

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202192984** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2022.05.13**

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

(22) Дата подачи заявки  
**2020.06.04**

---

(54) **КОНЬЮГАТЫ ПИРРОЛОБЕНЗОДИАЗЕПИН-АНТИТЕЛО**

---

(31) **1908128.0**

(32) **2019.06.07**

(33) **GB**

(86) **PCT/EP2020/065506**

(87) **WO 2020/245283 2020.12.10**

(71) Заявитель:

**АДС ТЕРАПЬЮТИКС СА (СН);  
МЕДИММЬОН ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:

**Ван Беркел Патрисиус Хендрикус  
Корнелис (GB)**

(74) Представитель:

**Нилова М.И. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство (ADC) пирролобензодиазепинов (ПБД), конъюгированных с антителом, которое связывается с КААГ1 (антигеном 1, связанным с почками).

**202192984**  
**A1**

**202192984**

**A1**

## КОНЬЮГАТЫ ПИРРОЛОБЕНЗОДИАЗЕПИН-АНТИТЕЛО

### Предшествующая заявка

5 Эта заявка испрашивает приоритет по заявке Великобритании номер GB1908128.0, поданной 7 июня 2019 года.

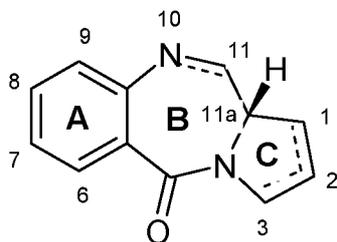
### Область техники

10 Данное изобретение относится к пирролобензодиазепинам (ПБД), имеющим лабильную защитную группу для C2 или N10 в форме линкера к антителу.

### Уровень техники

#### Пирролобензодиазепины

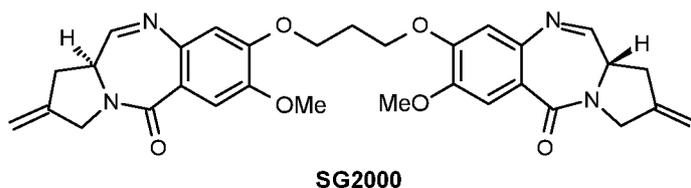
Некоторые пирролобензодиазепины (ПБД) обладают способностью распознавать специфические последовательности ДНК и связываться с ними; предпочтительной последовательностью является PuGpu.  
15 Первый противоопухолевый ПБД антибиотик антрамицин был открыт в 1965 году (Leimgruber, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 5793-5795 (1965); Leimgruber, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 5791-5793 (1965)). С тех пор был зарегистрирован ряд встречающихся в природе ПБД, и было разработано более 10 путей синтеза различных аналогов (Thurston, *et al.*, *Chem. Rev.* **1994**, 433-465 (1994); Antonow, D. and Thurston, D.E., *Chem. Rev.* **2011**  
20 111 (4), 2815-2864). Члены семейства включают аббеймицин (Hochlowski, *et al.*, *J. Antibiotics*, **40**, 145-148 (1987)), чикамицин (Konishi, *et al.*, *J. Antibiotics*, **37**, 200-206 (1984)), DC-81 (Japanese Patent 58-180 487; Thurston, *et al.*, *Chem. Brit.*, **26**, 767-772 (1990); Bose, *et al.*, *Tetrahedron*, **48**, 751-758 (1992)), мазетрамицин (Kuminoto, *et al.*, *J. Antibiotics*, **33**, 665-667 (1980)), неотрамицин А и В (Takeuchi, *et al.*, *J. Antibiotics*, **29**, 93-96 (1976)), поротрамицин (Tsunakawa, *et al.*, *J. Antibiotics*, **41**, 1366-1373 (1988)), протракарцин (Shimizu, *et al.*, *J. Antibiotics*, **29**, 2492-2503 (1982); Langley and Thurston, *J. Org. Chem.*, **52**, 91-97 (1987)), сибаномицин (DC-  
25 102)(Hara, *et al.*, *J. Antibiotics*, **41**, 702-704 (1988); Itoh, *et al.*, *J. Antibiotics*, **41**, 1281-1284 (1988)), сибиромицин (Leber, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 2992-2993 (1988)) и томамицин (Arima, *et al.*, *J. Antibiotics*, **25**, 437-444 (1972)). ПБД имеют следующую общую структуру:



30 Они различаются по числу, типу и положению заместителей, как в своих ароматических А-кольцах, так и в пиррольных С-кольцах, и по степени насыщения С-кольца. В положении N10-C11 В-кольца, которое представляет собой электрофильный центр, ответственный за алкилирование ДНК, находится либо имин (N=C), либо карбиноламин (NH-CH(OH)), либо метиловый эфир карбиноламина (NH-CH(OMe)). Все известные природные продукты имеют (S)-конфигурацию хирального центра C11a, что обеспечивает  
35 правозакрученную «твист»-форму если смотреть со стороны С-кольца в направлении А-кольца. Это придает

им подходящую трехмерную форму для изоспиральности с малой бороздкой В-формы ДНК, что приводит к точному соответствию в сайте связывания (Kohn, In *Antibiotics III*. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975); Hurley and Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.*, **19**, 230-237 (1986)). Их способность образовывать аддукт в малой бороздке позволяет им препятствовать процессингу ДНК, обеспечивая возможность их применения в качестве противоопухолевых агентов.

Особыми преимуществами обладает пирролобензодиазепин, описанный в Gregson *et al.* (*Chem. Commun.* **1999**, 797-798) как соединение **1** и в Gregson *et al.* (*J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1161-1174), как соединение **4a**. Указанное соединение, также известное как SG2000, показано ниже:



WO 2007/085930 описывает получение димерных соединений ПБД, имеющих линкерные группы для соединения с агентом, связывающим клетки, таким как антитело. Линкер присутствует в мостике, связывающем мономерные звенья ПБД димера.

Авторы данного изобретения описали димерные ПБД соединения, содержащие линкерные группы для присоединения к связывающемуся с клетками агенту, такому как антитело, в WO 2011/130613 и WO 2011/130616. Линкер в этих соединениях присоединен к ядру ПБД через положение C2 и обычно расщепляется под действием фермента на линкерную группу. В WO 2011/130598 линкер в этих соединениях присоединен к одному из доступных положений N10 на ядре ПБД и обычно расщепляется под действием фермента на линкерную группу.

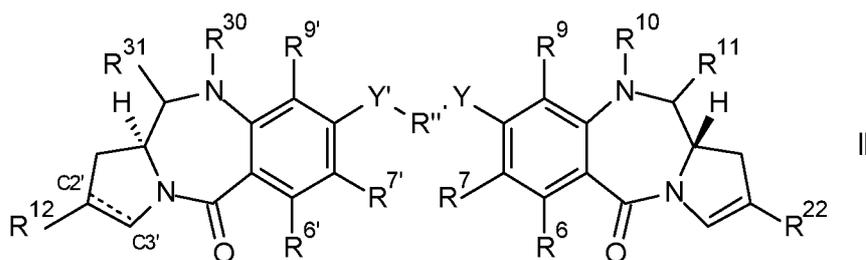
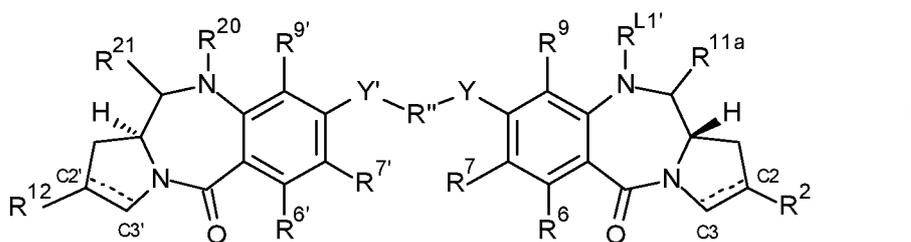
#### Конъюгаты антитело-лекарственное средство

Терапия с использованием антител была разработана для целенаправленного лечения пациентов, страдающих онкологическим заболеванием, иммунологическими и ангиогенными расстройствами (Carter, P. (2006) *Nature Reviews Immunology* 6:343-357). Применение конъюгатов антитело-лекарственное средство (КАЛС), то есть иммуноконъюгатов, для местной доставки цитотоксических или цитостатических агентов, то есть лекарственных средств для уничтожения или подавления опухолевых клеток при лечении онкологического заболевания, обеспечивает направленную доставку фрагмента лекарственного компонента к опухоли и внутриклеточное накопление в ней, тогда как системное введение указанных неконъюгированных лекарственных средств может приводить к неприемлемым уровням токсичности по отношению к здоровым клеткам (Xie *et al* (2006) *Expert Opin. Biol. Ther.* 6(3):281-291; Kovtun *et al* (2006) *Cancer Res.* 66(6):3214-32121; Law *et al* (2006) *Cancer Res.* 66(4):2328-2337; Wu *et al* (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1137-1145; Lambert J. (2005) *Current Opin. in Pharmacol.* 5:543-549; Hamann P. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* 15(9):1087-1103; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Trail *et al* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614).

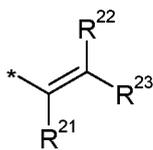
- Таким образом достигается максимальная эффективность при минимальной токсичности. Попытки разработки и очистки КАЛС были сосредоточены на селективности моноклональных антител (mAb), а также на механизме действия лекарственного средства, свойствах связывания с лекарственным средством, отношении лекарственное средство/антитело (нагрузка) и высвобождения лекарственного средства (Junutula, *et al.*, 2008b *Nature Biotech.*, 26(8):925-932; Doman *et al* (2009) *Blood* 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249; McDonagh (2006) *Protein Eng. Design & Sel.* 19(7): 299-307; Doronina *et al* (2006) *Bioconj. Chem.* 17:114-124; Erickson *et al* (2006) *Cancer Res.* 66(8):1-8; Sanderson *et al* (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:843-852; Jeffrey *et al* (2005) *J. Med. Chem.* 48:1344-1358; Hamblett *et al* (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063-7070). Фрагменты лекарственных средств могут оказывать свое цитотоксическое и цитостатическое действие по механизмам, включающим связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование протеасом и/или топоизомеразы. Некоторые цитотоксические лекарственные средства склонны инактивироваться или становятся менее активными при конъюгировании с большими антителами или белковыми рецепторными лигандами.
- 15 Авторы данного изобретения разработали конкретные конъюгаты димера ПБД с антителом.

### Сущность изобретения

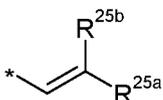
Первый аспект данного изобретения включает конъюгат формулы L -  $(D^L)_p$ , где  $D^L$  имеет формулу I или II:



- 20 где:
- L представляет собой антитело (Ab), как определено ниже;
- в случае, если между C2' и C3' присутствует двойная связь, R<sup>12</sup> выбран из группы, состоящей из:
- (ia) C<sub>5-10</sub> арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, включающей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир, C<sub>1-7</sub> алкил, C<sub>3-7</sub> гетероцикл и бис-окси-C<sub>1-3</sub> алкилен;
- 25 (ib) C<sub>1-5</sub> насыщенного алифатического алкила;
- (ic) C<sub>3-6</sub> насыщенного циклоалкила;

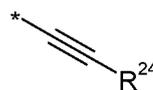


(id) , причем каждый из  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  и  $R^{23}$  независимо выбраны из H,  $C_{1-3}$  насыщенного алкила,  $C_{2-3}$  алкенила,  $C_{2-3}$  алкинила и циклопропила, причем общее количество атомов углерода в  $R^{12}$  группе составляет не более 5;



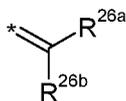
(ie) , причем один из  $R^{25a}$  и  $R^{25b}$  представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила и тиофенила; и

5



(if) , где  $R^{24}$  выбран из: H;  $C_{1-3}$  насыщенного алкила;  $C_{2-3}$  алкенила;  $C_{2-3}$  алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила и тиофенила;

где между  $C2'$  и  $C3'$  присутствует одинарная связь,



10  $R^{12}$  представляет собой , где  $R^{26a}$  и  $R^{26b}$  независимо выбраны из H, F,  $C_{1-4}$  насыщенного алкила,  $C_{2-3}$  алкенила, причем алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из  $C_{1-4}$  алкиламида и  $C_{1-4}$  алкилового сложного эфира; или, где один из  $R^{26a}$  и  $R^{26b}$  представляет собой H, другой выбран из нитрила и  $C_{1-4}$  алкилового сложного эфира;

$R^6$  и  $R^9$  независимо выбраны из H, R, OH, OR, SH, SR,  $NH_2$ , NHR,  $NRR'$ , нитро,  $Me_3Sn$  и галогена;

15 где R и  $R'$  независимо выбраны из необязательно замещенных  $C_{1-12}$  алкильной,  $C_{3-20}$  гетероциклической и  $C_{5-20}$  арильной групп;

$R^7$  выбран из H, R, OH, OR, SH, SR,  $NH_2$ , NHR,  $NHRR'$ , нитро,  $Me_3Sn$  и галогена;

$R''$  представляет собой  $C_{3-12}$  алкильную группу, цепь которой может быть прервана одним или более гетероатомами, например, O, S,  $NR^{N2}$  (где  $R^{N2}$  представляет собой H или  $C_{1-4}$  алкил), и/или ароматические кольца, например, бензол или пиридин;

20

Y и  $Y'$  выбраны из O, S или NH;

$R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^9$  выбраны из тех же групп, что и  $R^6$ ,  $R^7$  и  $R^9$  соответственно;

[Формула I]

$R^{L1'}$  представляет собой линкер для соединения с антителом (Ab);

25  $R^{11a}$  выбран из OH,  $OR^A$ , где  $R^A$  представляет собой  $C_{1-4}$  алкил и  $SO_zM$ , где z равно 2 или 3, и M представляет собой одновалентный фармацевтически приемлемый катион;

$R^{20}$  и  $R^{21}$  либо вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны, либо;

$R^{20}$  выбран из H и  $R^C$ , где  $R^C$  представляет собой кэпирующую группу;

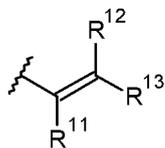
30  $R^{21}$  выбран из OH,  $OR^A$  и  $SO_zM$ ;

где между C2 и C3 присутствует двойная связь,  $R^2$  выбран из группы, состоящей из:

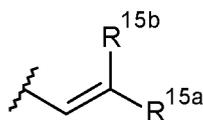
(ia) C<sub>5-10</sub> арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, включающей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир, C<sub>1-7</sub> алкил, C<sub>3-7</sub> гетероцикл и бис-окси-C<sub>1-3</sub> алкилен;

(ib) C<sub>1-5</sub> насыщенного алифатического алкила;

5 (ic) C<sub>3-6</sub> насыщенного циклоалкила;

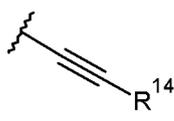


(id) , причем каждый из R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> и R<sup>13</sup> независимо выбраны из H, C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, C<sub>2-3</sub> алкинила и циклопропила, причем общее количество атомов углерода в R<sup>2</sup> группе составляет не более 5;



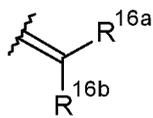
(ie) , причем один из R<sup>15a</sup> и R<sup>15b</sup> представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила и тиофенила; и

10



(if) , где R<sup>14</sup> выбран из: H; C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила; C<sub>2-3</sub> алкенила; C<sub>2-3</sub> алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила и тиофенила;

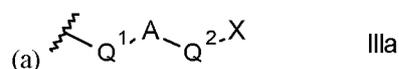
15 где между C2 и C3 присутствует одинарная связь,



R<sup>2</sup> представляет собой , где R<sup>16a</sup> и R<sup>16b</sup> независимо выбраны из H, F, C<sub>1-4</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, причем алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из C<sub>1-4</sub> алкиламида и C<sub>1-4</sub> алкилового сложного эфира или, где один из R<sup>16a</sup> и R<sup>16b</sup> представляет собой H, другой выбран из нитрила и C<sub>1-4</sub> алкилового сложного эфира;

20 [Формула II]

R<sup>22</sup> имеет формулу IIIa, формулу IIIb или формулу IIIc:

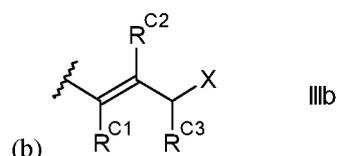


где A представляет собой C<sub>5-7</sub> арильную группу и одно из двух

(i) Q<sup>1</sup> представляет собой одинарную связь, и Q<sup>2</sup> выбран из одинарной связи и -Z-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, где Z выбран из

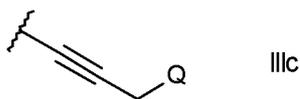
25 одинарной связи, O, S и NH и n равно от 1 до 3; или

(ii) Q<sup>1</sup> представляет собой -CH=CH-, и Q<sup>2</sup> представляет собой одинарную связь;



где;

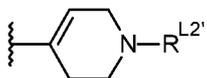
$R^{C1}$ ,  $R^{C2}$  и  $R^{C3}$  независимо выбраны из H и незамещенного  $C_{1-2}$  алкила;



(c)

где Q выбран из  $O-R^{L2'}$ ,  $S-R^{L2'}$  и  $NR^N-R^{L2'}$ , и  $R^N$  выбран из H, метила и этила

X выбран из группы, включающей:  $O-R^{L2'}$ ,  $S-R^{L2'}$ ,  $CO_2-R^{L2'}$ ,  $CO-R^{L2'}$ ,  $NH-C(=O)-R^{L2'}$ ,  $NHNH-R^{L2'}$ ,  $CONHNH-$

- 5  $R^{L2'}$ , , ,  $NR^N R^{L2'}$ , где  $R^N$  выбран из группы, включающей H и  $C_{1-4}$  алкил;

$R^{L2'}$  представляет собой линкер для соединения с антителом (Ab);

$R^{10}$  и  $R^{11}$  либо вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны, либо;

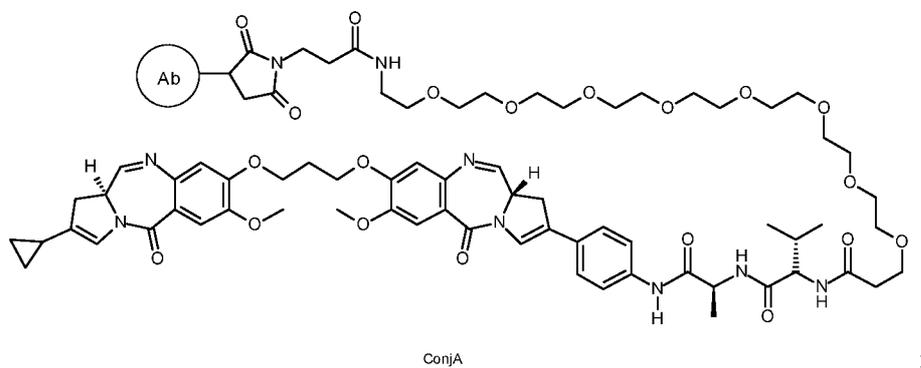
- 10  $R^{10}$  представляет собой H и  $R^{11}$  выбран из OH,  $OR^A$  и  $SO_2M$ ;

$R^{30}$  и  $R^{31}$  либо вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны, либо;

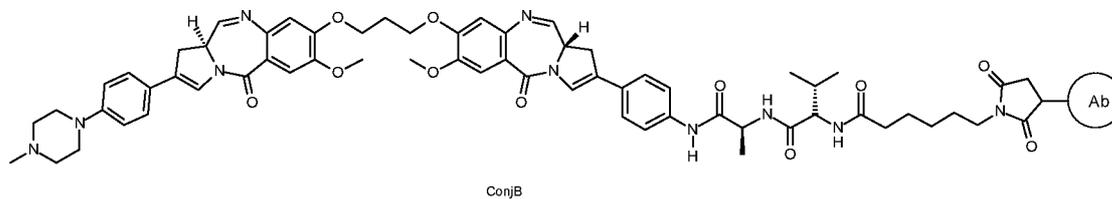
$R^{30}$  представляет собой H и  $R^{31}$  выбран из OH,  $OR^A$  и  $SO_2M$ .

- 15 В некоторых вариантах реализации, конъюгат не является:

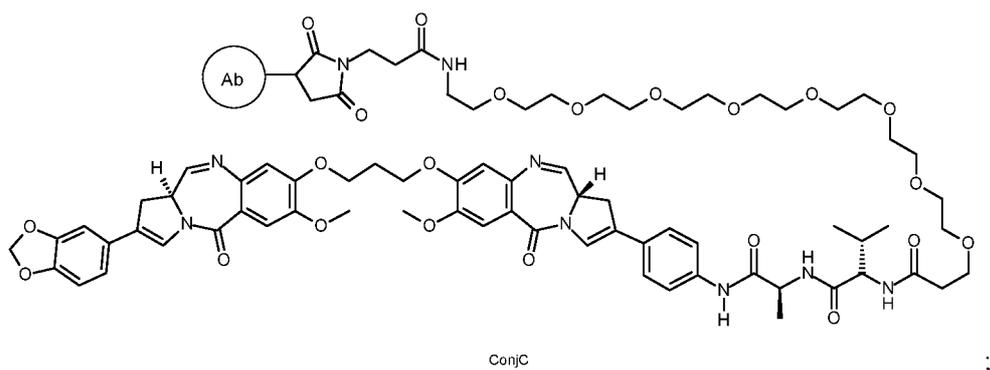
Конъюгатом А



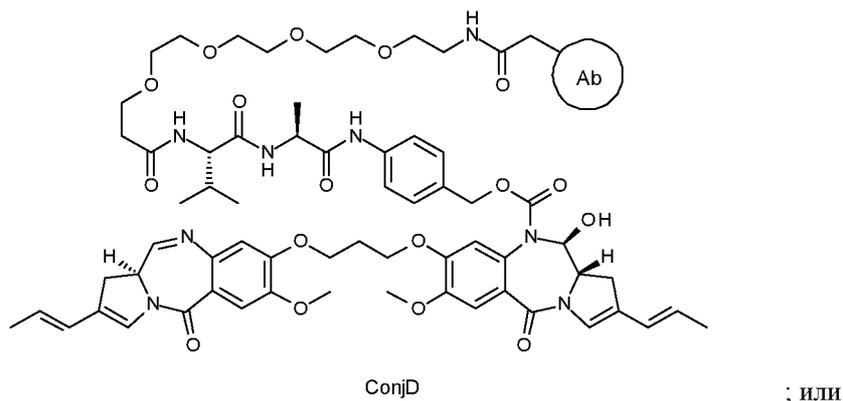
Конъюгатом В



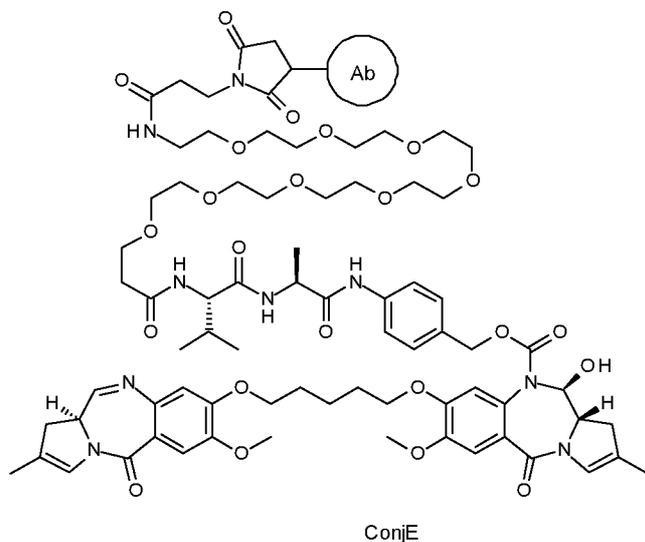
- 20 Конъюгатом С:



Конъюгатом D



Конъюгатом E:



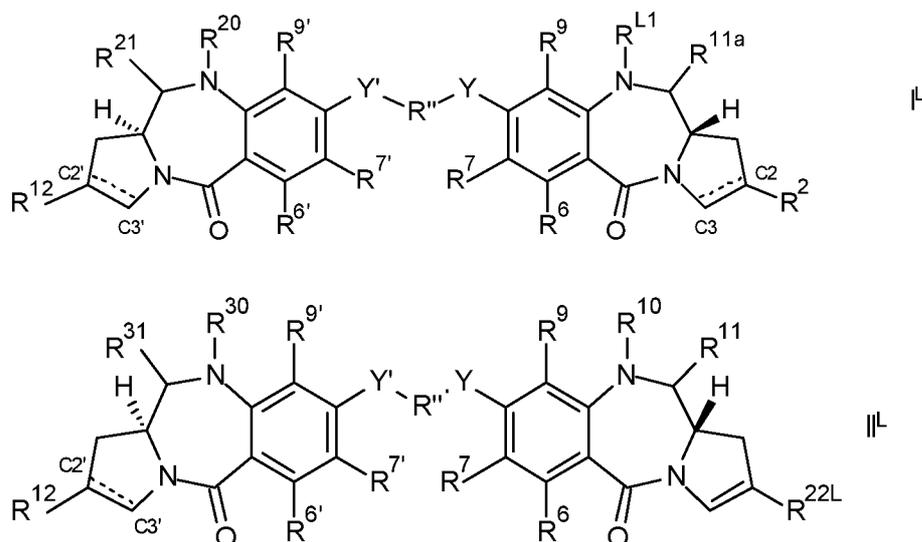
5

В других вариантах реализации может быть предпочтительным, чтобы конъюгат был выбран из конъюгата формулы Конъюгата А, Конъюгата В, Конъюгата С, Конъюгата D и Конъюгата E.

- 10 Индекс  $r$  в формуле I представляет собой целое число от 1 до 20. Соответственно, конъюгаты содержат антитело (Ab), как определено ниже, ковалентно связанное по меньшей мере с одним фрагментом лекарственного средства фрагментом линкера. Единица лиганда, более подробно описанная ниже, представляет собой нацеливающий агент, который связывается с целевым фрагментом. Соответственно, в данном изобретении также предложены способы лечения, например, различных видов онкологических

заболеваний и аутоиммунных заболеваний. Нагрузка лекарственного средства представлена  $p$ , числом молекул лекарственного средства на антитело. Нагрузка лекарственного средства может составлять от 1 до 20 фрагментов лекарственного средства ( $D^L$ ) на антитело. Для композиций  $p$  представляет собой среднюю нагрузку лекарственного средства конъюгатов в композиции, а  $p$  находится в диапазоне от 1 до 20.

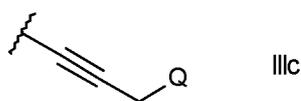
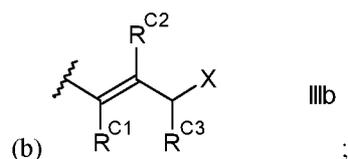
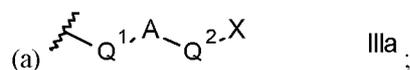
5 Во втором аспекте данного изобретения предлагается способ получения конъюгата согласно первому аспекту данного изобретения, включающий конъюгацию соединения формулы I<sup>L</sup> или II<sup>L</sup>:



10 к антителу (Ab), как определено ниже, где:

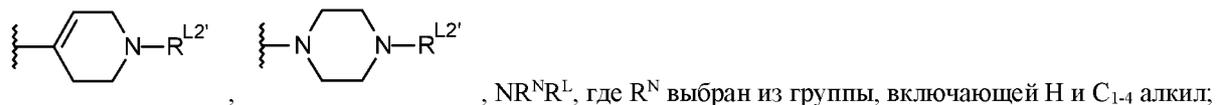
$R^{L1}$  представляет собой линкер, подходящий для конъюгации с антителом (Ab);

$R^{22L}$  имеет формулу IIIa<sup>L</sup>, формулу IIIb<sup>L</sup> или формулу IIIc<sup>L</sup>:



15 где  $Q^L$  выбран из  $O-R^{L2}$ ,  $S-R^{L2}$  и  $NR^N-R^{L2}$  и  $R^N$  выбран из H, метила и этила.

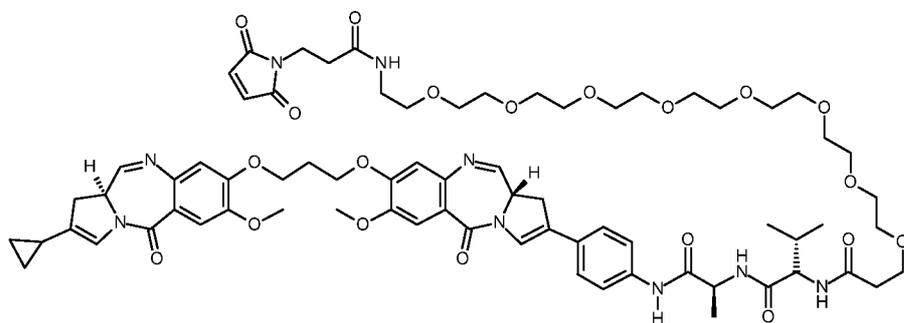
$X^L$  выбран из группы, включающей:  $O-R^{L2}$ ,  $S-R^{L2}$ ,  $CO_2-R^{L2}$ ,  $CO-R^{L2}$ ,  $N=C=O-R^{L2}$ ,  $NHNH-R^{L2}$ ,  $CONHNH-R^{L2}$ ,



$R^{L2}$  представляет собой линкер, подходящий для конъюгации с антителом (Ab);

20 и все остальные группы такие, как определено в первом аспекте.

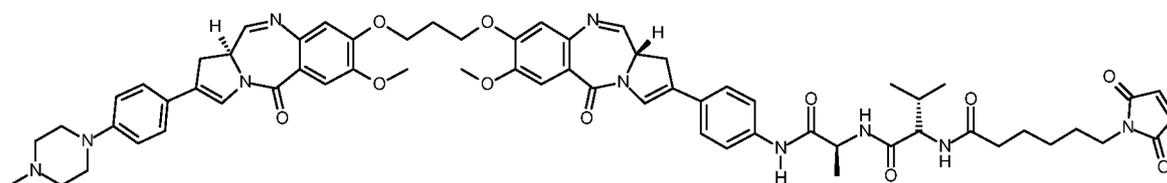
Таким образом, во втором аспекте может быть предпочтительнее, чтобы в описании был предложен способ получения конъюгата, выбранного из группы, состоящей из Конъюгата А, Конъюгата В, Конъюгата С, Конъюгата D и Конъюгата Е, включающий конъюгирование соединения, выбранного соответственно из А:



5

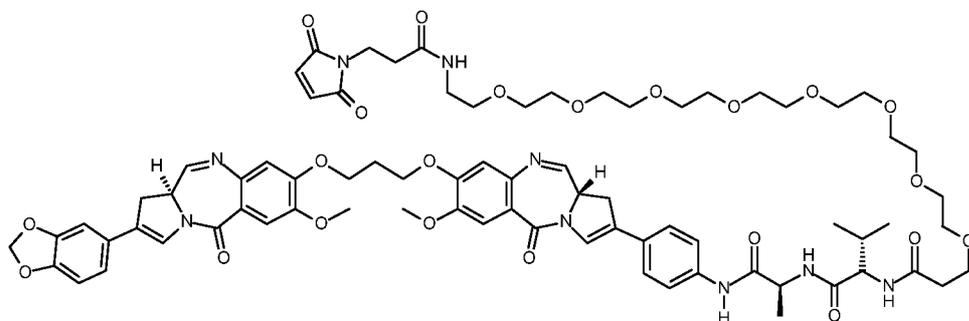
A

B:



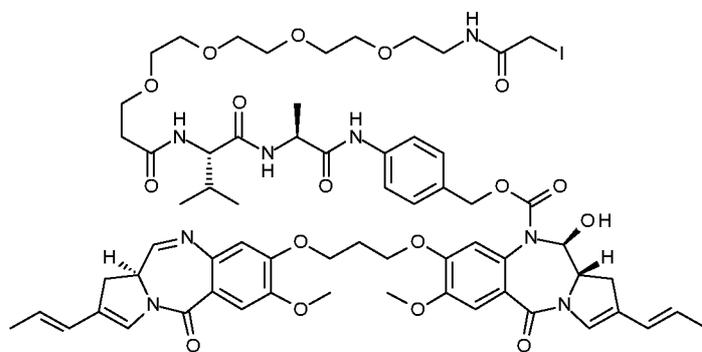
B

10 C:



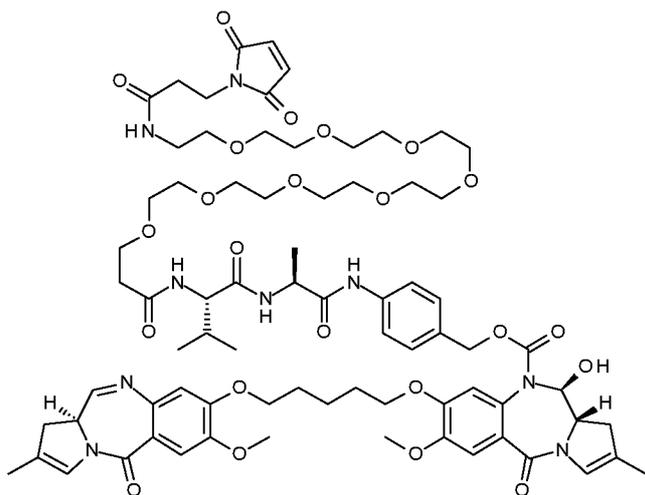
C

D:



D

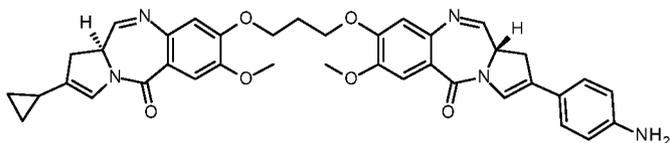
и E:



E

с антителом, как определено ниже.

WO 2011/130615 раскрывает соединение 26:

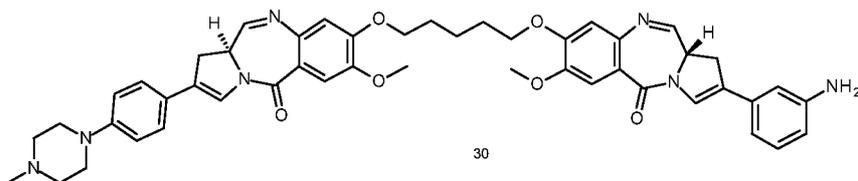


5

26

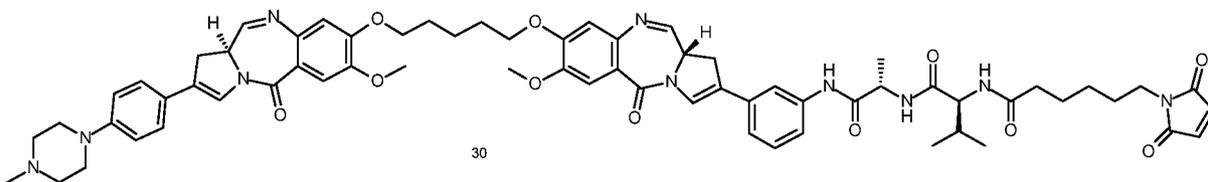
которое является исходным соединением А. Соединение А содержит данный ПБД с линкером для присоединения к связывающемуся с клетками агенту. Связывающийся с клетками агент обеспечивает ряд фрагментов этиленгликоля для обеспечения растворимости, которая полезна при синтезе конъюгатов.

10 WO 2010/043380 и WO 2011/130613 раскрывают соединение 30:



30

WO 2011/130613 также раскрывает соединение 51:



30

15 Соединение В отличается от соединения 30 только наличием связи  $(\text{CH}_2)_3$  между фрагментами ПБД вместо связки  $(\text{CH}_2)_5$ , которая снижает липофильность высвобожденного димера ПБД. Связывающая группа присоединена к С2-фенильной группе скорее в пара-положении, а не в мета-положении.

WO 2011/130613 раскрывает соединение 93:

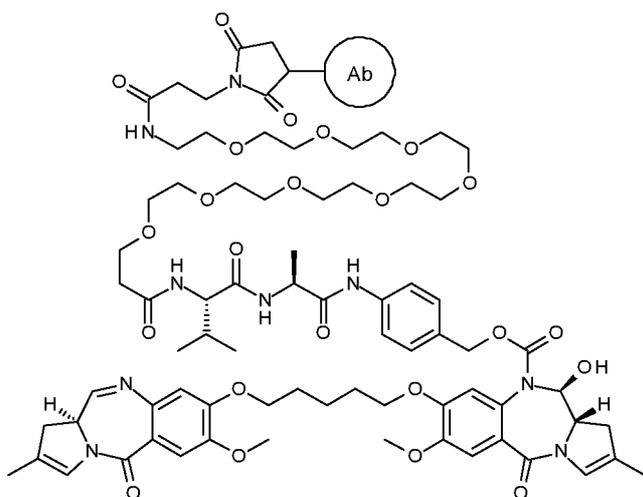


Как соединение D, так и соединение E имеют два  $sp^2$  центра в каждом С-кольце, что может обеспечить более сильное связывание в малой бороздке ДНК, чем для соединений, имеющих только один  $sp^2$  центр в каждом С-кольце.

- 5 Лекарственное средство-линкеры, раскрытые в WO 2010/043880, WO 2011/130613, WO 2011/130598 и WO 2011/130616, могут быть применены в данном изобретении и включены в данный документ посредством ссылки. Описанные в данном документе лекарственное средство-линкеры могут быть синтезированы, как описано в данном документе.

## 10 Предпочтительный вариант реализации данного изобретения

Предпочтительный вариант реализации представляет собой конъюгат, имеющий структуру:



, где антитело содержит: (i) домен VH, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1, и (ii) домен VL, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2.

- 15 Антитело может содержать: (i) домен VH, содержащий последовательность SEQ ID NO:3, и (ii) домен VL, содержащий последовательность SEQ ID NO:4.

## Краткое описание графических материалов

- 20 Фиг. 1  
*Цитотоксичность предложенных конъюгатов in vitro*
- 25 Фиг. 2  
*Исследование эффективности in vivo на модели ксенотрансплантата TNBC MDA-MB-231*
- Фиг. 3  
*Исследование эффективности in vivo на модели ксенотрансплантата онкологического заболевания почки SN12C*

Фиг. 4

Исследование эффективности *in vivo* на PDX-модели онкологического заболевания яичников STG-0703

5

Фиг. 5

5A) Исследование эффективности *in vivo* на PDX-модели онкологического заболевания яичников STG-0252

5B) Исследование эффективности *in vivo* на PDX-модели онкологического заболевания яичников STG-1086

10

5C) Исследование эффективности *in vivo* на PDX-модели онкологического заболевания яичников STG-0711

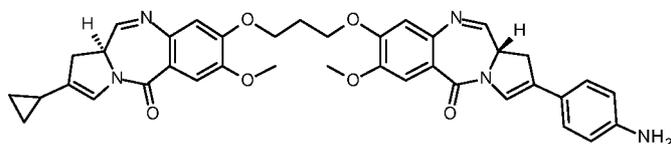
5D) Исследование эффективности *in vivo* на PDX-модели онкологического заболевания яичников STG-1423

15

**Подробное описание сущности изобретения**

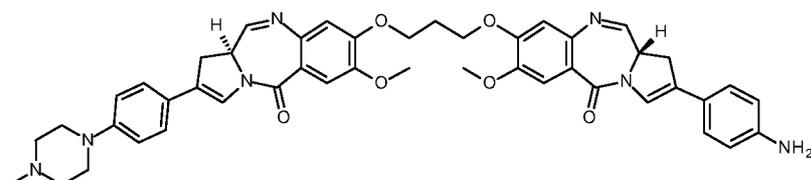
Данное изобретение подходит для применения для получения ПБД соединения в предпочтительной области в теле субъекта. Конъюгат обеспечивает высвобождение активного ПБД соединения, не содержащего какого-либо фрагмента линкера. При этом не наблюдается каких-либо остатков, которые могли бы влиять на реакционную способность ПБД соединения. Так, Конъюгат А высвободит соединение RelA:

20



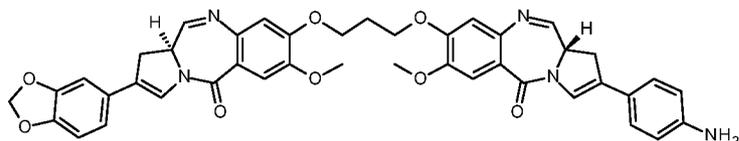
RelA

Конъюгат В высвободит соединение RelB:



RelB

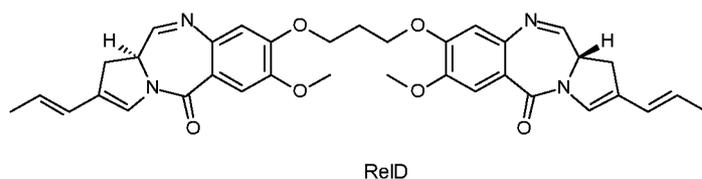
Конъюгат С высвободит соединение RelC:



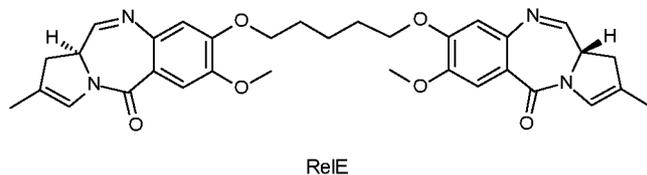
RelC

25

Конъюгат D высвободит соединение RelD:



и Конъюгат E высвободит соединение RelE:



5

Специфическая связь между димером ПБД и антителом в данном изобретении предпочтительно является стабильной за пределами клетки. Перед транспортировкой или доставкой в клетку конъюгат антитело-лекарственное средство (КАЛС) предпочтительно является стабильным и остается интактным, то есть антитело остается связанным с фрагментом лекарственного средства. Линкеры являются стабильными вне

10 клетки-мишени и могут расщепляться с некоторой эффективной скоростью внутри клетки. Эффективный линкер: (i) поддерживает свойства специфического связывания антитела; (ii) обеспечивает внутриклеточную доставку конъюгата или фрагмента лекарственного средства; (iii) остается стабильным и интактным, т.е. не расщепляется до момента доставки или транспортировки указанного конъюгата к области-мишени; и (iv) поддерживает цитотоксическое, приводящее к уничтожению клеток, действие или цитостатическое

15 действие фрагмента ПБД лекарственного средства. Стабильность КАЛС можно определить с помощью стандартных аналитических методов, таких как масс-спектрометрия, ВЭЖХ и метод разделения/анализа ЖХ/МС.

20

Доставка соединений формул RelA, RelB, RelC, RelD или RelE достигается в желаемой области активации конъюгатов формул Конъюгат А, Конъюгат В, Конъюгат С, Конъюгат D или Конъюгат E за счет действия фермента, такого как катепсин, на связывающую группу, и, в частности, остатка валин-аланинового дипептида.

### Антитело

25

В одном аспекте антитело представляет собой антитело, которое связывается с КААГ1.

### Антитело 3A4

30

В некоторых вариантах реализации, антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах реализации, домен VH дополнительно содержит CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5. В некоторых вариантах реализации, антитело содержит домен VH, содержащий CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, и CDR3 VH с аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO:7. В предпочтительных вариантах реализации, антитело содержит домен VH, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 1.

5 Антитело может дополнительно содержать домен VL. В некоторых вариантах реализации, антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах реализации, домен VL дополнительно содержит CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9, и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах реализации, антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, и 10 CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10. В предпочтительных вариантах реализации, антитело содержит домен VL, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15.

15 В предпочтительных вариантах реализации, антитело содержит домен VH и домен VL. Предпочтительно VH содержит последовательность SEQ ID NO:1 и домен VL содержит последовательность SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15.

Домен(ы) VH и VL могут образовывать пары для образования антигенсвязывающего сайта антитела, который связывает КААG1.

20 В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой интактное антитело, содержащее домен VH, спаренный с доменом VL, причем домены VH и VL содержат последовательности SEQ ID NO:1 спаренные с SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15.

25 В некоторых вариантах реализации, антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3, спаренную с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах реализации, антитело представляет собой интактное антитело, содержащее две тяжелые цепи, содержащие последовательность SEQ ID NO:3, каждая из которых спарена с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16.

30 В некоторых вариантах реализации, антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 11, спаренную с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах реализации, антитело представляет собой интактное антитело, содержащее две тяжелые цепи, содержащие последовательность SEQ ID NO:11, каждая из которых спарена с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16.

35 В одном аспекте антитело представляет собой описанное в данном документе антитело, которое было модифицировано (или дополнительно модифицировано), как описано ниже. В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой гуманизированную, деиммунизированную версию или версию антитела с измененной поверхностью, описанные в данном документе.

40

Терминология

Термин «антитело», в контексте данного документа, используется в широком смысле и в частности включает моноклональные антитела, поликлональные антитела, димеры, мультимеры, мультиспецифичные антитела (*например, биспецифичные антитела*), интактные антитела (также называемые «полноразмерными» антителами) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность, например, способность связывать КААГ1 (Miller *et al* (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). Антитела могут быть мышинными, человеческими, гуманизированными, гибридными или произошедшими из других видов. Антитело представляет собой белок, продуцируемый клетками иммунной системы, способный распознавать и связываться со специфическим антигеном. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology, 5th Ed.*, Garland Publishing, New York). Антиген-мишень в целом имеет многочисленные сайты связывания, также называемые эпитопами, которые распознают участки CDR множества антител. Каждое антитело, которое специфически связывается с отдельным эпитопом, имеет отличную структуру. Таким образом, один антиген может иметь более одного соответствующего ему антитела. Антитело включает полноразмерную молекулу иммуноглобулина или иммунологически активную часть полноразмерной молекулы иммуноглобулина, *т.е.*, молекулу, которая содержит антиген-связывающий сайт, иммуноспецифически связывающийся с антигеном интересующей мишени или его частью, при этом указанные мишени включают, но не ограничиваются ими, раковые клетки или клетки, которые продуцируют аутоиммунные антитела, ассоциированные с аутоиммунным заболеванием. Иммуноглобулин может относиться к любому типу (*например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA*), классу (*например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2*) или подклассу или аллотипу (*например, человеческим G1m1, G1m2, G1m3, non-G1m1 [то есть любой аллотип, отличный от G1m1], G1m17, G2m23, G3m21, G3m28, G3m11, G3m5, G3m13, G3m14, G3m10, G3m15, G3m16, G3m6, G3m24, G3m26, G3m27, A2m1, A2m2, Km1, Km2 и Km3*) молекул иммуноглобулинов. Иммуноглобулины могут иметь различное происхождение, включая иммуноглобулины человека, мыши или кролика.

В контексте данного документа, «связывает КААГ1» означает, что антитело связывает КААГ1 с более высокой аффинностью, чем неспецифический партнер, такой как бычий сывороточный альбумин (БСА, номер доступа в Genbank CAA76847, версия № CAA76847.1 GI:3336842, дата обновления записи: 7 января 2011 г., 02:30 п.п.). В некоторых вариантах реализации антитело связывает КААГ1 с константой ассоциации ( $K_a$ ) по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000,  $10^4$ ,  $10^5$  или  $10^6$  раз выше, чем константа ассоциации антитела для БСА при измерении в физиологических условиях. Антитела согласно данному изобретению могут связывать КААГ1 с высокой аффинностью. Например, в некоторых вариантах реализации, антитело может связывать КААГ1 с  $K_D$  равной или менее чем около  $10^{-6}$  М, например,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-13}$  или  $10^{-14}$ .

КААГ1 (антиген 1, связанный с почками) экспрессируется в яичках и почках, а на более низких уровнях - в мочевом пузыре и печени. Это выражается в большом количестве опухолей различного гистологического происхождения, включая меланомы, саркомы и колоректальные карциномы. В некоторых вариантах реализации, полипептид КААГ1 соответствует номеру доступа в Genbank AAF23613, версия № AAF23613.1. В одном варианте реализации, нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид КААГ1, соответствует

номеру доступа AF181722, версия № AF181722.1. В некоторых вариантах реализации, полипептид КААG1 имеет последовательность SEQ ID NO:12.

5 «Фрагменты антител» включают часть полноразмерного антитела, обычно его антигенсвязывающую или  
вариабельную область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и scFv; диатела;  
линейные антитела; фрагменты, полученные из Fab-экспрессионной библиотеки, антиидиотипические  
(анти-Id) антитела, CDR (определяющая комплементарность область) и связывающиеся с эпитопом  
фрагменты любого из указанных выше фрагментов, которые иммуноспецифично связываются с антигенами  
10 раковых клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами, молекулы одноцепочечных антител;  
и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

В контексте данного документа, термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из  
популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, содержащие указанную популяцию,  
являются идентичными за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в  
15 минимальном количестве. Моноклональные антитела являются высоко специфичными, при этом они  
направлены против одного антигенного сайта. Более того, в отличие от составов поликлональных антител,  
которые содержат различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое  
моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Помимо их специфичности  
преимуществом моноклональных антител является также в возможности их синтеза без загрязнения  
20 другими антителами. Определение «моноклональное» указывает на характер антитела как полученного из  
по существу гомогенной популяции антител, при этом указанное определение не подразумевает продукцию  
антител каким-либо определенным способом. Например, моноклональные антитела для применения в  
соответствии с данным изобретением могут быть получены с помощью гибридомных способов, впервые  
описанных в источнике Kohler *et al* (1975) *Nature* 256:495, или могут быть получены с помощью способов  
25 рекомбинации ДНК (см., US 4816567). Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых  
библиотек антител с использованием способом, описанных в Clackson *et al* (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks  
*et al* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, или от трансгенных мышей, несущих полностью человеческую  
иммуноглобулиновую систему (Lonberg (2008) *Curr. Opinion* 20(4):450-459).

