

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090148 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.08

(51) Int. Cl. C07D 487/04 (2006.01)
A61K 31/5517 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.08.17

(54) ПИРРОЛОБЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫЕ КОНЬЮГАТЫ

(31) 62/547,303

(32) 2017.08.18

(33) US

(86) PCT/EP2018/072298

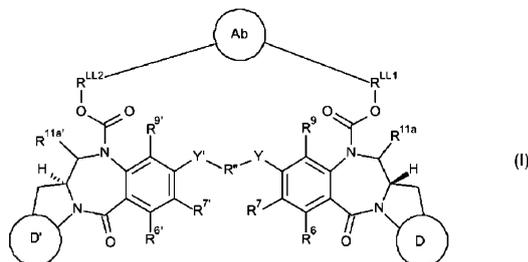
(87) WO 2019/034764 2019.02.21

(71) Заявитель:
МЕДИМЬЮН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Димази Нацарено (US), Ховард
Филип Уилсон, Мастерсон
Люк, Тибергьен Арно Шарль,
Виджаякришнан Балакумар (GB),
Уайт Джейсон (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Представлен конъюгат формулы (I)



где Ab представляет собой модифицированное антитело, содержащее по меньшей мере один свободный сайт конъюгации в каждой тяжелой цепи.

202090148 A1

202090148 A1

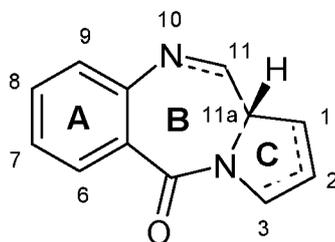
ПИРРОЛОБЕНЗОДИАЗЕПИНОВЫЕ КОНЪЮГАТЫ

Данное изобретение относится к конъюгатам, содержащим пирролобензодиазепины и родственные димеры (PBD) и линкеры предшественника лекарственного соединения, используемые для получения таких конъюгатов.

Уровень техники

Некоторые пирролобензодиазепины (PBD) обладают способностью распознавать и связываться с определенными последовательностями ДНК; предпочтительной последовательностью является PuGpu.

- 10 Первый PBD противоопухолевый антибиотик, антрамицин, 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 описано множество природных PBD и разработано более 10 синтетических способов получения различных аналогов (Thurston, *et al.*, *Chem. Rev.* **1994**, 433-465 (1994)). 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 (японский патент 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)), неотрамицины А и В (Takeuchi, *et al.*, *J. Antibiotics*, **29**, 93-96 (1976)), поротрамицин (Tsunakawa, *et al.*, *J. Antibiotics*, **41**, 1366-1373 (1988)), протракарин (Shimizu, *et al.*, *J. Antibiotics*, **29**, 2492-2503 (1982); Langley and Thurston, *J. Org. Chem.*, **52**, 91-97 (1987)), сибаномицин (DC-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)). PBD имеют общую структуру:

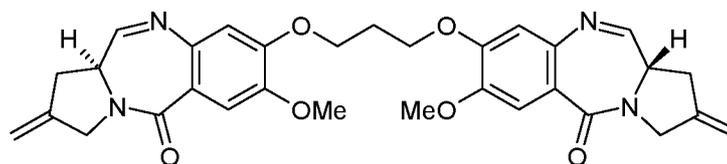


- 25 Они отличаются по количеству, типу и положению заместителей в ароматических кольцах А и пиррольных кольцах С, а также по степени насыщенности кольца С. В кольце В находится имин (N=C), карбиноламин (NH-CH(OH)) или метиловый эфир карбиноламина (NH-CH(OMe)) в положениях N10-C11, которые представляют собой электрофильный центр, отвечающий за алкилирование ДНК. Все известные природные продукты имеют (S)-конфигурацию в хиральном положении C11a, что обеспечивает их правостороннее скручивание, если смотреть с кольца С на кольцо А. Это придает им соответствующую трехмерную форму
- 30 для изоспиральности с малой бороздкой В-формы ДНК, что приводит к точному совпадению у сайта связывания (Kohn, In *Antibiotics III*. Springer-Verlag, Нью-Йорк, сс. 3-11 (1975); Hurley and Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.*, **19**, 230-237 (1986)). Их способность образовывать аддукт в малой бороздке обеспечивает возможность влиять на процессинг ДНК, вследствие чего их используют в качестве противоопухолевых агентов.

- 35 Ранее было описано, что биологическая активность указанных молекул может быть усилена посредством соединения двух звеньев PBD друг с другом через их C8/C'8-гидроксильные функциональные группы

посредством гибкого алкиленового линкера (Bose, D.S., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4939-4941 (1992); Thurston, D.E., *et al.*, *J. Org. Chem.*, **61**, 8141-8147 (1996)). Димеры PBD предположительно образуют последовательность-селективные повреждения ДНК, такие как палиндромная 5'-Pu-GATC-Py-3' межнитиевая поперечная сшивка (Smellie, M., *et al.*, *Biochemistry*, **42**, 8232-8239 (2003); Martin, C., *et al.*, *Biochemistry*, **44**, 4135-4147), которые предположительно несут главную ответственность за их биологическую активность.

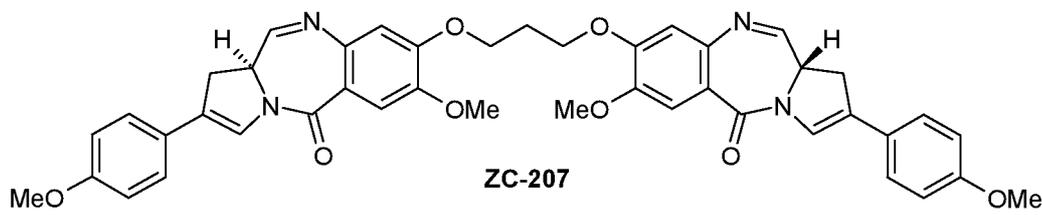
Одним из примеров димера PBD является SG2000 (SJG-136):



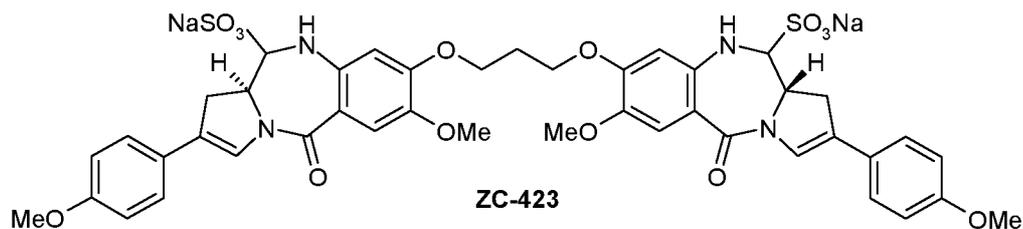
(Gregson, S., *et al.*, *J. Med. Chem.*, **44**, 737-748 (2001); Alley, M.C., *et al.*, *Cancer Research*, **64**, 6700-6706 (2004); Hartley, J.A., *et al.*, *Cancer Research*, **64**, 6693-6699 (2004)), который исследовали в клинических испытаниях в качестве отдельного агента, например, NCT02034227, изучая его применение при лечении острого миелоидного лейкоза и хронического лимфоцитарного лейкоза (см.: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02034227>).

15

Димерные PBD соединения, содержащие C2 арильные заместители, такие как SG2202 (ZC-207), описаны в WO 2005/085251:



и в WO2006/111759 описаны бисульфиты таких PBD соединений, например, SG2285 (ZC-423):



20

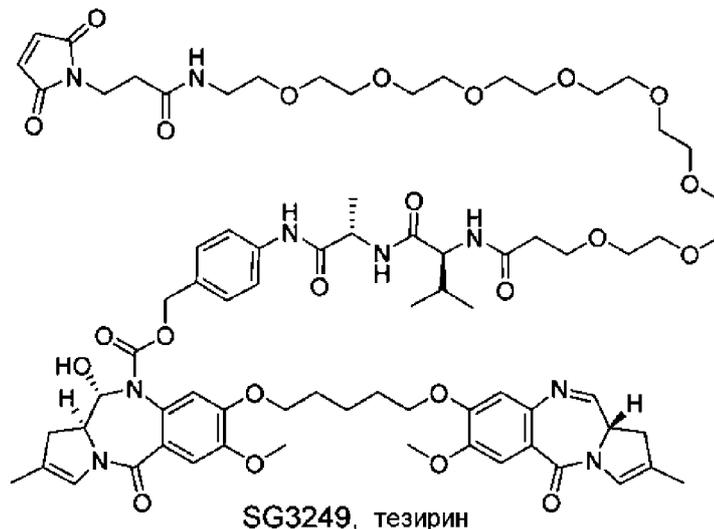
Было показано, что данные соединения являются весьма подходящими цитотоксическими агентами (Howard, P.W., *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* (2009), doi: 10.1016/j.bmcl.2009.09.012).

В WO 2007/085930 описано получение димерных соединений PBD, содержащих линкерные группы для связи с клеточно-связывающим агентом (СВА), таким как антитело. Указанный линкер находится в мостиковой связи мономерных звеньев PBD данного димера.

Димерные соединения PBD, содержащие линкерные группы для связывания с клеточно-связывающим агентом, таким как антитело, описаны в WO 2011/130598. Линкер в таких соединениях присоединен к одному из доступных положений N10, и обычно расщепляется под действием фермента на данную

линкерную группу. Если несвязанное положение N10 защищено кэп-группой, то иллюстративные кэп-группы имеют такой же триггер расщепления, как линкер, связанный с антителом.

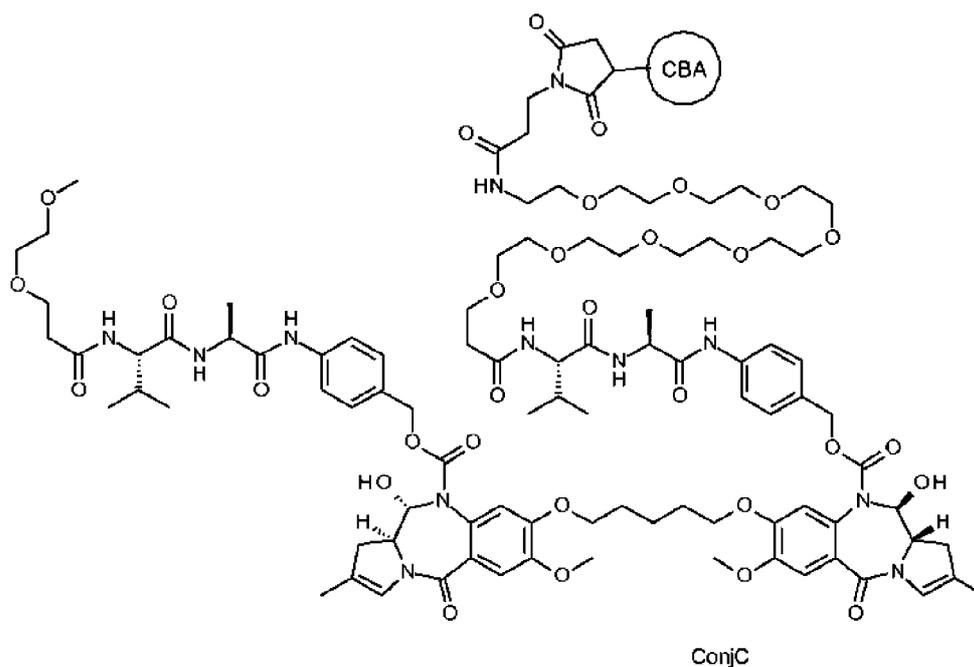
5 В WO 2014/057074 описаны два специфических димерных конъюгата PBD, связанных через положение N10 в одном мономере, причем другой мономер PBD находится в иминной форме. Один из описанных конъюгатов лекарственное соединение-линкер представляет собой SG3249, тезирин:



10 который, будучи конъюгирован с анти-DLL3 ровалпитузумабом, известен как ровалпитузумаб-тезирин (Rova-T), проходящий в настоящее время оценку при лечении мелкоклеточного рака легких (Tiberghien, A.C., *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2016, 7 (11), 983–987; DOI: 10.1021/acsmchemlett.6b00062).

15 Дополнительные конъюгаты указанного лекарственного соединения-линкера со сконструированной версией трастузумаба и гуманизированным антителом против человеческого CD19 также начали проходить испытания в начале 2017 года в компании ADC Therapeutics SA (рефераты №51 и №52 в публикации *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, том 58, апрель, 2017).

В WO 2015/052322 описан специфический димерный конъюгат PBD, связанный через положение N10 в одном мономере, причем другой мономер PBD находится в иминной форме. Описан также специфический димерный конъюгат PBD, связанный через положение N10 в одном мономере, причем другой мономер PBD содержит кэп-группу с таким же триггером расщепления, как линкер, связанный с антителом:



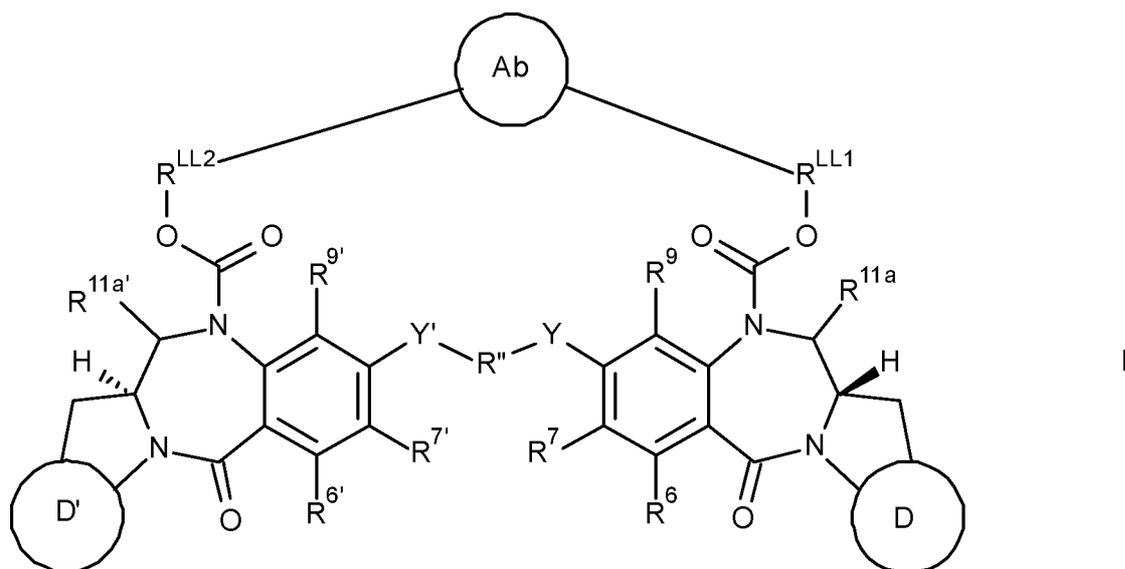
Сущность изобретения

5 В данном изобретении предложены PBD и родственные димерные конъюгаты PBD, в которых PBD конъюгированы с антителами, которые модифицированы так, что содержат по меньшей мере один свободный сайт конъюгации в каждой тяжелой цепи, и при этом конъюгация осуществлена через каждую группу N10 PBD через линкер.

10 Авторами настоящего изобретения обнаружено, что такие конъюгаты являются неожиданно эффективными, несмотря на предположение того, что невозможно связать один PBD или родственный димер с одним антителом через два линкера.

15 В данном изобретении также предложены PBD и родственные линкеры димерных лекарственных соединений, пригодные для конъюгации модифицированных антител, в которых обе группы N10 имеют линкерные группы.

В первом аспекте данного изобретения предложен конъюгат формулы I:



где

Ab представляет собой модифицированное антитело, содержащее по меньшей мере один свободный сайт конъюгации в каждой тяжелой цепи;

5 D означает группу D1 или D2:



D1

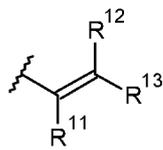
D2

;

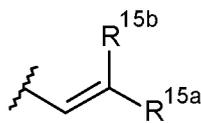
пунктирная линия означает необязательное наличие двойной связи между C2 и C3;

при наличии двойной связи между C2 и C3, R² выбран из группы, состоящей из:

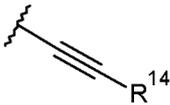
- 10 (ia) C₅₋₁₀ арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, содержащей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир, C₁₋₇ алкил, C₃₋₇ гетероцикл и бис-окси-C₁₋₃ алкилен;
- (ib) C₁₋₅ насыщенного алифатического алкила;
- (ic) C₃₋₆ насыщенного циклоалкила;

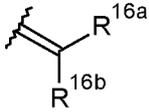


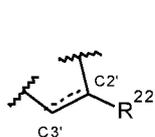
- 15 (id) , где каждый из R¹¹, R¹² и R¹³ независимо выбран из H, C₁₋₃ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, C₂₋₃ алкинила и циклопропила, и общее количество атомов углерода в группе R² составляет не более 5;



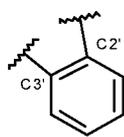
- (ie) , где один из R^{15a} и R^{15b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила метокси, пиридила; и тиофенила; и

(if)  , где R¹⁴ выбран из: C₁₋₃ насыщенного алкила; C₂₋₃ алкенила; C₂₋₃ алкинила; циклопропила; фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; при наличии одинарной связи между C2 и C3

5 R² выбран из H, OH, F, diF и  , где R^{16a} и R^{16b} независимо выбраны из H, F, C₁₋₄ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, причем указанные алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из C₁₋₄ алкиламида и сложного C₁₋₄ алкилового эфира; или, если один из R^{16a} и R^{16b} представляет собой H, то другой выбран из нитрила и сложного C₁₋₄ алкилового эфира; D' представляет собой группу D'1 или D'2:



D'1



D'2

10

где пунктирная линия означает необязательное наличие двойной связи между C2' и C3'; при наличии двойной связи между C2' и C3', R¹² выбран из группы, состоящей из:

(iia) C₅₋₁₀ арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, содержащей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир, C₁₋₇ алкил, C₃₋₇

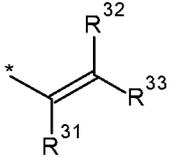
15

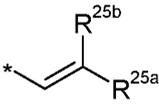
гетероцикл и бис-окси-C₁₋₃ алкилен;

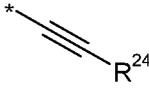
(iib) C₁₋₅ насыщенного алифатического алкила;

(iic) C₃₋₆ насыщенного циклоалкила;

20

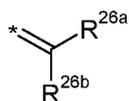
(iic)  , где каждый из R³¹, R³² и R³³ независимо выбран из H, C₁₋₃ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, C₂₋₃ алкинила и циклопропила, и общее количество атомов углерода в группе R¹² составляет не более 5;

(iie)  , где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила метокси; пиридила; и тиофенила; и

(iif)  , где R²⁴ выбран из: C₁₋₃ насыщенного алкила; C₂₋₃ алкенила; C₂₋₃ алкинила; циклопропила; фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила;

25

при наличии одинарной связи между C2' и C3',



R¹² выбран из H, OH, F, diF и $\begin{array}{c} \text{R}^{26a} \\ \diagdown \\ \text{C}^* \\ \diagup \\ \text{R}^{26b} \end{array}$, где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C₁₋₄ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, причем указанные алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из C₁₋₄ алкиламида и сложного C₁₋₄ алкилового эфира; или, если один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, то другой выбран из нитрила и сложного C₁₋₄ алкилового эфира;

5 R⁶ и R⁹ независимо выбраны из H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', нитро, Me₃Sn и галогена; где R и R' независимо выбраны из необязательно замещенных C₁₋₁₂ алкильных, C₃₋₂₀ гетероциклических и C₅₋₂₀ арильных групп;

R⁷ выбран из H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', нитро, Me₃Sn и галогена;

10 R'' представляет собой C₃₋₁₂ алкиленовую группу, цепь которой может прерываться одним или более гетероатомами, например, O, S, NR^{N2} (где R^{N2} представляет собой H или C₁₋₄ алкил), и/или ароматические кольца, например, бензол или пиридин;

Y и Y' выбраны из O, S или NH;

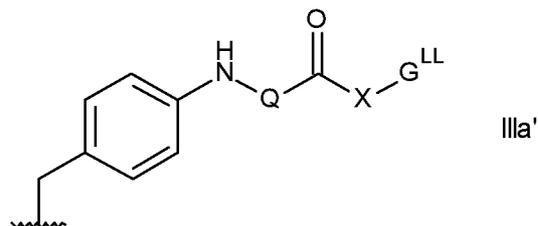
R^{11a} выбран из OH, OR^A, где R^A представляет собой C₁₋₄ алкил;

R^{6'}, R^{7'}, R^{9'} и R^{11a'} выбраны из таких же групп, как R⁶, R⁷, R⁹ и R^{11a}, соответственно;

15 и

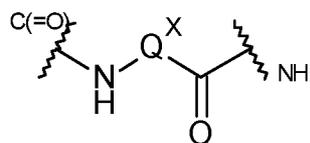
R^{LL1} и R^{LL2} представляют собой линкеры, связанные с антителом в разных сайтах, которые независимо выбраны из:

(iii):



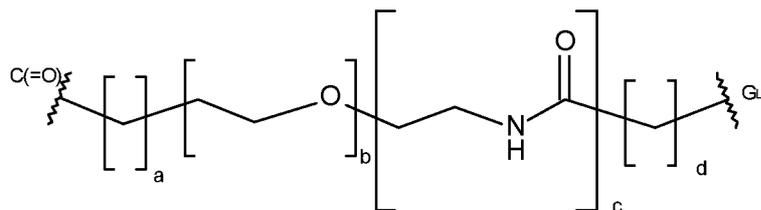
20 где

Q представляет собой:



, где Q^X является таким, что Q представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток или трипептидный остаток;

X представляет собой:

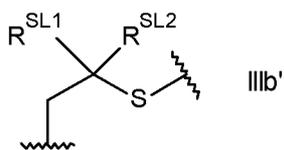


25

где a = 0 – 5, b = 0 – 16, c = 0 или 1, d = 0 – 5;

G^{LL} представляет собой линкер, связанный с антителом; и

(iiib):

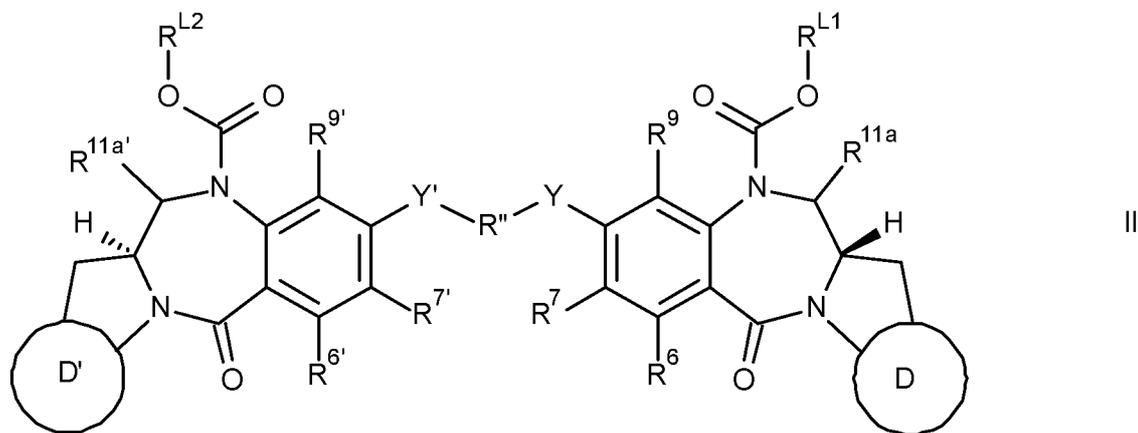


где R^{SL1} и R^{SL2} независимо выбраны из H и метила, или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу.

- 5 Следует понимать, что такие ADC, которые имеют эффективное отношение лекарственного средства к антителу (DAR), равное 1, могут обеспечивать существенное преимущество, включая сниженную нецелевую токсичность и расширенное терапевтическое окно благодаря уменьшению необходимой минимальной эффективной дозы, по сравнению с ADC, состоящими из гетерогенных смесей с более высоким значением DAR.

10

Второй аспект данного изобретения включает соединение формулы II:



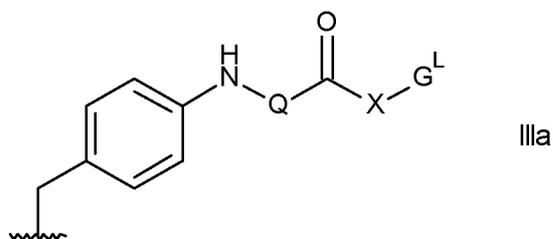
и его соли и сольваты,

где D, R², R⁶, R⁷, R⁹, R^{11a}, Y, R^{''}, Y', D', R^{6'}, R^{7'}, R^{9'}, R^{11a'} и R¹² (включая наличие или отсутствие двойных связей между C2 и C3 и между C2' и C3', соответственно) являются такими, как определено в первом аспекте данного изобретения;

15

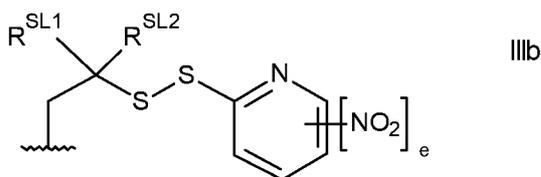
R^L представляет собой линкер для связывания с клеточносвязывающим агентом, который выбран из:

(iiiа):



- 20 где Q и X являются такими, как определено в первом аспекте, и G^L представляет собой линкер для связывания с антителом; и

(iiiб):



где R^{SL1} и R^{SL2} являются такими, как определено в первом аспекте, и e равен 0 или 1.

- 5 В третьем аспекте данного изобретения предложено применение конъюгата по первому аспекту данного изобретения в производстве лекарственного соединения для лечения пролиферативного заболевания. В третьем аспекте также предложен конъюгат по первому аспекту данного изобретения для применения при лечении пролиферативного заболевания. В третьем аспекте также предложен способ лечения пролиферативного заболевания, включающий введение терапевтически эффективного количества конъюгата по первому аспекту данного изобретения пациенту, нуждающемуся в этом.

15 Специалисты в данной области техники могут без труда определить, подходит или не подходит потенциальный конъюгат для лечения пролиферативного состояния для любого конкретного типа клеток. Например, анализы, которые можно удобно использовать для оценки активности, обеспечиваемой конкретным соединением, описаны ниже в примерах.

20 В четвертом аспекте данного изобретения предложен синтез конъюгата по первому аспекту данного изобретения, включающий конъюгацию соединения (линкера лекарственного соединения) по второму аспекту данного изобретения с антителом, определение которого приведено в первом аспекте данного изобретения.

Краткое описание графических материалов

- На Фиг. 1 показано влияние однократной дозы конъюгата по данному изобретению по сравнению с отсутствием лечения в модели ксенотрансплантата NCI-N87;
- 25 На Фиг. 2 показано влияние меньшей однократной дозы того же конъюгата по данному изобретению по сравнению с отсутствием лечения в модели ксенотрансплантата NCI-N87.
- На Фиг. 3 показано схематическое изображение (А) модифицированных антител, пригодных для применения по данному изобретению, (В) конъюгата антитела и лекарственного соединения, содержащего PBD по данному изобретению.
- 30 На Фиг. 4 показано схематическое изображение конъюгации модифицированного антитела с соединением 10.
- На Фиг. 5 показаны последовательности тяжелой и легкой цепи соединения герцептин-Flexmab.
- На Фиг. 6 показана активность конъюгата по данному изобретению по сравнению с конъюгатом, не относящимся к данному изобретению.

35 Определения
Заместители

Выражение «необязательно замещенная» в данном контексте относится к исходной группе, которая может быть незамещенной или которая может быть замещенной.

