-({[({[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9, 10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил] карбамоил} -4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамоил} метокси) метил] карбамоил} метил) карбамат (LP17)



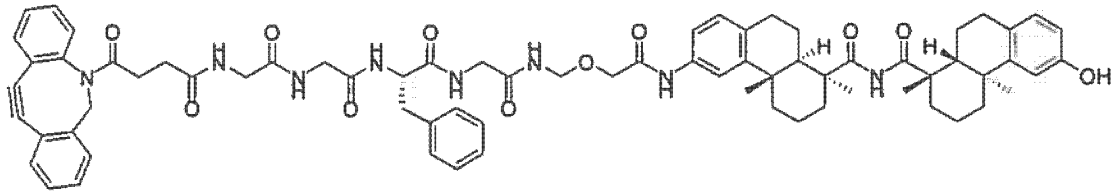
[00356] К раствору соединения **P18** (16 мг, 24 мкмоль) в DMF (5 мл) добавляли соединение **112** (26 мг, 24 мкмоль) и DIPEA (6,2 мг, 0,048 ммоль) при 25 °C. Смесь перемешивали при 25 °C в течение ночи, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (метод B), получая линкер-полезную нагрузку **LP17** (20 мг, выход 53%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 807 $(M/2 + 1)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.00 (s, 1H), 9.53 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.92-8.83 (m, 1H), 8.19-8.07 (m, 2H), 7.88 (d, J = 8.1 Гц, 1H), 7.77 (t, J = 5.6 Гц, 1H), 7.68 (d, J = 6.0 Гц, 1H), 7.64-7.56 (m, 4H), 7.53-7.25 (m, 9H), 6.96 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.81 (d, J = 8.3 Гц, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.50 (d, J = 7.9 Гц, 1H), 6.02-5.94 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.02 (d, J = 14 Гц, 1H), 4.95 (s, 2H), 4.65 (d, J = 6.5 Гц, 2H), 4.43-4.32 (m, 1H), 4.26-4.19 (m, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.70-3.54 (m, 5H), 3.50-3.41 (m, 12H), 3.31-3.26 (m, 1H), 3.13-2.54 (m, 8H), 2.41-2.08 (m, 11H), 2.06-1.52 (m, 14H), 1.47-1.08 (m, 12H), 1.00 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.86 (d, J = 6.8 Гц, 3H), 0.82 (d, J = 6.8 Гц, 3H) ч/млн.

(2*S*)-2-{2-[2-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1 (12), 4 (9), 5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4-оксобутанамидо) ацетамидо] ацетамидо} -3-фенилпропановая кислота (135)



[00357] К раствору пептида Gly-Gly-Phe (65 мг, 0,16 ммоль) в DMF (5 мл) добавляли соединение **132** (56 мг, 0,16 ммоль) и DIPEA (63 мг, 0,49 ммоль), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, что контролировали с помощью ЖХМС. Смесь непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (метод B) с получением соединения **135** (58 мг, выход 64%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 567 $(M + 1)^+$.

(1*S*,4a*S*,10a*R*)-*N*-[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-[2-({2-[(2*S*)-2-{2-[2-(4-{2-Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1 (12), 4 (9), 5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил} -4-оксобутанамидо) ацетамидо] ацетамидо} -3-фенилпропанамидо] ацетамидо } метокси) ацетамидо] -1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил] -6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3, 4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (LP18)



[00358] К раствору соединения **135** (8,5 мг, 15 мкмоль) в DMF (5 мл) добавляли HATU (11 мг, 30 мкмоль) и DIPEA (7,7 мг, 60 мкмоль), и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут перед добавлением соединения **P18** (10 мг, 15 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов, что контролировали с помощью ЖХМС. Полученную смесь непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (метод B), получая линкер-полезную нагрузку **LP18** (8,4 мг, выход 46%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 635 $(M - M_{P17})^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.53 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.70 (d, J = 5.2 Гц, 1H), 8.36 (d, J = 5.0 Гц, 1H), 8.20-7.96 (m, 4H), 7.69-7.62 (m, 1H), 7.61-7.56 (m, 2H), 7.51-7.39 (m, 4H), 7.38-7.32 (m, 2H), 7.31-7.20 (m, 5H), 7.19-7.13 (m, 1H), 6.95 (d, J = 8.7 Гц, 1H), 6.82 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 6.63 (d, J = 2.2 Гц, 1H), 6.50 (dd, J = 8.2 и 2.2 Гц, 1H), 4.99 (dd, J = 13.9 и 1.9 Гц, 1H), 4.64 (d, J = 6.6 Гц, 2H), 4.51-4.43 (m, 1H), 4.00 (s, 2H), 3.80-3.66 (m, 3H), 3.62-3.56 (m, 3H), 3.08-

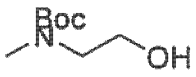
2.99 (m, 1H), 2.91-2.59 (m, 7H), 2.34-2.23 (m, 3H), 2.20-2.10 (m, 4H), 2.08-2.00 (m, 1H), 1.95-1.72 (m, 5H), 1.67-1.51 (m, 4H), 1.27 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.25-1.22 (m, 2H), 1.17-1.08 (m, 2H), 0.99 (s, 3H), 0.98 (s, 3H) ч/млн.

ПРИМЕР 12C

Линкер-полезная нагрузка LP19

[00359] Этот пример демонстрирует методы синтеза линкера-полезной нагрузки **LP19** в Таблице 2 выше. Этот пример относится к соединениям с номерами **136-138**, **140**, **P15**, **141-143**, **106**, **116** и линкеру-полезной нагрузке **LP19** на ФИГ. 9D.

***трет*-Бутил2-гидроксиэтил (метил) карбамат (137)**



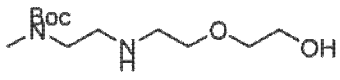
[00360] К смеси соединения **136** (3,8 г, 50 ммоль) в DCM (90 мл) по каплям добавляли раствор Boc_2O (11 г, 52 ммоль) в DCM (10 мл) при 0 ° C. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь дважды промывали рассолом и органический раствор концентрировали *в вакууме*, получая соединение **137** (8,5 г, выход 97%) в виде бесцветного масла. ESI масса/заряд: 198 $(M + Na)^+$.

***трет*-Бутилметил(2-оксоэтил) карбамат (138)**



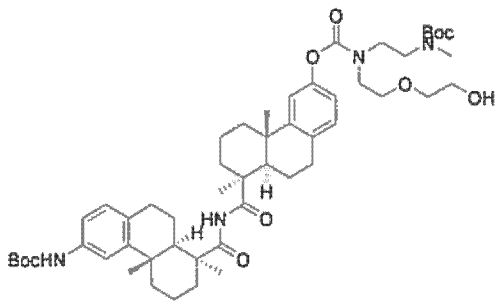
[00361] К раствору соединения **137** (4,4 г, 25 ммоль) в сухом DCM (50 мл) добавляли порциями пероксид Десса-Мартина (12 г, 25 ммоль) при 0 °C. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и гасили *насыщ. водн.* бикарбонатом натрия и *насыщ. водн.* тиосульфатом натрия. Погашенную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 0,5 часа. Органический раствор собирали и промывали *нас. водн.* бикарбонатом натрия, сушили над сульфатом магния и концентрировали *в вакууме*, получая неочищенный продукт **138**, который очищали флэш-хроматографией (12-18% ацетат в петролейном эфире, детектируемый ТСХ с использованием PMA) с получением соединения **138** (2,6 г, выход 60%) как светло-желтого масла. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 9.48(d, J = 8.4 Гц, 1H), 4.03 (br, 2H), 2.85 (s, 3H), 1.41 (s, 9H) ч/млн.

***трет*-Бутил2-(2- (2-гидроксиэтокси) этиламино) этил (метил) карбамат (140)**



[00362] Смесь соединения **138** (2,6 г, 15 ммоль) и соединения **139** (1,7 г, 16 ммоль) в сухом метаноле (20 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов перед тем, как в смесь порциями добавляли боргидрид натрия (1,1 г, 30 ммоль) при 0 °C. Смесь медленно нагревали до комнатной температуры и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь гасили холодной водой и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали флэш-хроматографией (0-100% метанол в DCM) с получением соединения **140** (2,4 г, выход 61%) в виде желтого масла. ESI масса/заряд: 263.1 $(M + H)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 3.50-3.43 (m, 4H), 3.41-3.38 (m, 2H), 3.21 (t, J = 6.4 Гц, 2H), 2.78 (s, 3H), 2.69-2.63 (m, 4H), 2.08 (s, 1H), 1.39 (s, 9H) ч/млн.

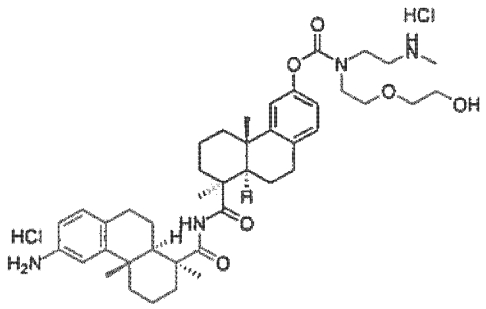
***трет*-Бутил *N*-[(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-{[(2-{[(*трет*-бутокси) карбонил] (метил) амино} этил) [2- (2-гидроксиэтокси) этил] карбамоил] окси} -1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил] формамидо} карбонил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил] карбамат (141)**



[00363] К раствору полезной нагрузки **P15** (0,44 г, 0,70 ммоль) в сухом DCM (15 мл) добавляли триэтиламин (0,21 г, 2,1 ммоль) и раствор 4-нитрофенилхлорформиата (0,15 г, 0,74 ммоль) в сухом DCM (5 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1,5 часов, что контролировали с помощью ЖХМС. Смесь концентрировали *в вакууме* с получением сырого сложного эфира PNP (0,58 г), который растворяли в DCM (15 мл). К раствору добавляли HOBt (19 мг, 0,14 ммоль) и раствор соединения **140** (0,32 г, 1,2 ммоль) в DCM (5 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов до завершения реакции в соответствии с ЖХМС. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом, промывали водой и рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали *в вакууме*. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрил в *води.* TFA (0,01%)) с получением соединения **141** (0,50 г, выход 78%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 940.5 $(M + Na)^+$.

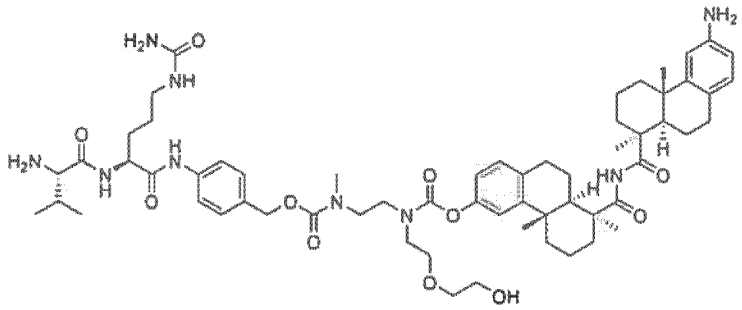
(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-

октагидрофенантрен-3-ил 2- (2-гидроксиэтокси) этил (2- (метиламино) этил) карбамат (142)



[00364] К раствору соединения **141** (0,30 г, 0,33 ммоль) в ацетонитриле (5 мл) добавляли раствор HCl в диоксане (4 N, 3 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Boc согласно ЖХМС. Летучие вещества удаляли и остаток очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в воде) с получением соединения **142** в виде соли HCl (0,19 г, выход 73%) в виде белого твердого вещества, которое не было стабильным даже в щелочном буфере (pH > 7). ESI масса/заряд: 717.2 $(M + H)^+$.

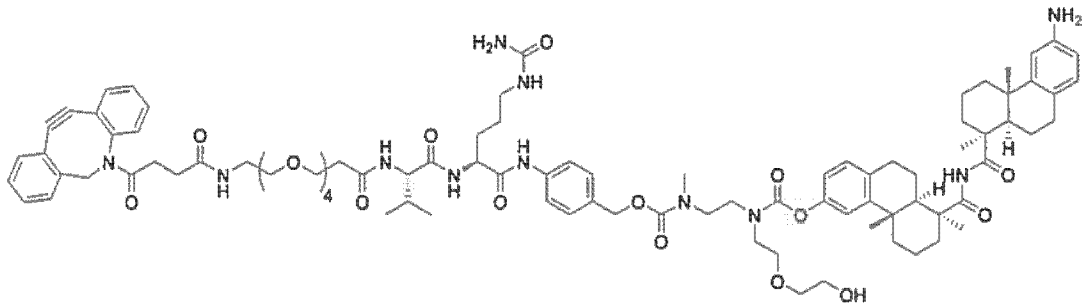
(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-(((1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1- карбонил) карбамоил)-4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил (2-((((4-((*S*)-2-((*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-урендопентанамидо) бензил) окси) карбонил) (метил) амино) этил) (2- (2-гидроксиэтокси) этил) карбамат (143)



[00365] К смеси свежесинтезированного соединения **142** (35 мг, 49 мкмоль) в сухом DMF добавляли триэтиламин (15 мг, 0,15 ммоль), HOBt (7,0 мг, 49 мкмоль) и раствор Fmoc-vcPAB-PNP (**116**, 35мг, 45 мкмоль) в сухом DMF (5 мл) последовательно при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. К реакционной смеси добавляли пиперидин (13 мг, 0,15 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов до полного удаления Fmoc в соответствии с ЖХМС. Реакционную смесь непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (5-95% ацетонитрила в *водном* бикарбонате аммония (10 мМ)) с

получением соединения **143** (62 мг, выход 58%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1145.6 $(M + Na)^+$.

(4b*S*,8*S*,8a*R*)-8-{[(1*S*,4a*S*,10a*R*)-6-амино-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a, 9,10,10a-октагидрофенантрен-1- карбонил] карбамоил} -4b, 8-диметил-4b, 5,6,7,8,8a, 9,10-октагидрофенантрен-3-ил *N*-(2-{[({4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-азатрицикло [10.4.0.0^{4},^{9}] гексадека-1 (12), 4 (9), 5,7,13,15-гексаен-10-ин)-2-ил} -4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо] -3-метилбутанамидо] -5- (карбамоиламино) пентанамидо] фенил} метокси) карбонил] (метил) амино} этил)-*N*-[2- (2-гидроксиэтокси) этил] карбамат (LP19)



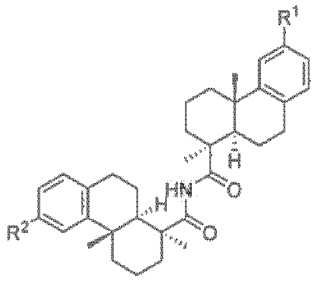
[00366] К раствору соединения **143** (30 мг, 27 мкмоль) в сухом DMF (5 мл) добавлялипоследовательно DIBAC-Suc-PEG_4-OSu (**107**, 21мг, 30 мкмоль) и DIPEA (10 мг, 78 мкмоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь очищали непосредственно с помощью препаративной ВЭЖХ (метод B) с получением соединения **LP19** (15 мг, выход 34%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 829.0 $(M/2 + H)^+$. ^{1}H ЯМР (400 МГц, $DMSO_{d6}$) δ 10.00 (br, 1H), 8.13-8.10 (m, 2H), 7.88-7.86 (m, 1H), 7.78-7.74 (m, 1H), 7.69-7.66 (m, 1H), 7.62-7.44 (m, 6H), 7.39-7.28 (m, 4H), 7.22-7.20 (m, 1H), 6.99-6.97 (m, 2H), 6.75-6.74 (m, 1H), 6.69-6.66 (m, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.35-6.32 (m, 1H), 5.97-5.96 (m, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.04-4.92 (m, 3H), 4.69 (s, 2H), 4.60-4.58 (m, 1H), 4.39-4.35 (m, 1H), 4.30-4.20 (m, 1H), 3.62-2.53 (m, 39H), 2.40-1.36 (m, 25H), 1.27-1.25 (m, 8H), 1.14-1.11 (m, 2H), 0.99-0.97 (m, 6H), 0.87-0.81 (m, 7H) ч/млн.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 13

[00367] Структуры, рассчитанные значения LogP, результаты МС и ВЭЖХ для вышеуказанных полезных соединений суммированы в таблице 3.

Таблица 3 Химико-физические свойства полезных нагрузок



Соединение	R1	R2	cLogP	МС (M+H)	ВЭЖХ	
					Чистота (%)	удержания
P1	OH	NH_2	+++	529,3	95	8,66
P2	NH_2	NH_2	+++	528,2	95	9,11
P3	NH_2	NBn_2	+++	354.8 (M/2+H)	95	8,87
P4	NH_2	$NHC(O)CH_2NH_2$ (Gly)	++	585,4	98	8,20
P5	NH_2	NHC(O)(S)-$CH(CH_2OH)NH_2$ (Ser)	++	615,4	100	7,86
P6	NH_2	$NHC(O)CH((CH_2)_4NH_2)NH_2$ (Lys)	+++	656,5	100	8,89
P7	NH_2	$NHC(O)CH(CH_2CO_2H)NH_2$ (Asp)	+	643,4	100	6,64
P8	NH_2	$NHC(O)CH(CH_2CH_2COOH)NH_2$ (Glu)	+	657,4	97	6,69
P9	NH_2	NHC(O)CH(CH_2-имидазол)NH_2 (His)	++	665,3	97	5,94
P10	$NHC(O)CH_2NH_2$ (Gly)	$NHC(O)CH(CH_2CH_2COOH)NH_2$ (Glu)	+	714,5	100	6,12

Соединение	R1	R2	cLogP	МС (M+H)	ВЭЖХ	
					Чистота (%)	удержания
P11	$NHC(O)CH(CH_2CH_2COOH)NH_2$ (Glu)	$NHC(O)CH(CH_2CH_2COOH)NH_2$ (Glu)	+	393.8 (M/2+H)	100	5,45
P12	NH_2	$NHC(O)CH(CH_3)NHC(O)CH(CH_2CH_2COOH)NH_2$ (AlaGlu)	+	728,5	100	6.61, 6.67
P13	NH_2	$NHC(O)CH(CH_3)NH_2$ (Ala)	+++	599,5	100	5,21
P14	NH_2	$NHC(O)CH_2OH$	++	586,3	100	8,26
P15	OH	$NHC(O)O^tBu$ (Boc)	+++	629,4	100	9,78
P16	OH	$NHC(O)CH(CH_3)NHC(O)CH(CH_2CH_2COOH)NH_2$ (AlaGlu)	+	729,5	98	6,62
P17	OH	$NHC(O)CH_2OH$	+++	587,3	97	8,17
P18	OH	$NHC(O)CH_2OCH_2NHC(O)CH_2NH_2$	++	673,3	98	7,83
P19	OH	NH_2	+++	545,3	99	6,54

$6 < +++ < 12$; $4 < ++ \leq 6$; $0 < + < 4$

ПРИМЕР 14

[00368] Молекулярные формулы, молекулярные массы, рассчитанные значения LogP, результаты МС и ВЭЖХ для указанных выше соединений линкер-полезная нагрузка суммированы в таблице 4.

Таблица 4 Химико-физические свойства полезных нагрузок

Соединение	MF	м.м.	cLogP	Чистота (%)	МС масса/заряд (100%)	самое высокое отношение МС масса/заряд	Время удержания ВЭЖХ (мин)
LP1	$C_{124}H_{176}N_{12}O_{43}$	2522,81	+	95	841.7 [M/3+H]	1262.0 [M/2+H]	7.93 (B)
LP2	$C_{127}H_{182}N_{14}O_{44}$	2608,87	+	100	870.3 [M/3+H]	870.3 [M/3+H]	7.35 (B)
LP3	$C_{101}H_{143}N_{13}O_{22}S$	1923,36	+++	100	641.8 [M/3+H]	962.5 [M/2+H]	6.20 (B)
LP4	$C_{104}H_{149}N_{15}O_{23}S$	2009,45	++	99	670.5 [M/3+H]	1004.9 [M/2+H]	5.94 (B)
LP5	$C_{100}H_{138}N_{12}O_{24}$	1892,23	++	95	631.5 [M/3+H]	946.6 [M/2+H]	6.94 (B)
LP6	$C_{85}H_{109}N_{11}O_{15}$	1524,84	+++	96	763.0 [M/2+H]	763.0 [M/2+H]	8.63 (B)
LP7	$C_{74}H_{96}N_8O_{12}$	1289,60	+++	97	645.4 [M/2+H]	1290.7 [M+H] (23%)	8.67 (B)
LP8	$C_{137}H_{192}N_{16}O_{47}$	2815,07	+	99	939.2 [M/2+H]	939.2 [M/2+H]	7.60 (B)
LP9	$C_{89}H_{118}N_{12}O_{15}$	1595,96	+++	100	798.3 [M/2+H]	798.3 [M/2+H]	8.58 (B)
LP10	$C_{87}H_{111}N_{11}O_{17}$	1582,88	+++	97	528.4 [M/3+H]	792.0 [M/2+H]	7.11 (B)
LP11	$C_{88}H_{113}N_{11}O_{17}$	1596,90	+++	96	799.2 [M/2+H]	799.2 [M/2+H]	7.10 (B)
LP12	$C_{72}H_{91}N_7O_{13}$	1262,53	+++	100	631.8 [M/2+H]	631.8 [M/2+H]	7.51 (B)
LP13	$C_{77}H_{100}N_8O_{14}$	1361,69	+++	100	681.6 [M/2+H]	681.6 [M/2+H]	7.12 (B)
LP14	$C_{77}H_{100}N_8O_{14}$	1361,69	+++	100	681.5 [M/2+H]	681.5 [M/2+H]	7.66 (B)
LP15	$C_{84}H_{104}N_{10}O_{16}$	1509,81	+++	96	755.5 [M/2+H]	755.5 [M/2+H]	8.26 (B)
LP16	$C_{72}H_{90}N_6O_{14}$	1263,54	+++	100	632.5 [M/2+H]	632.5 [M/2+H]	7.45 (B)

Соединение	MF	м.м.	cLogP	Чистота (%)	МС масса/заряд (100%)	самое высокое отношение МС масса/заряд	Время удержания ВЭЖХ (мин)
LP17	$C_{88}H_{113}N_{11}O_{18}$	1612,90	+++	97	807.0 [M/2+H]	807.0 [M/2+H]	8.29 (B)
LP18	$C_{71}H_{80}N_8O_{11}$	1221,44	+++	100	635,2 [полезная нагрузка M]	635,2 [полезная нагрузка M]	8.88 (B)
LP19	$C_{91}H_{121}N_{11}O_{18}$	1657,00	+++	100	829.3 [M/2+H]	829.3 [M/2+H]	8.66 (B)
LP20	$C_{106}H_{151}F_3N_{14}O_{21}$	2014,45	+	>95	950.8 [M/2]	950.8 [M/2]	6.54 (A)

$6 < +++ < 12$; $4 < ++ < 6$; $-2 < + \leq 4$

ПРИМЕР 15

[00369] Активность определенных полезных нагрузок агонистов печеночного рецептора X (LXR), описанных в настоящем документе, оценивали с помощью клеточного анализа репортерного гена люциферазы, чувствительной к LXR. Для создания линии клеток для анализа в клетки THP1 трансдуцировали LXR-регулируемый репортерный ген люциферазы [Cignal Lenti LXR Reporter (luc) kit (Qiagen, кат. № CLS-001L)] и клетки отбирали в течение двух недель в пуромицине. Лентивирус экспрессирует ген люциферазы светлячка под контролем минимального промотора CMV и тандемных повторов элемента транскрипционного ответа LXR. Полученная клеточная линия упоминается как клетки THP1/LXR-Luc. Для анализа клетки THP1/LXR-Luc высевали на 96-луночные планшеты при 40000 клеток/лунку в среде, содержащей RPMI, дополненную 10% FBS и пенициллин/стрептомицин, и затем дифференцировали с помощью 200 нМ форболмиристацетата (PMA) в течение 3 дней. Затем среду удаляли и заменяли 80 мкл свежей среды без PMA. Были приготовлены трехкратные серийные разведения свободных полезных нагрузок в 100% DMSO, перенесены в свежую среду и 20 мкл добавлены к клеткам при конечной постоянной концентрации DMSO 0,2% и свободные полезные нагрузки при конечных концентрациях в диапазоне от 100 нМ до 0,015 нМ. Последняя лунка в планшете служила в качестве холостого контроля, содержащего только среду и 0,2% DMSO (необработанная лунка), и была нанесена на график как продолжение 3-кратного серийного разведения. Через сорок восемь часов активность люциферазы

определяли после добавления реагента One-Glo™ (Promega, кат. № E6130) в каждую лунку. Относительные световые единицы (RLU) измеряли на люминометре Victor (PerkinElmer), а значения EC_{50} определяли с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по кривой отклика на дозу из 10 точек (GraphPad Prism). Значение EC_{50} для каждой протестированной молекулы показано в таблице 1. Отношение сигнал/шум (S/N) определяли путем взятия отношения наивысшей RLU (интенсивность сигнала люминесценции в относительных единицах люминисценции) на кривой доза-ответ к RLU в необработанных лунках. Как показано в таблице 5, все тестируемые соединения полезной нагрузки увеличивали LXR-зависимую люциферазную активность в клетках THP1/LXR-Luc со значениями EC_{50} в диапазоне от 112 пМ до 3,51 нМ и значениями S/N в диапазоне от 10,4 до 13,8.

Таблица 5: Активность LXR-репортерного гена по соединениям полезной нагрузки в дифференцированных клетках THP-1/LXR-Luc

Соединение полезной нагрузки	EC_{50} (M)	с/н
P1	1,14E-09	11,4
P2	2,92E-10	11,3
P4	1,25E-10	10,4
P6	3,34E-09	10,9
P5	1,74E-10	13,8
P7	2,53E-10	12,5
P9	2,34E-10	12,8
P8	3,51E-09	10,8
P10	2,22E-10	11,1
P12	2,96E-10	11,4
P11	1,12E-10	10,7

ПРИМЕР 16

[00370] Конъюгация через цистеины антитела выполняется в два этапа с использованием методов, аналогичных тем, которые описаны в *Mol. Pharm.* **2015**, 12 (6), 1863-71. В типовой процедуре моноклональное антитело (mAb) восстанавливается дитиотреитолом или TCEP. После гель-фильтрации к восстановленному антителу добавляют соответствующую линкерную нагрузку в растворе DMSO, и смесь доводят до

подходящего pH. Реакционной смеси дают перемешиваться. Полученный конъюгат очищают с помощью SEC. Значения DAR (УФ) определяют с использованием измеренных оптических плотностей ADC и коэффициентов экстинкции полезной нагрузки линкера антитела.

[00371] Сайт-специфическая конъюгация антител может быть выполнена, *например*, в два этапа: (1) микробная трансглютаминаза, *например*, (MTG EC 2.3.2.13, Zedira, Дармштадт, Германия) на основе ферментативного присоединения азидо-PEG-амина к сайту- специфически мутировавшее антитело и (2) присоединение предполагаемого линкера-полезной нагрузки к антителу, функционализированному азидо-PEG-амином, посредством [2+3] циклоприсоединения, *например*, 1,3-диполярного циклоприсоединения между азидогруппой функционализированного антитела и подходящим циклооктинный фрагмент полезной нагрузки линкера, *например*, щелочная химия без меди. См. Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. *PNAS* **2007**, 104 (43), 16793–7. Например, агликозилированное человеческое антитело IgG (IgG1, IgG4 и т. д.) или изотип человеческого IgG1 в BupH™ (pH 6,5–8,0) смешивают с ≥200 молярными эквивалентами азидо-dPEG$_3$-амина (MW = 218,26 г/моль). Полученный раствор смешивают с трансглютаминазой (25 Ед/мл; 5 Ед MTG на мг антитела, из Zedira, Дармштадт, Германия или Аджиномото, Япония), в результате чего конечная концентрация антитела составляет 0,5-5 мг/мл, и раствор выдерживают при pH 6,5–8,0, а затем инкубируют при 37 °C в течение 4–24 ч при осторожном встряхивании. За реакцией следят с помощью ESI-MS (тандемной масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением). По завершении реакции избыток амина и MTG удаляют с помощью SEC или колонки с белком A, элюируя кислотным буфером и затем нейтрализуя трис-буфером (pH 8), чтобы получить азидофункционализированное антитело. Этот продукт анализируется с помощью SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) и ESI. Азидо-dPEG$_3$-амин добавляет к двум сайтам - Q295 и Q297 - антитела, что приводит к увеличению на 804 Да для конъюгата 4DAR агликозилированное антитело-PEG$_3$-азид. Сайты конъюгации идентифицируются и подтверждаются в EEQ^{Линкер}YQ^{Линкер}STYR для азидофункционализированного антитела 4DAR посредством картирования пептидной последовательности тяжелых цепей, расщепленных трипсином.