30 Моноклональные антитела в данном документе, в частности, включают «химерные» антитела, в которых  
часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в  
антителах, полученных из определенных видов или принадлежащих определенному классу или подклассу  
антител, тогда как остальная часть цепи (цепей) является идентичной или гомологичной соответствующим  
последовательностям антител, произошедших из другого вида или принадлежащих другому классу или  
35 подклассу антител, а также фрагментам таких антител, при условии, что они проявляют желаемую  
биологическую активность (US 4816567; и Morrison *et al* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855).  
Химерные антитела включают «приматизированные» антитела, содержащие вариабельные доменные  
антиген-связывающие последовательности, произошедшие из последовательностей константной области  
примата, не представляющего собой человека (например, марышковых или человекообразных обезьян), и  
40 человека.

«Интактное антитело» в данном документе представляет собой антитело, содержащее домены VL и VH, а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Константные домены могут представлять собой константные домены нативных последовательностей (например, константные домены нативной последовательности человека) или вариантных аминокислотных последовательностей. Интактное антитело может иметь одну или более «эффекторных функций», которые относятся к биологическим активностям, свойственным Fc-области (нативной последовательности Fc-области или вариантной аминокислотной последовательностью Fc области) антитела. Примеры эффекторных функций антител включают C1q-связывание; зависимую от комплемента цитотоксичность; Fc-рецепторное связывание; антитело-зависимая опосредованная клетками цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз и отрицательная регуляция рецепторов клеточной поверхности, таких как B-клеточный рецептор и BCR.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей интактные антитела могут быть отнесены к различным «классам». Существует пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из указанных классов могут быть дополнительно разделены на «подклассы» (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам антител, называются  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , соответственно. Субъединичная структура и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Модификация антител

Описанные в данном документе антитела могут быть модифицированы. Например, чтобы сделать их менее иммуногенными для человека. Это может быть достигнуто с использованием любого из ряда способов, известных специалисту в данной области техники. Некоторые из этих способов описаны более подробно ниже.

Гуманизация

Способы снижения иммуногенности *in vivo* нечеловеческого антитела или фрагмента антитела включают те, которые называются «гуманизация».

«Гуманизованное антитело» относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере часть модифицированной переменной области антитела человека, при этом часть переменной области, предпочтительно часть, существенно меньшая, чем интактный переменный домен человека, заменена соответствующей последовательностью от не относящихся к человеку видов, и при этом модифицированная переменная область связана по меньшей мере с другой частью другого белка, предпочтительно с константной областью антитела человека. Выражение «гуманизованные антитела» включает человеческие антитела, в которых один или более аминокислотных остатков определяющей комплементарности области («CDR») и/или один или более аминокислотных остатков каркасной области («FW» или «FR») заменены остатками аминокислот из аналогичных сайтов в антителах грызунов или других нечеловеческих антителах. Выражение «гуманизованное антитело» также включает вариантную аминокислотную последовательность иммуноглобулина или его фрагмент, который включает FR, имеющий

по существу аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, и CDR, имеющий по существу аминокислотную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина.

5 «Гуманизированные» формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Или, если посмотреть с другой стороны, гуманизированное антитело представляет собой человеческое антитело, которое также содержит выбранные последовательности нечеловеческих (например, мышинных) антител вместо человеческих последовательностей. Гуманизированное антитело может включать консервативные аминокислотные замены или неприродные остатки одного и того же или разных видов, 10 которые существенно не изменяют его связывание и/или биологическую активность. Такие антитела представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческих иммуноглобулинов.

15 Существует ряд методов гуманизации, в том числе «прививка CDR», «управляемый отбор», «деиммунизация», «восстановление поверхности» (также известное как «венирование»), «составные антитела», «оптимизация содержания участков последовательности человека» и перетасовка каркаса.

#### Прививка CDR

20 В этом способе гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентные антитела), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиентного антитела заменены остатками из CDR нечеловеческого вида (донорское антитело), такого как мышь, крыса, верблюд, бык, коза или кролик, обладающие желаемыми свойствами (фактически, нечеловеческие CDR «прививаются» к человеческому каркасу). В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменяются соответствующими остатками нечеловеческого 25 происхождения (это может произойти, когда, например, конкретный остаток FR оказывает значительное влияние на связывание антигена).

30 Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которых нет ни в антителе-реципиенте, ни в импортных последовательностях CDR или каркасной области. Эти модификации выполнены для дальнейшего уточнения и максимального повышения эффективности антител. Таким образом, в общем, гуманизированное антитело будет включать все по меньшей мере один и в одном аспекте два переменных домена, в которых все или все гипервариабельные петли соответствуют петлям иммуноглобулина, не относящегося к человеку, и все или практически все FR области представляют собой участки последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также может 35 содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина (Fc) или иммуноглобулина человека.

#### Управляемый отбор

40 Способ состоит из комбинирования домена  $V_H$  или  $V_L$  данного нечеловеческого антитела, специфичного к конкретному эпитопу, с библиотекой  $V_H$  или  $V_L$  человека, и специфические V-домены человека отбираются против интересующего антигена. Затем эту выбранную  $V_H$  человека объединяют с библиотекой  $V_L$  для

создания комбинации полностью VHxVL человека. Способ описан в Nature Biotechnology (N.Y.) 12, (1994) 899-903.

#### Составные антитела

- 5 В этом способе два или более сегментов аминокислотной последовательности антитела человека объединяются в конечной молекуле антитела. Их конструируют путем комбинирования нескольких сегментов последовательности VH и VL человека в комбинациях, которые ограничивают или избегают эпитопов Т-клеток человека в V-областях конечного составного антитела. При необходимости, Т-клеточные эпитопы ограничиваются или избегаются путем замены сегментов V-области, вносящих вклад в Т-клеточный эпитоп или кодирующих их, на альтернативные сегменты, которые избегают Т-клеточных эпитопов. Этот метод описан в US 2008/0206239 A1.
- 10

#### Деиммунизация

- 15 Этот способ включает удаление эпитопов Т-клеток человека (или другого второго вида) из V-областей терапевтического антитела (или другой молекулы). Последовательность V-области терапевтических антител анализируется на наличие мотивов связывания МНС класса II, например, путем сравнения с базами данных мотивов связывания МНС (такими как база данных «фрагментов», размещенная на сайте [www.wehi.edu.au](http://www.wehi.edu.au)). Альтернативно, мотивы связывания МНС класса II могут быть идентифицированы с использованием вычислительных потоковых методов, таких как разработанные Altuvia et al. (J. Mol. Biol. 249 244-250 (1995));
- 20 в этих методах последовательные перекрывающиеся пептиды из последовательностей V-области проверяют их энергию связывания с белками МНС класса II. Затем эти данные могут быть объединены с информацией о других характеристиках последовательностей, которые относятся к успешно представленным пептидам, таким как амфипатичность, мотивы Ротбарда и сайты расщепления для катепсина В и других процессинговых ферментов.
- 25

- Как только потенциальные эпитопы Т-клеток второго вида (например, человека) идентифицированы, они удаляются путем изменения одной или более аминокислот. Модифицированные аминокислоты обычно находятся внутри самого Т-клеточного эпитопа, но также могут примыкать к эпитопу с точки зрения первичной или вторичной структуры белка (и, следовательно, могут не быть смежными в первичной структуре). Чаще всего изменение происходит путем замены, но в некоторых случаях более подходящим будет добавление или удаление аминокислот.
- 30

- Все изменения могут быть выполнены с помощью технологии рекомбинантной ДНК, так что конечная молекула может быть получена путем экспрессии из рекомбинантного хозяина с использованием хорошо известных методов, таких как сайт-направленный мутагенез. Однако также возможно использование химии белков или любых других средств молекулярного изменения.
- 35

#### Восстановление поверхности

Этот способ включает:

- (a) определение конформационной структуры вариабельной области нечеловеческого антитела (например, грызуна) (или его фрагмента) путем конструирования трехмерной модели вариабельной области нечеловеческого антитела;
- 5 (b) генерацию выравнивания последовательностей с использованием распределений относительной доступности из рентгеноструктурных кристаллографических структур достаточного количества тяжелых и легких цепей вариабельных областей нечеловеческих и антител человека, чтобы получить набор положений каркаса тяжелой и легкой цепей, в которых положения выравнивания идентичны в 98% достаточного количества тяжелых и легких цепей нечеловеческих антител;
- 10 (c) определение для гуманизованного нечеловеческого антитела набора аминокислотных остатков, экспонируемых на поверхности тяжелой и легкой цепей, с использованием набора положений каркаса, созданного на стадии (b);
- 15 (d) идентификацию из аминокислотных последовательностей антитела человека набора аминокислотных остатков, экспонируемых на поверхности тяжелой и легкой цепей, который наиболее близко идентичен набору экспонированных на поверхности аминокислотных остатков, определенных на этапе (c), где тяжелая и легкая цепи из человеческие антитела являются или не спарены естественным образом;
- (e) замену в аминокислотной последовательности нечеловеческого антитела, подлежащего гуманизации, набора аминокислотных остатков, экспонируемых на поверхности тяжелой и легкой цепей, определенных на этапе (c), на набор остатков аминокислот, экспонируемых на поверхности тяжелой и легкой цепи, идентифицированные на стадии (d);
- 20 (f) построение трехмерной модели вариабельной области нечеловеческого антитела, полученной в результате замены, указанной на этапе (e);
- (g) идентификацию путем сравнения трехмерных моделей, построенных на этапах (a) и (f), любых аминокислотных остатков из наборов, идентифицированных на этапах (c) или (d), которые находятся в пределах 5 ангстрем от любого атома любой остаток определяющих комплементарность областей
- 25 нечеловеческого антитела, подлежащего гуманизации; и
- (h) замену любых остатков, идентифицированных на стадии (g), с человеческих остатков на исходные нечеловеческие аминокислотные остатки, чтобы таким образом определить нечеловеческий антител гуманизирующий набор экспонированных на поверхности аминокислотных остатков; при условии, что этап (a) не обязательно должен выполняться первым, а должен выполняться до этапа (g).
- 30

#### Супергуманизация

С методе сравнивают нечеловеческую последовательность с функциональным спектром генов зародышевой линии человека. Выбирают гены человека, кодирующие канонические структуры, идентичные или тесно связанные с последовательностями, не относящимися к человеку. Те отобранные гены человека с

35 наивысшей гомологией в пределах CDR выбирают в качестве доноров FR. Наконец, нечеловеческие CDR прививаются к этим FR человека. Этот метод описан в патенте WO 2005/079479 A2.

#### Оптимизация содержания участков последовательности человека

40 Этот метод сравнивает нечеловеческую (например, мышиную) последовательность со спектром генов зародышевой линии человека, и различия оцениваются как содержание участков последовательности

человека (HSC), которое количественно определяет последовательность на уровне потенциальных эпитопов МНС/Т-клеток. Затем последовательность-мишень гуманизируется путем максимизации ее HSC вместо использования общей меры идентичности для создания множества разнообразных гуманизированных вариантов (описано в *Molecular Immunology*, 44, (2007) 1986–1998).

5

#### Перетасовка каркаса

CDR нечеловеческого антитела сливаются в рамке считывания с пулами кДНК, охватывающими все известные каркасные области тяжелых и легких цепей генов зародышевой линии человека. Затем гуманизированные антитела отбирают, например, панорамирование отображаемой фагом библиотеки антител. Это описано в *методах* 36, 43-60 (2005).

10

### Определения

#### Фармацевтически приемлемые катионы

Примеры фармацевтически приемлемых одновалентных и двухвалентных катионов обсуждаются в Berge, *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 66, 1-19 (1977), который включен в данный документ в качестве ссылки.

15

Фармацевтически приемлемый катион может быть неорганическим или органическим.

Примеры фармацевтически приемлемых одновалентных неорганических катионов включают, но не ограничиваются ими, ионы щелочных металлов, такие как  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . Примеры фармацевтически приемлемых двухвалентных неорганических катионов включают, но не ограничиваются ими, щелочноземельные катионы, такие как  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Примеры фармацевтически приемлемых органических катионов включают, без ограничений, ион аммония (т.е.  $\text{NH}_4^+$ ) и замещенные ионы аммония (например,  $\text{NH}_3\text{R}^+$ ,  $\text{NH}_2\text{R}_2^+$ ,  $\text{NHR}_3^+$ ,  $\text{NR}_4^+$ ). Примерами некоторых подходящих замещенных ионов аммония являются ионы, полученные из: этиламина, диэтиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтанолламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглумина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером обычного иона четвертичного аммония является  $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ .

25

#### Заместители

Фраза «необязательно замещенная» в контексте настоящего документа относится к исходной группе, которая может быть незамещенной или может быть замещенной.

30

Если не указано иное, термин «замещенный» в контексте настоящего документа относится к исходной группе, которая имеет один или более заместителей. Термин «заместитель» используется в настоящем документе в общепринятом смысле и относится к химическому фрагменту, который ковалентно присоединен к исходной группе или, если применимо, сконденсирован с исходной группой. Известно множество различных заместителей, и способы их образования и введения в различные исходные группы также хорошо известны.

35

40

Примеры заместителей описаны более подробно ниже.

5  $C_{1-12}$  алкил: Термин « $C_{1-12}$  алкил», используемый в данном документе, относится к одновалентному фрагменту, полученному путем удаления атома водорода от атома углерода углеводородного соединения, содержащего от 1 до 12 атомов углерода, которое может быть алифатическим или алициклическим, и который может быть насыщенным или ненасыщенным (например, частично ненасыщенным, полностью ненасыщенным). Термин « $C_{1-4}$  алкил», используемый в данном документе, относится к одновалентному фрагменту, полученному путем удаления водорода от атома углерода углеводородного соединения, содержащего от 1 до 4 атомов углерода, которое может быть алифатическим или алициклическим, и который может быть насыщенным или ненасыщенным (например, частично ненасыщенным, полностью ненасыщенным). Таким образом, термин «алкил» включает подклассы алкенил, алкинил, циклоалкил и т.д., описанные ниже.

15 Примеры насыщенных алкильных групп включают, но не ограничиваются ими, метил ( $C_1$ ), этил ( $C_2$ ), пропил ( $C_3$ ), бутил ( $C_4$ ), пентил ( $C_5$ ), гексил ( $C_6$ ) и гептил ( $C_7$ ).

Примеры насыщенных линейных алкильных групп включают, но не ограничиваются ими, метил ( $C_1$ ), этил ( $C_2$ ), н-пропил ( $C_3$ ), н-бутил ( $C_4$ ), н-пентил (амил) ( $C_5$ ), н-гексил ( $C_6$ ) и н-гептил ( $C_7$ ).

20 Примеры насыщенных разветвленных алкильных групп включают изо-пропил ( $C_3$ ), изо-бутил ( $C_4$ ), втор-бутил ( $C_4$ ), трет-бутил ( $C_4$ ), изо-пентил ( $C_5$ ) и неопентил ( $C_5$ ).

25  $C_{2-12}$  алкинил: Термин « $C_{2-12}$  алкенил», в контексте данного документа, относится к алкильной группе, имеющей одну или более углерод-углеродных двойных связей.

Примеры ненасыщенных алкенильных групп включают, но не ограничиваются ими, этенил (винил,  $-CH=CH_2$ ), 1-пропенил ( $-CH=CH-CH_3$ ), 2-пропенил (аллил,  $-CH=CH-CH_2$ ), изопропенил (1-метилвинил,  $-C(CH_3)=CH_2$ ), бутенил ( $C_4$ ), пентенил ( $C_5$ ), и гексенил ( $C_6$ ).

30  $C_{2-12}$  алкинил: Термин « $C_{2-12}$  алкинил», в контексте данного документа, относится к алкильной группе, содержащей одну или более углерод-углеродных тройных связей.

Примеры ненасыщенных алкинильных групп включают, но не ограничиваются ими, этинил ( $-C\equiv CH$ ) и 2-пропинил (пропаргил,  $-CH_2-C\equiv CH$ ).

35  $C_{3-12}$  циклоалкил: Термин « $C_{3-12}$  циклоалкил», в контексте данного документа, относится к алкильной группе, которая также является циклической группой; то есть одновалентному фрагменту, полученному путем удаления атома водорода от атома алициклического кольца циклического углеводородного (карбоциклического) соединения, причем указанный фрагмент содержит от 3 до 7 атомов углерода, включая от 3 до 7 атомов кольца

Примеры циклоалкильных групп включают, но не ограничиваются ими, группы, полученные из:

насыщенных моноциклических углеводородных соединений:

циклопропана ( $C_3$ ), циклобутана ( $C_4$ ), циклопентана ( $C_5$ ), циклогексана ( $C_6$ ), циклогептана ( $C_7$ ), метилциклопропана ( $C_4$ ), иметилциклопропана ( $C_5$ ), метилциклобутана ( $C_5$ ), диметилциклобутана ( $C_6$ ), метилциклопентана ( $C_6$ ), диметилциклопентана ( $C_7$ ) и метилциклогексана ( $C_7$ );

ненасыщенных моноциклических углеводородных соединений:

циклопропена ( $C_3$ ), циклобутена ( $C_4$ ), циклопентена ( $C_5$ ), циклогексена ( $C_6$ ), метилциклопропена ( $C_4$ ), диметилциклопропена ( $C_5$ ), метилциклобутена ( $C_5$ ), диметилциклобутена ( $C_6$ ), метилциклопентена ( $C_6$ ), диметилциклопентена ( $C_7$ ) и метилциклогексена ( $C_7$ ); и

насыщенных полициклических углеводородных соединений:

норкарана ( $C_7$ ), норпинана ( $C_7$ ), норборнана ( $C_7$ ).

$C_{3-20}$  гетероцикл: Термин « $C_{3-20}$  гетероцикл», в контексте данного документа, относится к одновалентному фрагменту, полученному путем удаления атома водорода от атома кольца гетероциклического соединения, причем указанный фрагмент содержит от 3 до 20 атомов в кольце, от 1 до 10 из которых представляют собой гетероатомы кольца. Предпочтительно каждое кольцо содержит от 3 до 7 атомов в кольце, от 1 до 4 атомов из которых представляют собой гетероатомы кольца.

В указанном контексте префиксы (например,  $C_{3-20}$ ,  $C_{3-7}$ ,  $C_{5-6}$ , и т.д.) обозначают число атомов в кольце или диапазон числа атомов в кольце, как атомов углерода, так и гетероатомов. Например, термин « $C_{5-6}$  гетероцикл», в контексте данного документа, относится к гетероциклической группе, содержащей 5 или 6 атомов в кольце.

Примеры моноциклических гетероциклических групп включают, но не ограничиваются ими, группы, полученные из:

$N_1$ : азиридина ( $C_3$ ), азетидина ( $C_4$ ), пирролидина (тетрагидропиррола) ( $C_5$ ), пирролина (например, 3-пирролина, 2,5-дигидропиррола) ( $C_5$ ), 2Н-пиррола или 3Н-пиррола (изопиррола, изоазола) ( $C_5$ ), пиперидина ( $C_6$ ), дигидропиридина ( $C_6$ ), тетрагидропиридина ( $C_6$ ), азепина ( $C_7$ );

$O_1$ : оксирана ( $C_3$ ), оксетана ( $C_4$ ), оксолана (тетрагидрофурана) ( $C_5$ ), оксола (дигидрофурана) ( $C_5$ ), оксана (тетрагидропирана) ( $C_6$ ), дигидропирана ( $C_6$ ), пирана ( $C_6$ ), оксепина ( $C_7$ );

$S_1$ : тирана ( $C_3$ ), тиетана ( $C_4$ ), тиолана (тетрагидротиюфена) ( $C_5$ ), тиана (тетрагидротиюпирана) ( $C_6$ ), тиепана ( $C_7$ );

$O_2$ : диоксолана ( $C_5$ ), диоксана ( $C_6$ ) и диоксепана ( $C_7$ );

$O_3$ : триоксана ( $C_6$ );

$N_2$ : имидазолидина ( $C_5$ ), пиразолидина (диазолидина) ( $C_5$ ), имидазолина ( $C_5$ ), пиразолина (дигидропиразола) ( $C_5$ ), пиперазина ( $C_6$ );

$N_1O_1$ : тетрагидрооксазола ( $C_5$ ), дигидрооксазола ( $C_5$ ), тетрагидроизоксазола ( $C_5$ ), дигидроизоксазола ( $C_5$ ), морфолина ( $C_6$ ), тетрагидрооксазина ( $C_6$ ), дигидрооксазина ( $C_6$ ), оксазина ( $C_6$ );

$N_1S_1$ : тиазолина ( $C_5$ ), тиазолидина ( $C_5$ ), тиоморфолина ( $C_6$ );

$N_2O_1$ : оксадиазина ( $C_6$ );

$O_1S_1$ : оксатиола ( $C_5$ ) и оксатиана (тиоксана) ( $C_6$ ); и

$N_1O_1S_1$ : оксатиазина ( $C_6$ ).

5 Примеры замещенных моноциклических гетероциклических групп включают группы, полученные из сахаридов в циклической форме, например, фуранозы ( $C_5$ ), такие как арабинофураноза, ликсофураноза, рибофураноза и ксилофураноза, и пиранозы ( $C_6$ ), такие как аллопираноза, альтропираноза, глюкопираноза, маннопираноза, гулопираноза, идопираноза, галактапираноза и талопираноза

10  $C_{5-20}$  арил: Термин « $C_{5-20}$  арил», в контексте данного документа, относится к моновалентному фрагменту, полученному путем удаления атома водорода от атома ароматического кольца ароматического соединения, причем указанный фрагмент содержит от 3 до 20 атомов в кольце. Термин « $C_{5-7}$  арил», в контексте данного документа, относится к одновалентному фрагменту, полученному удалением атома водорода от ароматического кольцевого атома ароматического соединения, который имеет от 5 до 7 кольцевых атомов, и термин « $C_{5-10}$  арил», в контексте данного документа, относится к одновалентному фрагменту, полученному удалением атома водорода от атома ароматического кольца ароматического соединения, которое имеет от 5 до 10 кольцевых атомов. Предпочтительно каждое кольцо содержит от 5 до 7 атомов в кольце.

15 В указанном контексте префиксы (например,  $C_{3-20}$ ,  $C_{5-7}$ ,  $C_{5-6}$ ,  $C_{5-10}$ , и т.д.) обозначают число атомов в кольце или диапазон числа атомов в кольце, как атомов углерода, так и гетероатомов. Например, термин « $C_{5-6}$  арил», в контексте данного документа, относится к арильной группе, содержащей 5 или 6 атомов в кольце.

20 Все атомы в кольце могут представлять собой атомы углерода, как в «карбоарильных группах». Примеры карбоарильных групп включают, но не ограничиваются ими, группы, полученные из бензола (т.е. фенил) ( $C_6$ ), нафталина ( $C_{10}$ ), азулена ( $C_{10}$ ), антрацена ( $C_{14}$ ), фенантрена ( $C_{14}$ ), нафтацена ( $C_{18}$ ) и пирена ( $C_{16}$ ).

25 Примеры арильных групп, которые содержат конденсированные кольца, по меньшей мере одно из которых представляет собой ароматическое кольцо, включают, но не ограничиваются ими, группы, произошедшие из индана (например, 2,3-дигидро-1H-инден) ( $C_9$ ), инден ( $C_9$ ), изоинден ( $C_9$ ), тетралин (1,2,3,4-тетрагидронафталин) ( $C_{10}$ ), аценафтен ( $C_{12}$ ), флуорен ( $C_{13}$ ), фенален ( $C_{13}$ ), ацефенантрен ( $C_{15}$ ) и ацеантрен ( $C_{16}$ ).

30 Альтернативно, атомы в кольце могут включать один или более гетероатомов, как в «гетероарильных группах». Примеры моноциклических гетероарильных групп включают, но не ограничиваются ими, группы, полученные из:

$N_1$ : пиррола (азола) ( $C_5$ ), пиридина (азина) ( $C_6$ );

35  $O_1$ : фурана (оксола) ( $C_5$ );

$S_1$ : тиафена (тиола) ( $C_5$ );

$N_1O_1$ : оксазола ( $C_5$ ), изоксазола ( $C_5$ ), изоксазина ( $C_6$ );

$N_2O_1$ : оксадиазола (фуразана) ( $C_5$ );

$N_3O_1$ : оксатриазола ( $C_5$ );

40  $N_1S_1$ : тиазола ( $C_5$ ), изотиазола ( $C_5$ );

N<sub>2</sub>: имидазола (1,3-диазола) (C<sub>5</sub>), пиразола (1,2-диазола) (C<sub>5</sub>), пиридазина (1,2-диазина) (C<sub>6</sub>), пиримидина (1,3-диазина) (C<sub>6</sub>) (например, цитозина, тимина, урацила), пиразина (1,4-диазина) (C<sub>6</sub>);

N<sub>3</sub>: триазола (C<sub>5</sub>), триазина (C<sub>6</sub>); и

N<sub>4</sub>: тетразола (C<sub>5</sub>).

5

Примеры гетероариллов, которые содержат конденсированные кольца, включают, но не ограничиваются ими: C<sub>9</sub> (с 2 конденсированными кольцами), полученные из бензофурана (O<sub>1</sub>), изобензофурана (O<sub>1</sub>), индола (N<sub>1</sub>), изоиндола (N<sub>1</sub>), индолизина (N<sub>1</sub>), индолина (N<sub>1</sub>), изоиндолина (N<sub>1</sub>), пурина (N<sub>4</sub>) (например, аденина, гуанина), бензимидазола (N<sub>2</sub>), индазола (N<sub>2</sub>), бензоксазола (N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>), бензизоксазола (N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>), бензодиоксила (O<sub>2</sub>), бензофуразана (N<sub>2</sub>O<sub>1</sub>), бензотриазола (N<sub>3</sub>), бензотиофурана (S<sub>1</sub>), бензотиазола (N<sub>1</sub>S<sub>1</sub>), бензотиадиазола (N<sub>2</sub>S);

10

C<sub>10</sub> (с 2 конденсированными кольцами), полученные из хромена (O<sub>1</sub>), изохромена (O<sub>1</sub>), хромана (O<sub>1</sub>), изохромана (O<sub>1</sub>), бензодиоксана (O<sub>2</sub>), хинолина (N<sub>1</sub>), изохинолина (N<sub>1</sub>), хинолизина (N<sub>1</sub>), бензоксазина (N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>), бензодиазина (N<sub>2</sub>), пиридопиридина (N<sub>2</sub>), хиноксалина (N<sub>2</sub>), хиназолина (N<sub>2</sub>), циннолина (N<sub>2</sub>), фталазина (N<sub>2</sub>), нафтиридина (N<sub>2</sub>), птеридина (N<sub>4</sub>);

15

C<sub>11</sub> (с 2 конденсированными кольцами), полученные из бензодиазепина (N<sub>2</sub>);

C<sub>13</sub> (с 3 конденсированными кольцами), полученные из карбазола (N<sub>1</sub>), дибензофурана (O<sub>1</sub>), дибензотиофена (S<sub>1</sub>), карболина (N<sub>2</sub>), перимидина (N<sub>2</sub>), пиридоиндола (N<sub>2</sub>); и

20

C<sub>14</sub> (с 3 конденсированными кольцами), полученные из акридина (N<sub>1</sub>), ксантена (O<sub>1</sub>), тиоксантена (S<sub>1</sub>), оксантрена (O<sub>2</sub>), феноксатиина (O<sub>1</sub>S<sub>1</sub>), феназина (N<sub>2</sub>), феноксазина (N<sub>1</sub>O<sub>1</sub>), фенотиазина (N<sub>1</sub>S<sub>1</sub>), тиантрена (S<sub>2</sub>), фенантридина (N<sub>1</sub>), фенантролина (N<sub>2</sub>), феназина (N<sub>2</sub>).

25

Описанные выше группы в отдельности или как часть другого заместителя могут сами необязательно содержать в качестве заместителя одну или более групп, выбранных из них самих и дополнительных заместителей, перечисленных ниже.

Галоген: -F, -Cl, -Br и -I.

30

Гидроксигруппы: -OH.

Простая эфирная группа: -OR, где R представляет собой заместитель простой эфирной группы, например, C<sub>1-7</sub> алкильную группу (которая также называется C<sub>1-7</sub> алкоксигруппой, как описано ниже), C<sub>3-20</sub> гетероциклическую группу (которая также называется C<sub>3-20</sub> гетероциклилоксигруппой) или C<sub>5-20</sub> арильную группу (которая также называется C<sub>5-20</sub> арилокси-группой), предпочтительно C<sub>1-7</sub> алкильную группу.

35

Алкокси: -OR, где R представляет собой алкильную группу, например, C<sub>1-7</sub> алкильную группу. Примеры C<sub>1-7</sub> алкоксигрупп включают, но не ограничиваются ими, -OMe (метокси), -OEt (этокси), -O(nPr) (н-пропокси), -O(iPr) (изопропокси), -O(nBu) (н-бутокси), -O(sBu) (втор-бутокси), -O(iBu) (изобутокси) и -O(tBu) (трет-бутокси).

40

Ацеталь:  $-\text{CH}(\text{OR}^1)(\text{OR}^2)$ , где  $\text{R}^1$  и  $\text{R}^2$  независимо представляют собой заместители ацеталей, например,  $\text{C}_{1-7}$  алкильную группу,  $\text{C}_{3-20}$  гетероциклильную группу или  $\text{C}_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $\text{C}_{1-7}$  алкильную группу, или в случае «циклической» ацетальной группы,  $\text{R}^1$  и  $\text{R}^2$  вместе с двумя атомами кислорода, к которым они присоединены, и атомами углерода, к которым они присоединены, образуют гетероциклический кольцо, содержащее от 4 до 8 атомов в кольце. Примеры ацетальных групп включают, но не ограничиваются ими,  $-\text{CH}(\text{OMe})_2$ ,  $-\text{CH}(\text{OEt})_2$  и  $-\text{CH}(\text{OMe})(\text{OEt})$ .

Гемиацеталь:  $-\text{CH}(\text{OH})(\text{OR}^1)$ , где  $\text{R}^1$  представляет собой заместитель гемиацетала, например,  $\text{C}_{1-7}$  алкильную группу,  $\text{C}_{3-20}$  гетероциклильную группу или  $\text{C}_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $\text{C}_{1-7}$  алкильную группу. Примеры гемиацетальных групп включают, но не ограничиваются ими,  $-\text{CH}(\text{OH})(\text{OMe})$  и  $-\text{CH}(\text{OH})(\text{OEt})$ .

Кеталь:  $-\text{CR}(\text{OR}^1)(\text{OR}^2)$ , где  $\text{R}^1$  и  $\text{R}^2$  являются такими, как определено для ацеталей, и  $\text{R}$  представляет собой заместитель кетала, отличный от водорода, например,  $\text{C}_{1-7}$  алкильную группу,  $\text{C}_{3-20}$  гетероциклильную группу или  $\text{C}_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $\text{C}_{1-7}$  алкильную группу. Примеры кетальных групп включают, но не ограничиваются ими,  $-\text{C}(\text{Me})(\text{OMe})_2$ ,  $-\text{C}(\text{Me})(\text{OEt})_2$ ,  $-\text{C}(\text{Me})(\text{OMe})(\text{OEt})$ ,  $-\text{C}(\text{Et})(\text{OMe})_2$ ,  $-\text{C}(\text{Et})(\text{OEt})_2$  и  $-\text{C}(\text{Et})(\text{OMe})(\text{OEt})$ .

Гемикеталь:  $-\text{CR}(\text{OH})(\text{OR}^1)$ , где  $\text{R}^1$  является таким, как определено для гемиацеталей, и  $\text{R}$  представляет собой заместитель гемикетала, отличный от водорода, например,  $\text{C}_{1-7}$  алкильную группу,  $\text{C}_{3-20}$  гетероциклильную группу или  $\text{C}_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $\text{C}_{1-7}$  алкильную группу. Примеры гемиацетальных групп включают, но не ограничиваются ими,  $-\text{C}(\text{Me})(\text{OH})(\text{OMe})$ ,  $-\text{C}(\text{Et})(\text{OH})(\text{OMe})$ ,  $-\text{C}(\text{Me})(\text{OH})(\text{OEt})$  и  $-\text{C}(\text{Et})(\text{OH})(\text{OEt})$ .

Оксо (кето, -он):  $=\text{O}$ .

Тион (тиокетон):  $=\text{S}$ .

Имино (имин):  $=\text{NR}$ , где  $\text{R}$  представляет собой заместитель имногруппы, например, водород,  $\text{C}_{1-7}$  алкильную группу,  $\text{C}_{3-20}$  гетероциклильную группу или  $\text{C}_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно водород или  $\text{C}_{1-7}$  алкильную группу. Примеры сложноэфирных групп включают, но не ограничиваются ими,  $=\text{NH}$ ,  $=\text{NMe}$ ,  $=\text{NEt}$  и  $=\text{NPh}$ .

Формил (карбальдегид, карбоксальдегид):  $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$ .

Ацил (кето):  $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$ , где  $\text{R}$  представляет собой заместитель ацильной группы, например,  $\text{C}_{1-7}$  алкильную группу (которая также называется  $\text{C}_{1-7}$  алкилацилом или  $\text{C}_{1-7}$  алканойлом),  $\text{C}_{3-20}$  гетероциклильную группу (которая также называется  $\text{C}_{3-20}$  гетероциклилацилом) или  $\text{C}_{5-20}$  арильную группу (которая также называется  $\text{C}_{5-20}$  арилацилом), предпочтительно  $\text{C}_{1-7}$  алкильную группу. Примеры ацильных групп включают, но не ограничиваются ими,  $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$  (ацетил),  $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$  (пропионил),  $-\text{C}(=\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$  (трет-бутирил) и  $-\text{C}(=\text{O})\text{Ph}$  (бензоил, фенол).

Карбоксии (карбоновая кислота):  $-C(=O)OH$ .

Тиокарбоксии (тиокарбоновая кислота):  $-C(=S)SH$ .

5 Тиолокарбоксии (тиолокарбоновая кислота):  $-C(=O)SH$ .

Тионоккарбоксии (тионоккарбоновая кислота):  $-C(=S)OH$ .

Имидокислота:  $-C(=NH)OH$ .

10

Гидроксамовая кислота:  $-C(=NOH)OH$ .

Сложноэфирная группа (карбоксилат, сложный эфир карбоновой кислоты, оксикарбонил):  $-C(=O)OR$ , где R представляет собой заместитель сложноэфирной группы, например,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры сложноэфирных групп включают, но не ограничиваются ими,  $-C(=O)OCH_3$ ,  $-C(=O)OCH_2CH_3$ ,  $-C(=O)OC(CH_3)_3$  и  $-C(=O)OPh$ .

15

Ацилокси (обращенный сложный эфир):  $-OC(=O)R$ , где R представляет собой заместитель ацилокси-группы, например,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры ацилоксигрупп включают, но не ограничиваются ими,  $-OC(=O)CH_3$  (ацетокси),  $-OC(=O)CH_2CH_3$ ,  $-OC(=O)C(CH_3)_3$ ,  $-OC(=O)Ph$  и  $-OC(=O)CH_2Ph$ .

20

Оксикарбонил:  $-OC(=O)OR$ , где R представляет собой заместитель сложноэфирной группы, например,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры сложноэфирных групп включают, но не ограничиваются ими,  $-OC(=O)OCH_3$ ,  $-OC(=O)OCH_2CH_3$ ,  $-OC(=O)OC(CH_3)_3$  и  $-OC(=O)OPh$ .

25

Амино:  $-NR^1R^2$ , где  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляют собой заместители аминогрупп, например, водород,  $C_{1-7}$  алкильную группу (которая также называется  $C_{1-7}$  алкиламино или ди- $C_{1-7}$  алкиламино),  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно H или  $C_{1-7}$  алкильную группу, или в случае «циклической» аминогруппы,  $R^1$  и  $R^2$ , вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 атомов в кольце. Аминогруппы могут быть первичными ( $-NH_2$ ), вторичными ( $-NHR^1$ ) или третичными ( $-NHR^1R^2$ ) и в катионной форме могут быть четвертичными ( $-^+NR^1R^2R^3$ ). Примеры аминогрупп включают, но не ограничиваются ими,  $-NH_2$ ,  $-NHCH_3$ ,  $-NHCH(CH_3)_2$ ,  $-N(CH_3)_2$ ,  $-N(CH_2CH_3)_2$  и  $-NPh$ . Примеры циклических аминогрупп включают, но не ограничиваются ими, азиридино, азетидино, пирролидино, пиперидино, пиперазино, морфолино и тиоморфолино.

35

Амидо (карбамоил, карбамил, аминокарбонил, карбоксамид):  $-C(=O)NR^1R^2$ , где  $R^1$  и  $R^2$  представляют собой заместители аминогрупп, как определено для аминогрупп. Примеры амидных групп включают, но не

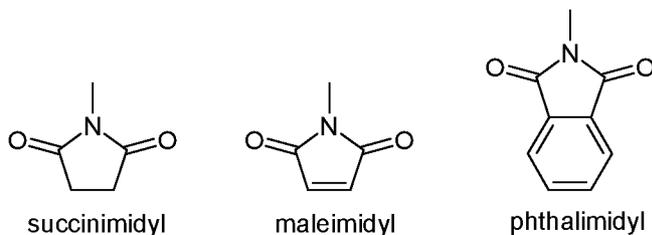
40

ограничиваются ими,  $-C(=O)NH_2$ ,  $-C(=O)NHCH_3$ ,  $-C(=O)N(CH_3)_2$ ,  $-C(=O)NHCH_2CH_3$  и  $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$ , а также амидные группы, в которых  $R^1$  и  $R^2$ , вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклическую структуру, как, например, в пиперидинокарбониле, морфолинокарбониле, тиоморфолинокарбониле и пиперазинокарбониле.

5

Тиоамидо (тиокарбамил):  $-C(=S)NR^1R^2$ , где  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляют собой заместители аминогрупп, как определено для аминогрупп. Примеры амидных групп включают, но не ограничиваются ими,  $-C(=S)NH_2$ ,  $-C(=S)NHCH_3$ ,  $-C(=S)N(CH_3)_2$  и  $-C(=S)NHCH_2CH_3$ .

- 10 Ациламидо (ациламино):  $-NR^1C(=O)R^2$ , где  $R^1$  представляет собой заместитель амидной группы, например, водород,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно водород или  $C_{1-7}$  алкильную группу и  $R^2$  представляет собой заместитель ацильной группы, например,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно водород или  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры ациламидных групп включают, но не ограничиваются ими,  $-NHC(=O)CH_3$ ,  $-NHC(=O)CH_2CH_3$  и  $-NHC(=O)Ph$ .  $R^1$  и  $R^2$  вместе могут образовывать циклическую структуру, как, например, в сукцинимидиле, малеимидиле и фталимидиле:



Аминокарбонилокси:  $-OC(=O)NR^1R^2$ , где  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляют собой заместители аминогруппы, как определено для аминогруппы. Примеры аминокарбонилксигрупп включают, но не ограничиваются ими,  $-OC(=O)NH_2$ ,  $-OC(=O)NHMe$ ,  $-OC(=O)NMe_2$  и  $-OC(=O)NEt_2$ .

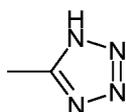
20

- Уреидо:  $-N(R^1)CONR^2R^3$  где  $R^2$  и  $R^3$  независимо представляют собой заместители аминогруппы, как определено для аминогруппы, и  $R^1$  представляет собой заместитель уреидогруппы, например, водород,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно водород или  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры уреидогрупп включают, но не ограничиваются ими,  $-NHCONH_2$ ,  $-NHCONHMe$ ,  $-NHCONHEt$ ,  $-NHCONMe_2$ ,  $-NHCONEt_2$ ,  $-NMeCONH_2$ ,  $-NMeCONHMe$ ,  $-NMeCONHEt$ ,  $-NMeCONMe_2$  и  $-NMeCONEt_2$ .

25

- 30 Гуанидино:  $-NH-C(=NH)NH_2$ .

Тетразолил: пятичленное ароматическое кольцо, содержащее четыре атома азота и один атом углерода,



Имино:  $=NR$ , где R представляет собой заместитель иминогруппы, например, водород,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно H или  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры иминогрупп включают, но не ограничиваются ими,  $=NH$ ,  $=NMe$  и  $=NEt$ .

5 Амидин (амидино):  $-C(=NR)NR_2$ , где каждая R представляет собой заместитель амидиновой группы, например, водород,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно H или  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры амидиновых групп включают, но не ограничиваются ими,  $-C(=NH)NH_2$ ,  $-C(=NH)NMe_2$  и  $-C(=NMe)NMe_2$ .

10 Нитро:  $-NO_2$ .

Нитрозо:  $-NO$ .

Азидо:  $-N_3$ .

15

Циано (нитрил, карбонитрил):  $-CN$ .

Изоциано:  $-NC$ .

20 Цианато:  $-OCN$ .

Изоцианато:  $-NCO$ .

Тиоциано (тиоцианато):  $-SCN$ .

25

Изотиоциано (изотиоцианато):  $-NCS$ .

Сульфгидрил (тиол, меркапто):  $-SH$ .

30 Тиоэфир (сульфид):  $-SR$ , где R представляет собой заместитель тиоэфирной группы, например,  $C_{1-7}$  алкильную группу (которая также называется  $C_{1-7}$  алкилтиогруппой),  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры  $C_{1-7}$  алкилтиогрупп включают, но не ограничиваются ими,  $-SCH_3$  и  $-SCH_2CH_3$ .

35 Дисульфид:  $-SS-R$ , где R представляет собой заместитель дисульфидной группы, например,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $C_{1-7}$  алкильную группу (которая также называется в данном документе  $C_{1-7}$  алкилдисульфидом). Примеры  $C_{1-7}$  алкилдисульфидных групп включают, но не ограничиваются ими,  $-SSCH_3$  и  $-SSCH_2CH_3$ .

40 Сульфин (сульфинил, сульфоксид):  $-S(=O)R$ , где R представляет собой заместитель сульфиновой группы, например,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу,

предпочтительно  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры сульфиновых групп включают, но не ограничиваются ими,  $-S(=O)CH_3$  и  $-S(=O)CH_2CH_3$ .

5 Сульфон (сульфонил):  $-S(=O)_2R$ , где R представляет собой заместитель сульфоновой группы, например,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $C_{1-7}$  алкильную группу, включая, например, фторированную или перфторированную  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры сульфоновых групп включают, но не ограничиваются ими,  $-S(=O)_2CH_3$  (метансульфонил, мезил) -  $S(=O)_2CF_3$  (трифлил),  $-S(=O)_2CH_2CH_3$  (езил),  $-S(=O)_2C_4F_9$  (нонафлил),  $-S(=O)_2CH_2CF_3$  (трезил), -  $S(=O)_2CH_2CH_2NH_2$  (таурил),  $-S(=O)_2Ph$  (фенилсульфонил, безил), 4-метилфенилсульфонил (тозил), 4-  $Cl$  фенилсульфонил (клозил), 4-бромфенилсульфонил (брозил), 4-нитрофенил (нозил), 2-  $Na$  нафталинсульфонат (напзил) и 5-диметиламинонафталин-1-илсульфонат (данзил).

Сульфиновая кислота (сульфино):  $-S(=O)OH$ ,  $-SO_2H$ .

15 Сульфоновая кислота (сульфо):  $-S(=O)_2OH$ ,  $-SO_3H$ .

20 Сульфинат (сложный эфир сульфиновой кислоты):  $-S(=O)OR$ ; где R представляет собой заместитель сульфидной группы, например,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры сульфидных групп включают, но не ограничиваются ими,  $-S(=O)OCH_3$  (метоксисульфидил; метилсульфинат) и  $-S(=O)OCH_2CH_3$  (этоксисульфидил; этилсульфинат).

25 Сульфидат (сложный эфир сульфидной кислоты):  $-S(=O)_2OR$ , где R представляет собой заместитель сульфидной группы, например,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры сульфидных групп включают, но не ограничиваются ими,  $-S(=O)_2OCH_3$  (метоксисульфидил; метилсульфинат) и  $-S(=O)_2OCH_2CH_3$  (этоксисульфидил; этилсульфинат).

30 Сульфидилокси:  $-OS(=O)R$ , где R представляет собой заместитель сульфидилоксигруппы, например,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры сульфидилоксигрупп включают, но не ограничиваются ими,  $-OS(=O)CH_3$  и  $-OS(=O)CH_2CH_3$ .

35 Сульфидилокси:  $-OS(=O)_2R$ , где R представляет собой заместитель сульфидилоксигруппы, например,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры сульфидилоксигрупп включают, но не ограничиваются ими,  $-OS(=O)_2CH_3$  (мезилат) и  $-OS(=O)_2CH_2CH_3$  (езилат).

40 Сульфат:  $-OS(=O)_2OR$ ; где R представляет собой заместитель сульфидной группы, например,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры сульфидных групп включают, но не ограничиваются ими,  $-OS(=O)_2OCH_3$  и  $-SO(=O)_2OCH_2CH_3$ .

Сульфамил (сульфамоил; амид сульффиновой кислоты; сульффинамид):  $-S(=O)NR^1R^2$ , где  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляют собой заместители для аминогрупп, как определено для аминогрупп. Примеры сульфамильных групп включают, но не ограничиваются ими,  $-S(=O)NH_2$ ,  $-S(=O)NH(CH_3)$ ,  $-S(=O)N(CH_3)_2$ ,  $-S(=O)NH(CH_2CH_3)$ ,  $-S(=O)N(CH_2CH_3)_2$  и  $-S(=O)NHPh$ .

Сульфонамидо (сульффинамидо; амид сульффиновой кислоты; сульффинамид):  $-S(=O)_2NR^1R^2$ , где  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляют собой заместители для аминогрупп, как определено для аминогрупп. Примеры сульффинамидных групп включают, но не ограничиваются ими,  $-S(=O)_2NH_2$ ,  $-S(=O)_2NH(CH_3)$ ,  $-S(=O)_2N(CH_3)_2$ ,  $-S(=O)_2NH(CH_2CH_3)$ ,  $-S(=O)_2N(CH_2CH_3)_2$  и  $-S(=O)_2NHPh$ .

Сульффимино:  $-NR^1S(=O)_2OH$ , где  $R^1$  представляет собой заместитель аминогруппы, как определено для аминогрупп. Примеры сульффиминогрупп включают, но не ограничиваются ими,  $-NHS(=O)_2OH$  и  $-N(CH_3)S(=O)_2OH$ .

Сульффиноамино:  $-NR^1S(=O)_2R$ , где  $R^1$  представляет собой заместитель аминогруппы, как определено для аминогрупп, и  $R$  представляет собой заместитель сульффиноаминогруппы, например,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры сульффиноаминогрупп включают, но не ограничиваются ими,  $-NHS(=O)_2CH_3$  и  $-N(CH_3)S(=O)_2C_6H_5$ .

Сульффиноамино:  $-NR^1S(=O)R$ , где  $R^1$  представляет собой заместитель аминогруппы, как определено для аминогрупп, и  $R$  представляет собой заместитель сульффиноаминогруппы, например,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $C_{1-7}$  алкильную группу. Примеры сульффиноаминогрупп включают, но не ограничиваются ими,  $-NHS(=O)CH_3$  и  $-N(CH_3)S(=O)C_6H_5$ .

Фосфино (фосфин):  $-PR_2$ , где  $R$  представляет собой заместитель фосфиногруппы, например,  $-H$ ,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $-H$ ,  $C_{1-7}$  алкильную группу или  $C_{5-20}$  арильную группу. Примеры фосфиногрупп включают, но не ограничиваются ими,  $-PH_2$ ,  $-P(CH_3)_2$ ,  $-P(CH_2CH_3)_2$ ,  $-P(t-Bu)_2$  и  $-P(Ph)_2$ .

Фосфо:  $-P(=O)_2$ .

Фосфинил (фосфиноксид):  $-P(=O)R_2$ , где  $R$  представляет собой заместитель фосфинильной группы, например,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$  арильную группу, предпочтительно  $C_{1-7}$  алкильную группу или  $C_{5-20}$  арильную группу. Примеры фосфинильных групп включают, но не ограничиваются ими,  $-P(=O)(CH_3)_2$ ,  $-P(=O)(CH_2CH_3)_2$ ,  $-P(=O)(t-Bu)_2$  и  $-P(=O)(Ph)_2$ .

Фосфиновая кислота (фосфино):  $-P(=O)(OH)_2$ .

Фосфонат (сложный эфир фосфиногруппы):  $-P(=O)(OR)_2$ , где  $R$  представляет собой заместитель фосфонатной группы, например,  $-H$ ,  $C_{1-7}$  алкильную группу,  $C_{3-20}$  гетероциклическую группу или  $C_{5-20}$

арильную группу, предпочтительно -H, C<sub>1-7</sub> алкильную группу или C<sub>5-20</sub> арильную группу. Примеры фосфонатных групп включают, но не ограничиваются ими, -P(=O)(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -P(=O)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -P(=O)(O-t-Bu)<sub>2</sub> и -P(=O)(OPh)<sub>2</sub>.