5 Если не указано иное, термин «замещенная» в данном контексте относится к исходной группе, которая имеет один или более заместителей. Термин «заместитель» в данном контексте использован в обычном смысле и относится к химическому фрагменту, который ковалентно присоединен или, если это возможно, конденсирован с исходной группой. Хорошо известны многочисленные заместители, и так же хорошо известны способы их получения и внедрения в различные исходные группы.

10 Примеры заместителей более подробно описаны ниже.

15 C_{1-12} алкил: Термин « C_{1-12} алкил» в данном контексте относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством отщепления атома водорода от атома углерода в углеводородном соединении, содержащем от 1 до 12 атомов углерода, которое может быть алифатическим или алициклическим, и которое может быть насыщенным или ненасыщенным (например, частично ненасыщенным, полностью ненасыщенным). Термин « C_{1-4} алкил» в данном контексте относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством отщепления атома водорода от атома углерода в углеводородном соединении, содержащем от 1 до 4 атомов углерода, которое может быть алифатическим или алициклическим, и которое может быть насыщенным или ненасыщенным (например, частично ненасыщенным, полностью ненасыщенным). Таким образом, термин 20 «алкил» включает подклассы алкенила, алкинила, циклоалкила и т.д., рассмотренные ниже.

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

25 Примеры насыщенных линейных алкильных групп включают, но не ограничиваются этим, 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) .

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 нео-пентил- (C_5) .

30 C_{2-12} Алкенил: Термин « C_{2-12} алкенил» в данном контексте относится к алкильной группе, содержащей одну или более двойных углерод-углеродных связей.

35 Примеры ненасыщенных алкенильных групп включают, но не ограничиваются этим, 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) .

40 C_{2-12} Алкинил: Термин « C_{2-12} алкинил» в данном контексте относится к алкильной группе, содержащей одну или более тройных углерод-углеродных связей.

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

- C_{3-12} циклоалкил: Термин « C_{3-12} циклоалкил» в данном контексте относится к алкильной группе, которая также является циклической группой; то есть к одновалентному фрагменту, полученному посредством отщепления атома водорода от алициклического кольцевого атома циклического углеводородного (карбоциклического) соединения, и указанный фрагмент содержит от 3 до 7 атомов углерода, включая от 3 до 7 кольцевых атомов.
- Примеры циклоалкильных групп включают, но не ограничиваются этим, 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), диметилциклопропана (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 данном контексте относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством отщепления атома водорода от кольцевого атома гетероциклического соединения, и указанный фрагмент содержит от 3 до 20 кольцевых атомов, из которых от 1 до 10 являются кольцевыми гетероатомами. Предпочтительно, каждое кольцо содержит от 3 до 7 кольцевых атомов, из которых от 1 до 4 являются кольцевыми гетероатомами.
- В данном контексте приставки (например, C_{3-20} , C_{3-7} , C_{5-6} и т.д.) означают количество кольцевых атомов или диапазон количества кольцевых атомов, будь то атомы углерода или гетероатомы. Например, термин « C_{5-6} гетероцикл» в данном контексте относится к гетероциклической группе, содержащей 5 или 6 кольцевых атомов.
- Примеры моноциклических гетероциклических групп включают, но не ограничиваются этим, группы, полученные из:
- N_1 : азиридина (C_3), азетирина (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 : тирирана (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)

(C₅), пиперазина (C₆);

N₁O₁: тетрагидрооксазола (C₅), дигидрооксазола (C₅), тетрагидроизоксазола (C₅), дигидроизоксазола (C₅), морфолина (C₆), тетрагидрооксазина (C₆), дигидрооксазина (C₆), оксазина (C₆);

N₁S₁: тиазолина (C₅), тиазолидина (C₅), тиомофролина (C₆);

5 N₂O₁: оксадиазина (C₆);

O₁S₁: оксатиола (C₅) и оксатиана (тиоксана) (C₆); и

N₁O₁S₁: оксатиазина (C₆).

10 Примеры замещенных моноциклических гетероциклических групп включают группы, полученные из сахаридов в циклической форме, например, из фураноз (C₅), таких как арабинофураноза, ликсофураноза, рибофураноза и ксилофураноза, и пираноз (C₆), таких как аллопираноза, альтропираноза, глюкопираноза, маннопираноза, гулопираноза, идопираноза, галактопираноза и талопираноза.

15 C₅₋₂₀ арил: Термин «C₅₋₂₀ арил» в данном контексте относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством отщепления атома водорода от ароматического кольцевого атома ароматического соединения, и указанный фрагмент содержит от 3 до 20 кольцевых атомов. Термин «C₅₋₇ арил» в данном контексте относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством отщепления атома водорода от ароматического кольцевого атома ароматического соединения, и указанный фрагмент содержит от 5 до 7 кольцевых атомов, а термин «C₅₋₁₀ арил» в данном контексте относится к одновалентному фрагменту, полученному посредством отщепления атома водорода от ароматического кольцевого атома ароматического соединения, и указанный фрагмент содержит от 5 до 10 кольцевых атомов. Предпочтительно, каждое кольцо содержит от 5 до 7 кольцевых атомов.

25 В данном контексте приставки (например, C₃₋₂₀, C₅₋₇, C₅₋₆, C₅₋₁₀ и т.д.) означают количество кольцевых атомов или диапазон количества кольцевых атомов, будь то атомы углерода или гетероатомы. Например, термин «C₅₋₆ арил» в данном контексте относится к арильной группе, содержащей 5 или 6 кольцевых атомов.

30 Все кольцевые атомы могут представлять собой атомы углерода, как в «карбоарильных группах». Примеры карбоарильных групп включают, но не ограничиваются этим, группы, полученные из бензола (т.е. фенил) (C₆), нафталина (C₁₀), азулена (C₁₀), антрацена (C₁₄), фенантрена (C₁₄), нафтацена (C₁₈) и пирена (C₁₆).

35 Примеры арильных групп, которые содержат конденсированные кольца, по меньшей мере одно из которых является ароматическим кольцом, включают, но не ограничиваются этим, группы, полученные из индана (например, 2,3-дигидро-1H-индена) (C₉), индена (C₉), изоиндена (C₉), тетралина (1,2,3,4-тетрагидронафталина) (C₁₀), аценафтена (C₁₂), флуорена (C₁₃), феналена (C₁₃), ацетфенантрена (C₁₅) и ацеантрена (C₁₆).

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

N₁: пиррола (азола) (C₅), пиридина (азина) (C₆);

- O₁: фурана (оксола) (C₅);
 S₁: тиафена (тиола) (C₅);
 N₁O₁: оксазола (C₅), изоксазола (C₅), изоксазина (C₆);
 N₂O₁: оксадиазола (фуразана) (C₅);
 5 N₃O₁: оксатриазола (C₅);
 N₁S₁: тиазола (C₅), изотиазола (C₅);
 N₂: имидазола (1,3-диазола) (C₅), пиразола (1,2-диазола) (C₅), пиридазина (1,2-диазина) (C₆), пиримидина (1,3-диазина) (C₆) (например, цитозина, тимина, урацила), пиразина (1,4-диазина) (C₆);
 N₃: триазола (C₅), триазина (C₆); и
 10 N₄: тетразола (C₅).

Примеры гетероарила, содержащего конденсированные кольца, включают, но не ограничиваются этим:

- C₉ (с 2 конденсированными кольцами), полученные из бензофурана (O₁), изобензофурана (O₁),
 индола (N₁), изоиндола (N₁), индолизина (N₁), индолина (N₁), изоиндолина (N₁), пурина (N₄) (например,
 15 аденина, гуанина), бензимидазола (N₂), индазола (N₂), бензоксазола (N₁O₁), бензизоксазола (N₁O₁),
 бензодиоксила (O₂), бензофуразана (N₂O₁), бензотриазола (N₃), бензотиафурана (S₁), бензотиазола (N₁S₁),
 бензотиадиазола (N₂S);
 C₁₀ (с 2 конденсированными кольцами), полученные из хромена (O₁), изохромена (O₁), хромана (O₁),
 изохромана (O₁), бензодиоксана (O₂), хинолин а (N₁), изохинолина (N₁), хинолизина (N₁), бензоксазина
 20 (N₁O₁), бензодиазина (N₂), пиридопиридина (N₂), хиноксалина (N₂), хиназолина (N₂), циннолина (N₂),
 фталазина (N₂), нафтиридина (N₂), птеридина (N₄);
 C₁₁ (с 2 конденсированными кольцами), полученные из бензодиазепина (N₂);
 C₁₃ (с 3 конденсированными кольцами), полученные из карбазола (N₁), дибензофурана (O₁),
 дибензотиафена (S₁), карболина (N₂), перимидина (N₂), пиридоиндола (N₂); и
 25 C₁₄ (с 3 конденсированными кольцами), полученные из акридина (N₁), ксантена (O₁), тиоксантена
 (S₁), оксантрена (O₂), феноксатиина (O₁S₁), феназина (N₂), феноксазина (N₁O₁), фенотиазина (N₁S₁),
 тиантрена (S₂), фенантридина (N₁), фенантролина (N₂), феназина (N₂).

- Вышеперечисленные группы, отдельно или как часть другого заместителя, сами могут быть необязательно
 30 замещены одной или более группами, выбранными из них самих и дополнительных заместителей,
 перечисленных ниже.

Галоген: -F, -Cl, -Br и -I.

- 35 Гидрокси: -ОН.

- Простой эфир: -OR, где R представляет собой заместитель простого эфира, например, C₁₋₇ алкильную группу
 (также упоминаемый как C₁₋₇ алкокси-группа, как описано ниже), C₃₋₂₀ гетероциклильную группу (также
 упоминаемый как C₃₋₂₀ гетероциклилокси-группа), или C₅₋₂₀ арильную группу (также упоминаемый как C₅₋₂₀
 40 арилокси-группа), предпочтительно C₁₋₇ алкильную группу.

Алкокси: -OR, где R представляет собой алкильную группу, например, C₁₋₇ алкильную группу. Примеры C₁₋₇

алкокси-групп включают, но не ограничиваются этим, -OMe (метокси), -OEt (этоксид), -O(nPr) (н-пропокси), -O(iPr) (изопропокси), -O(nBu) (н-бутокси), -O(sBu) (втор-бутокси), -O(iBu) (изобутокси) и -O(tBu) (трет-бутокси).

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

15 Полуацеталь: $-\text{CH}(\text{OH})(\text{OR}^1)$, где R^1 представляет собой заместитель полуацетала, например, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры полуацетальных групп включают, но не ограничиваются этим, $-\text{CH}(\text{OH})(\text{OMe})$ и $-\text{CH}(\text{OH})(\text{OEt})$.

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

25 Полукеталь: $-\text{CR}(\text{OH})(\text{OR}^1)$, где R^1 является таким, как определено для полуацеталей, и R представляет собой заместитель полукетала, отличный от водорода, например, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры полуацетальных групп включают, но не ограничиваются этим, $-\text{C}(\text{Me})(\text{OH})(\text{OMe})$, $-\text{C}(\text{Et})(\text{OH})(\text{OMe})$, $-\text{C}(\text{Me})(\text{OH})(\text{OEt})$ и $-\text{C}(\text{Et})(\text{OH})(\text{OEt})$.

Оксо (кето, -он): $=\text{O}$.

30 Тион (тиокетон): $=\text{S}$.

35 Имино (имин): $=\text{NR}$, 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 водород или C_{1-7} алкильную группу. Примеры сложноэфирных групп включают, но не ограничиваются этим, $=\text{NH}$, $=\text{NMe}$, $=\text{NEt}$ и $=\text{NPh}$.

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

40 Ацил-(кето): $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$, где R представляет собой заместитель ацила, например, C_{1-7} алкильную группу (также упоминаемый как C_{1-7} алкилацил или C_{1-7} алканойл), C_{3-20} гетероциклическую группу (также упоминаемый как C_{3-20} гетероциклилацил) или C_{5-20} арильную группу (также упоминаемый как C_{5-20} арилацил), предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры ацильных групп включают, но не ограничиваются этим,

$-C(=O)CH_3$ (ацетил), $-C(=O)CH_2CH_3$ (пропионил), $-C(=O)C(CH_3)_3$ (трет-бутирил) и $-C(=O)Ph$ (бензоил, фенол).

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

5

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

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

10 Тионокрбокси (тионокрбоновая кислота): $-C(=S)OH$.

Имидокислота: $-C(=NH)OH$.

Гидроксамовая кислота: $-C(=NOH)OH$.

15

Сложный эфир (карбоксилат, сложный эфир карбоновой кислоты, оксикарбонил): $-C(=O)OR$, где R представляет собой заместитель сложного эфира, 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 этим, $-C(=O)OCH_3$, $-C(=O)OCH_2CH_3$, $-C(=O)OC(CH_3)_3$ и $-C(=O)OPh$.

20

Ацилокси (обратный 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 ацилокси-групп включают, но не ограничиваются этим, $-OC(=O)CH_3$ (ацетокси), $-OC(=O)CH_2CH_3$, $-OC(=O)C(CH_3)_3$, $-OC(=O)Ph$ и $-OC(=O)CH_2Ph$.

25

Оксикарбоилокси: $-OC(=O)OR$, где R представляет собой заместитель сложного эфира, 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 этим, $-OC(=O)OCH_3$, $-OC(=O)OCH_2CH_3$, $-OC(=O)OC(CH_3)_3$ и $-OC(=O)OPh$.

30

Амино: $-NR^1R^2$, где R^1 и R^2 независимо представляют собой заместители для амина, например, водород, C_{1-7} алкильную группу (также упоминаемый как 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 кольцевых атомов. 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 этим, $-NH_2$, $-NHCH_3$, $-NHC(CH_3)_2$, $-N(CH_3)_2$, $-N(CH_2CH_3)_2$ и $-NHPh$. Примеры циклических аминогрупп включают, но не ограничиваются этим, азиридино, азетидино, пирролидино, пиперидино, пиперазино, морфолино и тиоморфолино.

40

Амидо (карбамоил, карбамил, аминокрбонил, карбоксамид): $-C(=O)NR^1R^2$, где R^1 и R^2 независимо представляют собой заместители для амина, как определено для аминогрупп. Примеры амидогрупп

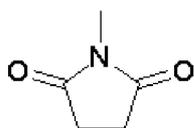
включают, но не ограничиваются этим, $-C(=O)NH_2$, $-C(=O)NHCH_3$, $-C(=O)N(CH_3)_2$, $-C(=O)NHCH_2CH_3$ и $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$, а также амидогруппы, в которых R^1 и R^2 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклическую структуру, как, например, в пиперидинокарбониле, морфолинокарбониле,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

5

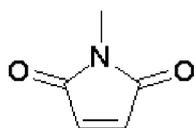
Тиоамидо (тиокарбамил): $-C(=S)NR^1R^2$, где R^1 и R^2 независимо представляют собой заместители для amino, как определено для аминогрупп. Примеры амидогрупп включают, но не ограничиваются этим, $-C(=S)NH_2$, $-C(=S)NHCH_3$, $-C(=S)N(CH_3)_2$ и $-C(=S)NHCH_2CH_3$.

10 Ациламидо (ациламино): $-NR^1C(=O)R^2$, где R^1 представляет собой заместитель амида, 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 ацила, 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 этим, $-NHC(=O)CH_3$,

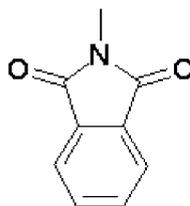
15 $-NHC(=O)CH_2CH_3$ и $-NHC(=O)Ph$. R^1 и R^2 могут вместе образовывать циклическую структуру, как, например, в сукцинимидиле, малеимидиле и фталиимидиле:



сукцинимидил



малеимидил



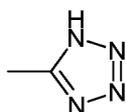
фталиимидил

20 Аминокарбонилокси: $-OC(=O)NR^1R^2$, где R^1 и R^2 независимо представляют собой заместители для amino, как определено для аминогрупп. Примеры аминокарбонилокси-групп включают, но не ограничиваются этим, $-OC(=O)NH_2$, $-OC(=O)NHMe$, $-OC(=O)NMe_2$ и $-OC(=O)NEt_2$.

25 Уреидо: $-N(R^1)CONR^2R^3$, где R^2 и R^3 независимо представляют собой заместители аминогруппы, как определено для аминогрупп, и R^1 представляет собой заместитель уреидо-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. Примеры уреидо-групп включают, но не ограничиваются этим, $-NHCONH_2$, $-NHCONHMe$, $-NHCONHEt$, $-NHCONMe_2$, $-NHCONEt_2$, $-NMeCONH_2$, $-NMeCONHMe$, $-NMeCONHEt$, $-NMeCONMe_2$ и $-NMeCONEt_2$.

30 Гуанидино: $-NH-C(=NH)NH_2$.

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



35 Имино: $=NR$, где R представляет собой заместитель иминогруппы, например, водород, C_{1-7} алкильную

группу, C₃₋₂₀ гетероциклическую группу или C₅₋₂₀ арильную группу, предпочтительно H или C₁₋₇ алкильную группу. Примеры иминогрупп включают, но не ограничиваются этим, =NH, =NMe и =NEt.

5 Амидин (амидино): -C(=NR)NR₂, где каждый R представляет собой заместитель амидина, например, водород, C₁₋₇ алкильную группу, C₃₋₂₀ гетероциклическую группу или C₅₋₂₀ арильную группу, предпочтительно H или C₁₋₇ алкильную группу. Примеры амидиновых групп включают, но не ограничиваются этим, -C(=NH)NH₂, -C(=NH)NMe₂ и -C(=NMe)NMe₂.

10 Нитро: -NO₂.

Нитрозо: -NO.

Азидо: -N₃.

15 Циано (нитрил, карбонитрил): -CN.

Изоциано: -NC.

Цианато: -OCN.

20

Изоцианато: -NCO.

Тиоциано (тиоцианато): -SCN.

25 Изотиоциано (изотиоцианато): -NCS.

Сульфгидрил-(тиол, меркапто): -SH.

30 Простой тиоэфир (сульфид): -SR, где R представляет собой заместитель простого тиоэфира, например, C₁₋₇ алкильную группу (также упоминаемый как C₁₋₇ алкилтио-группа), C₃₋₂₀ гетероциклическую группу или C₅₋₂₀ арильную группу, предпочтительно C₁₋₇ алкильную группу. Примеры C₁₋₇ алкилтио-групп включают, но не ограничиваются этим, -SCH₃ и -SCH₂CH₃.

35 Дисульфид: -SS-R, где R представляет собой заместитель дисульфида, например, C₁₋₇ алкильную группу, C₃₋₂₀ гетероциклическую группу или C₅₋₂₀ арильную группу, предпочтительно C₁₋₇ алкильную группу (также упоминаемый как C₁₋₇ алкилдисульфид). Примеры C₁₋₇ алкилдисульфидных групп включают, но не ограничиваются этим, -SSCH₃ и -SSCH₂CH₃.

40 Сульфин (сульфинил, сульфоксид): -S(=O)R, где R представляет собой заместитель сульфина, например, C₁₋₇ алкильную группу, C₃₋₂₀ гетероциклическую группу или C₅₋₂₀ арильную группу, предпочтительно C₁₋₇ алкильную группу. Примеры сульфиновых групп включают, но не ограничиваются этим, -S(=O)CH₃ и -S(=O)CH₂CH₃.

Сульфон (сульфонил): $-S(=O)_2R$, где R представляет собой заместитель сульфона, 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 этим, $-S(=O)_2CH_3$ (метансульфонил, мезил), $-S(=O)_2CF_3$ (третил), $-S(=O)_2CH_2CH_3$ (эзил), $-S(=O)_2C_4F_9$ (нонафил), $-S(=O)_2CH_2CF_3$ (трезил), $-S(=O)_2CH_2CH_2NH_2$ (таурил), $-S(=O)_2Ph$ (фенилсульфонил, безил), 4-метилфенилсульфонил-(тозил), 4-хлорфенилсульфонил-(клозил), 4-бромфенилсульфонил-(брозил), 4-нитрофенил-(нозил), 2-нафталинсульфонат (напсил) и 5-диметиламинонафталин-1-илсульфонат (дансил).

10

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

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

15 Сульфидат (сложный эфир сульфидовой кислоты): $-S(=O)OR$; где R представляет собой заместитель сульфидата, например, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры сульфидатных групп включают, но не ограничиваются этим, $-S(=O)OCH_3$ (метоксисульфидил, метилсульфидат) и $-S(=O)OCH_2CH_3$ (этоксисульфидил, этилсульфидат).

20

Сульфидат (сложный эфир сульфидовой кислоты): $-S(=O)_2OR$, где R представляет собой заместитель сульфидата, например, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры сульфидатных групп включают, но не ограничиваются этим, $-S(=O)_2OCH_3$ (метоксисульфидил, метилсульфидат) и $-S(=O)_2OCH_2CH_3$ (этоксисульфидил, этилсульфидат).

25

Сульфидилокси: $-OS(=O)R$, где R представляет собой заместитель сульфидилокси-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 сульфидилокси-групп включают, но не ограничиваются этим, $-OS(=O)CH_3$ и $-OS(=O)CH_2CH_3$.

30

Сульфидилокси: $-OS(=O)_2R$, где R представляет собой заместитель сульфидилокси-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 сульфидилокси-групп включают, но не ограничиваются этим, $-OS(=O)_2CH_3$ (мезилат) и $-OS(=O)_2CH_2CH_3$ (эзилат).

35

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

40

Сульфамил-(сульфамид; амид сульфидовой кислоты; сульфидамид): $-S(=O)NR^1R^2$, где R^1 и R^2 независимо представляют собой заместители для амина, как определено для аминогрупп. Примеры сульфамидных

групп включают, но не ограничиваются этим, $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_3)$, $-\text{S}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$,
 $-\text{S}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{S}(=\text{O})\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ и $-\text{S}(=\text{O})\text{NHPh}$.

5 Сульфонамидо (сульфинамоил; амид сульфоновой кислоты; сульфонамид): $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}^1\text{R}^2$, где R^1 и R^2 независимо представляют собой заместители для амина, как определено для аминогрупп. Примеры сульфонамидо-групп включают, но не ограничиваются этим, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}_2$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}(\text{CH}_3)$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ и $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NHPh}$.

10 Сульфамино: $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$, где R^1 представляет собой заместитель аминогруппы, как определено для аминогрупп. Примеры сульфамино-групп включают, но не ограничиваются этим, $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{OH}$ и $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$.

15 Сульфонамино: $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$, где R^1 представляет собой заместитель аминогруппы, как определено для аминогрупп, и R представляет собой заместитель сульфонамино-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 сульфонамино-групп включают, но не ограничиваются этим, $-\text{NHS}(=\text{O})_2\text{CH}_3$ и $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_5$.

20 Сульфинамино: $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})\text{R}$, где R^1 представляет собой заместитель аминогруппы, как определено для аминогрупп, и R представляет собой заместитель сульфинамино-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 сульфинамино-групп включают, но не ограничиваются этим, $-\text{NHS}(=\text{O})\text{CH}_3$ и $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$.

25 Фосфино (фосфин): $-\text{PR}_2$, где R представляет собой заместитель фосфино-группы, например, $-\text{H}$, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно $-\text{H}$, C_{1-7} алкильную группу или C_{5-20} арильную группу. Примеры фосфино-групп включают, но не ограничиваются этим, $-\text{PH}_2$, $-\text{P}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(\text{t-Bu})_2$ и $-\text{P}(\text{Ph})_2$.

Фосфо: $-\text{P}(=\text{O})_2$.

30 Фосфинил-(фосфиноксид): $-\text{P}(=\text{O})\text{R}_2$, где R представляет собой заместитель фосфинила, 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 этим, $-\text{P}(=\text{O})(\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{t-Bu})_2$ и $-\text{P}(=\text{O})(\text{Ph})_2$.

35 Фосфовая кислота (фосфоно): $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$.

40 Фосфонат (фосфовый сложный эфир): $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR})_2$, где R представляет собой заместитель фосфоната, например, $-\text{H}$, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклическую группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно $-\text{H}$, C_{1-7} алкильную группу или C_{5-20} арильную группу. Примеры фосфонатных групп включают, но не ограничиваются этим, $-\text{P}(=\text{O})(\text{OCH}_3)_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{O-t-Bu})_2$ и $-\text{P}(=\text{O})(\text{OPh})_2$.

Фосфорная кислота (фосфонокси): $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})_2$.

- Фосфат (сложный фосфоноокси-эфир): $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR})_2$, где R представляет собой заместитель фосфата, например, -H, C₁₋₇ алкильную группу, C₃₋₂₀ гетероциклическую группу или C₅₋₂₀ арильную группу, предпочтительно -H, C₁₋₇ алкильную группу или C₅₋₂₀ арильную группу. Примеры фосфатных групп
- 5 включают, но не ограничиваются этим, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_3)_2$, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{O}-t\text{-Bu})_2$ и $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OPh})_2$.
- Фосфористая кислота: $-\text{OP}(\text{OH})_2$.
- 10 Фосфит: $-\text{OP}(\text{OR})_2$, где R представляет собой заместитель фосфита, например, -H, C₁₋₇ алкильную группу, C₃₋₂₀ гетероциклическую группу или C₅₋₂₀ арильную группу, предпочтительно -H, C₁₋₇ алкильную группу или C₅₋₂₀ арильную группу. Примеры фосфитных групп включают, но не ограничиваются этим, $-\text{OP}(\text{OCH}_3)_2$, $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{OP}(\text{O}-t\text{-Bu})_2$ и $-\text{OP}(\text{OPh})_2$.
- 15 Фосфорамидит: $-\text{OP}(\text{OR}^1)\text{-NR}^2_2$, где R¹ и R² представляют собой заместители фосфорамидита, например, -H, (необязательно замещенную) C₁₋₇ алкильную группу, C₃₋₂₀ гетероциклическую группу или C₅₋₂₀ арильную группу, предпочтительно -H, C₁₋₇ алкильную группу или C₅₋₂₀ арильную группу. Примеры фосфорамидитных групп включают, но не ограничиваются этим, $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)\text{-N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)\text{-N}(i\text{-Pr})_2$ и $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})\text{-N}(i\text{-Pr})_2$.
- 20 Фосфорамидат: $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}^1)\text{-NR}^2_2$, где R¹ и R² представляют собой заместители фосфорамидата, например, -H, (необязательно замещенную) C₁₋₇ алкильную группу, C₃₋₂₀ гетероциклическую группу или C₅₋₂₀ арильную группу, предпочтительно -H, C₁₋₇ алкильную группу или C₅₋₂₀ арильную группу. Примеры фосфорамидатных групп включают, но не ограничиваются этим, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)\text{-N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)\text{-N}(i\text{-Pr})_2$ и
- 25 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})\text{-N}(i\text{-Pr})_2$.

Алкилен

- C₃₋₁₂ алкилен: Термин «C₃₋₁₂ алкилен» в данном контексте относится к бидентатному фрагменту, полученному посредством отщепления двух атомов водорода от одного и того же атома углерода или от
- 30 двух разных атомов углерода углеводородного соединения, содержащего от 3 до 12 атомов углерода (если не указано иное), которое может быть алифатическим или алициклическим, и которое может быть насыщенным, частично ненасыщенным или полностью ненасыщенным. Таким образом, термин «алкилен» включает подклассы алкенилена, алкинилена, циклоалкилена и т.д., рассмотренные ниже.
- 35 Примеры линейных насыщенных C₃₋₁₂ алкиленовых групп включают, но не ограничиваются этим, $-(\text{CH}_2)_n-$, где n представляет собой целое число от 3 до 12, например, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (пропилен), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (бутилен), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (пентилен) и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (гептилен).

- Примеры разветвленных насыщенных C₃₋₁₂ алкиленовых групп включают, но не ограничиваются этим,
- 40 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2-$.