[00372] В другом примере сайт-специфические конъюгаты лекарственного средства агликозилированного антитела с человеческим IgG (IgG1, IgG4 и т. д.), содержащим мутацию N297Q (нумерация EC), получают посредством клик-реакции [2+3] между

азидофункционализированными антителами с соединением линкер-полезная нагрузка, содержащим алкин. В частности, азидофункционализированное агликозилированное человеческое IgG1-антитело (mAb–PEG_3–N_3) конъюгировано с соответствующей нагрузкой линкера путем инкубации mAb–PEG_3–N_3 (1-3 мг/мл) в водной среде (например, PBS, PBS, содержащем 5% глицерина, HBS) с ≥6 молярными эквивалентами полезной нагрузки линкера, растворенного в подходящем органическом растворителе, таком как DMSO, DMF или DMA (т. е. реакционная смесь содержит 5-20% органического растворителя, об./об.), при температуре от 24 °C до 37 ° C в течение более 6 часов. За ходом реакции следят с помощью ESI-MS, и отсутствие mAb–PEG_3–N_3 указывает на завершение конъюгации. Избыточное количество полезной нагрузки линкера и органического растворителя удаляют с помощью SEC путем элюирования PBS или с помощью колонки с белком A, элюируя кислотным буфером с последующей нейтрализацией трис (pH 8). Очищенные конъюгаты анализируют методами SEC, SDS-PAGE и ESI-MS.

[00373] Конъюгаты антитело и антитело-лекарственное средство можно охарактеризовать с помощью SDS-PAGE, SEC и MS (ESI). В одном методе условия SDS-PAGE включали невосстановленные и восстановленные образцы (2-4 мкг) вместе с предварительно окрашенной белковой лестницей BenchMark (Invitrogen, кат. № 10748–010; партия № 1671922), загруженной на линию в (1,0 мм x 10 лунок) Novex 4-20% трис-глициновый гель и работали при 180 В, 300 мА, в течение 80 мин. Аналитический образец готовили с использованием SDX-буфера Novex Трис-Глицин (2X) (Invitrogen, кат. № LC2676), а восстанавливающий образец готовили с использованием буфера SDS для образцов (2X), содержащего 10% 2-мекаптоэтанол.

ПРИМЕР 16a

Клеточный анализ репортерного гена люциферазы, чувствительной к LXR

[00374] Описанные здесь агонисты LXR оценивали в клеточном анализе репортерной люциферазы, чувствительной к LXR. Для создания линии клеток для анализа в клетки THP1 трансдуцировали LXR-регулируемый репортерный ген люциферазы [Cignal Lenti LXR Reporter (luc) kit (Qiagen, кат. № CLS-001L)] и клетки отбирали в течение двух недель в пуромицине. Лентивирус экспрессирует ген люциферазы светлячка под контролем базального промотора и тандемных повторов элемента ответа транскрипции LXR. Полученная клеточная линия упоминается как клетки THP1/LXR-Luc. Для анализа клетки THP1/LXR-Luc высевали на 96-луночные планшеты при 40000 клеток/лунку в среде, содержащей RPMI, дополненную 10% FBS и пенциллин/стрептомицин, и затем

дифференцировали с помощью 200 нМ форболмиристацетата (PMA) в течение 3 дней. Затем среду удаляли и заменяли 80 мкл свежей среды без PMA. Были приготовлены трехкратные серийные разведения свободных полезных нагрузок в 100% DMSO, перенесены в свежую среду для выращивания и 20 мкл добавлены к клеткам при конечной постоянной концентрации DMSO 0,2% и свободные полезные нагрузки при конечных концентрациях в диапазоне от 100 нМ до 0,015 нМ. Последняя лунка в планшете служила в качестве холостого контроля, содержащего только среду и 0,2% DMSO (необработанная лунка), и была нанесена на график как продолжение 3-кратного серийного разведения. Через сорок восемь часов активность люциферазы определяли после добавления реагента One-Glo™ (Promega, кат. № E6130) в каждую лунку. Относительные световые единицы (RLU) измеряли на люминометре Envision (PerkinElmer), а значения EC_{50} определяли с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по кривой отклика на дозу из 10 точек (GraphPad Prism). Значение EC_{50} для каждой протестированной молекулы показано в таблице 5a. Отношение сигнал/шум (S/N) определяли путем взятия отношения наивысшей RLU (интенсивность сигнала люминесценции в относительных единицах люминисценции) на кривой доза-ответ к RLU в необработанных лунках. Как показано в Таблице 5a, агонисты LXR увеличивали LXR-зависимую активность люциферазы в клетках THP1/LXR-Luc со значениями EC_{50} в диапазоне от 78,8 пМ до 72,9 нМ и значениями S/N в диапазоне от 8,8 до 13,1.

Таблица 5a: Активность LXR-репортерного гена по агонистам LXR в дифференцированных клетках THP-1/LXR-Luc

Полезная нагрузка агониста LXR	**EC_{50} (M)**	**с/н**
P14	1,52E-10	10,8
P18	2,78E-09	11,5
P1	1,91E-10	11,9
P2	4,50E-10	13,1
P15	7,29E-08	8,8
P13	7,88E-11	11,9
P16	5,08E-10	11,5
P17	1,03E-09	12,5
P19	5,64E-10	11,4

ПРИМЕР 17

[00375] Несколько соединений линкер-полезная нагрузка (LP) были получены из соединений полезной нагрузки в таблице 1 и конъюгированы с антителом против MSR1 (H1H21234N-N297Q) или несвязывающим контролем с использованием методик, описанных в предыдущем примере. Полученные в результате конъюгаты агонистического антитела против MSR1 LXR-лекарственное средство (ADC) тестировали на активность в репортерном анализе THP1/LXRLuc, как описано выше для соединений полезной нагрузки. Как показано в таблице 6, все протестированные ADC агонистов против MSR1 LXR продемонстрировали стимуляцию клеток THP1/LXR-Luc со значениями EC_{50} в диапазоне от 414 пМ до 2,11 нМ и значениями S/N в диапазоне от 9,4 до 13,7. Неконъюгированное анти-MSR1 не влияло на активность LXR-Luc, а несвязывающееся контрольное антитело, конъюгированное с LP1 (контрольный ADC-LP1), имело значения EC_{50} > 100 нМ и максимальные значения S/N <5,0.

[00376] Антитело H1H21234N против MSR1 имеет HCVR согласно Ид. № последовательности: 2 и LCVR согласно Ид. № последовательности: 10. Он включает HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 согласно Ид. № последовательности: 4, 6, 8, 12, 14 и 16 соответственно. Полипептидные последовательности могут кодироваться полинуклеотидными последовательностями с Ид. № последовательности: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 и 15. N297Q указывает на то, что остаток 297 превращен из аспарагина (N) в глутамин (Q). Вся нумерация соответствует системе нумерации EC.

Таблица 6: Активность конъюгата агониста анти-MSR1-LXR в дифференцированных клетках THP-1/LXR-Luc

ADC, агонист анти-MSR1-LXR	LP агониста LXR	Полезная нагрузка агониста LXR	EC_{50} (M)	с/н
H1H21234N-N297Q-LP1	LP1	P2	7,38E-10	11,8
H1H21234N-N297Q- LP4	LP4	P2	9,23E-10	11,9
H1H21234N-N297Q-LP5	LP5	P2	1.20E-09	11,0
H1H21234N-N297Q-LP2	LP2	P2	8.68E-10	13,7
H1H21234N-N297Q-LP12	LP12	P2	1.30E-09	11,6
H1H21234N-N297Q-LP6	LP6	P4	6.85E-10	12,5

ADC, агонист анти-MSR1-LXR	LP агониста LXR	Полезная нагрузка агониста LXR	EC_{50} (M)	с/н
H1H21234N-N297Q-LP7	LP7	P4	5.60E-10	11,6
H1H21234N-N297Q-LP8	LP8	P4	6,19E-10	12,5
H1H21234N-N297Q-LP9	LP9	P6	4.14E-10	11,2
H1H21234N-N297Q-LP10	LP10	P6	9.60E-10	12,5
H1H21234N-N297Q-LP11	LP11	P8	9,78E-10	12,4
Неконъюгированный анти-MSR1	Н/Д	Н/Д	> 1.00E-07	0,8
Контроль ADC-LP1	LP1	P2	> 1.00E-07	4,4

ПРИМЕР 18

Характеристика ADC с помощью LC-ESI-MS (жидкостной хроматографии - ионизацией электроспреем - масс-спектрометрии)

[00377] Измерение неповрежденной массы образцов ADC с помощью LC-ESI-MS было выполнено для определения профиля распределения лекарственного вещества и полезной нагрузки и для расчета среднего DAR. Каждый тестируемый образец (20-50 нг, 5 мкл) загружали в колонку Acquity UPLC Protein BEH C4 (10 кПа, 300 Å, 1,7 мкм, 75 мкм × 100 мм; кат. № 186003810). После обессоливания в течение 3 минут белок элюировали и масс-спектры получали с помощью масс-спектрометра Waters Synapt G2-Si. Как показано в таблице 7, большинство сайт-специфичных ADC имеют 3,9 DAR для сайт-специфичных конъюгатов.

Таблица 7. Свойства ADC

№ LP	LXR (LP)	MW (LP)	MW (ESI-MS)	DAR (ESI-MS)
LP1	**DIBAC-Suc-PEG_4-D-Lys(COT-α-CyD)-VA-P2**	**2522,84**	**156687**	**3,6**
LP2	**DIBAC-Suc-PEG_4-D-Lys(COT-αCyD)-VC-P2**	**2608,93**	**157020**	**3,9**
LP3	**DIBAC-Suc-PEG_4-D-Lys(COT-PEG_4-AES)-VA-P2**	**1923,38**	**154277**	**3,9**
LP4	**DIBAC-Suc-PEG_4-D-Lys(COT-PEG_4-AES)-VC-P2**	**2009,50**	**154622**	**3,9**

№ LP	LXR (LP)	MW (LP)	MW (ESI-MS)	DAR (ESI-MS)
LP5	DIBAC-Suc-PEG$_4$-D-Lys(COT-глюкоза-глюкоза)-VA-P2	1892,26	154152	3,9
LP6	DIBAC-Suc-PEG$_4$-VA-P4	1285,64	151742	3,9
LP7	DIBAC-Suc-PEG$_4$-VC-PABC-P4	1524,88	152680	3,9
LP8	DIBAC-Suc-PEG$_4$-D-Lys(COT-αCyD)-VC-PABC-P4	2815,10	157859	3,8
LP9	DIBAC-Suc-PEG$_4$-VC-PABC-Lys-P2	1596,0	152979	3,9
LP10	DIBAC-Suc-PEG$_4$-VC-PABC-P7	1582,92	152915	3,8
LP11	DIBAC-Suc-PEG$_4$-VC-PABC-P8	1596,95	152977	3,9
LP12	DIBAC-Suc-PEG$_4$-EA-P2	1262,57	151642	3,9
LP16	DIBAC-Suc-PEG$_4$-EA-P1	1263,55	151645	3,9
LP19	DIBAC-Suc-PEG$_4$-VC-PABC-*N*-CH$_3$-*N*-PEG$_2$-EDC-P1	1657,04	153210	3,8

ПРИМЕР 19

Активация оттока холестерина в дифференцированных макрофагах THP1 конъюгатами антитело-лекарственное средство агониста LXR

[00378] Способность ADC агонистов против MSR1-LXR активировать отток холестерина в клеточной линии макрофагов человека (THP-1; № по каталогу ATTC TIB-202) оценивали с использованием флуоресцентного аналога холестерина. Для анализа клетки THP-1 высевали на 96-луночные планшеты, покрытые полилизином (Corning, каталожный № 354640), по 100000 клеток/лунку в среде RPMI 1640 (Irvine Scientific, каталожный № 9160), содержащей 10% FBS (Gibco, каталожный № 1043010), 10 мкг/мл пенициллин-стрептомицин (Gibco, каталожный № 15140122) в 5 % CO_2 при 37 °C. Клетки дифференцировали в макрофаги обработкой 100 нМ миристат 13-ацетата Phorbol-12 (Sigma, каталожный № P8139), который добавляли в среду (описанную выше) в течение 96 часов. Затем дифференцированные макрофаги инкубировали в среде RPMI 1640 без фенолового красного (Gibco, каталожный № 32404-014), содержащей 25 мкМ BODIPY-холестерина (Avanti Polar Lipids, каталожный № 810255P), 0,2% бычий сывороточный альбумин (BSA; № по каталогу Sigma A7211) и 10 мкг/мл пенициллин-стрептомицина в течение 24 часов с последующей 24-часовой обработкой серийными разведениями в диапазоне от $1x10^{-7}$ М до $5x10^{-17}$ М либо свободных полезных нагрузок (**P1** или **P2**), либо агонистов Ab-LXR против MSR1 ncADC (H1H21234N-N297Q-**29d1** и H1H21234N-N297Q-**LP1**) или агонист LXR изотипического контроля ncADC (изотипический контроль-N297Q-**LP1**) в среде RPMI 1640 без фенолового красного, содержащей 0,2% BSA. Клетки

промывали средой RPMI 1640 без фенолового красного и инкубировали со 100 мкл акцепторной среды, содержащей 50 мкг/мл липопротеина высокой плотности (Millipore, каталожный № 437641), 10 мкг/мл аполипопротеина A1 (Millipore, каталожный № ALP10) в среде RPMI 1640 без фенолового красного в течение 5 часов, после чего акцепторную среду собирали и клетки лизировали в 100 мкл буфера RIPA (Millipore, каталожный № 20-188) в течение 2 часов при осторожном перемешивании при комнатной температуре. Флуоресценцию измеряли в этих фракциях при возбуждении 482 нм, испускании 515 нм в планшет-ридере SpectraMax i3 (Molecular Devices). Процент оттока холестерина BODIPY рассчитывали по следующей формуле: [флуоресценция в акцепторной среде/ (флуоресценция в акцепторной среде + флуоресценция в клеточном лизате)] x 100.

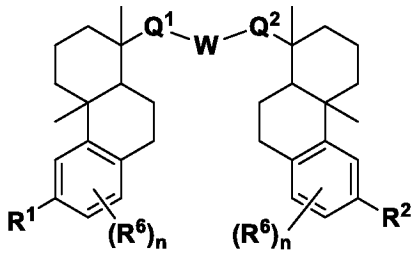
[00379] Как показано в таблице 8 и на ФИГ. 13, через 24 часа свободные полезные нагрузки **P1** и **P2** продемонстрировали аналогичные значения EC_{50} оттока холестерина, составляющие 20 пМ и 14 пМ, соответственно. NcADCH1H21234N-N297Q-**29d1** продемонстрировал значение EC_{50} 12 пМ, а ncADCH1H21234N-N297Q-**LP1** показал значение EC_{50} 98 пМ. Изотипический контроль N297Q-**LP1** ncADC продемонстрировал минимальный отток холестерина со значением EC_{50} 13 нМ.

Таблица 8: Активация оттока холестерина агонистами LXR и конъюгатами антитело-лекарственное средство агонистов LXR

Проверенная молекула	**Активация оттока холестерина EC_{50} (M)**
P1	2.0E-11
P2	1.4E-11
H1H21234N-N297Q-**29d1**	1.2E-11
H1H21234N-N297Q-**LP1**	9.8E-11
Изотипический контроль-N297Q-**LP1**	1.3E-8

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы I:



(I)

или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где

каждый из **Q**^{1} и **Q**^{2} независимо представляет собой $–CH_2–$, –C(O)–, –C(H)(OH)–, $–C(OH)_2–$, $–SO_2–$, –SO–, –PO(O**R**^{3})–, –PO(N**R**^{3}N**R**^{4})–, –N**R**^{3}– или –N=;

W представляет собой $-CH_2-$, -N(H)- или -O-;

R^1 представляет собой –N(H)**R**^{4} или $–N(\mathbf{R}^5)_2$;

R^2 представляет собой –N(H)**R**^{4};

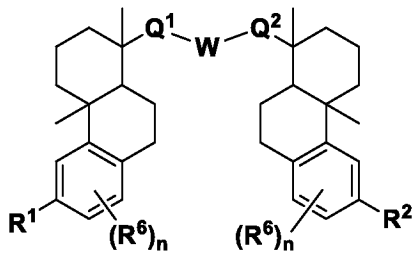
каждый **R**^{4} независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент, алкил, замещенный алкил, ацил или замещенный ацил;

R^5 представляет собой алкил, арил, арилалкил, гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил, где каждый гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил содержит один, два или три гетероатома, выбранных из азота и кислорода, и, когда он замещен, включает, по меньшей мере, один –OH и $–CH_2OH$, или, по меньшей мере, один первичный или вторичный азот;

каждый **R**^{6} независимо представляет собой галоген, $C_{1\text{-}6}$ алкил, $C_{1\text{-}6}$ алкокси, –CN, O-глюкозу, O-аминокислотный остаток или O-$PEG_{\mathbf{n1}}$, где каждый **n** представляет собой целое число от 0 до 14, и каждый **n1** представляет собой целое число от 1 до 12; и

каждый **R**^{3} независимо представляет собой водород, алкил или арил.

2. Соединение по п.1 согласно Формуле I:



(I)

или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где

каждый из **Q**^{1} и **Q**^{2} независимо представляет собой –CH_2–, –C(O)–, –C(H)(OH)–, –$C(OH)_2$–, –SO_2–, –SO–, –PO(O**R**^{3})–, –PO(N**R**^{3}N**R**^{4})–, –N**R**^{3}–, или –N=;

W представляет собой -CH_2-, -N(H)- или -O-;

R^1 представляет собой –N(H)**R**^{4} или –N(**R**^{5})$_2$;

R^2 представляет собой –N(H)**R**^{4};

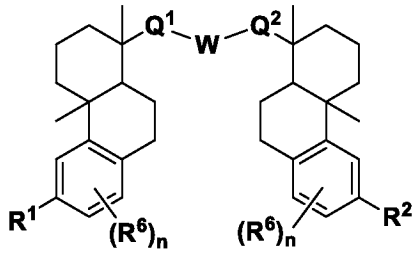
каждый **R**^{4} независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент или алкил;

R^5 представляет собой алкил, арил, арилалкил, гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил, где каждый гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил содержит один, два или три гетероатома, выбранных из азота и кислорода, и, когда он замещен, включает, по меньшей мере, один –OH и –CH_2OH, или, по меньшей мере, один первичный или вторичный азот;

каждый **R**^{6} независимо представляет собой галоген, $C_{1\text{-}6}$ алкил, $C_{1\text{-}6}$ алкокси, –CN, O-глюкозу, O-аминокислотный остаток или O-PEG$_{\mathbf{n1}}$, где каждый **n** представляет собой целое число от 0 до 14, и каждый **n1** представляет собой целое число от 1 до 12; а также

каждый **R**^{3} независимо представляет собой водород, алкил или арил.

3. Соединение по п.1 согласно формуле I:



(I)

или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где

каждый из **Q**^{1} и **Q**^{2} независимо представляет собой –CH_2–, –C(O)–, –C(H)(OH)– или –$C(OH)_2$–;

W представляет собой -CH_2-, -N(H)- или -O-;

R^1 представляет собой –N(H)**R**^{4} или –N(**R**^{5})$_2$;

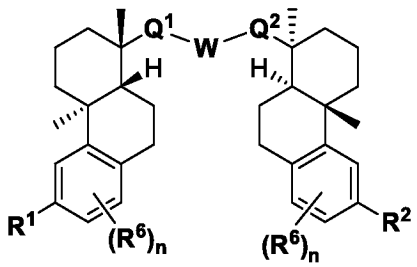
R^2 представляет собой –N(H)**R**^{4};

каждый **R**^{4} независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент или алкил;

R^5 представляет собой алкил, арил, арилалкил, гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил, где каждый гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил содержит один, два или три гетероатома, выбранных из азота и кислорода, и, когда он замещен, включает, по меньшей мере, один –OH и –CH_2OH, или, по меньшей мере, один первичный или вторичный азот; и

каждый **R**^{6} независимо представляет собой галоген, C_{1-6} алкил, C_{1-6} алкокси, –CN, O-глюкозу, O-аминокислотный остаток или O-PEG$_{n1}$, где каждый **n** представляет собой целое число от 0 до 14, и каждый **n1** представляет собой целое число от 1 до 12.

4. Соединение по п.3 согласно формуле II:



(II)

или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма.

5. Соединение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что **Q**^{1} представляет собой –CH_2– и **Q**^{2} представляет собой –C(O)–.

6. Соединение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что **Q**^{1} представляет собой –C(H)(OH)– и **Q**^{2} представляет собой –C(O)–.

7. Соединение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что **Q**^{1} представляет собой –C(O)– и **Q**^{2} представляет собой –C(O)–.

8. Соединение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что $\mathbf{Q^1}$ представляет собой –C(O)– и $\mathbf{Q^2}$ представляет собой $–CH_2–$.

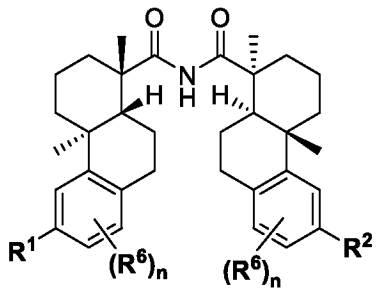
9. Соединение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что $\mathbf{Q^1}$ представляет собой –C(O)– и $\mathbf{Q^2}$ представляет собой –C(H)(OH)–.

10. Соединение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что **W** представляет собой $–CH_2–$.

11. Соединение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что **W** представляет собой –O–.

12. Соединение по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что **W** представляет собой –NH–.

13. Соединение по любому из предшествующих пунктов согласно Формуле III:



(III)

или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма.

14. Соединение по любому из пп. 1-13, где $\mathbf{R^1}$ представляет собой $–N(H)\mathbf{R^4}$.

15. Соединение по любому из пп. 1-13, где $\mathbf{R^1}$ представляет собой $–N(\mathbf{R^5})_2$.

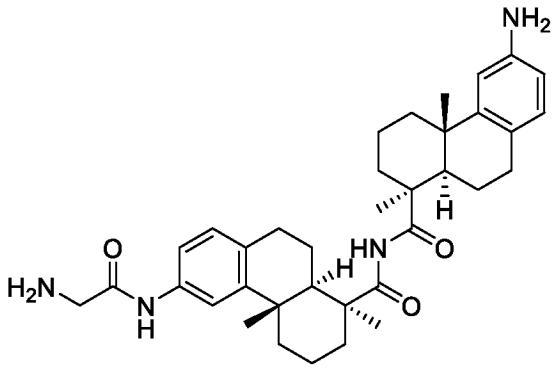
16. Соединение по п. 14, где $\mathbf{R^1}$ представляет собой $–NH_2$; и

каждый $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент или алкил.

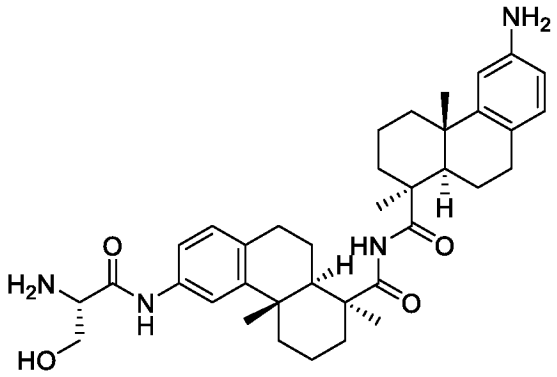
17. Соединение по п. 16, где каждый $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой аминокислотный остаток; и

аминокислотный остаток выбран из группы, состоящей из аланина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, тирозина, валина, серина, треонина, аспарагина, глутамина, цистеина, селеноцистеина, глицина, пролина, аргинина, гистидина, лизина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты.

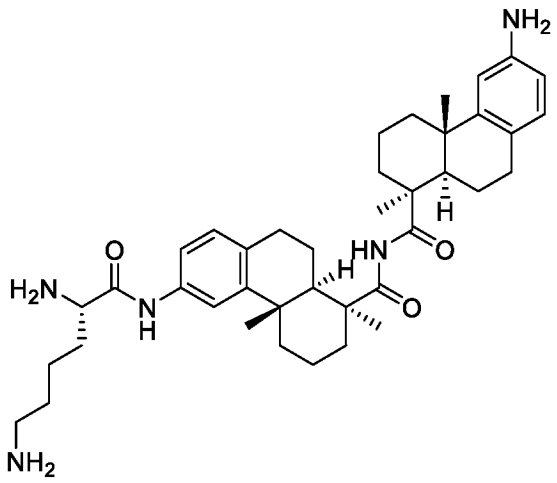
18. Соединение по п. 17, выбранное из группы, состоящей из



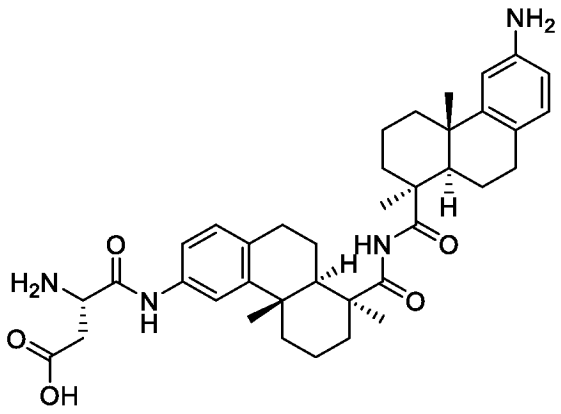
P4;



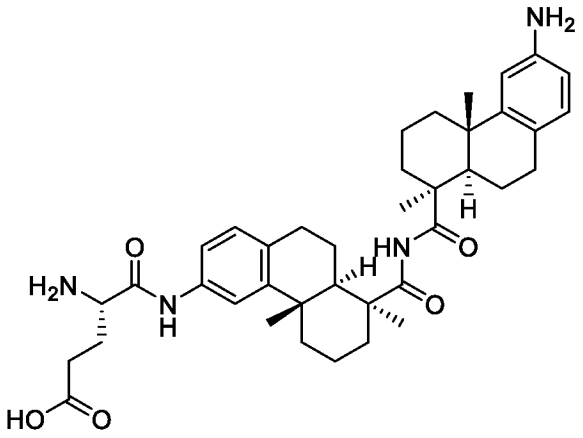
P5;



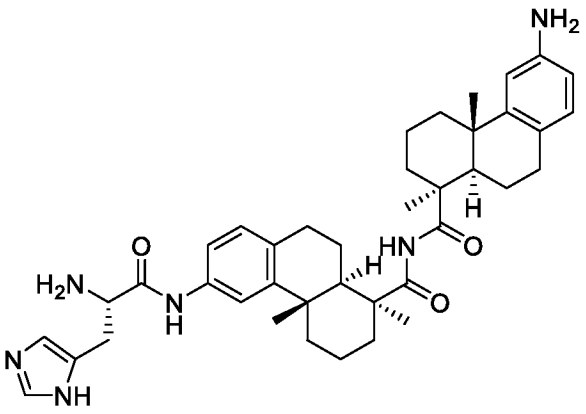
P6;



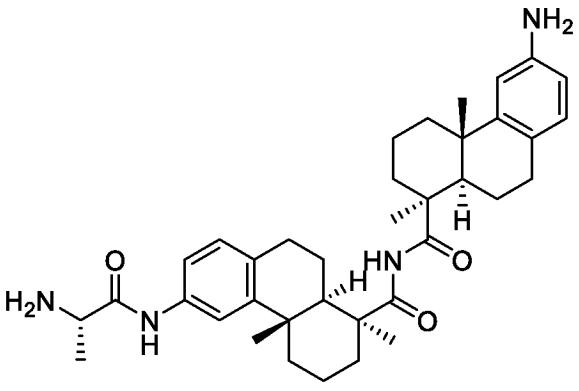
P7;



P8; и



P9;

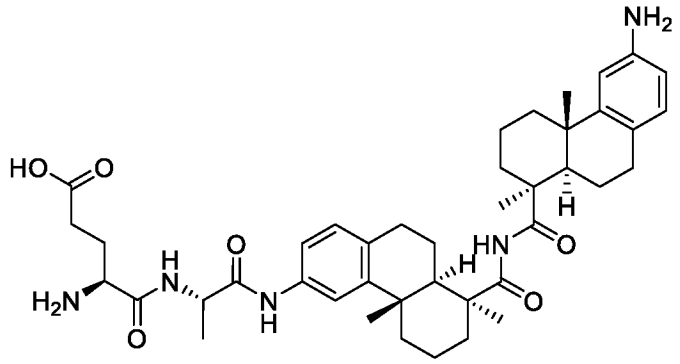


P13; или

фармацевтически приемлемая соль или сольват.