5 Фосфорная кислота (фосфонокси): -OP(=O)(OH)<sub>2</sub>.

Фосфат (сложный эфир фосфоноксигруппы): -OP(=O)(OR)<sub>2</sub>, где R представляет собой заместитель фосфатной группы, например, -H, C<sub>1-7</sub> алкильную группу, C<sub>3-20</sub> гетероциклическую группу или C<sub>5-20</sub> арильную группу, предпочтительно -H, C<sub>1-7</sub> алкильную группу или C<sub>5-20</sub> арильную группу. Примеры фосфатных групп

10 включают, но не ограничиваются ими, -OP(=O)(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -OP(=O)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -OP(=O)(O-t-Bu)<sub>2</sub> и -OP(=O)(OPh)<sub>2</sub>.

Фосфористая кислота: -OP(OH)<sub>2</sub>.

15 Фосфит: -OP(OR)<sub>2</sub>, где R представляет собой заместитель фосфитной группы, например, -H, C<sub>1-7</sub> алкильную группу, C<sub>3-20</sub> гетероциклическую группу или C<sub>5-20</sub> арильную группу, предпочтительно -H, C<sub>1-7</sub> алкильную группу или C<sub>5-20</sub> арильную группу. Примеры фосфитных групп включают, но не ограничиваются ими, -OP(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -OP(O-t-Bu)<sub>2</sub> и -OP(OPh)<sub>2</sub>.

20 Фосфорамидит: -OP(OR<sup>1</sup>)-NR<sup>2</sup><sub>2</sub>, где R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> представляют собой заместители фосфорамидитной группы, например, -H, (необязательно замещенную) C<sub>1-7</sub> алкильную группу, C<sub>3-20</sub> гетероциклическую группу или C<sub>5-20</sub> арильную группу, предпочтительно -H, C<sub>1-7</sub> алкильную группу или C<sub>5-20</sub> арильную группу. Примеры фосфорамидитных групп включают, но не ограничиваются ими, -OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-N(i-Pr)<sub>2</sub> и -OP(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)-N(i-Pr)<sub>2</sub>.

25 Фосфорамидат: -OP(=O)(OR<sup>1</sup>)-NR<sup>2</sup><sub>2</sub>, где R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> представляют собой заместители фосфорамидатной группы, например, -H, (необязательно замещенную) C<sub>1-7</sub> алкильную группу, C<sub>3-20</sub> гетероциклическую группу или C<sub>5-20</sub> арильную группу, предпочтительно -H, C<sub>1-7</sub> алкильную группу или C<sub>5-20</sub> арильную группу. Примеры фосфорамидатных групп включают, но не ограничиваются ими, -OP(=O)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -OP(=O)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-N(i-Pr)<sub>2</sub> и -OP(=O)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)-N(i-Pr)<sub>2</sub>.

30

#### Алкилен

С<sub>3-12</sub> алкилен: Термин «С<sub>3-12</sub> алкилен», в контексте данного документа, относится к бидентатному фрагменту, полученному путем удаления двух атомов водорода либо от одного и того же атома углерода, либо по одному от каждого из двух разных атомов углерода углеводородного соединения, содержащего от 3 до 12 атомов углерода (если не указано иное), который может являться алифатическим или алициклическим, и который может быть насыщенным, частично ненасыщенным или полностью ненасыщенным. Таким образом, термин «алкилен» включает подклассы алкенилен, алкинилен, циклоалкилен и т.д., описанные ниже.

40

Примеры линейных насыщенных C<sub>3-12</sub> алкиленовых групп включают, но не ограничиваются ими, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, где n равен целому числу от 3 до 12, например, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- (пропилен), -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- (бутилен), -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- (пентилен) и -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- (гептилен).

- 5 Примеры разветвленных насыщенных C<sub>3-12</sub> алкиленовых групп включают, но не ограничиваются ими, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-, -CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>- и -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-.

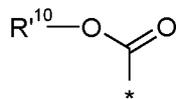
- 10 Примеры линейных частично ненасыщенных C<sub>3-12</sub> алкиленовых групп (C<sub>3-12</sub> алкениленовых и алкиниленовых групп) включают, но не ограничиваются ими, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-CH=CH-, -CH=CH-CH=CH-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=CH- и -CH<sub>2</sub>-C≡C-CH<sub>2</sub>-.

- 15 Примеры разветвленных частично ненасыщенных C<sub>3-12</sub> алкиленовых групп (C<sub>3-12</sub> алкениленовых и алкиниленовых групп) включают, но не ограничиваются ими, -C(CH<sub>3</sub>)=CH-, -C(CH<sub>3</sub>)=CH-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-CH(CH<sub>3</sub>)- и -C≡C-CH(CH<sub>3</sub>)-

- 20 Примеры алициклических насыщенных C<sub>3-12</sub> алкиленовых групп (C<sub>3-12</sub> циклоалкиленов) включают, но не ограничиваются ими, циклопентилен (например, циклопент-1,3-илен) и циклогексилен (например, циклогекс-1,4-илен).

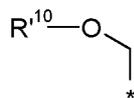
- 25 Примеры алициклических частично ненасыщенных C<sub>3-12</sub> алкиленовых групп (C<sub>3-12</sub> циклоалкиленов) включают, но не ограничиваются ими, циклопентенилен (например, 4-циклопентен-1,3-илен), циклогексенилен (например, 2-циклогексен-1,4-илен; 3-циклогексен-1,2-илен; 2,5-циклогексадиен-1,4-илен).

Карбаматная защитная группа для атома азота: термин «карбаматная защитная группа для атома азота» относится к фрагменту, который маскирует азот в иминной связи, и хорошо известны в данной области техники. Эти группы имеют следующую структуру:



- 30 где R<sup>10</sup> является такой R, как определено выше. Большое количество подходящих групп описано на страницах с 503 по 549 Greene, T.W. and Wuts, G.M., Protective Groups in Organic Synthesis, 3<sup>rd</sup> Edition, John Wiley & Sons, Inc., 1999, которая включена в данный документ посредством ссылки.

- 35 Полуаминая защитная группа для атома азота: термин «полуаминая защитная группа для атома азота» относится к группе, имеющей следующую структуру:



где R<sup>10</sup> является такой R, как определено выше. Большое количество подходящих групп описано на страницах с 633 по 647 как амидозащитные группы Greene, T.W. and Wuts, G.M., Protective Groups in Organic

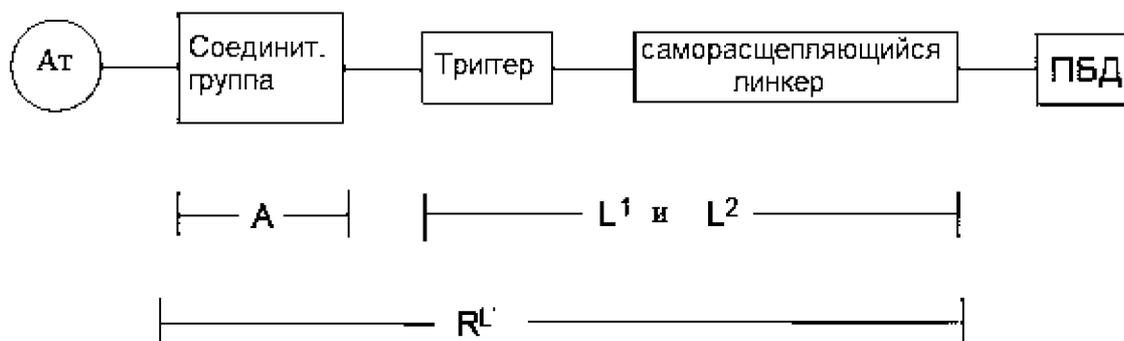
Synthesis, 3<sup>rd</sup> Edition, John Wiley & Sons, Inc., 1999, которая включена в данный документ посредством ссылки.

5 Группы Карбаматная защитная группа для атома азота и Полуаминая защитная группа для атома азота могут быть совместно названы «азотзащитной группой для синтеза».

### Конъюгаты

В данном описании предложен конъюгат, содержащий соединение ПБД, соединенное с антителим через фрагмент линкера.

10 В одном варианте реализации, конъюгат содержит антители, соединенное со спейсерной соединительной группой, спейсер, соединенный с триггером, триггер, соединенный с саморазрушающимся линкером, и саморасщепляющийся линкер, соединенный с положением N10 соединения ПБД. Такой конъюгат проиллюстрирован ниже:



15 где  $Ab$  представляет собой антители, как определено выше, и ПБД представляет собой соединение пирролобензодиазепина (D), как описано в данном документе. На иллюстрации показаны фрагменты, которые соответствуют  $R^L$ , A,  $L^1$  и  $L^2$  в некоторых вариантах реализации данного изобретения.  $R^L$  может представлять собой или  $R^{L1}$ , или  $R^{L2}$ . D представляет собой  $D^L$  с удаленными  $R^{L1}$  или  $R^{L2}$ .

20 Данное изобретение подходит для применения для получения ПБД соединения в предпочтительной области в теле субъекта. В предпочтительных вариантах реализации, конъюгат обеспечивает высвобождение активного ПБД соединения, не содержащего какого-либо фрагмента линкера. При этом не наблюдается каких-либо остатков, которые могли бы влиять на реакционную способность ПБД соединения.

25 Линкер соединяет антители с фрагментом D лекарственного средства ПБД посредством ковалентной связи (связей). Линкер представляет собой бифункциональный или многофункциональный фрагмент, который можно использовать для связывания одного или более фрагментов лекарственного средства (D) и единицы антителя ( $Ab$ ) с образованием конъюгатов антители-лекарственное средство (КАЛС). Линкер ( $R^L$ ) может  
30 являться стабильным за пределами клетки, т.е. внеклеточно, или же он может поддаваться отщеплению под действием ферментативной активности, гидролиза или в условиях других процессов метаболизма. Конъюгат антители-лекарственное средство (КАЛС) удобно получать с использованием линкера, содержащего реакционноспособную функциональную группу для связывания с фрагментом лекарственного средства и с

антителом Тиоловая группа цистеина или аминная группа, например, N-концевая или боковая цепь аминокислоты, такой как лизин, в антителе (Ab) может образовывать связь с функциональной группой линкерного или спейсерного реагента, фрагментом ПБД лекарственного средства (D) или реагента лекарственное средство-линкер ( $D^L$ ,  $D-R^L$ ), где  $R^L$  может представлять собой  $R^{L1}$  или  $R^{L2}$ .

5

Линкеры КАЛС предпочтительно предотвращают агрегацию молекул КАЛС и обеспечивают нахождение КАЛС в свободно растворимой в водной среде форме и в мономерном состоянии.

10

Линкеры КАЛС предпочтительно являются стабильными вне клетки. Перед транспортировкой или доставкой в клетку конъюгат антитело-лекарственное средство (КАЛС) предпочтительно является стабильным и остается интактным, то есть антитело остается связанным с фрагментом лекарственного средства. Линкеры являются стабильными вне клетки-мишени и могут расщепляться с некоторой эффективной скоростью внутри клетки. Эффективный линкер: (i) поддерживает свойства специфического связывания антитела; (ii) обеспечивает внутриклеточную доставку конъюгата или фрагмента лекарственного средства; (iii) остается стабильным и интактным, т.е. не расщепляется до момента доставки или транспортировки указанного конъюгата к области-мишени; и (iv) поддерживает цитотоксическое, приводящее к уничтожению клеток, действие или цитостатическое действие фрагмента ПБД лекарственного средства. Стабильность КАЛС можно определить с помощью стандартных аналитических методов, таких как масс-спектрометрия, ВЭЖХ и метод разделения/анализа ЖХ/МС.

20

Для ковалентного связывания антитела и фрагмента лекарственного средства необходимо, чтобы линкер имел две реакционноспособные функциональные группы, т.е. являлся бивалентным с точки зрения реакционноспособности. Бивалентные линкерные реагенты, которые могут использоваться для связывания двух или более функциональных или биологически активных фрагментов, таких как пептиды, нуклеиновые кислоты, лекарственные средства, токсины, антитела, гаптены и репортерные группы, являются известными, и описаны способы получения конъюгатов с использованием указанных линкеров (Hermanson, G.T. (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: New York, p 234-242).

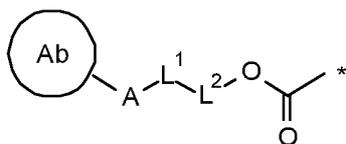
25

30

В другом варианте реализации линкер может быть заменен группами, которые модулируют агрегацию, растворимость или реактивность. Например, сульфатный заместитель может повышать растворимость реагента в воде и облегчать реакцию сочетания линкерного реагента с антителом или фрагментом лекарственного средства, или облегчать реакцию сочетания  $Ab-L$  с  $D^L$  или  $D^L-L$  с  $Ab$ , в зависимости от схемы синтеза, используемого для получения КАЛС.

35

В одном варианте реализации,  $L-R^L$  представляет собой группу:



где звездочка обозначает место присоединения к фрагменту лекарственного средства (D), Ab представляет собой антитело (L),  $L^1$  представляет собой линкер, A представляет собой связывающую группу,

соединяющую  $L^1$  с антителом,  $L^2$  представляет собой ковалентную связь или вместе с  $-OC(=O)-$  образует саморасщепляющийся линкер и  $L^1$  или  $L^2$  представляет собой отщепляемый линкер.

5  $L^1$  предпочтительно представляет собой отщепляемый линкер и может называться триггером для активации отщепления линкера.

10 Природа  $L^1$  и  $L^2$ , при его наличии, может сильно варьироваться. Указанные группы выбираются в соответствии с их способностью к расщеплению, которая может зависеть от условий в области-мишени, в которую доставляется конъюгат. Линкеры, которые расщепляются под действием ферментов, являются предпочтительными, несмотря на то, что также могут использоваться линкеры, отщепляемые при изменении рН (например, кислотолабильные или щелочнолабильные), температуры или при облучении (например, фотولاбильные). Линкеры, отщепляемые в присутствии восстановителя или окислителя, также могут использоваться согласно данному изобретению.

15  $L^1$  может содержать непрерывную последовательность аминокислот. Аминокислотная последовательность может представлять собой субстратную мишень для ферментативного расщепления, обеспечивая за счет этого высвобождение  $L-R^{L^1}$  из положения N10.

20 В одном варианте реализации,  $L^1$  отщепляется под действием фермента. В одном варианте реализации, фермент представляет собой эстеразу или пептидазу.

25 В одном варианте реализации,  $L^2$  присутствует и вместе с  $-C(=O)O-$  образует саморасщепляющийся линкер. В одном варианте реализации,  $L^2$  представляет собой субстрат для ферментативной активности, таким образом, обеспечивая высвобождение  $L-R^{L^1}$  из положения N10.

В одном варианте реализации, когда  $L^1$  отщепляется под действием фермента, и присутствует  $L^2$ , фермент расщепляет связь между  $L^1$  и  $L^2$ .

$L^1$  и  $L^2$ , при наличии, могут быть связаны посредством связи, выбранной из:

- 30  $-C(=O)NH-$ ,  
 $-C(=O)O-$ ,  
 $-NHC(=O)-$ ,  
 $-OC(=O)-$ ,  
 $-OC(=O)O-$ ,  
35  $-NHC(=O)O-$ ,  
 $-OC(=O)NH-$  и  
 $-NHC(=O)NH-$ .

40 Аминогруппа  $L^1$ , которая связывается с  $L^2$ , может представлять собой N-конец аминокислоты или может происходить из аминогруппы боковой цепи аминокислоты, например, боковой цепи аминокислоты лизина

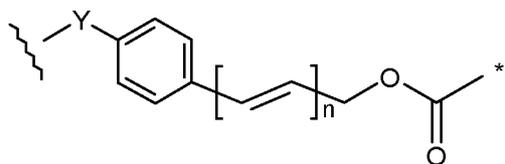
Карбоксильная группа  $L^1$ , которая связывается с  $L^2$ , может представлять собой С-конец аминокислоты или может происходить из карбоксильной группы боковой цепи аминокислоты, например, боковой цепи глутаминовой кислоты.

- 5 Гидроксильная группа  $L^1$ , которая связывается с  $L^2$ , может происходить из гидроксильной группы боковой цепи аминокислоты, например, боковой цепи аминокислоты серина

- 10 Термин «боковая цепь аминокислоты» включает группы, которые встречаются в: (i) природных аминокислотах, таких как аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин; (ii) минорных аминокислотах, таких как орнитин и цитруллин; (iii) не природных аминокислотах, бета-аминокислотах, синтетических аналогах и производных природных аминокислот; и (iv) всех энантиомерах, диастереомерах, изомерно обогащенных формах, меченых изотопом форм (например,  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ), защищенных формах и их рацемических смесях.

15

В одном варианте реализации,  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$  и  $L^2$  вместе образуют группу:

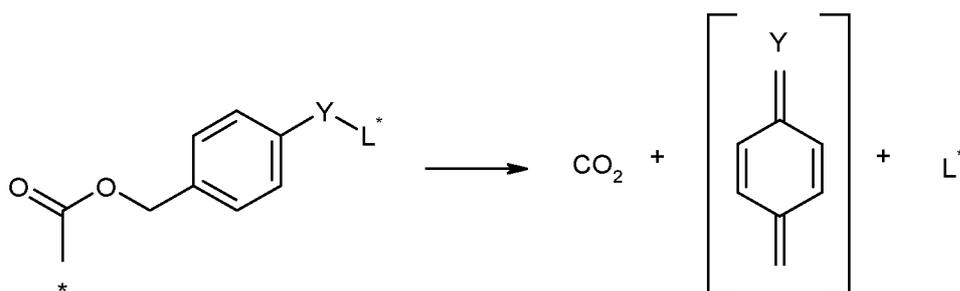


- 20 где звездочка обозначает место присоединения к положению N10, волнистая линия обозначает место присоединения к линкеру  $L^1$ , Y представляет собой  $-\text{N}(\text{H})-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{H})-$  или  $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ , а n равен 0-3. Фениленовое кольцо необязательно содержит в качестве заместителя один, два или три заместителя, описанных в данном документе. В одном варианте реализации, фениленовая группа необязательно содержит в качестве заместителя галоген,  $\text{NO}_2$ , R или OR.

- 25 В одном варианте реализации, Y представляет собой NH.  
В одном варианте реализации, n равен 0 или 1. Предпочтительно, n равен 0.

Когда Y представляет собой NH, и n равен 0, саморасщепляющийся линкер может называться п-аминобензилкарбонильным линкером (ПАВЛ).

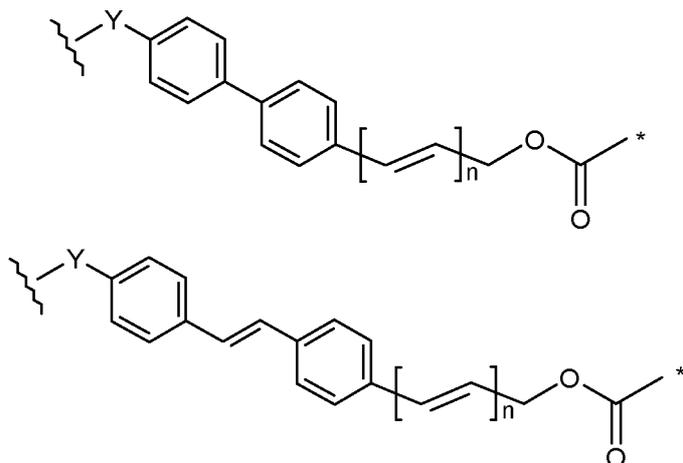
- 30 Саморасщепляющийся линкер обеспечивает высвобождение защищенного соединения при активации удаленного сайта, действуя таким образом, как показано ниже (для  $n=0$ ):



где  $L^*$  представляет собой активированную форму оставшегося фрагмента части линкера. Указанные группы имеют преимущество, которое заключается в том, что сайт активации отделен от соединения, подвергаемого защите. Как описано выше, фениленовая группа может быть необязательно замещенной.

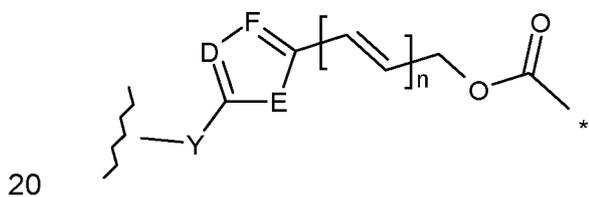
5 В одном варианте реализации описанному в данном документе, группа  $L^*$  представляет собой линкер  $L^1$  согласно данному описанию, который может содержать дипептидную группу.

10 В другом варианте реализации,  $-C(=O)O-$  и  $L^2$  вместе образуют группу, выбранную из следующих:



15 где звездочка, волнистая линия,  $Y$  и  $n$  являются такими, как определено выше. Каждое фениленовое кольцо необязательно содержит один, два или три заместителя, описанных в данном документе. В одном варианте реализации, фениленовое кольцо, содержащее заместитель  $Y$ , является необязательно замещенным, и фениленовое кольцо, не содержащее заместитель  $Y$ , является незамещенным. В одном варианте реализации, фениленовое кольцо, содержащее заместитель  $Y$ , является незамещенным, и фениленовое кольцо, не содержащее заместитель  $Y$ , является необязательно замещенным.

В другом варианте реализации,  $-C(=O)O-$  и  $L^2$  вместе образуют группу, выбранную из следующих:



20 где звездочка, волнистая линия,  $Y$  и  $n$  являются такими, как определено выше,  $E$  представляет собой  $O$ ,  $S$  или  $NR$ ,  $D$  представляет собой  $N$ ,  $CH$ , или  $CR$ , и  $F$  представляет собой  $N$ ,  $CH$  или  $CR$ .

25 В одном варианте реализации,  $D$  представляет собой  $N$ .  
В одном варианте реализации,  $D$  представляет собой  $CH$ .  
В одном варианте реализации,  $E$  представляет собой  $O$  или  $S$ .  
В одном варианте реализации,  $F$  представляет собой  $CH$ .

В предпочтительном варианте реализации, представляет собой катепсиновый лабильный линкер.

В одном варианте реализации, L<sup>1</sup> содержит дипептид. Указанный дипептид может представлять собой -NH-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-CO-, где -NH- и -CO- представляют собой N- и C-концы аминокислотных групп X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> соответственно. Аминокислоты в дипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот. Когда линкер представляет собой катепсиновый лабильный линкер, дипептид может представлять собой место действия для катепсин-опосредованного расщепления.

Кроме того, для указанных аминокислотных групп, содержащих карбоксильную или аминную функциональную группу боковой цепи, например, Glu и Lys соответственно, CO и NH могут представлять собой указанные функциональные группы боковой цепи.

В одном варианте реализации, группа -X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>- в дипептиде -NH-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-CO- выбрана из:

15            -Phe-Lys-,  
               -Val-Ala-,  
               -Val-Lys-,  
               -Ala-Lys-,  
               -Val-Cit-,  
               -Phe-Cit-,  
 20            -Leu-Cit-,  
               -Ile-Cit-,  
               -Phe-Arg-,  
               -Trp-Cit-

где Cit представляет собой цитруллин.

25            Предпочтительно, группа -X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>- в дипептиде -NH-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-CO- выбрана из:

              -Phe-Lys-,  
               -Val-Ala-,  
               -Val-Lys-,  
 30            -Ala-Lys-,  
               -Val-Cit-

Наиболее предпочтительно группа -X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>- в дипептиде -NH-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-CO- представляет собой -Phe-Lys- или -Val-Ala-.

35            Могут использоваться другие комбинации дипептидов, включая комбинации, описанные в Dubowchik *et al.*, *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855-869, включенном в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте реализации, цепь аминокислоты является дериватизированной, если это приемлемо.  
 40            Например, аминогруппа или карбоксильная группа боковой цепи аминокислоты может быть дериватизированной.

В одном варианте реализации, аминогруппа  $\text{NH}_2$  боковой цепи аминокислоты, такой как лизин, находится в дериватизированной форме, выбранной из группы, состоящей из  $\text{NHR}$  и  $\text{NRR}'$ .

В одном варианте реализации, карбоксигруппа  $\text{COOH}$  боковой цепи аминокислоты, такой как аспарагиновая кислота, находится в дериватизированной форме, выбранной из группы, состоящей из  $\text{COOR}$ ,  $\text{CONH}_2$ ,  
5  $\text{CONHR}$  и  $\text{CONRR}'$ .

В одном варианте реализации, боковая цепь аминокислоты является химически защищенной, если это приемлемо. Защитная группа боковой цепи может представлять собой группу, описанную ниже в отношении группы  $\text{R}^1$ . Авторы данного изобретения обнаружили, что защищенные аминокислотные  
10 последовательности поддаются ферментативному отщеплению. Например, было обнаружено, что дипептидная последовательность, содержащая боковую цепь остатка Lys, защищенную Boc-группой, поддается отщеплению катепсином.

Защитные группы боковых цепей аминокислот хорошо известны в данной области техники и описаны в каталоге Novabiochem. Дополнительные стратегии использования защитных групп представлены в *Protective  
15 Groups in Organic Synthesis, Greene and Wuts*.

Возможные защитные группы боковых цепей аминокислот, содержащих реакционноспособную функциональную группу в боковой цепи, показаны ниже:

20 Arg: Z, Mtr, Tos;

Asn: Trt, Xan;

Asp: Bzl, t-Bu;

Cys: Acn, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me, Trt;

Glu: Bzl, t-Bu;

25 Gln: Trt, Xan;

His: Boc, Dnp, Tos, Trt;

Lys: Boc, Z-Cl, Fmoc, Z, Alloc;

Ser: Bzl, TBDMS, TBDPS;

Thr: Bz;

30 Trp: Boc;

Tyr: Bzl, Z, Z-Br.

В одном варианте реализации, защитная группа боковой цепи выбрана таким образом, что она расположена ортогонально по отношению к группе, представляющей собой кэпирующую группу или ее часть, при  
35 наличии указанной кэпирующей группы. Таким образом, удаление защитной группы боковой цепи не приводит к удалению кэпирующей группы или какой-либо защитной группы функциональной группы, которая является частью кэпирующей группы.

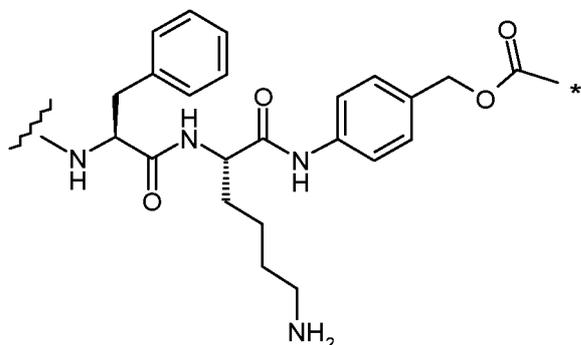
В других вариантах реализации, выбранные аминокислоты представляют собой аминокислоты, не  
40 содержащие реакционноспособную функциональную группу в боковой цепи. Например, аминокислоты могут быть выбраны из: Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro и Val.

В одном варианте реализации, дипептид используется в комбинации с саморасщепляющимся линкером. Саморасщепляющийся линкер может быть связан с  $-X_2-$ .

5 Если саморасщепляющийся линкер присутствует, то  $-X_2-$  непосредственно связан с указанным саморасщепляющимся линкером. Предпочтительно группа  $-X_2-CO-$  связана с Y, где Y представляет собой NH, с образованием, таким образом, группы  $-X_2-CO-NH-$ .

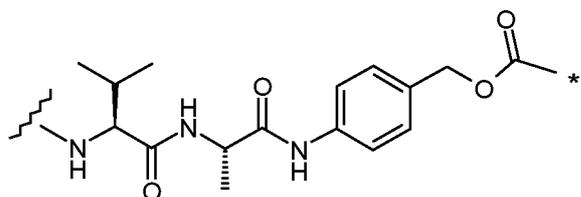
10  $-NH-X_1-$  непосредственно связан с группой A. Указанная группа A может содержать функциональную группу  $-CO-$  с образованием, таким образом, амидной связи с  $-X_1-$ .

В одном варианте реализации,  $L^1$  и  $L^2$  вместе с  $-OC(=O)-$  составляют группу  $NH-X_1-X_2-CO-PABC-$ . PABC- группа непосредственно связана с положением N10. Предпочтительно саморасщепляющийся линкер и дипептид вместе образуют группу  $-NH-Phe-Lys-CO-NH-PABC-$ , которая показана ниже:



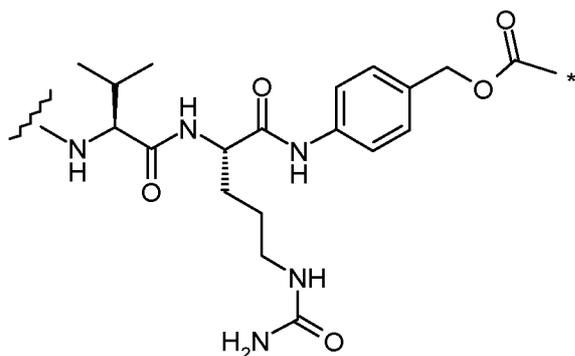
15 где звездочка обозначает место присоединения к положению N10, и волнистая линия обозначает место присоединения к остальной части линкера  $L^1$  или место присоединения к A. Предпочтительно волнистая линия обозначает место присоединения к A. Боковая цепь аминокислоты Lys может содержать защитную группу, например, Boc, Fmoc или Alloc, как описано выше.

20 Альтернативно, саморасщепляющийся линкер и дипептид вместе образуют группу  $-NH-Val-Ala-CO-NH-PABC-$ , которая показана ниже:



где звездочка и волнистая линия являются такими, как определено выше.

25 Альтернативно, саморасщепляющийся линкер и дипептид вместе образуют группу  $-NH-Val-Cit-CO-NH-PABC-$ , которая показана ниже:



где звездочка и волнистая линия являются такими, как определено выше.

5 В одном варианте реализации, А представляет собой ковалентную связь. Таким образом, L<sup>1</sup> и антитело связаны напрямую. Например, если L<sup>1</sup> содержит непрерывную аминокислотную последовательность, то N-конец указанной последовательности может непосредственно связываться с антителом.

Таким образом, если А представляет собой ковалентную связь, то связь между связывающимся с клетками агентом и L<sup>1</sup> может быть выбрана из:

- 10            -C(=O)NH-,  
               -C(=O)O-,  
               -NHC(=O)-,  
               -OC(=O)-,  
               -OC(=O)O-,  
 15            -NHC(=O)O-,  
               -OC(=O)NH-,  
               -NHC(=O)NH-,  
               -C(=O)NHC(=O)-,  
               -S-,  
 20            -S-S-,  
               -CH<sub>2</sub>C(=O)- и  
               =N-NH-.

25 Аминогруппа L<sup>1</sup> которая связывается с антителом, может представлять собой N-конец аминокислоты или может происходить из аминогруппы боковой цепи аминокислоты, например, боковой цепи аминокислоты лизина.

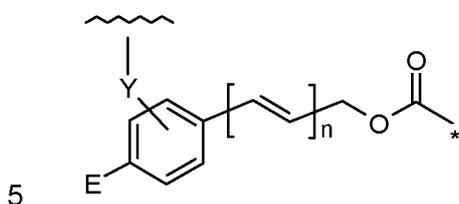
Карбоксильная группа L<sup>1</sup> которая связывается с антителом, может представлять собой C-конец аминокислоты или может происходить из карбоксильной группы боковой цепи аминокислоты, например, боковой цепи глутаминовой кислоты.

30 Гидроксильная группа L<sup>1</sup> которая связывается с антителом, может происходить из гидроксильной группы боковой цепи аминокислоты, например, боковой группы аминокислоты серина.

Тиоловая группа L<sup>1</sup> которая связывается с антителом, может происходить из тиоловой группы боковой цепи аминокислоты, например, боковой цепи аминокислоты серина.

Комментарии, приведенные выше в отношении аминогрупп, карбоксильных, гидроксильных и тиоловых групп  $L^1$  также применимы к антителиду.

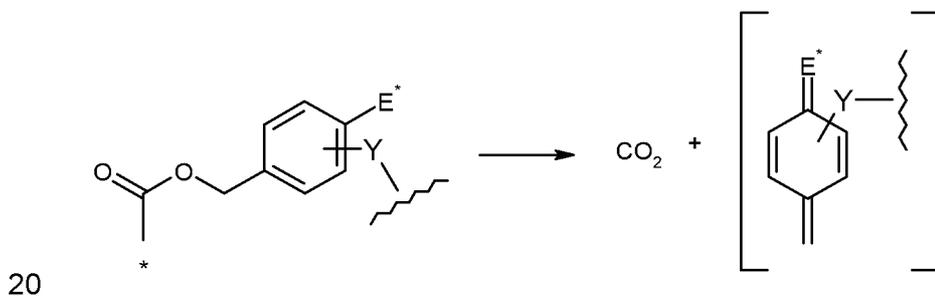
В одном варианте реализации,  $L^2$  вместе с  $-OC(=O)-$  представляет собой:



10 где звездочка обозначает место присоединения к положению N10, волнистая линия обозначает место присоединения к  $L^1$ ,  $n$  равен 0-3,  $Y$  представляет собой ковалентную связь или функциональную группу, и  $E$  представляет собой активируемую группу, например, в результате действия ферментов или света, с получением, таким образом, саморасщепляющейся единицы. Фениленовое кольцо необязательно дополнительно содержит один, два или три заместителя, описанных в данном документе. В одном варианте реализации, фениленовая группа необязательно дополнительно содержит в качестве заместителя галоген,  $NO_2$ ,  $R$  или  $OR$ . Предпочтительно  $n$  равен 0 или 1, наиболее предпочтительно 0.

15  $E$  выбран таким образом, что указанная группа является чувствительной к активации, например, светом или под действием фермента.  $E$  может представлять собой  $-NO_2$  или глюкуроновую кислоту. Первая может быть чувствительной к действию нитроредуктазы, а последняя - к действию  $\beta$ -глюкоронидазы.

В этом варианте реализации, саморасщепляющийся линкер обеспечивает высвобождение защищенного соединения, когда  $E$  активирован, действуя таким образом, как показано ниже (для  $n=0$ ):



25 где звездочка обозначает место присоединения к положению N10,  $E^*$  представляет собой активированную форму  $E$ , и  $Y$  является таким, как описано выше. Указанные группы имеют преимущество, которое заключается в том, что сайт активации отделен от соединения, подвергаемого защите. Как описано выше, фениленовая группа может быть необязательно дополнительно замещена.

Группа  $Y$  может представлять собой ковалентную связь с  $L^1$ .

Группа  $Y$  может представлять собой функциональную группу, выбранную из:

$-C(=O)-$

$-NH-$

30  $-O-$

$-C(=O)NH-$ ,

$-C(=O)O-$ ,

-NHC(=O)-,  
 -OC(=O)-,  
 -OC(=O)O-,  
 -NHC(=O)O-,  
 5 -OC(=O)NH-,  
 -NHC(=O)NH-,  
 -NHC(=O)NH,  
 -C(=O)NHC(=O)- и  
 -S-.

10

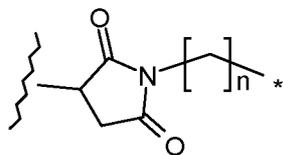
Если  $L^1$  представляет собой дипептид,  $Y$  предпочтительно представляет собой -NH- или -C(=O)- с образованием, таким образом, амидной связи между  $L^1$  и  $Y$ . В этом варианте реализации, дипептидная последовательность не обязательно является субстратом для ферментативной активности.

15 В другом варианте реализации,  $A$  представляет собой спейсерную группу. Таким образом,  $L^1$  и антитело связаны не напрямую.

$L^1$  и  $A$  могут быть связаны с помощью связи, выбранной из:

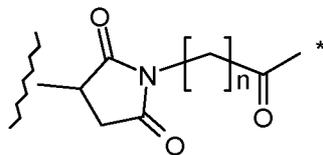
20 -C(=O)NH-,  
 -C(=O)O-,  
 -NHC(=O)-,  
 -OC(=O)-,  
 -OC(=O)O-,  
 -NHC(=O)O-,  
 25 -OC(=O)NH- и  
 -NHC(=O)NH-.

В одном варианте реализации, группа  $A$  представляет собой:



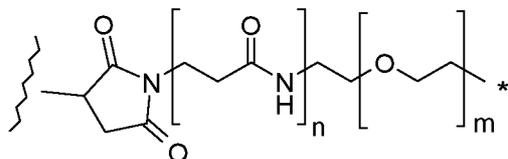
30 где звездочка обозначает место присоединения к  $L^1$ , волнистая линия обозначает место присоединения к антителу и  $n$  равен 0-6. В одном варианте реализации,  $n$  равен 5.

В одном варианте реализации, группа  $A$  представляет собой:



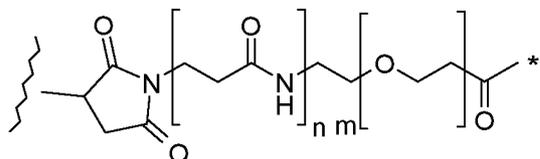
где звездочка обозначает место присоединения к  $L^1$ , волнистая линия обозначает место присоединения к антителу и  $n$  равен 0-6. В одном варианте реализации,  $n$  равен 5.

В одном варианте реализации, группа А представляет собой:



5 где звездочка обозначает место присоединения к  $L^1$ , волнистая линия обозначает место присоединения к антителу,  $n$  равен 0 или 1 и  $m$  равен 0-30. В предпочтительном варианте реализации,  $n$  равен 1 и  $m$  равен 0-10, 1-8, предпочтительно 4-8 и наиболее предпочтительно 4 или 8. В другом варианте реализации,  $m$  равен 10-30 и предпочтительно 20-30. Альтернативно,  $m$  равен 0-50. В этом варианте реализации,  $m$  предпочтительно равен 10-40 и  $n$  равен 1.

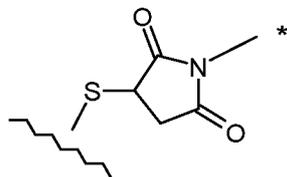
В одном варианте реализации, группа А представляет собой:



15 где звездочка указывает точку присоединения к  $L^1$ , волнистая линия указывает точку присоединения к антителу,  $n$  равен 0 или 1 и  $m$  равен 0-30. В предпочтительном варианте реализации,  $n$  равен 1 и  $m$  равен 0-10, 1-8, предпочтительно 4-8 и наиболее предпочтительно 4 или 8. В другом варианте реализации,  $m$  равен 10-30 и предпочтительно 20-30. Альтернативно,  $m$  равен 0-50. В этом варианте реализации,  $m$  предпочтительно равен 10-40 и  $n$  равен 1.

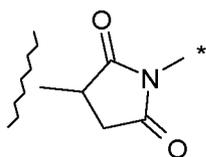
20 В одном варианте реализации, связь между антителом и А осуществляется через тиоловый остаток антитела и маленимидную группу А.

В одном варианте реализации, связь между антителом и А представляет собой:



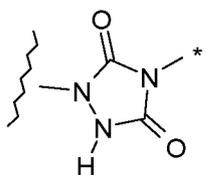
25 где звездочка обозначает место присоединения к остальной части А, и волнистая линия обозначает место присоединения к остальной части антитела. В этом варианте реализации, атом S, как правило, принадлежит антителу.

30 В каждом из вариантов реализации, указанных выше, вместо группы, полученной из маленимида, можно использовать альтернативную функциональную группу, показанную ниже:



где волнистая линия обозначает место присоединения к антителу, как показано ранее, а звездочка обозначает связь с остальной частью группы А.

- 5 В одном варианте реализации, группа, полученная из малеимида, заменена на следующую группу:



где волнистая линия обозначает место присоединения к антителу, а звездочка обозначает связь с остальной частью группы А.

- 10 В одном варианте реализации, группа, полученная из малеимида, заменена на группу, которая необязательно вместе с антителом выбрана из:

-C(=O)NH-,

-C(=O)O-,

-NHC(=O)-,

- 15 -OC(=O)-,

-OC(=O)O-,

-NHC(=O)O-,

-OC(=O)NH-,

-NHC(=O)NH-,

- 20 -NHC(=O)NH,

-C(=O)NHC(=O)-,

-S-,

-S-S-,

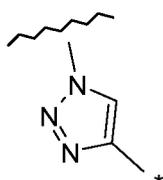
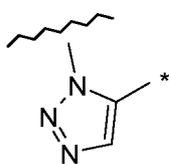
-CH<sub>2</sub>C(=O)-

- 25 -C(=O)CH<sub>2</sub>-,

=N-NH- и

-NH-N=.

- 30 В одном варианте реализации, группа, полученная из малеимида, заменена на группу, которая необязательно вместе с антителом выбрана из:

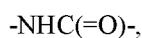
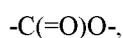
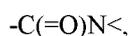


где волнистая линия обозначает место присоединения к антителу или связь с остальной частью группы А, и звездочка обозначает другую место присоединения к антителу или связь с остальной частью группы А.

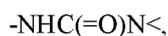
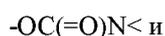
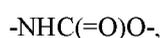
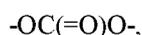
Другие группы, подходящие для связывания  $L^1$  с антителом описаны в WO 2005/082023.

5 В одном варианте реализации, присутствует связывающая группа А, триггер  $L^1$  присутствует, а саморасщепляющийся линкер  $L^2$  отсутствует. Таким образом,  $L^1$  и единица лекарственного средства связаны напрямую через связь. Эквивалентно в этом варианте реализации,  $L^2$  представляет собой связь. Это может быть особенно актуально, когда  $D^1$  имеет формулу II.

10  $L^1$  и D могут быть связаны с помощью связи, выбранной из:

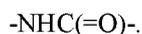
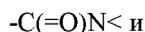


15 -OC(=O)-,



20 где N< или O- являются частью D.

В одном варианте реализации,  $L^1$  и D предпочтительно связаны с помощью связи, выбранной из:



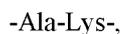
25 В одном варианте реализации,  $L^1$  содержит дипептид и один конец дипептида связан с D. Как описано выше, аминокислоты в дипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. В некоторых вариантах реализации, дипептид содержит природные аминокислоты. Когда линкер представляет собой катепсиновый лабильный линкер, дипептид может представлять собой место действия для катепсин-опосредованного расщепления. Тогда дипептид является сайтом узнавания катепсина.

30

В одном варианте реализации, группа  $-X_1-X_2-$  в дипептиде  $-NH-X_1-X_2-CO-$  выбрана из:



35 -Val-Ala-,



40 -Leu-Cit-,



-Phe-Arg- и

-Trp-Cit-;

где Cit представляет собой цитруллин. В таком дипептиде, -NH-представляет собой аминогруппу  $X_1$  и CO представляет собой карбонильную группу  $X_2$ .

5

Предпочтительно, группа  $-X_1-X_2-$  в дипептиде  $-NH-X_1-X_2-CO-$  выбрана из:

-Phe-Lys-,

-Val-Ala-,

-Val-Lys-,

10 -Ala-Lys- и

-Val-Cit-.

Наиболее предпочтительно группа  $-X_1-X_2-$  в дипептиде  $-NH-X_1-X_2-CO-$  представляет собой -Phe-Lys- или -Val-Ala-.

15

Другие представляющие интерес комбинации дипептидов включают:

-Gly-Gly-,

-Pro-Pro- и

-Val-Glu-.

20

Могут использоваться другие комбинации дипептидов, включая описанные выше.

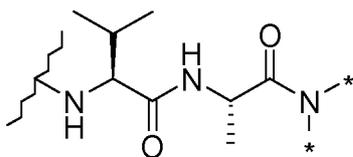
В одном варианте реализации,  $L^1-D$  представляет собой:

25  $-NH-X_1-X_2-CO-N< *$ 

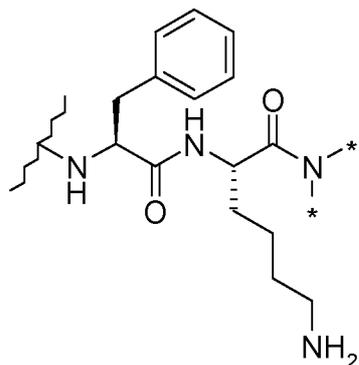
где  $-NH-X_1-X_2-CO$  представляет собой дипептид,  $-N<$  представляет собой часть единицы лекарственного средства, звездочка обозначает место присоединения к остальной части единицы лекарственного средства и волнистая линия обозначает место присоединения к остальной части  $L^1$  или место присоединения к A.

30 Предпочтительно, волнистая линия обозначает место присоединения к A.

В одном варианте реализации, дипептид представляет собой валин-аланин, а  $L^1-D$  представляет собой:

35 где звездочки,  $-N<$  и волнистая линия являются такими, как определено выше.

В одном варианте реализации, дипептид представляет собой фенилаланин-лизин, а  $L^1-D$  представляет собой:

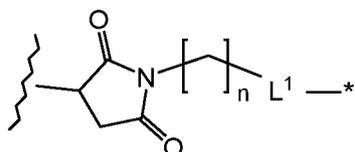


где звездочки, -N< и волнистая линия являются такими, как определено выше.

В одном варианте реализации, дипептид представляет собой валин-цитруллин.

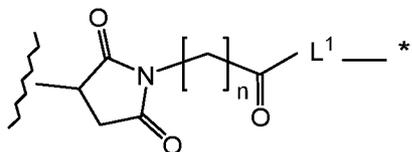
5

В одном варианте реализации, группы A-L<sup>1</sup> представляют собой:



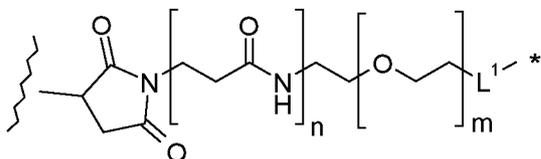
10 где звездочка обозначает место присоединения к L<sup>2</sup> или D, волнистая линия обозначает место присоединения к единице лиганда и n равен 0-6. В одном варианте реализации, n равен 5.

В одном варианте реализации, группы A-L<sup>1</sup> представляют собой:



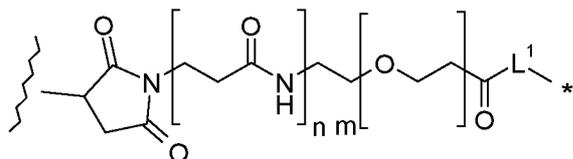
15 где звездочка обозначает место присоединения к L<sup>2</sup> или D, волнистая линия обозначает место присоединения к единице лиганда и n равен 0-6. В одном варианте реализации, n равен 5.

В одном варианте реализации, группы A-L<sup>1</sup> представляют собой:



20 где звездочка обозначает место присоединения к L<sup>2</sup> или D, волнистая линия обозначает место присоединения к единице лиганда, n равен 0 или 1 и m равен 0-30. В предпочтительном варианте реализации, n равен 1 и m равен 0-10, 1-8, предпочтительно 4-8, наиболее предпочтительно 4 или 8.

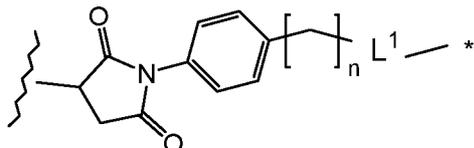
В одном варианте реализации, группы A-L<sup>1</sup> представляют собой:



где звездочка обозначает место присоединения к  $L^2$  или D, волнистая линия обозначает место присоединения к единице лиганда, n равен 0 или 1 и m равен 0-30. В предпочтительном варианте реализации, n равен 1 и m равен 0-10, 1-7, предпочтительно 3-7, наиболее предпочтительно 3 или 7.

5

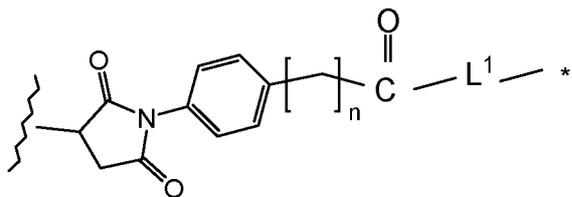
В одном варианте реализации, группы A- $L^1$  представляют собой:



где звездочка обозначает место присоединения к  $L^2$  или D, волнистая линия обозначает место присоединения к единице лиганда и n равен 0-6. В одном варианте реализации, n равен 5.

10

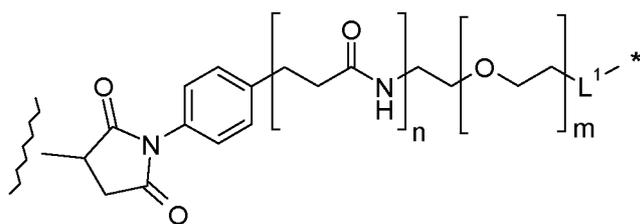
В одном варианте реализации, группы A- $L^1$  представляют собой:



где звездочка обозначает место присоединения к  $L^2$  или D, волнистая линия обозначает место присоединения к единице лиганда и n равен 0-6. В одном варианте реализации, n равен 5.