Примеры линейных частично ненасыщенных C₃₋₁₂ алкиленовых групп (C₃₋₁₂ алкениленовых и алкиниленовых) групп включают, но не ограничиваются этим, -CH=CH-CH₂-, -CH₂-CH=CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH=CH-, -CH=CH-CH=CH-CH₂-, -CH=CH-CH=CH-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH=CH-, -CH=CH-CH₂-CH₂-CH=CH- и -CH₂-C≡C-CH₂-.

5

Примеры разветвленных частично ненасыщенных C₃₋₁₂ алкиленовых групп (C₃₋₁₂ алкениленовых и алкиниленовых групп) включают, но не ограничиваются этим, -C(CH₃)=CH-, -C(CH₃)=CH-CH₂-, -CH=CH-CH(CH₃)- и -C≡C-CH(CH₃)-.

10 Примеры алициклических насыщенных C₃₋₁₂ алкиленовых групп (C₃₋₁₂ циклоалкиленов) включают, но не ограничиваются этим, циклопентилен (например, циклопент-1,3-илен) и циклогексилен (например, циклогекс-1,4-илен).

15 Примеры алициклических частично ненасыщенных C₃₋₁₂ алкиленовых групп (C₃₋₁₂ циклоалкиленов) включают, но не ограничиваются этим, циклопентилен (например, 4-циклопентен-1,3-илен), циклогексилен (например, 2-циклогексен-1,4-илен; 3-циклогексен-1,2-илен; 2,5-циклогексадиен-1,4-илен).

Звено лиганда

20 Звенья лиганда для применения по данному изобретению представляют собой клеточносвязывающие агенты, более конкретно модифицированные антитела или их антиген-связывающие фрагменты, содержащий по меньшей мере один сайт конъюгации в каждой тяжелой цепи. Примеры конкретных модифицированных антител, пригодных для применения по данному изобретению, описаны в публикации WO 2012/064733 (поданной как PCT/US2011/059775), которая включена в данный документ посредством ссылки.

25

Антитела

Термин «антитело» в данном контексте использован в самом широком смысле и включает, в частности, моноклональные антитела, поликлональные антитела, димеры, мультимеры, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и фрагменты антител, при условии, что они демонстрируют требуемую биологическую активность (Miller *et al* (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). Антитела могут быть мышинными, человеческими, гуманизированными, химерными или полученными из других видов. Антитело представляет собой белок, созданный иммунной системой, который способен распознавать и связываться со специфическим антигеном. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5-ое изд., Garland Publishing, Нью-Йорк). Антиген мишени обычно имеет множество связывающих 35 сайтов, также называемых эпитопами, которые распознаются определяющими комплементарность областями (CDR) различных антител. Каждое антитело, которое специфически связывается с другим эпитопом, имеет другую структуру. Так, один антиген может иметь более одного соответствующего антитела. Антитело включает полноразмерную молекулу иммуноглобулина или иммунологически активную часть полноразмерной молекулы иммуноглобулина, т.е. молекулу, которая содержит антиген-связывающий 40 сайт, который иммуноспецифически связывается с антигеном рассматриваемой мишени или его частью, и такие мишени включают, но не ограничиваются ими, раковые клетки или клетки, которые вырабатывают аутоиммунные антитела, связанные с аутоиммунным заболеванием. Иммуноглобулин может быть любого

типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса иммуноглобулиновых молекул. Иммуноглобулины могут быть получены из любых видов животных, включая человека, мышей или кроликов.

5 «Фрагменты антител» содержат часть полноразмерного антитела, обычно его антиген-связывающую или варибельную область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты F(ab')₂ и scFv, а также димерные эпитоп-связывающие фрагменты любых вышеперечисленных, которые иммуноспецифически связываются с антигенами раковых клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами, одноцепочечными молекулами антител, и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

10 Модифицированные антитела, пригодные для применения по данному изобретению, включают те, в которых природные межцепочечные цистеиновые остатки заменены на аминокислотные остатки, не содержащие тиольных групп. Такие антитела могут содержать по меньшей мере одну дополнительную замену в каждой тяжелой цепи аминокислотного остатка, содержащую реакционноспособную группу, пригодную для конъюгации с линкером. Дополнительно замещенная аминокислота может быть цистеином или неприродной аминокислотой. Замещенное положение может быть выбрано из следующих:

Антитело	Изотип	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Положение (по Кабату, ЕС) и соответствующая аминокислота	239	Ser	Ser	Ser	Ser
	282	Val	Val	Val	Val
	289	Thr	Thr	Thr	Thr
	297	Asn	Asn	Asn	Asn
	312	Asp	Asp	Asp	Asp
	324	Ser	Ser	Ser	Ser
	330	Ala	Ala	Ala	Ser
	335	Thr	Thr	Thr	Thr
	337	Ser	Ser	Ser	Ser
	339	Ala	Thr	Thr	Ala
	356	Glu	Glu	Glu	Glu
	359	Thr	Thr	Thr	Thr
	361	Asn	Asn	Asn	Asn
	383	Ser	Ser	Ser	Ser
	384	Asn	Asn	Ser	Asn
	398	Leu	Leu	Leu	Leu
	400	Ser	Ser	Ser	Ser
	422	Val	Val	Ile	Val
440	Ser	Ser	Ser	Ser	
442	Ser	Ser	Ser	Ser	

20 Примеры модифицированных антител, пригодных для применения по данному изобретению, включают структуры Flexmab, описанные в публикации WO 2012/064733, содержание которой включено в данный документ. Такие структуры Flexmab содержат цистеин со свободными тиольными группами в шарнирной

области антитела, которые могут быть использованы в качестве сайтов конъюгации для связывания через группы N10 PBD по данному изобретению.

Другие примеры модифицированных антител, пригодных для применения по данному изобретению,

5 включают антитела, в которых цистеиновые остатки вставлены в выборочные сайты антитела. Они описаны в публикации Dimasi, N., et al., *Molecular Pharmaceutics*, 2017, 14, 1501-1516 (DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00995) и WO2015/157595. В частности, пригодны антитела, которые модифицированы посредством вставки цистеина после положения S239 (т.е. между положениями 239 и 240).

10

Сделана ссылка на перечень на страницах 60 – 62 публикации WO 2012/064733, содержание которой включено в данный документ. В некоторых вариантах реализации антитело может представлять собой опухолеассоциированный антиген, например: HER2 (ErbB2); EPHA2 (EPH рецептор A2); CD19; IL2RA (рецептор интерлейкина 2, альфа).

15

Опухолеассоциированные антигены и когнатные антитела для применения в вариантах реализации данного изобретения перечислены ниже и более подробно описаны на страницах 14 – 86 публикации 2017/186894, которая включена в данный документ.

(1) BMPRIВ (рецептор костного морфогенетического белка типа IB)

20

(2) E16 (LAT1, SLC7A5)

(3) STEAP1 (шестой трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы)

(4) 0772P (CA125, MUC16)

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, фактор стимуляции мегакариоцитов, мезотелин)

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, семейство носителей растворенных веществ 34 (фосфат натрия),

25

член 2, тип II, натрий-зависимый фосфатный транспортер 3b)

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Нlog семафорина 5b, домен sema, из семи тромбоспондиновых повторов (типа 1 и подобных типу 1), трансмембранный домен (ТМ) и короткий цитоплазматический домен, (семафорин) 5B)

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, кДНК RIKEN 2700050C12, кДНК RIKEN, ген 2700050C12)

30

(9) ETBR (рецептор эндотелина типа B)

(10) MSG783 (RNF124, гипотетический белок FLJ20315)

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, ассоциированный с раком предстательной железы ген 1, ассоциированный с раком предстательной железы белок 1, шестой трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 2, шестой трансмембранный белок предстательно железы)

35

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, катионный канал транзиторного рецепторного потенциала 5, подсемейство M, член 4)

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, фактор роста, полученный из тератокарциномы)

(14) CD21 (CR2 (рецептор комплемента 2) или C3DR (C3d/рецептор вируса Эпштейна-Барра) или Hs.73792)

40

(15) CD79b (CD79B, CD79β, Igb (иммуноглобулин-ассоциированный, бета), B29)

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (домен SH2, содержащий якорный белок фосфатазы 1a), SPAP1B, SPAP1C)

- (17) HER2 (ErbB2)
- (18) NCA (CEACAM6)
- (19) MDP (DPEP1)
- (20) IL20R-альфа (IL20Ra, ZCYTOR7)
- 5 (21) Brevican (BCAN, BEHAV)
- (22) EphB2R (DRT, ERK, Nek5, EPHT3, Tyro5)
- (23) ASLG659 (B7h)
- (24) PSCA (предшественник антигена стволовых клеток предстательной железы)
- (25) GEDA
- 10 (26) BAFF-R (рецептор фактора активации В-клеток, рецептор BLyS 3, BR3)
- (27) CD22 (изоформа В CD22 рецептора В-клеток, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814)
- (27a) CD22 (молекула CD22)
- (28) CD79a (CD79A, CD79alpha), иммуноглобулин-ассоциированный альфа, специфичный к В-клеткам белок, который ковалентно взаимодействует с Ig бета (CD79B) и образует комплекс на поверхности с молекулами Ig M, передает сигнал, участвующий в дифференцировке В-клеток), pI: 4,84, СС: 25028 ТМ: 2
- 15 [P] хромосома гена: 19q13.2).
- (29) CXCR5 (рецептор 1 лимфомы Беркитта, рецептор, связанный с белком G который активируется хемокином CXCL13, участвует в миграции лимфоцитов и гуморальной защите, играет роль в инфекции ВИЧ-2 и возможно развитии СПИДа, лимфомы, миеломы и лейкоза); 372 aa, pI: 8,54, ММ: 41959 ТМ: 7 [P]
- 20 хромосома гена: 11q23.3,
- (30) HLA-DOB (бета-субъединица молекулы II класса МНС (антиген Ia), которая связывает пептиды и предоставляет их в лимфоциты CD4+ T); 273 aa, pI: 6,56, ММ: 30820, ТМ: 1 [P] хромосома гена: 6p21.3)
- (31) P2X5 (лиганд-управляемый ионный канал 5 пуриnergического рецептора P2X, ионный канал, управляемый внеклеточной АТФ, может участвовать в синаптической трансмиссии и нейрогенезе, дефицит может способствовать патофизиологии идиопатической нестабильности детрузора); 422 aa, pI: 7.63, ММ: 47206 ТМ: 1 [P] хромосома гена: 17p13.3).
- 25 (32) CD72 (антиген дифференцировки В-клеток CD72, Lyb-2); 359 aa, pI: 8,66, ММ: 40225, ТМ: 1 5 [P] хромосома гена: 9p13.3).
- (33) LY64 (лимфоцитарный антиген 64 (RP105), мембранный белок I типа семейства с высоким содержанием лейцина (LRR), регулирует активацию и апоптоз В-клеток, потеря функции связана с повышенной активностью заболевания у пациентов с системной красной волчанкой); 661 aa, pI: 6,20, ММ: 74147 ТМ: 1 [P] хромосома гена: 5q12).
- 30 (34) FcRH1 (рецептор-подобный белок 1 Fc, предполагаемый рецептор к домену Fc иммуноглобулина, который содержит Ig-подобный домен типа C2 и домен ITAM, может играть роль в дифференцировке В-лимфоцитов); 429 aa, pI: 5,28, ММ: 46925 ТМ: 1 [P] хромосома гена: 1q21-1q22)
- 35 (35) IRTA2 (рецептор иммуноглобулинового суперсемейства, ассоциированный с транслокацией 2, предполагаемый иммунорецептор с возможным участием в развитии В-клеток и лимфомагенезе; разрегулиция гена вследствие транслокации происходит при некоторых В-клеточных злокачественных заболеваниях); 977 aa, pI: 6,88, ММ: 106468, ТМ: 1 [P] хромосома гена: 1q21)
- 40 (36) TENB2 (TMEFF2, томорегулин, TPEF, HPP1, TR, предполагаемый трансмембранный протеогликан, связанный с семейством EGF/герегулина факторов роста и фоллистатина); 374 aa)
- (37) PSMA – FOLH1 (Фолатгидролаза (простата-специфический мембранный антиген1)

- (38) SST (рецептор соматостатина; следует учитывать, что существует 5 подтипов)
- (38.1) SSTR2 (рецептор соматостатина 2)
- (38.2) SSTR5 (рецептор соматостатина 5)
- (38.3) SSTR1
- 5 (38.4) SSTR3
- (38.5) SSTR4
- AvB6 – Обе субъединицы (39+40)**
- (39) ITGAV (*интегрин, альфа V*)
- (40) ITGB6 (*интегрин, бета 6*)
- 10 (41) CEACAM5 (молекула клеточной адгезии 5, связанная с карциноэмбриональным антигеном)
- (42) MET (прото-онкоген met; рецептор фактора роста гепатоцитов)
- (43) MUC1 (муцин 1, связанный с клеточной поверхностью)
- (44) CA9 (карбонангидраза IX)
- (45) EGFRvIII (рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), транскрипционный вариант 3)
- 15 (46) CD33 (молекула CD33)
- (47) CD19 (молекула CD19)
- (48) IL2RA (рецептор интерлейкина 2, альфа); эталонная последовательность NCBI: NM_000417.2);
- (49) AXL (рецепторная тирозинкиназа AXL)
- (50) CD30 - TNFRSF8 (8 член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли)
- 20 (51) BCMA (антиген созревания В-клеток) - TNFRSF17 (17 член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли)
- (52) CT Ags – CTA (антигены рака яичек)
- (53) CD174 (Льюис Y) - FUT3 (фукозилтрансфераза 3 (галактозид-3(4)-L-фукозилтрансфераза, группа крови Льюиса)
- 25 (54) CLEC14A (член А семейства 14 лектиновых доменов С-типа; Genbank, номер доступа NM175060)
- (55) GRP78 – HSPA5 (белок 5 теплового шока 70 кДа (глюкозорегулируемый белок, 78 кДа)
- (56) CD70 (молекула CD70) L08096
- (57) Антигены, специфические для стволовых клеток. Например:
- 5T4 (см. строку (63) ниже)
- 30
- CD25 (см. строку (48) выше)
 - CD32
 - LGR5/GPR49
 - Проминин/CD133
- (58) ASG-5
- 35 (59) ENPP3 (эктонуклеотидная пирофосфатаза/фосфодиэстераза 3)
- (60) PRR4 (пролин-богатый 4 (лакримальный))
- (61) GCC – GUCY2C (гуанилатциклаза 2C (рецептор термостабильного энтеротоксина)
- (62) Liv-1 – SLC39A6 (6 член семейства носителей растворенных веществ 39 (транспортер цинка))
- (63) 5T4, трофобластный гликопротеин, TPBG – TPBG (трофобластный гликопротеин)
- 40 (64) CD56 – NCMA1 (молекула адгезии нервных клеток 1)
- (65) CanAg (опухлеассоциированный антиген CA242)
- (66) FOLR1 (фолатный рецептор 1)

- (67) GPNMB (гликопротеин (трансмембранный) nmb)
- (68) TIM-1 – HAVCR1 (клеточный рецептор 1 вируса гепатита А)
- (69) RG-1/мишень опухоли предстательной железы Mindin – Mindin/RG-1
- (70) B7-H4 – VTCN1 (ингибитор 1 активации Т-клеток, содержащий V-образный домен)
- 5 (71) PTK7 (протеинтирозинкиназа 7 PTK7)
- (72) CD37 (молекула CD37)
- (73) CD138 – SDC1 (синдекан 1)
- (74) CD74 (молекула CD74, главный комплекс гистосовместимости, инвариантная цепь II класса)
- (75) Клаудины – CL (клаудины)
- 10 (76) EGFR (рецептор эпидермального фактора роста)
- (77) Her3 (ErbB3) – ERBB3 (гомолог 3 вирусного онкогена эритробластного лейкоза v-erb-b2 (птиц))
- (78) RON - MST1R (макрофаг-стимулирующий рецептор 1 (с-met-родственная тирозинкиназа))
- (79) EPHA2 (EPH рецептор A2)
- (80) CD20 – MS4A1 (трансмембранные 4-домены, подсемейство A, член 1)
- 15 (81) Тенасцин С – TNC (тенасцин С)
- (82) FAP (альфа-белок активации фибробластов)
- (83) DKK-1 (Dickkopf 1 гомолог (Xenopus laevis))
- (84) CD52 (молекула CD52)
- (85) CS1 - SLAMF7 (7 член семейства SLAM)
- 20 (86) Эндоглин – ENG (эндоглин)
- (87) Аннексин А1 – ANXA1 (аннексин А1)
- (88) V-CAM (CD106) - VCAM1 (молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа)

Связывание линкерного звена со звеном лиганда

- 25 Звено лиганда может быть связано с линкерным звеном через дисульфидную связь.

В одном варианте реализации связь между звеном лиганда и линкером лекарственного соединения образуется между тиольной группой цистеинового остатка в звене лиганда и малеимидной группой в звене лекарственного линкера. Другие возможные группы для связывания, а также образующиеся линкерные

30 группы, представлены ниже.

- 35 Цистеиновые остатки звена лиганда могут быть доступны для реакции с функциональной группой линкерного звена с образованием связи. В других вариантах реализации, например, если звено лиганда представляет собой антитело, тиольные группы антитела могут участвовать в межцепочечных дисульфидных связях. Указанные межцепочечные связи можно превращать в свободные тиольные группы, например, посредством обработки антитела агентом ДТТ перед осуществлением реакции с функциональной группой линкерного звена.

- 40 В некоторых вариантах реализации цистеиновый остаток внедряют в тяжелую или легкую цепь антитела. Положения для вставки цистеина посредством замещения тяжелых или легких цепей антитела включают положения, описанные в опубликованной заявке США № 2007-0092940 и в публикации международного патента WO2008/070593, которые включены в данный документ.

Способы лечения

Соединения по данному изобретению можно использовать в способе терапии. Также предложен способ лечения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества конъюгата формулы I. Термин «терапевтически эффективное количество» означает количество, достаточное для обеспечения благоприятного эффекта для пациента. Такой благоприятный эффект может представлять собой облегчение по меньшей мере одного симптома. Фактически введенное количество, а также частота и схема введения зависят от природы и тяжести патологического состояния, подлежащего лечению. Назначение лечения, например, определение дозы, входит в ответственность врачей общей практики и другого медицинского персонала.

Конъюгат можно вводить отдельно или в комбинации с другими способами лечения, одновременно или последовательно, в зависимости от патологического состояния, подлежащего лечению. Примеры способов лечения и терапий включают, но не ограничиваются ими, химиотерапию (введение активных агентов, включая, например, лекарства); хирургические операции; и лучевую терапию.

Фармацевтические композиции по данному изобретению и для применения в соответствии с данным изобретением могут содержать, помимо активного ингредиента, т.е. конъюгата формулы I, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, известные специалистам в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Точная природа носителя или другого материала зависит от способа введения, который может быть пероральным, или посредством инъекции, например, кожной, подкожной или внутривенной.

Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме таблетки, капсулы, порошка или в жидкой форме. Таблетка может содержать твердый носитель или адъювант. Жидкие фармацевтические композиции обычно содержат жидкий носитель, такой как вода, нефтяной, животный или растительный жир, минеральное масло или синтетическое масло. Может быть включен физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Капсула может содержать твердый носитель, такой как желатин.

Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции, или инъекции в очаг поражения активный ингредиент должен быть в форме парентерально приемлемого водного раствора, который является апирогенным и имеет подходящий pH, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области техники могут получить подходящие растворы с применением, например, изотоничных сред, таких как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, лактатный раствор Рингера для инъекций. При необходимости можно добавлять консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

Указанные конъюгаты можно использовать для лечения пролиферативного заболевания и аутоиммунного заболевания. Термин «пролиферативное заболевание» относится к нежелательной или неконтролируемой клеточной пролиферации избыточных или патологических клеток, которые являются нежелательными,

такой как неопластический или гиперпластический рост *in vitro* или *in vivo*.

Примеры пролиферативных патологических состояний включают, но не ограничиваются ими, доброкачественную, пред-злокачественную и злокачественную клеточную пролиферацию, включая, но не ограничиваясь этим, неоплазмы и опухоли (например, гистiocитому, глиому, астроцитому, остеому), рак (например, рак легких, мелкоклеточный рак легких, желудочно-кишечный рак, рак кишечника, рак толстой кишки, карцинома молочной железы, карцинома яичника, рак предстательной железы, рак яичек, рак печени, рак почек, рак молочного пузыря, рак поджелудочной железы, рак головного мозга, саркома, остеосаркома, саркома Капоши, меланома), лейкозы, псориаз, болезни костей, фибропролиферативные расстройства (например, соединительных тканей) и атеросклероз. Другие раковые заболевания, представляющие интерес, включают, но не ограничиваются ими, гематологические заболевания; злокачественные заболевания, такие как лейкозы и лимфомы, такие как неходжкинская лимфома и подтипы, такие как DLBCL, лимфома из клеток маргинальной зоны, из клеток мантийной зоны и фолликулярная лимфома, лимфома Ходжкина, AML и другие раковые заболевания из В- или Т-клеток.

Примеры аутоиммунного заболевания включают следующие: ревматоидный артрит, аутоиммунные демиелинизирующие заболевания (например, рассеянный склероз, аллергический энцефаломиелит), псориаз, псориатический артрит, эндокринная офтальмопатия, увеоретинит, системная красная волчанка, миастения гравис, болезнь Грейса, гломерулонефрит, аутоиммунное гепатологическое расстройство, воспалительная болезнь кишечника (например, болезнь Крона), анафилаксия, аллергическая реакция, синдром Шегрена, сахарный диабет I типа, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, фибромиалгия, полимиозит, дерматомиозит, множественная эндокринная недостаточность, синдром Шмидта, аутоиммунный увеит, болезнь Аддисона, адреналит, тиреоидит, тиреоидит Хашимото, аутоиммунная болезнь щитовидной железы, пернициозная анемия, желудочная атрофия, хронический гепатит, волчаночный гепатит, атеросклероз, подострая кожная красная волчанка, гипопаратиреоз, синдром Дресслера, аутоиммунная тромбоцитопения, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, гемолитическая анемия, обыкновенная пузырчатка, пузырчатка, герпетиформный дерматит, очаговая алопеция, пемфигоид, склеродермия, прогрессирующий системный склероз, CREST-синдром (кальциноз, феномен Рейно, пищеводная дискинезия, склеродактилия и телеангиэктазия), аутоиммунное бесплодие мужчин и женщин, анкилозирующий спондилит, язвенный колит, смешанная болезнь соединительной ткани, нодозный полиартериит, системный некротизирующий васкулит, атопический дерматит, атопический ринит, синдром Гудпасчера, болезнь Шагаса, саркоидоз, ревматическая лихорадка, астма, привычный выкидыш, антифосфолипидный синдром, аллергический альвеолит фермеров, мультиформная эритема, посткардиотомный синдром, синдром Кушинга, аутоиммунный хронический активный гепатит, легочная аллергия птицеводов, токсический эпидермальный некролиз, синдром Альпорта, альвеолит, аллергический альвеолит, фиброзирующий альвеолит, интерстициальная болезнь легких, нодозная эритема, гангренозная пиодермия, трансфузионная реакция, артериит Такаясу, ревматическая полимиалгия, височный артериит, шистозомоз, гигантоклеточный артериит, аскаридоз, аспергиллоз, синдром Самптера, экзема, лимфоматоидный гранулематоз, болезнь Бехчета, синдром Каплана, болезнь Кавасаки, денге, энцефаломиелит, эндокардит, эдомиокардиальный фиброз, эндофтальмит, стойко возвышающаяся эритема, псориаз, эритробластоз плода, эозинофильный фасциит, синдром Шулльмана, синдром Фелти, филяриоз, циклит, хронический циклит, гетерохронический циклит, циклит Фукса, нефроматия IgA, пурпура Геноха-Шонлейна, болезнь «трансплантат против

хозяина», отторжение трансплантата, кардиомиопатия, синдром Итона-Ламберта, рецидивирующий полихондрит, криоглобулинемия, макроглобулинемия Вальденстрема, синдром Эванса и аутоиммунная гонадная недостаточность.

5 В некоторых вариантах реализации аутоиммунное заболевание представляет собой расстройство В-лимфоцитов (например, системная красная волчанка, синдром Гудпасчера, ревматоидный артрит и диабет I типа), Th1-лимфоцитов (например, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, псориаз, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, туберкулез или болезнь «трансплантат против хозяина») или Th2-лимфоцитов (например, atopический дерматит, системная красная волчанка, atopическая астма, риноконъюнктивит, аллергический ринит, синдром Оменна, системный склероз или хроническая болезнь «трансплантат против хозяина»). В целом, расстройства, затрагивающие дендритные клетки, включают расстройства Th1-лимфоцитов или Th2-лимфоцитов. В некоторых вариантах реализации аутоиммунное расстройство представляет собой иммунологическое расстройство, опосредованное Т-клетками.

15 В некоторых вариантах реализации количество введенного конъюгата составляет от около 0,01 до около 10 мг/кг на одну дозу. В некоторых вариантах реализации количество введенного конъюгата составляет от около 0,01 до около 5 мг/кг на одну дозу. В некоторых вариантах реализации количество введенного конъюгата составляет от около 0,05 до около 5 мг/кг на одну дозу. В некоторых вариантах реализации количество введенного конъюгата составляет от около 0,1 до около 5 мг/кг на одну дозу. В некоторых вариантах реализации количество введенного конъюгата составляет от около 0,1 до около 4 мг/кг на одну дозу. В некоторых вариантах реализации количество введенного конъюгата составляет от около 0,05 до около 3 мг/кг на одну дозу. В некоторых вариантах реализации количество введенного конъюгата составляет от около 0,1 до около 3 мг/кг на одну дозу. В некоторых вариантах реализации количество введенного конъюгата составляет от около 0,1 до около 2 мг/кг на одну дозу.

Содержание лекарственного вещества

Содержание лекарственного вещества (р) представляет собой среднее количество PBD лекарств на один клеточно-связывающий агент, например, антитело. В данном изобретении оно всегда равно 1. Однако любая композиция может содержать антитела, в которых PBD является конъюгированным, и антитела, в которых PBD является не конъюгированным. Таким образом, Для композиции содержание лекарственного вещества (или DAR) может быть меньше 1, например, 0,75 и более, 0,80 и более, 0,85 и более, 0,90 и более или 0,95 или более.