19. Соединение по п.16, где каждый $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой пептидный остаток, где пептидный остаток включает аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, тирозина, валина, серина, треонина, аспарагина, глутамина, цистеина, селеноцистеина, глицина, пролина, аргинина, гистидина, лизина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и их остатков.

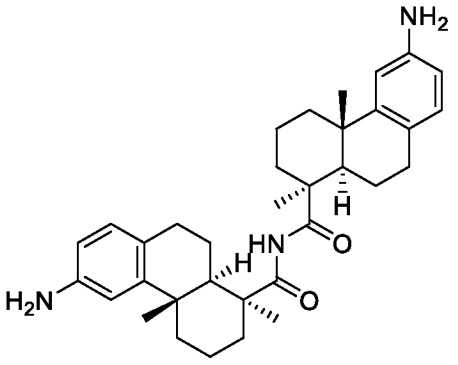
20. Соединение по п. 19, где соединение представляет собой



P12; или

его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

21. Соединение по п. 14, отличающееся тем, что соединение представляет собой



P2; или

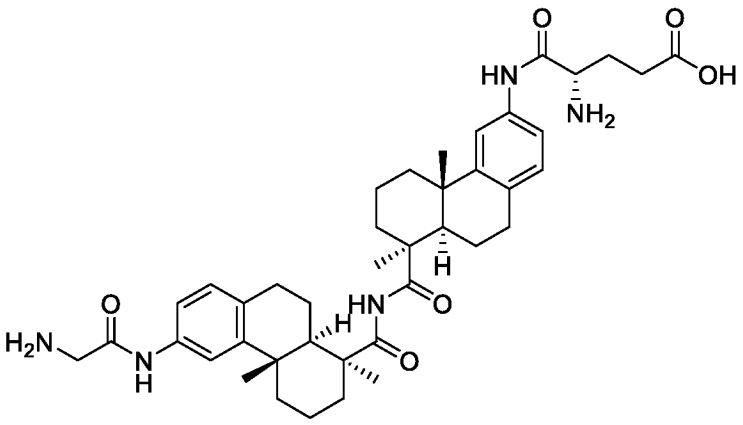
его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

22. Соединение по любому из пп. 1-13, где $\mathbf{R^1}$ и $\mathbf{R^2}$ представляют собой –N(H)$\mathbf{R^4}$.

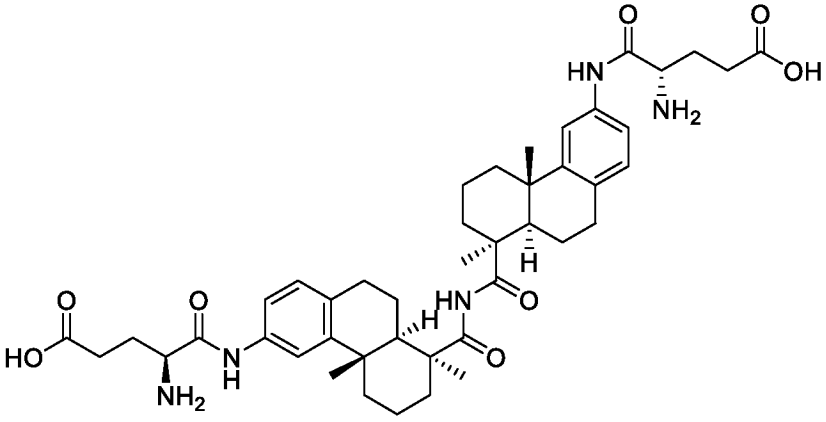
23. Соединение по п. 22, где каждый $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой аминокислотный остаток; где

аминокислота выбрана из группы, состоящей из аланина, изолейцина, лейцина, метионина, фенилаланина, триптофана, тирозина, валина, серина, треонина, аспарагина, глутамина, цистеина, селеноцистеина, глицина, пролина, аргинина, гистидина, лизина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и их остатков.

24. Соединение по п. 23, где соединение выбрано из группы, состоящей из



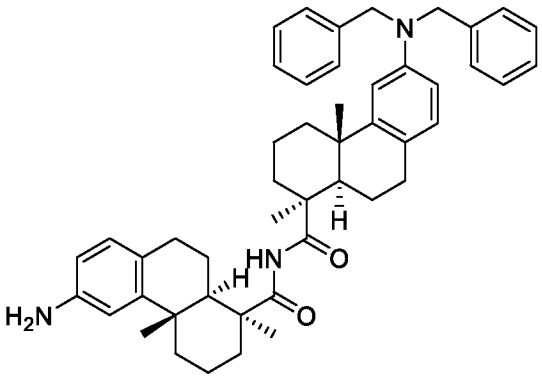
P10; и



P11; или

их фармацевтически приемлемые соли или сольваты.

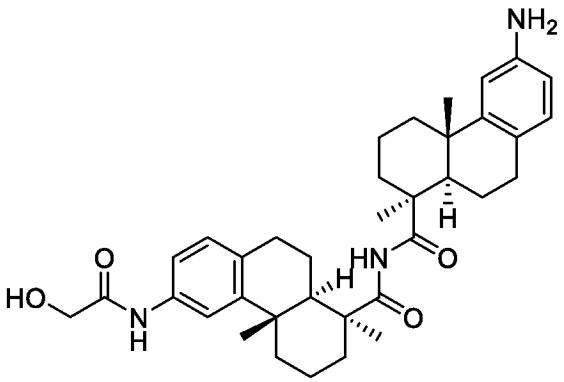
25. Соединение по п. 15, где соединение представляет собой



P3; или

его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

26. Соединение по п. 22, где соединение представляет собой

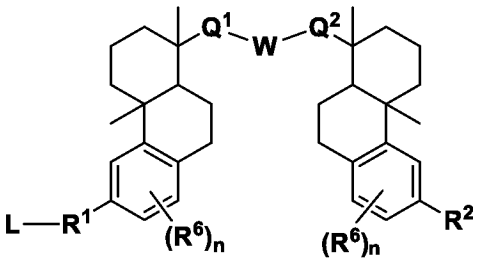


P14; или

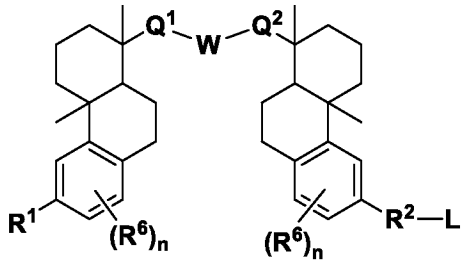
его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

27. Соединение линкер-полезная нагрузка, содержащее соединение по любому из предшествующих пунктов, связанное с линкером.

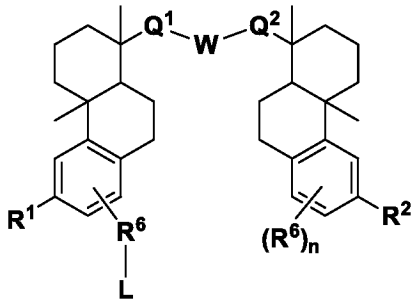
28. Соединение линкер-полезная нагрузка по любому из предшествующих пунктов согласно формулам **LPa**, **LPb**, **LPc** или **LPd**:



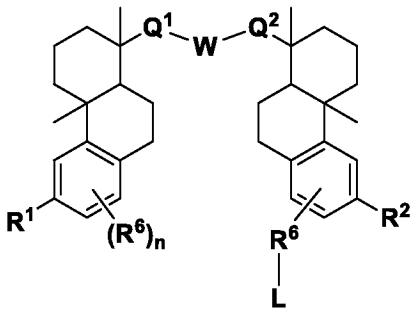
(LPa)



(LPb)



(LPc)



(LPd)

или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где

L представляет собой линкер;

каждый из $\mathbf{Q^1}$ и $\mathbf{Q^2}$ независимо представляет собой $–CH_2–$, –C(O)–, –C(H)(OH)–, $–C(OH)_2–$, $–SO_2–$, –SO–, $–PO(O\mathbf{R^3})–$, $–PO(N\mathbf{R^3}N\mathbf{R^4})–$, $–N\mathbf{R^3}–$ или –N=;

W представляет собой $-CH_2-$, -N(H)- или -O-;

$\mathbf{R^1}$ представляет собой $–N(H)\mathbf{R^4}$, $–N(H)\mathbf{R^4}–$, –N(H)–, $–N(\mathbf{R^5})_2$ или $–N(\mathbf{R^5})_2–$;

$\mathbf{R^2}$ представляет собой $–N(H)\mathbf{R^4}$, $–N(H)\mathbf{R^4}–$ или –N(H)–;

каждый $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент, алкил, замещенный алкил, ацил, замещенный ацил или -алкилен-;

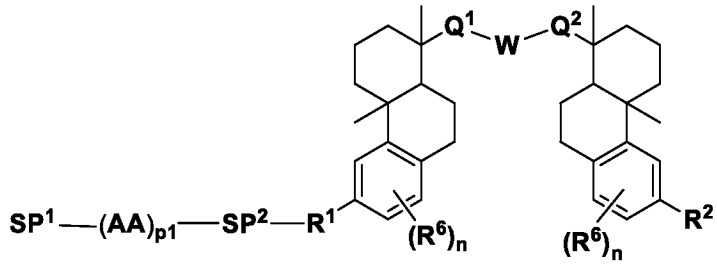
$\mathbf{R^5}$ представляет собой алкил, арил, арилалкил, гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил, где каждый гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил содержит один, два или три гетероатома, выбранных из азота и кислорода, и, когда он замещен, включает, по меньшей мере, один –OH и $–CH_2OH$, или, по меньшей мере, один первичный или вторичный азот;

каждый $\mathbf{R^6}$ независимо представляет собой галоген, $C_{1\text{-}6}$ алкил, $C_{1\text{-}6}$ алкилен, $C_{1\text{-}6}$ алкокси, –CN, O-глюкозу, O-аминокислотный остаток или $O\text{-}PEG_{\mathbf{n1}}$, где каждый **n** представляет собой целое число от 0 до 14, и каждый **n1** представляет собой целое число от 1 до 12; и

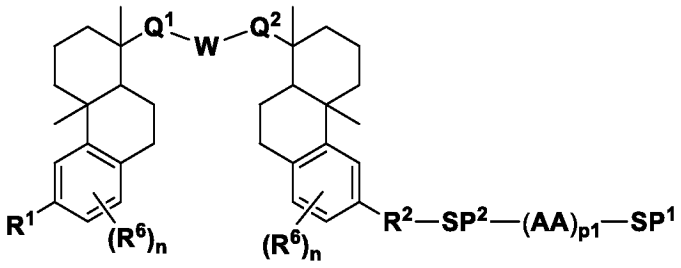
каждый $\mathbf{R^3}$ независимо представляет собой водород, алкил или арил.

29. Соединение линкер-полезная нагрузка по п. 28, где каждый $\mathbf{R^4}$ независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент, алкил или -алкилен-.

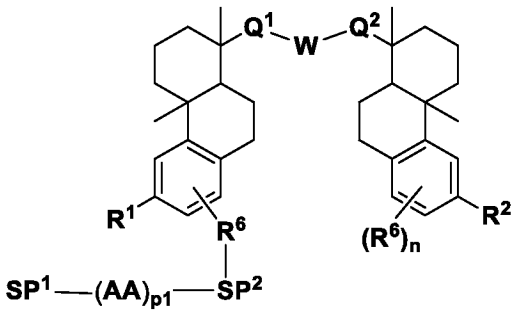
30. Соединение линкер-полезная нагрузка по п. 28 согласно формулам **LPa'**, **LPb'**, **LPc'** или **LPd'**:



(LPa')

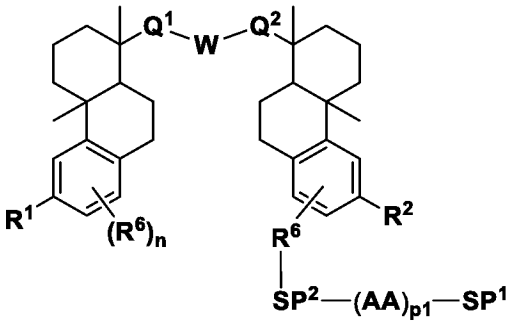


(LPb')



(LPc')

или



(LPd')

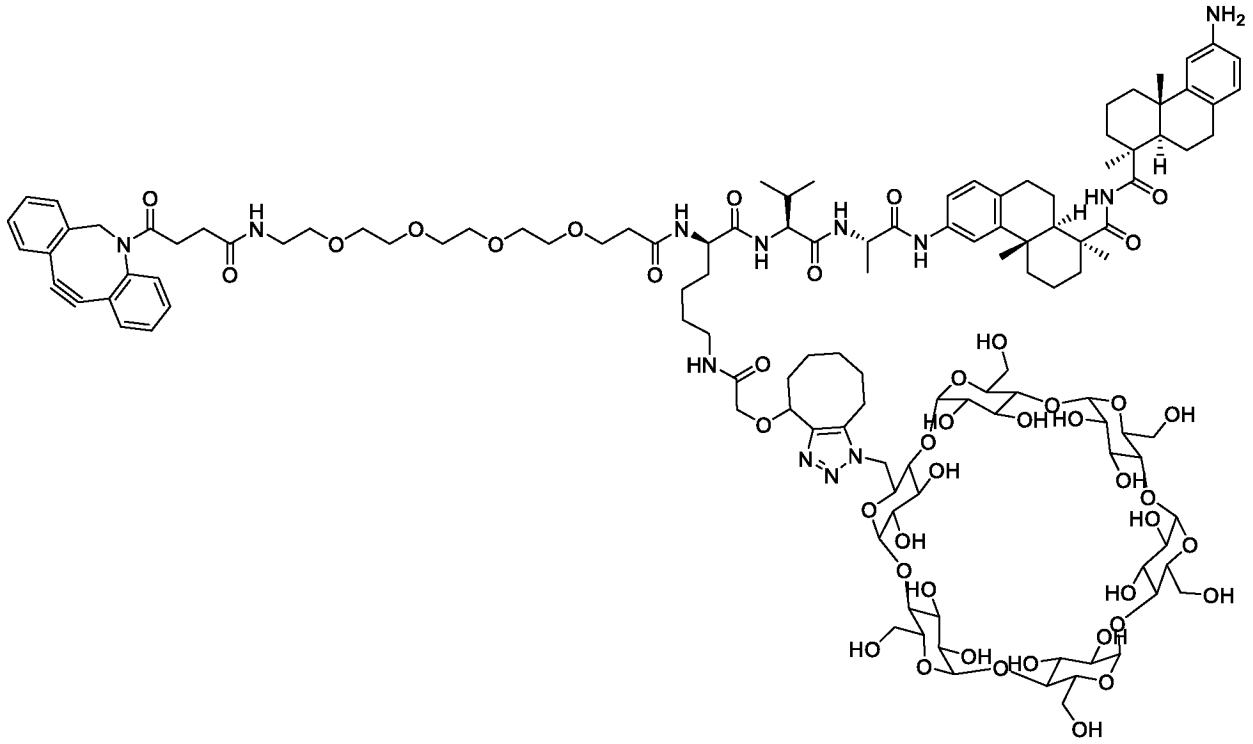
где SP^1 и SP^2, если они присутствуют, представляют собой спейсерные группы;

каждый **AA** представляет собой аминокислотный остаток; а также

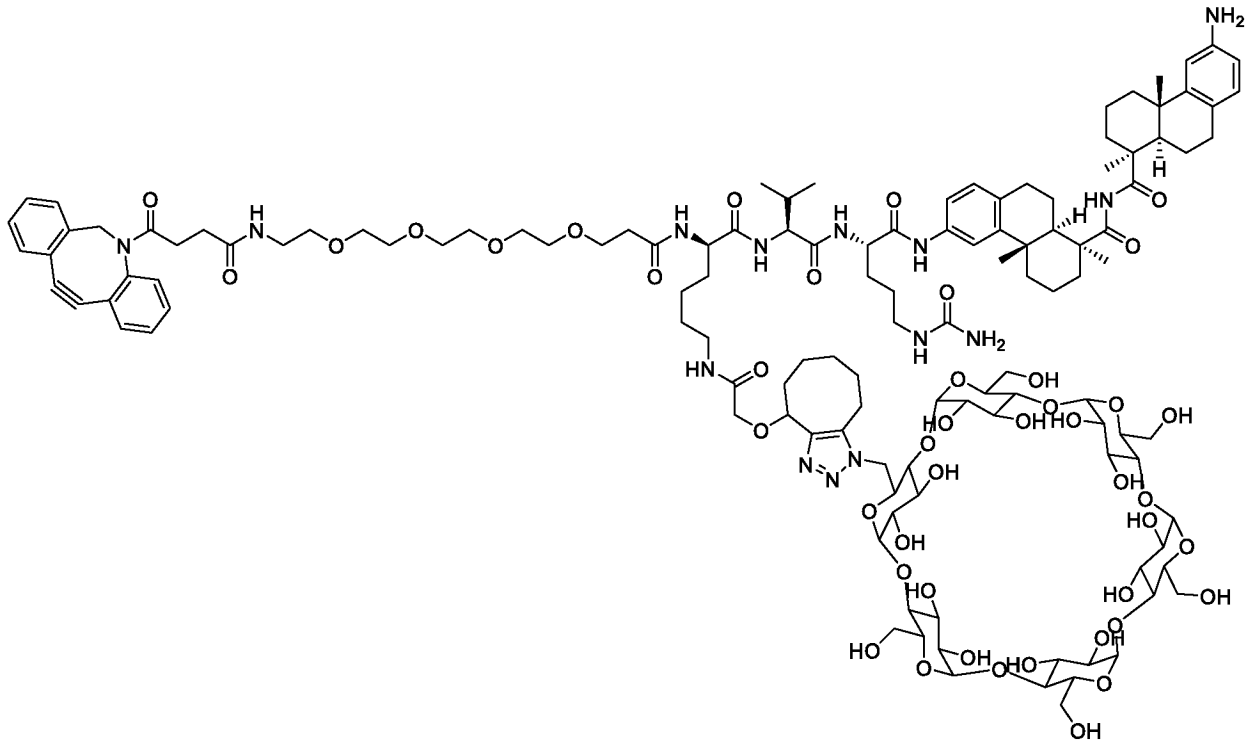
p1 представляет собой целое число от 1 до 10.

31. Соединение линкер-полезная нагрузка по любому из предшествующих пунктов, где линкер **L** или спейсер SP^2 связан с арильным азотом или аминокислотным остатком отдельно или внутри пептида.

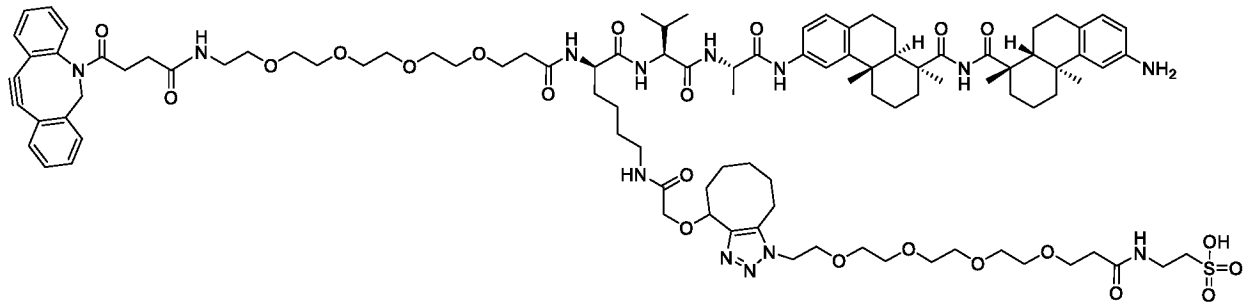
32. Соединение линкер-полезная нагрузка по любому из пп. 27-31, выбранное из группы, состоящей из



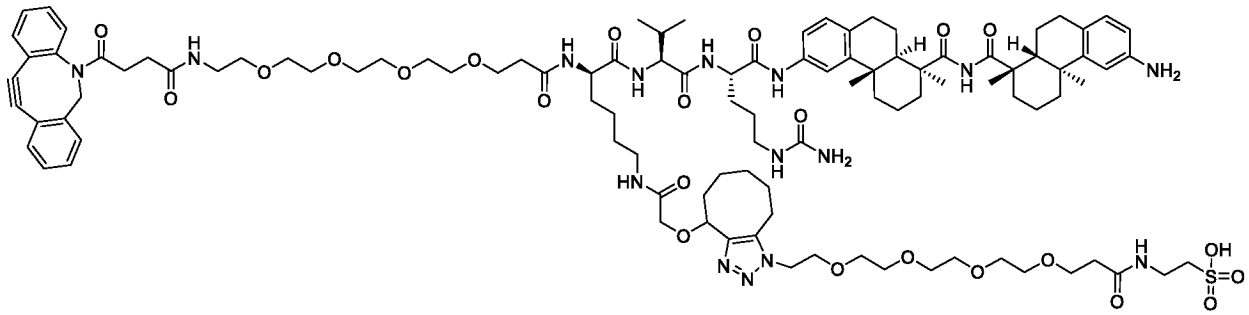
LP1;



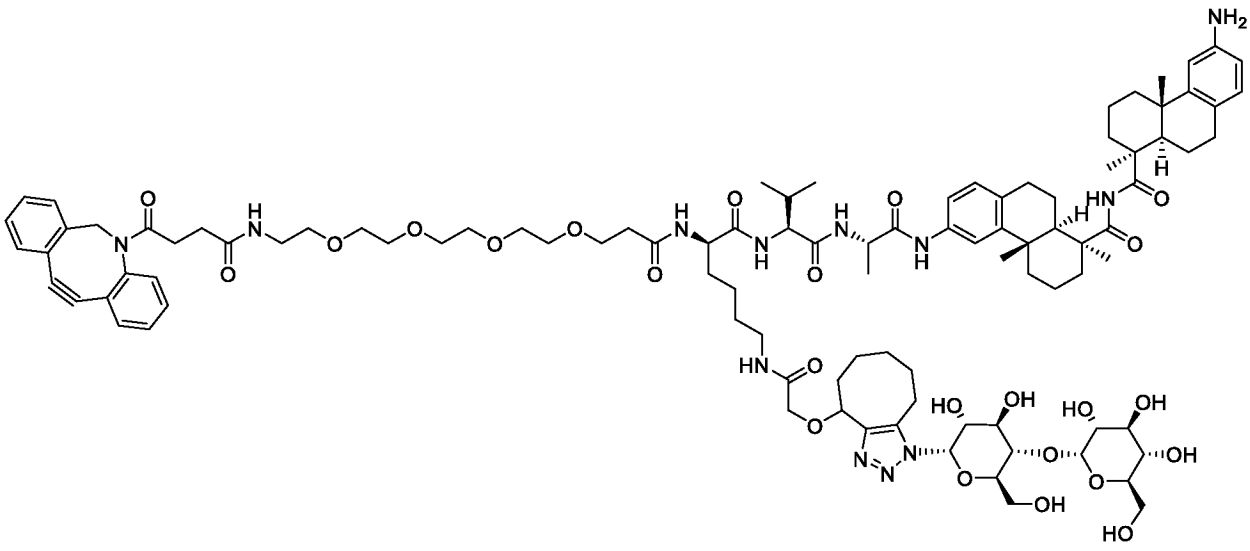
LP2;



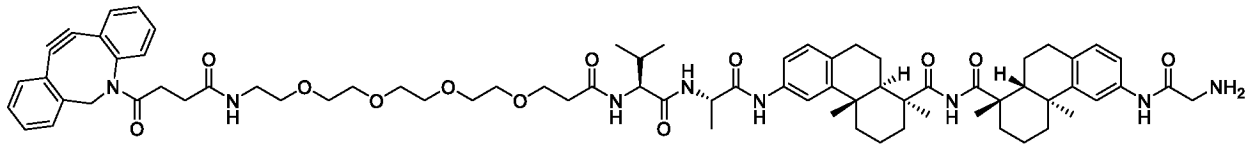
LP3;



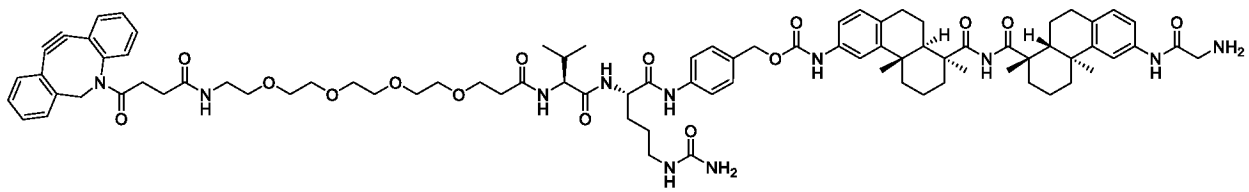
LP4;



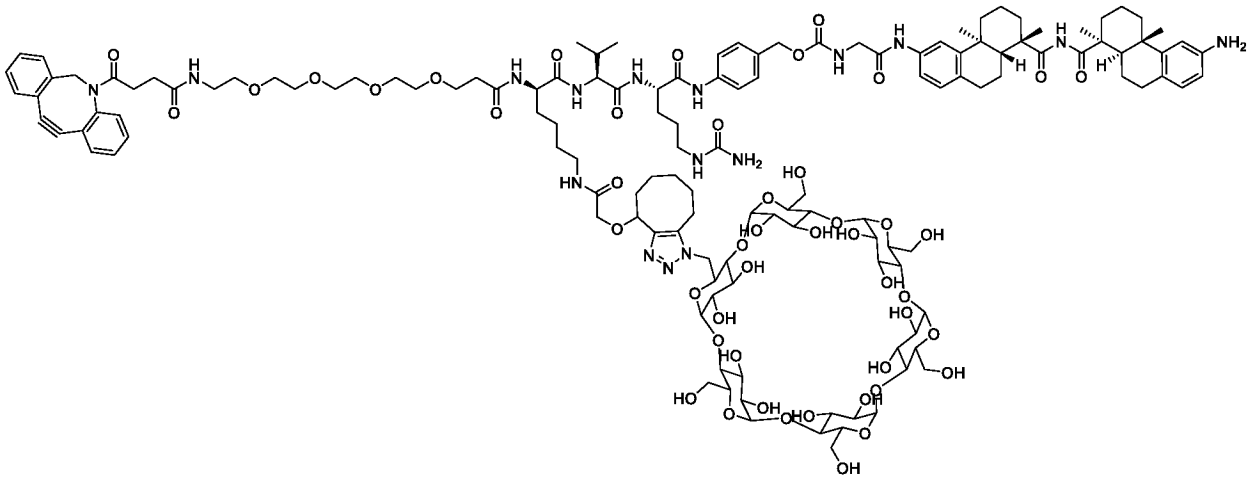
LP5;