15

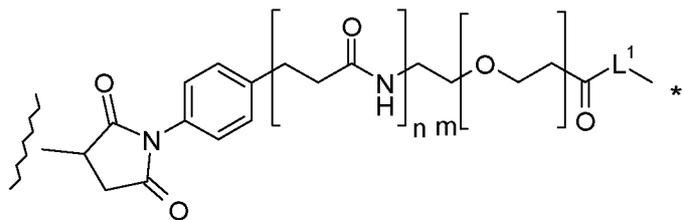
В одном варианте реализации, группы A- $L^1$  представляют собой:



где звездочка обозначает место присоединения к  $L^2$  или D, волнистая линия обозначает место присоединения к единице лиганда, n равен 0 или 1 и m равен 0-30. В предпочтительном варианте реализации, n равен 1 и m равен 0-10, 1-8, предпочтительно 4-8, наиболее предпочтительно 4 или 8.

20

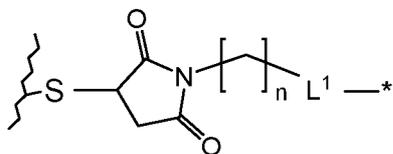
В одном варианте реализации, группа A- $L^1$  представляет собой:



где звездочка обозначает место присоединения к  $L^2$  или D, волнистая линия обозначает место присоединения к единице лиганда, n равен 0 или 1 и m равен 0-30. В предпочтительном варианте реализации, n равен 1 и m равен 0-10, 1-8, предпочтительно 4-8, наиболее предпочтительно 4 или 8.

5

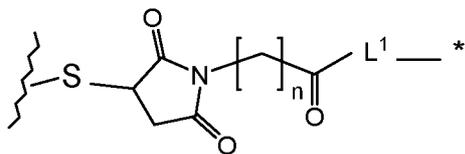
В одном варианте реализации, группы A- $L^1$  представляют собой:



10

где звездочка обозначает место присоединения к  $L^2$  или D, S представляет собой серосодержащую группу единицы лиганда, волнистая линия обозначает место присоединения к остальной части единицы лиганда и n равен 0-6. В одном варианте реализации, n равен 5.

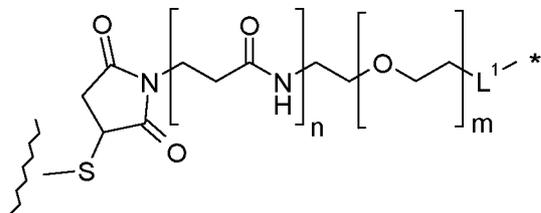
В одном варианте реализации, группа A- $L^1$  представляет собой:



15

где звездочка обозначает место присоединения к  $L^2$  или D, S представляет собой серосодержащую группу единицы лиганда, волнистая линия обозначает место присоединения к остальной части единицы лиганда и n равен 0-6. В одном варианте реализации, n равен 5.

В одном варианте реализации, группы A<sup>1</sup>- $L^1$  представляют собой:

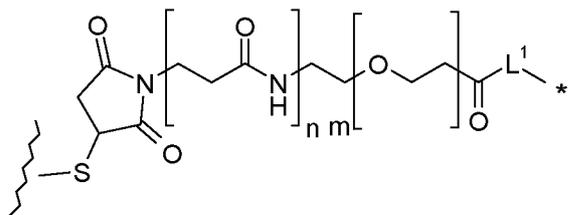


20

где звездочка обозначает место присоединения к  $L^2$  или D, S представляет собой серосодержащую группу единицы лиганда, волнистая линия обозначает место присоединения к остальной части единицы лиганда, n равен 0 или 1 и m равен 0-30. В предпочтительном варианте реализации, n равен 1 и m равен 0-10, 1-8, предпочтительно 4-8, наиболее предпочтительно 4 или 8.

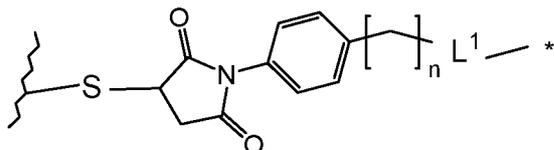
25

В одном варианте реализации, группы A<sup>1</sup>- $L^1$  представляют собой:



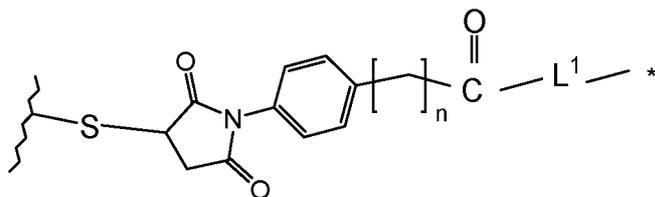
где звездочка обозначает место присоединения к  $L^2$  или D, волнистая линия обозначает место присоединения к единице лиганда, n равен 0 или 1 и m равен 0-30. В предпочтительном варианте реализации, n равен 1 и m равен 0-10, 1-7, предпочтительно 4-8, наиболее предпочтительно 4 или 8.

5 В одном варианте реализации, группы  $A^1-L^1$  представляют собой:



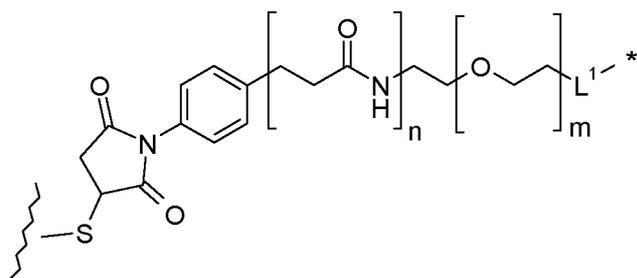
где звездочка обозначает место присоединения к  $L^2$  или D, волнистая линия обозначает место присоединения к остальной части единицы лиганда и n равен 0-6. В одном варианте реализации, n равен 5.

10 В одном варианте реализации, группы  $A^1-L^1$  представляют собой:



где звездочка обозначает место присоединения к  $L^2$  или D, волнистая линия обозначает место присоединения к остальной части единицы лиганда и n равен 0-6. В одном варианте реализации, n равен 5.

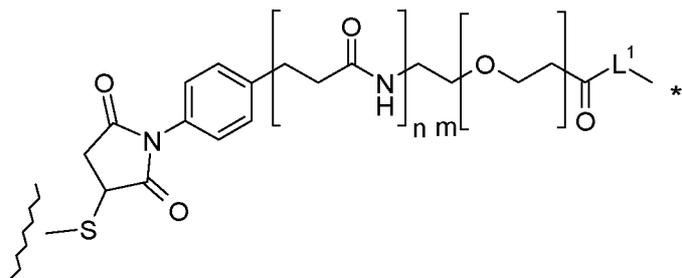
15 В одном варианте реализации, группы  $A^1-L^1$  представляют собой:



где звездочка обозначает место присоединения к  $L^2$  или D, волнистая линия обозначает место присоединения к остальной части единицы лиганда, n равен 0 или 1 и m равен 0-30. В предпочтительном варианте реализации, n равен 1 и m равен 0-10, 1-8, предпочтительно 4-8, наиболее предпочтительно 4 или 8.

20

В одном варианте реализации, группы  $A^1-L^1$  представляют собой:



где звездочка обозначает место присоединения к  $L^2$  или D, волнистая линия обозначает место присоединения к остальной части единицы лиганда, n равен 0 или 1 и m равен 0-30. В предпочтительном варианте реализации, n равен 1 и m равен 0-10, 1-8, предпочтительно 4-8, наиболее предпочтительно 4 или 8.

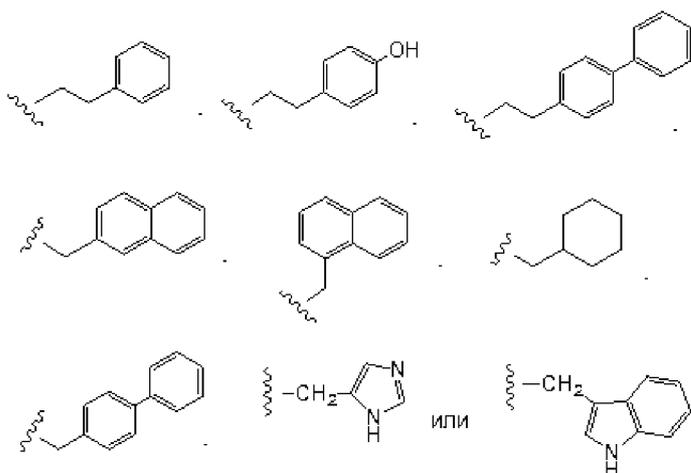
5  
Группа  $R^{L'}$  происходит из группы  $R^L$ . Группа  $R^L$  может быть превращена в группу  $R^{L'}$  путем связывания антитела с функциональной группой  $R^L$ . Для превращения  $R^L$  в  $R^{L'}$  можно использовать другие стадии. Данные стадии могут включать удаление защитных групп при их наличии или введение соответствующей функциональной группы.

10  
 $R^L$   
Линкеры могут включать отщепляемые протеазой пептидные фрагменты, содержащие одну или более аминокислотных звеньев. Пептидные линкерные реагенты могут быть получены с помощью способов твердофазного или жидкофазного синтеза (E. Schröder and K. Lübke, *The Peptides*, volume 1, pp 76-136 (1965)  
15 Academic Press), которые хорошо известны в области пептидной химии, включая химию t-BOC (Geiser et al "Automation of solid-phase peptide synthesis" in *Macromolecular Sequencing and Synthesis*, Alan R. Liss, Inc., 1988, pp. 199-218) и химию Fmoc/HBTU (Fields, G. and Noble, R. (1990) "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids", *Int. J. Peptide Protein Res.* 35:161-214), на автоматическом синтезаторе, таком как синтезатор пептидов Rainin Symphony (Protein Technologies, Inc., Туксон, Аризона)  
20 или Model 433 (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния).

Примеры аминокислотных линкеров включают дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. Примеры дипептидов включают: валин-цитруллин (vc или val-cit), аланин-фенилаланин (af или ala-phe). Примеры трипептидов включают: глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly).  
25 Аминокислотные остатки, которые содержат аминокислотный линкерный компонент, включают остатки природных аминокислот, а также минорных аминокислот и неприродных аналогов аминокислот, таких как цитруллин. Аминокислотные линкерные компоненты могут быть получены и по селективности для ферментативного расщепления определенными ферментами, например, опухлеассоциированной протеазой, катепсином B, C и D или протеазой плазмином.

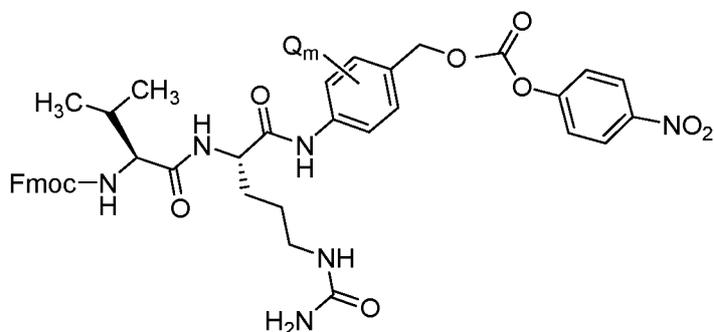
30 Боковые цепи аминокислот включают боковые цепи природных аминокислот, а также минорных аминокислот и неприродных аналогов аминокислот, таких как цитруллин. Боковые цепи аминокислот включают водород, метил, изопропил, изобутил, втор-бутил, бензил, и-гидроксibenзил,  $-CH_2OH$ ,  $-CH(OH)CH_3$ ,  $-CH_2CH_2SCH_3$ ,  $-CH_2CONH_2$ ,  $-CH_2COOH$ ,  $-CH_2CH_2CONH_2$ ,  $-CH_2CH_2COOH$ ,  $-$   
35  $(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ ,  $-(CH_2)_3NH_2$ ,  $-(CH_2)_3NHCOCH_3$ ,  $-(CH_2)_3NHCHO$ ,  $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$ ,  $-(CH_2)_4NH_2$ ,  $-$

$(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ ,  $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ , 2-пиридилметил-, 3-пиридилметил-, 4-пиридилметил-, фенил, циклогексил, а также следующие структуры:



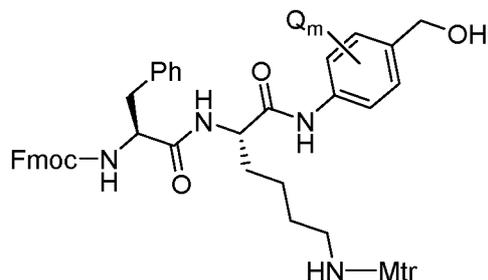
- 5 Когда боковая цепь аминокислоты содержит более одного атома водорода (глицин), атом углерода, к которому присоединена указанная боковая цепь аминокислоты, является хиральным. Каждый атом углерода, к которому присоединена боковая цепь аминокислоты, независимо находится в (*S*) или (*R*) конфигурации, или образует рацемическую смесь. Соединение лекарственное средство-линкерные реагента, таким образом, могут находиться в виде энантиомерно чистой, рацемической или диастереомерной смеси.
- 10 В примерном варианте реализации, боковые цепи аминокислот выбраны из боковых цепей природных и неприродных аминокислот, включая аланин, 2-амино-2-циклогексилуксусную кислоту, 2-амино-2-фенилуксусную кислоту, аргинин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, цистеин, глутамин, глутаминовую кислоту, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, норлейцин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин, валин,  $\gamma$ -аминомасляную кислоту,  $\alpha,\alpha$ -диметил  $\gamma$ -аминомасляную кислоту,
- 15  $\beta,\beta$ -диметил  $\gamma$ -аминомасляную кислоту, орнитин и цитруллин (Cit).

20 Пример дипептидного линкерного реагента валин-цитруллин (val-cit или vc), пригодного для создания интермедиата линкер-фрагмент ПБД лекарственного средства для конъюгирования с антителом, например, антителом, содержащим парааминобензилкарбамоильный (PAB) саморасщепляющийся спейсер, имеет следующую структуру:



где Q представляет собой  $\text{C}_1\text{--C}_8$  алкил,  $-\text{O}(\text{C}_1\text{--C}_8 \text{ алкил})$ , -галоген,  $-\text{NO}_2$  или  $-\text{CN}$ ; и m равен целому числу в диапазоне от 0 до 4.

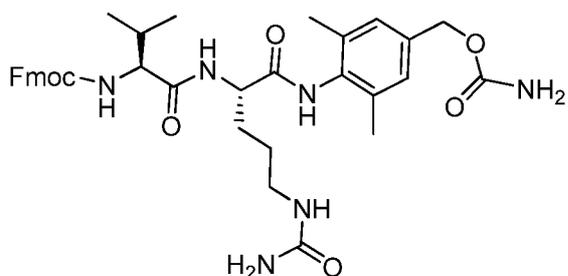
Пример дипептидного линкерного реагента phe-lys(Mtr), содержащего *p*-аминобензильную группу, может быть получен в соответствии с источником Dubowchik, et al. (1997) *Tetrahedron Letters*, 38:5257-60 и имеет следующую структуру:



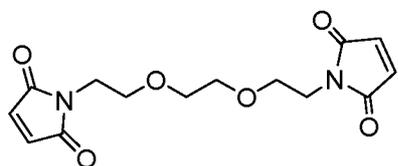
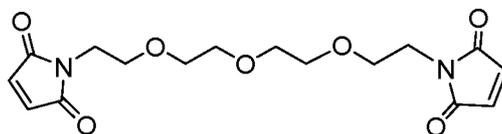
- 5 где Mtr представляет собой моно-4-метокситритил, Q представляет собой  $C_1-C_8$  алкил,  $-O-(C_1-C_8$  алкил), -галоген,  $-NO_2$  или  $-CN$ ; и *m* равен целому числу в диапазоне от 0 до 4.

Саморасщепляющийся линкер PAB (парааминобензилоксикарбонил) присоединяет фрагмент лекарственного средства к антителу в конъюгате антитело-лекарственное средство (Carl et al (1981) *J. Med.*  
 10 *Chem.* 24:479-480; Chakravarty et al (1983) *J. Med. Chem.* 26:638-644; US 6214345; US20030130189; US20030096743; US6759509; US20040052793; US6218519; US6835807; US6268488; US20040018194; WO98/13059; US20040052793; US6677435; US5621002; US20040121940; WO2004/032828). Другие примеры саморасщепляющихся спейсеров, кроме PAB, включают, но не ограничиваются ими: (i) ароматические соединения, которые по электронному строению подобны PAB-группе, такие как производные 2-аминоимдазол-5-метанола (Hay et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237), триазолы (US 7375078),  
 15 множество последовательно соединенных PAB звеньев (de Groot et al (2001) *J. Org. Chem.* 66:8815-8830); и орто- или парааминобензилацетали; и (ii) гомологичные стирольные аналоги PAB (US 7223837). Могут использоваться спейсеры, которые подвергаются циклизации при гидролизе амидной связи, такие как замещенные и незамещенные амиды 4-аминоасляной кислоты (Rodrigues et al (1995) *Chemistry Biology*  
 20 2:223), замещенные подходящим образом бицикло[2.2.1] и бицикло[2.2.2]кольцевые системы (Storm et al (1972) *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) и амиды 2-аминофенилпропионовой кислоты (Amsberry, et al (1990) *J. Org. Chem.* 55:5867). Способные к элиминированию аминсодержащие лекарственные средства с замещенным глицином (Kingsbury et al (1984) *J. Med. Chem.* 27:1447) также являются примерами саморасщепляющихся спейсеров, применимых в КАЛС.

25 В одном варианте реализации, реагент, представляющий собой дипептидный PAB аналог валин-цитруллин, содержит 2,6-диметилфенильную группу и имеет следующую структуру:



Линкерные реагенты, пригодные для получения конъюгатов антитело-лекарственное средство, согласно данному изобретению включают, но не ограничиваются ими: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), и бис-малеимидные реагенты: DTME, BMB, BMDV, BMH, BMOE, 1,8-бис-малеимидодидиэтиленгликоль (BM(PEO)<sub>2</sub>) и 1,11-бис-малеимидотриэтиленгликоль (BM(PEO)<sub>3</sub>), которые являются коммерчески доступными от компании Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, Иллинойс, и других поставщиков реагентов. Бис-малеимидные реагенты обеспечивают присоединение свободной тиоловой группы цистеинового остатка антитела к тиолсодержащему фрагменту лекарственного средства, метки или линкерного интермедиата, последовательное или параллельное. Другие функциональные группы помимо малеимида, которые являются реакционноспособными по отношению к тиоловой группе антитела, ПБД фрагменту лекарственного средства или линкерному интермедиату, включают йодацетамид, бромацетамид, винилпиридин, дисульфид, пиридилдисульфид, изоцианат и изотиоцианат.

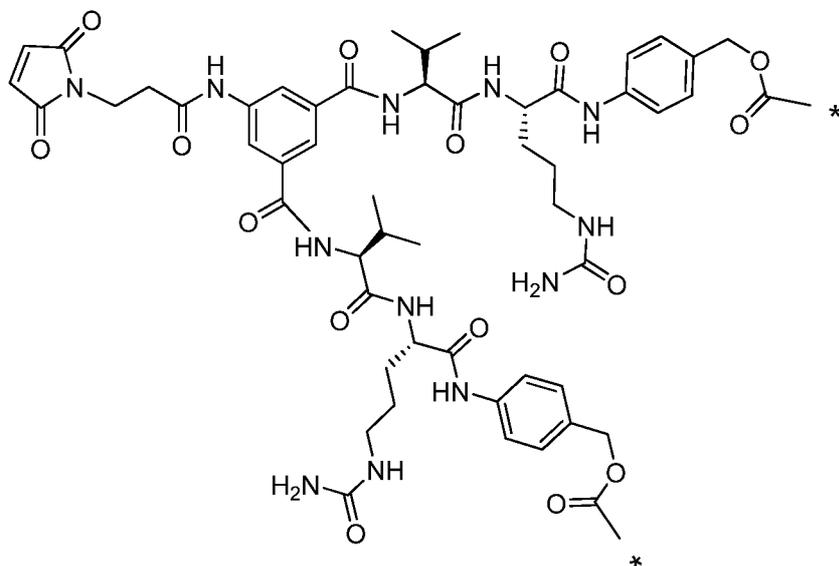
BM(PEO)<sub>2</sub>BM(PEO)<sub>3</sub>

Другие варианты линкерных реагентов представляют собой: N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат (SPP), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP, Carlsson et al (1978) *Biochem. J.* 173:723-737), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), имиотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные фторсодержащие соединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Пригодные для применения линкерные реагенты также могут быть получены из других коммерческих источников, таких как Molecular Biosciences Inc. (Боулдер, Колорадо), или получены в соответствии со способами, описанными в Toki et al (2002) *J. Org. Chem.* 67:1866-1872; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; и WO 04/032828.

Линкер может представлять собой линкер разветвленного типа для ковалентного связывания более одного фрагмента лекарственного средства через разветвленный мультифункциональный линкерный фрагмент с антителом (US 2006/116422; US 2005/271615; de Groot et al (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:4490-4494; Amir et al (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42:4494-4499; Shamis et al (2004) *J. Am. Chem. Soc.* 126:1726-1731; Sun et al (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun et al (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768; King et al (2002) *Tetrahedron Letters* 43:1987-1990). Разветвленные линкеры могут повышать молярное соотношение лекарственного средства к антителу, т.е. нагрузку, которая связана с активностью КАЛС. Таким образом, когда антитело имеет только одну реакционноспособную тиоловую

группу цистеина, множество фрагментов лекарственного средства может быть присоединено через разветвленный, или дендритный, линкер.

В одном примерном варианте реализации линкер разветвленного типа имеет следующую структуру:



5

где звездочка обозначает место присоединения к положению N10 ПБД фрагмента.

#### Кэпирующая группа R<sup>C</sup>

10 Конъюгат согласно первому аспекту данного изобретения может содержать кэпирующую группу R<sup>C</sup> в положении N10. Соединение E может содержать кэпирующую группу R<sup>C</sup>.

15

В одном варианте реализации, когда конъюгат представляет собой димер, каждый мономер которого имеет формулу (A), группа R<sup>10</sup> в одном из мономерных звеньев представляет собой кэпирующую группу R<sup>C</sup> или представляет собой группу R<sup>10</sup>.

В одном варианте реализации, когда конъюгат представляет собой димер, каждый мономер которого имеет формулу (A), группа R<sup>10</sup> в одном из мономерных звеньев представляет собой кэпирующую группу R<sup>C</sup>.

20

В одном варианте реализации, когда соединение E представляет собой димер, каждый мономер которого имеет формулу (E), группа R<sup>L</sup> в одном из мономерных звеньев представляет собой кэпирующую группу R<sup>C</sup> или представляет собой линкер для соединения с антителом.

25

В одном варианте реализации, когда соединение E представляет собой димер, каждый мономер которого имеет формулу (E), группа R<sup>L</sup> в одном из мономерных звеньев представляет собой кэпирующую группу R<sup>C</sup>.

Группа R<sup>C</sup> способна удаляться из положения N10 фрагмента ПБД с образованием N10-C11 иминной связи, карбиноламина, замещенного карбиноламина, если QR<sup>11</sup> представляет собой OSO<sub>3</sub>M, бисульфитного аддукта, тиокарбиноламина, замещенного тиокарбиноламина или замещенного карбиналамина.

В одном варианте реализации,  $R^C$ , может представлять собой защитную группу, которая способна удаляться с образованием N10-C11 иминной связи, карбиноламина, замещенного карбиноламина, или, если  $QR^{11}$  представляет собой  $OSO_3M$ , бисульфитного аддукта. В одном варианте реализации,  $R^C$  представляет собой защитную группу, которая способна удаляться с образованием N10-C11 иминной связи.

5  
Группа  $R^C$  должна быть способной удаляться в таких же условиях, которые требуются для удаления группы  $R^{10}$ , например, с образованием N10-C11 иминной связи, карбиноламина и т.д. Кэпирующая группа действует как защитная группа для предполагаемой функциональной группы в положении N10. Кэпирующая группа не должна являться реакционноспособной по отношению к антители. Например,  $R^C$  не является таким же,  
10 как  $R^L$ .

Соединения, содержащие кэпирующую группу, могут использоваться как интермедиаты в синтезе димеров, содержащих иминный мономер. Альтернативно, соединения, содержащие кэпирующую группу, могут использоваться как конъюгаты, если кэпирующая группа удаляется в области-мишени с получением имина,  
15 карбиноламина, замещенного карбиноламина и т.д. Таким образом, в этом варианте реализации, кэпирующая группа может называться терапевтически удаляемой защитной группой азота, как определено в более ранней публикации международной заявки авторов данного изобретения WO 00/12507.

В одном варианте реализации, группа  $R^C$  способна удаляться в условиях, в которых расщепляется линкер  $R^L$   
20 группы  $R^{10}$ . Таким образом, согласно одному варианту реализации кэпирующая группа отщепляется под действием фермента.

В альтернативном варианте реализации, кэпирующая группа поддается удалению до связывания линкера  $R^L$   
25 с антителим. В этом варианте реализации, кэпирующая группа удаляется в условиях, в которых не расщепляется линкер  $R^L$ .

Если соединение содержит функциональную группу  $G^1$  для образования связи с антителим, то кэпирующая группа удаляется до добавления или удаления защитной группы от  $G^1$ .

30 Кэпирующая группа может применяться в методе использования защитных групп для обеспечения того, что только один из мономерных звеньев в димере соединяется с антителим.

Кэпирующая группа может использоваться как маскирующая группа для N10-C11 иминной связи. Кэпирующая группа может быть удалена в тот момент, когда требуется иминная функциональная группа  
35 соединения. Кэпирующая группа также является маскирующей группой для карбиноламина, замещенного карбиноламина и бисульфитного аддукта, как описано выше.

$R^C$  может представлять собой защитную группу для N10, такую как группы, описанные в более ранней публикации международной заявки авторов данного изобретения WO 00/12507. В одном варианте  
40 реализации,  $R^C$  представляет собой терапевтически удаляемую защитную группу азота, как определено в более ранней публикации международной заявки авторов данного изобретения WO 00/12507.

В одном варианте реализации,  $R^C$  представляет собой карбаматную защитную группу.

В одном варианте реализации, карбаматная защитная группа выбрана из:

5 Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Psec, Cbz и PNZ.

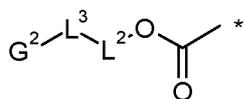
Необязательно карбаматная защитная группа также выбрана из Мос.

В одном варианте реализации,  $R^C$  представляет собой линкерную группу  $R^L$ , в которой отсутствует функциональная группа для связывания с антителом.

10

Данная заявка, в частности, относится к таким группам  $R^C$ , которые представляют собой карбаматы.

В одном варианте реализации,  $R^C$  представляет собой следующую группу:



15

где звездочка указывает точку присоединения к положению N10,  $G^2$  представляет собой концевую группу,  $L^3$  представляет собой ковалентную связь или отщепляемый линкер  $L^1$ ,  $L^2$  представляет собой ковалентную связь или вместе с  $OC(=O)$  образует саморасщепляющийся линкер.

20 Когда  $L^3$  and  $L^2$  представляют собой ковалентные связи,  $G^2$  и  $OC(=O)$  вместе образуют карбаматную защитную группу, как определено выше.

$L^1$  является таким, как определено выше для  $R^{10}$ .

$L^2$  является таким, как определено выше для  $R^{10}$ .

25

Различные концевые группы описаны ниже, включая группы на основе хорошо известных защитных групп.

В одном варианте реализации  $L^3$  представляет собой отщепляемый линкер  $L^1$  и  $L^2$ , вместе с  $OC(=O)$ , образует саморасщепляющийся линкер. В этом варианте реализации,  $G^2$  представляет собой Ac (ацетил) или

30 Мос, или карбаматную защитную группу, выбранную из:

Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Psec, Cbz и PNZ.

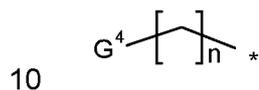
Необязательно карбаматная защитная группа также выбрана из Мос.

35 В другом варианте реализации,  $G^2$  представляет собой ацильную группу  $-C(=O)G^3$ , где  $G^3$  выбран из алкила (включая циклоалкил, алкенил и алкинил), гетероалкила, гетероциклила и арила (включая гетероарил и карбоарил). Указанные группы могут быть необязательно замещенными. Ацильная группа вместе с аминогруппой  $L^3$  или  $L^2$ , если применимо, может образовывать амидную связь. Ацильная группа вместе с гидроксигруппой  $L^3$  или  $L^2$ , если применимо, может образовывать сложноэфирную связь.

В одном варианте реализации,  $G^3$  представляет собой гетероалкил. Гетероалкильная группа может включать полиэтиленгликоль. Гетероалкильная группа может содержать гетероатом, такой как O или N, смежный с ацильной группой, с образованием, таким образом, карбаматной или карбонатной группы, если применимо, с гетероатомом, присутствующим в группе  $L^3$  или  $L^2$ , если применимо.

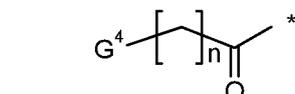
5 В одном варианте реализации,  $G^3$  выбран из  $NH_2$ ,  $NHR$  и  $NRR'$ . Предпочтительно,  $G^3$  представляет собой  $NRR'$ .

В одном варианте реализации  $G^2$  представляет собой следующую группу:



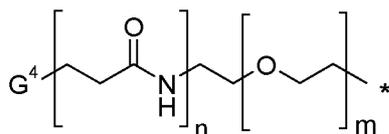
где звездочка обозначает место присоединения к  $L^3$ ,  $n$  равен 0-6 и  $G^4$  выбран из  $OH$ ,  $OR$ ,  $SH$ ,  $SR$ ,  $COOR$ ,  $CONH_2$ ,  $CONHR$ ,  $CONRR'$ ,  $NH_2$ ,  $NHR$ ,  $NRR'$ ,  $NO_2$  и галогена. группы  $OH$ ,  $SH$ ,  $NH_2$  и  $NHR$  являются защищенными. В одном варианте реализации,  $n$  равен 1-6 и предпочтительно  $n$  равен 5. В одном варианте реализации,  $G^4$  представляет собой  $OR$ ,  $SR$ ,  $COOR$ ,  $CONH_2$ ,  $CONHR$ ,  $CONRR'$  и  $NRR'$ . В одном варианте реализации,  $G^4$  представляет собой  $OR$ ,  $SR$  и  $NRR'$ . Предпочтительно  $G^4$  выбран из  $OR$  and  $NRR'$ , наиболее предпочтительно  $G^4$  представляет собой  $OR$ . Наиболее предпочтительно  $G^4$  представляет собой  $OMe$ .

В одном варианте реализации, группа  $G^2$  представляет собой:



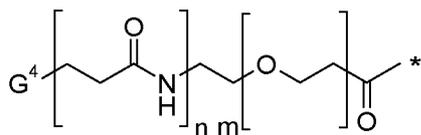
где звездочка обозначает место присоединения к  $L^3$  и  $n$  и  $G^4$  являются такими, как определено выше.

В одном варианте реализации, группа  $G^2$  представляет собой:



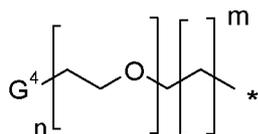
где звездочка обозначает место присоединения к  $L^3$ ,  $n$  равен 0 или 1,  $m$  равен 0-50 и  $G^4$  выбран из  $OH$ ,  $OR$ ,  $SH$ ,  $SR$ ,  $COOR$ ,  $CONH_2$ ,  $CONHR$ ,  $CONRR'$ ,  $NH_2$ ,  $NHR$ ,  $NRR'$ ,  $NO_2$  и галогена. В предпочтительном варианте реализации,  $n$  равен 1 и  $m$  равен 0-10, 1-2, предпочтительно 4-8 и наиболее предпочтительно 4 или 8. В другом варианте реализации,  $n$  равен 1 и  $m$  равен 10-50, предпочтительно 20-40. Группы  $OH$ ,  $SH$ ,  $NH_2$  и  $NHR$  являются защищенными. В одном варианте реализации,  $G^4$  представляет собой  $OR$ ,  $SR$ ,  $COOR$ ,  $CONH_2$ ,  $CONHR$ ,  $CONRR'$  и  $NRR'$ . В одном варианте реализации,  $G^4$  представляет собой  $OR$ ,  $SR$  и  $NRR'$ . Предпочтительно  $G^4$  выбран из  $OR$  and  $NRR'$ , наиболее предпочтительно  $G^4$  представляет собой  $OR$ . Предпочтительно  $G^4$  представляет собой  $OMe$ .

В одном варианте реализации, группа  $G^2$  представляет собой:



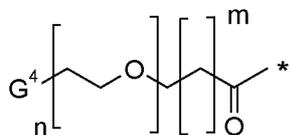
где звездочка обозначает место присоединения к  $L^3$  и  $n$ ,  $m$  и  $G^4$  являются такими, как определено выше.

5 В одном варианте реализации, группа  $G^2$  представляет собой:



где  $n$  равен 1-20,  $m$  равен 0-6 и  $G^4$  выбран из OH, OR, SH, SR, COOR, CONH<sub>2</sub>, CONHR, CONRR', NH<sub>2</sub>, NHR, NRR', NO<sub>2</sub> и галогена. В одном варианте реализации,  $n$  равен 1-10. В другом варианте реализации,  $n$  равен 10-50, предпочтительно 20-40. В одном варианте реализации,  $n$  равен 1. В одном варианте реализации,  $m$  равен 1. Группы OH, SH, NH<sub>2</sub> и NHR являются защищенными. В одном варианте реализации,  $G^4$  представляет собой OR, SR, COOR, CONH<sub>2</sub>, CONHR, CONRR' и NRR'. В одном варианте реализации,  $G^4$  представляет собой OR, SR и NRR'. Предпочтительно  $G^4$  выбран из OR and NRR', наиболее предпочтительно  $G^4$  представляет собой OR. Предпочтительно  $G^4$  представляет собой OMe.

15 В одном варианте реализации, группа  $G^2$  представляет собой:



где звездочка обозначает место присоединения к  $L^3$  и  $n$ ,  $m$  и  $G^4$  являются такими, как определено выше.

В каждом из вышеперечисленных вариантов реализации,  $G^4$  может быть OH, SH, NH<sub>2</sub> и NHR. Указанные группы предпочтительно являются защищенными.

В одном варианте реализации, OH содержит защитную группу Bzl, TBDMS или TBDPS.

В одном варианте реализации, SH содержит защитную группу AcM, Bzl, Bzl-OMe, Bzl-Me или Trt.

В одном варианте реализации, NH<sub>2</sub> или NHR содержит защитную группу Boc, Moc, Z-Cl, Fmoc, Z или Alloc.

25 В одном варианте реализации, группа  $G^2$  присутствует в комбинации с группой  $L^3$ , причем указанная группа представляет собой дипептид.

Кэпирующая группа не должна связываться с антителом. Таким образом, другой мономер, присутствующий в димере, служит в качестве места соединения с антителом через линкер. Соответственно, предпочтительно, функциональная группа, присутствующая в кэпирующей группе, не является доступной для реагирования с антителом. Таким образом, реакционноспособные функциональные группы, такие как OH, SH, NH<sub>2</sub>, COOH

предпочтительно не используются. Однако, такая функциональная группа может присутствовать в кэпирующей группе, если она содержит защитную группу, как описано выше.

#### Варианты реализации

5 Варианты реализации данного изобретения включают Конъюгат А, в котором антитело является таким, как определено выше.

Варианты реализации данного изобретения включают Конъюгат В, в котором антитело является таким, как определено выше.

10 Варианты реализации данного изобретения включают Конъюгат С, в котором антитело является таким, как определено выше.

15 Варианты реализации данного изобретения включают Конъюгат D, в котором антитело является таким, как определено выше.

Варианты реализации данного изобретения включают Конъюгат E, в котором антитело является таким, как определено выше.

20 Как упоминалось выше, некоторые варианты реализации исключают Конъюгат А, Конъюгат В, Конъюгат С, Конъюгат D и Конъюгат E.

#### Нагрузка лекарственного средства

25 Нагрузка лекарственного средства представляет собой среднее количество ПБД лекарственного средства на антитело, например, антитело. Когда соединения по данному изобретению связаны с цистеинами, нагрузка лекарственного средства может варьироваться от 1 до 8 лекарственных средств ( $D^L$ ) на антитело, т.е. При этом 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 фрагментов лекарственного средства ковалентно связаны к антителом. Композиции конъюгатов включают совокупность антител, конъюгированных с фрагментами лекарственного средства в количестве от 1 до 8. В случае, если соединения по данному изобретению связаны с лизинами, нагрузка

30 лекарственного средства может варьироваться от 1 до 80 лекарственных средств ( $D^L$ ) на антитело, хотя верхний предел 40, 20, 10 или 8 может быть предпочтительным. Композиции конъюгатов включают совокупность антител, конъюгированных с фрагментами лекарственных средств в количестве от 1 до 80, от 1 до 40, от 1 до 20, от 1 до 10 или от 1 до 8.

35 Среднее число лекарственных средств на антитело в композициях КАЛС, полученных в результате реакций конъюгации, может быть определено стандартными способами, таким как УФ, обращенно-фазовая ВЭЖХ, НИС, масс-спектрометрия, ИФА-анализ и электрофорез. Также можно определить количественное распределение КАЛС в единицах  $\rho$ . Среднее значение  $\rho$  в конкретной композиции КАЛС можно определить с помощью ИФА (Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res.

40 11:843-852). Однако распределение значений  $\rho$  (нагрузка лекарственного средства) невозможно определить вследствие связывания антитело-антиген и предела обнаружения ИФА. Также с помощью ИФА при

использовании метода для выявления конъюгатов антитело-лекарственное средство нельзя определить, в каких сайтах фрагменты лекарственного средства присоединены к антителу, например, к фрагментам тяжелых цепей или легких цепей или определенным аминокислотным остаткам. В некоторых примерах разделение, очистка и характеристика однородных КАЛС, где  $p$  принимает определенное значение, от КАЛС с другими нагрузками лекарственного средства может достигаться такими способами, как обращенно-фазовая ВЭЖХ или электрофорез..

Для некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство  $p$  может ограничиваться числом сайтов присоединения на антителе. Например, антитело может содержать одну или более тиоловых групп цистеина или может содержать только одну или более достаточно реакционноспособных тиоловых групп, через которые может присоединяться линкер. Более высокая нагрузка лекарственного средства, например,  $p > 5$ , может вызывать агрегацию, нерастворимость, токсичность или потерю проницаемости в клетки определенных конъюгатов антитело-лекарственное средство.

Как правило, во время реакции конъюгации с антителом связывается число фрагментов лекарственного средства, меньше теоретического максимума. Антитело может содержать, например, много остатков лизина, которые не взаимодействуют с интермедиатом лекарственное средство-линкер (D-L) или линкерным реагентом. Только наиболее реакционноспособные группы лизина могут реагировать с реакционноспособным по отношению к аминам линкерным реагентом. Подобным образом, только наиболее реакционноспособные тиоловые группы цистеина могут реагировать с реакционноспособным по отношению к тиоловым группам линкерным реагентом. В целом, антитела содержат немного, если вообще содержат, свободных и реакционноспособных тиоловых групп цистеина, которые могут связываться с фрагментом лекарственного средства. Большинство тиоловых групп остатков цистеина в антителах в указанных соединениях существуют в виде дисульфидных мостиков и должны восстанавливаться с помощью восстановителей, таких как дитиотреитол (ДТТ) или ТСЕР, в частично или полностью восстановительных условиях. Нагрузка (отношение лекарственное средство/антитело) в КАЛС может контролироваться несколькими различными способами, включая: (i) ограничение молярного избытка интермедиата лекарственное средство-линкер (D-L) или линкерного реагента по отношению к антителу, (ii) ограничение времени или температуры реакции конъюгации, и (iii) частичные или ограничивающие восстановительные условия для модификации тиоловых групп цистеина.

Некоторые антитела содержат способные к восстановлению межцепевые дисульфиды, т.е. цистеиновые мостики. Антитела можно активировать для конъюгирования с линкерными реагентами путем обработки восстановителем, таким как ДТТ (дитиотреитол). В результате каждый цистеиновый мостик теоретически сможет образовать два реакционноспособных тиоловых нуклеофила. В антитела можно вводить дополнительные нуклеофильные группы посредством реакции лизинов с 2-иминотиолоном (реагентом Траута), что приводит к превращению амина в тиол. Реакционноспособные тиоловые группы могут вводиться в антитело (или его фрагмент) путем введения одного, двух, трех, четырех или более цистеиновых остатков (например, при получении мутантных антител, содержащих один или более чужеродных цистеиновых аминокислотных остатков). В US 7521541 описано получение антитела путем введения реакционноспособных цистеиновых аминокислот.

В реакционноспособных сайтах антитела могут быть сконструированы цистеиновые аминокислоты, которые не образуют межцепевые или межмолекулярные дисульфидные связи (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Doman et al (2009) Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249).

5 Полученные тиоловые группы цистеинов могут взаимодействовать с линкерными реагентами или соединениями лекарственное средство-линкерный реагент согласно данному изобретению, содержащими реакционноспособные по отношению к тиольным группам электрофильные группы, такие как малеимидная или альфа-галогенамиды, с образованием КАЛС со сконструированными на основе цистеина антителами и фрагментами ПБД лекарственного средства. Положение фрагмента лекарственного средства, таким образом, может планироваться, контролироваться и быть известным. Нагрузку лекарственного средства можно контролировать, так как сконструированные тиоловые группы цистеина, как правило, взаимодействуют с реакционноспособными по отношению к тиоловым группам линкерными реагентами или соединениями лекарственное средство-линкерный реагент с высокой эффективностью. Конструирование антитела IgG с введением аминокислоты цистеина путем замещения одного сайта в тяжелой или легкой цепи приводит к появлению двух новых цистеинов в симметричном антителе. Можно достичь нагрузку лекарственного средства со значением около 2 и относительную однородность продукта конъюгации КАЛС.

Альтернативно, сайт-специфическая конъюгация может быть достигнута путем конструирования антител, содержащих неприродные аминокислоты в их тяжелых и/или легких цепях, как описано Axup et al. ((2012), Proc Natl Acad Sci U S A. 109(40):16101-16116). Не встречающиеся в природе аминокислоты обеспечивают дополнительное преимущество, заключающееся в том, что можно разработать ортогональную химию для присоединения линкерного реагента и лекарственного средства.

Когда более одной нуклеофильной или электрофильной группы антитела реагирует с интермедиатом лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом с последующим взаимодействием с фрагментом лекарственного средства, полученный продукт представляет собой смесь КАЛС соединений с распределением фрагментов лекарственного средства, присоединенных к антителу, например 1, 2, 3 и т.д. С помощью методов жидкостной хроматографии, таких как полимерная обращенно-фазовая хроматография (PLRP) и хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC), можно разделять соединения в смеси в соответствии с нагрузкой лекарственного средства. Могут быть выделены композиции КАЛС с одним значением нагрузки лекарственного средства ( $\rho$ ), однако указанные композиции КАЛС с одним значением нагрузки могут все еще представлять собой гетерогенные смеси, так как фрагменты лекарственного средства могут присоединяться с помощью линкера к различным сайтам антитела.

35 Таким образом, композиции конъюгата антитело-лекарственное средство согласно данному изобретению включают смеси соединений антитело-лекарственное средство, представляющие собой конъюгаты, где антитело содержит один или более фрагментов ПБД лекарственного средства и где фрагменты лекарственного средства могут быть присоединены к антителу через связывание с различными аминокислотными остатками.

40

В одном варианте реализации, среднее количество димерных пирролобензодиазепиновых групп на одно антитело находится в диапазоне от 1 до 20. В некоторых вариантах реализации, диапазон выбран из от 1 до 8, от 2 до 8, от 2 до 6, от 2 до 4 и от 4 до 8.

- 5 В некоторых вариантах реализации, на одно антитело приходится одна димерная пирролобензодиазепиновая группа.

#### Включение других форм

- 10 Если не указано иное, в приведенное выше описание включены хорошо известные ионные формы, формы солей, сольватов и защищенные формы указанных заместителей. Например, указание на карбоновую кислоту (-COOH) также включает анионную (карбоксилатную) форму (-COO<sup>-</sup>), соль или сольват, а также традиционные защищенные формы. Аналогично, указание на аминогруппу включает протонированную форму (-N<sup>+</sup>HR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>), соль или сольват аминогруппы, например, гидрохлоридную соль, а также традиционные защищенные формы аминогруппы. Аналогично, указание на гидроксильную группу также включает
- 15 анионную форму (-O<sup>-</sup>), соль или сольват, а также традиционные защищенные формы.

#### Соли

- 20 Может быть удобным или желательным получать, очищать и/или обрабатывать соответствующую соль активного соединения, например, фармацевтически приемлемую соль. Примеры фармацевтически приемлемых солей описаны в Berge, *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 1-19 (1977).

- Примеры, если соединение является анионным или содержит функциональную группу, которая может быть анионной (например, -COOH может представлять собой -COO<sup>-</sup>), то может происходить образование соли с подходящим катионом. Примеры подходящих неорганических катионов включают, но не ограничиваются
- 25 ими, ионы щелочных металлов, такие как Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>, катионы щелочноземельных металлов, такие как Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> и другие катионы, такие как Al<sup>3+</sup>. Примеры подходящих органических катионов включают, но не ограничиваются ими, ион аммония (т.е. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) и замещенные ионы аммония (например, NH<sub>3</sub>R<sup>+</sup>, NH<sub>2</sub>R<sub>2</sub><sup>+</sup>, NHR<sub>3</sub><sup>+</sup>, NR<sub>4</sub><sup>+</sup>). Примерами некоторых подходящих замещенных ионов аммония являются ионы, полученные из: этиламина, диэтиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина,
- 30 диэтианоламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглумина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Примером обычного иона четвертичного аммония является N(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>+</sup>.

- Если соединение является катионным или имеет функциональную группу, которая может быть катионной
- 35 (например, -NH<sub>2</sub> может быть -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), то с подходящим анионом может быть образована соль. Примеры подходящих неорганических анионов включают, но не ограничиваются ими, анионы, полученные из следующих неорганических кислот: хлористоводородной, бромистоводородной, йодистоводородной, серной, серной, азотной, азотистой, фосфорной и фосфорной.

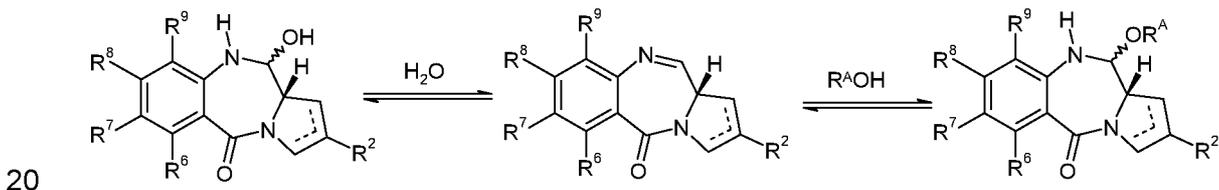
- 40 Примеры подходящих органических анионов включают, но не ограничиваются ими, анионы, полученные из следующих органических кислот: 2-ацетилоксибензойная, уксусная, аскорбиновая, аспарагиновая,

бензойная, камфорсульфоная, коричная, лимонная, эдетическая, этандисульфоновая, этансульфоная, фумаровая, глючептоновая, глюконовая, глутаминовая, гликолевая, гидроксималеиновая, гидроксинафталинкарбоновая, изетионовая, молочная, лактобионная, лауриновая, малеиновая, яблочная, метансульфоная, муциновая, олеиновая, щавелевая, пальмитиновая, памоиновая, пантотеновая, фенилацетатная, фенилсульфоная, пропионовая, пируватная, салициловая, стеариновая, сукциновая, сульфаниловая, винная, толуолсульфоная, трифторуксусная кислоты и валериановая кислота. Примеры подходящих полимерных органических анионов включают, но не ограничиваются ими, анионы, полученные из следующих полимерных кислот: дубильная кислота, карбоксиметилцеллюлоза.

## 10 Сольваты

Может быть удобно или желательно получить, очистить и/или использовать соответствующий сольват активного соединения. Термин «сольват», как он используется в данном документе, в общепринятом смысле для обозначения комплекса растворенного вещества (например, активного соединения, соли активного соединения) и растворителя. Если растворителем является вода, сольват можно удобно называть гидратом, например, моногидратом, дигидратом, тригидратом и т. д.

Раскрытие включает соединения, в которых растворитель добавляется через иминную связь фрагмента ПБД, что проиллюстрировано ниже, где растворителем является вода или спирт ( $R^A\text{OH}$ , где  $R^A$  представляет собой  $C_{1-4}$  алкил):



Эти формы можно назвать карбиноламиновыми и карбиноламиновыми эфирными формами ПБД (как описано в разделе, относящемся к  $R^{10}$  выше). Баланс этих равновесий зависит от условий, в которых находятся соединения, а также от природы самого фрагмента.

25 Эти конкретные соединения могут быть выделены в твердой форме, например, лиофилизацией.