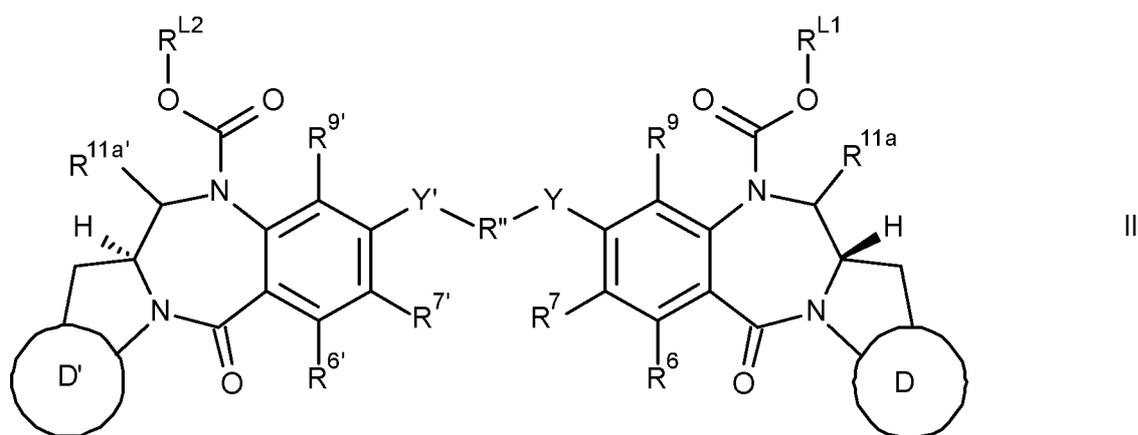
35 Общие способы синтеза

Синтез PBD соединений подробно описан в следующих ссылках, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки:

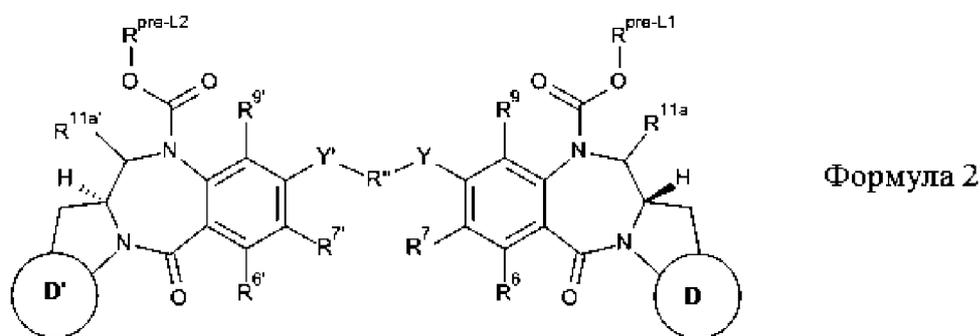
- a) WO 00/12508 (страницы 14 – 30);
- b) WO 2005/023814 (страницы 3 – 10);
- 40 c) WO 2004/043963 (страницы 28 – 29); и
- d) WO 2005/085251 (страницы 30 – 39).

Способ синтеза

Соединения по данному изобретению формулы I:



можно синтезировать из соединения Формулы 2:

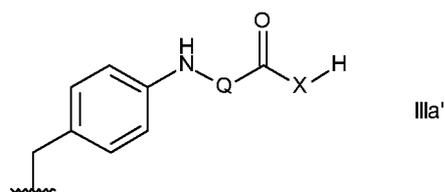


Формула 2

5

где $R^2, R^6, R^7, R^9, R^{11a}, R^{6'}, R^{7'}, R^{9'}, R^{11a'}$, Y, Y' и R'' являются такими, как определено для соединений формулы I, R^{pre-L1} является предшественником R^{L1} , и R^{pre-L2} является предшественником R^{L2} – указанный способ особенно пригоден для соединений формулы I, где R^{L1} и R^{L2} имеют формулу IIIa. Для таких соединений R^{pre-L1} и R^{pre-L2} обычно представляют собой части R^{L1} и R^{L2} , такие как группа формулы IIIa':

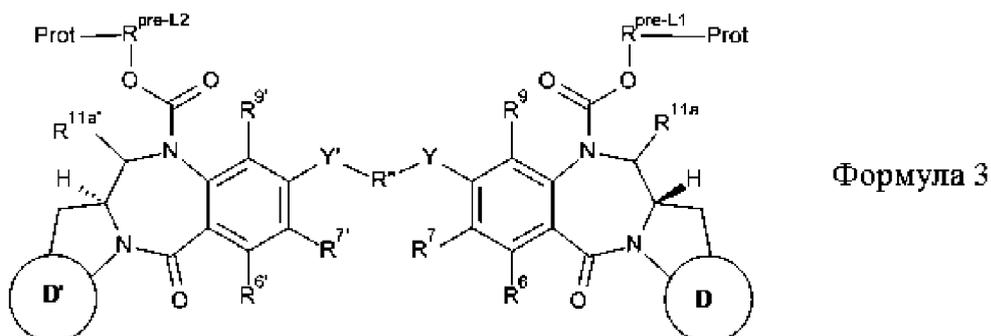
10



IIIa'

. В таком случае реакция включает присоединение группы G^L .

Соединения Формулы 2 можно получать посредством снятия защиты с соединений Формулы 3:



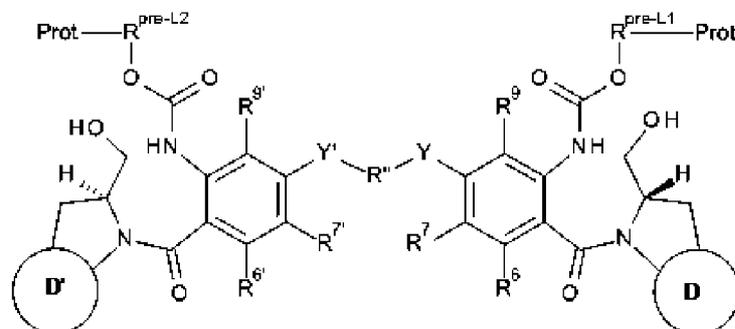
Формула 3

15

где $R^2, R^6, R^7, R^9, R^{11a}, R^{6'}, R^{7'}, R^{9'}, R^{11a'}, Y, Y'$ и R'' являются такими, как определено для соединений формулы I, $R^{pre-L1Prot}$ представляет собой защищенную версию R^{pre-L1} , $R^{pre-L2Prot}$ представляет собой защищенную версию R^{pre-L2} и Prot означает соответствующую защитную группу для карбокси/гидроксигруппы.

5

Соединения формулы 3 можно получать посредством замыкания кольца в соединениях Формулы 4:

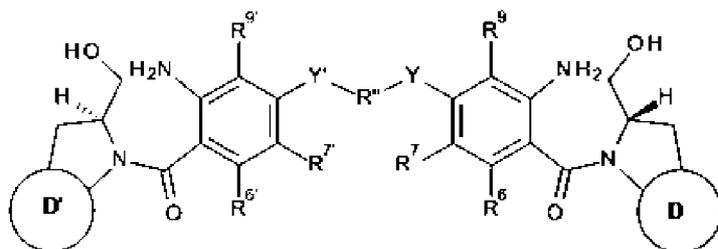


Формула 4

где указанное замыкание кольца осуществляют посредством окисления, например, по Сверну.

10

Соединения формулы 4 можно синтезировать из соединений формулы 5:



Формула 5

посредством присоединения двух защитных групп для аминогрупп. Если указанные группы являются разными, то поэтапное присоединение можно осуществлять простой защитой одной аминогруппы (например, с использованием Fmoc), с последующей установкой требуемой защитной группы на другой аминогруппе. После этого можно удалять простую защитную группу, а затем устанавливать другую требуемую защитную группу для аминогруппы.

15

20 Соединения формулы I, где R^{L1} и R^{L2} имеют формулу IIIb, можно синтезировать таким же способом, хотя можно установить всю группу R^{L1} и/или R^{L2} , исходя из соединения Формулы 5, а не использовать защищенный предшественник.

25 Соединения Формулы 5 можно синтезировать известными способами, такими как описаны в WO 2011/130598.

Синтез лекарственных конъюгатов

Антитела, как правило, можно конъюгировать с линкером лекарственного соединения, как описано в публикации Doronina et al., Nature Biotechnology, 2003, 21, 778-784). Вкратце, антитела (4-5 мг/мл) в PBS, содержащем 50 мМ бората натрия при pH 7,4, восстанавливают гидрохлоридом трис(карбоксиэтил)фосфина

30

(ТСЕР) при 37 °С. Ход реакции, в которой восстанавливают межпечечные дисульфиды, контролируют по реакции с 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислотой) и продолжают реакцию до достижения требуемого значения отношения тиолы/mAb. Затем восстановленное антитело охлаждают до 0 °С и алкилируют, используя 3 эквивалента линкера лекарственного соединения на одно антитело. Через 1 час реакцию гасят добавлением 5 эквивалентов N-ацетилцистеина. Погашенный линкер лекарственного соединения удаляют геле-фильтрацией на колонке PD-10. Затем ADC фильтруют через стерилизующий шприц-фильтр размером 0,22 мкм. Концентрацию белка можно определять спектральным анализом при 280 нм и 329 нм, соответственно, с поправкой на вклад поглощения лекарства при 280 нм. Можно использовать эксклюзионную хроматографию для определения степени агрегации антитела, и можно использовать ОФ-ВЭЖХ для определения содержания остаточного NAC-погашенного линкера лекарственного соединения.

Дополнительные предпочтения

Следующие предпочтения можно применять в отношении всех аспектов данного изобретения, описанных выше, или они могут относиться к одному аспекту. Предпочтения можно комбинировать друг с другом в любом сочетании.

R^6 , R^7 , R^9 , R^{11a} и Y' выбраны из тех же групп, что и R^6 , R^7 , R^9 , R^{11a} и Y , соответственно. В некоторых вариантах реализации R^6 , R^7 , R^9 , R^{11a} и Y' являются такими же, как R^6 , R^7 , R^9 , R^{11a} и Y , соответственно.

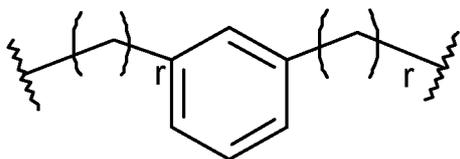
В некоторых вариантах реализации R^{12} является таким же, как R^2 .

Димерная связь

В некоторых вариантах реализации оба Y и Y' представляют собой O .

В некоторых вариантах реализации R'' представляет собой C_{3-7} алкиленовую группу без заместителей. В некоторых из таких вариантов реализации R'' представляет собой C_3 , C_5 или C_7 алкилен. В частности, R'' может представлять собой C_3 или C_5 алкилен.

В других вариантах реализации R'' представляет собой группу формулы:



где r равен 1 или 2.

$R^6 - R^9$

В некоторых вариантах реализации R^9 представляет собой H .

В некоторых вариантах реализации R^6 выбран из H , OH , OR , SH , NH_2 , нитро и галогена, и может быть выбран из H или галогена. В некоторых из таких вариантов реализации R^6 представляет собой H .

В некоторых вариантах реализации R^7 выбран из H, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR' и галогена. В некоторых из таких вариантов реализации R^7 выбран из H, OH и OR, где R выбран из необязательно замещенных C₁₋₇ алкильных, C₃₋₁₀ гетероциклических и C₅₋₁₀ арильных групп. Более предпочтительно, R может представлять собой C₁₋₄ алкильную группу, которая может быть или не быть замещенной. Пригодный

5 заместитель представляет собой C₅₋₆ арильную группу (например, фенил). Особенно предпочтительные заместители в 7-положениях представляют собой OMe и OCH₂Ph. Другие особенно пригодные заместители представляют собой диметиламино (т.е. -NMe₂); -(OC₂H₄)_qOMe, где q равен от 0 до 2; азотсодержащие C₆ гетероциклилы, включая морфолино, пиперидинил и N-метилпиперазинил.

10 Указанные варианты реализации и предпочтения относятся к R^9 , R^6 и R^7 , соответственно.

D и D'

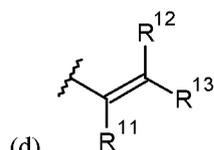
В некоторых вариантах реализации D и D' представляют собой D1 и D'1, соответственно.

15 В некоторых вариантах реализации D и D' представляют собой D2 и D'2, соответственно.

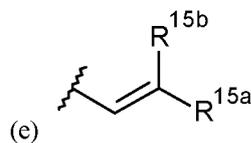
R^2

При наличии двойной связи между C2 и C3, R^2 выбран из:

- 20 (a) C₅₋₁₀ арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, содержащей: галоген, нитро, циано, простой эфир, C₁₋₇ алкил, C₃₋₇ гетероцикл и бис-окси-C₁₋₃ алкилен;
- (b) C₁₋₅ насыщенного алифатического алкила;
- (c) C₃₋₆ насыщенного циклоалкила;



25 (d) , где каждый из R^{11} , R^{12} и R^{13} независимо выбран из H, C₁₋₃ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, C₂₋₃ алкинила и циклопропила, и общее количество атомов углерода в группе R^2 составляет не более 5;



(e) , где один из R^{15a} и R^{15b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила метокси, пиридила; и тиофенила; и



30 (f) , где R^{14} выбран из: H; C₁₋₃ насыщенного алкила; C₂₋₃ алкенила; C₂₋₃ алкинила; циклопропила; фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила.

Если R^2 представляет собой C₅₋₁₀ арильную группу, он может представлять собой C₅₋₇ арильную группу. C₅₋₇ арильная группа может представлять собой фенильную группу или C₅₋₇ гетероарильную группу, например,

35 фуранил, тиофенил и пиридил. В некоторых вариантах реализации R^2 предпочтительно представляет собой

фенил. В других вариантах реализации R^2 предпочтительно представляет собой тиофенил, например, тиофен-2-ил и тиофен-3-ил.

5 Если R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, он может представлять собой C_{8-10} арил, например, группу хинолинила или изохинолинила. Группа хинолинила или изохинолинила может быть связана с ядром PBD через любое доступное кольцевое положение. Например, хинолинил может представлять собой хинолин-2-ил, хинолин-3-ил, хинолин-4-ил, хинолин-5-ил, хинолин-6-ил, хинолин-7-ил и хинолин-8-ил. Из них предпочтительными могут быть хинолин-3-ил и хинолин-6-ил. Изохинолин может представлять собой изохинолин-1-ил, изохинолин-3-ил, изохинолин-4-ил, изохинолин-5-ил, изохинолин-6-ил, изохинолин-7-ил и изохинолин-8-ил. Из них предпочтительными могут быть изохинолин-3-ил и изохинолин-6-ил.

10 Если R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, он может представлять иметь любое количество групп заместителей. Предпочтительно, он содержит от 1 до 3 групп заместителей, более предпочтительно 1 и 2 группы заместителей, и наиболее предпочтительными являются однократно замещенные группы. Заместители могут быть в любом положении.

15 Если R^2 представляет собой C_{5-7} арильную группу, то единственный заместитель предпочтительно находится у кольцевого атома, который не является смежным со связью с остальной частью соединения, т.е. он предпочтительно находится в положении β или γ относительно связи с остальной частью соединения. Таким образом, если C_{5-7} арильная группа представляет собой фенил, то заместитель предпочтительно находится в мета- или пара-положениях, и более предпочтительно находится в пара-положении.

20 Если R^2 представляет собой C_{8-10} арильную группу, например, хинолинил или изохинолинил, он может содержать любое количество заместителей в любом положении хинолинового или изохинолинового кольца. В некоторых вариантах реализации он содержит один, два или три заместителя, и они могут быть расположены либо в ближнем, либо в дальнем кольце, либо в обоих кольцах (при наличии более чем одного заместителя).

Заместители R^2 , если R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу

30 Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой галоген, то он предпочтительно представляет собой F или Cl, более предпочтительно Cl.

35 Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой простоя эфир, то в некоторых вариантах реализации он может представлять собой алкокси-группу, например, C_{1-7} алкокси-группу (например, метокси, этокси) или в некоторых вариантах реализации может представлять собой C_{5-7} арилокси-группу (например, фенокси, пиридилокси, фуранилокси). Сама алкокси-группа может быть дополнительно замещена, например, аминогруппой (например, диметиламино).

40 Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой C_{1-7} алкил, то он может предпочтительно представлять собой C_{1-4} алкильную группу (например, метил, этил, пропил, бутил).

Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой C_{3-7} гетероцикл, то в некоторых вариантах реализации он может представлять собой C_6 азотсодержащую гетероциклическую группу, например, морфолино, тиоморфолино, пиперидинил, пиперазинил. Указанные группы могут быть связаны с остальной частью фрагмента PBD через атом азота. Указанные группы могут
5 быть дополнительно замещены, например, C_{1-4} алкильными группами. Если C_6 азотсодержащая гетероциклическая группа представляет собой пиперазинил, то указанный дополнительный заместитель может быть расположен у второго кольцевого атома азота.

Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой бис-окси- C_{1-3}
10 алкилен, то он предпочтительно представляет собой бис-окси-метилен или бис-окси-этилен.

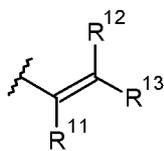
Если заместитель в R^2 , когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой сложный эфир, то он предпочтительно представляет собой метиловый эфир или этиловый эфир.

15 Особенно предпочтительные заместители, если R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, включают метокси, этокси, фтор, хлор, циано, бис-окси-метилен, метилпиперазинил, морфолино и метилтиофенил. Другие особенно предпочтительные заместители для R^2 представляют собой диметиламинопропилокси и карбоксокси.

20 Особенно предпочтительные замещенные группы R^2 , если R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, включают, но не ограничиваются этим, 4-метоксифенил, 3-метоксифенил, 4-этоксифенил, 3-этоксифенил, 4-фторфенил, 4-хлорфенил, 3,4-бис-оксиметилен-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 группа R^{12} представляет собой 4-нитрофенил. Группы R^{12} ,
25 представляющие особый интерес, включают 4-(4-метилпиперазин-1-ил)фенил и 3,4-бис-оксиметилен-фенил.

Если R^2 представляет собой C_{1-5} насыщенный алифатический алкил, он может представлять собой метил, этил, пропил, бутил или пентил. В некоторых вариантах реализации он может представлять собой метил, этил или пропил-(н-пентил или изопропил). В некоторых из таких вариантов реализации он может
30 представлять собой метил. В других вариантах реализации он может представлять собой бутил или пентил, который может быть линейным или разветвленным.

Если R^2 представляет собой C_{3-6} насыщенный циклоалкил, он может представлять собой циклопропил, циклобутил, циклопентил или циклогексил. В некоторых вариантах реализации он может представлять
35 собой циклопропил.



Если R^2 представляет собой _____, то каждый из R^{11} , R^{12} и R^{13} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее количество атомов углерода в группе R^2 составляет не более 5. В некоторых вариантах реализации общее количество атомов

углерода в группе R^2 составляет не более 4 или не более 3.

В некоторых вариантах реализации один из R^{11} , R^{12} и R^{13} представляет собой H, а другие две группы выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

5

В других вариантах реализации два из R^{11} , R^{12} и R^{13} представляют собой H, а другая группа выбрана из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

В некоторых вариантах реализации группы, которые не представляют собой H, выбраны из метила и этила.

10 В некоторых из таких вариантов реализации группы, которые не представляют собой H, представляют собой метил.

В некоторых вариантах реализации R^{11} представляет собой H.

15 В некоторых вариантах реализации R^{12} представляет собой H.

В некоторых вариантах реализации R^{13} представляет собой H.

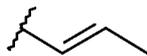
В некоторых вариантах реализации R^{11} и R^{12} представляют собой H.

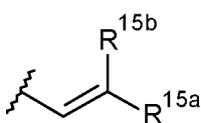
20

В некоторых вариантах реализации R^{11} и R^{13} представляют собой H.

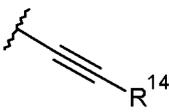
В некоторых вариантах реализации R^{12} и R^{13} представляют собой H.

25 Особенно предпочтительная группа R^2 представляет собой:



Если R^2 представляет собой , то один из R^{15a} и R^{15b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила метокси; пиридила; и тиофенила. В некоторых вариантах реализации группа, которая не представляет собой H, представляет собой необязательно замещенный фенил. Если необязательный заместитель фенила представляет собой галоген, то он предпочтительно представляет собой фтор. В некоторых вариантах реализации фенильная группа является незамещенной.

30

Если R^2 представляет собой , то R^{14} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила. Если необязательный заместитель фенила представляет собой галоген, то

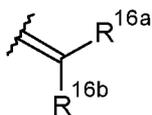
35

он предпочтительно представляет собой фтор. В некоторых вариантах реализации фенильная группа является незамещенной.

В некоторых вариантах реализации R^{14} выбран из H, метила, этила, этенила и этинила. В некоторых из таких вариантов реализации R^{14} выбран из H и метила.

5

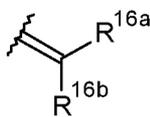
При наличии одинарной связи между C2 и C3,



R^2 представляет собой H или $\text{---} \text{C} = \text{C} \begin{matrix} \text{---} \text{R}^{16a} \\ \text{---} \text{R}^{16b} \end{matrix}$, где R^{16a} и R^{16b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, и указанные алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламида и сложного C_{1-4} алкилового эфира; или если один из R^{16a} и R^{16b} представляет собой H, то другой выбран из нитрила и сложного C_{1-4} алкилового эфира.

10

В некоторых вариантах реализации R^2 представляет собой H.



В некоторых вариантах реализации R^2 представляет собой

15

В некоторых вариантах реализации предпочтительно, что оба R^{16a} и R^{16b} представляют собой H.

В других вариантах реализации предпочтительно, что оба R^{16a} и R^{16b} представляют собой метил.

20 В дополнительных вариантах реализации предпочтительно, что один из R^{16a} и R^{16b} представляет собой H, а другой выбран из C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, и указанные алкильные и алкенильные группы являются необязательно замещенными. В указанном дополнительном варианте реализации может быть дополнительно предпочтительно, что группа, которая не представляет собой H, выбрана из метила и этила.

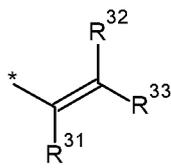
25 R^{22}

При наличии двойной связи между C2' и C3', R^{22} выбран из:

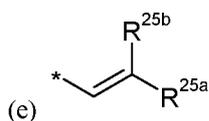
(a) C_{5-10} арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, содержащей: галоген, нитро, циано, простой эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероцикл и бис-окси- C_{1-3} алкилен;

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

(c) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;



(d) $\text{---} \text{C} = \text{C} \begin{matrix} \text{---} \text{R}^{32} \\ \text{---} \text{R}^{33} \end{matrix}$, где каждый из R^{31} , R^{32} и R^{33} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, и общее количество атомов углерода в группе R^{22} составляет не более 5;



, где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила метокси; пиридила; и тиофенила; и



, где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила.

5

Если R^{22} представляет собой C_{5-10} арильную группу, он может представлять собой C_{5-7} арильную группу. C_{5-7} арильная группа может представлять собой фенильную группу или C_{5-7} гетероарильную группу, например, фуранил, тиофенил и пиридил. В некоторых вариантах реализации R^{22} предпочтительно представляет собой фенил. В других вариантах реализации R^{22} предпочтительно представляет собой тиофенил, например, тиофен-2-ил и тиофен-3-ил.

10

Если R^{22} представляет собой C_{5-10} арильную группу, он может представлять собой C_{8-10} арил, например, группу хинолинила или изохинолинила. Группа хинолинила или изохинолинила может быть связана с ядром PBD через любое доступное кольцевое положение. Например, хинолинил может представлять собой хинолин-2-ил, хинолин-3-ил, хинолин-4-ил, хинолин-5-ил, хинолин-6-ил, хинолин-7-ил и хинолин-8-ил. Из них предпочтительными могут быть хинолин-3-ил и хинолин-6-ил. Изохинолин может представлять собой изохинолин-1-ил, изохинолин-3-ил, изохинолин-4-ил, изохинолин-5-ил, изохинолин-6-ил, изохинолин-7-ил и изохинолин-8-ил. Из них предпочтительными могут быть изохинолин-3-ил и изохинолин-6-ил.

15

20

Если R^{22} представляет собой C_{5-10} арильную группу, он может представлять иметь любое количество групп заместителей. Предпочтительно, он содержит от 1 до 3 групп заместителей, более предпочтительно 1 и 2 группы заместителей, и наиболее предпочтительными являются однократно замещенные группы. Заместители могут быть в любом положении.

25

Если R^{22} представляет собой C_{5-7} арильную группу, то единственный заместитель предпочтительно находится у кольцевого атома, который не является смежным со связью с остальной частью соединения, т.е. он предпочтительно находится в положении β или γ относительно связи с остальной частью соединения. Таким образом, если C_{5-7} арильная группа представляет собой фенил, то заместитель предпочтительно находится в мета- или пара-положениях, и более предпочтительно находится в пара-положении.

30

Если R^{22} представляет собой C_{8-10} арильную группу, например, хинолинил или изохинолинил, он может содержать любое количество заместителей в любом положении хинолинового или изохинолинового кольца. В некоторых вариантах реализации он содержит один, два или три заместителя, и они могут быть расположены либо в ближнем, либо в дальнем кольце, либо в обоих кольцах (при наличии более чем одного заместителя).

35

Заместители R^{22} , если R^{22} представляет собой C_{5-10} арильную группу

Если заместитель в R^{22} , когда R^{22} представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой галоген, то

он предпочтительно представляет собой F или Cl, более предпочтительно Cl.

5 Если заместитель в R^{22} , когда R^{22} представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой простоя эфир, то в некоторых вариантах реализации он может представлять собой алкокси-группу, например, C_{1-7} алкокси-группу (например, метокси, этокси) или в некоторых вариантах реализации может представлять собой C_{5-7} арилокси-группу (например, фенокси, пиридилокси, фуранилокси). Сама алкокси-группа может быть дополнительно замещена, например, аминогруппой (например, диметиламино).

10 Если заместитель в R^{22} , когда R^{22} представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой C_{1-7} алкил, то он может предпочтительно представлять собой C_{1-4} алкильную группу (например, метил, этил, пропил, бутил).

15 Если заместитель в R^{22} , когда R^{22} представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой C_{3-7} гетероцикл, то в некоторых вариантах реализации он может представлять собой C_6 азотсодержащую гетероциклическую группу, например, морфолино, тиоморфолино, пиперидинил, пиперазинил. Указанные группы могут быть связаны с остальной частью фрагмента PBD через атом азота. Указанные группы могут быть дополнительно замещены, например, C_{1-4} алкильными группами. Если C_6 азотсодержащая гетероциклическая группа представляет собой пиперазинил, то указанный дополнительный заместитель может быть расположен у второго кольцевого атома азота.

20 Если заместитель в R^{22} , когда R^{22} представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой бис-окси- C_{1-3} алкилен, то он предпочтительно представляет собой бис-окси-метилен или бис-окси-этилен.

25 Если заместитель в R^{22} , когда R^{22} представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой сложный эфир, то он предпочтительно представляет собой метиловый эфир или этиловый эфир.

30 Особенно предпочтительные заместители, если R^{22} представляет собой C_{5-10} арильную группу, включают метокси, этокси, фтор, хлор, циано, бис-окси-метилен, метилпиперазинил, морфолино и метилтиофенил. Другие, особенно предпочтительные, заместители для R^{22} представляют собой диметиламинопропилокси и карбоксокси.

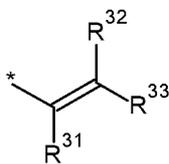
35 Особенно предпочтительные замещенные группы R^{22} , если R^{22} представляет собой C_{5-10} арильную группу, включают, но не ограничиваются этим, 4-метоксифенил, 3-метоксифенил, 4-этоксифенил, 3-этоксифенил, 4-фторфенил, 4-хлорфенил, 3,4-бис-оксиметилен-фенил, 4-метилтиофенил, 4-цианофенил, 4-феноксифенил, хинолин-3-ил и хинолин-6-ил, изохинолин-3-ил и изохинолин-6-ил, 2-тиенил, 2-фуранил, метоксинафтил и нафтил. Другая возможная замещенная группа R^{22} представляет собой 4-нитрофенил. Группы R^{22} , представляющие особый интерес, включают 4-(4-метилпиперазин-1-ил)фенил и 3,4-бис-оксиметилен-фенил.

40 Если R^{22} представляет собой C_{1-5} насыщенный алифатический алкил, он может представлять собой метил, этил, пропил, бутил или пентил. В некоторых вариантах реализации он может представлять собой метил, этил или пропил-(н-пентил или изопропил). В некоторых из таких вариантов реализации он может представлять собой метил. В других вариантах реализации он может представлять собой бутил или пентил,

который может быть линейным или разветвленным.

Если R^{22} представляет собой C_{3-6} насыщенный циклоалкил, он может представлять собой циклопропил, циклобутил, циклопентил или циклогексил. В некоторых вариантах реализации он может представлять собой циклопропил.