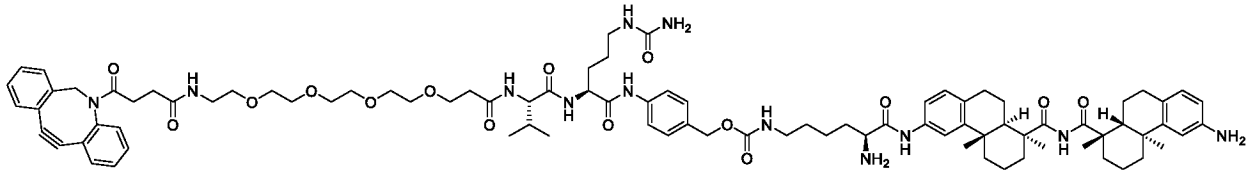
LP6;



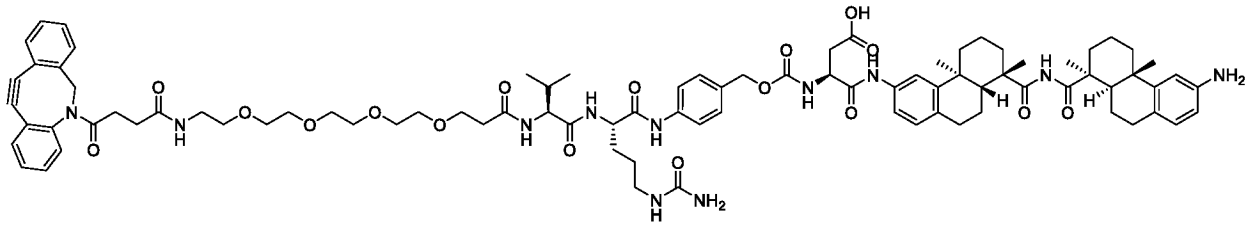
LP7;



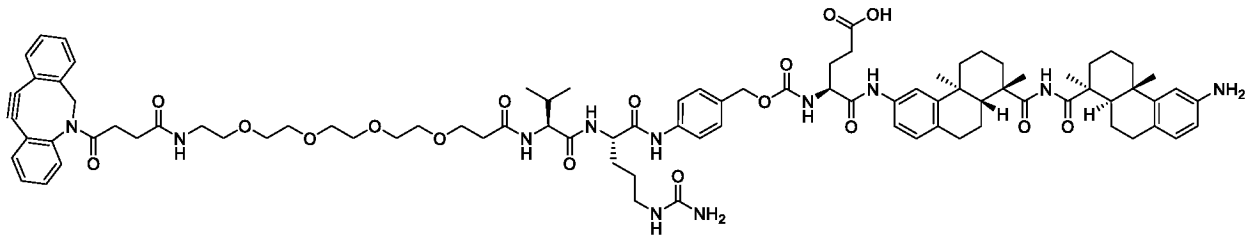
LP8;



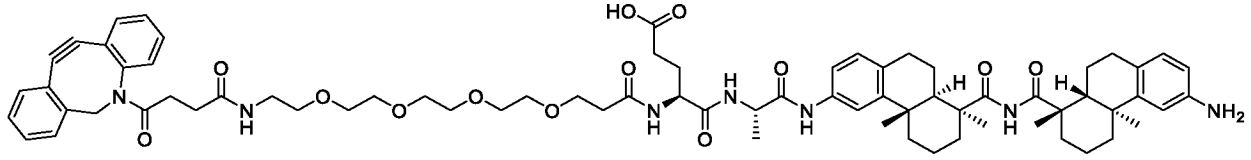
LP9;



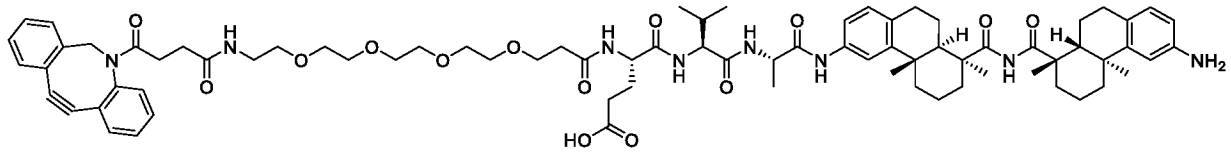
LP10;



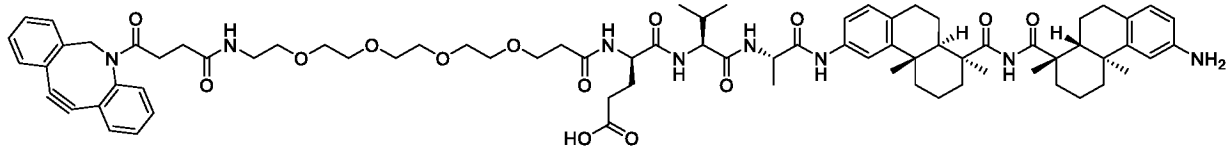
LP11;



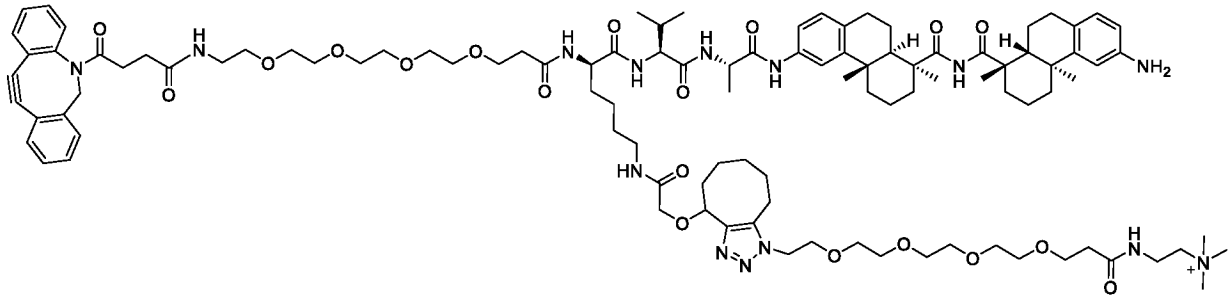
LP12;



LP13;



LP14; и

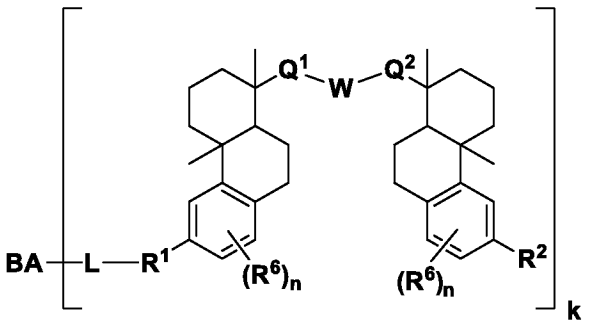


LP20; или

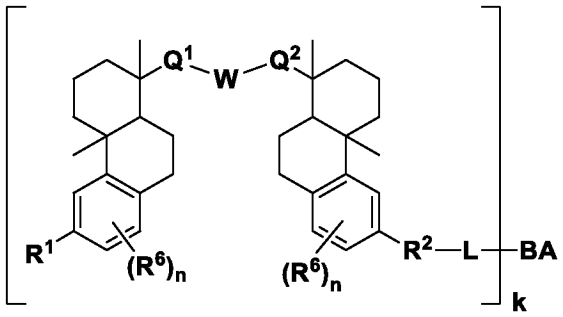
его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

33. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий соединение или полезную нагрузку линкера по любому из предшествующих пунктов, связанные с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

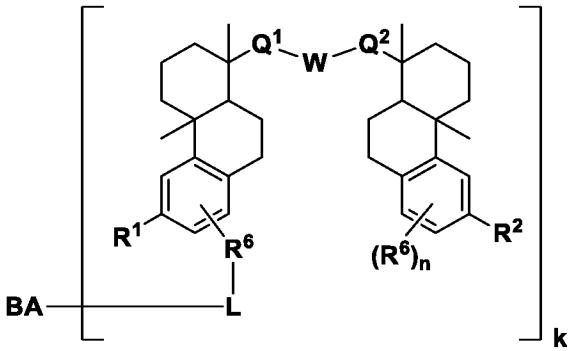
34. Соединение согласно формулам **A**, **B**, **C** или **D**:



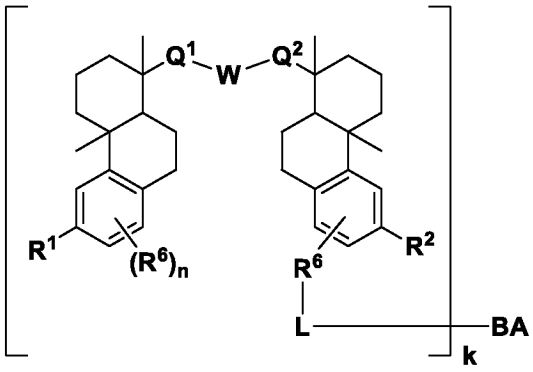
(**A**)



(B)



(C)



(D)

или фармацевтически приемлемая соль или стереоизомерная форма, где

L представляет собой линкер;

BA представляет собой связующий агент;

k представляет собой целое число от 1 до 30;

каждый из $\mathbf{Q^1}$ и $\mathbf{Q^2}$ независимо представляет собой $–CH_2–$, –C(O)–, –C(H)(OH)–, $–C(OH)_2–$, $–SO_2–$, –SO–, $–PO(O\mathbf{R^3})–$, $–PO(N\mathbf{R^3}N\mathbf{R^4})–$, $–N\mathbf{R^3}–$ или –N=;

W представляет собой $-CH_2-$, -N(H)- или -O-;

$\mathbf{R^1}$ представляет собой $–N(H)\mathbf{R^4}$, $–N(H)\mathbf{R^4}–$, –N(H)–, $–N(\mathbf{R^5})_2$ или $–N(\mathbf{R^5})_2–$;

$\mathbf{R^2}$ представляет собой $–N(H)\mathbf{R^4}$, $–N(H)\mathbf{R^4}–$ или –N(H)–;

каждый **R**^{4} независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент, алкил, замещенный алкил, ацил, замещенный ацил или -алкилен-;

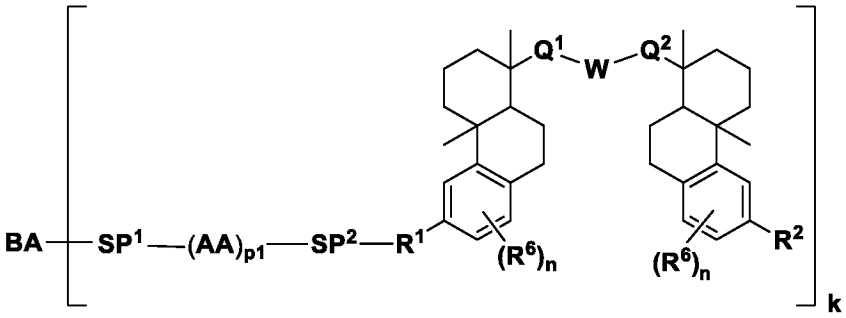
R^{5} представляет собой алкил, арил, арилалкил, гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил, где каждый гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил содержит один, два или три гетероатома, выбранных из азота и кислорода, и, когда он замещен, включает, по меньшей мере, один –OH и –CH_2OH, или, по меньшей мере, один первичный или вторичный азот;

каждый **R**^{6} независимо представляет собой галоген, $C_{1\text{-}6}$ алкил, $C_{1\text{-}6}$ алкилен, $C_{1\text{-}6}$ алкокси, –CN, O-глюкозу, O-аминокислотный остаток или O-PEG_{n1}, где каждый **n** представляет собой целое число от 0 до 14, и каждый **n1** представляет собой целое число от 1 до 12; и

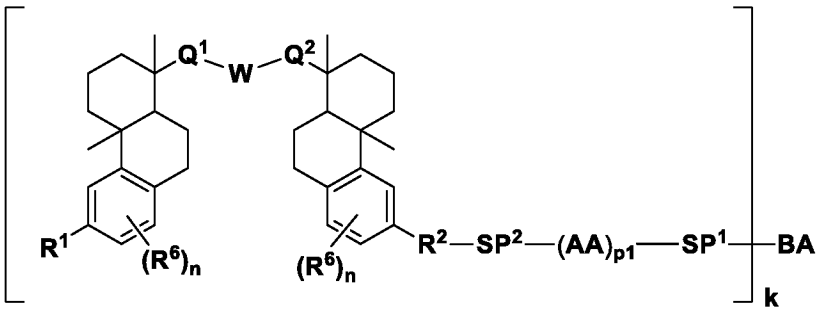
каждый **R**^{3} независимо представляет собой водород, алкил или арил.

35. Соединение по п. 34, где каждый **R**^{4} независимо в каждом случае представляет собой водород, аминокислотный остаток, *N*-алкильный аминокислотный остаток, пептидный остаток, биоразлагаемый фрагмент, алкил или -алкилен-.

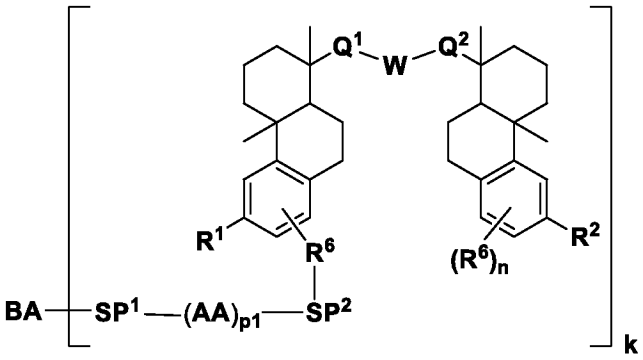
36. Соединение по п. 34 согласно формулам **A'**, **B'**, **C'** или **D'**:



(A')

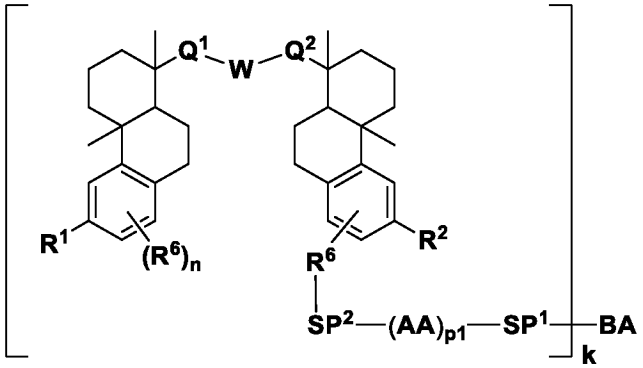


(B')



(C')

или



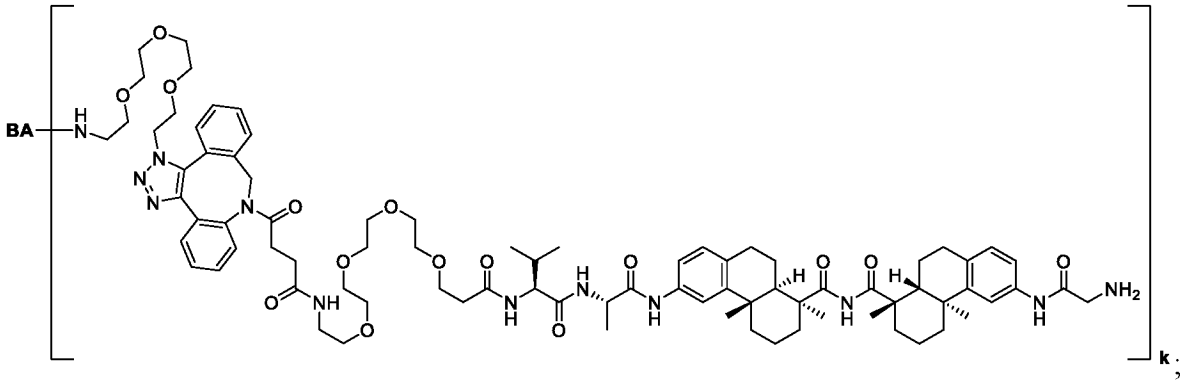
(D')

где SP^1 и SP^2, если они присутствуют, представляют собой спейсерные группы;

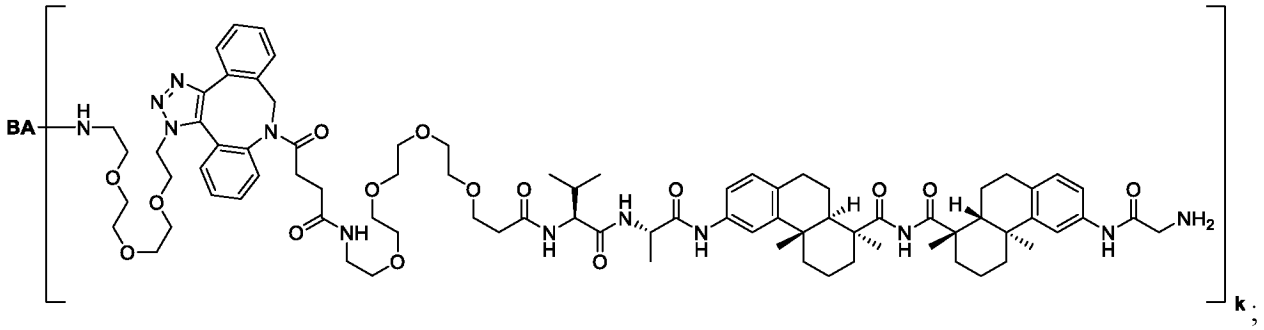
каждый **AA** представляет собой аминокислотный остаток; а также

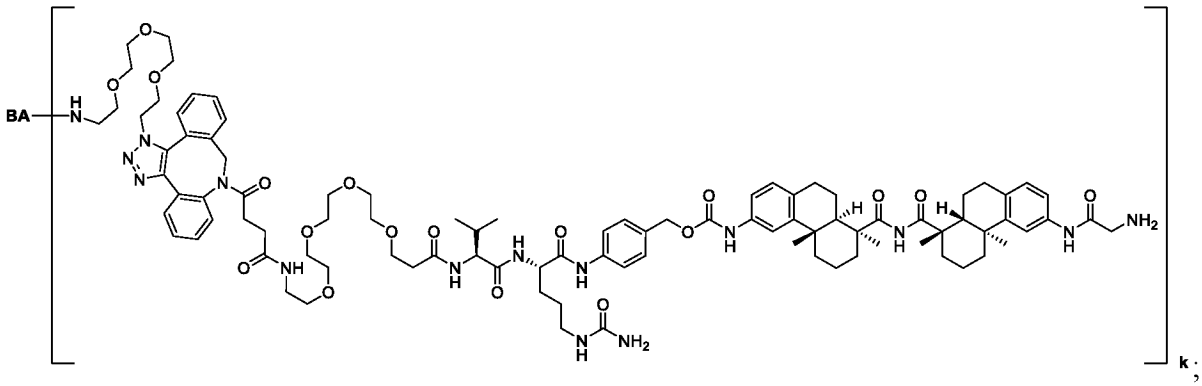
p1 представляет собой целое число от 1 до 10.

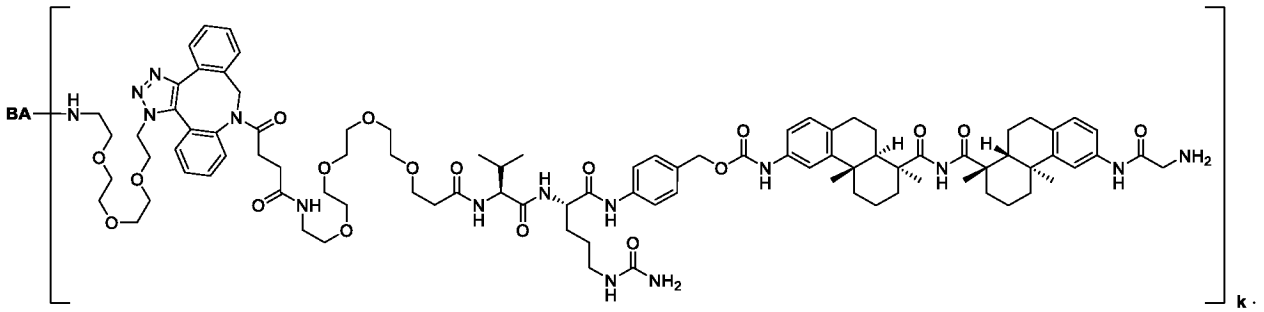
37. Соединение по п. 36, где соединение выбрано из группы, состоящей из

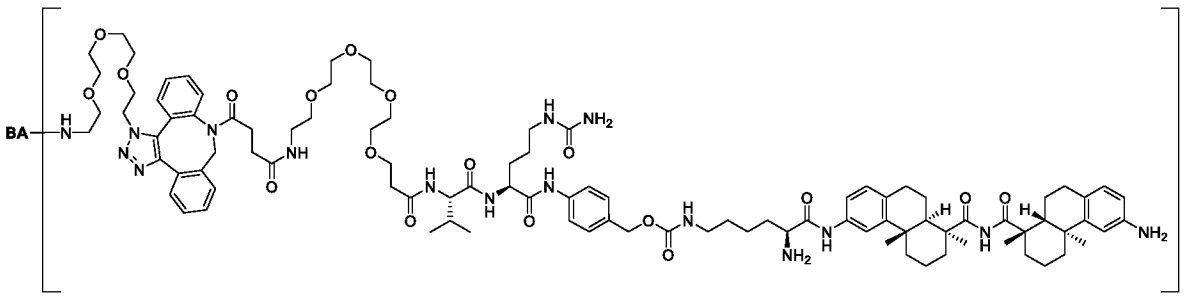


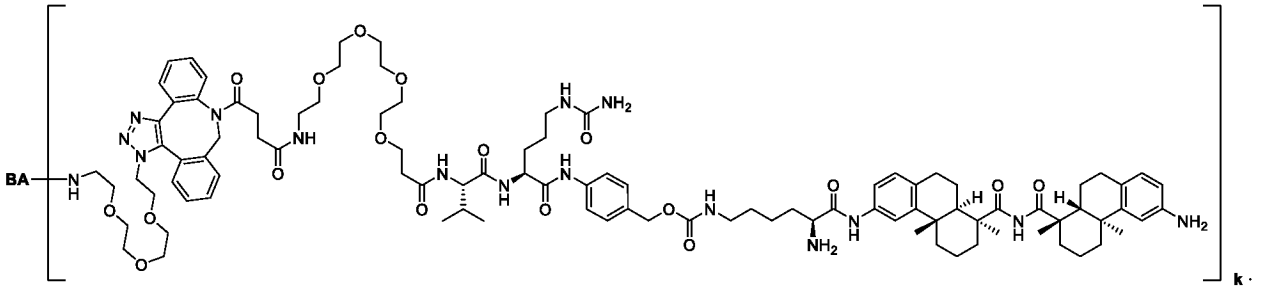
;

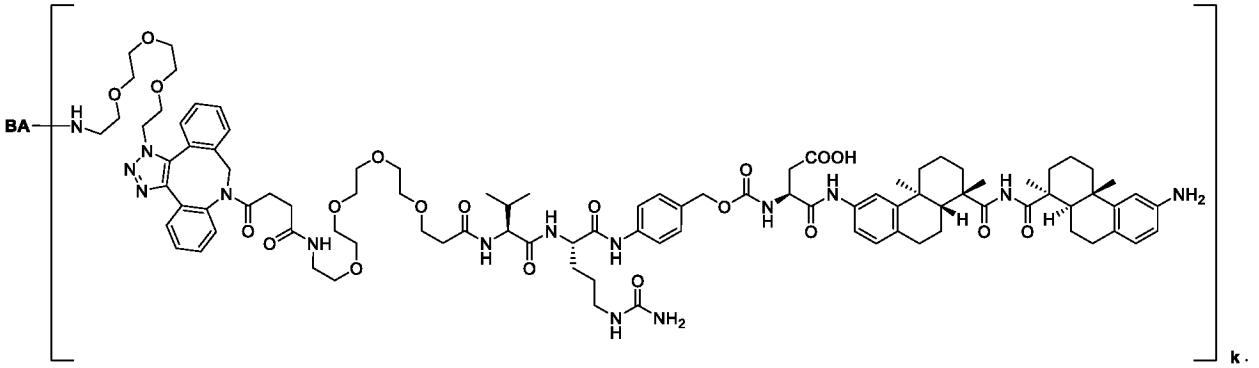


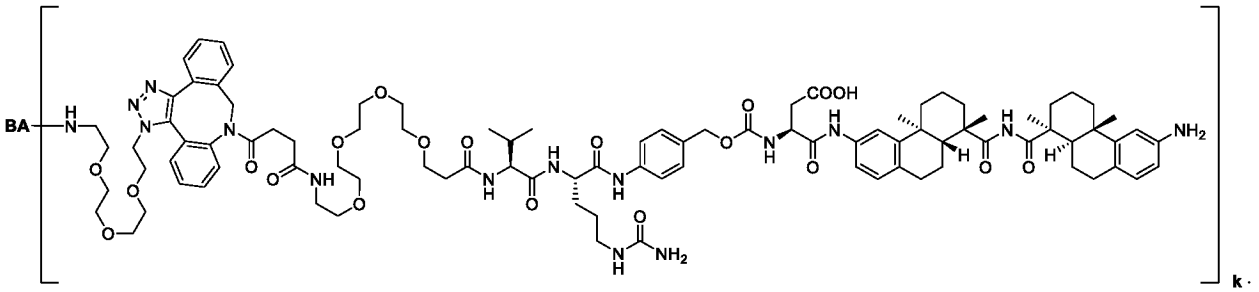


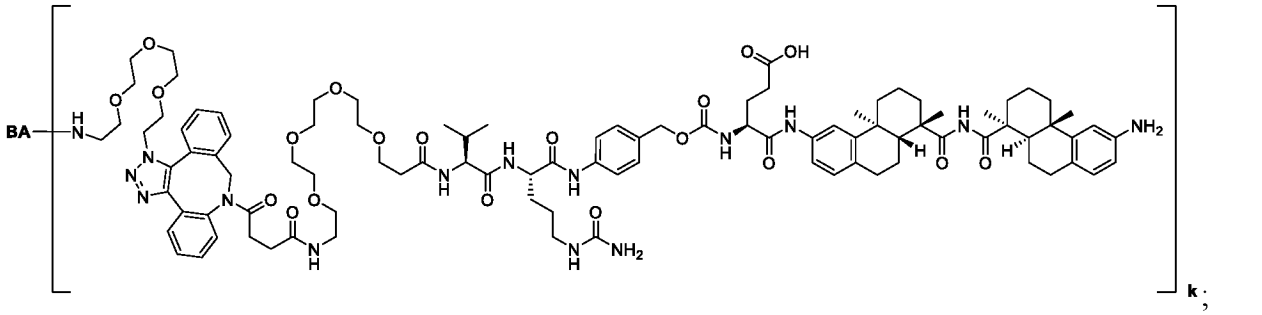


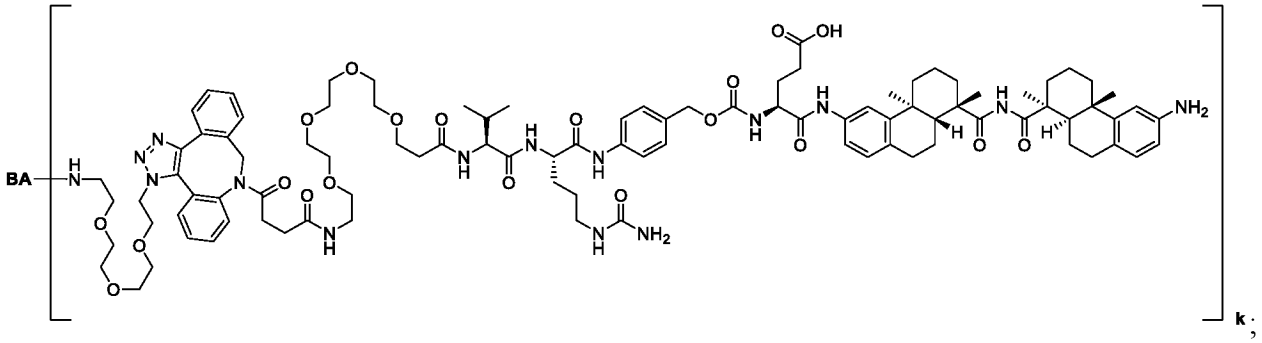


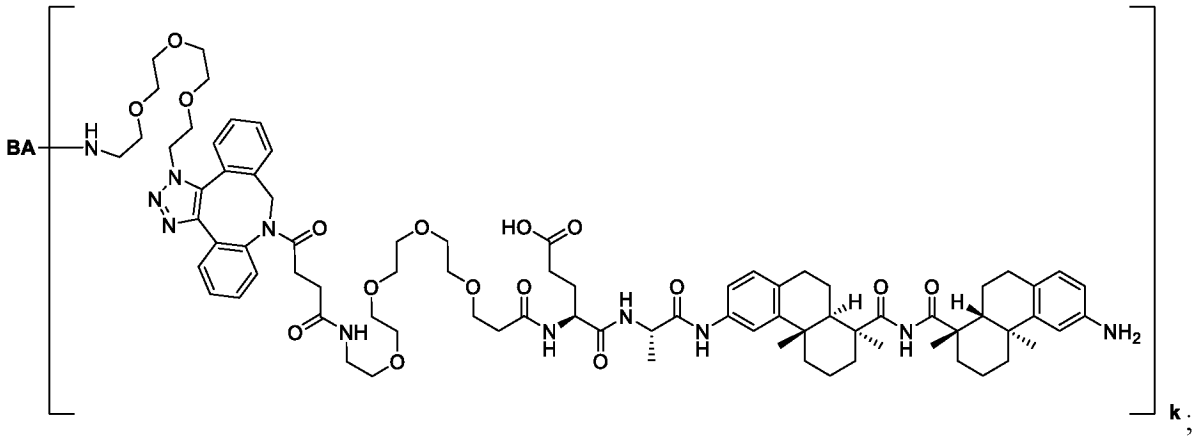

BA
k;