## Изомеры

Некоторые соединения по данному описанию могут существовать в одной или более конкретных геометрических, оптических, энантиомерных, диастериомерных, эпимерных, атропных, стереоизомерных, таутомерных, конформационных или аномерных формах, включая, но не ограничиваясь ими, цис- и транс-формы; E- и Z-формы; c-, t- и г- формы; эндо- и экзо-формы; R-, S- и мезо-формы; D- и L-формы; d- и l-формы; (+) и (-) формы; кето-, енол- и енолят-формы; син- и анти-формы; синклиальные и антиклиальные формы;  $\alpha$ - и  $\beta$ -формы; аксиальные и экваториальные формы; формы челна, кресла, твиста, конвертов и полукресла; и их комбинации, в дальнейшем совместно именуемые «изомеры» (или «изомерные формы»).

35 Термин «хиральный» относится к молекулам, которые обладают свойством не накладываемости партнера по зеркальному отображению, в то время как термин «ахиральный» относится к молекулам, которые обладают свойством накладываемости партнера по зеркальному отображению.

Термин «стереоизомеры» относится к соединениям, которые имеют идентичный химический состав, но различаются расположением атомов или групп в пространстве.

5 Термин «диастереомер» относится к стереоизомеру с двумя или более центрами хиральности, молекулы которого не являются зеркальным отображением друг друга. Диастереомеры имеют разные физические свойства, например, точки плавления, точки кипения, спектральные свойства и реакционную способность. Смеси диастереомеров можно разделить с помощью аналитических процедур высокого разрешения, таких как электрофорез и хроматография.

10 Термин «энантиомеры» относятся к двум стереоизомерам соединения, которые являются несовместимыми зеркальными отображениями друг друга.

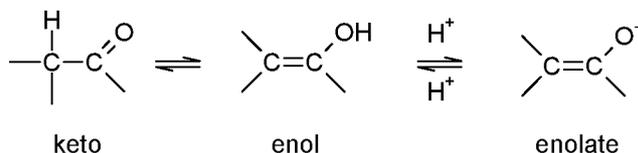
Используемые в данном документе стереохимические определения и условные обозначения в основном соответствуют S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; и Eliel, E. и Wilen, S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. Соединения настоящего описания могут содержать асимметричные или хиральные центры и, следовательно, существовать в различных стереоизомерных формах. Предполагается, что все стереоизомерные формы соединений по данному описанию, включая, но не ограничиваясь ими, диастереомеры, энантиомеры и атропоизомеры, а также их смеси, такие как рацемические смеси, составляют часть настоящего описания. Многие органические соединения существуют в оптически активных формах, т.е., они обладают способностью вращать плоскость плоско-поляризованного света. При описании оптически активного соединения префиксы D и L или R и S, используются для обозначения абсолютной конфигурации молекулы относительно ее хирального центра(ов). Префиксы d и l или (+) и (-) используются для обозначения знака вращения плоско-поляризованного света соединением, при этом (-) или l означают, что соединение является левовращающим. Соединение с префиксом (+) или d является правовращающим. Для данной химической структуры эти стереоизомеры идентичны, за исключением того, что они являются зеркальным отображением друг друга. Конкретный стереоизомер также может называться энантиомером, и смесь таких изомеров часто называют энантиомерной смесью. Смесь энантиомеров 50:50 называется рацемической смесью или рацематом, что может происходить там, где не было стереоселекции или стереоспецифичности химической реакции или процесса. Термины «рацемическая смесь» и «рацемат» относятся к эквимолярной смеси двух энантиомерных видов, лишенной оптической активности.

35 Обратите внимание, что, за исключением случаев, описанных ниже для таутомерных форм, специально исключенными из термина «изомеры», как он используется в данном документе, являются структурные (или конституционные) изомеры (то есть изомеры, которые различаются связями между атомами, а не просто положением атомов в пространстве). Например, ссылку на метоксигруппу,  $-\text{OCH}_3$ , не следует толковать как ссылку на ее структурный изомер, гидроксиметильную группу,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ . Точно так же ссылку на орто-хлорфенил не следует толковать как ссылку на его структурный изомер, мета-хлорфенил. Однако ссылка на класс структур может включать структурно изомерные формы, попадающие в этот класс (например, C<sub>1-7</sub>

40

алкил включает н-пропил и изопропил; бутил включает н-, изо-, втор- и трет-бутил; метоксифенил включает орто-, мета- и пара-метоксифенил).

Вышеупомянутое исключение не относится к таутомерным формам, например, кето-, енол- и енолятным формам, как, например, в следующих таутомерных парах: кето/енол (показано ниже), имин/енамин, амид/имино спирт, амидин/амидин, нитрозо/оксим, тиокетон/энетiol, N-нитрозо/гидроксиазо и нитро/аци-нитро.



10 Термин «таутомер» или «таутомерная форма» относится к структурным изомерам разной энергии, которые взаимно превращаются через низкий энергетический барьер. Например, протонные таутомеры (также известные как прототропные таутомеры) включают взаимопревращения посредством миграции протона, такие как кето-енольная и имин-енаминная изомеризация. Валентные таутомеры включают взаимопревращения за счет реорганизации некоторых связывающих электронов.

15 Обратите внимание, что в термин «изомер» специально включены соединения с одним или более изотопными замещениями. Например, H может быть в любой изотопной форме, включая  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$  (D) и  $^3\text{H}$  (T); C может быть в любой изотопной форме, включая  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{14}\text{C}$ ; O может быть в любой изотопной форме, включая  $^{16}\text{O}$  и  $^{18}\text{O}$ ; и тому подобное.

20 Примеры изотопов, которые могут быть включены в соединения согласно раскрытию, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора и хлора, такие как, но не ограничиваясь ими,  $^2\text{H}$  (дейтерий, D),  $^3\text{H}$  (тритий),  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ , и  $^{125}\text{I}$ . Различные меченые изотопами соединения настоящего раскрытия, например те, в которых радиоактивные изотопы, такие как  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{14}\text{C}$ , также включены. Такие меченые изотопами соединения могут быть полезны в исследованиях метаболизма, кинетических исследованиях реакций, методах обнаружения или визуализации, таких как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) или однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), включая анализы распределения лекарственного средства или субстратов в тканях, или при радиоактивном лечении пациентов. Меченые дейтерием или замещенные терапевтические соединения по данному описанию могут иметь улучшенные свойства DMPK (метаболизм и фармакокинетика лекарственного средства), относящиеся к распределению, метаболизму и выведению (ADME). Замена более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, может дать определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, увеличение периода полужизни *in vivo* или снижение требований к дозировке. Соединение, меченное  $^{18}\text{F}$ , может быть использовано для исследований ПЭТ или ОФЭКТ. Меченые изотопами соединения данного раскрытия и их пролекарства обычно могут быть получены путем проведения процедур, раскрытых на схемах или в примерах и способах получения, описанных ниже, путем замены легко доступного изотопно меченного реагента на неизотопно меченный реагент. Кроме того, замещение более тяжелыми изотопами, особенно дейтерием (например,  $^2\text{H}$  или D), может дать определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической

стабильностью, например, увеличение периода полужизни *in vivo* или снижение требований к дозировке, или улучшение терапевтического индекса. Понятно, что дейтерий в этом контексте рассматривается как заместитель. Концентрация такого более тяжелого изотопа, в частности дейтерия, может определяться коэффициентом изотопного обогащения. В соединениях этого раскрытия любой атом, специально не обозначенный как конкретный изотоп, означает любой стабильный изотоп этого атома.

Если не указано иное, ссылка на конкретное соединение включает все такие изомерные формы, включая (полностью или частично) их рацемические и другие смеси. Способы получения (например, асимметричный синтез) и разделения (например, фракционная кристаллизация и хроматографические средства) таких изомерных форм либо известны в данной области техники, либо их легко получить путем адаптации описанных в данном документе способов или известных способов известным способом.

### Биологическая активность

#### Анализы пролиферации клеток *in vitro*

Обычно цитотоксическую или цитостатическую активность конъюгата антитело-лекарственное средство (КАЛС) измеряют путем: воздействия на клетки млекопитающих, содержащие рецепторные белки, антитела КАЛС в среде для культивирования клеток; культивирование клеток в течение периода от около 6 часов до около 5 дней; и измерение жизнеспособности клеток. Клеточные анализы *in vitro* используются для измерения жизнеспособности (пролиферации), цитотоксичности и индукции апоптоза (активации каспазы) КАЛС согласно раскрытию.

Активность конъюгатов антитело-лекарственное средство *in vitro* можно измерить с помощью анализа пролиферации клеток. Люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® является коммерчески доступным (Promega Corp., Мэдисон, Висконсин) гомогенным методом анализа, основанным на рекомбинантной экспрессии люциферазы *Coleoptera* (патенты США № 5583024; 5674713 и 5700670). Этот анализ пролиферации клеток определяет количество жизнеспособных клеток в культуре на основе количественного определения присутствующего АТФ, индикатора метаболически активных клеток (Stouch *et al* (1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81-88; US 6602677). Анализ CellTiter-Glo® проводится в 96-луночном формате, что делает его пригодным для автоматизированного высокопроизводительного скрининга (HTS) (Cree *et al* (1995) *AntiCancer Drugs* 6:398-404). Процедура гомогенного анализа включает добавление одного реагента (реагент CellTiter-Glo®) непосредственно к клеткам, культивируемым в среде с добавлением сыворотки. Промывка клеток, удаление среды и многократное пипетирование не требуются. Система обнаруживает всего 15 клеток/луночку в 384-луночном формате за 10 минут после добавления реагента и перемешивания. Клетки можно обрабатывать непрерывно с помощью КАЛС или их можно обрабатывать и отделять от КАЛС. Как правило, клетки, обработанные кратковременно, т.е. 3 часа, проявляли такие же эффекты, как и клетки, обработанные непрерывно.

Гомогенный формат «добавить-смешать-измерить» приводит к лизису клеток и генерации люминесцентного сигнала, пропорционального количеству присутствующего АТФ. Количество АТФ прямо пропорционально количеству клеток, присутствующих в культуре. Анализ CellTiter-Glo® генерирует люминесцентный сигнал «свечения», производимый люциферазной реакцией, период полужизни которого обычно превышает пять

часов, в зависимости от типа клеток и используемой среды. Жизнеспособность клеток отражается в относительных единицах люминесценции (RLU). Субстрат, люциферин жука, окислительно декарбоксилируется рекомбинантной люциферазой светлячка с сопутствующим преобразованием АТФ в АМФ и генерацией фотонов.

5

Активность конъюгатов антитело-лекарственное средство *in vitro* также можно измерить с помощью анализа цитотоксичности. Культивируемые адерантные клетки промывают ФСБ, отделяют трипсином, разбавляют полной средой, содержащей 10% FCS, центрифугируют, ресуспендируют в свежей среде и подсчитывают с помощью гемоцитометра. Подсчет суспензионных культур осуществляется напрямую. Суспензии монодисперсных клеток, подходящие для подсчета, могут потребовать перемешивания суспензии путем повторной аспирации для разрушения скоплений клеток.

10

Суспензию клеток разбавляют до желаемой плотности посева и распределяют (100 мкл на лунку) в черные 96-луночные планшеты. Планшеты с адерантными клеточными линиями инкубируют в течение ночи, чтобы обеспечить присоединение к поверхности. Суспензионные культуры клеток можно использовать в день посева.

15

Раствор стока (1 мл) КАЛС (20 мкг/мл) готовят в соответствующей среде для культивирования клеток. Последовательные 10-кратные разведения исходного КАЛС производят в центрифужных пробирках на 15 мл путем последовательного переноса от 100 мкл до 900 мкл среды для культивирования клеток.

20

Четыре репликатные лунки каждого разведения КАЛС (100 мкл) распределяют в 96-луночные черные планшеты, предварительно засеянные клеточной суспензией (100 мкл), в результате чего конечный объем составляет 200 мкл. В контрольные лунки помещают среду для культивирования клеток (100 мкл).

Если время удвоения клеточной линии превышает 30 часов, инкубация КАЛС длится 5 дней, в противном случае - четыре дня.

25

В конце инкубационного периода жизнеспособность клеток оценивают с помощью анализа Alamar blue. AlamarBlue (Invitrogen) вводят в планшет (20 мкл на лунку) и инкубируют в течение 4 часов. Флуоресценцию Alamar blue измеряют при возбуждении 570 нм, эмиссии 585 нм на флеш-ридере Varioskan. Процент выживаемости клеток рассчитывают из средней флуоресценции в лунках, обработанных КАЛС, по сравнению со средней флуоресценцией в контрольных лунках.

30

### Применение

Конъюгаты по раскрытию могут применяться для обеспечения соединения ПБД в целевом месте.

35

Целевое место предпочтительно представляет собой популяцию пролиферативных клеток. Антитело представляет собой антитело к антигену, присутствующему в популяции пролиферативных клеток.

В одном варианте реализации антиген отсутствует или присутствует на пониженном уровне в популяции непролиферативных клеток по сравнению с количеством антигена, присутствующим в популяции пролиферативных клеток, например, в популяции опухолевых клеток.

40

В целевом месте линкер может быть расщеплен, чтобы высвободить соединение RelA, RelB, RelC, RelD или RelE. Таким образом, конъюгат можно использовать для селективной доставки соединения RelA, RelB, RelC, RelD или RelE в целевое место.

5 Линкер может быть расщеплен ферментом, присутствующим в целевом месте.

Целевое место может быть *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

10 Соединения конъюгат антитело-лекарственное средство (КАЛС) по данному описанию включают соединения, полезные для проявления противоопухолевой активности. В частности, соединения включают антитело, конъюгированное, т.е. ковалентно присоединенное линкером, к фрагменту лекарственного средства ПБД, то есть к токсину. Когда лекарственное средство не конъюгировано с антителом, лекарственное средство ПБД оказывает цитотоксическое действие. Таким образом, биологическая активность лекарственной части ПБД модулируется конъюгацией с антителом.

15 Лекарственное средство (КАЛС) по данному описанию избирательно доставляют эффективную дозу цитотоксического агента в опухолевую ткань, за счет чего может быть достигнута более высокая селективность, т.е. более низкая эффективная доза.

20 Таким образом, в одном аспекте настоящее раскрытие предлагает соединение конъюгата, как описано в данном документе, для применения в терапии.

В дополнительном аспекте также предложено соединение-конъюгат, как описано в данном документе, для применения при лечении пролиферативного заболевания. Второй аспект настоящего раскрытия обеспечивает применение конъюгированного соединения при производстве лекарства для лечения

25 пролиферативного заболевания.

30 Специалист в данной области техники легко сможет определить, лечит ли конъюгат-кандидат пролиферативное состояние для любого конкретного типа клеток. Например, анализы, которые удобно использовать для оценки активности, обеспечиваемой конкретным соединением, описаны в примерах ниже.

Термин «пролиферативное заболевание» относится к нежелательной или неконтролируемой клеточной пролиферации избыточных или аномальных клеток, которая является нежелательной, такой как неопластический или гиперпластический рост, как *in vitro* или *in vivo*.

35 Примеры пролиферативных состояний включают, но не ограничиваются ими, доброкачественную, предзлокачественную и злокачественную клеточную пролиферацию, включая, но не ограничиваясь, новообразования и опухоли (например, гистiocитому, глиому, астроциому, остеому), онкологические заболевания (например, онкологическое заболевание легких, мелкоклеточный онкологическое заболевание легких, онкологическое заболевание желудочно-кишечного тракта, онкологическое заболевание кишечника,

40 онкологическое заболевание толстой кишки, онкологическое заболевание молочной железы, онкологическое заболевание яичников, онкологическое заболевание простаты, онкологическое заболевание

яичек, онкологическое заболевание печени, онкологическое заболевание почки, онкологическое заболевание мочевого пузыря, онкологическое заболевание поджелудочной железы, онкологическое заболевание мозга, саркому, остеосаркому, саркому Капоши, меланому), лимфомы, лейкозы, псориаз, заболевания костей, фибропролиферативные заболевания (например, соединительной ткани) и атеросклероз. Онкологические заболевания, представляющие особый интерес, включают, но не ограничиваются ими, лейкозы и онкологическое заболевание яичников.

Можно лечить любой тип клеток, включая, помимо прочего, клетки легких, желудочно-кишечного тракта (включая, например, кишечника, толстой кишки), молочной железы, яичников, простаты, печени (печени), почек (почек), мочевого пузыря, поджелудочной железы, мозга и кожи.

Нарушения, представляющие особый интерес, включают, но не ограничиваются ими, онкологические заболевания, включая метастатическое онкологическое заболевание и метастатические клетки онкологического заболевания, такие как циркулирующие опухолевые клетки, которые могут быть обнаружены циркулирующими в жидкостях организма, таких как кровь или лимфа. К видам онкологического заболевания, представляющим особый интерес, относятся онкологические заболевания яичников, молочной железы, простаты и почек.

Другие представляющие интерес расстройства включают любое состояние, при котором избыточна экспрессия КААG1, или при котором антагонизм КААG1 обеспечивает клиническую пользу. К ним относятся иммунные нарушения, сердечно-сосудистые нарушения, тромбоз, диабет, нарушения функции иммунных контрольных точек, фиброзные нарушения (фиброз) или пролиферативные заболевания, такие как онкологическое заболевание, особенно метастатическое онкологическое заболевание.

Предполагается, что конъюгаты антитело-лекарственное средство (КАЛС) по данному изобретению можно использовать для лечения различных заболеваний или нарушений, например, характеризующихся сверхэкспрессией опухолевого антигена. Типичные состояния или гиперпролиферативные нарушения включают доброкачественные или злокачественные опухоли; лейкоз, гематологические и лимфоидные злокачественные новообразования. Другие включают нейрональные, глиальные, астроцитарные, гипоталамические, железистые, макрофагальные, эпителиальные, стромальные, blastocellular, воспалительные, ангиогенные и иммунологические, включая аутоиммунные нарушения.

Обычно заболевание или расстройство, подлежащее лечению, представляет собой гиперпролиферативное заболевание, такое как онкологическое заболевание. Примеры онкологического заболевания, подлежащего лечению в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Более конкретные примеры таких видов онкологического заболевания включают плоскоклеточное онкологическое заболевание (например, плоскоклеточный эпителиальный рак), онкологическое заболевание легких, включая мелкоклеточное онкологическое заболевание легкого, немелкоклеточное онкологическое заболевание легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточное онкологическое заболевание легкого, онкологическое заболевание брюшины, гепатоцеллюлярное онкологическое заболевание, онкологическое заболевание

желудка или желудка, включая онкологическое заболевание желудочно-кишечного тракта, онкологическое заболевание поджелудочной железы, глиобластома, онкологическое заболевание шейки матки, онкологическое заболевание яичников, онкологическое заболевание печени, онкологическое заболевание мочевого пузыря, гепатому, онкологическое заболевание молочной железы, онкологическое заболевание толстой кишки, онкологическое заболевание прямой кишки, колоректальное онкологическое заболевание, онкологическое заболевание эндометрия или матки, онкологическое заболевание слюнной железы, онкологическое заболевание почек или почечной системы, онкологическое заболевание простаты, онкологическое заболевание вульвы, онкологическое заболевание щитовидной железы, онкологическое заболевание печени, онкологическое заболевание анального канала, онкологическое заболевание полового члена, а также онкологическое заболевание головы и шеи.

Аутоиммунные заболевания, для лечения которых можно использовать соединения КАЛС, включают ревматологические расстройства (такие как, например, ревматоидный артрит, синдром Шегрена, склеродермия, волчанка, такая как SLE и волчаночный нефрит, полимиозит/дерматомиозит, криоглобулинемия, синдром антител к фосфолипидам, и псориазический артрит), остеоартрит, аутоиммунные заболевания желудочно-кишечного тракта и печени (такие как, например, воспалительные заболевания кишечника (например, язвенный колит и болезнь Крона), аутоиммунный гастрит и пернициозная анемия, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит и глютеиновая болезнь), васкулиты (такие как, например, ANCA-ассоциированный васкулит, включая васкулит Чарджа-Стросса, гранулематоз Вегенера и полиартериит), аутоиммунные неврологические расстройства (такие как, например, рассеянный склероз, синдром опсоклонуса миоклонуса, миастения гравис, оптиконевромиелит, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и аутоиммунные полинейропатии), почечные заболевания (такие как, например, гломерулонефрит, синдром Гудпастчера и болезнь Бергера), аутоиммунные дерматологические заболевания (такие как, например, псориаз, крапивница, крапивница, вульгарная пузырчатка, буллезный пемфигоид и кожная красная волчанка), гематологические нарушения (такие как, например, тромбоцитопеническая пурпура, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, посттрансфузионная пурпура и аутоиммунная гемолитическая анемия), атеросклероз, увеит, аутоиммунные заболевания слуха (такие как, например, болезнь внутреннего уха и потеря слуха), болезнь Бехчета, синдром Рейно, трансплантация органов и аутоиммунные эндокринные нарушения (такие как, например, связанные с диабетом аутоиммунные заболевания, такие как инсулинозависимый сахарный диабет (IDDM), болезнь Аддисона и аутоиммунное заболевание щитовидной железы (например, болезнь Грейвса и тиреоидит)). Более предпочтительно такие заболевания включают, например, ревматоидный артрит, язвенный колит, ANCA-ассоциированный васкулит, волчанку, рассеянный склероз, синдром Шегрена, болезнь Грейвса, IDDM, пернициозную анемию, тиреоидит и гломерулонефрит.

#### Способы лечения

Конъюгаты по данному изобретению можно использовать в способе терапии. Также предложен способ лечения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества конъюгированного соединения по данному изобретению. Термин «терапевтически эффективное количество» означает количество, достаточное для того, чтобы продемонстрировать пользу у пациента.

Такая польза может заключаться по меньшей мере в облегчении по меньшей мере одного симптома. Фактическое вводимое количество, а также скорость и продолжительность введения будут зависеть от природы и тяжести того, что подвергают лечению. Назначение лечения, например, принятие решения о дозировке, входит в компетенцию терапевтов и других врачей.

5

Соединение по данному изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с другими видами лечения, одновременно или последовательно, в зависимости от состояния, которое необходимо лечить. Примеры лечения и терапии включают, но не ограничиваются ими, химиотерапию (введение активных агентов, включая, например, лекарственные средства, такие как химиотерапевтические средства); операцию; и лучевую терапию.

10

«Химиотерапевтический агент» представляет собой химическое соединение, используемое при лечении онкологического заболевания, независимо от механизма действия. Классы химиотерапевтических агентов включают, но не ограничиваются ими: алкилирующие агенты, антиметаболиты, растительные алкалоиды веретенового яда, цитотоксические/противоопухолевые антибиотики, ингибиторы топоизомеразы, антитела, фотосенсибилизаторы и ингибиторы киназ. Химиотерапевтические агенты включают соединения, используемые в «целевой терапии» и обычной химиотерапии.

15

Примеры химиотерапевтических агентов включают: эрлотиниб (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), доцетаксел (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (фторурацил, 5-фторурацил, CAS № 51-21-8), гемцитабин (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS № 391210-10-9, Pfizer), цисплатин (цис-диамин, дихлороплатина(II), CAS № 15663-27-1), карбоплатин (CAS № 41575-94-4), паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), темозоломид (4-метил-5-оксо-2,3,4,6,8-пентазабицикло[4.3.0]нона-2,7,9-триен-9-карбоксамид, № CAS 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), тамоксифен ((Z)-2-[4-(1,2-дифенилбут-1-енил)фенокси]-N,N-диметилэтанамин, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®) и доксорубицин (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD и рапамидин.

25

Другие примеры химиотерапевтических агентов включают: оксалиплатин (ELOXATIN®, Sanofi), бортезомиб (VELCADE®, Millennium Pharm.), Sutent (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), летрозол (FEMARA®, Novartis), мезилат иматиниба (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (ингибитор Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (ингибитор Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (ингибитор PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (ингибитор PI3K, Novartis), XL-147 (ингибитор PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), фулвестрант (FASLODEX®, AstraZeneca), лейковорин (фолиновая кислота), рапамидин (сиролимус, RAPAMUNE®, Wyeth), лапатиниб (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), лонафарниб (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), сорафениб (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), гефитиниб (IRESSA®, AstraZeneca), иринотекан (CAMPTOSAR®, CPT-11 Pfizer), типифарниб (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (без кремофора), составы паклитаксела в виде наночастиц, созданных на основе альбумина (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, IL), вандетаниб (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), хлоранмбуцил, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), темсиролимус (TORISEL®, Wyeth), пазопаниб (GlaxoSmithKline), канфосфамид (TELCYTA®, Telik), тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN®, NEOSAR®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан;

40

азиридины, такие как бензодопа, карбохон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилмеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (особенно криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и СВ1-ТМ1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как эндиновые антибиотики (например, калихеамицин, калихеамицин гаммаII, калихеамицин омегаII (*Angew Chem. Intl. Ed. Engl.* (1994) 33:183-186); динемидин, динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также хромофор неокарзиностатина и родственный хромофорам эндинового антибиотика хромопротеин), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлецин, морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, неморубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, лепломицин, порфирамицин, пуромидин, киеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестостерон; антиадренальные агенты, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; восполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демсколцин; диазиквон; эльфорнитин; эллиптиния ацетат; эпотион; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; Полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Юджин, Орегон); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; теназоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ара-С»); циклофосфамид; тиотепа; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; тенипозид; эдатраксат; дауномицин; аминоклутетин; капецитабин (XELODA®, Roche); ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из вышеперечисленных.

- В определение «химиотерапевтического агента» также включены: (i) антигормональные агенты, которые регулируют или ингибируют действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен (включая NOLVADEX®; цитрат тамоксифена), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и FARESTON® (цитрат торемифина); (ii) ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, который регулирует выработку эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, MEGASE® (мегестрола ацетат), AROMASIN® (экземестан; Pfizer), форместание, фазрозол, RIVISOR® (ворозол), FEMARA® (летрозол; Novart представляет собой) и ARIMIDEX® (анастрозол; AstraZeneca); (iii) антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и троксацитабин (1,3-диоксолановый нуклеозидный цитозинный аналог); (iv) ингибиторы протеинкиназы, такие как ингибиторы MEK (WO 2007/044515); (v) ингибиторы липидкиназы; (vi) антисмысловые олигонуклеотиды, особенно те, которые ингибируют экспрессию генов в сигнальных путях, участвующих в aberrантной пролиферации клеток, например PKC-альфа, Raf и H-Ras, такие как облимерсен (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) рибозимы, такие как ингибиторы экспрессии VEGF (например, ANGIOZYME®) и ингибиторы экспрессии HER2; (viii) вакцины, такие как вакцины для генной терапии, например ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® и VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; ингибиторы топоизомеразы I, такие как LURTOTECAN®; ABARELIX® gmRH; (ix) антиангиогенные средства, такие как бевацизумаб (AVASTIN®, Genentech); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из вышеперечисленных.
- Также в определение «химиотерапевтического агента» входят терапевтические антитела, такие как алемтузумаб (Campath), бевацизумаб (AVASTIN®, Genentech); цетуксимаб (ERBITUX®, Imclone); панитумумаб (VECTIBIX®, Amgen), ритуксимаб (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), офатумумаб (ARZERRA®, GSK), пертузумаб (PERJETA™, OMNITARG™, 2C4, Genentech), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), тозитумомаб (Vectra, Corixa) и конъюгат антитело с лекарственным средством, гемтузумаб озогаминин (MYLOTARG®, Wyeth).

Гуманизированные моноклональные антитела с терапевтическим потенциалом в качестве химиотерапевтических агентов в комбинации с конъюгатами по данному описанию включают: алемтузумаб, аполизумаб, азелизумаб, атлизумаб, бапинеузумаб, бевацизумаб, биватузумаб мертансин, кантузумаб мертансин, седелизумаб, цертолизумаб пегол, цидфузитузумаб, цидтузумаб, даклизумаб, экулизумаб, эфализумаб, эпратузумаб, эрлизумаб, фельвизумаб, фонтолизумаб, гемтузумаб озогаминин, ипотимузумаб озогаминин, ипилимумаб, лабетузумаб, линтузумаб, матузумаб, меполизумаб, мотавизумаб, мотовизумаб, натализумаб, нимотузумаб, ноловизумаб, нумавизумаб, окрелизумаб, омализумаб, паливизумаб, пасколизумаб, пекфузитузумаб, пектузумаб, пертузумаб, пекселизумаб, раливизумаб, ранибизумаб, ресливизумаб, реслизумаб, резивизумаб, ровелизумаб, руплизумаб, сибротузумаб, сиплизумаб, сонтузумаб, такатузумаб, тетраксетан, тадоцизумаб, тализумаб, тефибазумаб, тоцилизумаб, торализумаб, трастузумаб, тукотузумаб, целмолейкин, тукуситузумаб, умавизумаб, уртоксазумаб и визилизумаб.

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим раскрытием и для использования в соответствии с настоящим раскрытием могут содержать, помимо активного ингредиента, то есть конъюгированного соединения, фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель, буфер, стабилизатор

или другие материалы, хорошо известные специалисту в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Точная природа носителя или другого материала будет зависеть от пути введения, который может быть пероральным или инъекционным, например, кожным, подкожным или внутривенным.

5

Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме таблеток, капсул, порошка или жидкости. Таблетка может содержать твердый носитель или адъювант. Жидкие фармацевтические композиции обычно содержат жидкий носитель, такой как вода, нефтепродукт, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Капсула может содержать твердый носитель, такой как желатин.

10

Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в место поражения активный ингредиент будет в форме парентерально приемлемого водного раствора, не содержащего пирогенов и имеющего подходящий рН, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области техники хорошо способны приготовить подходящие растворы с использованием, например, изотонических носителей, таких как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор лактата Рингера для инъекций. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

15

20

#### Составы

Хотя можно использовать конъюгат (например, вводить) отдельно, часто предпочтительно представлять его в виде композиции или состава.

25

В одном варианте реализации композиция представляет собой фармацевтическую композицию (например, состав, препарат, лекарство), содержащую соединение конъюгата, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

30

В одном варианте реализации композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере одно соединение-конъюгат, как описано в данном документе, вместе с одним или более другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, хорошо известными специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, фармацевтически приемлемые носители, разбавители, наполнители, адъюванты, наполнители, буферы, консерванты, антиоксиданты, смазывающие вещества, стабилизаторы, солубилизаторы, поверхностно-активные вещества (например, смачивающие агенты), маскирующие агенты, красители, ароматизаторы и подслащивающие агенты.

35

В одном варианте реализации композиция дополнительно включает другие активные агенты, например другие терапевтические или профилактические агенты.

40

Подходящие носители, разбавители, наполнители и т. д. можно найти в стандартных источниках по фармацевтике. См., например, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2nd Edition (eds. M. Ash and I. Ash),

2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, New York, USA), Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th edition, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; bd Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd edition, 1994.

5 Другой аспект настоящего раскрытия относится к способам изготовления фармацевтической композиции, включающим смешивание по меньшей мере одного [<sup>11</sup>C]-радио меченного конъюгата или конъюгатоподобного соединения, как определено в данном документе, вместе с одним или более другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, хорошо известными специалистам в данной области техники, например, носителями, разбавителями, наполнителями и т.д. Если они составлены в виде дискретных единиц (например, таблеток и т.д.), каждая единица содержит заранее определенное количество (дозу) активного соединения.

15 Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый» относится к соединениям, ингредиентам, материалам, композициям, лекарственным формам и т. д., которые в рамках здравого медицинского заключения подходят для использования в контакте с тканями субъекта (например, человека) без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, и имеют соизмеримое с разумным соотношение польза/риск. Каждый носитель, разбавитель, наполнитель и т.д. также должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами состава.

20 Составы могут быть приготовлены любыми способами, хорошо известными в области фармацевтики. Такие способы включают стадию объединения активного соединения с носителем, который представляет собой один и более дополнительных ингредиентов. Как правило, составы готовят путем равномерного и тщательного объединения активного соединения с носителями (например, жидкими носителями, тонкоизмельченным твердым носителем и т. д.), а затем, при необходимости, придания продукту формы.

25 Состав может быть приготовлен для обеспечения быстрого или медленного высвобождения; немедленного, отсроченного, замедленного или постоянного высвобождения; или их комбинации.

30 Составы, подходящие для парентерального введения (например, путем инъекции), включают водные или неводные, изотонические, апирогенные, стерильные жидкости (например, растворы, суспензии), в которых активный ингредиент растворен, суспендирован или иным образом составлен (например, в липосомах или других микрочастицах). Такие жидкости могут дополнительно содержать другие фармацевтически приемлемые ингредиенты, такие как антиоксиданты, буферы, консерванты, стабилизаторы, бактериостатические агенты, суспендирующие агенты, загустители и растворенные вещества, которые делают состав изотоничным с кровью (или другими соответствующими жидкостями организма)

35 предполагаемого получателя. Примеры наполнителей включают, например, воду, спирты, полиолы, глицерин, растительные масла и тому подобное. Примеры подходящих изотонических носителей для использования в таких составах включают раствор хлорида натрия для инъекции, раствор Рингера для инъекции или раствор Рингера с лактатом для инъекции. Обычно концентрация активного ингредиента в жидкости составляет от около 1 нг/мл до около 10 мкг/мл, например, от около 10 нг/мл до около 1 мкг/мл.

40 Составы могут быть представлены в герметичных контейнерах для единичных или множественных доз, например, в ампулах и флаконах, и могут храниться в лиофилизированных (лиофилизированных) условиях,

требующих добавления только стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекции, непосредственно перед использованием. Растворы и суспензии для немедленной инъекции могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

## 5 Дозировка

Специалисту в данной области техники будет понятно, что подходящие дозировки соединения конъюгата и композиций, содержащих соединение конъюгата, могут варьироваться от пациента к пациенту. Определение оптимальной дозировки обычно включает балансирование уровня терапевтического эффекта с любым риском или вредными побочными эффектами. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая, помимо прочего, активность конкретного соединения, способ введения, время введения, скорость выведения соединения, продолжительность лечения и применение других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации, тяжесть состояния и вид, пол, возраст, масса тела, патологическое состояние, общее состояние здоровья и предыдущая история болезни пациента. Количество соединения и способ введения в конечном итоге будут определяться врачом, ветеринаром или клиницистом, хотя обычно дозировка будет выбрана для достижения локальных концентраций в месте действия, которые достигают желаемого эффекта, не вызывая существенных вредных или отрицательных побочных явлений.

Введение можно осуществлять одной дозой, непрерывно или периодически (например, в виде разделенных доз с соответствующими интервалами) на протяжении всего курса лечения. Способы определения наиболее эффективных средств и дозировки хорошо известны специалистам в данной области техники и будут варьироваться в зависимости от состава, используемого для терапии, цели терапии, целевой клетки (клеток), подвергаемой лечению, и субъекта подвергаемого лечению. Однократное или многократное введение может быть выполнено с выбором уровня дозы и схемы лечащим врачом, ветеринаром или клиницистом.

Как правило, подходящая доза активного соединения находится в диапазоне от около 100 нг до около 25 мг (более типично от около 1 мкг до около 10 мг) на килограмм массы тела субъекта в день. Когда активное соединение представляет собой соль, сложный эфир, амид, пролекарство или подобное, вводимое количество рассчитывается на основе исходного соединения, и поэтому фактическая масса, которую нужно использовать, увеличивается пропорционально.

В одном из вариантов реализации активное соединение вводят пациенту-человеку в соответствии со следующей схемой введения: около 100 мг 3 раза в день.

В одном из вариантов реализации активное соединение вводят пациенту-человеку в соответствии со следующей схемой введения: около 150 мг 2 раза в день.

В одном из вариантов реализации активное соединение вводят пациенту-человеку в соответствии со следующей схемой введения: около 200 мг 2 раза в день.

Однако в одном варианте реализации соединение-конъюгат вводят пациенту-человеку в соответствии со следующей схемой введения: около 50 или около 75 мг, 3 или 4 раза в день.

5 В одном варианте реализации соединение-конъюгат вводят пациенту-человеку в соответствии со следующей схемой введения: около 100 или около 125 мг 2 раза в день.

Описанные выше количества доз могут применяться к конъюгату (включая фрагмент ПБД и линкер к антителу) или к эффективному количеству введенного соединения ПБД, например, количеству соединения, которое высвобождается после расщепления линкера.

10 Для предотвращения или лечения заболевания подходящая доза КАЛС по данному описанию будет зависеть от типа заболевания, которое подлежит лечению, как определено выше, тяжести и течения заболевания, независимо от того, вводят ли молекулу в профилактических или терапевтических целях, предыдущей терапии, истории болезни пациента и реакции на антитело, а также на усмотрение лечащего врача.

15 Молекулу подходящим образом вводят пациенту за один раз или в течение ряда курсов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания от около 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1-20 мг/кг) молекулы является начальной дозой-кандидатом для введения пациенту, будь то, например, посредством одного или более отдельных введений, или путем непрерывной инфузии. Типичная суточная доза может составлять от

20 около 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. Примерная доза КАЛС, вводимая пациенту, находится в диапазоне от около 0,1 до около 10 мг/кг массы тела пациента. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продолжают до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Типичный режим дозирования включает курс введения начальной насыщающей дозы около 4 мг/кг с последующими

25 дополнительными дозами КАЛС каждую неделю, две или три недели. Могут быть полезны другие схемы введения. Прогресс этой терапии легко контролировать с помощью обычных способов и анализов.

#### Лечение

Термин «лечение», используемый в данном документе в контексте лечения состояния, обычно относится к лечению и терапии, будь то человека или животного (например, в ветеринарии), при которых достигается

30 некоторый желаемый терапевтический эффект, например, торможение прогрессирования состояния и включает снижение скорости прогрессирования, остановку прогрессирования, регресс состояния, улучшение состояния и излечение состояния. Также включено лечение в качестве профилактической меры (например, профилактика, предотвращение).

35 Термин «терапевтически эффективное количество», как он, как он используется в данном документе, относится к тому количеству активного соединения или материала, композиции или дозировки, включающей активное соединение, которое эффективно для получения некоторого желаемого терапевтического эффекта, соизмеримого с разумным соотношением польза/риск при введении в соответствии с желаемой схемой введения.

40

Аналогичным образом, термин «профилактически эффективное количество», как он, как он используется в данном документе, относится к тому количеству активного соединения или материала, композиции или дозировки, включающей активное соединение, которое эффективно для получения некоторого желаемого профилактического эффекта, соизмеримого с разумным соотношением польза/риск при введении в соответствии с желаемой схемой введения.

#### Получение конъюгатов лекарственных средств

Конъюгаты антитело-лекарственное средство могут быть получены несколькими способами с использованием реакций органической химии, условий и реагентов, известных специалистам в данной области техники, включая реакцию нуклеофильной группы антитела с реактивом включающим лекарственное средство-линкер. Этот метод может быть использован для получения конъюгатов антитело-лекарственное средство согласно раскрытию.

Нуклеофильные группы на антителах включают, но не ограничиваются ими, тиоловые группы боковой цепи, например цистеин. Тиоловые группы являются нуклеофильными и способны реагировать с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных фрагментах, таких как фрагменты настоящего раскрытия. Некоторые антитела содержат способные к восстановлению межцепевые дисульфиды, т.е. цистеиновые мостики. Антитела можно сделать реактивными для конъюгации с линкерными реагентами путем обработки восстанавливающим агентом, таким как DTT (реагент Келланда, дитиотреитол) или TCEP (трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид; Getz et al. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA). Таким образом, каждый дисульфидный мостик цистеина будет образовывать, теоретически, два реактивных тиоловых нуклеофила. Дополнительные нуклеофильные группы могут быть введены в антитела посредством реакции лизинов с 2-иминотиолоном (реагент Траута), приводящей к превращению амина в тиол.

#### Субъект/Пациент

Субъект/пациент может быть животным, млекопитающим, плацентарным млекопитающим, сумчатым животным (например, кенгуру, вомбат), монотремой (например, утконосом), грызуном (например, морской свинкой, хомяком, крысой, мышью), мышью (например, мышью), зайцеобразным (например, кроликом), птичим (например, птицей), собачим (например, собакой), кошачим (например, кошкой), лошадиным (например, лошастью), свиной (например, свиньей), овцой (например, овцой), бычьим (например, коровой), приматом, обезьяньим (например, обезьяной или крупной обезьяной), обезьяньим (например, мартышкой, бабуином), обезьяньим (например, гориллой, шимпанзе, орангутангом, гиббоном) или человек.

Кроме того, субъект/пациент может быть любой из форм своего развития, например, плодом. В одном предпочтительном варианте реализации субъект/пациент является человеком.

#### **Дополнительные предпочтительные варианты реализации**

Следующие ниже предпочтительные варианты реализации могут применяться ко всем аспектам раскрытия, как описано выше, или могут относиться к одному аспекту. Предпочтительные варианты реализации можно комбинировать в любой комбинации.

В некоторых вариантах реализации,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^9$  и  $Y$  являются предпочтительно одинаковыми  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^9$  и  $Y$ , соответственно.

5 Линкер димера

$Y$  и  $Y'$  представляют собой предпочтительно  $O$ .

$R''$  представляет собой предпочтительно  $C_{3-7}$  алкиленовую группу без заместителей. Более предпочтительно  $R''$  представляет собой  $C_3$ ,  $C_5$  или  $C_7$  алкилен. Наиболее предпочтительно,  $R''$  представляет собой  $C_3$  или  $C_5$  алкилен.

От  $R^6$  до  $R^9$

$R^9$  предпочтительно представляет собой  $H$ .

15  $R^6$  предпочтительно выбран из  $H$ ,  $OH$ ,  $OR$ ,  $SH$ ,  $NH_2$ , нитро и галогена и более предпочтительно представляет собой  $H$  или галоген, и наиболее предпочтительно представляет собой  $H$ .

$R^7$  предпочтительно выбран из  $H$ ,  $OH$ ,  $OR$ ,  $SH$ ,  $SR$ ,  $NH_2$ ,  $NHR$ ,  $NRR'$ , и галогена, и более предпочтительно независимо выбран из  $H$ ,  $OH$  и  $OR$ , где  $R$  предпочтительно выбран из необязательно замещенной  $C_{1-7}$  алкильной,  $C_{3-10}$  гетероциклической и  $C_{5-10}$  арильной групп.  $R$  может предпочтительно представлять собой  $C_{1-4}$  алкильную группу, которая может быть замещенной или незамещенной. Представляющий интерес заместитель представляет собой  $C_{5-6}$  арильную группу (например, фенил). Особенно предпочтительные заместители в 7- положениях представляют собой  $OMe$  и  $OCH_2Ph$ . Другие заместители представляющие интерес представляют собой диметиламино (например,  $-NMe_2$ );  $-(OC_2H_4)_qOMe$ , где  $q$  равно от 0 до 2; азотсодержащие  $C_6$  гетероциклы, включая морфолино, пиперидинил и  $N$ -метил-пиперазинил.

Эти предпочтения применимы к  $R^9$ ,  $R^6$  и  $R^7$  соответственно.

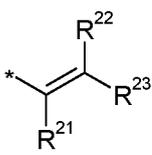
$R^{12}$

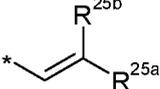
30 Когда между  $C2'$  и  $C3'$  присутствует двойная связь,  $R^{12}$  выбран из:

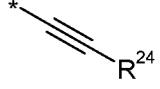
(a)  $C_{5-10}$  арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями выбранными из группы содержащей: галоген, нитро, циано, простой эфир,  $C_{1-7}$  алкил,  $C_{3-7}$  гетероцикл и бис-окси- $C_{1-3}$  алкилен;

(b)  $C_{1-5}$  насыщенного алифатического алкила;

35 (c)  $C_{3-6}$  насыщенного циклоалкила;

(d)  , где каждый из  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  и  $R^{23}$  независимо выбраны из  $H$ ,  $C_{1-3}$  насыщенного алкила,  $C_{2-3}$  алкенила,  $C_{2-3}$  алкинила и циклопропила, где общее число атомов углерода в  $R^{12}$  группе равно не более 5;

(e)  , где один из R<sup>25a</sup> и R<sup>25b</sup> представляет собой H и другой выбран из: фенила, причем фенил необязательно замещен группой выбранной из галогена метила, метокси; пиридила и тиофенила; и

(f)  , где R<sup>24</sup> выбран из: H; C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила; C<sub>2-3</sub> алкенила; C<sub>2-3</sub> алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил необязательно замещен группой выбранной из галогена метила, метокси; пиридила и тиофенила.

5  
10  
Когда R<sup>12</sup> представляет собой C<sub>5-10</sub> арильную группу, он может быть C<sub>5-7</sub> арильной группой. C<sub>5-7</sub> арильная группа может быть фенильной группой или C<sub>5-7</sub> гетероарильной группой, например, фуранилом, тиофенилом и пиридилом. В некоторых вариантах реализации, R<sup>12</sup> предпочтительно представляет собой фенил. В других вариантах реализации, R<sup>12</sup> предпочтительно представляет собой тиофенил, например, тиофен-2-ил и тиофен-3-ил.

15  
20  
30  
Когда R<sup>12</sup> представляет собой C<sub>5-10</sub> арильную группу, она может быть C<sub>8-10</sub> арилом, например, хинолильной или изохинолильной группой. Хинолинильная или изохинолинильная группа может быть связана с ядром ПБД через любое доступное положение кольца. Например, указанный хинолил может быть хинолин-2-илом, хинолин-3-илом, хинолин-4-ил, хинолин-5-илом, хинолин-6-илом, хинолин-7-ил и хинолин-8-илом. Из вышеперечисленных хинолилов хинолин-3-ил и хинолин-6-ил могут быть предпочтительными. Изозинолил может быть изохинолин-1-илом, изохинолин-3-илом, изохинолин-4-илом, изохинолин-5-илом, изохинолин-6-илом, изохинолин-7-илом и изохинолин-8-илом. Из вышеперечисленных изохинолилов изохинолин-3-ил и изохинолин-6-ил могут быть предпочтительными.

25  
30  
Когда R<sup>12</sup> представляет собой C<sub>5-10</sub> арильную группу, она может нести любое количество заместителей. Она предпочтительно имеет от 1 до 3 групп заместителей, причем 1 и 2 являются более предпочтительными, а наиболее предпочтительными являются однократно замещенные группы. Заместители могут находиться в любом положении.

35  
40  
Где R<sup>12</sup> представляет собой C<sub>5-7</sub> арильную группу, однократный заместитель предпочтительно находится на кольцевом атоме, который не примыкает к связи с остальной частью соединения, то есть он находится предпочтительно в β или γ положении по отношению к связи с остатком соединения. Таким образом, где C<sub>5-7</sub> арильная группа представляет собой фенил, заместитель предпочтительно находится в мета- или пара-положениях и более предпочтительно находится в пара-положении.

45  
50  
Где R<sup>12</sup> представляет собой C<sub>8-10</sub> арильную группу, например, хинолинил или изохинолинил, он может нести любое количество заместителей в любом положении хинолинового или изохинолинового колец. В некоторых вариантах реализации, он имеет один, два или три заместителя, и они могут находиться либо на ближнем и дальнем кольцах, либо на обоих (если присутствует более одного заместителя).

R<sup>12</sup> заместители, когда R<sup>12</sup> представляет собой C<sub>5-10</sub> арильную группу

Если заместитель на  $R^{12}$ , когда  $R^{12}$  представляет собой  $C_{5-10}$  арильную группу, представляет собой галоген, он предпочтительно представляет собой F или Cl, более предпочтительно Cl.

5 Если заместитель на  $R^{12}$ , когда  $R^{12}$  представляет собой  $C_{5-10}$  арильную группу, представляет собой простой эфир, он может в некоторых вариантах реализации быть алкокси группой, например,  $C_{1-7}$  алкокси группой (например, метокси, этокси) или он может в некоторых вариантах реализации быть  $C_{5-7}$  арилокси группой (например, фенокси, пиридилокси, фуранилокси). Сама алкоксигруппа может быть дополнительно замещена, например, аминогруппой (например, диметиламино).

10 Если заместитель на  $R^{12}$ , когда  $R^{12}$  представляет собой  $C_{5-10}$  арильную группу, представляет собой  $C_{1-7}$  алкил, он может предпочтительно представлять собой  $C_{1-4}$  алкильную группу (например, метил, этил, пропил, бутил).

15 Если заместитель на  $R^{12}$ , когда  $R^{12}$  представляет собой  $C_{5-10}$  арильную группу, представляет собой  $C_{3-7}$  гетероцикл, он может в некоторых вариантах реализации представлять собой  $C_6$  азотсодержащую гетероциклическую группу, например, морфолино, тиоморфолино, пиперидинил, пиперазинил. Эти группы могут быть связаны с остальной частью ПБД через атом азота. Эти группы могут быть дополнительно замещены, например,  $C_{1-4}$  алкильными группами. Если  $C_6$  азотсодержащая гетероциклическая группа представляет собой пиперазинил, указанный дополнительный заместитель может находиться на втором атоме азота в кольце.

Если заместитель на  $R^{12}$ , когда  $R^{12}$  представляет собой  $C_{5-10}$  арильную группу, представляет собой бис-окси- $C_{1-3}$  алкилен, он предпочтительно представляет собой бис-окси-метилен или бис-окси-этилен.

25 Если заместитель на  $R^{12}$ , когда  $R^{12}$  представляет собой  $C_{5-10}$  арильную группу, представляет собой сложный эфир, он предпочтительно представляет собой метиловый эфир или этиловый эфир.

Особенно предпочтительные заместители, когда  $R^{12}$  представляет собой  $C_{5-10}$  арильную группу, включают метокси, этокси, фтор, хлор, циано, бис-окси-метилен, метил-пиперазинил, морфолино и метил-тиофенил.