5



Если R^{22} представляет собой C_{2-3} насыщенный алкил, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее количество атомов углерода в группе R^{22} составляет не более 5. В некоторых вариантах реализации общее количество атомов углерода в группе R^{22} составляет не более 4 или не более 3.

10

В некоторых вариантах реализации один из R^{31} , R^{32} и R^{33} представляет собой H, а другие две группы выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

В других вариантах реализации два из R^{31} , R^{32} и R^{33} представляют собой H, а другая группа выбрана из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

15

В некоторых вариантах реализации группы, которые не представляют собой H, выбраны из метила и этила. В некоторых из таких вариантов реализации группы, которые не представляют собой H, представляют собой метил.

20

В некоторых вариантах реализации R^{31} представляет собой H.

В некоторых вариантах реализации R^{32} представляет собой H.

25

В некоторых вариантах реализации R^{33} представляет собой H.

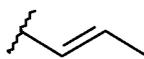
В некоторых вариантах реализации R^{31} и R^{32} представляют собой H.

В некоторых вариантах реализации R^{31} и R^{33} представляют собой H.

30

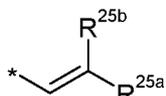
В некоторых вариантах реализации R^{32} и R^{33} представляют собой H.

Особенно предпочтительная группа R^{22} представляет собой:



35

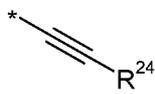
Если R^{22} представляет собой C_{2-3} насыщенный алкил, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее количество атомов углерода в группе R^{22} составляет не более 5. В некоторых вариантах реализации общее количество атомов углерода в группе R^{22} составляет не более 4 или не более 3.

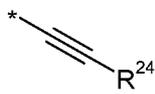


Если R^{22} представляет собой C_{2-3} насыщенный алкил, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее количество атомов углерода в группе R^{22} составляет не более 5. В некоторых вариантах реализации общее количество атомов углерода в группе R^{22} составляет не более 4 или не более 3.

из: фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила метокси; пиридила; и тифенила. В некоторых вариантах реализации группа, которая не представляет собой H, представляет собой необязательно замещенный фенил. Если необязательный заместитель фенила представляет собой галоген, то он предпочтительно представляет собой фтор. В некоторых вариантах реализации фенильная группа является незамещенной.

5

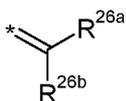


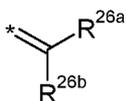
Если R^{22} представляет собой , то R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тифенила. Если необязательный заместитель фенила представляет собой галоген, то он предпочтительно представляет собой фтор. В некоторых вариантах реализации фенильная группа является незамещенной.

10

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

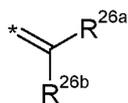
15 При наличии одинарной связи между $C2'$ и $C3'$,

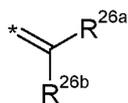


R^{22} представляет собой H или , где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, и указанные алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламида и сложного C_{1-4} алкилового эфира; или если один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, то другой выбран из нитрила и сложного C_{1-4} алкилового эфира.

20

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



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

25 В некоторых вариантах реализации предпочтительно, что оба R^{26a} и R^{26b} представляют собой H.

В других вариантах реализации предпочтительно, что оба R^{26a} и R^{26b} представляют собой метил.

30 В дополнительных вариантах реализации предпочтительно, что один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, а другой выбран из C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, и указанные алкильные и алкенильные группы являются необязательно замещенными. В указанном дополнительном варианте реализации может быть дополнительно предпочтительно, что группа, которая не представляет собой H, выбрана из метила и этила.

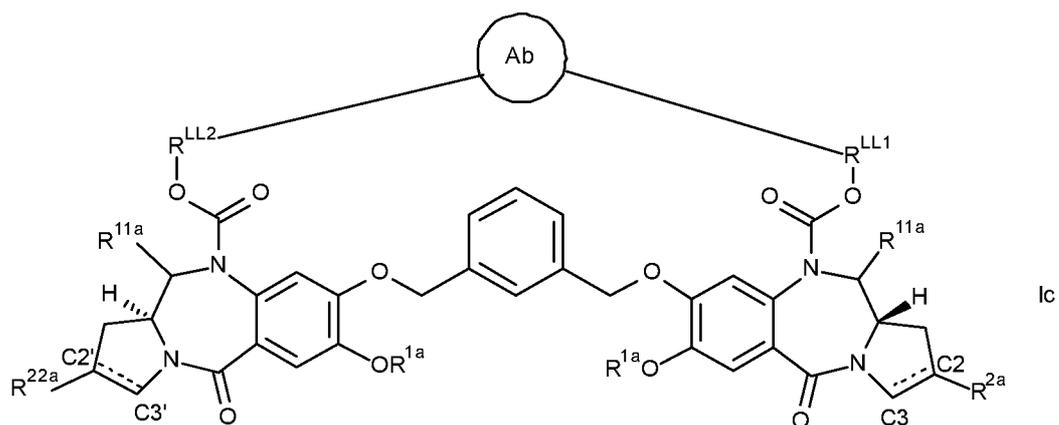
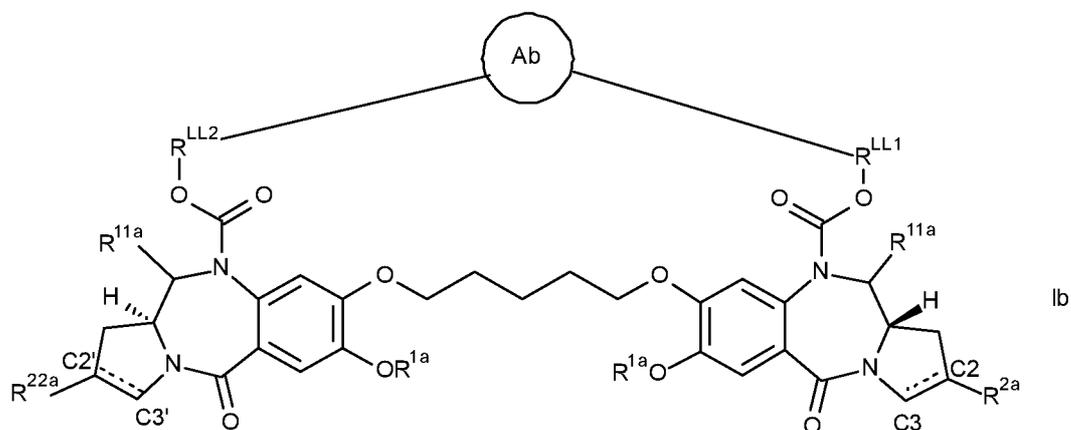
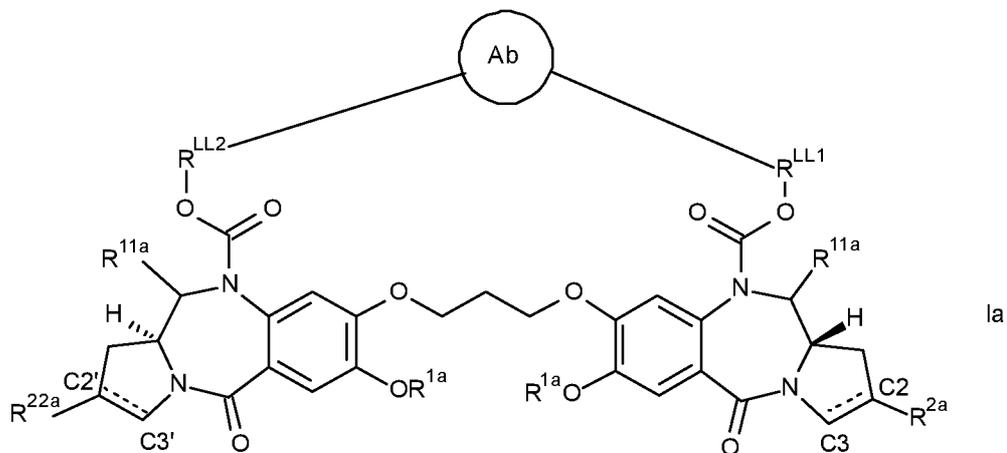
R^{11}

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

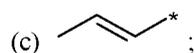
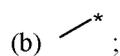
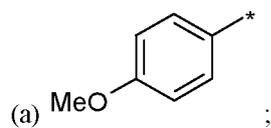
В некоторых вариантах реализации R^{11a} представляет собой OR^A , где R^A представляет собой C_{1-4} алкил. В

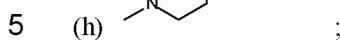
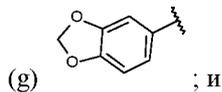
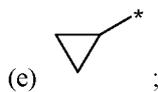
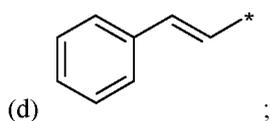
некоторых из таких вариантов реализации R^A представляет собой метил.

В некоторых вариантах реализации первого аспекта данного изобретения предложены соединения формулы Ia-1, Ia-2 или Ia-3:



5 где R^{2a} и R^{22a} являются одинаковыми и выбраны из:





R^{1a} выбран из метила и бензила;

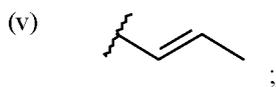
R^{LL1} , R^{LL2} и R^{11a} являются такими, как определено выше.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения и R^2 , и R^{22} содержат не более 3 атомов углерода.

10

В тех вариантах реализации, в которых между C2 и C3 присутствует двойная связь, R^2 может быть выбран из:

(i) метил;



(ii) этила;



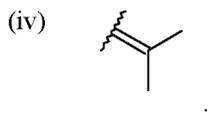
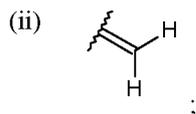
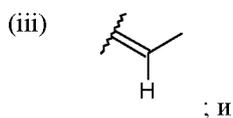
(iii) пропила;



(iv) циклопропила;

В тех вариантах реализации, в которых между C2 и C3 нет двойной связи, R^2 может быть выбран из:

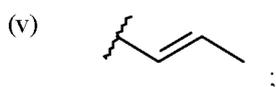
(i) H;

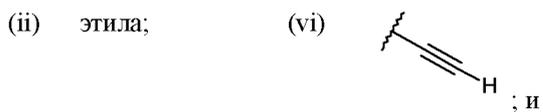


15

В тех вариантах реализации, в которых между C2' и C3' присутствует двойная связь, R^{22} может быть выбран из:

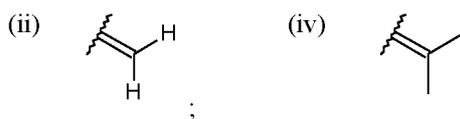
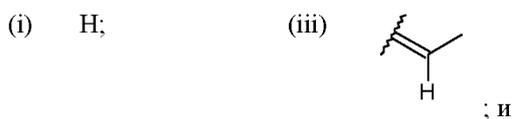
(i) метила;





(iv) циклопропила;

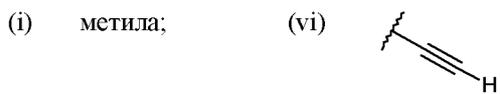
В тех вариантах реализации, в которых между C2' и C3' нет двойной связи, R²² может быть выбран из:



В некоторых из таких вариантов реализации и R², и R²² содержат не более 2 атомов углерода.

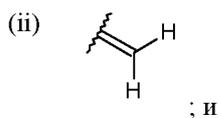
5

В тех вариантах реализации, в которых между C2 и C3 присутствует двойная связь, R² может быть выбран из:



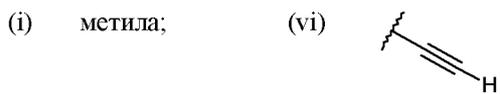
(ii) этила; и

В тех вариантах реализации, в которых между C2 и C3 нет двойной связи, R² может быть выбран из:



10

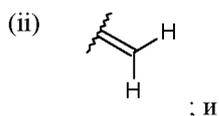
В тех вариантах реализации, в которых между C2' и C3' присутствует двойная связь, R²² может быть выбран из:



(ii) этила; и

В тех вариантах реализации, в которых между C2' и C3' нет двойной связи, R²² может быть выбран из:





В следующих из таких вариантов реализации и R^2 , и R^{22} содержат не более 1 атома углерода.

5 В тех вариантах реализации, в которых между $C2$ и $C3$ присутствует двойная связь, R^2 может представлять собой метил. В тех вариантах реализации, в которых между $C2$ и $C3$ нет двойной связи, R^2 может быть выбран из:



10 В тех вариантах реализации, в которых между $C2'$ и $C3'$ присутствует двойная связь, R^{22} может представлять собой метил. В тех вариантах реализации, в которых между $C2'$ и $C3'$ нет двойной связи, R^{22} может быть выбран из:



15 Не ограничиваясь теорией, если заместитель в положении $C2$ димеров PBD является небольшим, то использование глюкуронового кэп-звена в таких линкерах лекарственных соединений предпочтительно является особенно преимущественным, поскольку оно может увеличивать гидрофильность линкера лекарственного соединения, упрощая конъюгацию линкеров лекарственных соединений со звеном лиганда.

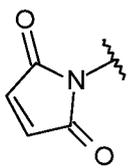
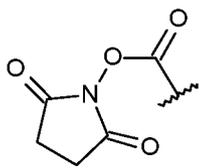
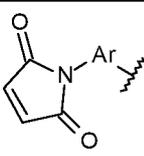
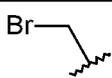
Указанные варианты реализации и предпочтения также относятся ко второму аспекту данного изобретения.

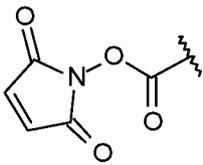
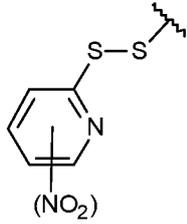
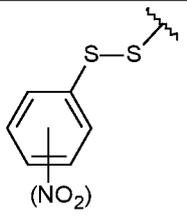
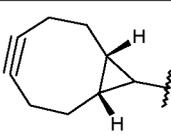
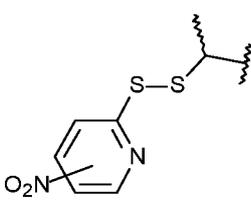
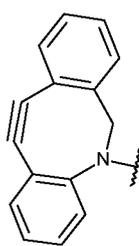
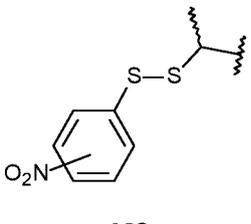
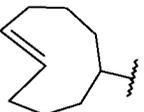
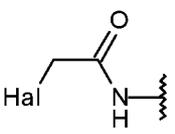
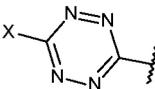
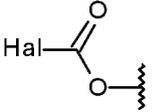
Линкер (R^L/R^{LL})

20 В некоторых вариантах реализации R^{LL1} и R^{LL2} имеют формулу IIIa'.
В некоторых вариантах реализации R^{L1} и R^{L2} имеют формулу IIIa.

G^L

G^L может быть выбран из

(G^{L1-1}) 1)		(G^{L6})	
(G^{L1-2}) 2)		(G^{L7})	

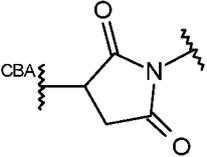
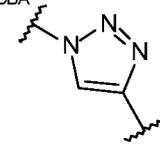
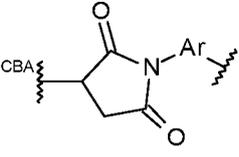
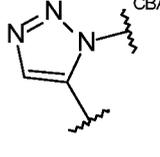
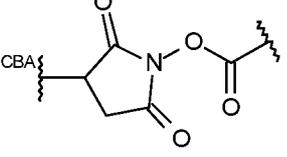
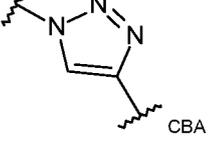
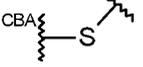
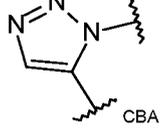
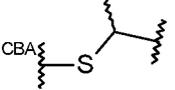
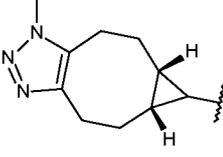
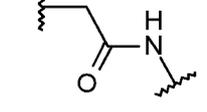
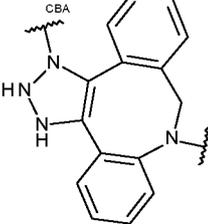
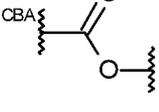
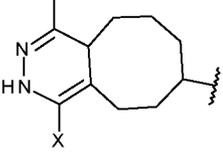
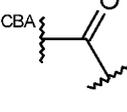
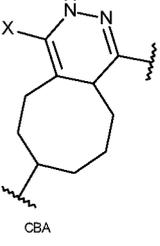
(G ^{L2})		(G ^{L8})	
(G ^{L3-} 1)	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L9})	
(G ^{L3-} 2)	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L10})	
(G ^{L3-} 3)	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L11})	
(G ^{L3-} 4)	 где группа NO ₂ является необязательной	(G ^{L12})	
(G ^{L4})	 где Hal = I, Br, Cl	(G ^{L13})	
(G ^{L5})			

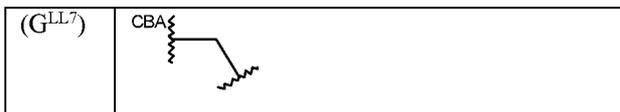
где Ar представляет собой C₅₋₆ ариленовую группу, например, фенилен, и X представляет собой C¹⁻⁴ алкил.

В некоторых вариантах реализации G^L выбран из G^{L1-1} и G^{L1-2}. В некоторых из таких вариантов реализации G^L представляет собой G^{L1-1}.

G^{LL}

G^{LL} может быть выбран из:

(G^{LL1-1}) 1)		(G^{LL8-1})	
(G^{LL1-2}) 2)		(G^{LL8-2})	
(G^{LL2})		(G^{LL9-1})	
(G^{LL3-1}) 1)		(G^{LL9-2})	
(G^{LL3-2}) 2)		G^{L10}	
(G^{LL-4})		G^{L11}	
(G^{LL5})		G^{L12}	
(G^{LL6})		G^{L13}	



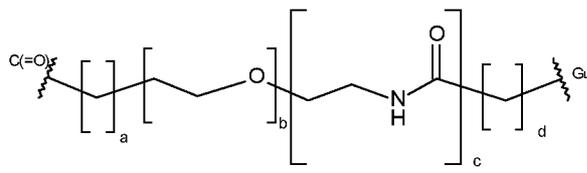
где Ar представляет собой C_{5-6} ариленовую группу, например, фенилен, и X представляет собой C^{1-4} алкил.

В некоторых вариантах реализации G^{LL} выбран из G^{LL1-1} и G^{LL1-2} . В некоторых из таких вариантов реализации G^{LL} представляет собой G^{LL1-1} .

5

X

X представляет собой:



где $a =$ от 0 до 5, $b =$ от 0 до 16, $c = 0$ или 1, $d =$ от 0 до 5.

10

a может быть равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах реализации a равен от 0 до 3. В некоторых из таких вариантов реализации a равен 0 или 1. В дополнительных вариантах реализации a равен 0.

15

b может быть равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16. В некоторых вариантах реализации b равен от 0 до 12. В некоторых из таких вариантов реализации b равен от 0 до 8, и может быть равен 0, 2, 4 или 8.

c может быть равен 0 или 1.

20

d может быть равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах реализации d равен от 0 до 3. В некоторых из таких вариантов реализации d равен 1 или 2. В дополнительных вариантах реализации d равен 2.

В некоторых вариантах реализации группы X, a равен 0, c равен 1, и d равен 2, и b может быть равен от 0 до 8. В некоторых из таких вариантов реализации b равен 0, 4 или 8.

25

Q^X

В одном варианте реализации Q^X представляет собой остаток аминокислоты. Аминокислота может быть природной аминокислотой или неприродной аминокислотой.

30

В одном варианте реализации Q^X выбран из: Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp, где Cit представляет собой цитруллин.

35

В одном варианте реализации Q^X содержит дипептидный остаток. Аминокислоты в дипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. В некоторых вариантах реализации дипептид содержит природные аминокислоты. Если линкер представляет собой катепсин-подвижный линкер, то дипептид представляет собой место действия катепсин-опосредованного расщепления. В таком случае дипептид представляет собой сайт распознавания для катепсина.

В одном варианте реализации Q^X выбран из:

- 5 CO-Phe-Lys-NH,
 CO-Val-Ala-NH,
 CO-Val-Lys-NH,
 CO-Ala-Lys-NH,
 CO-Val-Cit-NH,
 CO-Phe-Cit-NH,
10 CO-Leu-Cit-NH,
 CO-Ile-Cit-NH,
 CO-Phe-Arg-NH, и
 CO-Trp-Cit-NH,

где Cit представляет собой цитруллин.

15 Предпочтительно, Q^X выбран из:

- CO-Phe-Lys-NH,
 CO-Val-Ala-NH,
 CO-Val-Lys-NH,
 CO-Ala-Lys-NH,
20 CO-Val-Cit-NH.

Наиболее предпочтительно, Q^X выбран из CO-Phe-Lys-NH, CO-Val-Cit-NH и CO-Val-Ala-NH.

Другие перспективные дипептидные комбинации включают:

- 25 CO-Gly-Gly-NH,
 CO-Pro-Pro-NH, и
 CO-Val-Glu-NH.

30 Можно использовать другие дипептидные комбинации, включая комбинации, описанные в публикации Dubowchik et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13,855-869, включенной в данный документ посредством ссылки.

35 В некоторых вариантах реализации Q^X представляет собой трипептидный остаток. Аминокислоты в трипептиде могут представлять собой любую комбинацию природных аминокислот и неприродных аминокислот. В некоторых вариантах реализации трипептид содержит природные аминокислоты. Если линкер представляет собой катепсин-подвижный линкер, то трипептид представляет собой место действия катепсин-опосредованного расщепления. В таком случае трипептид представляет собой сайт распознавания для катепсина.

40 В одном варианте реализации боковая цепь аминокислоты является химически защищенной, если это необходимо. Защитная группа боковой цепи может представлять собой группу, описанную ниже. Защищенные аминокислотные последовательности могут расщепляться ферментами. Например,

дипептидная последовательность, содержащая остаток Lys с Вос-защищенной боковой цепью, расщепляется катепсином.

5 Защитные группы для боковых цепей аминокислот хорошо известны в данной области техники и описаны в каталоге Novabiochem, а также описаны выше в данном документе.

В некоторых вариантах реализации R^{LL1} и R^{LL2} имеют формулу IIIb'.

В некоторых вариантах реализации R^{L1} и R^{L2} имеют формулу IIIb.

10 R^{SL1} и R^{SL2} независимо выбраны из H и метила, или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу.

В некоторых вариантах реализации оба R^{SL1} и R^{SL2} представляют собой H.

15 В некоторых вариантах реализации R^{SL1} представляет собой H, и R^{SL2} представляет собой метил.

В некоторых вариантах реализации оба R^{SL1} и R^{SL2} представляют собой метил.

20 В некоторых вариантах реализации R^{SL1} и R^{L2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу.

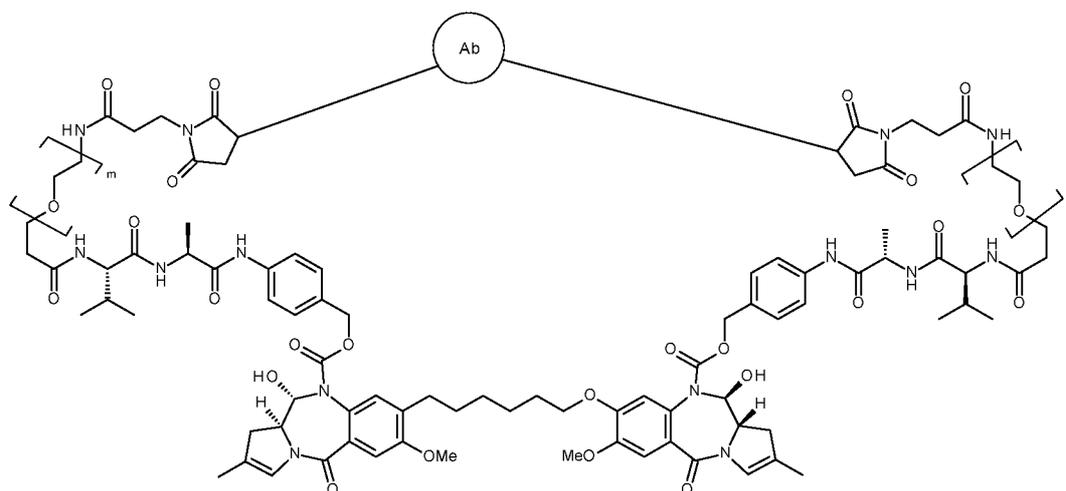
В некоторых вариантах реализации R^{SL1} и R^{SL2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.

25 В некоторых вариантах реализации в группе IIIb ϵ равен 0. В других вариантах реализации ϵ равен 1, и нитрогруппа может быть в любом доступном положении кольца. В некоторых из таких вариантов реализации она находится в орто-положении. В других из таких вариантов реализации она находится в пара-положении.

30 В некоторых вариантах реализации R^{L1} и R^{L2} являются одинаковыми.

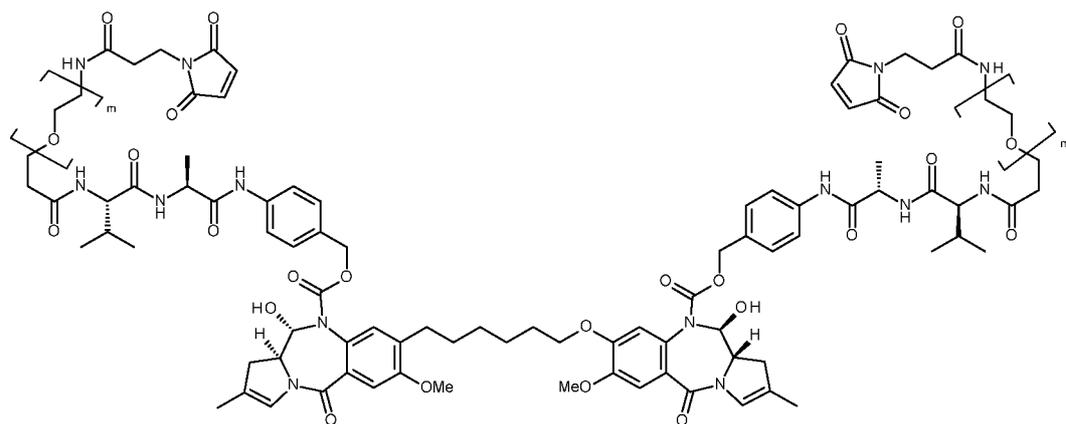
В некоторых вариантах реализации R^{LL1} и R^{LL2} являются одинаковыми.

В одном конкретном варианте реализации первый аспект данного изобретения включает конъюгат формулы Id:



где m представляет собой целое число от 2 до 8.

5 В одном конкретном варианте реализации второго аспекта данного изобретения линкер лекарственного соединения (D^L) имеет формулу (Id^1):



где

m представляет собой целое число от 2 до 8.

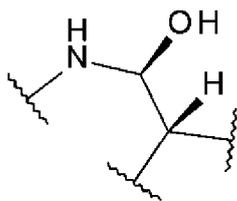
В некоторых вариантах реализации R^{L1} и R^{L2} являются разными.

10 В некоторых вариантах реализации R^{LL1} и R^{LL2} являются разными.

В частности, в тех вариантах реализации, в которых линкерные группы являются различными, указанные различия могут быть только в группах γ , так что остальные линкерные группы являются одинаковыми (поэтому инициаторы расщепления являются одинаковыми).