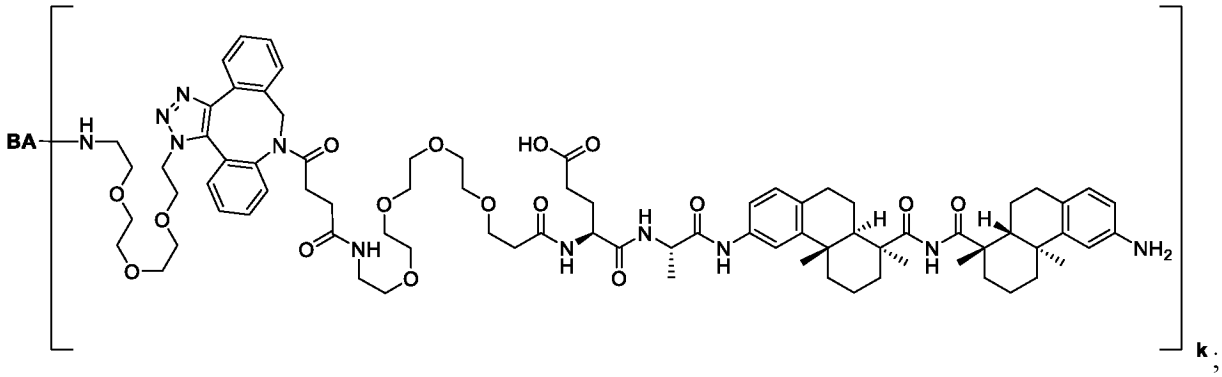

BA
k;

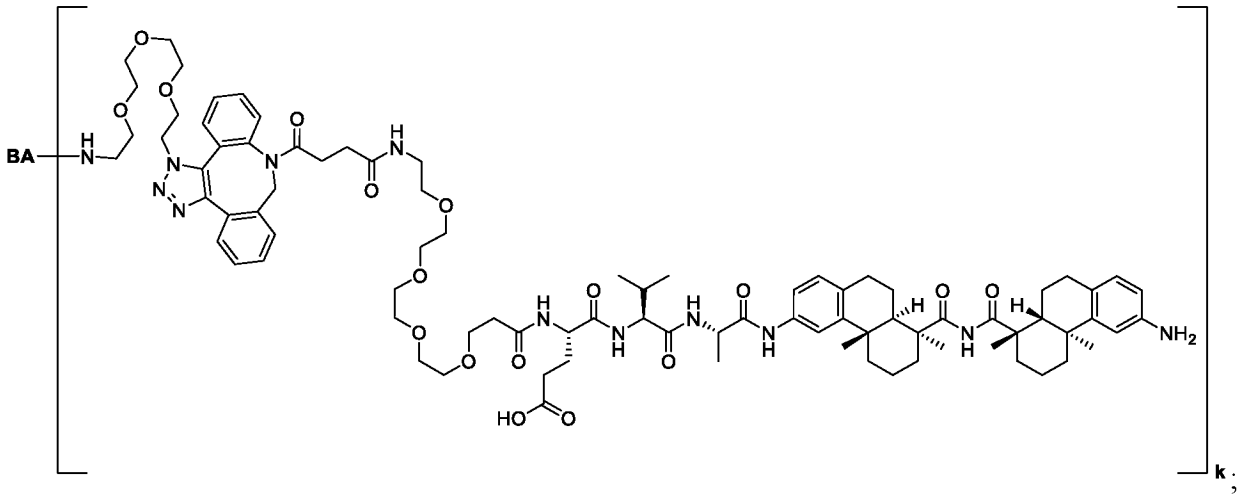

BA
k;

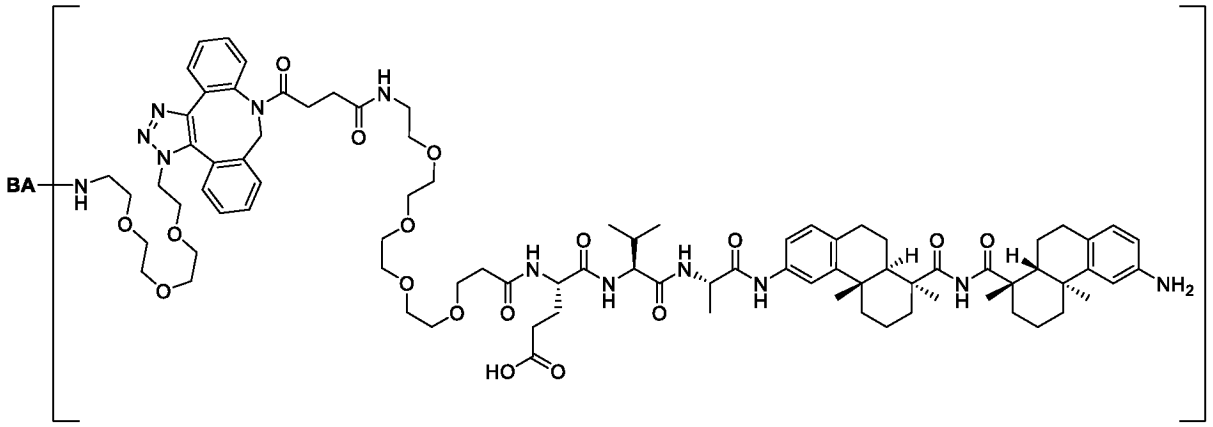

BA
k;



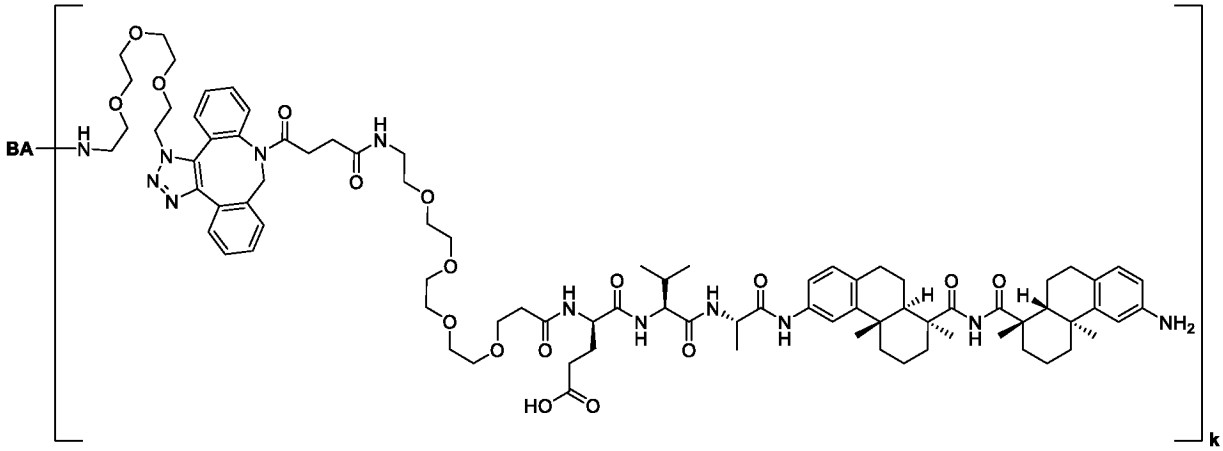




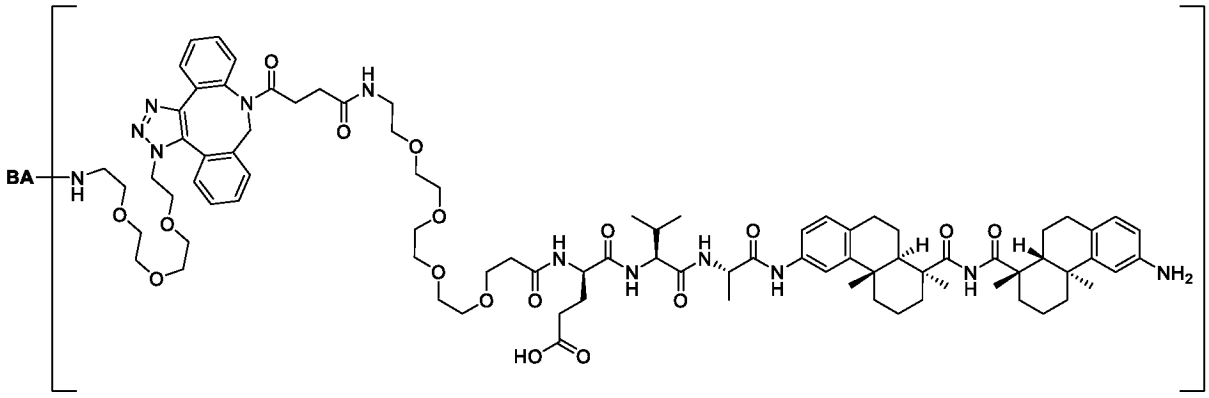




;

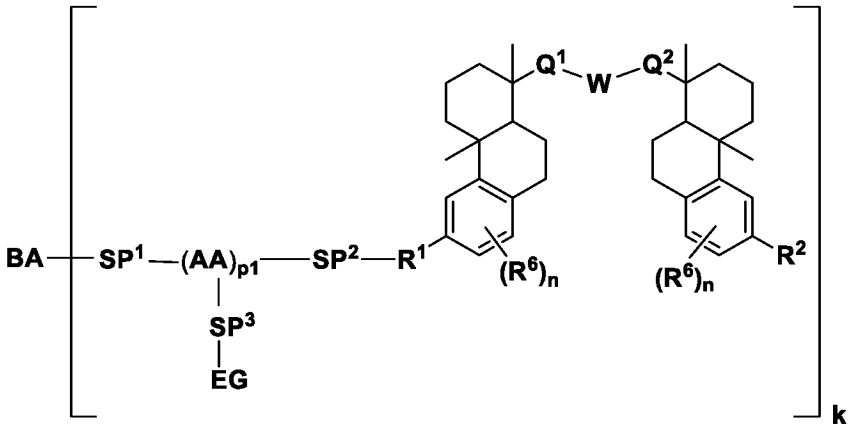


; и



.

38. Соединение по п. 34 согласно формуле (**A''**)



(A'') или

фармацевтически приемлемая соль, или его стереоизомерная форма, или его региоизомер, где:

каждый **SP**^{1}, **SP**^{2}, и **SP**^{3} представляет собой спейсерную группу, где **SP**^{3} связан с одним **AA** из $(\mathbf{AA})_{p1}$;

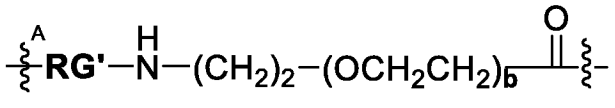
каждый **AA** представляет собой аминокислотный остаток;

p1 представляет собой целое число от 1 до 10; и

EG представляет собой усиливающий агент.

39. Соединение по п.38, где

спейсер **SP**^{1} представляет собой:



,

где **RG'** представляет собой остаток реакционноспособной группы после реакции реакционноспособной группы **RG** со связывающим агентом;



является связью, прямой или косвенной, со связующим агентом; и

b представляет собой целое число от 1 до 4;

$(\mathbf{AA})_{p1}$–**SP**^{2}– представляет собой –NH-лизин-валин-аланин–, –NH-лизин-валин-цитруллин– или –NH-лизин-валин-цитруллин-PABC–;

спейсер **SP**^{3} представляет собой:



где **RG'** представляет собой остаток реакционной группы после реакции реакционноспособной группы **RG** с усиливающим агентом **EG**;

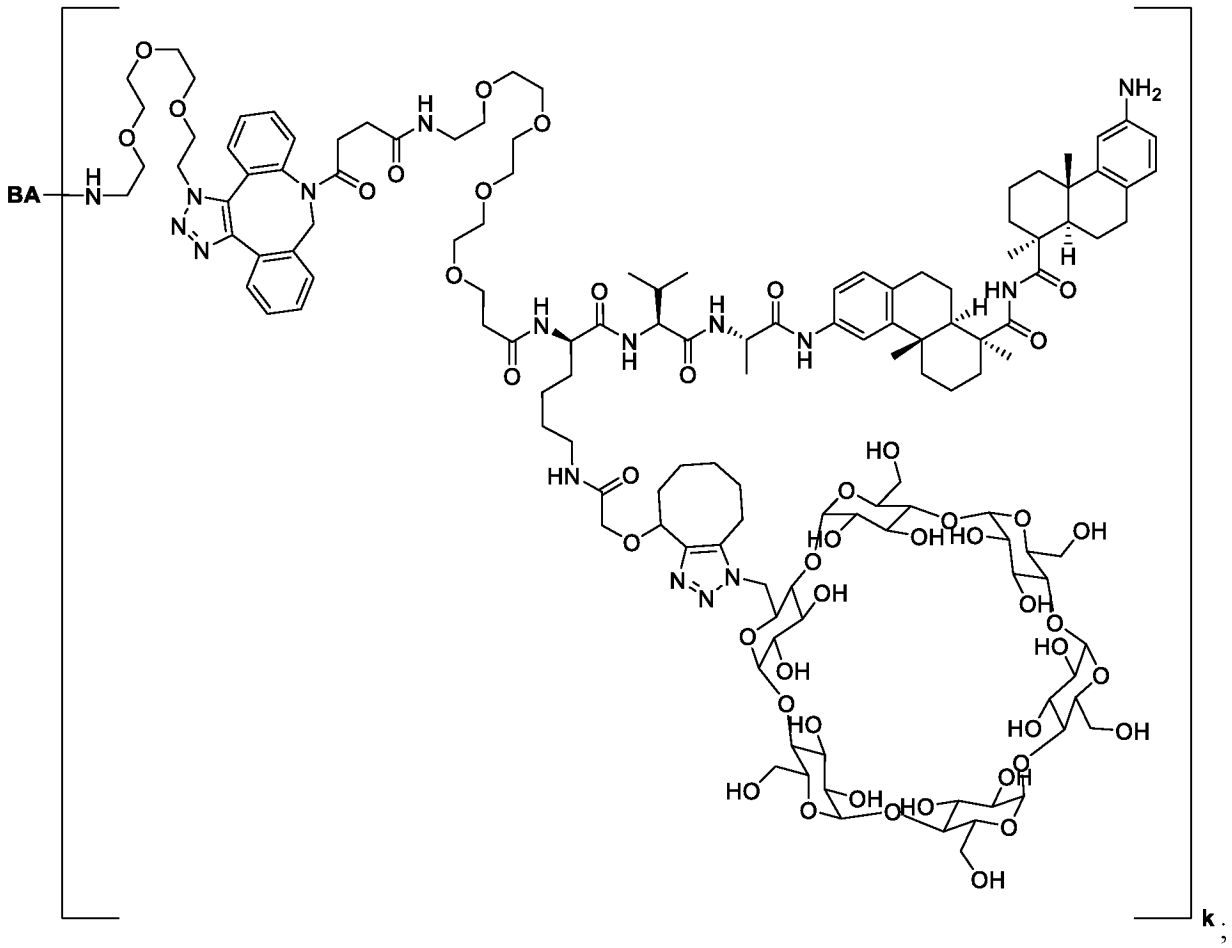


является связью с усиливающим агентом; и

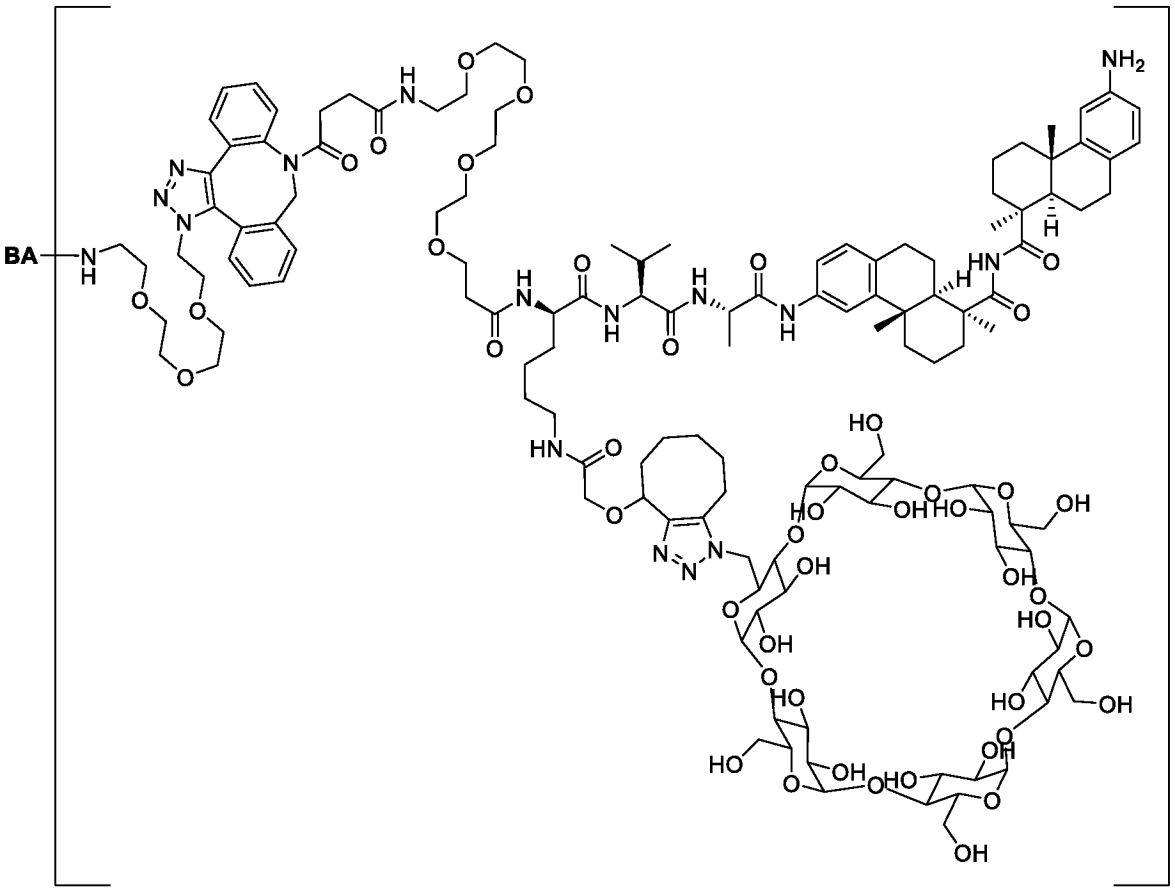


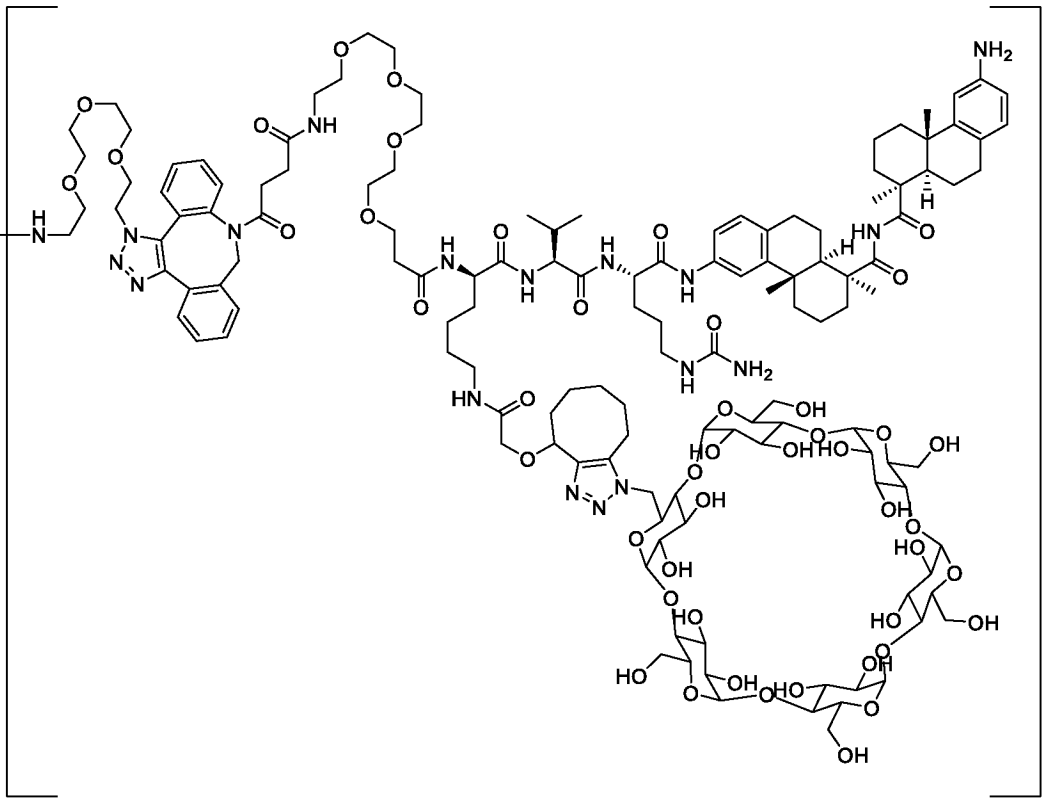
представляет собой связь с $(\mathbf{AA})_{\mathbf{p1}}$.

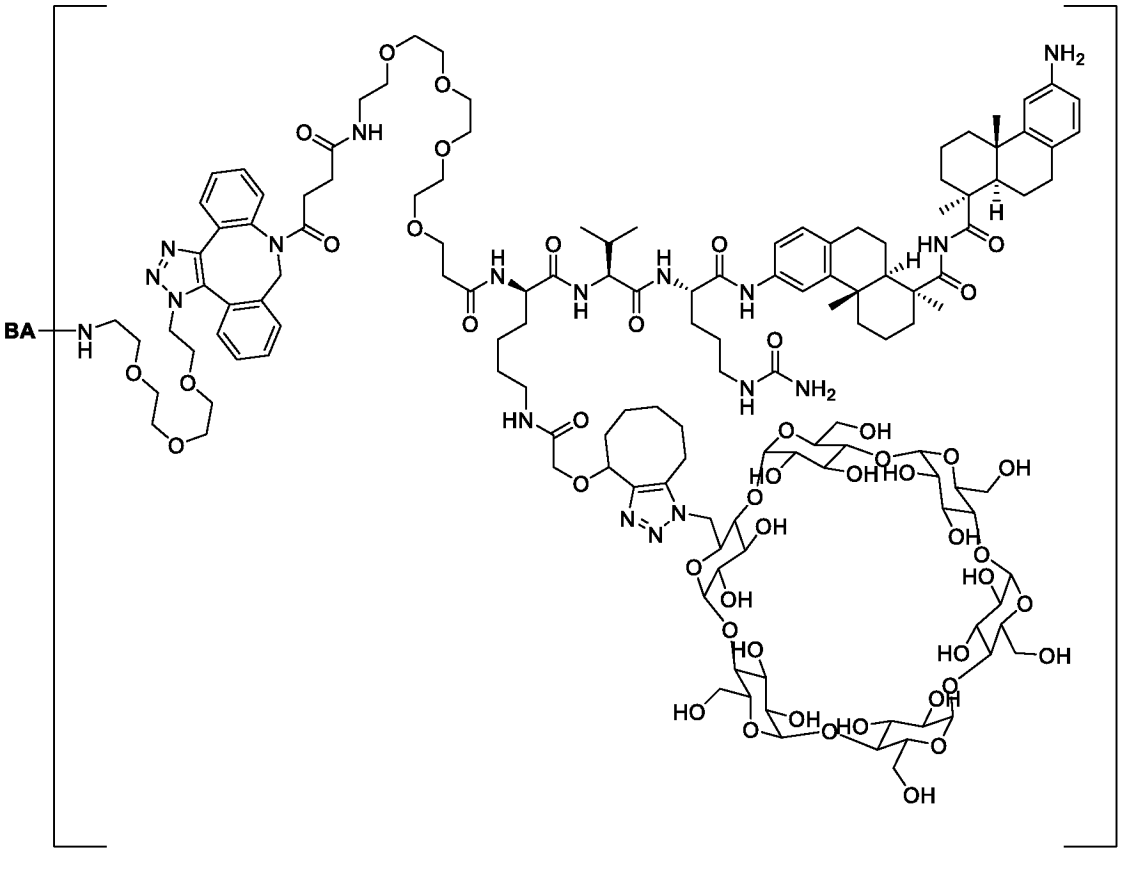
40. Соединение по любому из пп. 38 или 39, где соединение выбрано из группы, состоящей из