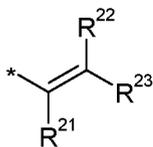
30 Другими особенно предпочтительными заместителями для  $R^{12}$  представляют собой диметиламинопропилокси и карбокси.

Особенно предпочтительные замещенные  $R^{12}$  группы, когда  $R^{12}$  представляет собой  $C_{5-10}$  арильную группу включают, но не ограничиваются ими, 4-метокси-фенил, 3-метоксифенил, 4-этокси-фенил, 3-этокси-фенил, 4-фтор-фенил, 4-хлор-фенил, 3,4-бисоксиметилен-фенил, 4-метилтиофенил, 4-цианофенил, 4-феноксифенил, хинолин-3-ил и хинолин-6-ил, изохинолин-3-ил и изохинолин-6-ил, 2-тиенил, 2-фуранил, метоксинафтил и нафтил. Другая возможная замещенная  $R^{12}$  группа представляет собой 4-нитрофенил.  $R^{12}$  группы представляющие особый интерес, включают 4-(4-метилпиперазин-1-ил)фенил и 3,4-бисоксиметилен-фенил.

40 Когда  $R^{12}$  представляет собой  $C_{1-5}$  насыщенный алифатический алкил, он может быть метилом, этилом, пропилом, бутилом или пентилом. В некоторых вариантах реализации, он может быть метилом, этилом или

пропилом (n-пентилом или изопропилом). В некоторых вариантах реализации, он может быть метилом. В других вариантах реализации, он может быть бутилом или пентилом, который может быть линейным или разветвленным.

- 5 Когда  $R^{12}$  представляет собой  $C_{3-6}$  насыщенный циклоалкил, он может быть циклопропилом, циклобутилом, циклопентилом или циклогексилом. В некоторых вариантах реализации, он может быть циклопропилом.



- 10 Когда  $R^{12}$  представляет собой  $C_{2-3}$  алкенила,  $C_{2-3}$  алкинила и циклопропила, где общее число атомов углерода в  $R^{12}$  группе равно не более 5. В некоторых вариантах реализации, общее число атомов углерода в  $R^{12}$  группе равно не более 4 или не более 3.

В некоторых вариантах реализации, один из  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  и  $R^{23}$  представляет собой H, и две другие группы выбраны из H,  $C_{1-3}$  насыщенного алкила,  $C_{2-3}$  алкенила,  $C_{2-3}$  алкинила и циклопропила.

- 15 В других вариантах реализации, два из  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  и  $R^{23}$  представляют собой H, и где другая группа выбрана из H,  $C_{1-3}$  насыщенного алкила,  $C_{2-3}$  алкенила,  $C_{2-3}$  алкинила и циклопропила.

- 20 В некоторых вариантах реализации группы, не являющиеся H, выбраны из метила и этила. В некоторых вариантах реализации, группы, не являющиеся H, выбраны из метила.

В некоторых вариантах реализации,  $R^{21}$  представляет собой H.

В некоторых вариантах реализации,  $R^{22}$  представляет собой H.

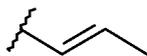
- 25 В некоторых вариантах реализации,  $R^{23}$  представляет собой H.

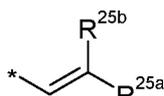
В некоторых вариантах реализации,  $R^{21}$  и  $R^{22}$  представляют собой H.

- 30 В некоторых вариантах реализации,  $R^{21}$  и  $R^{23}$  представляют собой H.

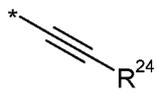
В некоторых вариантах реализации,  $R^{22}$  и  $R^{23}$  представляют собой H.

$R^{12}$  группа представляющая особый интерес представляет собой :





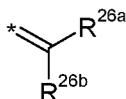
5 Когда  $R^{12}$  представляет собой  $\text{C}^*=\text{C}(\text{R}^{25\text{a}})\text{R}^{25\text{b}}$ , один из  $R^{25\text{a}}$  и  $R^{25\text{b}}$  представляет собой H и другой выбран из: фенила, причем фенил необязательно замещен группой выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила и тиофенила. В некоторых вариантах реализации, группа, не являющаяся H, представляет собой представляет собой необязательно замещенный фенил. Если фенильный необязательный заместитель представляет собой галоген, он предпочтительно представляет собой фтор. В некоторых вариантах реализации фенильная группа незамещена.



10 Когда  $R^{12}$  представляет собой  $\text{C}^*\equiv\text{C}(\text{R}^{24})$ ,  $R^{24}$  выбран из: H;  $\text{C}_{1-3}$  насыщенного алкила;  $\text{C}_{2-3}$  алкенила;  $\text{C}_{2-3}$  алкинила; циклопропила; фенил, причем фенил необязательно замещен группой выбранной из галогена метила, метокси; пиридила и тиофенила. Если фенильный необязательный заместитель представляет собой галоген, он предпочтительно представляет собой фтор. В некоторых вариантах реализации фенильная группа незамещена.

В некоторых вариантах реализации,  $R^{24}$  выбран из H, метила, этила, этенила и этинила. В некоторых вариантах реализации,  $R^{24}$  выбран из H и метила.

15 Когда между  $\text{C}2'$  и  $\text{C}3'$  присутствует одинарная связь,



20  $R^{12}$  представляет собой  $\text{C}^*=\text{C}(\text{R}^{26\text{a}})\text{R}^{26\text{b}}$ , где  $R^{26\text{a}}$  и  $R^{26\text{b}}$  независимо выбраны из H, F,  $\text{C}_{1-4}$  насыщенного алкила,  $\text{C}_{2-3}$  алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены группой выбранной из  $\text{C}_{1-4}$  алкил амидо и  $\text{C}_{1-4}$  алкил сложный эфир; или, когда один из  $R^{26\text{a}}$  и  $R^{26\text{b}}$  представляет собой H, другой выбран из нитрила и  $\text{C}_{1-4}$  алкил сложного эфира.

В некоторых вариантах реализации предпочтительно, чтобы  $R^{26\text{a}}$  и  $R^{26\text{b}}$  оба представляли собой H.

В некоторых вариантах реализации предпочтительно, чтобы  $R^{26\text{a}}$  и  $R^{26\text{b}}$  оба представляли собой метил.

25 В дополнительных вариантах осуществления предпочтительно, чтобы один из  $R^{26\text{a}}$  и  $R^{26\text{b}}$  представлял собой H, и другой был выбран из  $\text{C}_{1-4}$  насыщенного алкила,  $\text{C}_{2-3}$  алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены. В этом дополнительном варианте осуществления может быть дополнительно предпочтительно, чтобы группа, которая не является H, была выбрана из метила и этила.

30  $R^2$

Вышеуказанные предпочтения для  $R^{12}$  в равной степени применимы к  $R^2$ .

$R^{22}$

35 В некоторых вариантах реализации,  $R^{22}$  имеет формулу Па.

А в R<sup>22</sup> когда он имеет формулу IIa, может быть фенильной группой или C<sub>5-7</sub> гетероарильной группой, например, фуранилом, тиофенилом и пиридилом. В некоторых вариантах реализации, А предпочтительно представляет собой фенил.

5 Q<sup>2</sup>-X может быть на любом из доступных кольцевых атомов C<sub>5-7</sub> арильной группы, но предпочтительно находится на кольцевом атоме, который не примыкает к связи с остальной частью соединения, то есть он находится предпочтительно в β или γ положении по отношению к связи с остатком соединения. Таким образом, где C<sub>5-7</sub> арильная группа (А) представляет собой фенил, заместитель (Q<sup>2</sup>-X) предпочтительно находится в мета- или пара-положениях и более предпочтительно находится в пара-положении.

10 В некоторых вариантах реализации, Q<sup>1</sup> представляет собой одинарную связь. В данных вариантах реализации, Q<sup>2</sup> выбран из одинарной связи и -Z-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, где Z выбран из одинарной связи, O, S и NH и равен от 1 до 3. В некоторых вариантах реализации, Q<sup>2</sup> представляет собой одинарную связь. В других вариантах реализации, Q<sup>2</sup> представляет собой -Z-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-. В данных вариантах реализации, Z может представлять собой

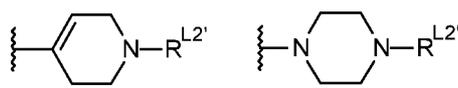
15 O или S и n может быть равно 1 или n может быть равно 2. В других вариантах реализации, Z может представлять собой одинарную связь и n может быть равно 1.

В других вариантах реализации, Q<sup>1</sup> представляет собой -CH=CH-.

20 В других вариантах реализации, R<sup>22</sup> имеет формулу IIb. В данных вариантах реализации, R<sup>C1</sup>, R<sup>C2</sup> и R<sup>C3</sup> независимо выбраны из H и незамещенного C<sub>1-2</sub> алкила. В некоторых предпочтительных вариантах реализации, все R<sup>C1</sup>, R<sup>C2</sup> и R<sup>C3</sup> представляют собой H. В других вариантах реализации, все R<sup>C1</sup>, R<sup>C2</sup> и R<sup>C3</sup> все представляют собой метил. В некоторых вариантах реализации, R<sup>C1</sup>, R<sup>C2</sup> и R<sup>C3</sup> независимо выбраны из H и метила.

25 X представляет собой группу выбранную из списка, включающего: O-R<sup>L2'</sup>, S-R<sup>L2'</sup>, CO<sub>2</sub>-R<sup>L2'</sup>, CO-R<sup>L2'</sup>, NH-

C(=O)-R<sup>L2'</sup>, NHNH-R<sup>L2'</sup>, CONHNH-R<sup>L2'</sup>,



, NR<sup>N</sup>R<sup>L2'</sup>, где R<sup>N</sup> выбран из группы включающей H и C<sub>1-4</sub> алкил. X может предпочтительно представлять собой: OH, SH, CO<sub>2</sub>H, -N=C=O или NHR<sup>N</sup>, и может предпочтительно представлять собой: O-R<sup>L2'</sup>, S-R<sup>L2'</sup>, CO<sub>2</sub>-R<sup>L2'</sup>, -NH-C(=O)-R<sup>L2'</sup> или NH-R<sup>L2'</sup>. Особенно предпочтительные группы включают: O-R<sup>L2'</sup>, S-R<sup>L2'</sup> и NH-R<sup>L2'</sup>, причем NH-R<sup>L2'</sup> является наиболее предпочтительной группой.

30

В некоторых вариантах реализации R<sup>22</sup> имеет формулу IIc. В данных вариантах реализации, предпочтительно, чтобы Q представлял собой NR<sup>N</sup>-R<sup>L2'</sup>. В других вариантах реализации, Q представляет собой O-R<sup>L2'</sup>. В дополнительных вариантах реализации, Q представляет собой S-R<sup>L2'</sup>. R<sup>N</sup> предпочтительно выбран из H и метила. В некоторых вариантах реализации, R<sup>N</sup> представляет собой H. В других вариантах реализации, R<sup>N</sup> представляет собой метил.

35

В некоторых вариантах реализации,  $R^{22}$  может представлять собой  $-A-CH_2-X$  и  $-A-X$ . В данных вариантах реализации,  $X$  может представлять собой  $O-R^{L2'}$ ,  $S-R^{L2'}$ ,  $CO_2-R^{L2'}$ ,  $CO-R^{L2'}$  и  $NH-R^{L2'}$ . В особо предпочтительных вариантах реализации,  $X$  может представлять собой  $NH-R^{L2'}$ .

5  $R^{10}, R^{11}$

В некоторых вариантах реализации,  $R^{10}$  и  $R^{11}$  вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны.

В некоторых вариантах реализации,  $R^{11}$  представляет собой  $OH$ .

10

В некоторых вариантах реализации,  $R^{11}$  представляет собой  $OMe$ .

В некоторых вариантах реализации,  $R^{11}$  представляет собой  $SO_zM$ , где  $z$  равно 2 или 3 и  $M$  представляет собой одновалентный фармацевтически приемлемый катион.

15

$R^{11a}$

В некоторых вариантах реализации,  $R^{11a}$  представляет собой  $OH$ .

В некоторых вариантах реализации,  $R^{11a}$  представляет собой  $OMe$ .

20

В некоторых вариантах реализации,  $R^{11a}$  представляет собой  $SO_zM$ , где  $z$  равно 2 или 3 и  $M$  представляет собой одновалентный фармацевтически приемлемый катион.

$R^{20}, R^{21}$

25 В некоторых вариантах реализации,  $R^{20}$  и  $R^{21}$  вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны.

В некоторых вариантах реализации  $R^{20}$  представляет собой  $H$ .

30 В некоторых вариантах реализации,  $R^{20}$  представляет собой  $R^C$ .

В некоторых вариантах реализации,  $R^{21}$  представляет собой  $OH$ .

В некоторых вариантах реализации,  $R^{21}$  представляет собой  $OMe$ .

35

В некоторых вариантах реализации,  $R^{21}$  представляет собой  $SO_zM$ , где  $z$  равно 2 или 3 и  $M$  представляет собой одновалентный фармацевтически приемлемый катион.

$R^{30}, R^{31}$

40 В некоторых вариантах реализации,  $R^{30}$  и  $R^{31}$  вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны.

В некоторых вариантах реализации,  $R^{31}$  представляет собой OH.

В некоторых вариантах реализации,  $R^{31}$  представляет собой OMe.

5

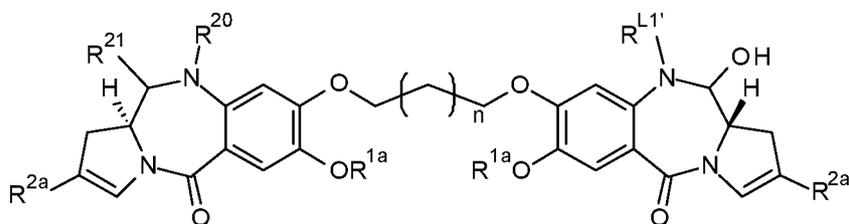
В некоторых вариантах реализации,  $R^{31}$  представляет собой  $SO_2M$ , где  $z$  равно 2 или 3 и  $M$  представляет собой одновалентный фармацевтически приемлемый катион.

$M$  и  $z$

10 Предпочтительно, чтобы  $M$  представлял собой одновалентный фармацевтически приемлемый катион, более предпочтительно  $Na^+$ .

$z$  предпочтительно равно 3.

15 Предпочтительные конъюгаты первого аспекта настоящего раскрытия могут иметь  $D^L$  формулы Ia:



Ia

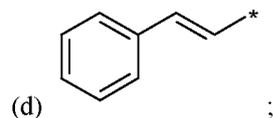
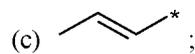
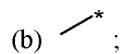
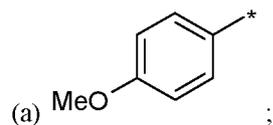
где

$R^{L1'}$ ,  $R^{20}$  и  $R^{21}$  представляют собой как определено ранее;

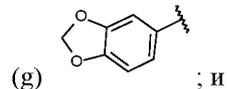
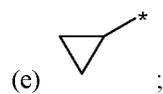
$n$  равно 1 или 3;

20  $R^{1a}$  представляет собой метил или фенил; и

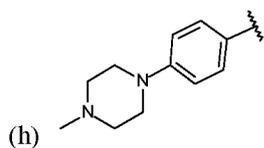
$R^{2a}$  выбран из:



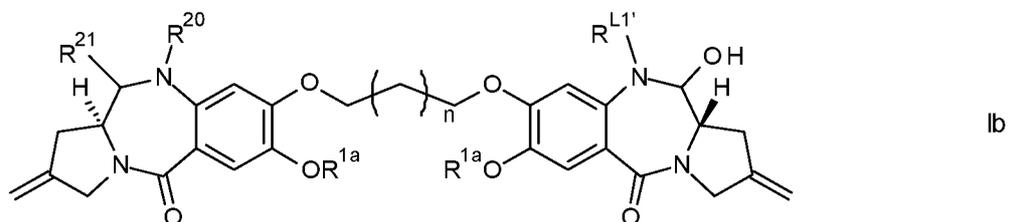
25



; и

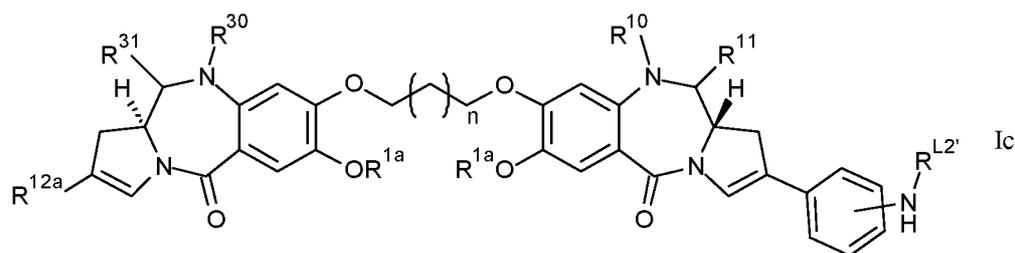


Предпочтительные конъюгаты первого аспекта настоящего раскрытия могут иметь D<sup>L</sup> формулы Ib:

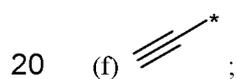
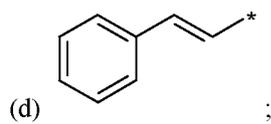
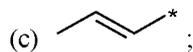
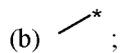
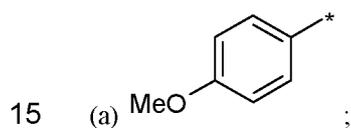


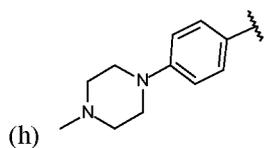
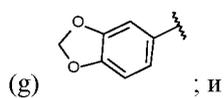
- 5 где  
 R<sup>L1'</sup>, R<sup>20</sup> и R<sup>21</sup> представляют собой как определено ранее;  
 n равно 1 или 3; и  
 R<sup>1a</sup> представляет собой метил или фенил.

10 Предпочтительные конъюгаты первого аспекта настоящего раскрытия могут иметь D<sup>L</sup> формулы Ic:



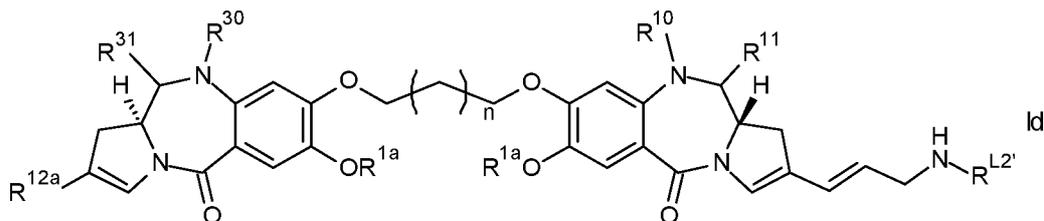
- где R<sup>L2'</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup>, R<sup>30</sup> и R<sup>31</sup> представляют собой как определено ранее  
 n равно 1 или 3;  
 R<sup>12a</sup> выбран из:





аминогруппа находится в мета или пара положениях фенильной группы.

5 Предпочтительные конъюгаты первого аспекта настоящего раскрытия могут иметь D<sup>L</sup> формулы Id:

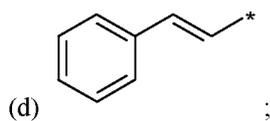
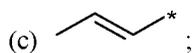
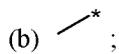
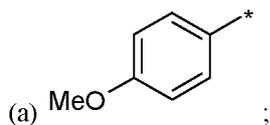


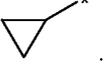
где R<sup>L2'</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup>, R<sup>30</sup> и R<sup>31</sup> представляют собой как определено ранее

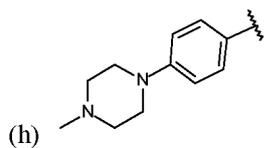
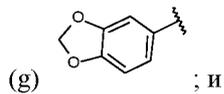
n равно 1 или 3;

R<sup>1a</sup> представляет собой метил или фенил;

10 R<sup>12a</sup> выбран из:

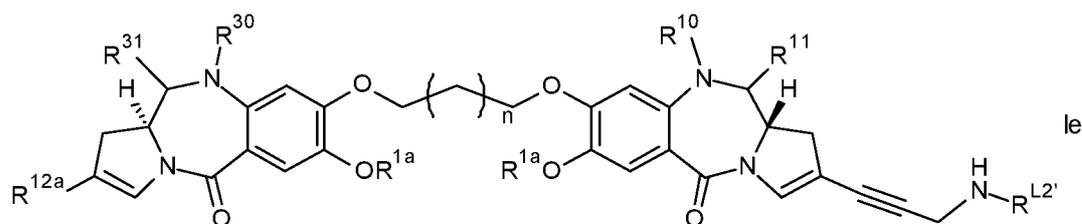


15 (e)  ;



20

Предпочтительные конъюгаты первого аспекта настоящего раскрытия могут иметь D<sup>L</sup> формулы Ie:

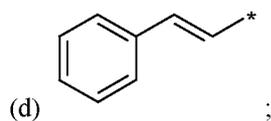
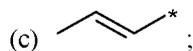
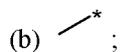
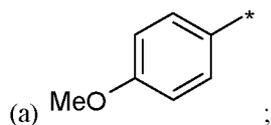


где  $R^{L2'}$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{30}$  и  $R^{31}$  представляют собой как определено ранее

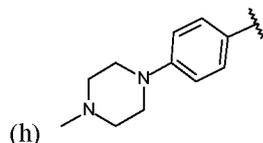
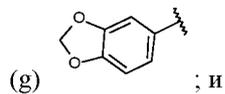
$n$  равно 1 или 3;

$R^{1a}$  представляет собой метил или фенил;

5  $R^{12a}$  выбран из:



10 (e) ;



## ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

15

SEQ ID NO:1 [3A4 VH, CDR подчеркнуты]

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQKFKGKAT  
LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGLVTVSS

20

SEQ ID NO:2 [3A4 VL, CDR подчеркнуты]

DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVDPDRFSGSGSG  
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:3 [тяжелая цепь 3A4]

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQKFKGKAT  
 LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA  
 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
 5 EVHNAKTKPREEQYN\*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

N\* обозначает Asn297

10 SEQ ID NO:4 [легкая цепь 3A4]

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSHNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSG  
 TDFTLKISRVEAEDVGVVYCFQGSHPVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP  
 REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR  
 GEC

15

SEQ ID NO:5 [3A4 CDR1 VH]

GYTFTDDYMS

SEQ ID NO:6 [3A4 CDR2 VH]

20 DINPYNGDTN

SEQ ID NO:7 [3A4 CDR3 VH]

DPGAMDY

25 SEQ ID NO:8 [3A4 CDR1 VL]

RSSQSLLSHNGNTYLE

SEQ ID NO:9 [3A4 CDR2 VL]

TVSNRFS

30

SEQ ID NO:10 [3A4 CDR3 VL]

FQGSHPVPLT

SEQ ID NO:11 [тяжелая цепь 3A4, конец K]

35 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQKFKGKAT  
 LTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA  
 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
 EVHNAKTKPREEQYN\*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
 40 PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

N\* обозначает Asn297

SEQ ID NO:12 [KAAG1 человека]

MDDDAAPRVEGVPVAVHKHALHDGLRQVAGPGAAAHLPRWPPQLAASRREAPPLSQRPHRTQGAGSP  
5 PETNEKLTNPQVKEK

SEQ ID NO:13 [3A4-L2 VL, CDR подчеркнуты]

DVVMTQTPLSLPVTGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSGVDRFSGSGS  
10 GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGS~~SHVPLTFGQ~~GTKLEIK

SEQ ID NO:14 [легкая цепь 3A4-L2]

DVVMTQTPLSLPVTGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSGVDRFSGSGS  
15 GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGS~~SHVPLTFGQ~~GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF  
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF  
NRGEC

SEQ ID NO:15 [3A4-K4 VL, CDR подчеркнуты]

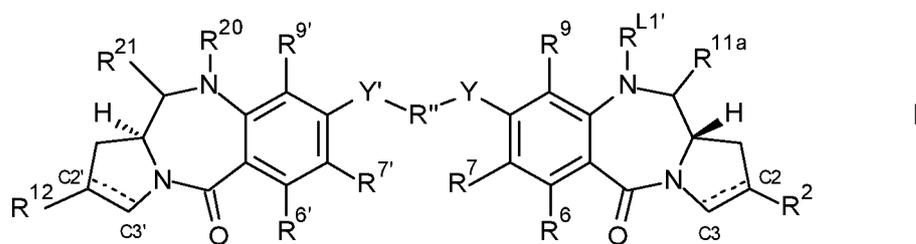
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLLHSNGNTYLEWYQQKPGQPPKLLIYTVSNRFSGVDRFSGSGS  
20 GTDFTLTISLQAEDVAVYYCFQGS~~SHVPLTFGQ~~GTKVEIK

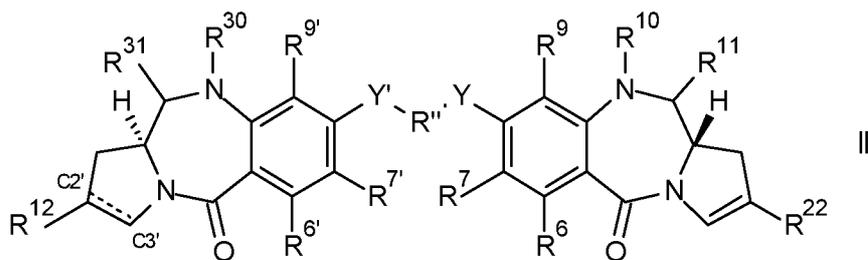
SEQ ID NO:16 [легкая цепь 3A4-K4]

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLLHSNGNTYLEWYQQKPGQPPKLLIYTVSNRFSGVDRFSGSGS  
25 GTDFTLTISLQAEDVAVYYCFQGS~~SHVPLTFGQ~~GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY  
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
RGEC

### Варианты реализации

1. Конъюгат формулы L -  $(D^L)_p$ , где  $D^L$  имеет формулу **I** или **II**:



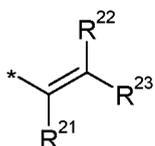


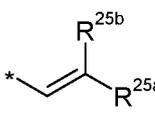
где:

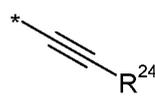
L представляет собой антитело (Ab), связывающееся с КААG1;

в случае, если между C2' и C3' присутствует двойная связь, R<sup>12</sup> выбран из группы, состоящей из:

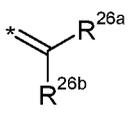
- 5 (ia) C<sub>5-10</sub> арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, включающей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир, C<sub>1-7</sub> алкил, C<sub>3-7</sub> гетероцикл и бис-окси-C<sub>1-3</sub> алкилен;
- (ib) C<sub>1-5</sub> насыщенного алифатического алкила;
- (ic) C<sub>3-6</sub> насыщенного циклоалкила;

- 10 (id) , причем каждый из R<sup>21</sup>, R<sup>22</sup> и R<sup>23</sup> независимо выбраны из H, C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, C<sub>2-3</sub> алкинила и циклопропила, причем общее количество атомов углерода в R<sup>12</sup> группе составляет не более 5;

- (ie) , причем один из R<sup>25a</sup> и R<sup>25b</sup> представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила и тиофенила; и

- 15 (if) , где R<sup>24</sup> выбран из: H; C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила; C<sub>2-3</sub> алкенила; C<sub>2-3</sub> алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила и тиофенила;

где между C2' и C3' присутствует одинарная связь,

- 20 R<sup>12</sup> представляет собой , где R<sup>26a</sup> и R<sup>26b</sup> независимо выбраны из H, F, C<sub>1-4</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, причем алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из C<sub>1-4</sub> алкиламида и C<sub>1-4</sub> алкилового сложного эфира; или, где один из R<sup>26a</sup> и R<sup>26b</sup> представляет собой H, другой выбран из нитрила и C<sub>1-4</sub> алкилового сложного эфира;

R<sup>6</sup> и R<sup>9</sup> независимо выбраны из H, R, OH, OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NRR', нитро, Me<sub>3</sub>Sn и галогена;

- 25 где R и R' независимо выбраны из необязательно замещенных C<sub>1-12</sub> алкильной, C<sub>3-20</sub> гетероциклической и C<sub>5-20</sub> арильной групп;

R<sup>7</sup> выбран из H, R, OH, OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NHRR', нитро, Me<sub>3</sub>Sn и галогена;

$R''$  представляет собой  $C_{3-12}$  алкильную группу, цепь которой может быть прервана одним или более гетероатомами, например, O, S,  $NR^{N2}$  (где  $R^{N2}$  представляет собой H или  $C_{1-4}$  алкил), и/или ароматические кольца, например, бензол или пиридин;

Y и Y' выбраны из O, S или NH;

- 5  $R^6, R^7, R^9$  выбраны из тех же групп, что и  $R^6, R^7$  и  $R^9$  соответственно;

[Формула I]

$R^{L1'}$  представляет собой линкер для соединения с антителом (Ab);

$R^{11a}$  выбран из OH,  $OR^A$ , где  $R^A$  представляет собой  $C_{1-4}$  алкил и  $SO_zM$ , где z равно 2 или 3, и M представляет собой одновалентный фармацевтически приемлемый катион;

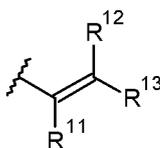
- 10  $R^{20}$  и  $R^{21}$  либо вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны, либо;

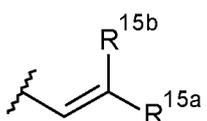
$R^{20}$  выбран из H и  $R^C$ , где  $R^C$  представляет собой кэпирующую группу;

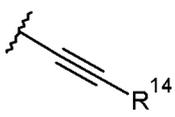
$R^{21}$  выбран из OH,  $OR^A$  и  $SO_zM$ ;

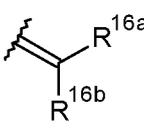
где между C2 и C3 присутствует двойная связь,  $R^2$  выбран из группы, состоящей из:

- 15 (ia)  $C_{5-10}$  арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, включающей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир,  $C_{1-7}$  алкил,  $C_{3-7}$  гетероцикл и бис-окси- $C_{1-3}$  алкилен;
- (ib)  $C_{1-5}$  насыщенного алифатического алкила;
- (ic)  $C_{3-6}$  насыщенного циклоалкила;

- 20 (id) , причем каждый из  $R^{11}, R^{12}$  и  $R^{13}$  независимо выбраны из H,  $C_{1-3}$  насыщенного алкила,  $C_{2-3}$  алкенила,  $C_{2-3}$  алкинила и циклопропила, причем общее количество атомов углерода в  $R^2$  группе составляет не более 5;

- (ie) , причем один из  $R^{15a}$  и  $R^{15b}$  представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила и тиофенила; и
- 25

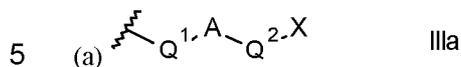
- (if) , где  $R^{14}$  выбран из: H;  $C_{1-3}$  насыщенного алкила;  $C_{2-3}$  алкенила;  $C_{2-3}$  алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила и тиофенила;
- где между C2 и C3 присутствует одинарная связь,

- 30  $R^2$  представляет собой , где  $R^{16a}$  и  $R^{16b}$  независимо выбраны из H, F,  $C_{1-4}$  насыщенного алкила,  $C_{2-3}$  алкенила, причем алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из  $C_{1-}$

4 алкиламида и C<sub>1-4</sub> алкилового сложного эфира или, где один из R<sup>16a</sup> и R<sup>16b</sup> представляет собой H, другой выбран из нитрила и C<sub>1-4</sub> алкилового сложного эфира;

[Формула II]

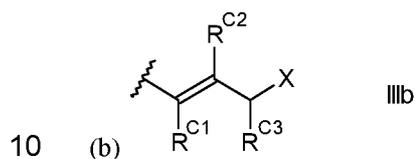
R<sup>22</sup> имеет формулу IIIa, формулу IIIb или формулу IIIc:



где A представляет собой C<sub>5-7</sub> арильную группу и одно из двух

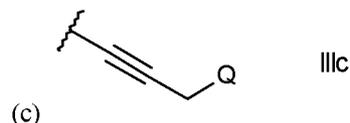
(i) Q<sup>1</sup> представляет собой одинарную связь, и Q<sup>2</sup> выбран из одинарной связи и -Z-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, где Z выбран из одинарной связи, O, S и NH и n равно от 1 до 3; или

(ii) Q<sup>1</sup> представляет собой -CH=CH-, и Q<sup>2</sup> представляет собой одинарную связь;



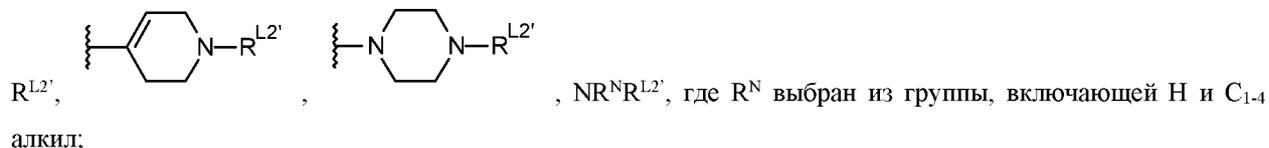
где;

R<sup>C1</sup>, R<sup>C2</sup> и R<sup>C3</sup> независимо выбраны из H и незамещенного C<sub>1-2</sub> алкила;



где Q выбран из O-R<sup>L2'</sup>, S-R<sup>L2'</sup> и NR<sup>N</sup>-R<sup>L2'</sup>, и R<sup>N</sup> выбран из H, метила и этила

15 X выбран из группы, включающей: O-R<sup>L2'</sup>, S-R<sup>L2'</sup>, CO<sub>2</sub>-R<sup>L2'</sup>, CO-R<sup>L2'</sup>, NH-C(=O)-R<sup>L2'</sup>, NNNH-R<sup>L2'</sup>, CONHNH-



R<sup>L2'</sup> представляет собой линкер для соединения с антителом (Ab);

20 R<sup>10</sup> и R<sup>11</sup> либо вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны, либо;

R<sup>10</sup> представляет собой H и R<sup>11</sup> выбран из OH, OR<sup>A</sup> и SO<sub>2</sub>M;

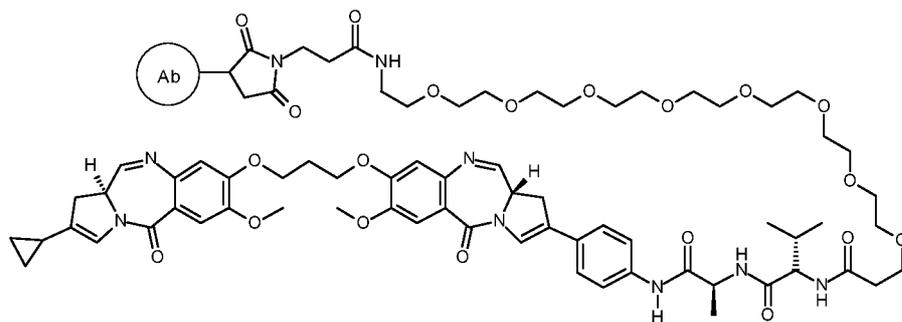
R<sup>30</sup> и R<sup>31</sup> либо вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны, либо;

R<sup>30</sup> представляет собой H и R<sup>31</sup> выбран из OH, OR<sup>A</sup> и SO<sub>2</sub>M.

25

2. Конъюгат по варианту реализации 1, где конъюгат не является:

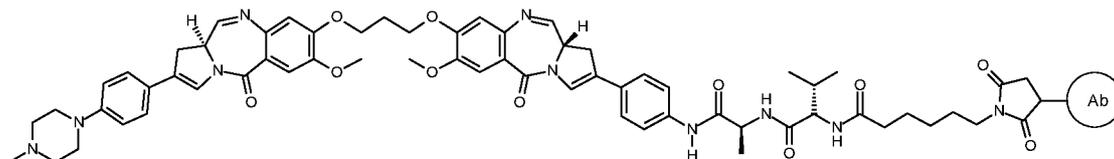
Конъюгатом А



ConjA

;

Конъюгатом

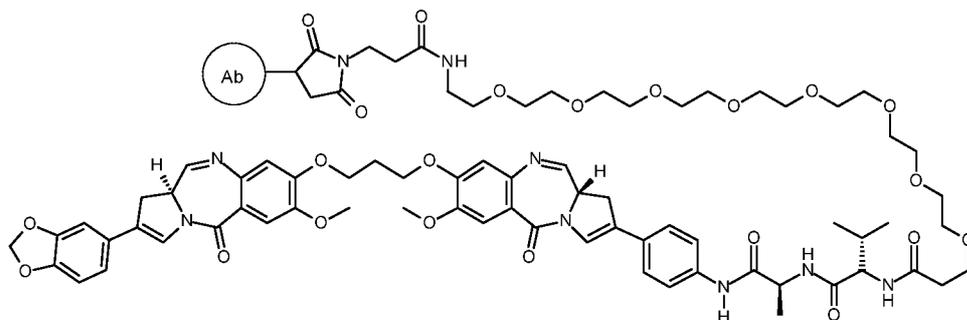


ConjB

;

B

Конъюгатом C:

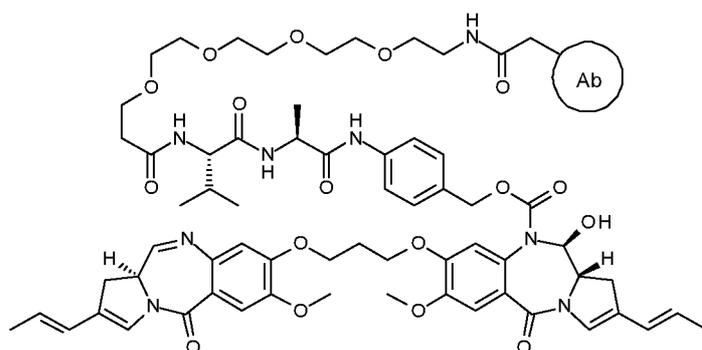


ConjC

;

5

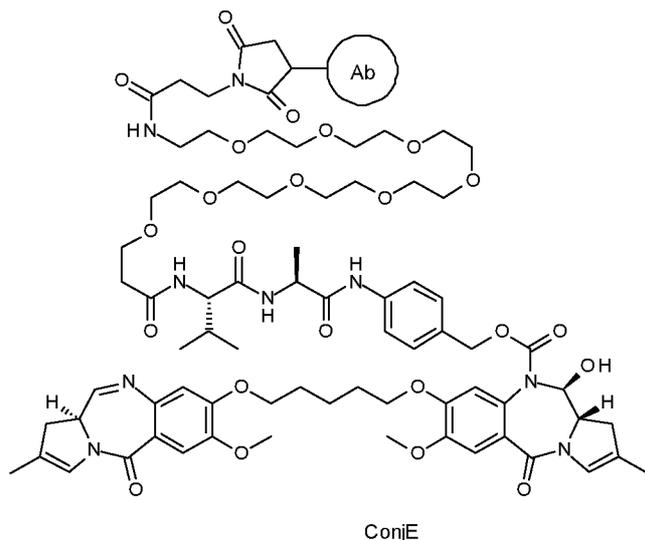
Конъюгатом D



ConjD

; или

Конъюгатом E:



3.        Конъюгат по любому из вариантов реализации 1 или 2, где  $R^7$  выбран из H, OH и OR.
  
- 5        4.        Конъюгат по варианту реализации 3, где  $R^7$  представляет собой  $C_{1-4}$  алкилокси группу.
  
5.        5.        Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-4, где Y представляет собой O.
  
6.        6.        Конъюгат по любому из предшествующих вариантов реализации, где  $R^{11}$  представляет собой  $C_{3-7}$
- 10        7.        алкилен.
  
7.        8.        Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-6, где  $R^9$  представляет собой H.
  
8.        9.        Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-7, где  $R^6$  выбран из H и галогена.
  
- 15        10.        9.        Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-8, где между  $C2'$  и  $C3'$  присутствует двойная связь, и  $R^{12}$  представляет собой  $C_{5-7}$  арильную группу.
  
- 20        11.        10.        Конъюгат по варианту реализации 9, где  $R^{12}$  представляет собой фенил.
  
11.        12.        11.        Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-8, где между  $C2'$  и  $C3'$  присутствует двойная связь, и  $R^{12}$  представляет собой  $C_{8-10}$  арильную группу.
  
12.        13.        12.        Конъюгат по любому из вариантов реализации 9-11, где  $R^{12}$  имеет от одной до трех групп заместителей.
  
- 25        13.        13.        Конъюгат по любому из вариантов реализации 9-12, где заместители выбраны из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-окси-метилена, метил-пиперазинила, морфолино и метил-тиофенила.

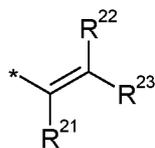
14. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-8, где между C2' и C3' присутствует двойная связь, и R<sup>12</sup> представляет собой C<sub>1-5</sub> насыщенную алифатическую алкильную группу.

15. Соединение по варианту реализации 16, где R<sup>12</sup> представляет собой метил, этил или пропил.

5  
16. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-8, где между C2' и C3' присутствует двойная связь, и R<sup>12</sup> представляет собой C<sub>3-6</sub> насыщенную циклоалкильную группу.

17. Конъюгат по варианту реализации 16, где R<sup>12</sup> представляет собой циклопропил.

10  
18. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-8, где между C2' и C3' присутствует двойная связь, и R<sup>12</sup> представляет собой группу формулы:



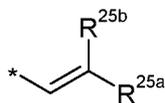
15  
19. Конъюгат по варианту реализации 18, где общее количество атомов углерода в группе R<sup>12</sup> составляет не более 4.

20. Конъюгат по варианту реализации 19, где общее количество атомов углерода в группе R<sup>12</sup> составляет не более 3.

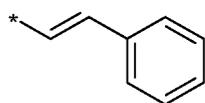
20  
21. Конъюгат по любому из вариантов реализации 18-20, где один из R<sup>21</sup>, R<sup>22</sup> и R<sup>23</sup> представляет собой H, а две другие группы выбраны из H, C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, C<sub>2-3</sub> алкинила и циклопропила.

25  
22. Конъюгат по любому из вариантов реализации 18-20, где два из R<sup>21</sup>, R<sup>22</sup> и R<sup>23</sup> представляют собой H, а другая группа выбрана из H, C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, C<sub>2-3</sub> алкинила и циклопропила.

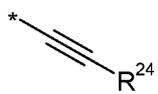
23. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-8, где между C2' и C3' присутствует двойная связь, и R<sup>12</sup> представляет собой группу формулы:



30  
24. Конъюгат по варианту реализации 23, где R<sup>12</sup> представляет собой группу:



25. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-8, где между C2' и C3' присутствует двойная связь, и R<sup>12</sup> представляет собой группу формулы:



5 26. Конъюгат по варианту реализации 25, где R<sup>24</sup> выбран из H, метил, этила, этенила и этинила.

27. Конъюгат по варианту реализации 26, где R<sup>24</sup> выбран из H и метила.

28. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-8, где между C2' и C3' присутствует одинарная

10 связь, R<sup>12</sup> представляет собой  $\begin{array}{c} * \\ \diagdown \\ = \\ \diagup \\ R^{26b} \end{array}$  R<sup>26a</sup>, и R<sup>26a</sup> и R<sup>26b</sup> оба представляют собой H.

29. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-8, где между C2' и C3' присутствует одинарная

связь, R<sup>12</sup> представляет собой  $\begin{array}{c} * \\ \diagdown \\ = \\ \diagup \\ R^{26b} \end{array}$  R<sup>26a</sup>, и R<sup>26a</sup> и R<sup>26b</sup> оба представляют собой метил.

15 30. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-8, где между C2' и C3' присутствует одинарная

связь, R<sup>12</sup> представляет собой  $\begin{array}{c} * \\ \diagdown \\ = \\ \diagup \\ R^{26b} \end{array}$  R<sup>26a</sup>, один из R<sup>26a</sup> и R<sup>26b</sup> представляет собой H, и другой выбран из C<sub>1-4</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены.

[Формула I]

20 31. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30, где между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R<sup>2</sup> представляет собой C<sub>5-7</sub> арильную группу.

32. Конъюгат по варианту реализации 31, где R<sup>2</sup> представляет собой фенил.

25 33. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30, где между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R<sup>1</sup> представляет собой C<sub>8-10</sub> арильную группу.

34. Соединение по любому из вариантов реализации 31-33, где R<sup>2</sup> имеет от одной до трех групп заместителей.

30 35. Конъюгат по любому из вариантов реализации 31-34, где заместители выбраны из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-окси-метилена, метил-пиперазина, морфолино и метил-тиофенила.

36. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30, где между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R<sup>2</sup> представляет собой C<sub>1-5</sub> насыщенную алифатическую алкильную группу.

37. Конъюгат по варианту реализации 36, где R<sup>2</sup> представляет собой метил, этил или пропил.

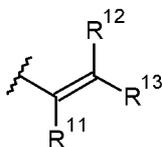
5

38. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30, где между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R<sup>2</sup> представляет собой C<sub>3-6</sub> насыщенную циклоалкильную группу.

39. Конъюгат по варианту реализации 38, где R<sup>2</sup> представляет собой циклопропил.

10

40. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30, где между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R<sup>2</sup> представляет собой группу формулы:



15 41. Конъюгат по варианту реализации 40, где общее количество атомов углерода в группе R<sup>2</sup> составляет не более 4.

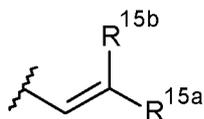
42. Конъюгат по варианту реализации 41, где общее количество атомов углерода в группе R<sup>2</sup> составляет не более 3.

20

43. Конъюгат по любому из вариантов реализации 40-42, где один из R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> и R<sup>13</sup> представляет собой H, а две другие группы выбраны из H, C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, C<sub>2-3</sub> алкинила и циклопропила.

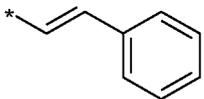
25 44. Конъюгат по любому из вариантов реализации 40-42, где два из R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> и R<sup>13</sup> представляют собой H, а другая группа выбрана из H, C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, C<sub>2-3</sub> алкинила и циклопропила.

45. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30, где между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R<sup>2</sup> представляет собой группу формулы:

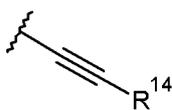


30

46. Конъюгат по варианту реализации 45, где R<sup>2</sup> представляет собой группу:



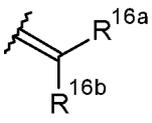
47. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30, где между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R<sup>2</sup> представляет собой группу формулы:



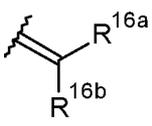
5 48. Конъюгат по варианту реализации 48, где R<sup>14</sup> выбран из H, метил, этила, этенила и этинила.

49. Конъюгат по варианту реализации 48, где R<sup>14</sup> выбран из H и метила.

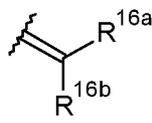
50. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30, где между C2 и C3 присутствует одинарная

10 связь, R<sup>2</sup> представляет собой , и R<sup>16a</sup> и R<sup>16b</sup> оба представляют собой H.

51. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30, где между C2 и C3 присутствует одинарная

связь, R<sup>2</sup> представляет собой , и R<sup>16a</sup> и R<sup>16b</sup> оба представляют собой метил.

15 52. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30, где между C2 и C3 присутствует одинарная

связь, R<sup>2</sup> представляет собой , один из R<sup>16a</sup> и R<sup>16b</sup> представляет собой H, и другой выбран из C<sub>1-4</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены.

20 53. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-52, где R<sup>11a</sup> представляет собой OH.

54. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-53, где R<sup>21</sup> представляет собой OH.

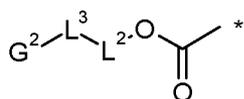
55. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-53, где R<sup>21</sup> представляет собой OMe.

25 56. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-55, где R<sup>20</sup> представляет собой H.

57. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-55, где R<sup>20</sup> представляет собой R<sup>C</sup>.

30 58. Конъюгат по варианту реализации 57, где R<sup>C</sup> выбран из группы состоящей из: Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Psec, Cbz и PNZ.

60. Конъюгат по варианту реализации 57, где R<sup>C</sup> представляет собой группу:



где звездочка указывает точку присоединения к положению N10,  $G^2$  представляет собой концевую группу,  $L^3$  представляет собой ковалентную связь или отщепляемый линкер  $L^1$ ,  $L^2$  представляет собой ковалентную связь или вместе с  $OC(=O)$  образует саморасщепляющийся линкер.

5  
61. Конъюгат по варианту реализации 60, где  $G^2$  представляет собой Ac или Moc или выбран из группы состоящей из: Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Psec, Cbz и PNZ.

10  
62. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-53, где  $R^{20}$  и  $R^{21}$  вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны.

[Формула III]

15  
63. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30, где  $R^{22}$  имеет формулу IIIa, и A представляет собой фенил.

64. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30 и 63, где  $R^{22}$  имеет формулу IIIa, и  $Q^1$  представляет собой одинарную связь.

20  
65. Конъюгат по варианту реализации 63, где  $Q^2$  представляет собой одинарную связь.