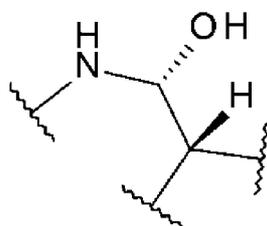
15

В некоторых вариантах реализации данного изобретения заместитель $C11$ может быть в следующем стереохимическом положении относительно соседних групп:



5

В других вариантах реализации заместитель C11 может быть в следующем стереохимическом положении относительно соседних групп:



10

Соединения, представляющие собой особый интерес, включают соединения, описанные в примерах.

Примеры

Флэш-хроматографию проводили с использованием силикагеля под давлением. Чистоту фракций проверяли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ), используя силикагель Merck Kieselgel 60 F254, с флуоресцентным индикатором на алюминиевых пластинах. Визуализацию ТСХ осуществляли с помощью УФ света или паров йода, если не указано иное. Растворители для экстракции и хроматографии приобретали и использовали без дополнительной очистки у компании VWR, Великобритания. Все химические реактивы приобретали у компании Sigma-Aldrich, если не указано иное. Пэгелированные реагенты приобретали у компании Quanta biodesign, США, через компанию Stratech, Великобритания, или у компании Pierce Scientific, через компанию Thermo Fisher.

^1H и ^{13}C ЯМР спектры записывали на спектрометре Bruker Avance® 400. Константы связывания записывали в герцах (Гц). Химические сдвиги записывали в миллионных долях (м.д.) в сторону слабого поля относительно сигнала тетраметилсилана. Спиновые мультиплетности записывали как с (синглет), шс (широкий синглет), д (дублет), т (триплет) и м (мультиплет).

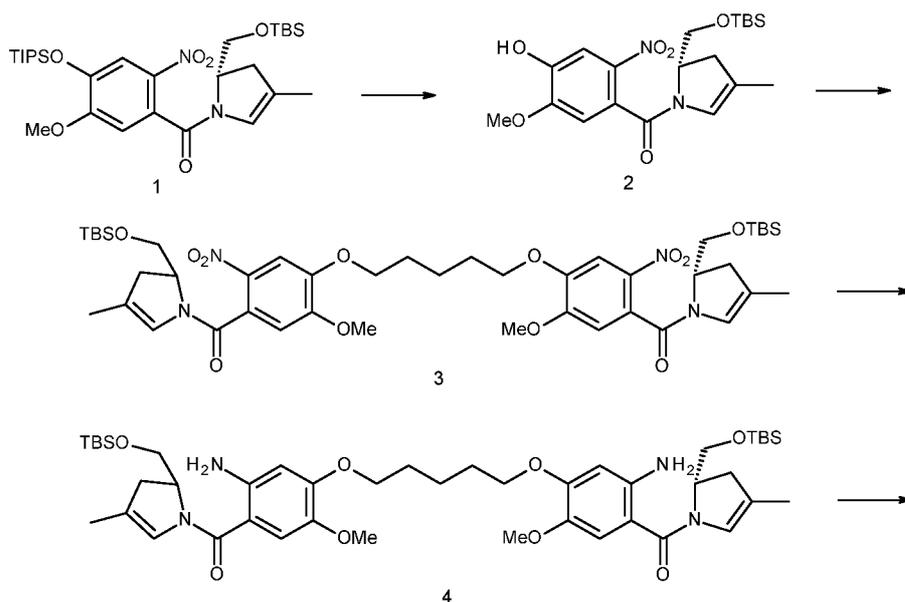
Использовали следующие условия аналитической ЖХ/МС (для проверки хода реакции и определения чистоты): Электрораспылительную масс-спектрометрию в режиме положительной ионизации проводили на приборе Shimadzu Nexera®/Prominence® LCMS-2020. В качестве подвижных фаз использовали растворитель А (H_2O с 0,1% муравьиной кислоты) и растворитель В (CH_3CN с 0,1% муравьиной кислоты). Градиент для обычной записи хроматограммы за 3 минуты: первоначальное содержание 5% В выдерживали

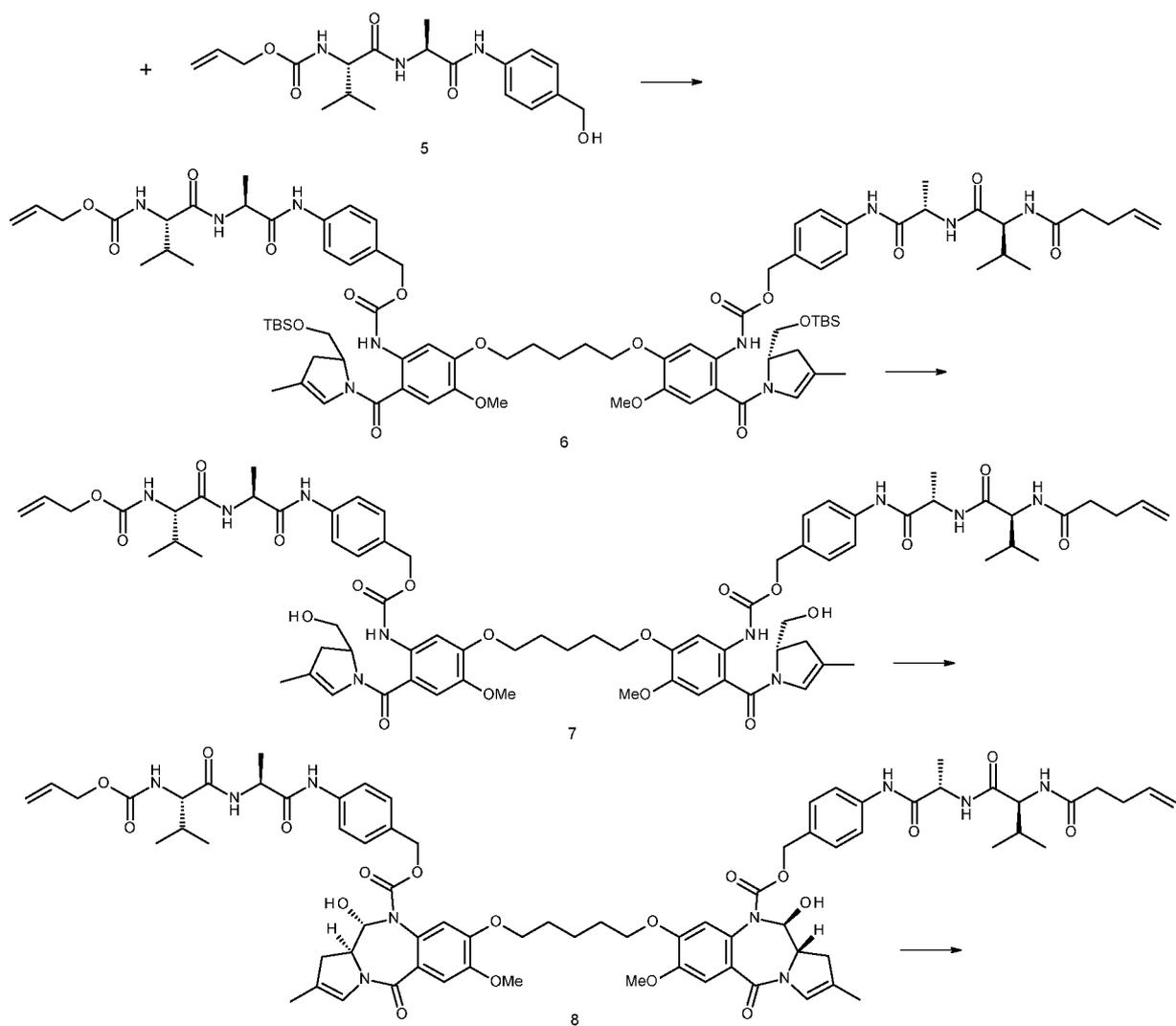
в течение 25 секунд, затем повышали от 5% В до 100% В за 1 минуту 35 секунд. Такое содержание выдерживали в течение 50 секунд при 100% В, затем возвращали к 5% В за 5 секунд и выдерживали в течение 5 секунд. Общая продолжительность градиентного цикла составляла 3,0 минуты. Градиент для записи хроматограммы за 15 минут: первоначальное содержание 5% В выдерживали в течение 1,25 минуты, затем повышали от 5% В до 100% В за 8,75 минут. Такое содержание выдерживали в течение 2,5 минут при 100% В, затем возвращали к 5% В за 30 секунд и выдерживали в течение 2 минут. Общая продолжительность градиентного цикла составляла 15,0 минуты. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин. (для 3-минутного цикла) и 0,5 мл/мин. (для 15-минутного цикла). Обнаружение проводили при 254 нм.

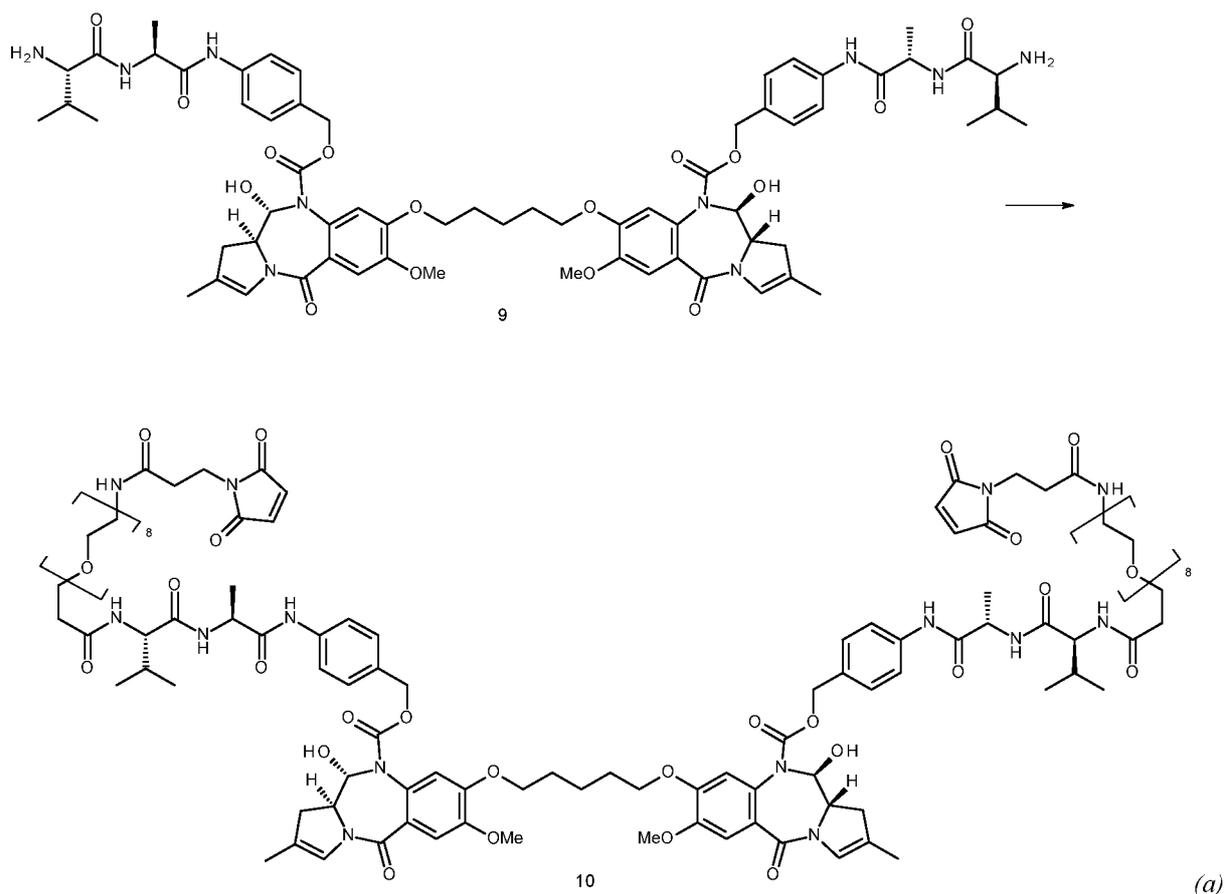
Колонки: Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18, 1,7 мкм, 2,1 x 50 мм при 50 °С, оснащенная предколонкой Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard, 130A, 1,7 мкм, 2,1 мм x 5 мм (стандартный 3-минутный цикл); и Waters Acquity UPLC CSH C18, 1,7 мкм, 2,1 x 100 мм, оснащенная предколонкой Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard, 130A, 1,7 мкм, 2,1 мм x 5 мм (15-минутный цикл).

Использовали следующие условия препаративной ВЭЖХ: Обращенно-фазовую сверхскоростную высокоэффективную жидкостную хроматографию (СВЭЖХ) проводили на приборе Shimadzu Prominence®, используя колонку Phenomenex® Gemini NX, 5 мкм, C18 (при 50 °С), 150 x 21,2 мм. В качестве элюентов использовали растворитель А (Н₂О с 0,05% муравьиной кислоты) и растворитель В (СН₃CN с 0,05% муравьиной кислоты). Все эксперименты СВЭЖХ проводили, используя следующие условия градиента: первоначальное содержание 13% В увеличивали до 100% В за 17 минут с градиентом, пригодным для обеспечения требуемого разделения, затем выдерживали в течение 1 минуты при 100% В, затем возвращали к 13% В за 0,1 минуты и выдерживали в течение 1,9 минуты. Общая продолжительность градиентного цикла составляла 20,0 минуты. Скорость потока составляла 20,0 мл/мин., и обнаружение проводили при 254 и 280 нм.

Пример 1







(S)-2-(((*tert*-бутилдиметилсил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил(4-гидрокси-5-метокси-2-нитрофенил)метанон (**2**)

5 Дигидрат ацетата лития (3,52 г, 34,5 ммоль, 1,0 экв.) добавляли к перемешанному раствору простого эфира TIPS (**1**) (19,96 г, 34,5 ммоль, 1,0 экв.) в ДМФА/Н₂O (300 мл/4 мл). Полученный красный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 3,5 ч. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (600 мл) и промывали 1 М раствором лимонной кислоты (2 x 250 мл), Н₂O (2 x 250 мл), насыщенным соевым раствором (300 мл) и сушили (MgSO₄). Растворитель выпаривали при пониженном давлении с получением продукта в виде желтого твердого вещества (14,57 г, 100%). Продукт использовали без дополнительной

10 очистки. Аналитические данные: ЖХ/МС, RT 1,74 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 423 ([*M* + Н]⁺, 100); 445 ([*M* + Na]⁺, 75).

(b) ((Пентан-1,5-диилбис(окси))бис(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))бис(((*S*)-2-(((*tert*-бутилдиметилсил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)метанон (**3**)

15 Карбонат калия (5,03 г, 36,44 ммоль, 1,1 экв.) добавляли к перемешанному раствору фенола (**2**) (14 г, 33,13 ммоль, 1,0 экв.) и 1,5-дидопентана (21,46 г, 9,86 мл, 66,26 ммоль, 2,0 экв.) в ДМФА (250 мл). Раствор нагревали при 70 °С в течение 3,5 ч. Раствор выливали в смесь льда/воды (800 мл) и экстрагировали EtOAc (4 x 500 мл). Объединенные экстракты промывали Н₂O (2 x 250 мл), насыщенным соевым раствором (400 мл), сушили (MgSO₄) и выпаривали при пониженном давлении с получением коричневого маслянистого

20 вещества. После очистки колоночной флэш-хроматографией [*n*-гептан/EtOAc, от 40% до 80% с приращениями по 10%] получали продукт в виде желтого пенистого вещества (12,7 г, 85%). Аналитические данные: ЖХ/МС, RT 2,16 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 913 ([*M* + Н]⁺, 100); 935 ([*M* + Na]⁺, 100).

(с) ((Пентан-1,5-диилбис(окси))бис(2-амино-5-метокси-4,1-фенилен))бис(((S)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-ил)метанон (4)

5 Цинковую пыль (19,9 г, 304 ммоль, 40 экв.) обрабатывали 1 М HCl (100 мл) и перемешивали в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем смесь обрабатывали ультразвуком в течение 10 минут и собирали активированный цинк вакуумной фильтрацией, затем промывали 1 М HCl (50 мл), H₂O (до pH 6 – 7), MeOH и сушили *in vacuo* на фильтре. Активированный цинк добавляли к энергично перемешиваемому раствору бис-нитросоединения (3) (6,94 г, 7,6 ммоль, 1,0 экв.) в EtOH/H₂O/EtOAc (60 мл/4 мл/60 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь по каплям обрабатывали 5% об./об. раствором HCO₂H в MeOH (76 мл).
10 Цвет изменялся с зеленого на металлический серый, и наблюдали экзотерму до 42 °С. После угасания экзотермы до 30 °С ЖХ/МС показала, что реакция не завершена. Добавляли еще одну порцию 5% об./об. HCO₂H в MeOH (20 мл) и наблюдали еще одну экзотерму (34°С). Реакционную смесь оставляли остывать до комнатной температуры, когда анализ ЖХ/МС показал полное превращение в требуемый продукт. Смесь фильтровали через Celite® и промывали набивку EtOAc. Фильтрат промывали насыщенным водным
15 раствором NaHCO₃ (2 x 300 мл), водой (300 мл), насыщенным соевым раствором (300 мл), сушили (MgSO₄), фильтровали и выпаривали *in vacuo* с получением бис-анилина в виде желтого пенистого вещества (6,22 г, 96%). Продукт использовали без дополнительной очистки. Аналитические данные: ЖХ/МС, RT 2,12 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 853 ([M + H]⁺, 15).

20 (d) Бис(4-((S)-2-((S)-2-((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил((пентан-1,5-диилбис(окси))бис(6-((S)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метил-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-4-метокси-3,1-фенилен))дикарбамат (6)

Триэтиламин (0,171 г, 235 мкл, 1,69 ммоль, 4,4 экв.) через шприц добавляли к перемешанному раствору бис-анилина (4) (0,33 г, 0,38 ммоль, 1,0 экв.) и трифосгена (0,082 г, 0,28 ммоль, 0,72 экв.) в сухом ТГФ в
25 атмосфере аргона. Полученную суспензию нагревали до 40 °С и через 5 минут брали образец в MeOH для анализа ЖХ/МС, который показал бис-метилкарбамат (МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 969 ([M + H]⁺, 80); 992 ([M + Na]⁺, 100). Добавляли дилаурат дибутилолова (0,024 г, 23 мкл, 38 мкмоль, 0,1 экв.), затем твердый линкер (5) (0,319 г, 0,85 ммоль, 2,2 экв.) и триметиламин (0,085 г, 118 мкл, 0,85 ммоль, 2,2 экв.) и нагревали смесь при 40 °С при перемешивании в атмосфере аргона в течение 5 часов. Реакционную
30 смесь оставляли остывать, фильтровали и выпаривали ТГФ при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией [CHCl₃/MeOH 0%, 1%, 1,5%, 2%, градиентное элюирование] с получением продукта в виде желтого пенистого вещества (0,42 г, 66%). Аналитические данные: ЖХ/МС, RT 2,16 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1660 ([M + H]⁺, 60); 1682 ([M + Na]⁺, 65).

35 (e) Бис(4-((S)-2-((S)-2-((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил((пентан-1,5-диилбис(окси))бис(6-((S)-2-((гидроксиметил)-4-метил-2,3-дигидро-1H-пиррол-1-карбонил)-4-метокси-3,1-фенилен))дикарбамат (7)

n-Толуолсульфоновую кислоту (0,296 г, 1,7 ммоль, 2,2 экв.) добавляли к перемешанному раствору бис-трет-бутилдиметилсилилового эфира (6) (1,26 г, 0,76 ммоль, 1,0 экв.) в 10% об./об. H₂O в ТГФ. Раствор
40 перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (100 мл) и промывали насыщенным раствором NaHCO₃ (2 x 100 мл), H₂O (100 мл), насыщенным соевым раствором (100 мл), сушили (MgSO₄) и выпаривали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной флэш-

хроматографией [CHCl₃/MeOH, от 0% до 5% с приращениями по 1%] с получением продукта в виде белого пенистого вещества (0,896 г, 92%). Аналитические данные: ЖХ/МС, RT 1,61 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1432 ([M + H]⁺, 5); 1454 ([M + Na]⁺, 5).

5 (f) Бис(4-((S)-2-((S)-2-((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)-8,8'-(пентан-1,5-диилбис(окси))(11S,11aS,11'S,11a'S)-бис(11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-11,11a-дигидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-10(5H)-карбоксилат) (8)

10 Периодинан Десс-Мартина (0,24 г, 0,57 ммоль, 2,0 экв.) добавляли к перемешанному раствору бис-спирта (7) в сухом ДХМ (20 мл). Полученную белую суспензию перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (100 мл) и экстрагировали насыщенным раствором NaHCO₃ (2 x 100 мл), водой (100 мл), насыщенным солевым раствором (100 мл), сушили (MgSO₄) и выпаривали при пониженном давлении. После очистки колоночной флэш-хроматографией [CHCl₃/MeOH, от 0% до 3% с приращениями по 0,5%] получали продукт в виде белого пенистого вещества (0,28 г, 69%). Аналитические данные: ЖХ/МС, RT 1,58 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1428 ([M + H]⁺, 20); 1450 ([M + Na]⁺, 30).

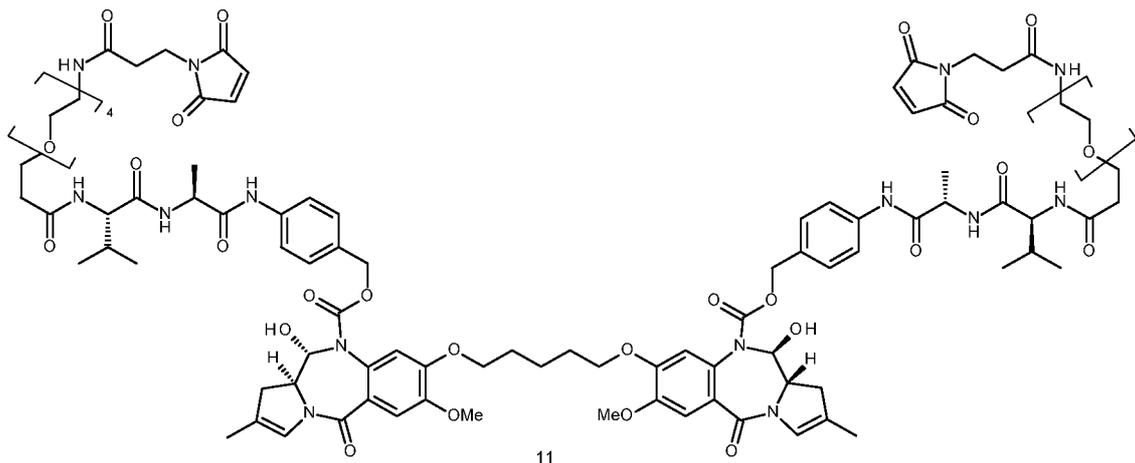
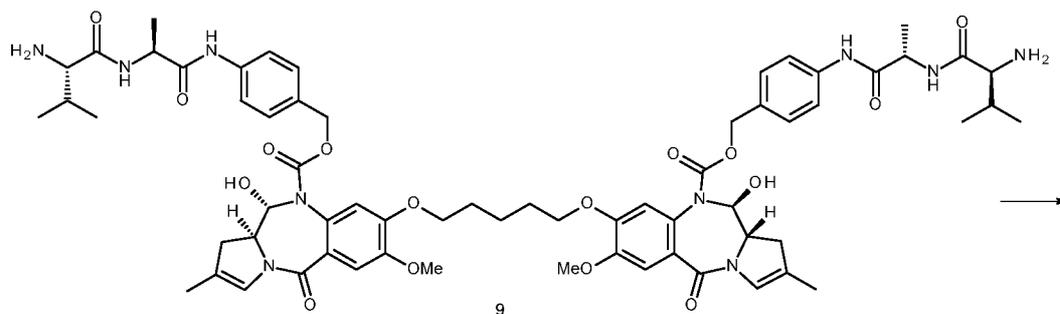
(g) Бис(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)-8,8'-(пентан-1,5-диилбис(окси))(11S,11aS,11'S,11a'S)-бис(11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-11,11a-дигидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-10(5H)-карбоксилат) (9)

20 Pd(PPh₃)₄ (8 мг, 7 мкмоль, 0,04 экв.) добавляли к перемешанному раствору бис-аллос производного (8) (0,25 г, 0,176 ммоль 1,0 экв.) и пирролидина (31 мг, 36 мкл, 0,44 ммоль, 2,5 экв.) в сухом ДХМ (10 мл). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакционную смесь разделяли между насыщенным раствором NH₄Cl (50 мл) и ДХМ (50 мл). ДХМ отделяли и промывали насыщенным солевым раствором (100 мл), сушили (MgSO₄) и выпаривали при пониженном давлении. Твердый остаток
25 измельчали/обрабатывали ультразвуком с Et₂O (3 x 15 мл) и сушили под вакуумом с получением продукта в виде белого твердого вещества (0,207 г, 93%). Продукт использовали без дополнительной очистки. Аналитические данные: ЖХ/МС, RT 1,06 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 630 ([M + 2H]⁺, 100).

30 (h) Бис(4-((2S,5S)-37-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-5-изопропил-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октаокса-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил)-8,8'-(пентан-1,5-диилбис(окси))(11S,11aS,11'S,11a'S)-бис(11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-11,11a-дигидро-1H-пирроло[2,1-c][1,4]бензодиазепин-10(5H)-карбоксилат) (10)

35 EDCI.HCl (56 мг, 0,29 ммоль, 3 экв.) добавляли к перемешанному раствору бис-амина (9) (0,123 г, 98 мкмоль, 1,0 экв.) и MaldPEG®OH (0,128 г, 0,22 ммоль, 2,2 экв.) в CHCl₃ (15 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин., затем разбавляли CHCl₃ (50 мл), промывали H₂O (100 мл), насыщенным солевым раствором (100 мл), сушили (MgSO₄) и выпаривали при пониженном давлении. После очистки препаративной ВЭЖХ с последующей лиофилизацией получали продукт в виде
40 белого пенистого вещества (0,047 г, 20%). Аналитические данные: ЖХ/МС, RT 6,61 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1205 ([M + 2H]⁺, 55).