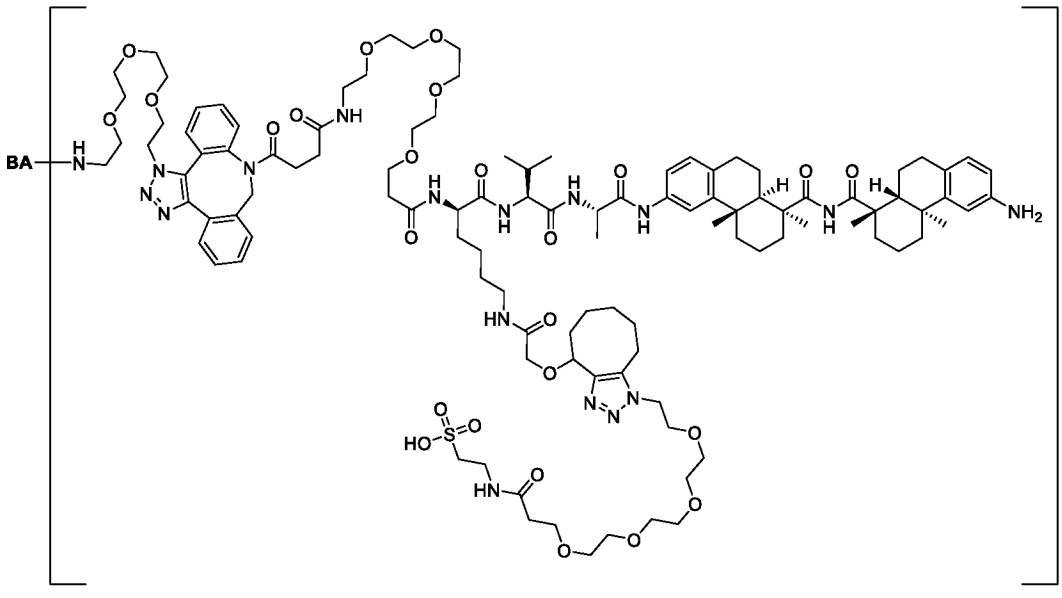


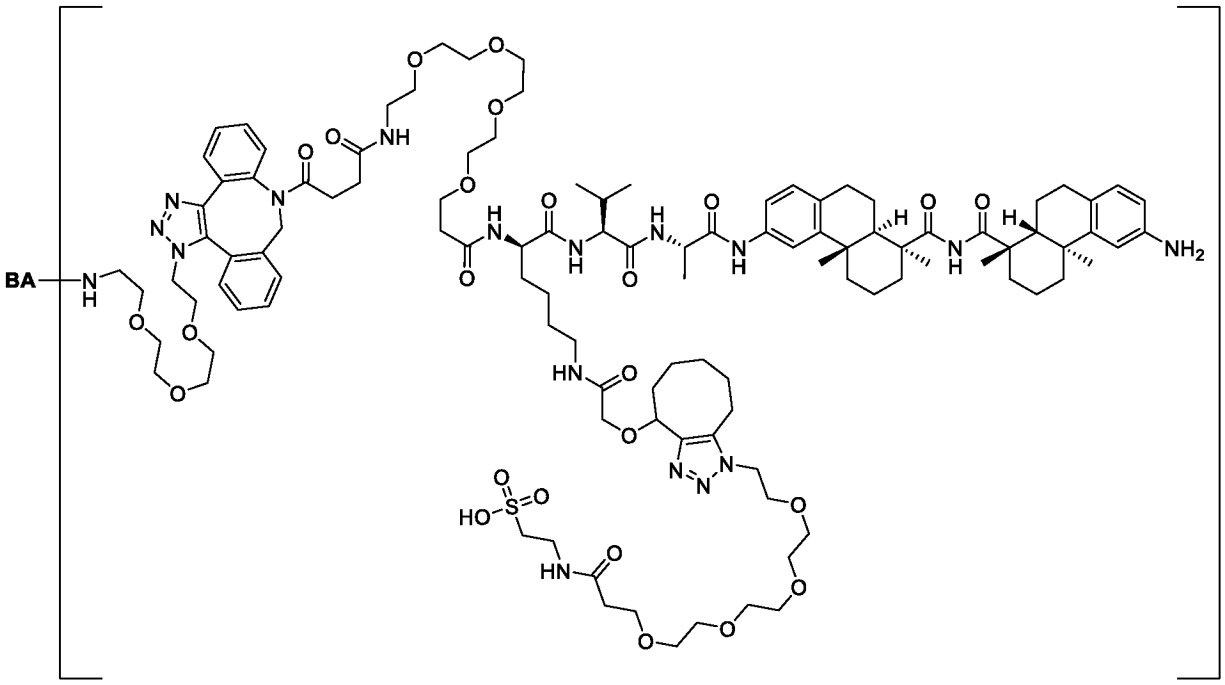
;

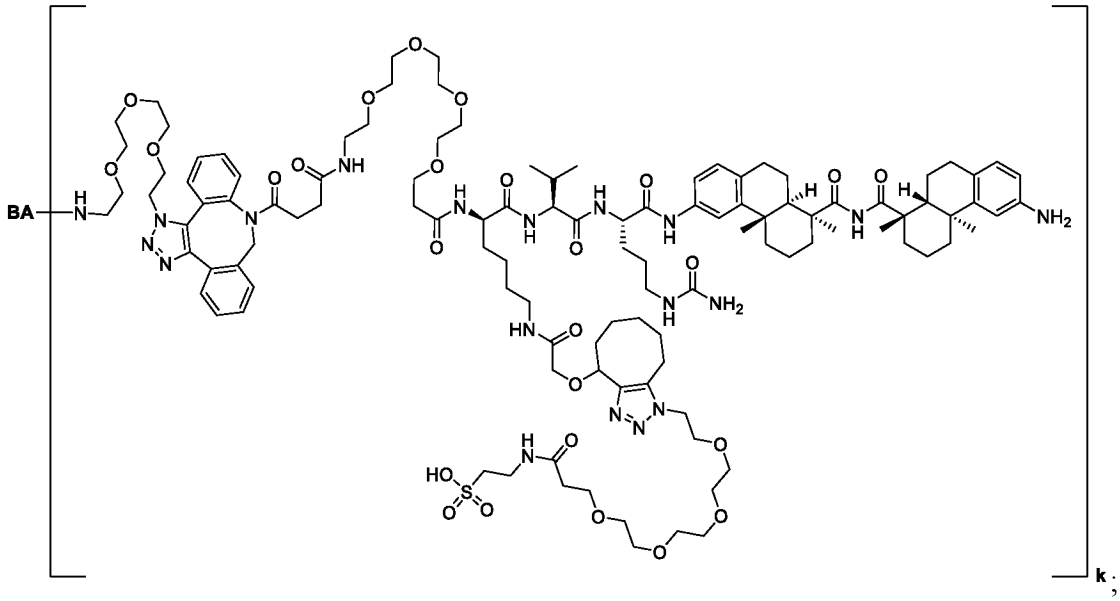

BA
NH2
HO
OH
HN
NH
O
N
k

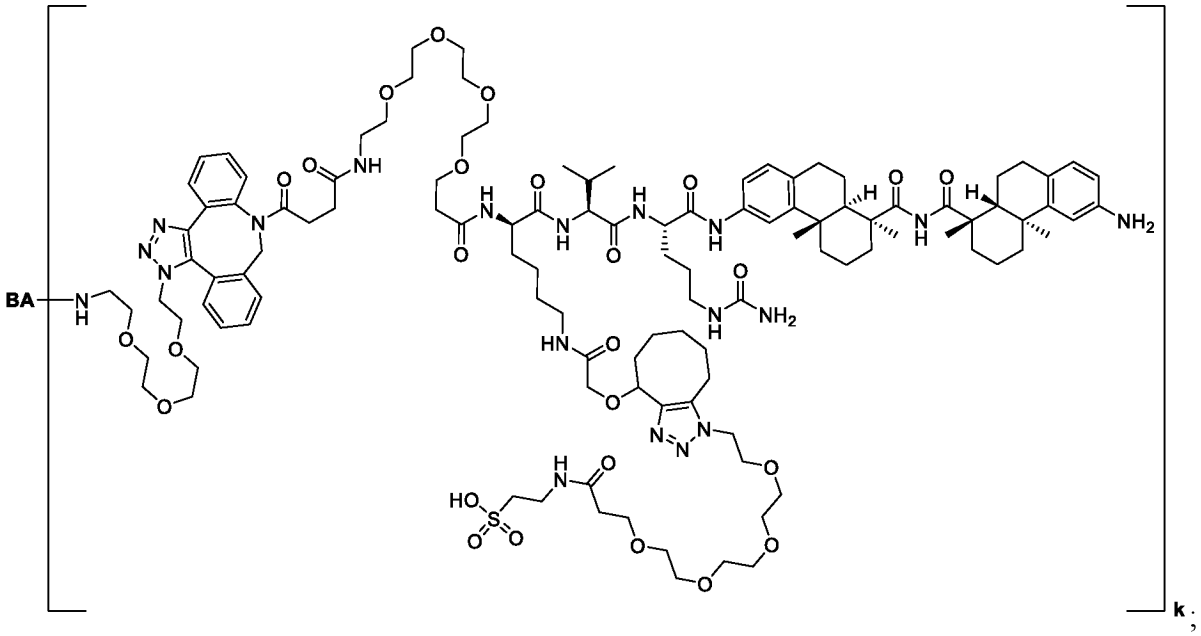

BA
NH2
HO
OH
HN
NH
O
N
k

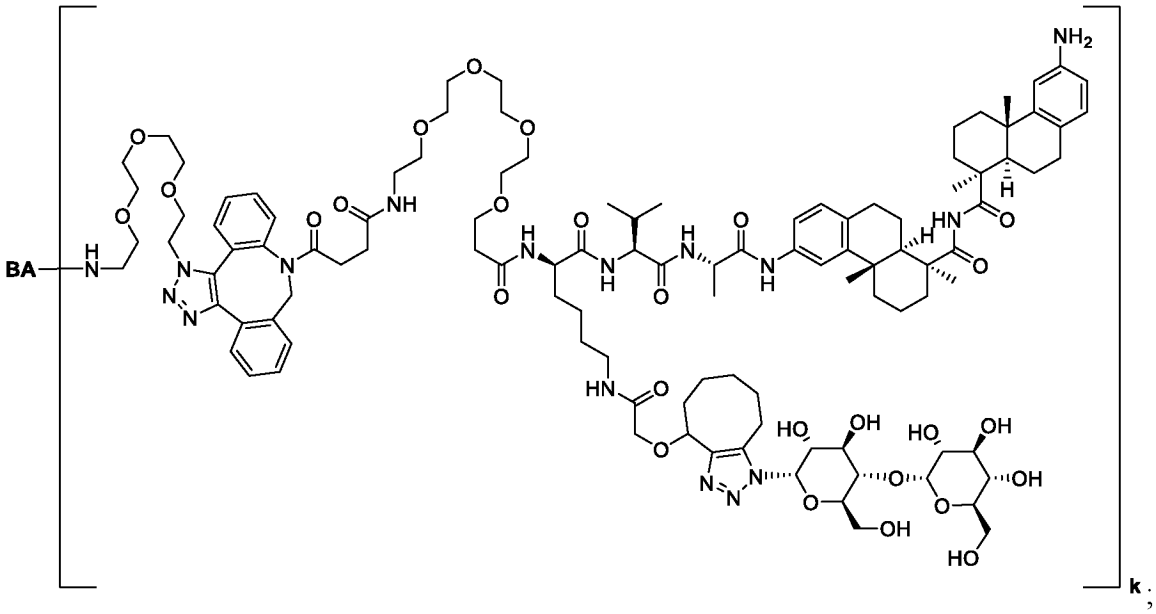


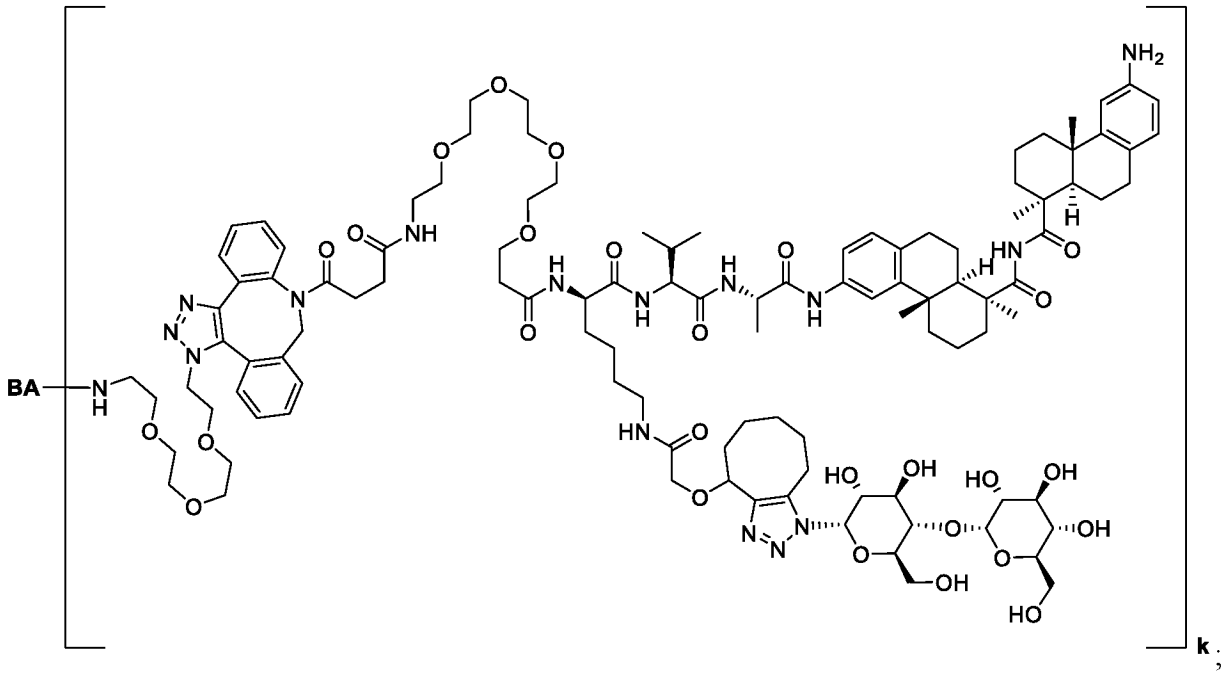


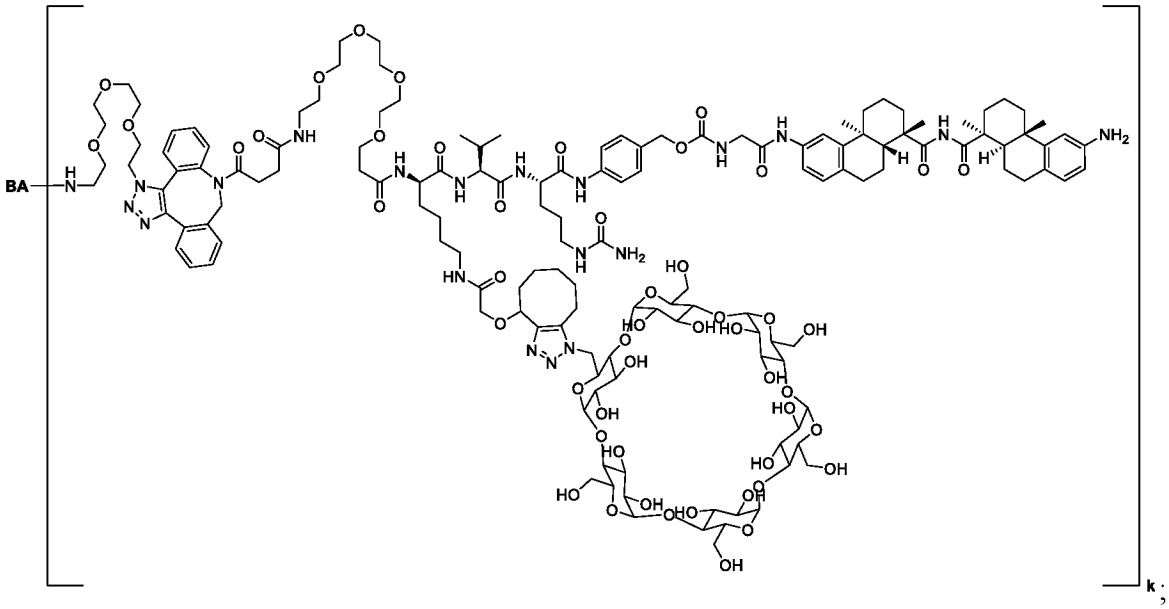


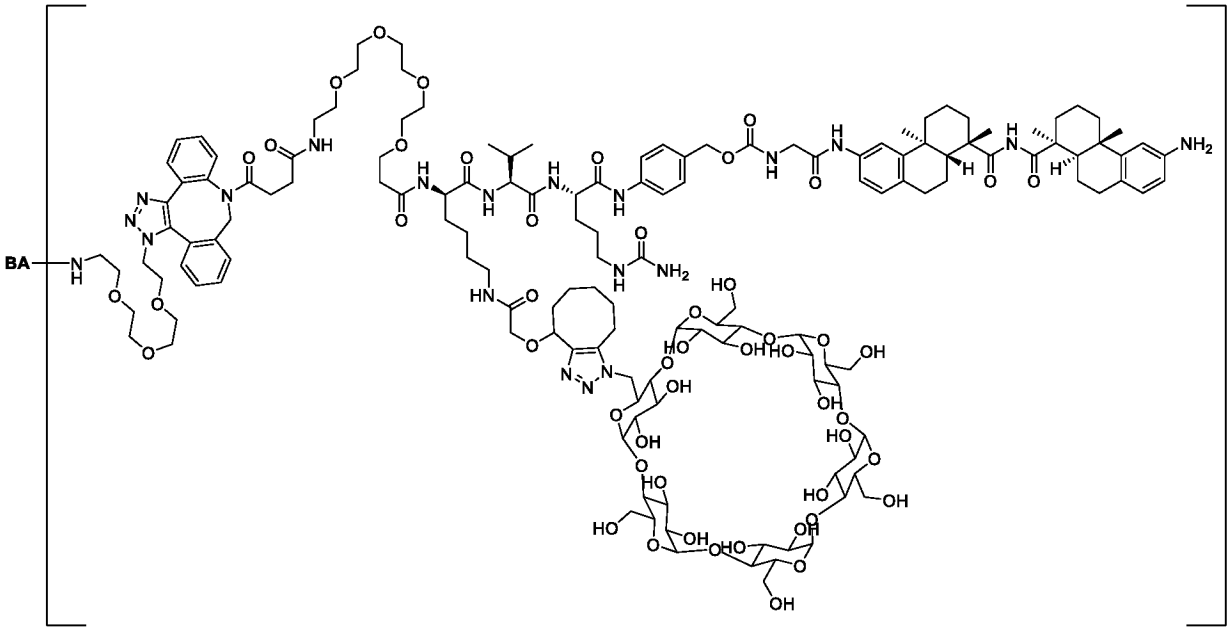


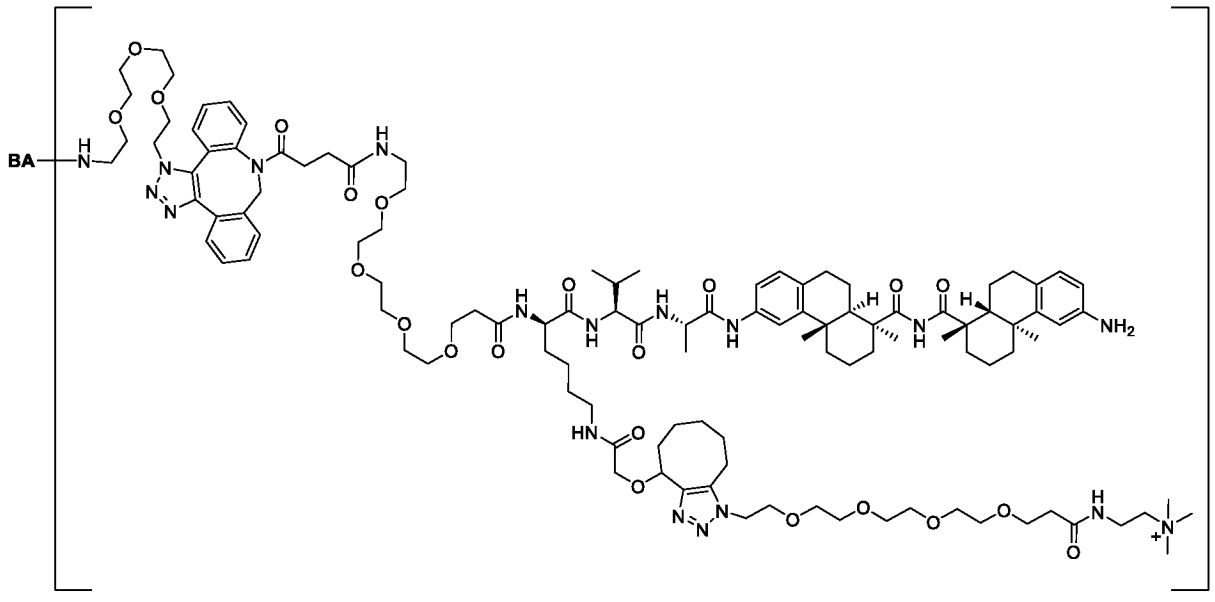




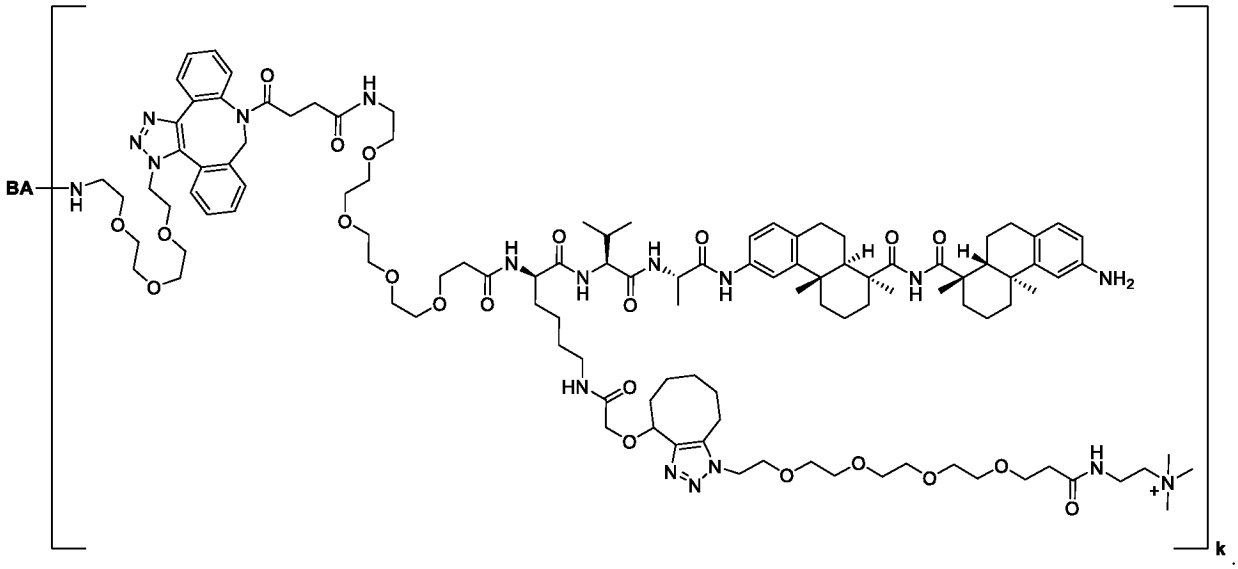








И



41. Соединение по пп. 34-40, где **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

42. Соединение по пп. 34-41, где **k** представляет собой целое число от 1 до 4.

43. Соединение по пп. 34-42, где **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает HER2.

44. Соединение по пп. 34-42, где **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает PRLR.

45. Соединение по пп. 34-42, где **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает MSR1.

46. Соединение по пп. 34-45, где **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и конъюгация осуществляется через по меньшей мере один остаток Q295.

47. Соединение по пп. 34-45, где **BA** представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и конъюгация осуществляется через два остатка Q295.

48. Соединение по пп. 34-47, где **BA** представляет собой антитело N297Q или его антигенсвязывающий фрагмент.

49. Соединение по пп. 34-48, где **BA** представляет собой антитело N297Q или его антигенсвязывающий фрагмент, и конъюгация осуществляется через по меньшей мере один остаток Q295 и по меньшей мере один остаток Q297.

50. Соединение по пп. 34-49, где **BA** представляет собой антитело N297Q или его антигенсвязывающий фрагмент, и конъюгация осуществляется через два остатка Q295 и два остатка Q297.

51. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение, линкер-полезную нагрузку или конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предшествующих пунктов и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель.

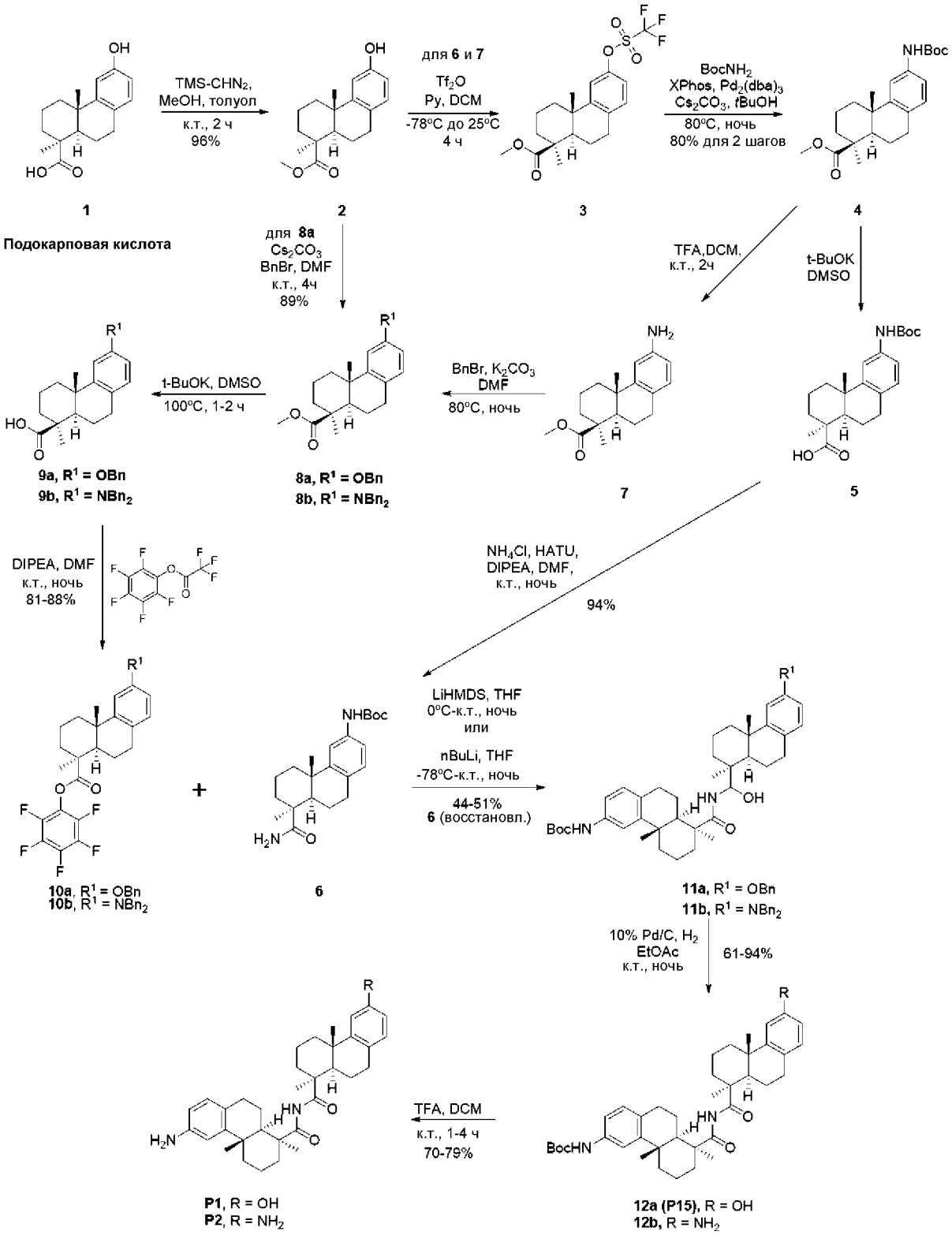
52. Способ лечения дислипидемии, метаболического заболевания, воспаления или нейродегенеративного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного лечебного количества соединения или фармацевтической композиции по любому из предшествующих пунктов.

53. Способ лечения дислипидемии у субъекта, включающий введение субъекту эффективного лечебного количества соединения или фармацевтической композиции по любому из предшествующих пунктов.

54. Способ лечения метаболического заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного лечебного количества соединения или фармацевтической композиции по любому из предшествующих пунктов.