66. Конъюгат по варианту реализации 63, где  $Q^2$  представляет собой  $-Z-(CH_2)_n-$ , Z представляет собой O или S и n равно 1 или 2.

25  
67. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30 и 63, где  $R^{22}$  имеет формулу IIIa, и  $Q^1$  представляет собой  $-CH=CH-$ .

68. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30, где  $R^{22}$  имеет формулу IIIb, и  $R^{C1}$ ,  $R^{C2}$  и  $R^{C3}$  независимо выбраны из H и метила.

30  
69. Конъюгат по варианту реализации 68, где  $R^{C1}$ ,  $R^{C2}$  и  $R^{C3}$  представляют собой H.

70. Конъюгат по варианту реализации 68, где  $R^{C1}$ ,  $R^{C2}$  и  $R^{C3}$  все представляют собой метил.

35  
71. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30 и 63-70, где  $R^{22}$  имеет формулу IIIa или формулу IIIb и X выбран из  $O-R^{L2'}$ ,  $S-R^{L2'}$ ,  $CO_2-R^{L2'}$ ,  $-N-C(=O)-R^{L2'}$  и  $NH-R^{L2'}$ .

72. Конъюгат по варианту реализации 71, где X представляет собой  $NH-R^{L2'}$ .

40  
73. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30, где  $R^{22}$  имеет формулу IIIc, и Q представляет собой  $NR^N-R^{L2'}$ .

74. Конъюгат по варианту реализации 73, где  $R^N$  равно Н или метил.
75. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30, где  $R^{22}$  имеет формулу Шс, и Q представляет собой  $O-R^{L2'}$  или  $S-R^{L2'}$ .
76. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30 и 63-75, где  $R^{11}$  представляет собой ОН.
77. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30 и 63-75, где  $R^{11}$  представляет собой ОМе.
78. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30 и 63-77, где  $R^{10}$  представляет собой Н.
79. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30 и 63-75, где  $R^{10}$  и  $R^{11}$  вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны.
80. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30 и 63-79, где  $R^{31}$  представляет собой ОН.
81. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30 и 63-79, где  $R^{31}$  представляет собой ОМе.
82. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30 и 63-81, где  $R^{30}$  представляет собой Н.
83. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-30 и 63-79, где  $R^{30}$  и  $R^{31}$  вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны.
84. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-83, где  $R^{6'}$ ,  $R^{7'}$ ,  $R^{9'}$ , и  $Y'$  являются одинаковыми с  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^9$ , и  $Y$ .
85. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-84 где, где  $L-R^{L1'}$  или  $L-R^{L2'}$  представляет собой группу:
- The diagram shows a chemical structure where a circle labeled 'Ab' is connected to a group 'A'. 'A' is connected to a linker consisting of two parts,  $L^1$  and  $L^2$ .  $L^2$  is connected to an oxygen atom, which is part of a carbonyl group ( $C=O$ ). An asterisk (\*) is placed at the end of the carbonyl group, indicating a point of attachment.
- где звездочка обозначает место присоединения к положению ПБД, Ab представляет собой антитело,  $L^1$  отщепляемый линкер, A представляет собой соединяющую группу соединяющую  $L^1$  с антителом,  $L^2$  представляет собой ковалентную связь или вместе с  $OC(=O)$  образует саморасщепляющийся линкер.
86. Конъюгат по варианту реализации 85, где  $L^1$  является фермент-отщепляемым.
87. Конъюгат по варианту реализации 85 или 86, где  $L^1$  содержит непрерывную последовательность из аминокислот.

88. Конъюгат по варианту реализации 87, где  $L^1$  содержит дипептид и группу  $-X_1-X_2-$  в дипептиде, и  $-NH-X_1-X_2-CO-$  выбран из:

- 5
- Phe-Lys-,
  - Val-Ala-,
  - Val-Lys-,
  - Ala-Lys-,
  - Val-Cit-,
  - Phe-Cit-,
- 10
- Leu-Cit-,
  - Ile-Cit-,
  - Phe-Arg-,
  - Trp-Cit-.

15 89. Конъюгат по варианту реализации 88, где группа  $-X_1-X_2-$  в дипептиде,  $-NH-X_1-X_2-CO-$ , выбрана из:

- Phe-Lys-,
  - Val-Ala-,
  - Val-Lys-,
  - Ala-Lys-,
- 20
- Val-Cit-.

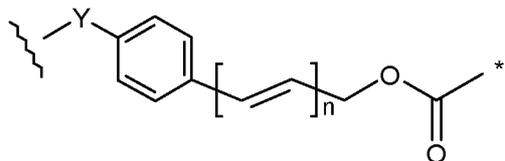
90. Конъюгат по варианту реализации 89, где группа  $-X_1-X_2-$  в дипептиде,  $-NH-X_1-X_2-CO-$ , представляет собой -Phe-Lys-, -Val-Ala- или -Val-Cit-.

25 91. Конъюгат по любому из вариантов реализации 88-90, где группа  $X_2-CO-$  соединена с  $L^2$ .

92. Конъюгат по любому из вариантов реализации 88-91, где группа  $NH-X_1-$  соединена с А.

30 93. Конъюгат по любому из вариантов реализации 88-92, где  $L^2$  вместе с  $OC(=O)$  образует саморасщепляющийся линкер.

94. Конъюгат по варианту реализации 93, где  $C(=O)O$  и  $L^2$  вместе образуют группу:

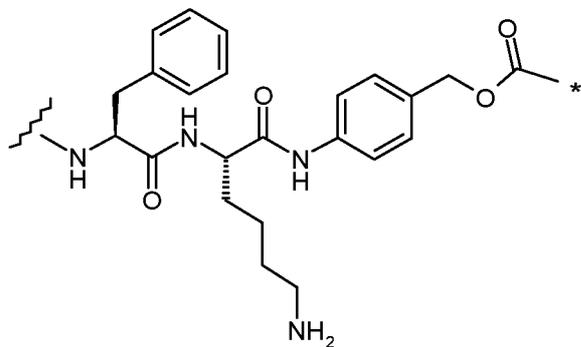


35 где звездочка обозначает место присоединения к ПБД, волнистая линия обозначает место присоединения к линкеру  $L^1$ , Y представляет собой NH, O,  $C(=O)NH$  или  $C(=O)O$ , и n равен 0-3.

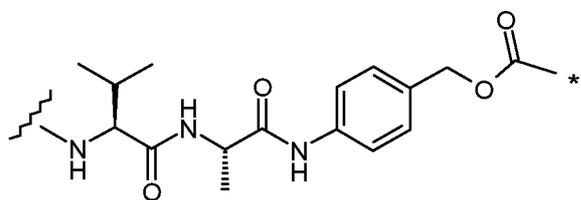
95. Конъюгат по варианту реализации 94, где Y представляет собой NH.

96. Конъюгат по варианту реализации 94 или 95, где  $n$  равно 0.

97. Конъюгат по варианту реализации 95, где  $L^1$  и  $L^2$  вместе с  $-OC(=O)-$  составляют группу, выбранную из:



или



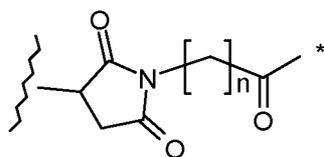
10 где звездочка обозначает место присоединения к ПБД, и волнистая линия обозначает место присоединения к оставшейся части линкера  $L^1$  или точку присоединения к А.

98. Конъюгат по варианту реализации 97, где волнистая линия обозначает место присоединения к А.

99. Конъюгат по любому из вариантов реализации 85-98, где А представляет собой:

15

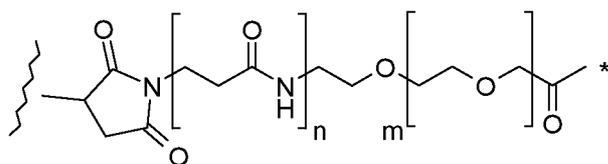
(i)



20 где звездочка обозначает место присоединения к  $L^1$ , волнистая линия обозначает место присоединения к антителу, и  $n$  равно 0-6; или

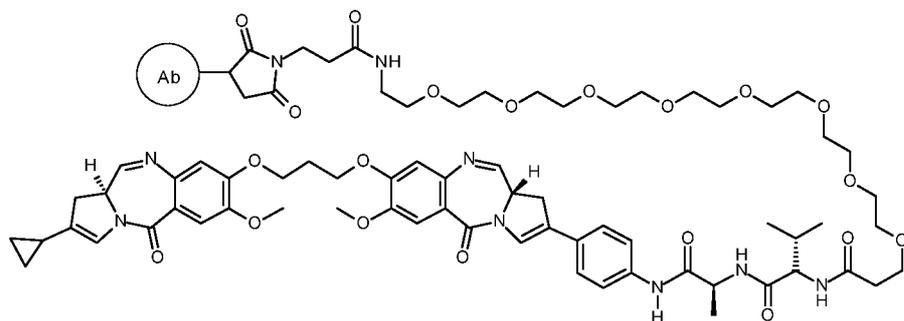
20

(ii)



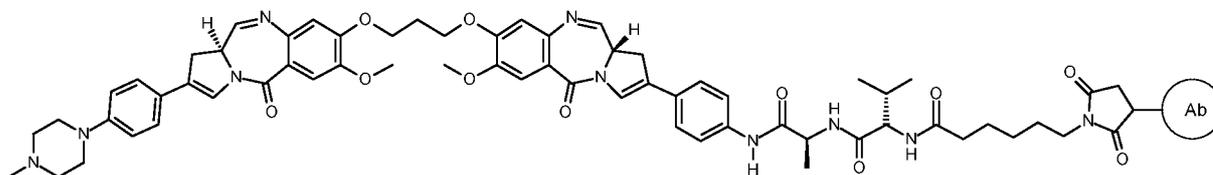
где звездочка обозначает место присоединения к  $L^1$ , волнистая линия обозначает место присоединения к антителу,  $n$  равен 0 или 1 и  $m$  равен 0-30.

100. Конъюгат по варианту реализации 1 формулы Конъюгата А:



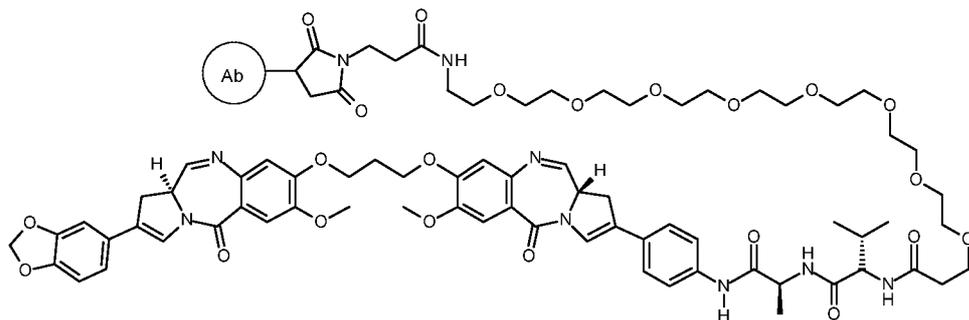
ConjA

5 Конъюгата В:



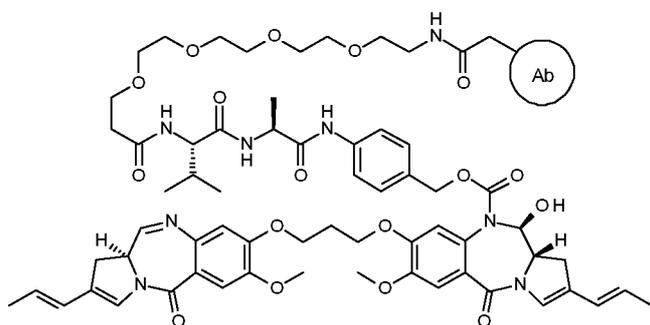
ConjB

Конъюгата С:



ConjC

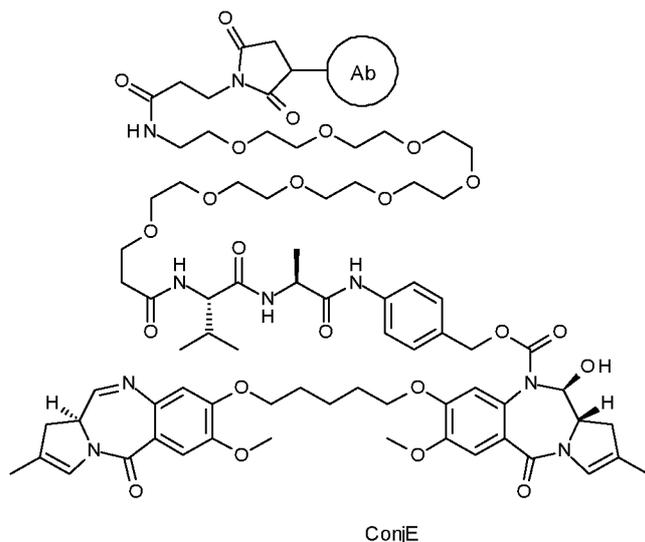
Конъюгата D:



ConjD

10

Или Конъюгата Е:



101. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-100 где антитело содержит домен VH, содержащий CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, и CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7; где необязательно домен VH имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 1.
102. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-101, где антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:8, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9, и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:10.
103. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-102, где антитело содержит домен VL, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15.
104. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-102, где антитело содержит домен VL, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 2.
105. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-104, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3.
106. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-104, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 11.
107. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-106, где антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16.
108. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-106, где антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:4.

109. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-108, где антитело представляет собой интактное антитело.
- 5 110. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-109, где антитело является гуманизированным, деиммунизированным или антителом с измененной поверхностью.
111. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-108, где антитело представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG1, предпочтительно IgG1,κ.
- 10 112. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-111, где нагрузка (p) лекарственного средства (D) на антитело (Ab) равна целому числу от 1 до около 8.
113. Конъюгат по варианту реализации 112, где p равно 1, 2, 3, или 4.
- 15 114. Конъюгат по варианту реализации 112 содержащий смесь соединений конъюгата антитело-лекарственное средство, где средняя нагрузка лекарственного средства на антитело в смеси соединений конъюгата антитело-лекарственное средство составляет от около 2 до около 5.
- 20 115. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-114, для применения в терапии.
116. Конъюгат по любому из вариантов реализации 1-114 для применения при лечении пролиферативного заболевания у субъекта.
- 25 117. Конъюгат по варианту реализации 116, где заболевание представляет собой онкологическое заболевание.
118. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из вариантов реализации 1-114 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или наполнитель.
- 30 119. Фармацевтическая композиция по варианту реализации 118, дополнительно содержащая терапевтически эффективное количество химиотерапевтического агента.
120. Применение конъюгата по любому из вариантов реализации 1-114 при приготовлении лекарства для применения при лечении пролиферативного заболевания у субъекта.
- 35 121. Способ лечения онкологического заболевания, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по варианту реализации 118.
- 40 122. Способ по варианту реализации 121, где пациенту вводят химиотерапевтическое средство в комбинации с данным конъюгатом.

## Примеры

### Экспериментальные методы получения и свойства лекарственных средств-линкеров и высвобождаемых соединений.

- 5 Подробные примеры, относящиеся к синтезу и свойствам лекарственных средств-линкеров и высвобождаемых соединений, раскрытых в данном документе, можно найти, например, в WO2014/057119 (см. Раздел «Примеры», начинающийся на странице 106 WO2014/057119, в частности, Примеры с 1 по 10).

Эти примеры включены в настоящее описание в качестве ссылки во всем своем объеме.

10

### Пример 1: Образование конъюгатов

#### Получение КАЛС

- 15 Антитело 3A4 к КАAG1 (с последовательностями VH и VL Seq 1 и Seq 2, соответственно) конъюгировали с лекарственным средством-линкером E с получением КАЛСxКАAG1 следующим способом.

3A4 в 30 mM гистидине, 200 mM сахарозе, pH 6,0 доводили до pH 7,5 с помощью 500 mM Трис, 25 mM ЭДТА, pH 8,5 и восстанавливали в течение 90 минут путем добавления 1,24 молярных эквивалентов ТСЕР при 18-  
20 22 °C.

Конъюгирование проводили путем добавления 4 молярных эквивалентов 10 mM SG3249 (также известного как. Лекарственное средство-линкер E) в DMA в течение 90 минут при 18-22 °C, и реакцию останавливали добавлением 8 молярных эквивалентов N-ацетилцистеина в течение 30 минут при 18-22 °C.

25

pH доводили до 6,2, добавляя 400 mM гистидин-HCl, pH 4,0, и конъюгат фильтровали через фильтр 0,2 мкм. Конъюгат подвергали диафильтрации с использованием 12 объемов 30 mM гистидина, 175 mM сахарозы, pH 6,0 с мембранами Pellicon 3 Ultracell.

- 30 КАЛС разбавляли до конечной концентрации белка 5 мг/мл 30 mM гистидина, 175 mM сахарозы, pH 6,0, добавляли Твин-20 до конечной концентрации 0,02% (об./об.). Наконец, весь объем фильтровали через фильтр 0,2 мкм и хранили при температуре <-70 °C.

- 35 Антитело B12 к gp120 ВИЧ, конъюгированное с лекарственным средством-линкером E, использовали для создания контрольных КАЛС, не нацеленных на КАAG1, способом, аналогичным описанному выше.

#### Определение DAR и анализ чистоты

Конечный DAR КАЛСxКАAG1, определенный с помощью НИС, составлял 2,2, а процент мономера составлял 95%, как определено с помощью эксклюзионной хроматографии (ЭХ).

40

Пример 2: Цитотоксичность КАЛС *in vitro*Культура клеток

Использовали клетки РС3, SN12С и SKOV3.

5

Анализ цитотоксичности *in vitro*

Клетки, растущие экспоненциально при 80-90% конfluence, промывали ФСБ, отделяли (при необходимости) трипсин-ЭДТА (0,25%) и ресуспендировали в среде, специфичной для клеток. Затем клетки разбавляли до  $6 \times 10^4$  клеток/мл и аликвотировали по 50 мкл/лунку в помеченные 96-луночные белые прозрачные планшеты с плоским дном.

10

Исходный раствор на 400 мкл каждого КАЛС доводили до концентрации 20 мкг/мкл путем разбавления стерилизованного фильтрованием КАЛС в среде для роста клеток.

Затем с использованием этого исходного раствора был установлен диапазон разбавления 1: 5 для получения набора из 7 разведений; 50 мкл каждого разведения КАЛС (включая исходный раствор) распределяли в 2 дублирующиеся лунки помеченного 96-луночного белого прозрачного планшета с плоским дном, содержащего 50 мкл клеточной суспензии.

15

Контроль среды: 100 мкл среды для роста клеток распределяли в 2 лунки для повторения.

20

Контроль клеточной линии: 50 мкл среды для роста клеток + 50 мкл клеточной суспензии, распределенные в 2 лунки для повторения.

Затем планшеты инкубировали при 37 °С в инкубаторе с CO<sub>2</sub> в течение времени воздействия, специфичного для клеточной линии; 3 дня для РС3 и SN12С, 4 дня для SKOV3.

25

В конце инкубационного периода жизнеспособность клеток измеряли с помощью анализа CellTiter-Glo (Promega). Планшеты удаляли из инкубатора и давали возможность температуре уравниваться до комнатной температуры в течение 10 минут, затем в лунки добавляли 100 мкл/лунку CellTiter-Glo. Затем планшеты помещали в орбитальный шейкер на 2 минуты (легкое встряхивание), затем давали возможность стабилизироваться в течение 10 минут. Люминесценцию клеток измеряли с использованием планшет-ридера Envision.

30

Процент выживаемости клеток рассчитывали из средней люминесценции клеток, обработанных КАЛС (с использованием 2 повторяющихся лунок) и средней люминесценции клеток, не подвергавшихся обработке (контрольные лунки). Процент выживаемости клеток рассчитывали из среднего количества клеток, обработанных КАЛС (с использованием 2 повторяющихся лунок) и среднего количества клеток, не подвергавшихся обработке (контрольные лунки). IC<sub>50</sub> определяли из данных кривой доза-ответ с использованием GraphPad Prism с использованием алгоритма подбора нелинейной кривой для каждого повторения, из которого рассчитывали среднее значение IC<sub>50</sub>. Эксперимент повторяли в трижды.

40

Полученные результаты

| IC50 (мкг/мл)    | SKOV3 | SN12C | PC3  |
|------------------|-------|-------|------|
| КАЛСхКАAG1       | 0,14  | 0,22  | 0,81 |
| Контрольный КАЛС | 17,73 | 190,2 | 5,33 |

Значения IC50 получены из графиков, показанных на Фиг. 1.

5

Пример 3 - Исследование эффективности *In vivo* на модели ксенотрансплантата TNBC MDA-MB-231

Самки бестимусных голых мышей (CrI:NU(Ncr)-Foxn1nu, Charles River) были в возрасте восьми недель с диапазоном массы тела (MT) от 20,7 до 31,2 г в 1 день исследования. Каждой мышши вводили подкожно (п/к) в правый бок  $5 \times 10^6$  опухолевых клеток MDA-MB-231.

10

Опухоль измеряли в двух измерениях с помощью штангенциркуля, а объем рассчитывали по формуле:

$$\text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = w^2 \times l / 2$$

15 где  $w$  = ширина и  $l$  = длина опухоли в мм. Массы опухоли можно оценить, исходя из предположения, что 1 мг эквивалентен 1 мм<sup>3</sup> объема опухоли.

20 Шестнадцать дней спустя, обозначенных как 1 День исследования, мышшей разделили на группы лечения ( $n = 8$ ) с индивидуальным объемом опухоли от 108 до 144 мм<sup>3</sup> и средним групповым объемом опухоли 113–124 мм<sup>3</sup>.

В 1 день исследования лекарственные средства вводили внутривенно (в/в) однократно (qd x 1) через инъекцию в хвостовую вену. Вводимый объем составлял 0,2 мл на 20 г массы тела (10 мл/кг) и был масштабирован по массе тела каждого отдельного животного.

25 Опухоли измеряли с помощью штангенциркуля два раза в неделю, и каждое животное подвергалось эвтаназии, когда его опухоль достигала конечного объема 1500 мм<sup>3</sup> или в конце исследования (59 день), в зависимости от того, что наступило раньше.

30 Результаты показаны на Фиг. 2.

Пример 4 - Исследование эффективности *In vivo* на модели ксенотрансплантата онкологического заболевания почки SN12C

35 Самки мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (Fox Chase SCID®, CB17/Icr-Prkdcscid/IcrIcoCrI, Charles River) были в возрасте девяти недель с диапазоном массы тела (MT) от 15,4 до 22,2 г в 1 день исследования. В день имплантации опухоли каждая тестируемая мышшь получала  $5 \times 10^6$

клеток SN12C (0,1 мл клеточной суспензии в 50% Matrigel® Matrix в фосфатно-солевом буфере), имплантированных подкожно в правый бок.

Опухоль измеряли в двух измерениях с помощью штангенциркуля, а объем рассчитывали по формуле:

$$5 \quad \text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = w^2 \times l / 2$$

где  $w$  = ширина и  $l$  = длина опухоли в мм. Массы опухоли можно оценить, исходя из предположения, что 1 мг эквивалентен 1 мм<sup>3</sup> объема опухоли.

10 Рост опухоли контролировали по мере приближения среднего размера к целевому диапазону от 100 до 150 мм<sup>3</sup>. Через двадцать три дня после имплантации опухоли, обозначенных как 1 день исследования, животные были разделены на группы ( $n = 8$ ) с индивидуальными объемами опухолей от 108 до 172 мм<sup>3</sup> и средним групповым объемом опухолей 129 мм<sup>3</sup>.

15 В 1 день исследования лекарственные средства вводили внутривенно (в/в) однократно (qd x 1) через инъекцию в хвостовую вену. Вводимый объем составлял 0,2 мл на 20 г массы тела (10 мл/кг) и был масштабирован по массе тела каждого отдельного животного.

20 Опухоли измеряли с помощью штангенциркуля два раза в неделю, и каждое животное подвергалось эвтаназии, когда его опухоль достигала конечного объема 1000 мм<sup>3</sup> или в конце исследования, в зависимости от того, что наступило раньше. Исследование закончилось на 60 день.

Результаты показаны на Фиг. 3.

25 Пример 5 - Исследование эффективности *In vivo* в модели PDX онкологического заболевания яичников CTG-0703

30 Бестимусные самки Nude-Foxn1nu (Envigo; Индианаполис, Индиана, США) были возрастом не менее 8 недель, с массой тела около 20 грамм в начале приема лекарственного средства. Исходным мышам имплантировали опухолевые клетки из модели PDX CTG-0703.

После того, как опухоли достигли размера 1000-1500 мм<sup>3</sup>, их собирали и фрагменты опухоли имплантировали подкожно в левый бок самок исследуемых мышей. Каждому животному имплантировали определенную партию пассажей (пассаж 7) и регистрировали.

35 Рост опухоли контролировали дважды в неделю с помощью цифровых штангенциркулей и рассчитывали объем опухоли (ОО) по формуле ( $0,52 \times [\text{длина} \times \text{ширина}^2]$ ).

40 Когда ОО достигал приблизительно 150-300 мм<sup>3</sup>, животных подбирали по размеру опухоли и распределяли в группы контроля носителями ( $n = 8$ ) или лечения ( $n = 8$ ), и введение начинали в 0 день. Лекарственные

средства вводили внутривенно (в/в) за одно введение (qd x 1). Объем дозировки составлял 0,2 мл на 20 г массы тела (10 мл/кг).

5 После начала введения в 0 день животных взвешивали дважды в неделю, используя цифровые весы, и измеряли ОО дважды в неделю, а также в последний день исследования или в день умерщвления животных.

10 Исследование прекращали, когда средний объем опухоли в контрольной группе носителя достигал около 1500 мм<sup>3</sup> или на 49 день, в зависимости от того, что происходило раньше. Отдельные животные с размером опухоли > 1700 мм<sup>3</sup> были исключены из исследования и умерщвлены.

Результаты показаны на Фиг. 4.

15 Пример 6 - Исследование эффективности *In vivo* на 4 дополнительных PDX моделях онкологического заболевания яичников

Методика исследования на PDX модели CTG-0252

20 Самки бестимусных мышей (Nude-Foxn1<sup>tm</sup>, Envigo) были в возрасте не менее 6-8 недель с массой тела не менее 18 грамм в начале приема лекарственного средства. Каждой мышце подкожно (п.к) имплантировали фрагменты опухоли (около 5 × 5 × 5 мм<sup>3</sup>) в левый бок. Рост опухоли контролировали дважды в неделю с помощью цифровых штангенциркулей и рассчитывали объем опухоли (ОО) по формуле (0,52 × [длина × ширина<sup>2</sup>]).

25 Когда ОО достигал около 100-200 мм<sup>3</sup> (средний ОО группы 200 мм<sup>3</sup>), животных подбирали по размеру опухоли и рандомизировали в контрольную группу и группу лечения (n = 5/группу). В 0 день исследования начинали введение лекарственные средства внутривенно (в/в) однократно (qd x 1) через инъекцию в хвостовую вену. Объем введения составлял 0,2 мл на 20 г массы тела (10 мл/кг) и был масштабирован по массе тела каждого отдельного животного. Опухоли измеряли с помощью штангенциркуля два раза в неделю, и каждое животное подвергалось эвтаназии, когда его опухоль достигала конечного объема 2000 мм<sup>3</sup> или в конце исследования (58 день), в зависимости от того, что наступило раньше.

30 Результаты показаны на Фиг. 5А.

35 Методика исследования на PDX модели CTG-1086

40 Самки бестимусных мышей (Nude-Foxn1<sup>tm</sup>, Envigo) были в возрасте не менее 6-8 недель с массой тела не менее 18 грамм в начале приема лекарственного средства. Каждой мышце подкожно (п.к) имплантировали фрагменты опухоли (около 5 × 5 × 5 мм<sup>3</sup>) в левый бок. Рост опухоли контролировали дважды в неделю с помощью цифровых штангенциркулей и рассчитывали объем опухоли (ОО) по формуле (0,52 × [длина × ширина<sup>2</sup>]).

Когда ОО достигал около 100-200 мм<sup>3</sup> (средний ОО группы 140 мм<sup>3</sup>), животных подбирали по размеру опухоли и рандомизировали в контрольную группу и группу лечения (n = 5/группу). В 0 день исследования начинали введение лекарственных средства внутривенно (в/в) однократно (qd x 1) через инъекцию в хвостовую вену. Объем введения составлял 0,2 мл на 20 г массы тела (10 мл/кг) и был масштабирован по

5 массе тела каждого отдельного животного. Опухоли измеряли с помощью штангенциркуля два раза в неделю, и каждое животное подвергалось эвтаназии, когда его опухоль достигала конечного объема 2000 мм<sup>3</sup> или в конце исследования (61 день), в зависимости от того, что наступило раньше.

Результаты показаны на Фиг. 5В.

10

#### Методика исследования на PDX модели CTG-0711

Самки бестимусных мышей (Nude-Foxn1<sup>tm</sup>, Envigo) были в возрасте не менее 6-8 недель с массой тела не менее 18 грамм в начале приема лекарственного средства. Каждой мышце подкожно (п.к) имплантировали

15 фрагменты опухоли (около 5 × 5 × 5 мм<sup>3</sup>) в левый бок. Рост опухоли контролировали дважды в неделю с помощью цифровых штангенциркулей и рассчитывали объем опухоли (ОО) по формуле (0,52 × [длина × ширина<sup>2</sup>]).

Когда ОО достигал около 100-200 мм<sup>3</sup> (средний ОО группы 148 мм<sup>3</sup>), животных подбирали по размеру

20 опухоли и рандомизировали в контрольную группу и группу лечения (n = 5/группу). В 0 день исследования начинали введение лекарственных средства внутривенно (в/в) однократно (qd x 1) через инъекцию в хвостовую вену. Объем введения составлял 0,2 мл на 20 г массы тела (10 мл/кг) и был масштабирован по

25 массе тела каждого отдельного животного. Опухоли измеряли с помощью штангенциркуля два раза в неделю, и каждое животное подвергалось эвтаназии, когда его опухоль достигала конечного объема 2000 мм<sup>3</sup> или в конце исследования (63 день), в зависимости от того, что наступило раньше.

Результаты показаны на Фиг. 5С.

#### Методика исследования на PDX модели CTG-1423

Самки бестимусных мышей (Nude-Foxn1<sup>tm</sup>, Envigo) были в возрасте не менее 6-8 недель с массой тела не менее 18 грамм в начале приема лекарственного средства. Каждой мышце подкожно (п.к) имплантировали

35 фрагменты опухоли (около 5 × 5 × 5 мм<sup>3</sup>) в левый бок. Рост опухоли контролировали дважды в неделю с помощью цифровых штангенциркулей и рассчитывали объем опухоли (ОО) по формуле (0,52 × [длина × ширина<sup>2</sup>]).

Когда ОО достигал около 100-200 мм<sup>3</sup> (средний ОО группы 204 мм<sup>3</sup>), животных подбирали по размеру

40 опухоли и рандомизировали в контрольную группу и группу лечения (n = 5/группу). В 0 день исследования начинали введение лекарственных средства внутривенно (в/в) однократно (qd x 1) через инъекцию в хвостовую вену. Объем введения составлял 0,2 мл на 20 г массы тела (10 мл/кг) и был масштабирован по

массе тела каждого отдельного животного. Опухоли измеряли с помощью штангенциркуля два раза в

неделю, и каждое животное подвергалось эвтаназии, когда его опухоль достигала конечного объема 2000 мм<sup>3</sup> или в конце исследования (55 день), в зависимости от того, что наступило раньше.

Результаты показаны на Фиг. 5D.

5

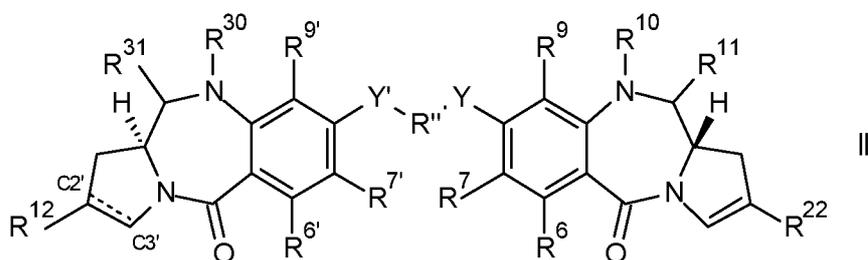
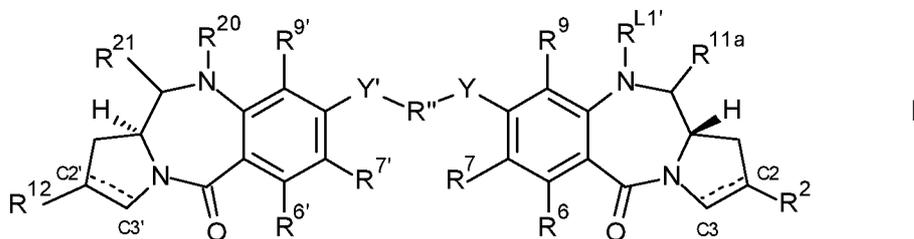
### Сокращения

|    |           |  |
|----|-----------|--|
| 10 | Ac        | ацетил   |
|    | Acм       | ацетамидометил   |
|    | Alloc     | аллилоксикарбонил  |
|    | Woc       | Woc ди- <i>трет</i> -бутилдикарбонат   |
|    | t-Bu      | трет-бутил   |
| 15 | Bzl       | бензил, где Bzl-OMe - метоксибензил, и Bzl-Me - метилбензол.   |
|    | Cbz или Z | бензилоксикарбонил, где Z-Cl и Z-Br представляют собой хлор- и бромбензилоксикарбонил, соответственно                                |
|    | DMFA      | <i>N,N</i> -диметилформамид  |
|    | Dnp       | динитрофенил   |
| 20 | DTT       | дитиотреитол   |
|    | Fmoc      | 9 <i>H</i> -флуорен-9-илметоксикарбонил  |
|    | imp       | <i>N</i> -10 иминзащитная группа: 3- (2-метоксиэтокси)пропаноат-Val-Ala-PAB MC-OSu малеимидокапроил- <i>O</i> - <i>N</i> -сукцинимид |
|    | Moc       | метоксикарбонил  |
| 25 | MP        | малеимидопропанамид  |
|    | Mtr       | 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил  |
|    | PAB       | пара-аминобензилоксикарбонил   |
|    | ПЭГ       | этиленокси   |
|    | PNZ       | <i>n</i> -нитробензил карбамат   |
| 30 | Psec      | 2-(фенилсульфонил)этоксикарбонил   |
|    | TBDMS     | трет-бутилдиметилсилил   |
|    | TBDPS     | трет-бутилдифенилсилил   |
|    | Teoc      | 2-(триметилсилил)этоксикарбонил  |
|    | Tos       | тозил  |
| 35 | Troc      | 2,2,2-трихлорэтоксикарбонилхлорид  |
|    | Trt       | третил   |
|    | Xan       | ксантил  |

40

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат формулы L - (D<sup>L</sup>)<sub>p</sub>, где D<sup>L</sup> имеет формулу I или II:

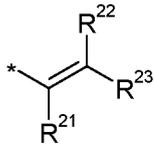


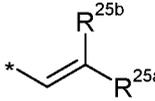
где:

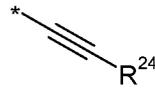
L представляет собой антитело (Ab), связывающееся с КААG1;

в случае, если между C2' и C3' присутствует двойная связь, R<sup>12</sup> выбран из группы, состоящей из:

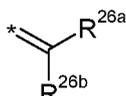
- 10 (ia) C<sub>5-10</sub> арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, включающей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир, C<sub>1-7</sub> алкил, C<sub>3-7</sub> гетероцикл и бис-окси-C<sub>1-3</sub> алкилен;
- (ib) C<sub>1-5</sub> насыщенного алифатического алкила;
- (ic) C<sub>3-6</sub> насыщенного циклоалкила;

- 15 (id)  , причем каждый из R<sup>21</sup>, R<sup>22</sup> и R<sup>23</sup> независимо выбраны из H, C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, C<sub>2-3</sub> алкинила и циклопропила, причем общее количество атомов углерода в R<sup>12</sup> группе составляет не более 5;

- (ie)  , причем один из R<sup>25a</sup> и R<sup>25b</sup> представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила и тиофенила; и

- 20 (if)  , где R<sup>24</sup> выбран из: H; C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила; C<sub>2-3</sub> алкенила; C<sub>2-3</sub> алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила и тиофенила;

где между C2' и C3' присутствует одинарная связь,



$R^{12}$  представляет собой  $\text{C}^*$ , где  $R^{26a}$  и  $R^{26b}$  независимо выбраны из H, F,  $C_{1-4}$  насыщенного алкила,  $C_{2-3}$  алкенила, причем алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из  $C_{1-4}$  алкиламида и  $C_{1-4}$  алкилового сложного эфира; или, где один из  $R^{26a}$  и  $R^{26b}$  представляет собой H, другой выбран из нитрила и  $C_{1-4}$  алкилового сложного эфира;

5  $R^6$  и  $R^9$  независимо выбраны из H, R, OH, OR, SH, SR,  $NH_2$ , NHR,  $NRR'$ , нитро,  $Me_3Sn$  и галогена; где R и  $R'$  независимо выбраны из необязательно замещенных  $C_{1-12}$  алкильной,  $C_{3-20}$  гетероциклической и  $C_{5-20}$  арильной групп;

$R^7$  выбран из H, R, OH, OR, SH, SR,  $NH_2$ , NHR,  $NHRR'$ , нитро,  $Me_3Sn$  и галогена;

10  $R''$  представляет собой  $C_{3-12}$  алкильную группу, цепь которой может быть прервана одним или более гетероатомами, например, O, S,  $NR^{N2}$  (где  $R^{N2}$  представляет собой H или  $C_{1-4}$  алкил), и/или ароматические кольца, например, бензол или пиридин;

Y и  $Y'$  выбраны из O, S или NH;

$R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^9$  выбраны из тех же групп, что и  $R^6$ ,  $R^7$  и  $R^9$  соответственно;

[Формула I]

15  $R^{L1'}$  представляет собой линкер для соединения с антителом (Ab);

$R^{11a}$  выбран из OH,  $OR^A$ , где  $R^A$  представляет собой  $C_{1-4}$  алкил, и  $SO_zM$ , где z равно 2 или 3, и M представляет собой одновалентный фармацевтически приемлемый катион;

$R^{20}$  и  $R^{21}$  либо вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны, либо;

20  $R^{20}$  выбран из H и  $R^C$ , где  $R^C$  представляет собой кэпирующую группу;

$R^{21}$  выбран из OH,  $OR^A$  и  $SO_zM$ ;

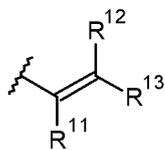
где между C2 и C3 присутствует двойная связь,  $R^2$  выбран из группы, состоящей из:

(ia)  $C_{5-10}$  арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, содержащей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир,  $C_{1-7}$  алкил,  $C_{3-7}$

25 гетероцикл и бис-окси- $C_{1-3}$  алкилен;

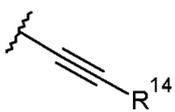
(ib)  $C_{1-5}$  насыщенного алифатического алкила;

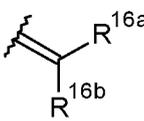
(ic)  $C_{3-6}$  насыщенного циклоалкила;



(id)  $\text{C}^*$ , причем каждый из  $R^{11}$ ,  $R^{12}$  и  $R^{13}$  независимо выбраны из H,  $C_{1-3}$  насыщенного алкила,  $C_{2-3}$  алкенила,  $C_{2-3}$  алкинила и циклопропила, причем общее количество атомов углерода в  $R^2$  группе составляет не более 5;

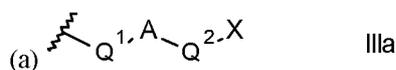
30 (ie)  $\text{C}^*$ , причем один из  $R^{15a}$  и  $R^{15b}$  представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила и тиофенила; и

- (if)  , где R<sup>14</sup> выбран из: H; C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила; C<sub>2-3</sub> алкенила; C<sub>2-3</sub> алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси, пиридила и тиофенила;  
где между C2 и C3 присутствует одинарная связь,

- 5 R<sup>2</sup> представляет собой  , где R<sup>16a</sup> и R<sup>16b</sup> независимо выбраны из H, F, C<sub>1-4</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены группой, выбранной из C<sub>1-4</sub> алкиламида и C<sub>1-4</sub> алкилового сложного эфира или, когда один из R<sup>16a</sup> и R<sup>16b</sup> представляет собой H, другой выбран из нитрила и C<sub>1-4</sub> алкилового сложного эфира;

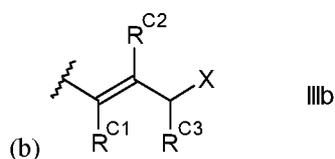
[Формула II]

- 10 R<sup>22</sup> имеет формулу IIIa, формулу IIIb или формулу IIIc:



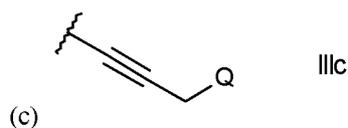
где A представляет собой C<sub>5-7</sub> арильную группу, и либо

- (i) Q<sup>1</sup> представляет собой одинарную связь, и Q<sup>2</sup> выбран из одинарной связи и -Z-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, где Z выбран из одинарной связи, O, S и NH и n равен от 1 до 3; или  
15 (ii) Q<sup>1</sup> представляет собой -CH=CH-, и Q<sup>2</sup> представляет собой одинарную связь;

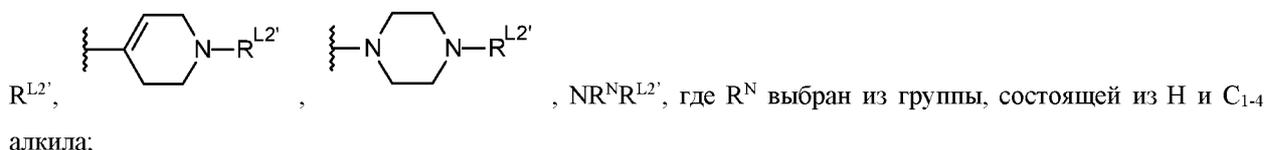


где;

R<sup>C1</sup>, R<sup>C2</sup> и R<sup>C3</sup> независимо выбраны из H и незамещенного C<sub>1-2</sub> алкила;



- 20 где Q выбран из O-R<sup>L2'</sup>, S-R<sup>L2'</sup> и NR<sup>N</sup>-R<sup>L2'</sup>, и R<sup>N</sup> выбран из H, метила и этила  
X выбран из группы, состоящей из: O-R<sup>L2'</sup>, S-R<sup>L2'</sup>, CO<sub>2</sub>-R<sup>L2'</sup>, CO-R<sup>L2'</sup>, NH-C(=O)-R<sup>L2'</sup>, NHNH-R<sup>L2'</sup>, CONHNH-



R<sup>L2'</sup> представляет собой линкер для соединения с антителом (Ab);

- 25 R<sup>10</sup> и R<sup>11</sup> либо вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны, либо;

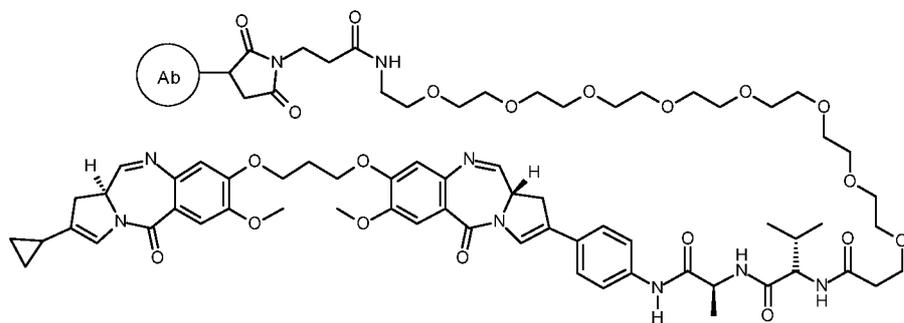
R<sup>10</sup> представляет собой H и R<sup>11</sup> выбран из OH, OR<sup>A</sup> и SO<sub>2</sub>M;

R<sup>30</sup> и R<sup>31</sup> либо вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны, либо;

$R^{30}$  представляет собой H и  $R^{31}$  выбран из OH,  $OR^A$  и  $SO_2M$ .

2. Конъюгат по п. 1, причем конъюгат не является:

Конъюгатом А

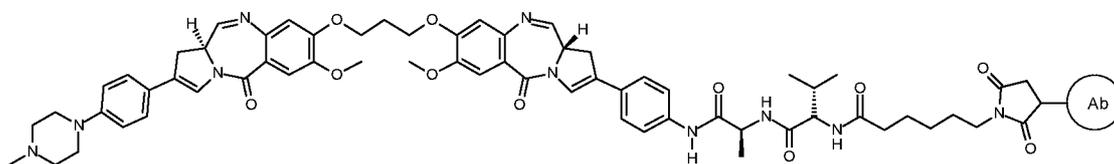


5

ConjA

;

Конъюгатом

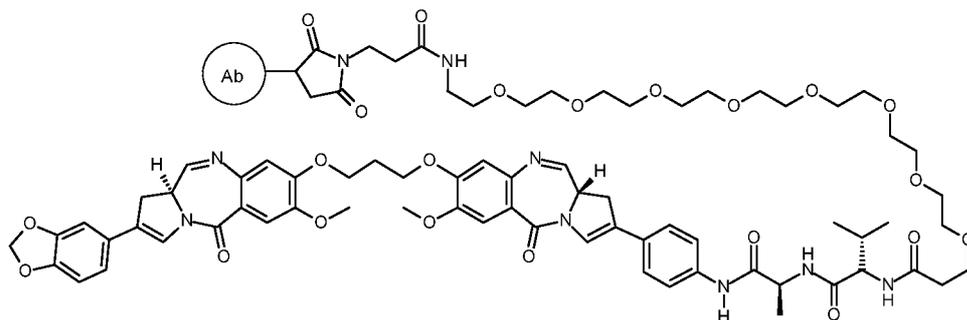


B

ConjB

;

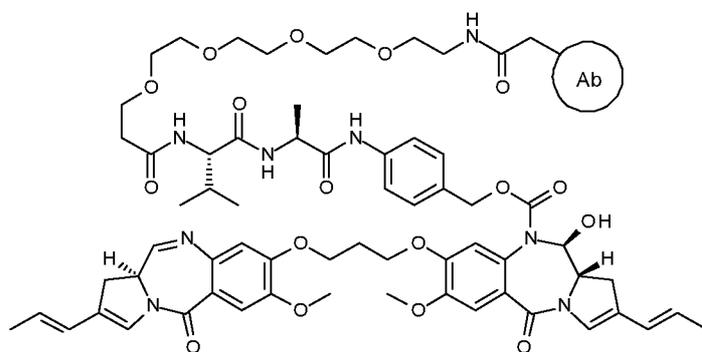
Конъюгатом С:



ConjC

;

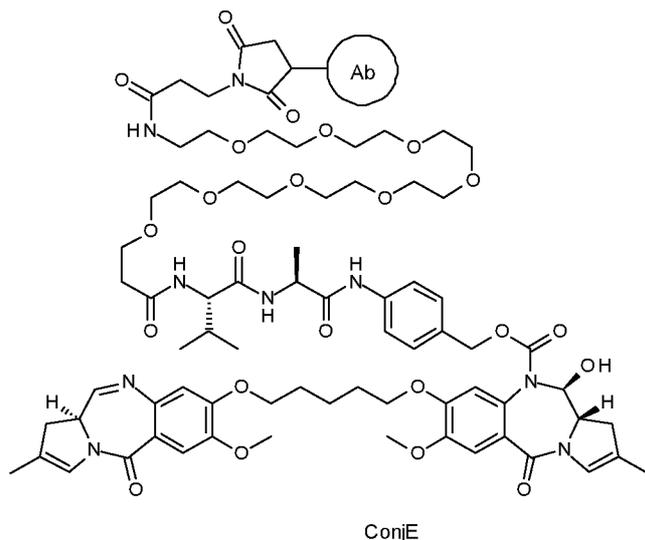
10 Конъюгатом D



ConjD

; или

Конъюгатом E:



3. Конъюгат по любому из п. 1 или п. 2, в котором  $R^7$  выбран из H, OH и OR.
- 5 4. Конъюгат по п. 3, в котором  $R^7$  представляет собой  $C_{1-4}$  алкилокси группу.
5. Конъюгат по любому из пп. 1-4, в котором Y представляет собой O.
6. Конъюгат по любому из предшествующих пунктов, в котором  $R^{11}$  представляет собой  $C_{3-7}$  алкилен.
- 10 7. Конъюгат по любому из пп. 1-6, в котором  $R^9$  представляет собой H.
8. Конъюгат по любому из пп. 1-7, в котором  $R^6$  выбран из H и галогена.
- 15 9. Конъюгат по любому из пп. 1-8, в котором между  $C2'$  и  $C3'$  присутствует двойная связь, и  $R^{12}$  представляет собой  $C_{5-7}$  арильную группу.
10. Конъюгат по п. 9, в котором  $R^{12}$  представляет собой фенил.
- 20 11. Конъюгат по любому из пп. 1-8, в котором между  $C2'$  и  $C3'$  присутствует двойная связь, и  $R^{12}$  представляет собой  $C_{8-10}$  арильную группу.
12. Конъюгат по любому из пп. 9-11, в котором  $R^{12}$  имеет от одной до трех групп заместителей.
- 25 13. Конъюгат по любому из пп. 9-12, в котором заместители выбраны из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-окси-метилена, метил-пиперазина, морфолино и метил-тиофенила.
14. Конъюгат по любому из пп. 1-8, в котором между  $C2'$  и  $C3'$  присутствует двойная связь, и  $R^{12}$  представляет собой  $C_{1-5}$  насыщенную алифатическую алкильную группу.