Пример 2

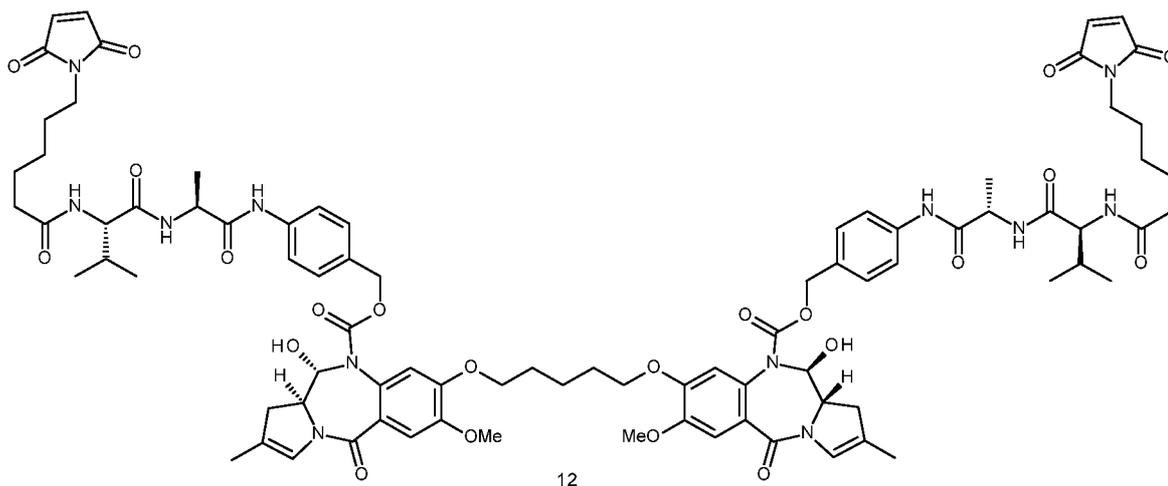
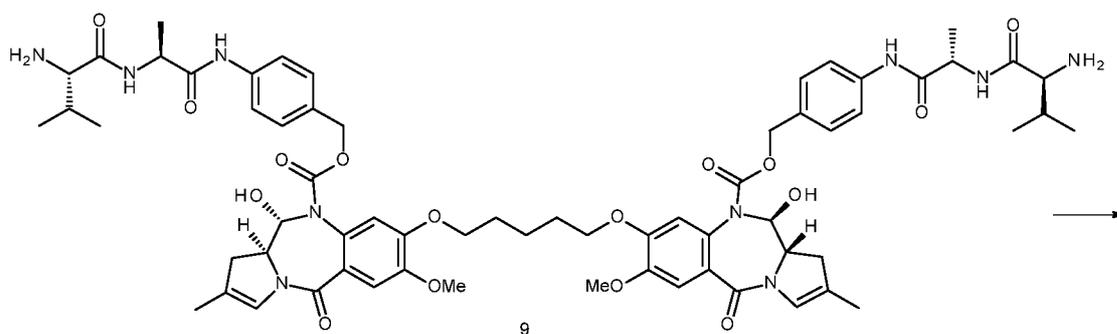


Бис(4

5 *-(2S,5S)-25-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-5-изопропил-2-метил-4,7,23-триоксо-10,13,16,19-тетраокса-3,6,22-триазатептакозанамидо)бензил)-8,8'-(пентан-1,5-диилбис(окси))(11S,11aS,11'S,11a'S)-бис(11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-11,11a-дигидро-1H-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-10(5H)-карбоксилат) (11)*

10 DIPEA (30 мг, 42 мкл, 0,23 ммоль, 3 экв.) добавляли к перемешанному раствору бис-аминa (9) (98 мг, 78 мкмоль, 1,0 экв.) и MalPEG₄OSu (88 мг, 0,17 ммоль, 2,2 экв.) в CHCl₃ (10 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 72 ч., затем разбавляли CHCl₃ (50 мл), промывали H₂O (100 мл), насыщенным соевым раствором (100 мл), сушили (MgSO₄) и выпаривали при пониженном давлении. После очистки препаративной ВЭЖХ с последующей лиофилизацией получали продукт в виде белого пенного вещества (0,043 г, 25%). Аналитические данные: ЖХ/МС, RT 6,11 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1028 ($[M + 2H]^+$, 80).

Пример 3

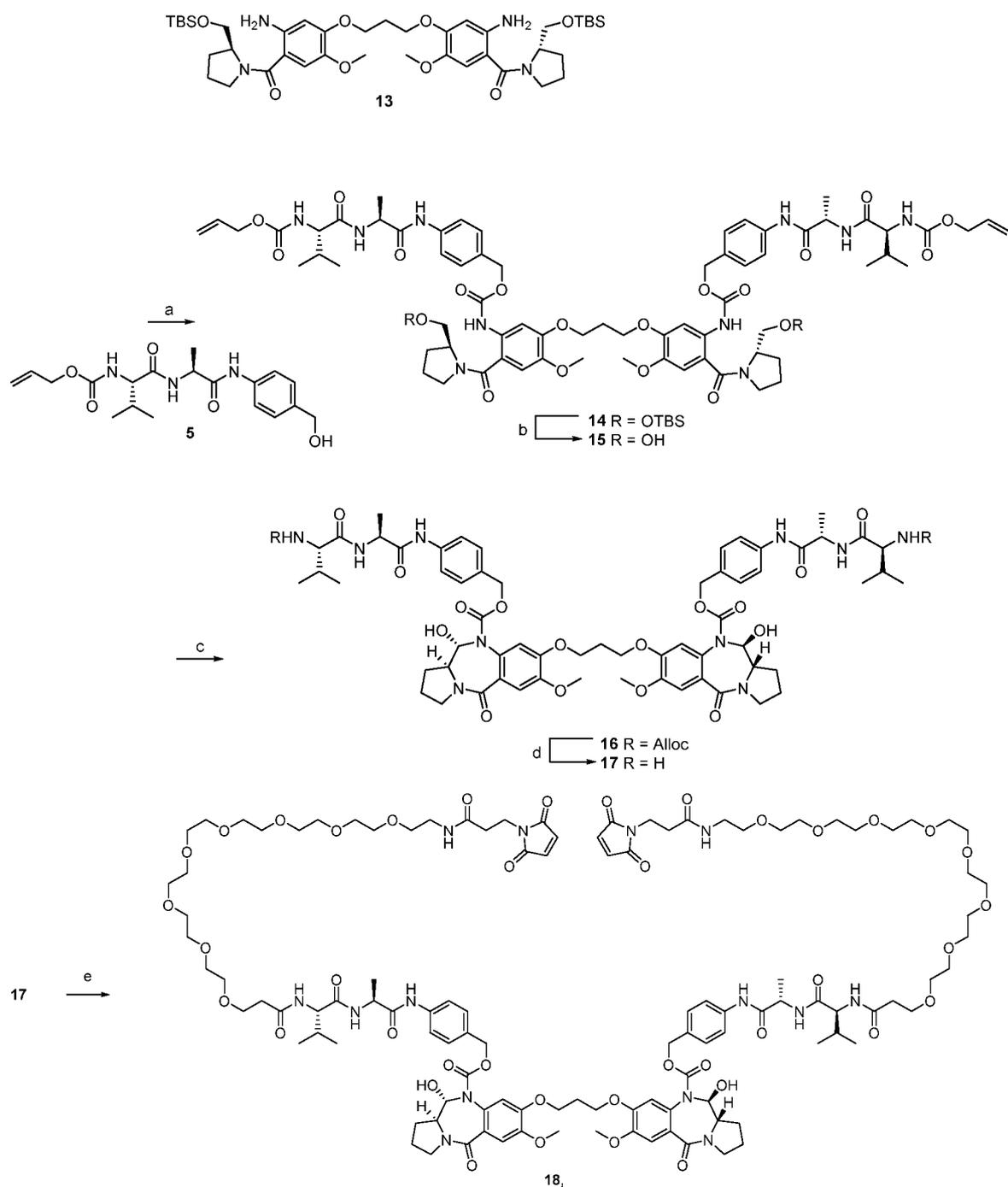


6

ис(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)-8,8'-(пентан-1,5-диилбис(окси))(11S,11aS,11'S,11a'S)-бис(11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-11,11a-дигидро-1H-пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепин-10(5H)-карбоксилат) (12)

- 5 EDCI.HCl (50 мг, 0,26 ммоль, 3 экв.) добавляли к перемешанному раствору бис-амина (9) (0,109 г, 86,5 мкмоль, 1,0 экв.) и MeCOsu (40 мг, 0,19 ммоль, 2,2 экв.) в CHCl₃ (10 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут, затем разбавляли CHCl₃ (50 мл), промывали H₂O (100 мл), насыщенным соевым раствором (100 мл), сушили (MgSO₄) и выпаривали при пониженном давлении. После
- 10 очистки препаративной ВЭЖХ с последующей лиофилизацией получали продукт в виде белого пенящего вещества (0,045 г, 32%). Аналитические данные: ЖХ/МС, RT 6,82 мин.; МС (ИР⁺) m/z (относительная интенсивность) 1646 ([M + H]⁺, 20); 1667 ([M + Na]⁺, 30).

Пример 4



(a) бис(4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)((пропан-1,3-диилбис(окси))бис(6-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсиллил)окси)метил)пирролидин-1-карбонил)-4-метокси-3,1-фенилен))дикарбамат (**14**)

- 5 Трифосген (472 мг, 1,59 ммоль, 0,72 экв.) одной порцией добавляли к смеси соединения **13** (1,77 г, 2,21 ммоль) и триэтиламина (1,35 мл, 9,69 ммоль, 4,38 экв.) в дихлорметане (3,6 мл). Через 10 минут одной порцией добавляли соединение **5** (1,83 г, 4,85 ммоль, 2,19 экв.) в виде тонкодисперсного порошка, затем триэтиламин (0,68 мл, 4,9 ммоль, 2,2 экв.) и дилаурат дибутилолова (132 мкл, 0,221 ммоль, 0,1 экв.).
- 10 Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 37 °С в течение 4 ч., после чего перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Органическую фазу промывали водой и декантировали в фильтрующем картридже. ДХМ удаляли выпариванием, а остаток в сухом виде загружали на силикагель, затем проводили хроматографию на картридже Ultra Biotage, 50 г (градиент ДХМ / ДХМ:MeOH 90:10, от 5% до 32%, элюирование при 32%). Чистые фракции объединяли с получением продукта **14** (2,35 г, 1,46 ммоль,

выход 66,2%).

Аналитические данные: ЖХ/МС, 3 мин., липофильный метод, RT 2,24 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1608,9 ($[M + H]^+$, 100);

- 5 (b) бис(4-((S)-2-((S)-2-((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил((пропан-1,3-диилбис(окси))бис(6-((S)-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-карбонил)-4-метокси-3,1-фенилен))дикарбамат (15)

Гидрат пара-толуолсульфоновой кислоты (277 мг, 1,46 ммоль, 1 экв.) одной порцией добавляли к смеси соединения **14** (2,34 г, 1,46 ммоль) в тетрагидрофуране (53,0 мл) и воде (5,00 мл) при 0 °С (баня из льда/воды). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 20 °С в течение 7 ч. до завершения реакции, по данным ЖХМС. Реакционную смесь разделяли между этилацетатом и водой и промывали NaHCO₃, затем насыщенным соевым раствором. Органические вещества сушили над сульфатом магния и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали хроматографией (50 г Ultra, сухая загрузка на картридж Samplet, ДХМ и смесь ДХМ:MeOH 90:10, градиент от 20% до 64%, элюирование около 64%. Чистые фракции объединяли и концентрировали под вакуумом с получением продукта **15** (1,60 г, 1,16 ммоль, выход 79,7%) в виде белого твердого вещества.

Аналитические данные: ЖХ/МС, 3 мин., липофильный метод, RT 1,50 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1380,9 ($[M + H]^+$, 100);

- 20 (c) бис(4-((S)-2-((S)-2-((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил-8,8'-(пропан-1,3-диилбис(окси))(11S,11aS,11'S,11a'S)-бис(11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат) (16)

Добавляли 0,2 М раствор Stahl Tempo (2,10 мл, 0,420 ммоль, 0,44 экв.), затем трифлат тетрааксацетонитрилмеди (I) (160 мг, 0,425 ммоль, 0,44 экв.) к раствору соединения **15** (1,32 г, 0,957 ммоль) в ДМФА (4,00 мл) в колбе объемом 500 мл. Реакционную смесь быстро перемешивали и нагревали при 40 °С в течение 5 ч., затем при 35 °С в течение 18 ч. в атмосфере воздуха из баллона, после чего наблюдали завершение реакции, по данным ЖХМС. Растворители удаляли выпариванием. Следы ДМФА удаляли вторым выпариванием с бутанолом, затем под высоким вакуумом. Сухой остаток загружали на картридж Samplet (10 г) с ацетоном, затем проводили хроматографию на колонке Ultra, 50 г, в системе Biotage Isolera. Градиент 10% MeOH в ДХМ / ДХМ, от 20% до 63% в 8 объемах колонки. Элюирование и выдерживание около 60%. Первые фракции примесей повторно очищали на той же системе, используя 25 г колонку. Все чистые фракции объединяли. Остаток растворяли в ацетоне. Добавление гептана вызывало образование белого осадка продукта. Летучие вещества выпаривали с получением продукта **16** в виде белого порошка после обработки под высоким вакуумом. (892 мг, 0,648 ммоль, выход 67,8%). Аналитические данные: ЖХ/МС, 3 мин., липофильный метод, RT 1,42 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1376,6 ($[M + H]^+$, 100);

- 40 (d) бис(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)-8,8'-(пропан-1,3-диилбис(окси))(11S,11aS,11'S,11a'S)-бис(11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат) (17)

Тетракис(трифенилфосфин)палладий (0) (10,0 мг, 0,00865 ммоль, 0,034 экв.) добавляли к смеси соединения **16** (350 мг, 0,254 ммоль) и пирролидина (65,0 мкл, 0,780 ммоль, 3,07 экв.) в дихлорметане (7,50 мл) и

метаноле (0,5 мл). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре в течение 1 ч. 30 минут, и реакция была завершена, по данным ЖХМС.

Добавляли хлорид аммония в воде (30 мл, 34,3 ммоль, 6% мас.) и энергично перемешивали смесь. Затем смесь декантировали в картридже для разделения фаз Biotage. Слой ДХМ выпаривали досуха под вакуумом.

- 5 Остаток растворяли в хлороформе (20 мл), и удаляли растворитель выпариванием под вакуумом при 35 °С. Указанный цикл повторяли второй раз, затем сушили под высоким вакуумом (3 мбар) с получением неочищенного продукта **17** (307 мг, 0,254 ммоль, 100%) в виде белого твердого вещества, которое напрямую использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Аналитические данные: ЖХ/МС, 3 мин., липофильный метод, 2 пика, RT 0,22 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 604,9 ($[M + 2H]^{2+}$;
- 10 100); 1208,2 ($[M + H]^+$, 10);

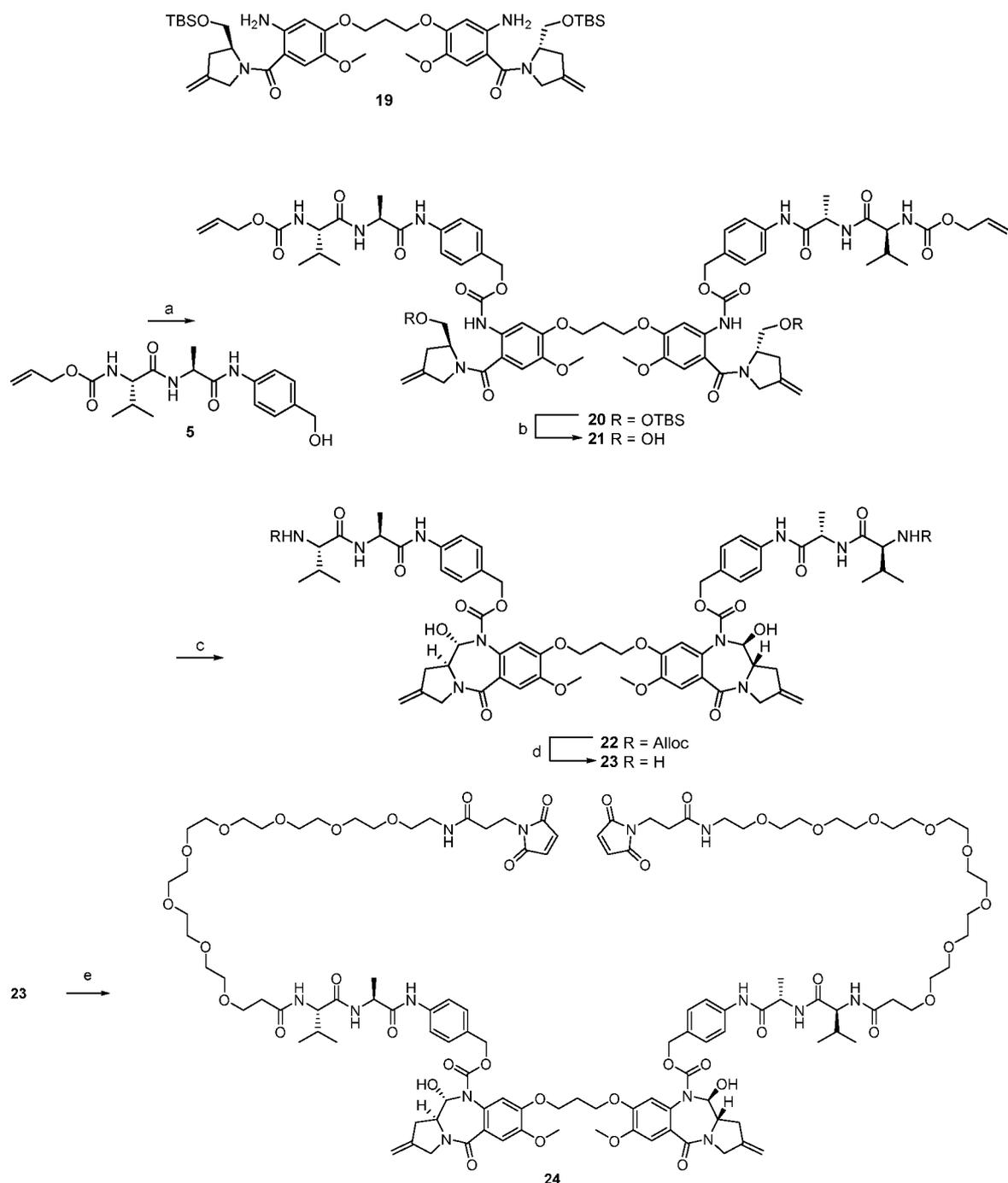
(e) бис(4-((2*S*,5*S*)-37-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)-5-изопропил-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октаокса-3,6,34-триазагептапентаконтанамидо)бензил)-8,8'-(пропан-1,3-диилбис(окси))(11*S*,11*a**S*,11'*S*,11*a*'*S*)-бис(11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11*a*-тетрагидро-1*H*-бензо[*e*]пирроло[1,2-*a*][1,4]диазепин-10(5*H*)-карбоксилат) (**18**)

- 15 Хлороформ (10,00 мл) и метанол (0,4 мл) добавляли к неочищенному соединению **17** (307 мг, 0,254 ммоль), затем добавляли mal-амидо-ПЭГ8-кислоту (339 мг, 0,561 ммоль, 2,2 экв.) и EDCI (107 мг, 0,558 ммоль, 2,19 экв.). Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 45 минут, после чего наблюдали завершение реакции, по данным ЖХМС. Добавляли хлорид аммония в воде (30 мл, 6% мас.) и энергично перемешивали смесь. Смесь декантировали в картридже для разделения фаз Biotage. Слой ДХМ выпаривали досуха под вакуумом. Летучие вещества удаляли на ротационном испарителе и очищали неочищенный остаток хроматографией (50 г Ultra, Biotage, градиент от 30/70 до 100/0 смеси 16% MeOH в ДХМ / ДХМ в 10 объемах колонки; элюирование при более 10% MeOH). Все фракции анализировали с помощью ТСХ (10% MeOH в ДХМ). Чистые фракции объединяли. Растворитель удаляли выпариванием с получением
- 20 соединения **18** (200 мг). Анализ ЖХМС показал следы mal-ПЭГ8-кислоты, и материал еще раз очищали препаративной ВЭЖХ, сушили замораживанием, брали аликвоту в дихлорметане и сушили под высоким вакуумом с получением соединения **18** в виде белого твердого вещества. Чистота составляла 99,45%. (В, 110 мг, 0,0467 ммоль, выход 18,3%). Аналитические данные: ЖХ/МС, 15 мин. период, RT 5,90 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1179,5 ($[M + 2H]^{2+}$, 100); ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,92 (с, 2H), 8,16 (д, J = 6,9 Гц, 2H), 7,99 (т, J = 5,7 Гц, 2H), 7,86 (д, J = 8,7 Гц, 2H), 7,55 (с, 4H), 7,18 (с, 4H), 7,07 (с, 2H), 7,00 (с, 4H), 6,79 (с, 2H), 6,50 (с, 2H), 5,48 (с, 2H), 5,23 – 4,77 (м, 4H), 4,39 (т, J = 7,0 Гц, 2H), 4,22 (дд, J = 8,7, 6,6 Гц, 2H), 4,10 (с, 4H), 3,77 (с, 6H), 3,64 – 3,55 (м, 8H), 3,55 – 3,42 (м, 56H), 3,37 (т, J = 5,9 Гц, 6H), 3,28 (т, J = 8,3 Гц, 2H), 3,15 (к, J = 5,8 Гц, 4H), 2,49 – 2,37 (м, 4H), 2,37 – 2,30 (м, 4H), 2,17 (с, 2H), 2,09 – 1,73 (м, 10H), 1,30 (д, J = 7,0 Гц, 6H), 0,85 (дд, J = 15,3, 6,7 Гц, 12H).

35

40

Пример 5



5 (a) бис(4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)((пропан-1,3-диилбис(окси))бис(6-((S)-2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-метиленпирролидин-1-карбонил)-4-метокси-3,1-фенилен))дикарбамат (20)

10 Трифосген (816 мг, 2,75 ммоль, 0,72 экв.) одной порцией добавляли к смеси соединения 19 (3,15 г, 3,82 ммоль) и триэтиламина (2,34 мл, 16,8 ммоль, 4,4 экв.) в дихлорметане (75 мл) при 0 °С. Ледяную баню убрали и через 15 минут одной порцией добавляли спирт 5 (3,17 г, 8,40 ммоль, 2,2 экв.) в виде тонкодисперсного порошка, затем триэтиламин (1,17 мл, 8,39 ммоль, 2,2 экв.) и дилаурат дибутилолова (229 мкл, 0,383 ммоль, 0,1 экв.). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 37 °С в течение 1 ч., затем перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Органическую фазу разбавляли ДХМ (100 мл) и промывали водой (200 мл), насыщенным раствором хлорида аммония (100 мл) и насыщенным соевым раствором (50 мл), затем сушили над сульфатом магния. Летучие вещества удаляли выпариванием при

пониженном давлении. Неочищенный продукт в сухом виде загружали на силикагель и элюировали на 340 г колонке Ultra с градиентом этилацетат – ацетон, от 20 % до 100% в 7 объемах колонки. Быстрое элюирование в 2 объемах колонки при около 30% ацетона обеспечивало получение чистых фракций, которые сушили под вакуумом с получением соединения **20** (4,00 г, 2,45 ммоль, 100% мас., выход 64,2%).

5 Аналитические данные: ЖХ/МС, 3 мин., липофильный метод, RT 2,34 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1661,1 ([*M* + *H*]⁺, 100);

(b) бис(4-((*S*)-2-((*S*)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)((пропан-1,3-дильбис(окси))бис(6-((*S*)-2-(гидроксиметил)-4-метиленпирролидин-1-карбонил)-4-метокси-3,1-фенилен))дикарбамат (**21**)

10 Бис-TBS эфир **20** (4,00 г, 2,45 ммоль) и гидрат пара-толуолсульфоновой кислоты (300 мг, 1,58 ммоль) растворяли в смеси 2-метилтетрагидрофурана (25,0 мл, 249 ммоль, 100% мас.), уксусной кислоты (4,00 мл, 69,8 ммоль, 100% мас.) и воды (4,00 мл, 222 ммоль, 100% мас.). Смесь нагревали при 40 °С. Через 2 ч. Наблюдали завершение реакции, по данным ЖХМС. Реакционную смесь разделяли между этилацетатом
15 (150 мл) и водой (200 мл), затем промывали насыщенным раствором NaHCO₃ (150 мл) и насыщенным солевым раствором (100 мл). Органические вещества сушили над сульфатом магния и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали хроматографией (100 г Ultra, сухая загрузка на картридж Samplet 10 г, этилацетат / ацетон, градиент от 85/15 до 0/100, элюирование при около 80% ацетона. Чистые фракции объединяли и концентрировали под вакуумом с получением чистого продукта **21** (960 мг, 0,684 ммоль,
20 выход 27,9%) в виде белого твердого вещества. Аналитические данные: ЖХ/МС, 3 мин., липофильный метод, RT 1,54 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1402,3 ([*M* + *H*]⁺, 100);

(c) бис(4-((*S*)-2-((*S*)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)-8,8'-(пропан-1,3-дильбис(окси))((1*S*,11*aS*,11'*S*,11*a'S*)-бис(11-гидрокси-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,11,11*a*-тетрагидро-1*H*-бензо[*e*]пирроло[1,2-*a*][1,4]дiazепин-10(5*H*)-карбоксилат) (**22**)

25 0,2 М Раствор Stahl Tempo (1,34 мл, 0,268 ммоль, 0,4 экв.), затем трифлат тетрааксациетонитрилмеди (I) (190 мг, 0,504 ммоль, 0,75 экв.) добавляли к раствору спирта **21** (940 мг, 0,670 ммоль) в ДМФА (3,00 мл) и ДХМ (13,0 мл) в колбе объемом 500 мл. Реакционную смесь быстро перемешивали и нагревали при 37 °С в течение 5 ч. (почти до завершения), затем при -20 °С в течение 96 ч., после чего реакционную смесь
30 разбавляли дихлорметаном (60 мл) и водой (60 мл) и перемешивали в течение 5 минут. Реакционную смесь декантировали в устройстве для разделения фаз и сушили ДХМ фазу при пониженном давлении. Добавляли МЭК (60 мл) и удаляли остаточный ДМФА азеотропной перегонкой с МЭК при пониженном давлении (2 раза) с получением неочищенного продукта в виде твердого вещества. Его снова растворяли в смеси
35 ДХМ/изопропанол 80/20 (от 5 до 10 мл) и загружали на картридж Biotage Samplet (10 г), сушили и загружали на 100 г колонку Ultra. Градиент от 88/12 ДХМ/20% MeOH в ДХМ до 70/30 в 10 объемах колонки. Чистые фракции объединяли с получением чистого соединения **22** (602 мг, 0,430 ммоль, выход 64,2%) в виде белого продукта. Аналитические данные: ЖХ/МС, 3 мин., липофильный метод, RT 1,51 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1401,5 ([*M* + *H*]⁺, 100);

40 (d) бис(4-((*S*)-2-((*S*)-2-амино-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)-8,8'-(пропан-1,3-дильбис(окси))((1*S*,11*aS*,11'*S*,11*a'S*)-бис(11-гидрокси-7-метокси-2-метилен-5-оксо-2,3,11,11*a*-тетрагидро-1*H*-бензо[*e*]пирроло[1,2-*a*][1,4]diazепин-10(5*H*)-карбоксилат) (**23**)

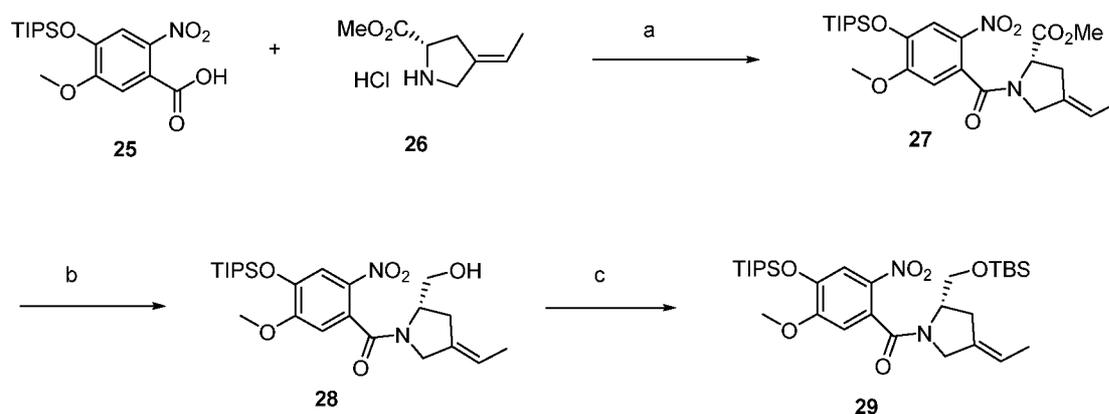
Тетракис(трифенилфосфин)палладий (0) (8,2 мг, 0,0071 ммоль, 100% мас.) добавляли к смеси соединения **22** (250 мг, 0,179 ммоль) и пирролидина (37,0 мкл, 0,444 ммоль, 2,49 экв.) в ДХМ (7,50 мл) и метаноле (0,5 мл). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре в течение 1 ч. 30 мин., и реакция была завершена, по данным ЖХМС.