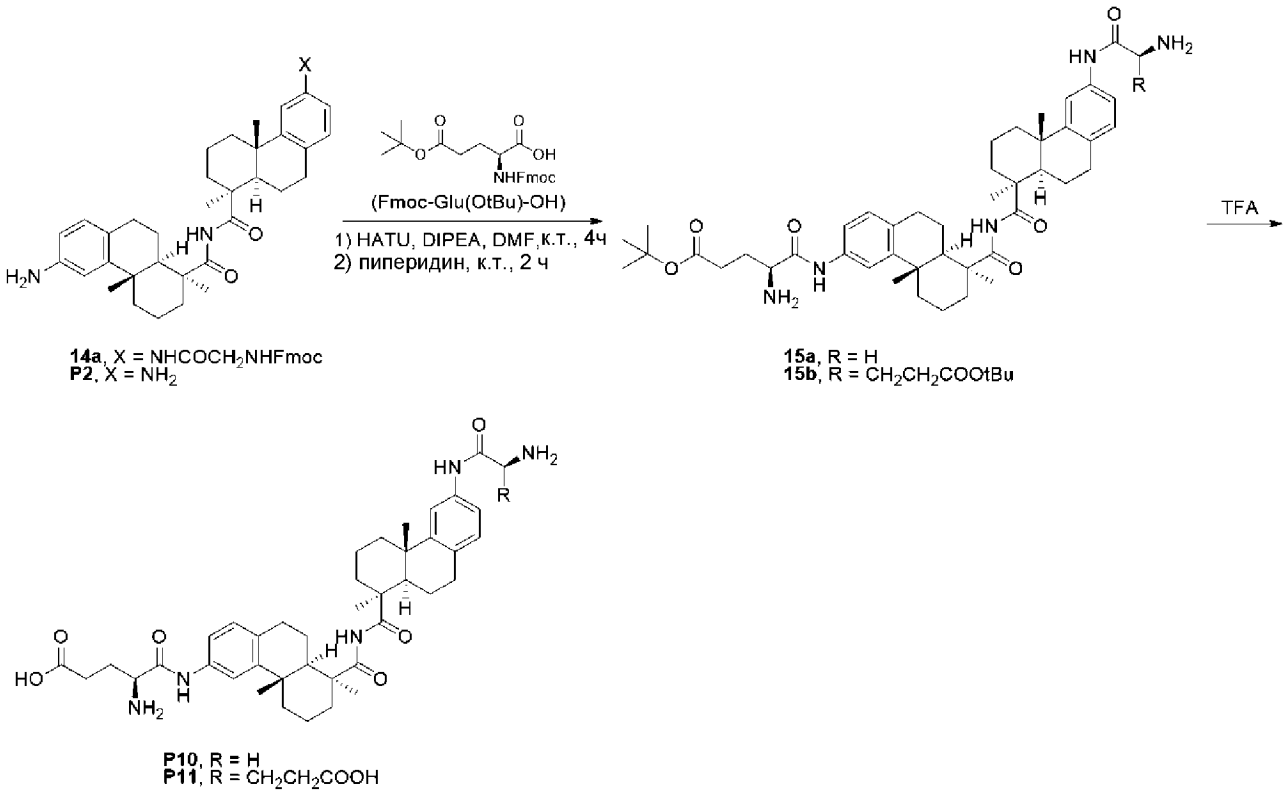
55. Способ лечения воспаления у субъекта, включающий введение субъекту эффективного лечебного количества соединения или фармацевтической композиции по любому из предшествующих пунктов.

56. Способ лечения нейродегенеративного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного лечебного количества соединения или фармацевтической композиции по любому из предшествующих пунктов.

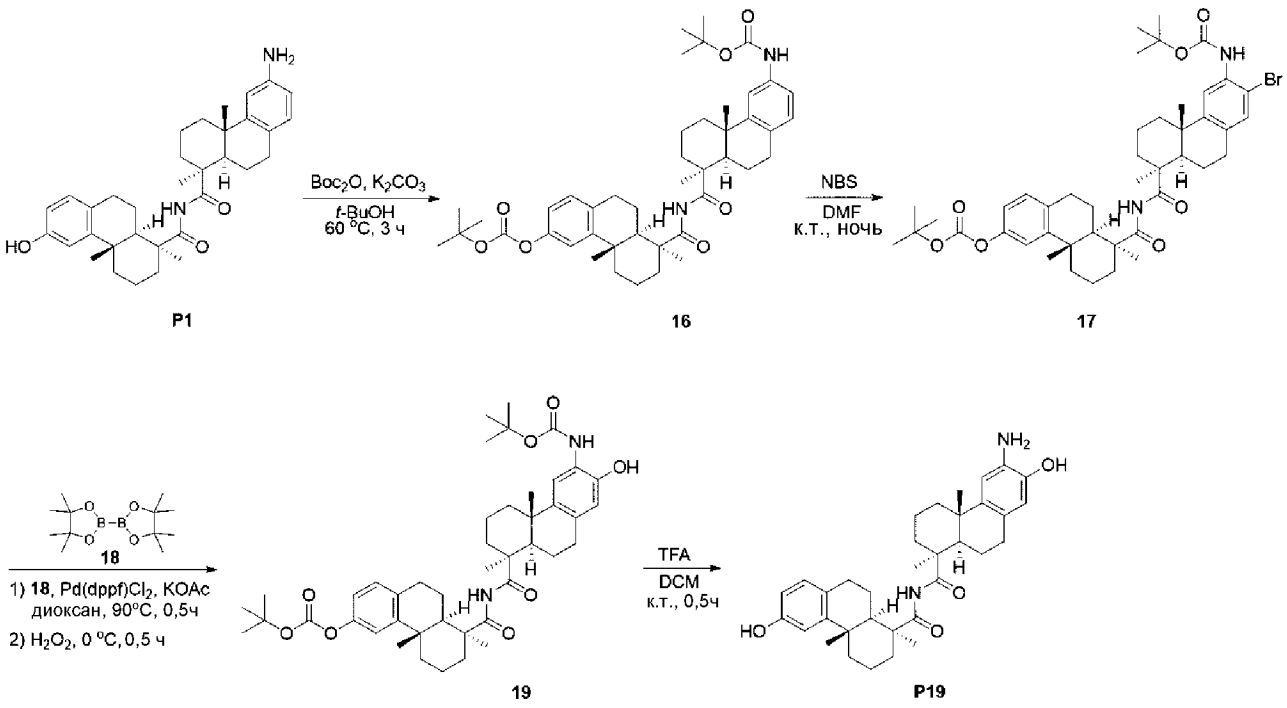


ФИГ. 1. Синтез P1 и P2

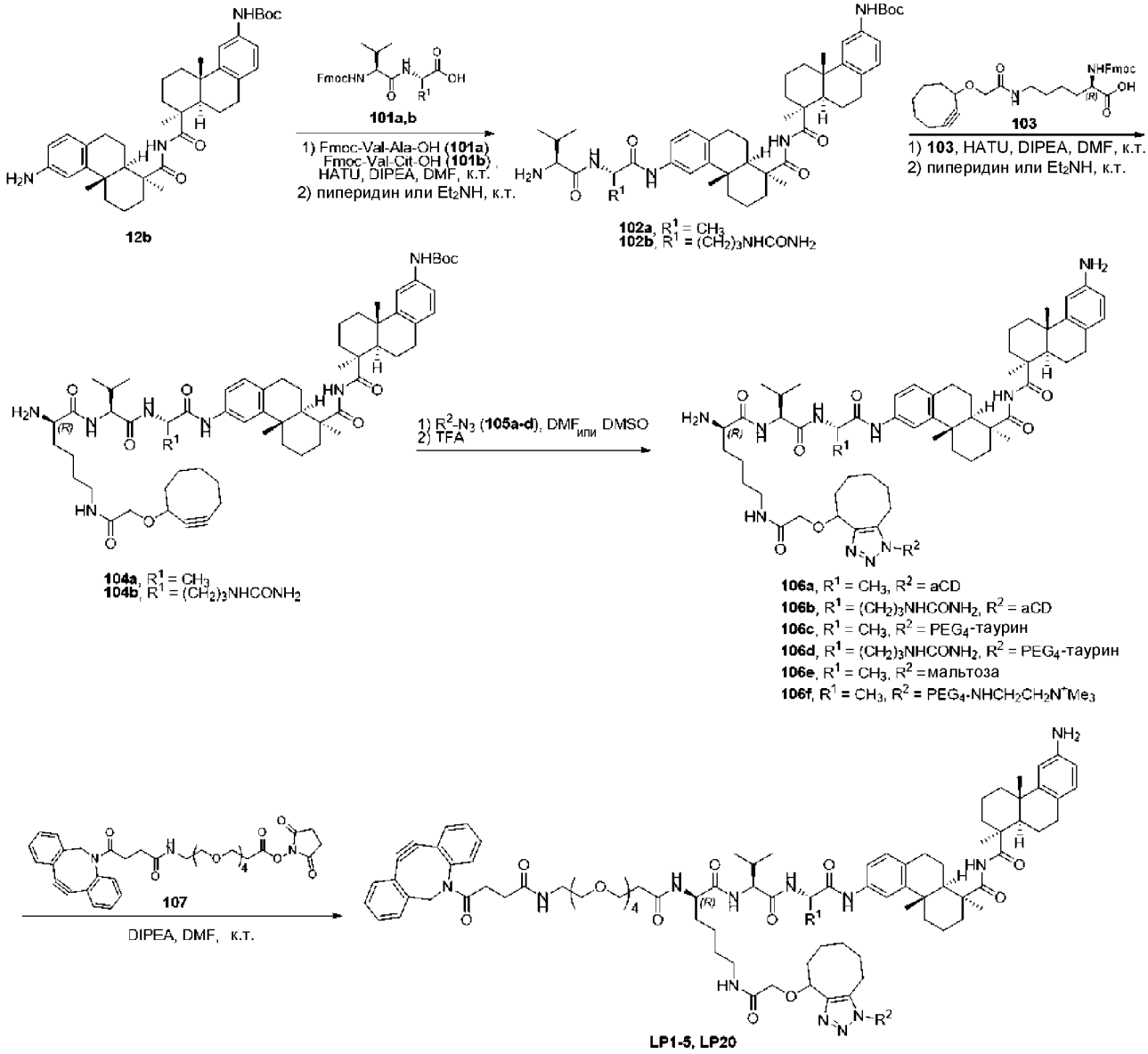
ФИГ. 2А. Синтез нагрузок P3-P9, P13, P14, и P17



ФИГ. 2B. Синтез нагрузок P10 и P11.

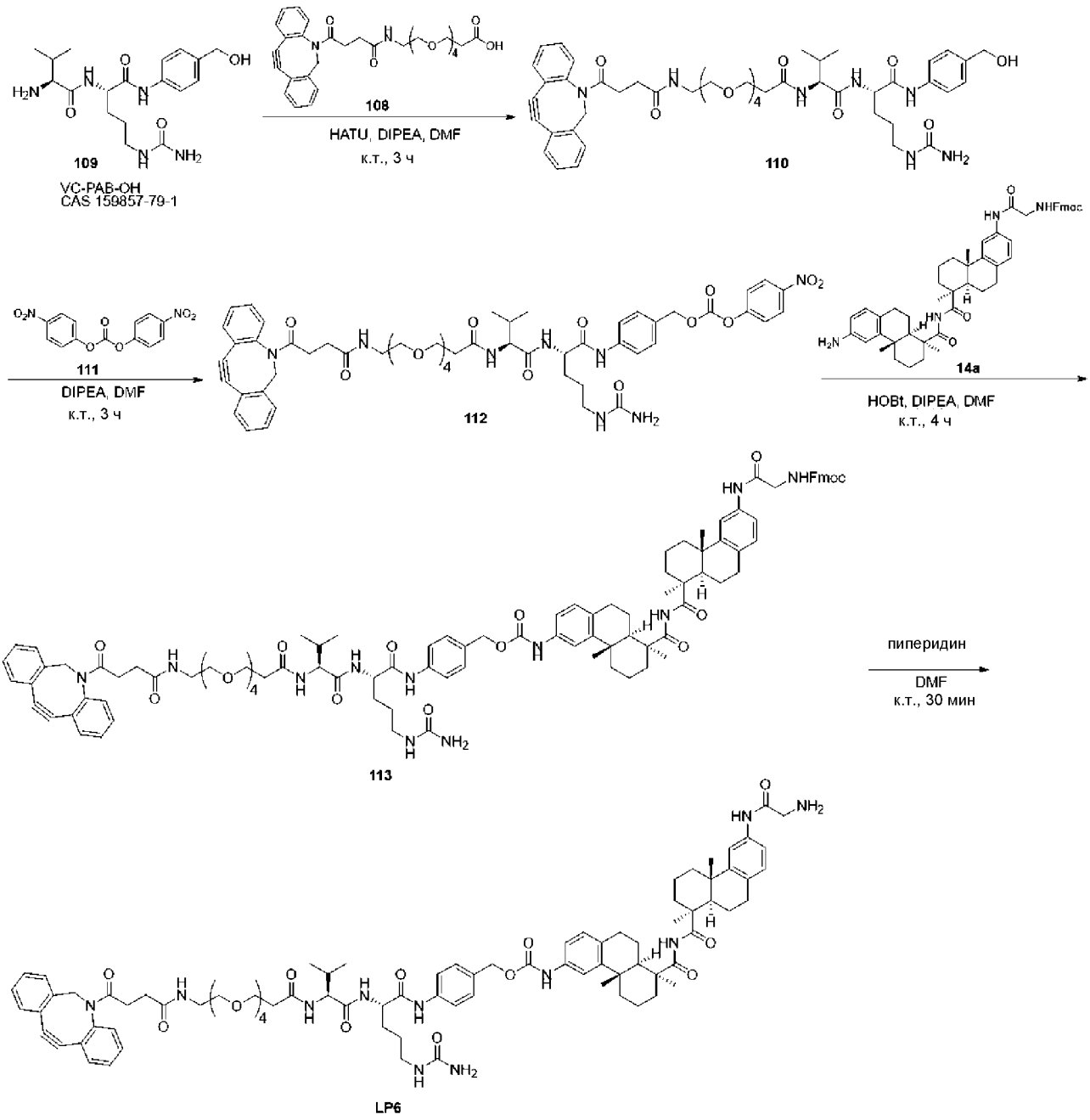


ФИГ. 2C. Синтез нагрузки P19

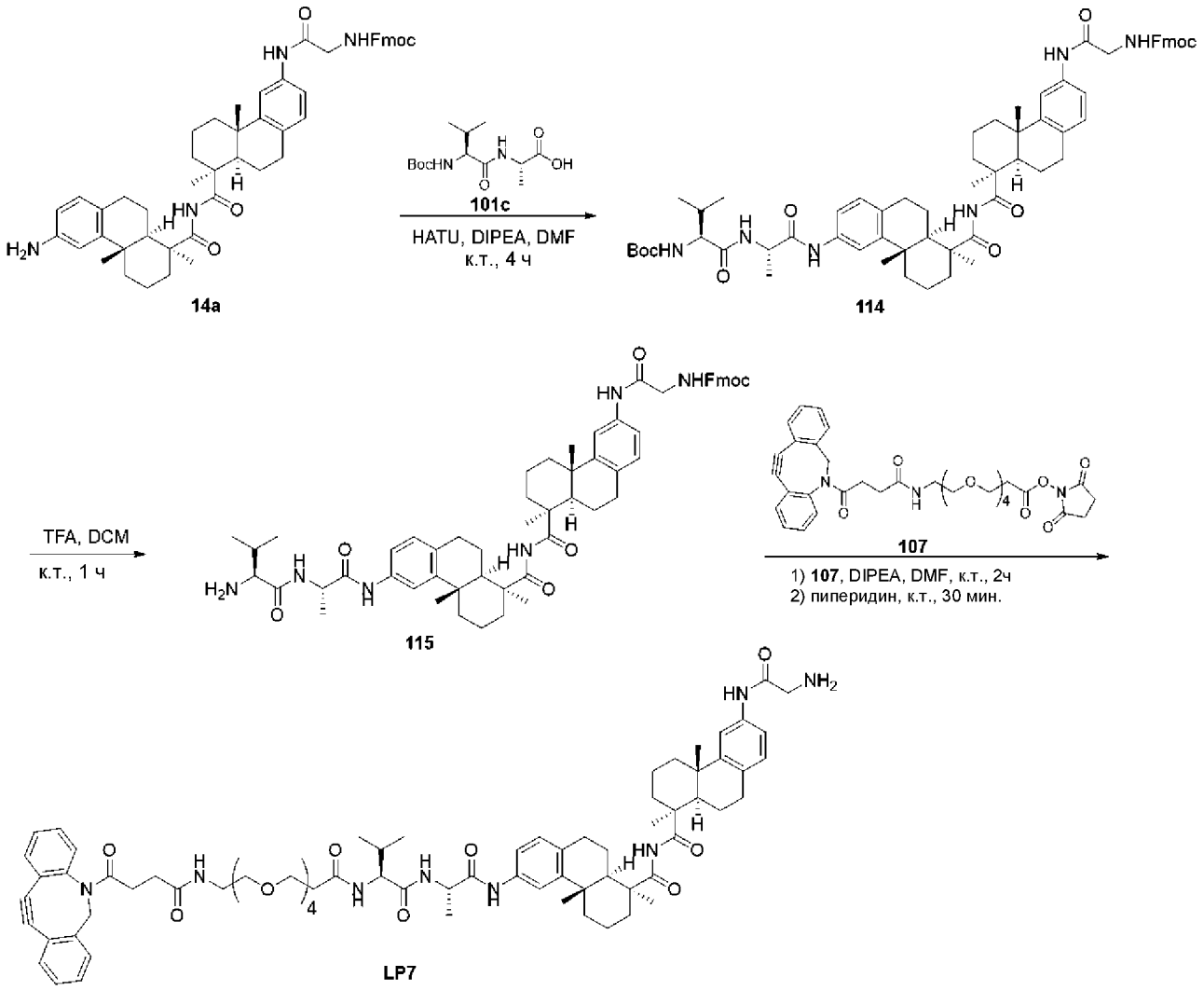


LP	R^1	R^2
LP1	CH_3	αCD
LP2	$(CH_2)_3NHCONH_2$	αCD
LP3	CH_3	PEG_4-таурин
LP4	$(CH_2)_3NHCONH_2$	PEG_4-таурин
LP5	CH_3	мальтоза
LP20	CH_3	PEG_4-$NHCH_2CH_2N^+Me_3$

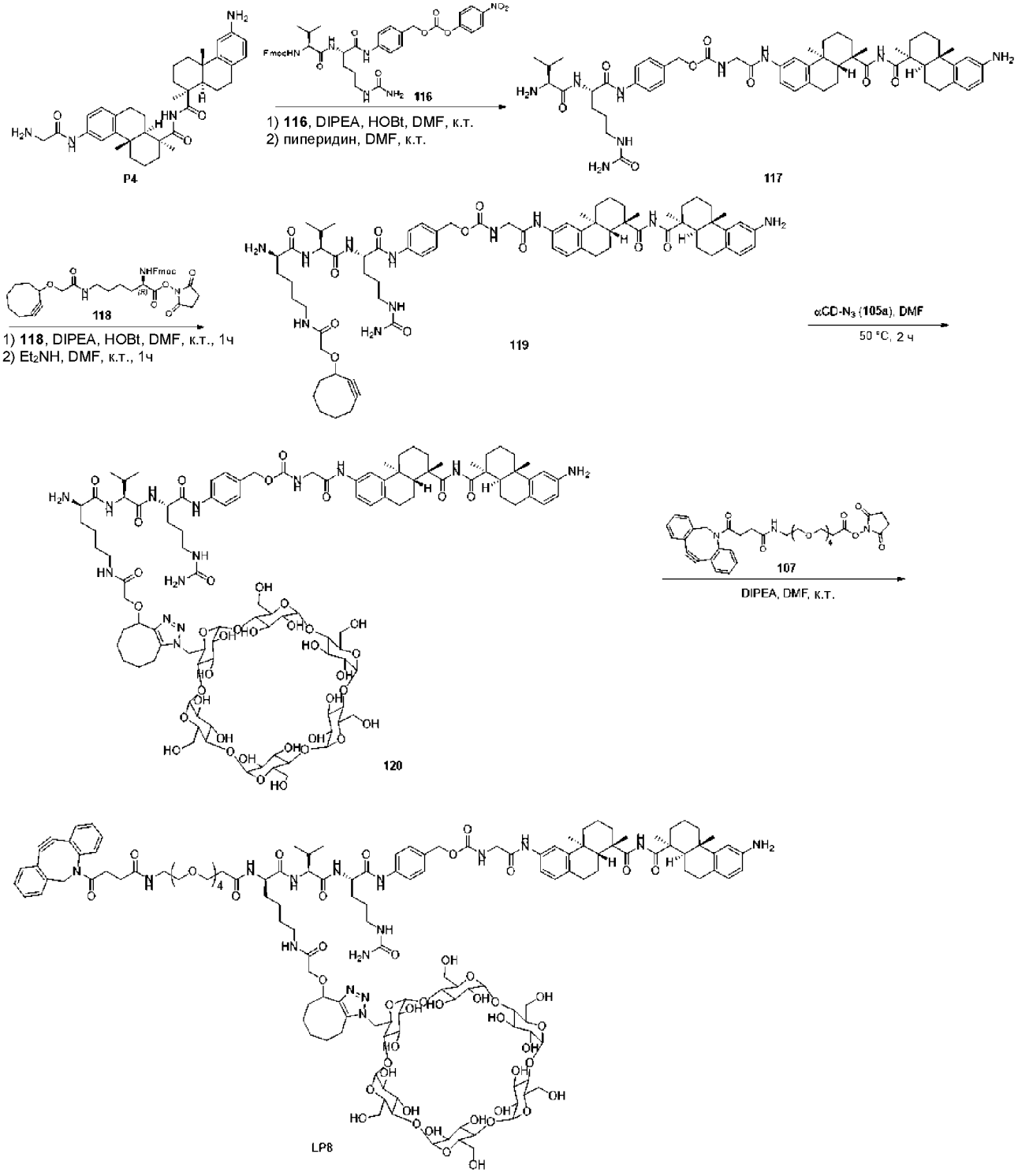
ФИГ. 3. Общий синтез линкера и LP1-5 и LP20