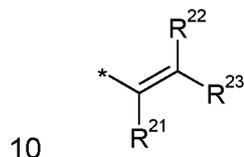
15. Соединение по п. 16, в котором  $R^{12}$  представляет собой метил, этил или пропил.

16. Конъюгат по любому из пп. 1-8, в котором между  $C2'$  и  $C3'$  присутствует двойная связь, и  $R^{12}$  представляет собой  $C_{3-6}$  насыщенную циклоалкильную группу.

5

17. Конъюгат по п. 16, в котором  $R^{12}$  представляет собой циклопропил.

18. Конъюгат по любому из пп. 1-8, в котором между  $C2'$  и  $C3'$  присутствует двойная связь, и  $R^{12}$  представляет собой группу формулы:



19. Конъюгат по п. 18, в котором общее количество атомов углерода в группе  $R^{12}$  составляет не более 4.

20. Конъюгат по п. 19, в котором общее количество атомов углерода в группе  $R^{12}$  составляет не более 3.

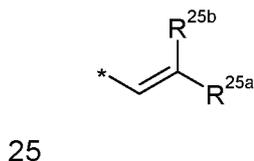
15

21. Конъюгат по любому из пп. 18-20, в котором один из  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  и  $R^{23}$  представляет собой H, а две другие группы выбраны из H,  $C_{1-3}$  насыщенного алкила,  $C_{2-3}$  алкенила,  $C_{2-3}$  алкинила и циклопропила.

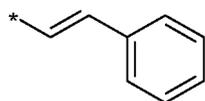
22. Конъюгат по любому из пп. 18-20, в котором два из  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  и  $R^{23}$  представляют собой H, а другая группа выбрана из H,  $C_{1-3}$  насыщенного алкила,  $C_{2-3}$  алкенила,  $C_{2-3}$  алкинила и циклопропила.

20

23. Конъюгат по любому из пп. 1-8, в котором между  $C2'$  и  $C3'$  присутствует двойная связь, и  $R^{12}$  представляет собой группу формулы:

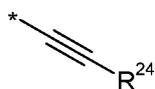


24. Конъюгат по п. 23, в котором  $R^{12}$  представляет собой группу:



25. Конъюгат по любому из пп. 1-8, в котором между  $C2'$  и  $C3'$  присутствует двойная связь, и  $R^{12}$  представляет собой группу формулы:

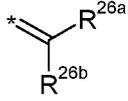
30



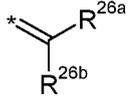
26. Конъюгат по п. 25, в котором  $R^{24}$  выбран из H, метил, этила, этенила и этинила.

27. Конъюгат по п. 26, в котором  $R^{24}$  выбран из Н и метила.

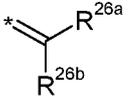
28. Конъюгат по любому из пп. 1-8, в котором между  $C2'$  и  $C3'$  присутствует одинарная связь,  $R^{12}$

5 представляет собой , и  $R^{26a}$  и  $R^{26b}$  оба представляют собой Н.

29. Конъюгат по любому из пп. 1-8, в котором между  $C2'$  и  $C3'$  присутствует одинарная связь,  $R^{12}$

представляет собой , и  $R^{26a}$  и  $R^{26b}$  оба представляют собой метил.

10 30. Конъюгат по любому из пп. 1-8, в котором между  $C2'$  и  $C3'$  присутствует одинарная связь,  $R^{12}$

представляет собой , один из  $R^{26a}$  и  $R^{26b}$  представляет собой Н, и другой выбран из  $C_{1-4}$  насыщенного алкила,  $C_{2-3}$  алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены.

[Формула I]

15 31. Конъюгат по любому из пп. 1-30, в котором между  $C2$  и  $C3$  присутствует двойная связь, и  $R^2$  представляет собой  $C_{5-7}$  арильную группу.

32. Конъюгат по п. 31, в котором  $R^2$  представляет собой фенил.

20 33. Конъюгат по любому из пп. 1-30, в котором между  $C2$  и  $C3$  присутствует двойная связь, и  $R^1$  представляет собой  $C_{8-10}$  арильную группу.

34. Соединение по любому из пп. 31-33, в котором  $R^2$  имеет от одной до трех групп заместителей.

25 35. Конъюгат по любому из пп. 31-34, в котором заместители выбраны из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-окси-метилена, метил-пиперазина, морфолино и метил-тиофенила.

36. Конъюгат по любому из пп. 1-30, в котором между  $C2$  и  $C3$  присутствует двойная связь, и  $R^2$  представляет собой  $C_{1-5}$  насыщенную алифатическую алкильную группу.

30

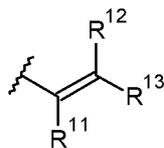
37. Конъюгат по п. 36, в котором  $R^2$  представляет собой метил, этил или пропил.

38. Конъюгат по любому из пп. 1-30, в котором между  $C2$  и  $C3$  присутствует двойная связь, и  $R^2$  представляет собой  $C_{3-6}$  насыщенную циклоалкильную группу.

35

39. Конъюгат по п. 38, в котором  $R^2$  представляет собой циклопропил.

40. Конъюгат по любому из пп. 1-30, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R<sup>2</sup> представляет собой группу формулы:



5

41. Конъюгат по п. 40, в котором общее количество атомов углерода в группе R<sup>2</sup> составляет не более 4.

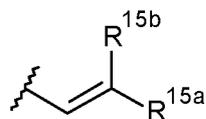
42. Конъюгат по п. 41, в котором общее количество атомов углерода в группе R<sup>2</sup> составляет не более 3.

10 43. Конъюгат по любому из пп. 40-42, в котором один из R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> и R<sup>13</sup> представляет собой H, а две другие группы выбраны из H, C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, C<sub>2-3</sub> алкинила и циклопропила.

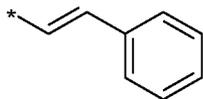
44. Конъюгат по любому из пп. 40-42, в котором два из R<sup>11</sup>, R<sup>12</sup> и R<sup>13</sup> представляют собой H, а другая группа выбрана из H, C<sub>1-3</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, C<sub>2-3</sub> алкинила и циклопропила.

15

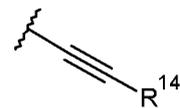
45. Конъюгат по любому из пп. 1-30, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R<sup>2</sup> представляет собой группу формулы:



20 46. Конъюгат по п. 45, в котором R<sup>2</sup> представляет собой группу:



47. Конъюгат по любому из пп. 1-30, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R<sup>2</sup> представляет собой группу формулы:



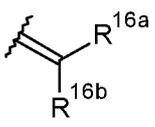
25

48. Конъюгат по п. 48, в котором R<sup>14</sup> выбран из H, метил, этила, этенила и этинила.

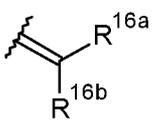
49. Конъюгат по п. 48, в котором R<sup>14</sup> выбран из H и метила.

30

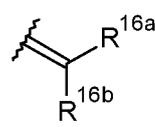
50. Конъюгат по любому из пп. 1-30, в котором между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R<sup>2</sup>

представляет собой , и R<sup>16a</sup> и R<sup>16b</sup> оба представляют собой H.

51. Конъюгат по любому из пп. 1-30, в котором между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R<sup>2</sup>

5 представляет собой , и R<sup>16a</sup> и R<sup>16b</sup> оба представляют собой метил.

52. Конъюгат по любому из пп. 1-30, в котором между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R<sup>2</sup>

10 представляет собой , один из R<sup>16a</sup> и R<sup>16b</sup> представляет собой H, и другой выбран из C<sub>1-4</sub> насыщенного алкила, C<sub>2-3</sub> алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены.

53. Конъюгат по любому из пп. 1-52, в котором R<sup>11a</sup> представляет собой OH.

54. Конъюгат по любому из пп. 1-53, в котором R<sup>21</sup> представляет собой OH.

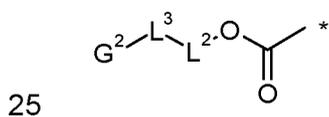
15 55. Конъюгат по любому из пп. 1-53, в котором R<sup>21</sup> представляет собой OMe.

56. Конъюгат по любому из пп. 1-55, в котором R<sup>20</sup> представляет собой H.

57. Конъюгат по любому из пп. 1-55, в котором R<sup>20</sup> представляет собой R<sup>C</sup>.

20 58. Конъюгат по п. 57, где R<sup>C</sup> выбран из группы, состоящей из: Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Psec, Cbz и PNZ.

60. Конъюгат по п. 57, в котором R<sup>C</sup> представляет собой группу:



где звездочка указывает точку присоединения к положению N10, G<sup>2</sup> представляет собой концевую группу, L<sup>3</sup> представляет собой ковалентную связь или отщепляемый линкер L<sup>1</sup>, L<sup>2</sup> представляет собой ковалентную связь или вместе с OC(=O) образует саморасщепляющийся линкер.

30 61. Конъюгат по п. 60, в котором G<sup>2</sup> представляет собой Ac или Moc, или выбран из группы, состоящей из: Alloc, Fmoc, Boc, Troc, Teoc, Psec, Cbz и PNZ.

62. Конъюгат по любому из пп. 1-53, в котором  $R^{20}$  и  $R^{21}$  вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны.

[Формула II]

- 5 63. Конъюгат по любому из пп. 1-30, в котором  $R^{22}$  имеет формулу IIIа, и А представляет собой фенил.
64. Конъюгат по любому из пп. 1-30 и п. 63, в котором  $R^{22}$  имеет формулу IIIа, и  $Q^1$  представляет собой одинарную связь.
- 10 65. Конъюгат по п. 63, в котором  $Q^2$  представляет собой одинарную связь.
66. Конъюгат по п. 63, в котором  $Q^2$  представляет собой  $-Z-(CH_2)_n-$ , Z представляет собой O или S, и n равен 1 или 2.
- 15 67. Конъюгат по любому из пп. 1-30 и п. 63, в котором  $R^{22}$  имеет формулу IIIа, и  $Q^1$  представляет собой  $-CH=CH-$ .
68. Конъюгат по любому из пп. 1-30, в котором  $R^{22}$  имеет формулу IIIб, и  $R^{C1}$ ,  $R^{C2}$  и  $R^{C3}$  независимо выбраны из H и метила.
- 20 69. Конъюгат по п. 68, в котором  $R^{C1}$ ,  $R^{C2}$  и  $R^{C3}$  представляют собой H.
70. Конъюгат по п. 68, в котором  $R^{C1}$ ,  $R^{C2}$  и  $R^{C3}$  все представляют собой метил.
- 25 71. Конъюгат по любому из пп. 1-30 и пп. 63-70, в котором  $R^{22}$  имеет формулу IIIа или формулу IIIб, и X выбран из  $O-R^{L2'}$ ,  $S-R^{L2'}$ ,  $CO_2-R^{L2'}$ ,  $-N-C(=O)-R^{L2'}$  и  $NH-R^{L2'}$ .
72. Конъюгат по п. 71, в котором X представляет собой  $NH-R^{L2'}$ .
- 30 73. Конъюгат по любому из пп. 1-30, в котором  $R^{22}$  имеет формулу IIIс, и Q представляет собой  $NR^N-R^{L2'}$ .
74. Конъюгат по п. 73, в котором  $R^N$  представляет собой H или метил.
- 35 75. Конъюгат по любому из пп. 1-30, в котором  $R^{22}$  имеет формулу IIIс, и Q представляет собой  $O-R^{L2'}$  или  $S-R^{L2'}$ .
76. Конъюгат по любому из пп. 1-30 и пп. 63-75, в котором  $R^{11}$  представляет собой OH.
- 40 77. Конъюгат по любому из пп. 1-30 и пп. 63-75, в котором  $R^{11}$  представляет собой OMe.

78. Конъюгат по любому из пп. 1-30 и пп. 63-77, в котором  $R^{10}$  представляет собой Н.

79. Конъюгат по любому из пп. 1-30 и пп. 63-75, в котором  $R^{10}$  и  $R^{11}$  вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны.

5

80. Конъюгат по любому из пп. 1-30 и пп. 63-79, в котором  $R^{31}$  представляет собой ОН.

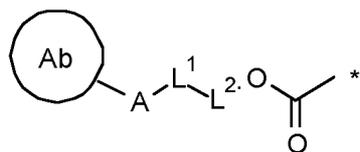
81. Конъюгат по любому из пп. 1-30 и пп. 63-79, в котором  $R^{31}$  представляет собой ОМе.

10 82. Конъюгат по любому из пп. 1-30 и пп. 63-81, в котором  $R^{30}$  представляет собой Н.

83. Конъюгат по любому из пп. 1-30 и пп. 63-79, в котором  $R^{30}$  и  $R^{31}$  вместе образуют двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны.

15 84. Конъюгат по любому из пп. 1-83, в котором  $R^{6'}$ ,  $R^{7'}$ ,  $R^{9'}$  и  $Y'$  являются одинаковыми с  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^9$  и  $Y$ .

85. Конъюгат по любому из пп. 1-84 в котором  $L-R^{L1'}$  или  $L-R^{L2'}$  представляет собой группу:



20 где звездочка обозначает место присоединения к положению ПБД. Ab представляет собой антитело,  $L^1$  отщепляемый линкер, A представляет собой соединяющую группу соединяющую  $L^1$  с антителом,  $L^2$  представляет собой ковалентную связь или вместе с  $OC(=O)$  образует саморасщепляющийся линкер.

86. Конъюгат по п. 85, в котором  $L^1$  является фермент-отщепляемым.

25 87. Конъюгат по пп. 85 или 86, в котором  $L^1$  содержит непрерывную последовательность из аминокислот.

88. Конъюгат по п. 87, в котором  $L^1$  содержит дипептид и группу  $-X_1-X_2-$  в дипептиде, причем  $-NH-X_1-X_2-CO-$  выбрана из:

- 30
- Phe-Lys-,
  - Val-Ala-,
  - Val-Lys-,
  - Ala-Lys-,
  - Val-Cit-,
  - Phe-Cit-,

35

  - Leu-Cit-,
  - Ile-Cit-,
  - Phe-Arg-,
  - Trp-Cit-.

89. Конъюгат по п. 88, в котором группа  $-X_1-X_2-$  в дипептиде  $-NH-X_1-X_2-CO-$  выбрана из:  
 -Phe-Lys-,  
 -Val-Ala-,  
 5 -Val-Lys-,  
 -Ala-Lys-,  
 -Val-Cit-.

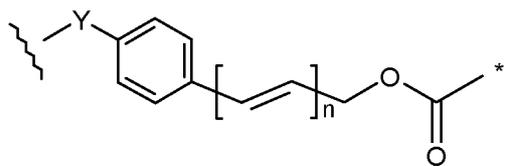
90. Конъюгат по п. 89, в котором группа  $-X_1-X_2-$  в дипептиде  $-NH-X_1-X_2-CO-$  представляет собой -Phe-  
 10 Lys-, -Val-Ala- или -Val-Cit-.

91. Конъюгат по любому из пп. 88-90, в котором группа  $X_2-CO-$  соединена с  $L^2$ .

92. Конъюгат по любому из пп. 88-91, в котором группа  $NH-X_1-$  соединена с А.  
 15

93. Конъюгат по любому из пп. 88-92, в котором  $L^2$  вместе с  $OC(=O)$  образует саморасщепляющийся линкер.

94. Конъюгат по п. 93, в котором  $C(=O)O$  и  $L^2$  вместе образуют группу:

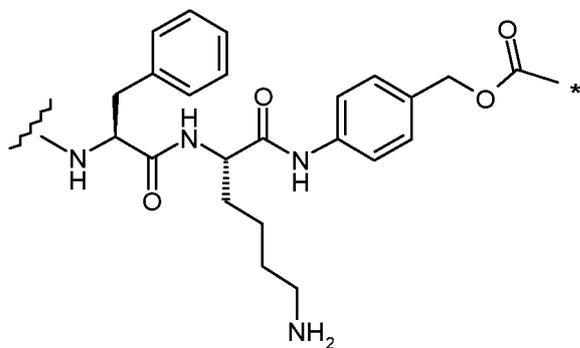


- 20 где звездочка обозначает место присоединения к ПБД, волнистая линия обозначает место присоединения к линкеру  $L^1$ , Y представляет собой NH, O,  $C(=O)NH$  или  $C(=O)O$ , и n равен 0-3.

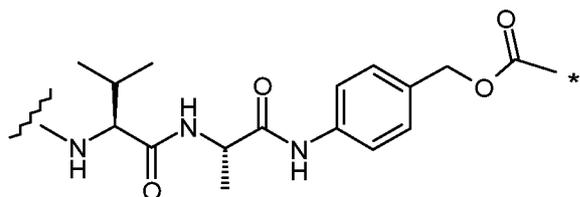
95. Конъюгат по п. 94, в котором Y представляет собой NH.

- 25 96. Конъюгат по п. 94 или п. 95, в котором n равен 0.

97. Конъюгат по п. 95, в котором  $L^1$  и  $L^2$  вместе с  $-OC(=O)-$  составляют группу, выбранную из:



или



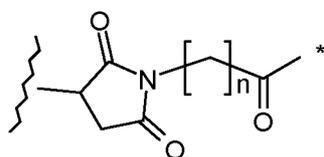
где звездочка обозначает место присоединения к ПБД, и волнистая линия обозначает место присоединения к оставшейся части линкера  $L^1$  или точку присоединения к А.

5

98. Конъюгат по п. 97, в котором волнистая линия обозначает место присоединения к А.

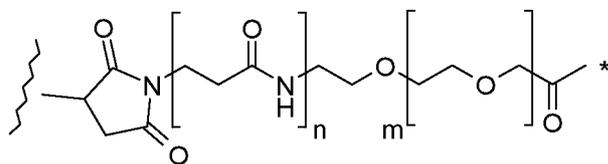
99. Конъюгат по любому из пп. 85-98, в котором А представляет собой:

10 (i)



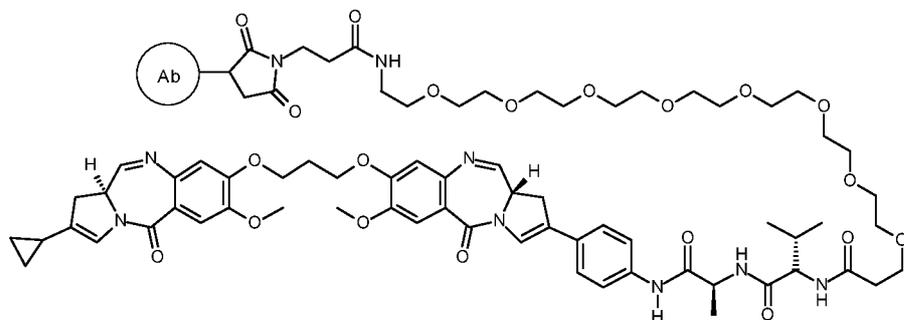
где звездочка обозначает место присоединения к  $L^1$ , волнистая линия обозначает место присоединения к антителу, и  $n$  равен 0-6; или

15 (ii)



где звездочка обозначает место присоединения к  $L^1$ , волнистая линия обозначает место присоединения к антителу,  $n$  равен 0 или 1, и  $m$  равен 0-30.

20 100. Конъюгат по п. 1, имеющий формулу Конъюгата А:



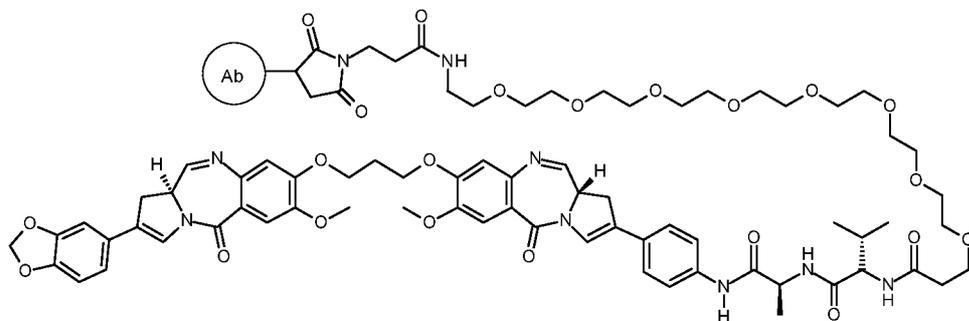
ConjA

Конъюгата В:



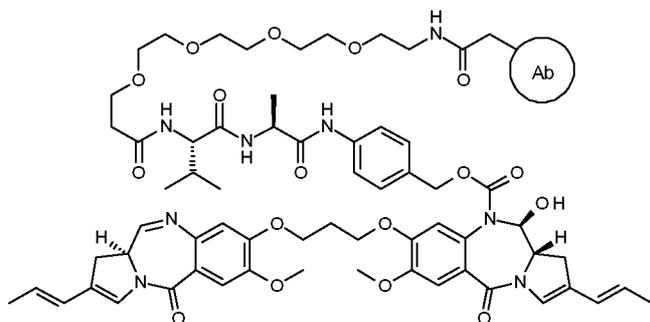
ConjB

Конъюгата С:



ConjC

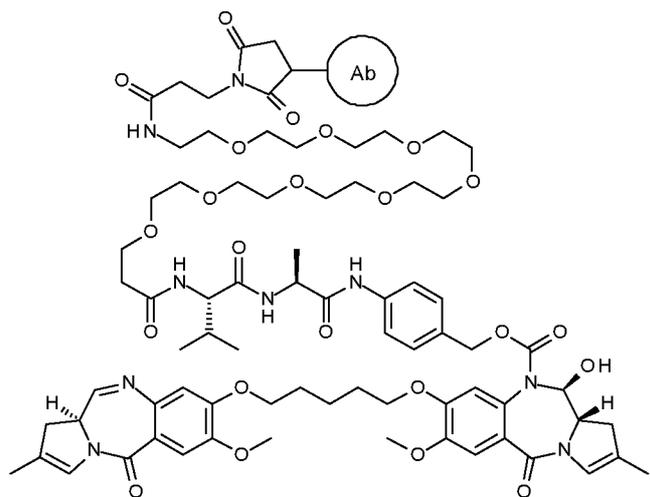
Конъюгата D:



ConjD

5

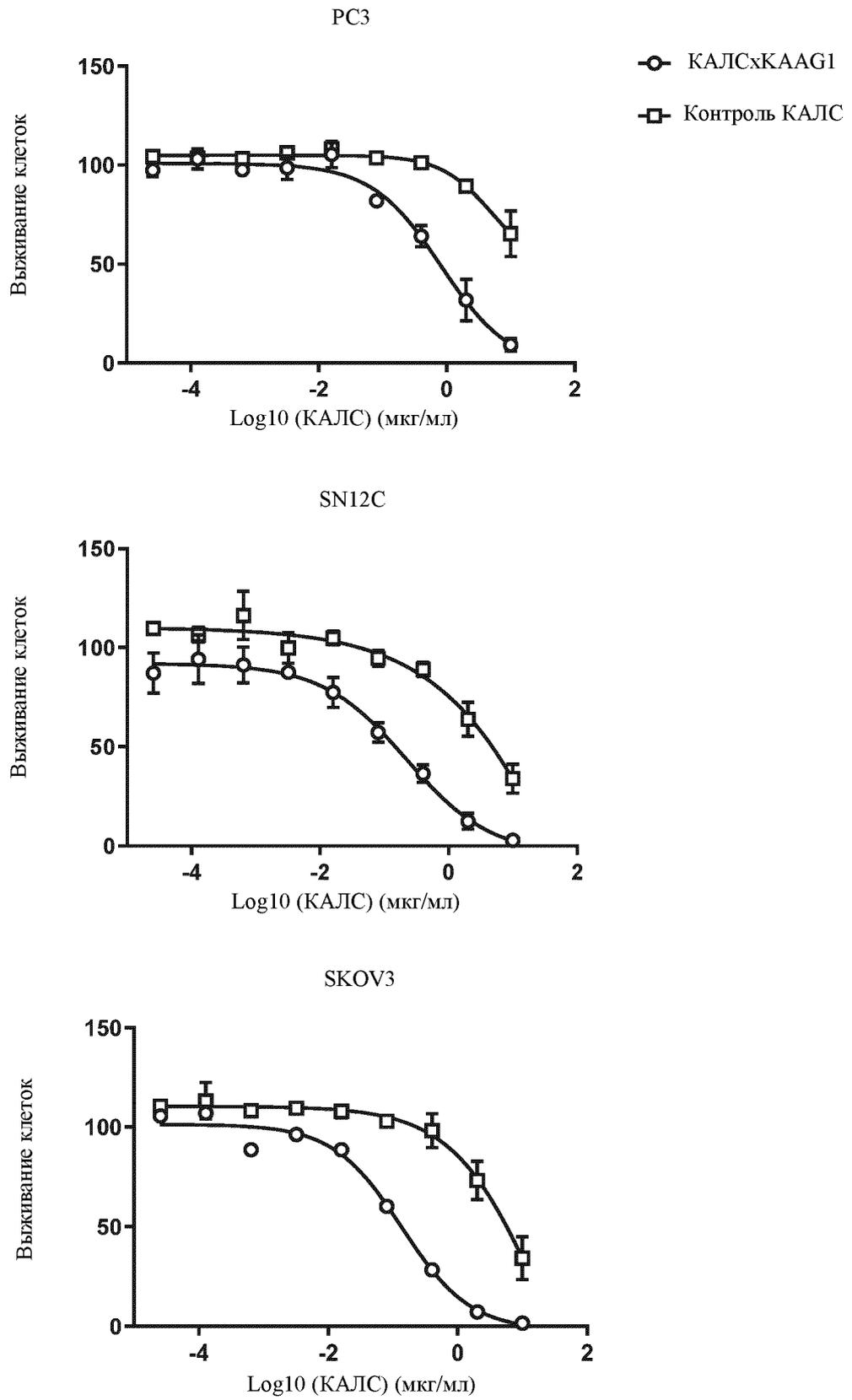
Или Конъюгата E:



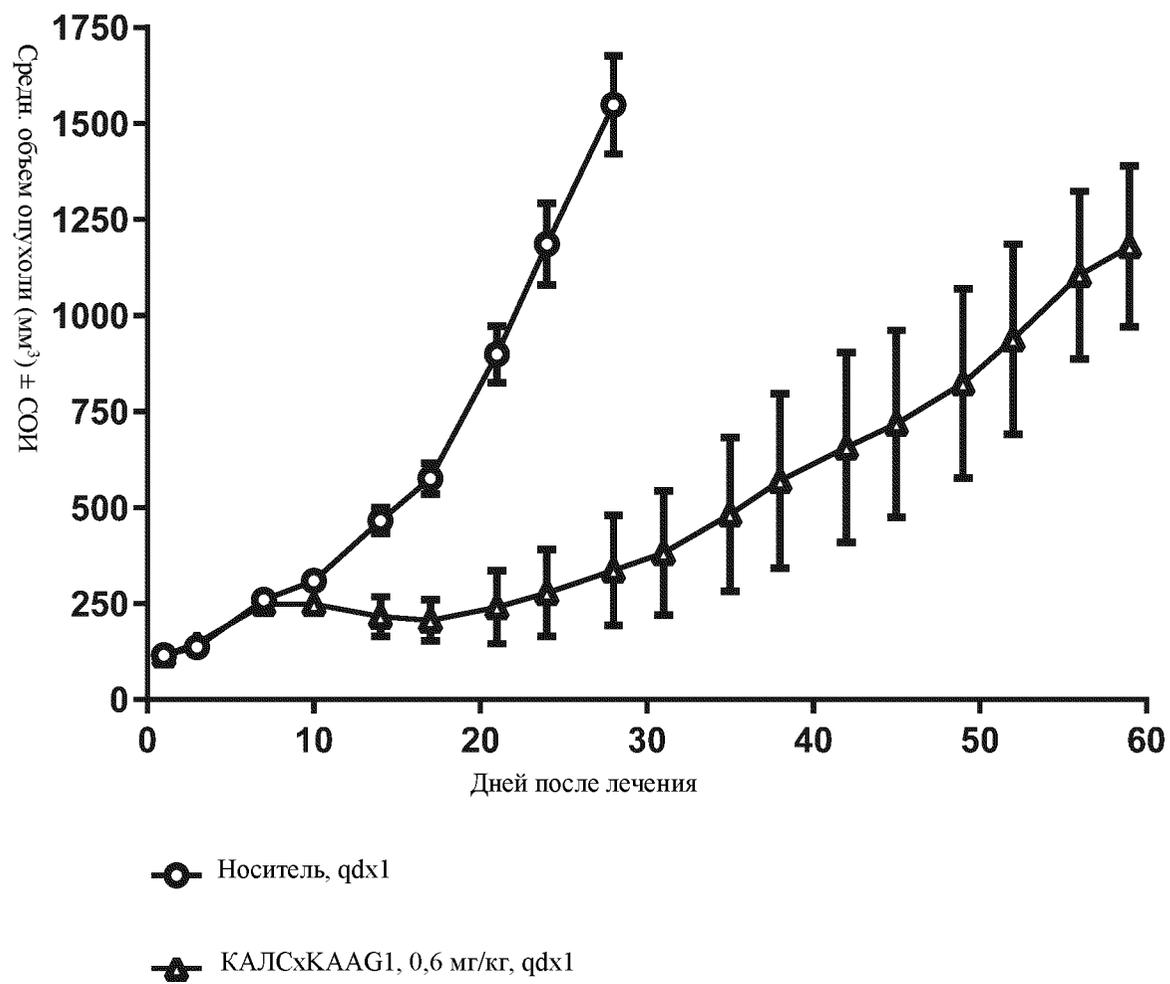
ConjE

101. Конъюгат по любому из пп. 1-100, в котором антитело содержит домен VH, содержащий CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:6, и CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:7;  
где необязательно домен VH имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 1.
- 5
102. Конъюгат по любому из пп. 1-101, в котором антитело содержит:  
домен VL, содержащий CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:8, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:9, и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:10.
- 10
103. Конъюгат по любому из пп. 1-102, в котором антитело содержит домен VL, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:13 или SEQ ID NO:15.
104. Конъюгат по любому из пп. 1-102, в котором антитело содержит домен VL, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 2.
- 15
105. Конъюгат по любому из пп. 1-104, в котором антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 3.
- 20
106. Конъюгат по любому из пп. 1-104, в котором антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 11.
107. Конъюгат по любому из пп. 1-106, в котором антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:16.
- 25
108. Конъюгат по любому из пп. 1-106, в котором антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO: 4.
109. Конъюгат по любому из пп. 1-108, в котором антитело представляет собой интактное антитело.
- 30
110. Конъюгат по любому из пп. 1-109, в котором антитело является гуманизированным, деиммунизированным или антителом с измененной поверхностью.
111. Конъюгат по любому из пп. 1-108, в котором антитело представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG1, предпочтительно IgG1,к.
- 35
112. Конъюгат по любому из пп. 1-111, в котором нагрузка (p) лекарственного средства (D) на антитело (Ab) равна целому числу от 1 до около 8.
- 40
113. Конъюгат по п. 112, в котором p равна 1, 2, 3 или 4.

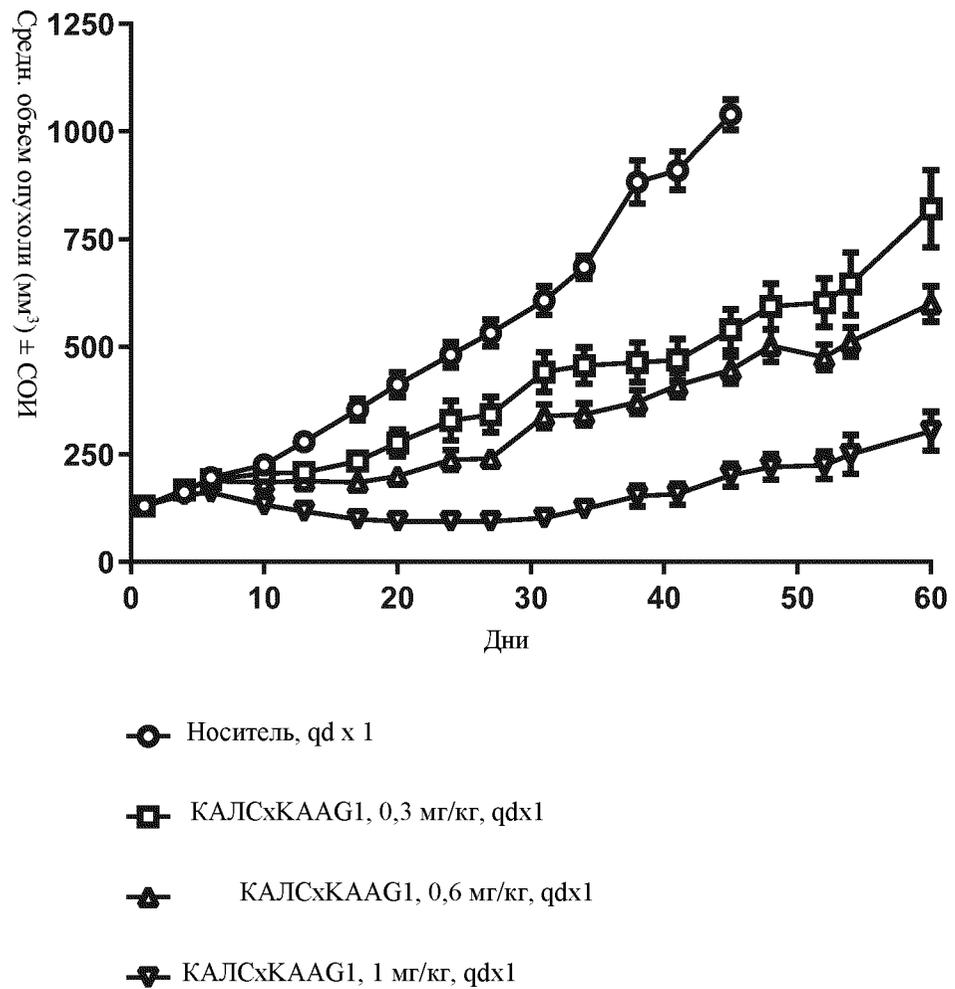
114. Конъюгат по п. 112, содержащий смесь соединений конъюгата антитело-лекарственное средство, причем средняя нагрузка лекарственного средства на антитело в смеси соединений конъюгата антитело-лекарственное средство равна от около 2 до около 5.
- 5 115. Конъюгат по любому из пп. 1-114, для применения в терапии.
116. Конъюгат по любому из пп. 1-114 для применения при лечении пролиферативного заболевания у субъекта.
- 10 117. Конъюгат по п. 116, причем заболевание представляет собой онкологическое заболевание.
118. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп. 1-114 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или наполнитель.
- 15 119. Фармацевтическая композиция по п. 118, дополнительно содержащая терапевтически эффективное количество химиотерапевтического агента.
120. Применение конъюгата по любому из пп. 1-114 при приготовлении лекарства для применения при лечении пролиферативного заболевания у субъекта.
- 20 121. Способ лечения онкологического заболевания, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п. 118.
122. Способ по п. 121, в котором пациенту вводят химиотерапевтическое средство в комбинации с
- 25 данным конъюгатом.



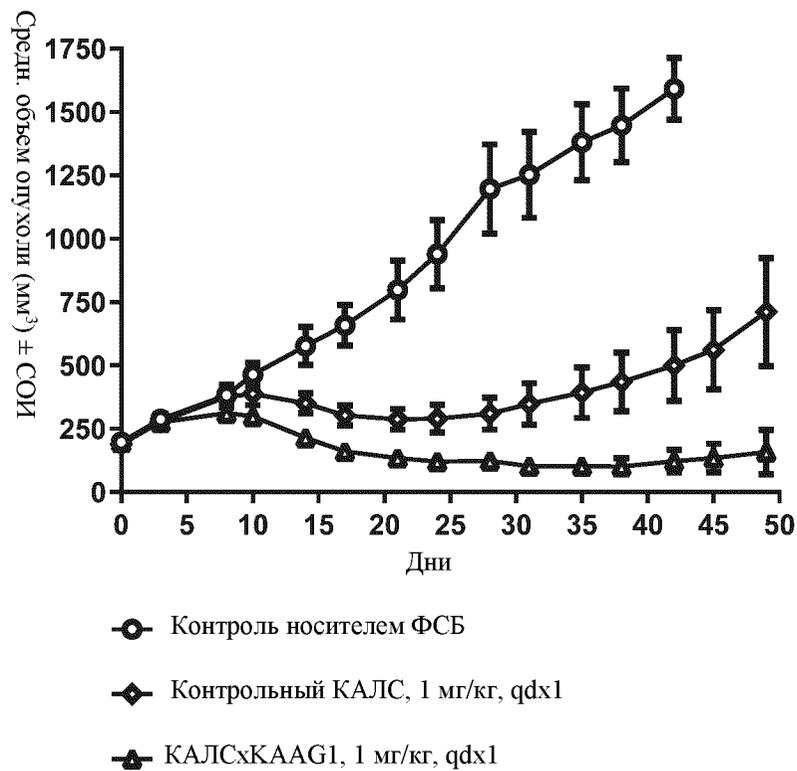
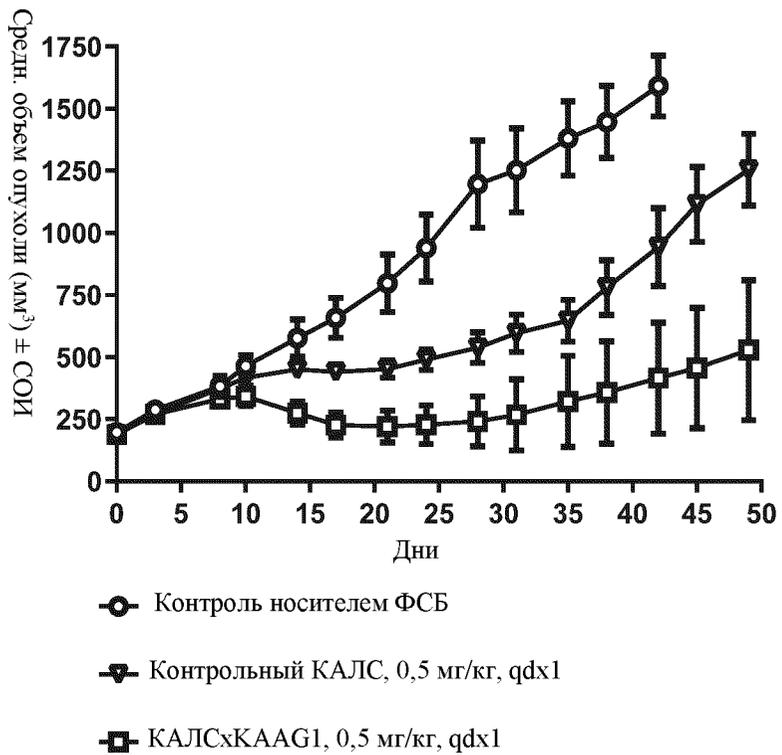
Фиг. 1



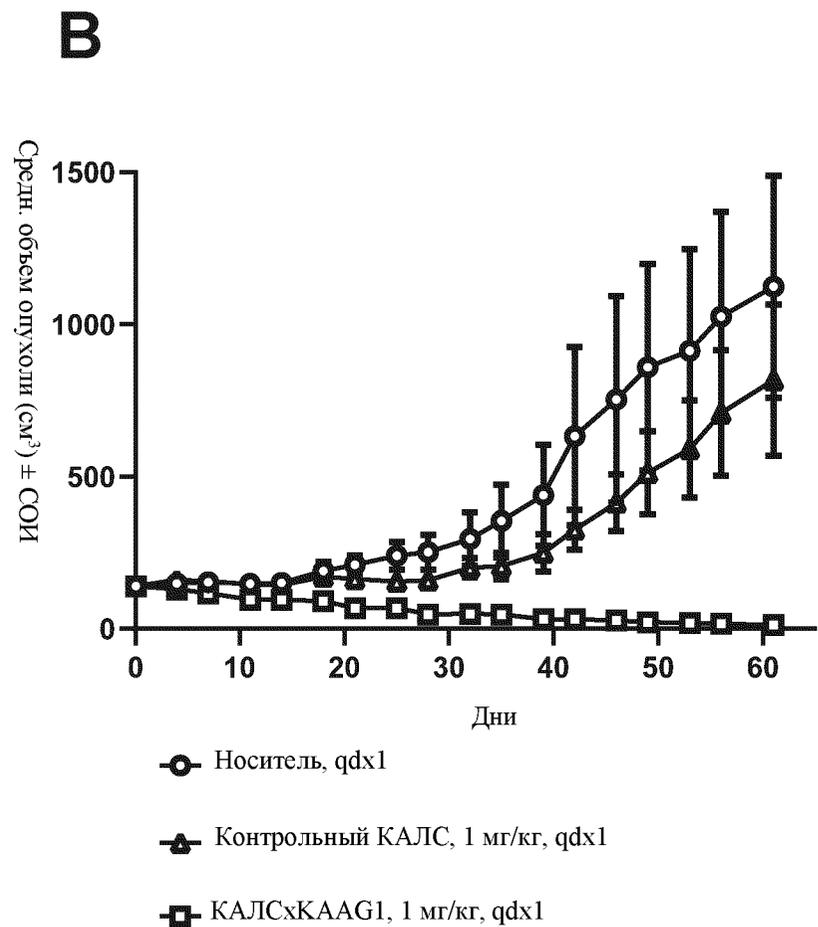
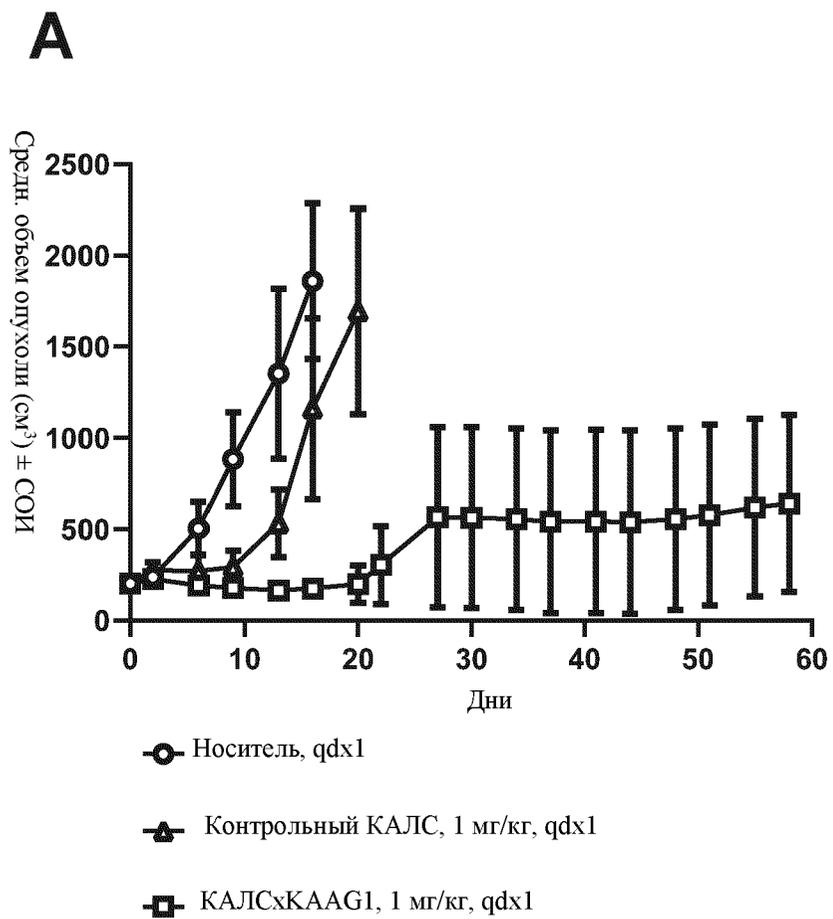
Фиг. 2



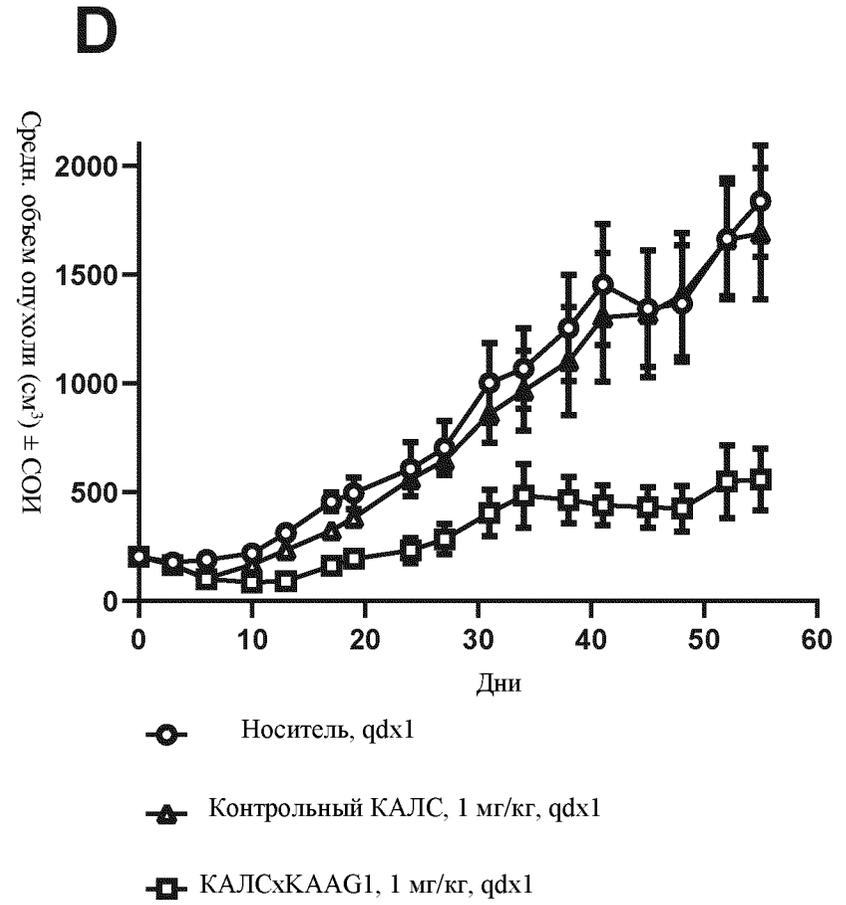
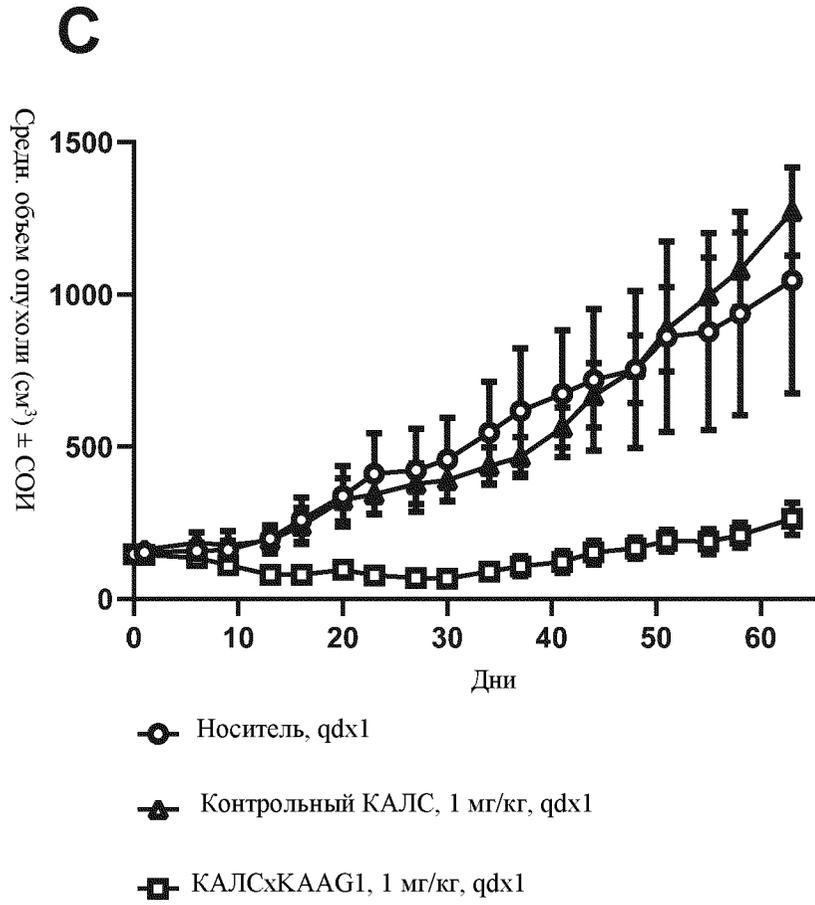
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 5