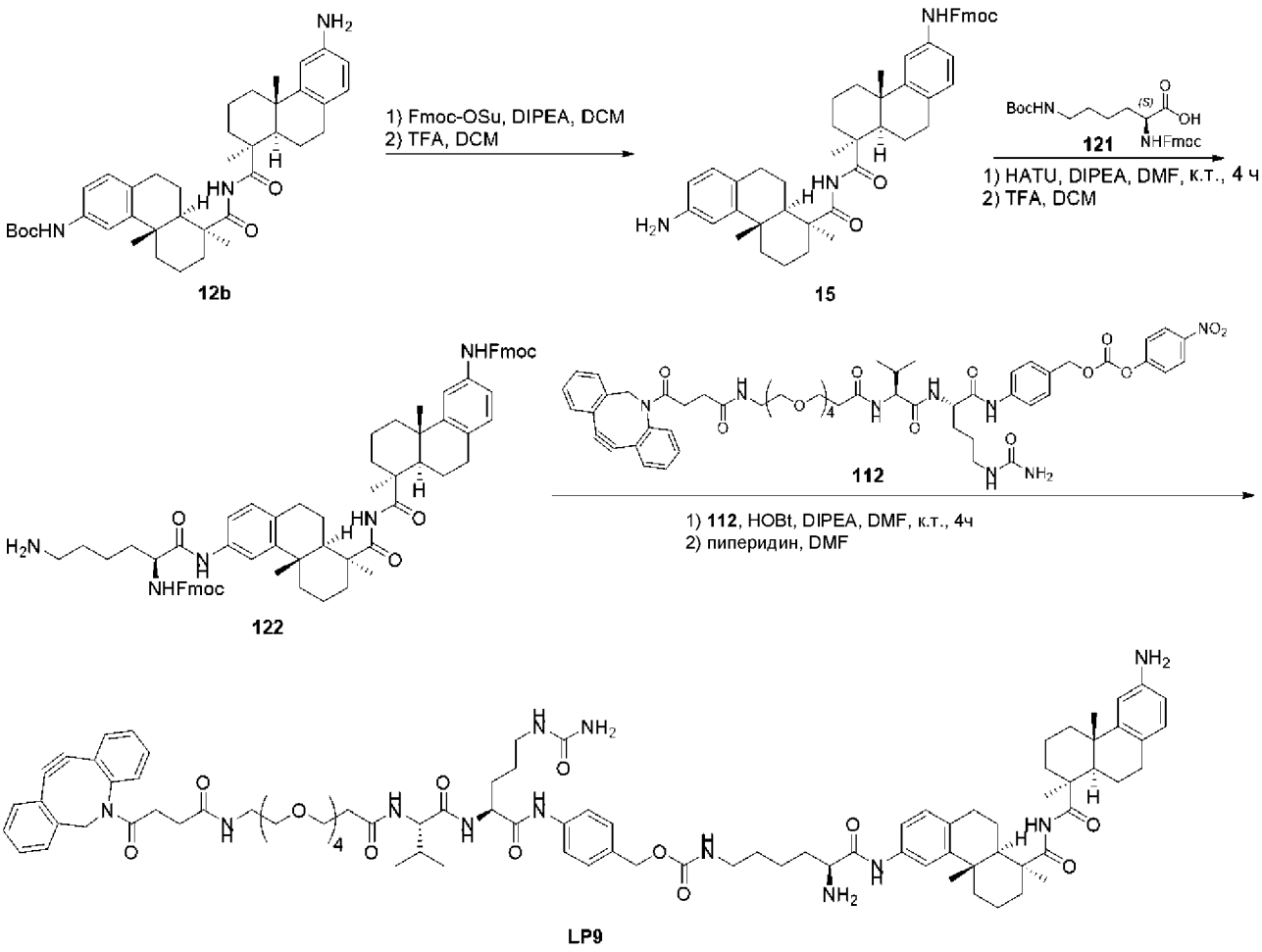
ФИГ.4 Синтез LP6



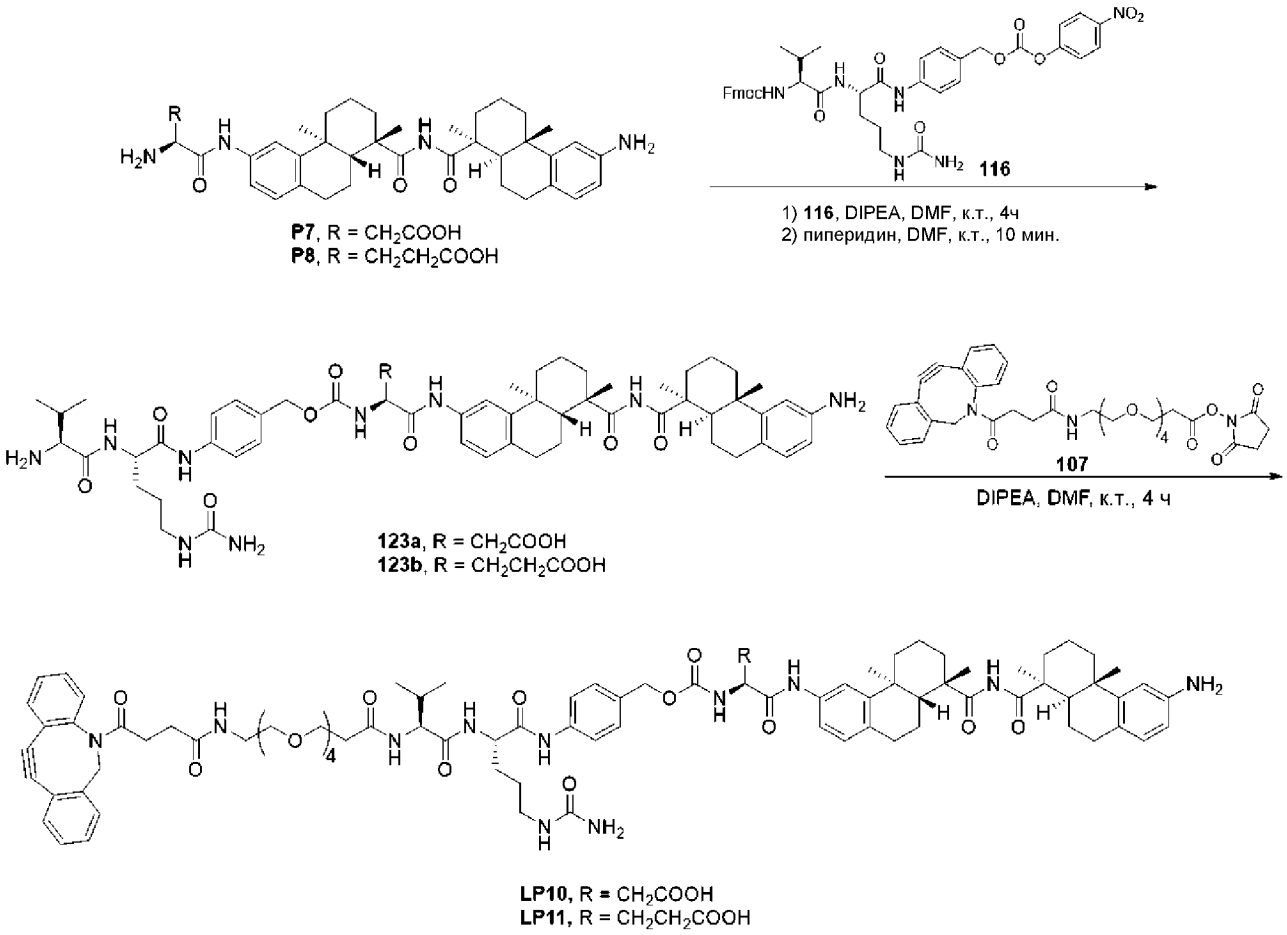
ФИГ.5 Синтез LP7



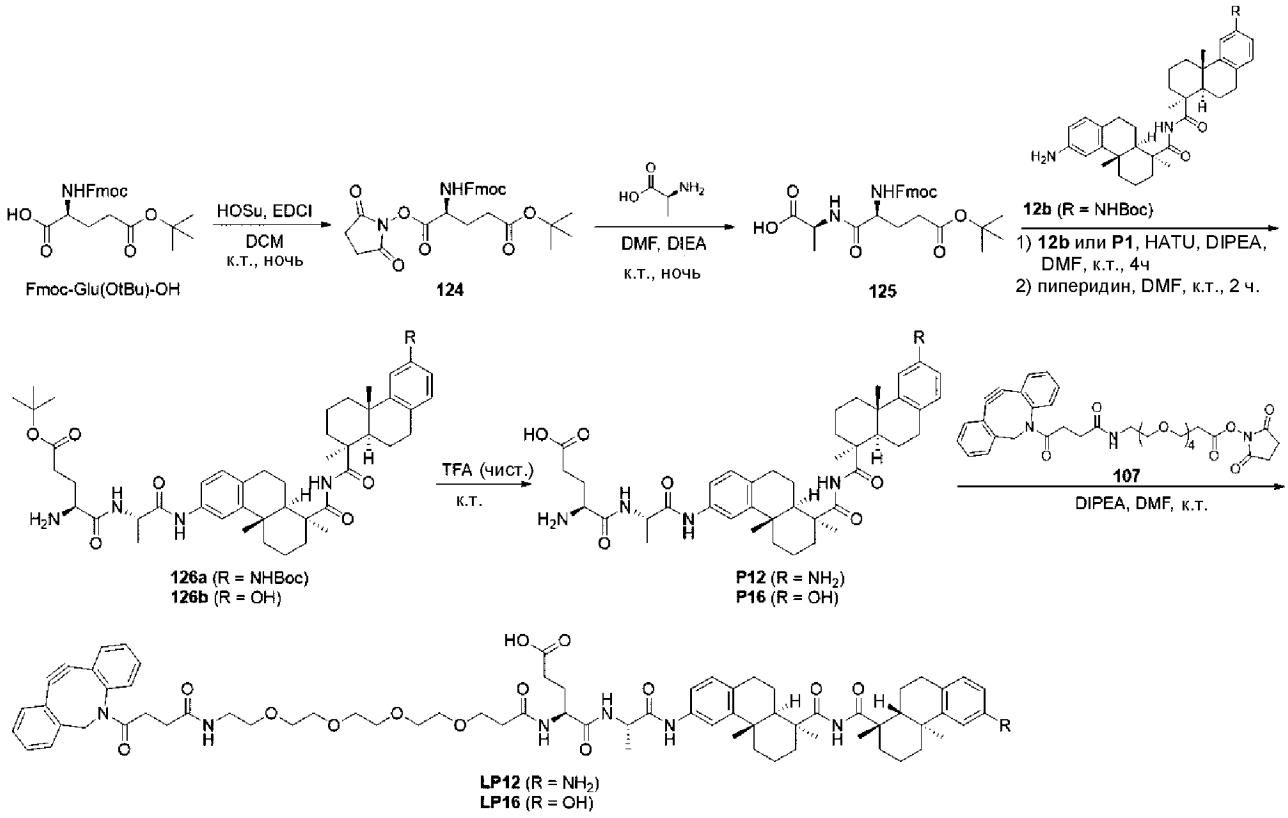
ФИГ.6 Синтез LP8



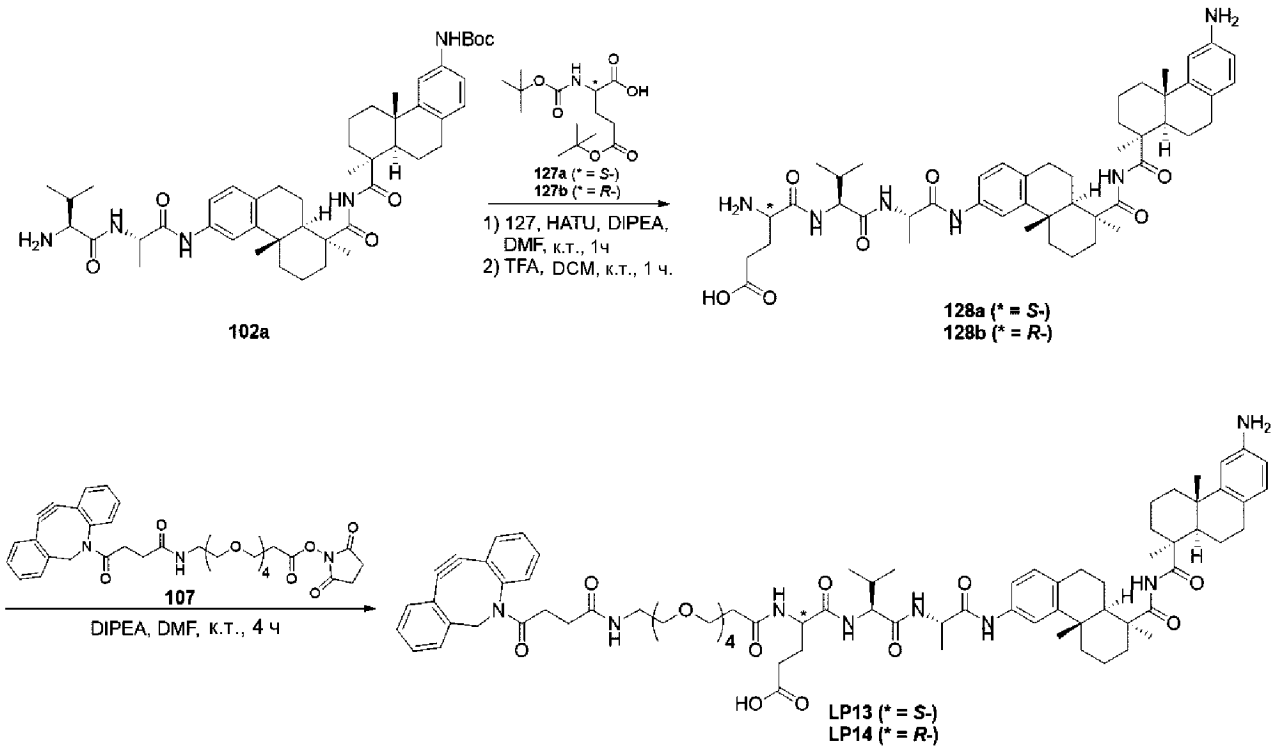
ФИГ.7 Синтез LP9



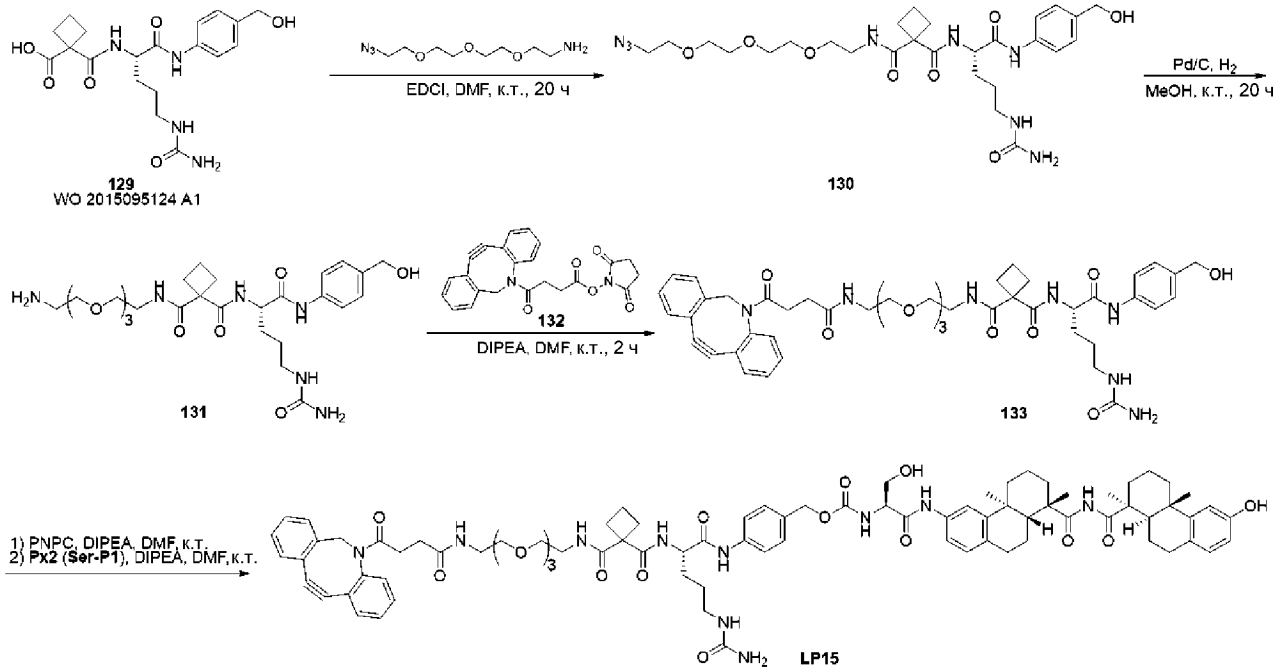
ФИГ.8 Синтез LP10 и LP11



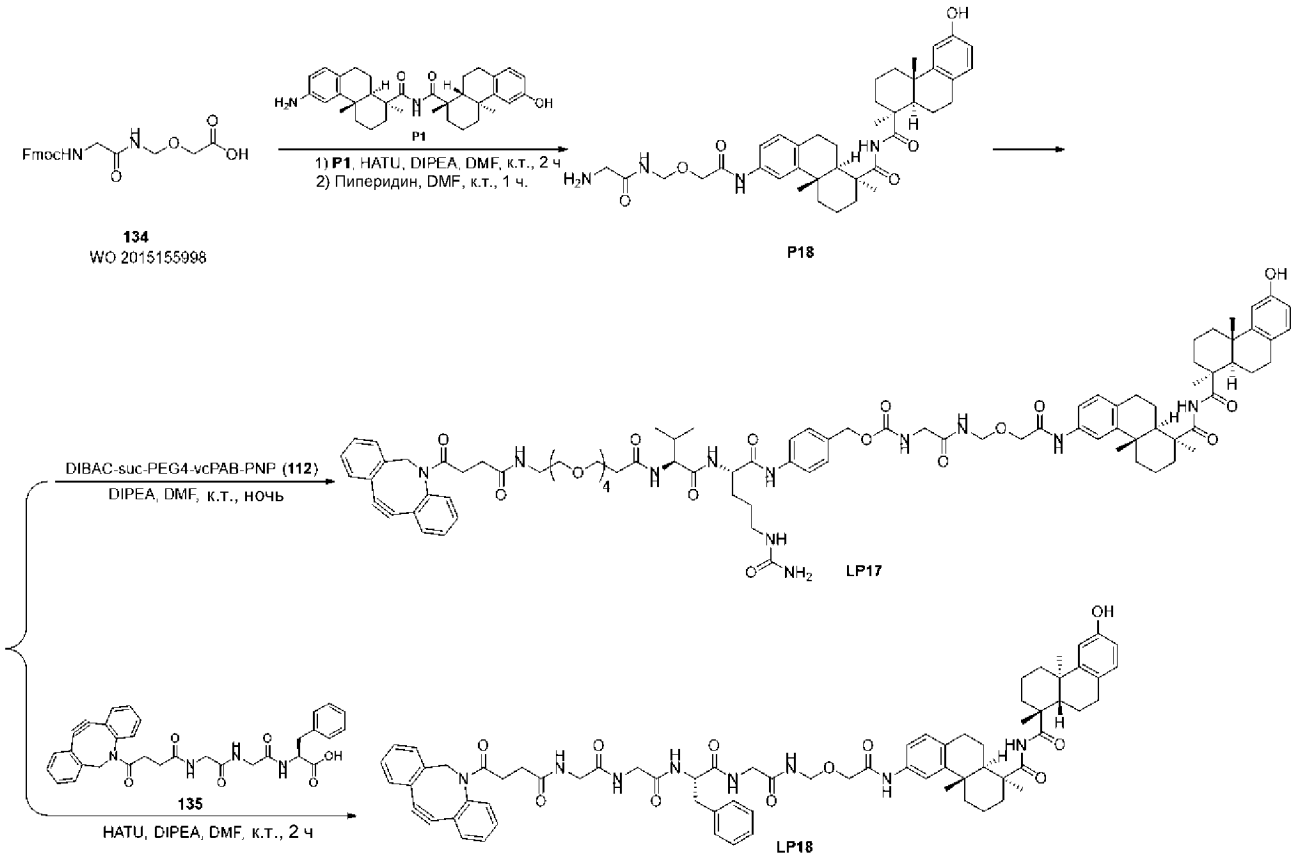
ФИГ.9 Синтез P12 и LP12; и P16 и LP16



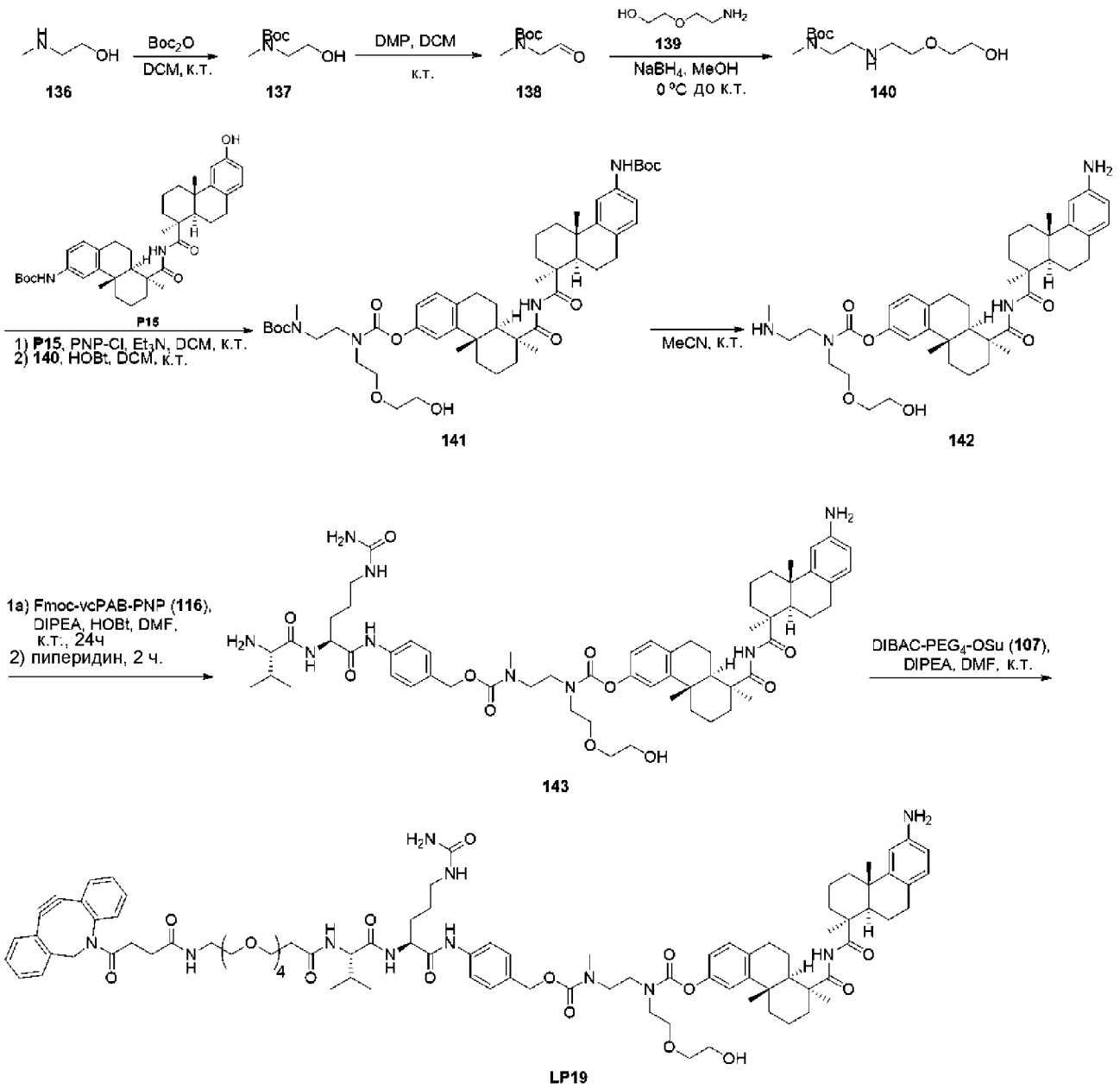
ФИГ.9А. Синтез LP13 и LP14



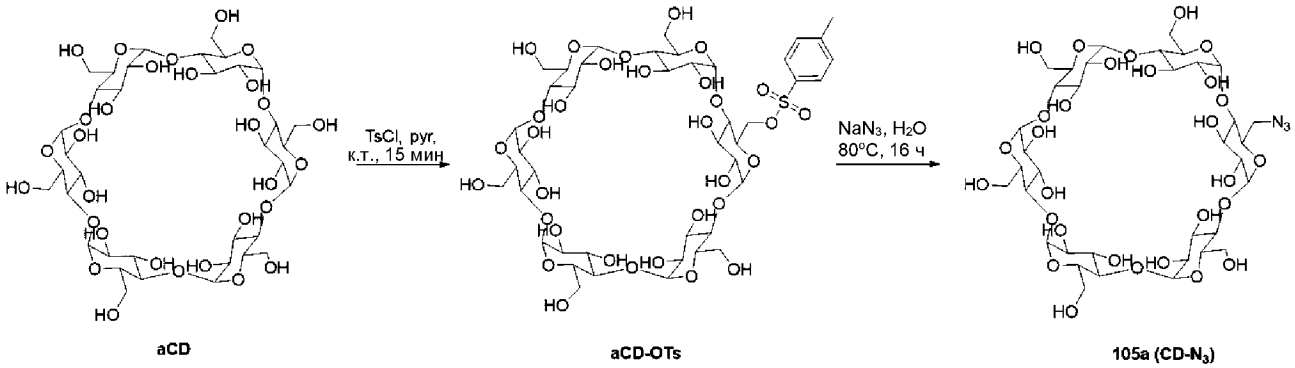
ФИГ.9В. Синтез LP15



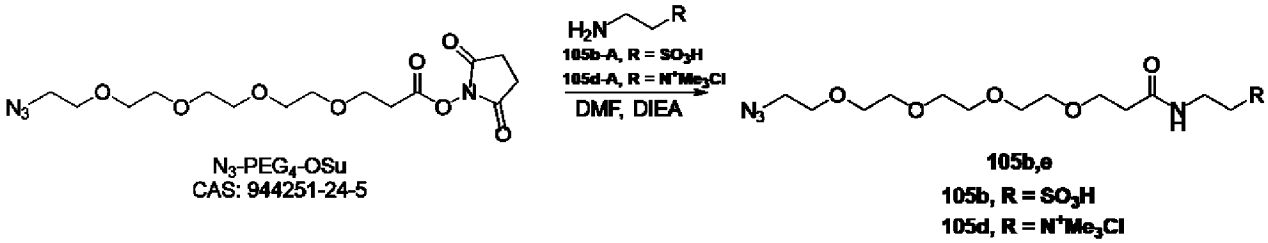
ФИГ.9С. Синтез P18 и LP17 и LP18



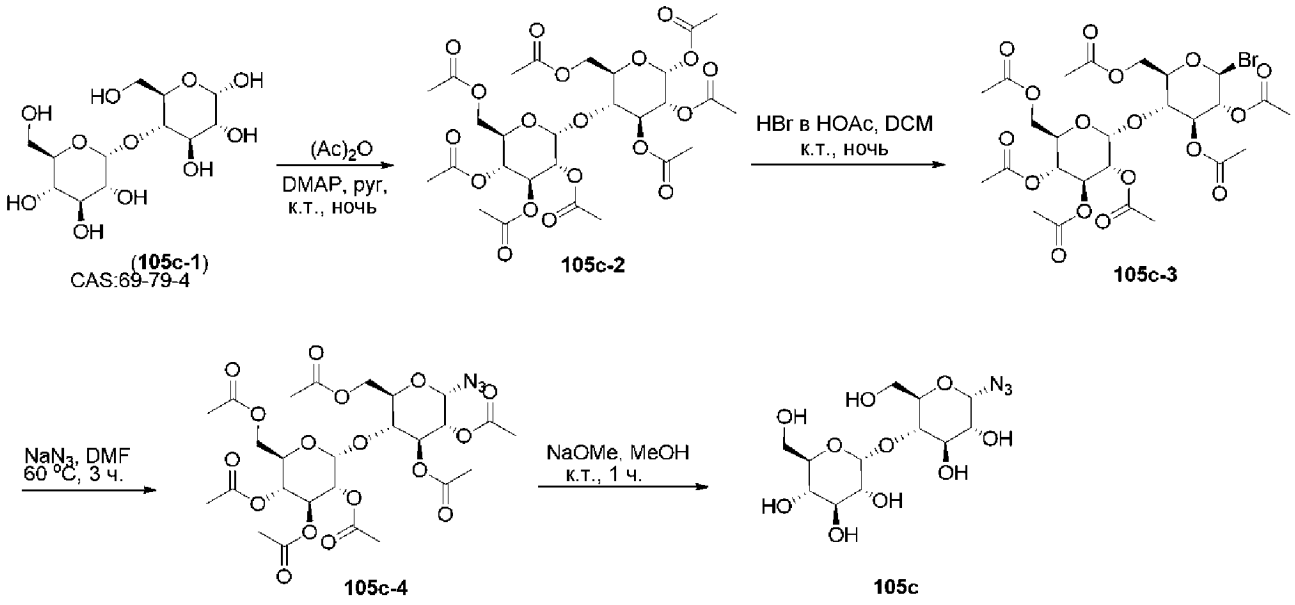
ФИГ.9D. Синтез LP19



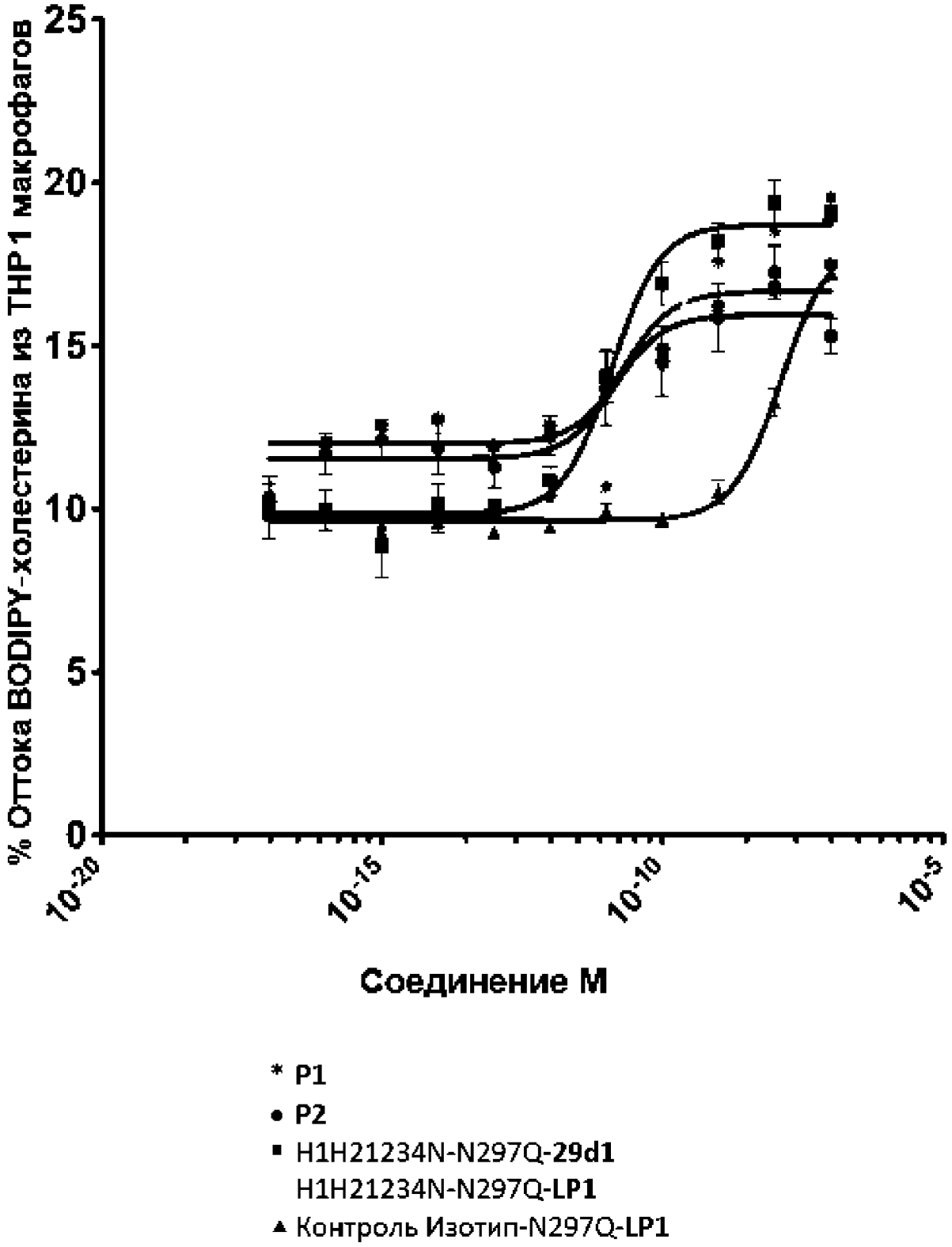
ФИГ.10. Синтез Азида 105a



ФИГ.11. Синтез Азида 105b



ФИГ.12. Синтез промежуточного продукта 105c



ФИГ.13. Активация оттока холестерина ADC с анти-MSR1, имеющим полезную нагрузку P2