- 5 Добавляли хлорид аммония в воде (30 мл, 6% мас.) и энергично перемешивали смесь. Затем смесь декантировали в картридже для разделения фаз Biotage. ДХМ слой выпаривали досуха под вакуумом. Остаток растворяли в хлороформе (20 мл) и удаляли растворитель на ротационном испарителе под вакуумом при 35 °С. Указанный цикл повторяли второй раз, затем сушили под высоким вакуумом (3 мбар, на ротационном испарителе) с получением неочищенного продукта **23** (220 мг, 0,179 ммоль, 100%) в виде
- 10 белого твердого вещества, которое напрямую использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Аналитические данные: ЖХ/МС, 3 мин. метод, 2 пика, RT 1,15 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 616,9 ($[M + 2H]^{2+}$, 100); 1232,1 ($[M + H]^+$, 10).

- (e) бис(4-((2*S*,5*S*)-37-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)-5-изопропил-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октаокса-3,6,34-триазагептапентаконтанамидо)бензил)-8,8'-(*н*-пропан-1,3-диилбис(окси))(11*S*,11*aS*,11'*S*,11*a'S*)-бис(11-гидрокси-7-метокси-2-метил-5-оксо-2,3,11,11*a*-тетрагидро-1*H*-бензо[*e*]пирроло[1,2-*a*][1,4]дiazепин-10(5*H*)-карбоксилат) (**24**)
- Хлороформ (4,1 мл) и метанол (0,2 мл) добавляли к соединению **23**, затем добавляли *mal*-амидо-ПЭГ8-кислоту (238 мг, 0,394 ммоль, 2,2 экв.) и EDCI (85,0 мг, 0,443 ммоль, 2,48 экв.). Реакцию проводили при
- 20 комнатной температуре в течение 45 мин., после чего наблюдали завершение реакции, по данным ЖХМС. Реакционную смесь концентрировали (2 мл), загружали на 3 г картридж Biotage Samplet из диоксида кремния и сушили под вакуумом. Samplet загружали на 25 г колонку Ultra Biotage и элюировали (градиент от 10/90 до 58/42 смеси 20% MeOH в ДХМ / ДХМ за 12 объемов колонки; элюирование при около 55% смеси 20% MeOH). Все фракции анализировали с помощью ТСХ (10% MeOH в ДХМ). Чистые фракции
- 25 объединяли. Растворитель удаляли выпариванием с получением соединения **24** (250 мг, 0,105 ммоль, выход 58,8%). Аналитические данные: ЖХ/МС, 15 мин. метод, RT 6.20 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1191,5 ($[M + 2H]^{2+}$, 100); ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 9,92 (с, 2H), 8,16 (д, J = 6,9 Гц, 2H), 7,99 (т, J = 5,5 Гц, 2H), 7,86 (д, J = 8,6 Гц, 2H), 7,68 – 7,42 (м, 4H), 7,39 – 7,11 (м, 4H), 7,07 (с, 2H), 7,00 (с, 4H), 6,81 (с, 2H), 6,60 (с, 2H), 5,46 – 5,30 (м, 2H), 5,21 – 4,79 (м, 8H), 4,39 (т, J = 7,0 Гц, 2H), 4,22 (дд, J = 8,7,
- 30 6,7 Гц, 2H), 4,15 – 3,88 (м, 8H), 3,77 (с, 6H), 3,65 – 3,55 (м, 8H), 3,54 – 3,40 (м, 58H), 3,37 (т, J = 5,9 Гц, 4H), 3,15 (к, J = 5,8 Гц, 4H), 2,95 – 2,79 (м, 2H), 2,57 – 2,52 (м, 2H), 2,49 – 2,37 (м, 4H), 2,37 – 2,29 (м, 4H), 2,22 – 2,10 (м, 2H), 2,03 – 1,88 (м, 2H), 1,30 (д, J = 7,0 Гц, 6H), 0,85 (дд, J = 15,3, 6,7 Гц, 12H).

Пример 6

- 35 (i) Синтез (*S,E*)-(2-(((*трет*-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-этилиденпирролидин-1-ил)(5-метокси-2-нитро-4-((*три*изопропилсилил)окси)фенил)метанола (**29**)



Соединение **25** описано в публикации Tiberghien et al, ACS Med. Chem. Lett., 2016, 7 (11), сс. 983–987.

Соединение **26** описано в публикации Smits and Zemribo, Org. Lett., 2013, 15 (17), сс. 4406–4409.

5 (a) метил(*S,E*)-4-этилиден-1-(5-метокси-2-нитро-4-((триизопропилсилил)окси)бензоил)пирролидин-2-карбоксилат (**27**)

Соединение **25** (325 г, 1,2 экв.) и **26** (1,0 экв.) растворяли в ДХМ (3,25 л) и охлаждали до -40 °С. По частям добавляли ТЗР (2 экв.) при -40 °С, затем DIEA (6,0 экв.). Смесь перемешивали в течение 1 часа при -40 °С. По данным ЖХМС, наблюдали завершение реакции. Добавляли водный раствор уксусной кислоты (10%, 3,25 л) при 0 °С. Органическую фазу отделяли и второй раз промывали водным раствором уксусной кислоты (10%, 3,25 л), затем насыщенным соевым раствором (3,25 л). Летучие вещества удаляли под вакуумом с получением неочищенного продукта **27** в виде коричневого маслянистого вещества, которое очищали хроматографией на силикагеле (петролейный эфир/EtOAc, градиент от 100/1 до 10/1, сбор от 20/1. (591 г, чистота 87,6% по ЖХ, 70% по ЯМР, выход = 60%). RT: 6,374 мин.

15

Аналитический метод, использованный для соединения **27**

Колонка: Agilent Poroshell 120 EC- C18 4,6*100 мм, 2,7 мкм

Подвижная фаза А: 0,05% ТФК в воде

Подвижная фаза В: 0,05% ТФК в АСН

20 Разбавитель: АСН

Скорость потока: 1,0 мл/мин.

Объем ввода пробы: 1 мкл

Температура колонки: 40 °С

Детектор: 220 нм

25 Время записи хроматограммы: 8,1 минуты

Время перерыва: 2 минуты

Таблица градиента

Время (мин.)	0,0	4,0	8,0	8,1
% подвижной фазы А	80	0	0	95
% подвижной фазы В	20	100	100	5

(b) (S,E)-(4-этилиден-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-ил)(5-метокси-2-нитро-4-((триизопропилсилил)окси)фенил)метанон (28)

5 Соединение 27 (591 г, 1 экв.) растворяли в ДХМ и охлаждали до 0 °С. По частям добавляли боргидрид лития (2,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 0 °С в течение 6 часов. По данным ЖХМС, наблюдали завершение реакции. Добавляли водный раствор уксусной кислоты (10%, 5,9 л) при 0 °С. Органическую фазу отделяли и второй раз промывали водным раствором уксусной кислоты (10%, 5,9 л), затем насыщенным солевым раствором (5,9 л). Летучие вещества удаляли под вакуумом с получением остатка, который очищали флэш-хроматографией (петролейный эфир/EtOAc, градиент от 50/1 до 1/1, сбор от 5/1) с получением соединения 28 в виде грязновато-белого твердого вещества (250 г, выход 64%). RT: 7,922 мин.

10 (c) (S,E)-(2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-этилиденпирролидин-1-ил)(5-метокси-2-нитро-4-((триизопропилсилил)окси)фенил)метанон (29)

15 Соединение 28 (250 г, 1 экв.) и имидазол (2 экв.) растворяли в ДХМ (1,5 л, 6 об.) при комнатной температуре. По частям добавляли TBSCl (1,5 экв.), поддерживая температуру ниже 30 °С. Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 25 °С в течение 1 часа, когда наблюдали исчезновение исходного вещества, по данным ЖХМС. Смесь фильтровали через хлопковую вату. Осадок на фильтре промывали ДХМ (500 мл). Фильтрат промывали водным раствором уксусной кислоты (10%, 2,5 л) при 10 °С, затем насыщенным солевым раствором (2,5 л). Органическую фазу сушили безводным сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом с получением продукта 29 в виде желтого маслянистого вещества, которое было достаточно чистым для использования на следующей стадии (285 г, выход 92,2%). RT: 11,002 мин. MS (IP⁺) m/z (относительная интенсивность) 663,4 ([M + H]⁺, 100);

Аналитический метод, использованный для соединения 28 и 29

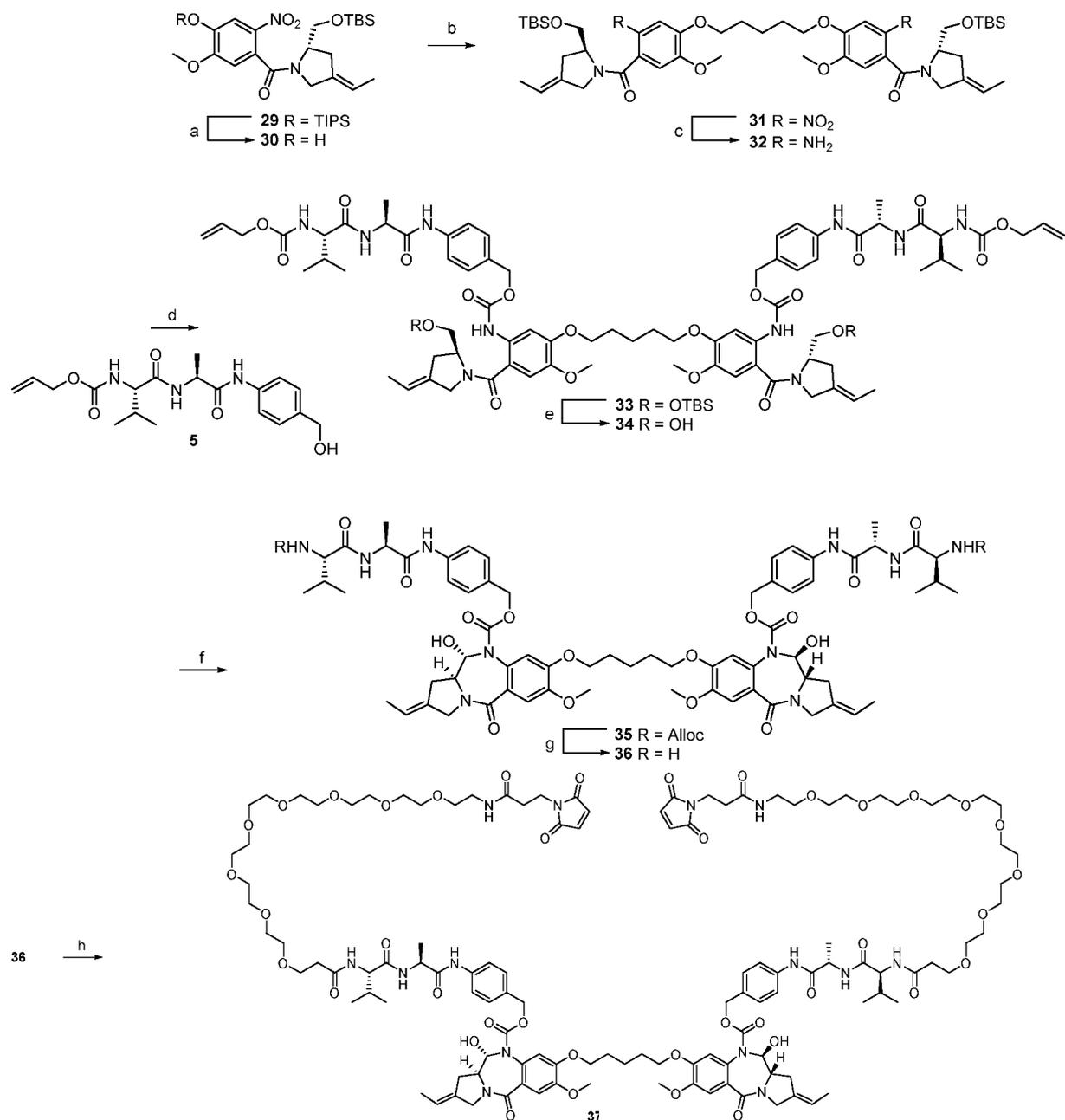
25 Колонка: Agilent Poroshell 120 EC- C18 4,6*100 мм, 2,7 мкм
Подвижная фаза А: 0,05% ТФК в воде
Подвижная фаза В: 0,05% ТФК в ACN
Разбавитель: ACN
Скорость потока: 1,0 мл/мин.
Объем ввода пробы: 2 мкл
30 Температура колонки: 40 °С
Детектор: 220 нм
Время записи хроматограммы: 12,1 минуты
Время перерыва: 2 минуты

35 Таблица градиента

Время (мин.)	0,0	6,0	12,0	12,1
% подвижной фазы А	80	0	0	80
% подвижной фазы В	20	100	100	20

(ii) Синтез бис(4-((2S,5S)-37-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-5-изопропил-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октаокса-3,6,34-триазагептатриаконтанамидо)бензил)-8,8'-(пентан-1,5-

дилбис(окси)((2*E*,2'*E*,11*S*,11*aS*,11'*S*,11*a'S*)-бис(2-этилиден-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11*a*-тетрагидро-1*H*-бензо[*e*]пирроло[1,2-*a*][1,4]дiazепин-10(5*H*)-карбоксилата) (37)



(a) (*S,E*)-2-(((*tert*-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-этилиденпирролидин-1-ил(4-гидрокси-5-метокси-2-нитрофенил)метанон (30)

- 10 TIPS-защищенный фенол 29 (10,0 г, 16,9 ммоль) растворяли в смеси этилацетата (20,0 мл) и ДМФА (20,0 мл) при 40 °С. Добавляли раствор ацетата лития (0,668 г, 10,1 ммоль, 0,6 экв.) в воде (3,0 мл). Реакцию проводили при 40 °С в течение 4 ч., после чего наблюдали завершение реакции, по данным ЖХМС. Реакционную смесь разделяли между 2-Ме-ТГФ (200 мл) и 2% раствором лимонной кислоты в воде (200 мл). Органическую фазу промывали насыщенным соевым раствором (70 мл) и сушили над сульфатом магния. Летучие вещества удаляли под вакуумом. Твердый остаток в форме осадка получали при добавлении диэтилового эфира (50 мл) и гексана (200 мл). Продукт собирали фильтрованием, промывали
- 15

небольшим количеством диэтилового эфира и сушили в течение ночи под вакуумом с получением соединения **30** в виде бледно-желтого твердого вещества. (5,8 г, 13 ммоль, выход 79%). Аналитические данные: ЖХ/МС, 3 мин., липофильный метод, RT 1,82 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 437,8 ([M + H]⁺, 100);

5

(b) ((Пентан-1,5-диилбис(окси))бис(5-метокси-2-нитро-4,1-фенилен))бис(((S,E)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-этилиденпирролидин-1-ил)метанон) (**31**)

Добавляли 1,5-дибромпентан (0,986 г, 4,29 ммоль, 0,5 экв.), затем карбонат калия (1,30 г, 9,41 ммоль, 1,1 экв.) к раствору соединения **30** (3,74 г, 8,57 ммоль) и йодида тетрабутиламмония (0,63 г, 1,7 ммоль, 0,2 экв.) в ацетоне (20,0 мл) в круглодонной колбе объемом 100 мл. Реакционную смесь быстро перемешивали и нагревали при 60 °С в течение 2 ч., а затем оставляли перемешиваться при 45 °С в течение ночи. Реакция была завершена, по данным ЖХМС. Смесь разделяли в этилацетате (150 мл) и воде (200 мл), затем промывали насыщенным соевым раствором (100 мл), сушили над сульфатом магния. Летучие вещества удаляли под вакуумом с получением продукта **31** (4,04 г, 4,29 ммоль, выход 100%), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. Аналитические данные: ЖХ/МС, 3 мин., липофильный метод, RT 2,39 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 942,3 ([M + H]⁺, 100);

10

15

(c) ((Пентан-1,5-диилбис(окси))бис(2-амино-5-метокси-4,1-фенилен))бис(((S,E)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-этилиденпирролидин-1-ил)метанон) (**32**)

Цинк (20,6 г, 315 ммоль, 74 экв.) добавляли к смеси этанола (64,0 мл), воды (4,00 мл) и муравьиной кислоты (4,00 мл, 106 ммоль, 25 экв.) при 10 °С (ледяная баня) и энергично перемешивали. К этой смеси по каплям, с помощью пипетки добавляли раствор соединения **31** (4,00 г, 4,25 ммоль) в этаноле (16,0 мл), поддерживая температуру ниже 35 °С. Цинковую массу периодически перемешивали вручную. Реакцию проводили еще 30 минут при комнатной температуре, после чего было достигнуто завершение реакции. Смесь разбавляли этилацетатом (200 мл). Твердое вещество удаляли фильтрованием через целит. Агломерат промывали этилацетатом (200 мл). Фильтрат промывали водой (300 мл), насыщенным раствором бикарбоната натрия (150 мл), насыщенным соевым раствором (100 мл) и сушили над сульфатом магния. Летучие вещества удаляли выпариванием и очищали остаток автоматической флэш-хроматографией (100 г Ultra, Biotage, этилацетат / гексан, градиент от 30% до 80% за 8 объемов колонки, элюирование от 58% с 10 объемов колонки), с получением соединения **32** (1,94 г, 2,20 ммоль, выход 51,8%) в виде бледно-желтого пенистого вещества. Аналитические данные: ЖХ/МС, 3 мин., липофильный метод, RT 2,29 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 882,4 ([M + H]⁺, 100);

25

30

35

(d) бис(4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)((пентан-1,5-диилбис(окси))бис(6-((S,E)-2-((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-4-этилиденпирролидин-1-карбонил)-4-метокси-3,1-фенилен))дикарбамат (**33**)

40

Трифосген (0,461 г, 1,55 ммоль, 0,72 экв.) одной порцией добавляли к смеси соединения **32** (1,90 г, 2,16 ммоль) и триэтиламина (1,32 г, 13,0 ммоль, 6 экв.) в ДХМ (45 мл) при 0 °С. Ледяную баню убирали и через 15 минут одной порцией добавляли соединение **5** (1,79 г, 4,74 ммоль, 2,2 экв.) в виде тонкодисперсного порошка, затем триэтиламин (0,661 г, 6,53 ммоль, 3 экв.) и дилаурат дибутилолова (0,129 г, 0,215 ммоль, 0,1 экв.). Реакционную смесь оставляли перемешиваться при 37 °С на 4 часа, затем перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Органическую фазу разбавляли ДХМ (100 мл) и промывали водой

(200 мл), насыщенным раствором хлорида аммония (100 мл) и насыщенным соевым раствором (50 мл), затем сушили над сульфатом магния. Летучие вещества удаляли выпариванием при пониженном давлении с получением соединения **3** (3,00 г, 1,78 ммоль, выход 82%). Неочищенный продукт напрямую использовали для реакции на следующей стадии.

- 5 Аналитические данные: ЖХ/МС, 3 мин., липофильный метод, RT 2,31 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1689,6 ($[M + H]^+$, 100);

(e) бис(4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)((пентан-1,5-диилбис(окси))бис(6-((S,E)-4-этилиден-2-(гидроксиметил)пирролидин-1-карбонил)-4-метокси-3,1-фенилен))дикарбамат (**34**)

- 10 Бис-TBS эфир **33** (3,00 г, 1,78 ммоль) растворяли в смеси 2-метилтетрагидрофурана (9 мл), уксусной кислоты (9 мл) и воды (1,5 мл). Смесь нагревали при 40 °С в течение 2 ч. Наблюдение с помощью ЖХМС показало неудовлетворительную степень завершения реакции (40%). Добавляли гидрат паратолуолсульфоновой кислоты (203 мг, 1,07 ммоль, 0,6 экв.), которая ускоряла реакцию. Завершение наблюдали через 30 минут.

- 15 Реакционную смесь разделяли между этилацетатом (150 мл) и водой (200 мл), затем промывали насыщенным раствором NaHCO₃ (150 мл) и насыщенным соевым раствором (100 мл). Органические вещества сушили над сульфатом магния и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали хроматографией (50 г Ultra, сухая загрузка на рыхлый силикагель, этилацетат / ацетон, градиент от 85/15 до 0/100, элюирование около 55% ацетона). Чистые фракции объединяли и концентрировали под вакуумом с получением чистого продукта **34** (2,20 г, 1,51 ммоль, выход 84,8%) в виде белого твердого вещества. Аналитические данные: ЖХ/МС, 3 мин., липофильный метод, RT 1,67 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1461,6 ($[M + H]^+$, 100);

- 25 (f) бис(4-((S)-2-((S)-2-(((аллилокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)-8,8'-((пентан-1,5-диилбис(окси))((2E,2'E,11S,11aS,11'S,11a'S)-бис(2-этилиден-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат) (**35**)

- 30 0,2 М раствор Stahl Tempo (3,50 мл, 0,700 ммоль, 0,47 экв.), затем трифлат тетракисацетонитрилмеди (I) (290 мг, 0,770 ммоль, 0,52 экв.) добавляли к раствору соединения **34** (2,17 г, 1,49 ммоль) в ДМФА (3,00 мл) в колбе объемом 500 мл. Реакционную смесь быстро перемешивали и нагревали при 40 °С в течение 5 ч. (завершение), затем при 30 °С в течение 18 ч. в атмосфере воздуха из баллона, после чего реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (60 мл) и водой (60 мл) и перемешивали в течение 5 минут. Реакционную смесь декантировали в устройстве для разделения фаз и сушили ДХМ фазу при пониженном давлении. Добавляли МЭК (60 мл) и удаляли остаточный ДМФА азеотропной перегонкой при пониженном давлении (2 раза) с получением неочищенного продукта в виде твердого вещества. Его снова растворяли в ДХМ (5 – 10 мл) и загружали на 100 г колонку Ultra. Градиент от 75/25 ДХМ/10% MeOH в ДХМ до 40/60 (элюирование около 50/50). Чистые фракции объединяли с получением соединения **35** (1,35 г, 0,927 ммоль, выход 62,4%) в виде белого продукта. Аналитические данные: ЖХ/МС, 3 мин., липофильный метод, RT 1,63 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1457,3 ($[M + H]^+$, 100); 15 мин. период, RT 7,52 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1456,6 ($[M + H]^+$, 100);

(g) бис(4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)пропанамидо)бензил)-8,8'-((пентан-1,5-

дишлбис(окси))(2E,2'E,11S,11aS,11'S,11a'S)-бис(2-этилиден-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат) (36)

Тетракис(трифенилфосфин)палладий (0) (10,0 мг, 0,0086 ммоль, 0,01 экв.) добавляли к смеси соединения **35** (1,33 г, 0,914 ммоль) и пирролидина (190 мкл, 2,28 ммоль, 2,5 экв.) в ДХМ (7,50 мл) и метаноле (0,5 мл).

- 5 Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре в течение 1 ч. 30 минут, и реакция была завершена, по данным ЖХМС. Добавляли хлорид аммония в воде (30 мл, 6% мас.) и энергично перемешивали смесь. Затем смесь декантировали в картридже для разделения фаз Biotage. ДХМ слой выпаривали досуха под вакуумом. Остаток растворяли в хлороформе (20 мл), и удаляли растворитель под вакуумом при 35 °С. Указанный цикл повторяли второй раз, затем сушили под высоким вакуумом (3
- 10 мбар) с получением неочищенного соединения **36** (1,17 г, 0,914 ммоль, выход 100%) в виде белого твердого вещества. Аналитические данные: ЖХ/МС, 3 мин. метод, RT 1,23 мин., 2 пика; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 645,0 ([*M* + 2H]²⁺, 100); 1288,8 ([*M* + H]⁺, 10).

(h) бис(4-((2S,5S)-37-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-5-изопропил-2-метил-4,7,35-триоксо-10,13,16,19,22,25,28,31-октаокса-3,6,34-триазагептапентаконтанамидо)бензил)-8,8'-(пентан-1,5-дишлбис(окси))(2E,2'E,11S,11aS,11'S,11a'S)-бис(2-этилиден-11-гидрокси-7-метокси-5-оксо-2,3,11,11a-тетрагидро-1H-бензо[e]пирроло[1,2-a][1,4]дiazепин-10(5H)-карбоксилат) (37)

- 15 ДХМ (10,00 мл) и метанол (0,4 мл) добавляли к соединению **36** (393 мг, 0,305 ммоль), затем добавляли мал-амидо-ПЭГ8-кислоту (380 мг, 0,628 ммоль, 2,06 экв.) и EDCI (128 мг, 0,668 ммоль, 2,2 экв.). Реакцию
- 20 проводили при комнатной температуре в течение 4 часов, после чего наблюдали завершение реакции, по данным ЖХМС. Добавляли хлорид аммония в воде (30 мл, 6% мас.) и энергично перемешивали смесь. Смесь декантировали в картридже для разделения фаз Biotage. ДХМ слой выпаривали досуха под вакуумом и очищали неочищенный остаток хроматографией (25 г Ultra, градиент от 15/85 до 100/0 смеси 20% MeOH в ДХМ / ДХМ за 12 объемов колонки; выдерживание при элюировании при около 48%). Фракции
- 25 анализировали с помощью ТСХ (10% MeOH в ДХМ). Чистые фракции объединяли. Растворитель удаляли выпариванием. Остаток дополнительно очищали обращенно-фазовой препаративной ВЭЖХ (градиент от 15 до 75% смеси вода/ацетонитрил + 0,01% муравьиной кислоты), затем сушили замораживанием и брали
- 30 аликвоту из ДХМ с получением соединения **37** (516 мг, 0,212 ммоль, выход 69,4%) в виде белого пенистого вещества. Чистота составила 97,65%. Аналитические данные: ЖХ/МС, 15 мин. метод, RT 6,61 мин.; МС (ИР⁺) *m/z* (относительная интенсивность) 1219,7 ([*M* + 2H]²⁺, 100); ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 9,92 (с, 2H), 8,17 (д, J = 6,9 Гц, 2H), 8,01 (т, J = 5,6 Гц, 2H), 7,87 (д, J = 8,7 Гц, 2H), 7,72 – 7,44 (м, 4H), 7,39 – 7,10 (м, 4H), 7,05 (с, 2H), 7,00 (с, 4H), 6,76 (с, 2H), 6,66 – 6,46 (м, 2H), 5,56 (д, J = 7,1 Гц, 2H), 5,34 (дд, J = 9,7, 5,9 Гц, 2H), 5,21 – 4,70 (м, 4H), 4,39 (т, J = 7,0 Гц, 2H), 4,22 (дд, J = 8,7, 6,7 Гц, 2H), 4,15 – 4,01 (м, 2H), 3,94 (д, J = 15,3 Гц, 4H), 3,86 – 3,72 (м, 8H), 3,60 (т, J = 7,3 Гц, 8H), 3,55 – 3,42 (м, 58H), 3,37 (т, J = 5,9 Гц, 4H), 3,15 (к, J = 5,8 Гц, 4H), 2,76 – 2,56 (м, 4H), 2,46 (т, J = 6,8 Гц, 2H), 2,40 (т, J = 6,5 Гц, 2H), 2,36 – 2,29 (м, 4H), 1,96 (к, J = 6,7 Гц, 2H), 1,78 (с, 4H), 1,66 (д, J = 6,6 Гц, 6H), 1,57 (д, J = 8,6 Гц, 2H), 1,30 (д, J = 7,0 Гц, 6H), 0,85 (дд, J = 15,2, 6,7 Гц, 12H).

Получение антител герцептин-Flexmab и NIP228-Flexmab

40 *Общая информация*

Клеточные линии SKBR-3 (HER2⁺, 1,5×10⁶ рецепторов/клетка), MDA-MB-453 (HER2⁺, 7,7×10⁴ рецепторов/клетка) и MCF-7 (HER2⁻) приобретали у ATCC и выдерживали в колбах для тканевых культур

T175 (Corning), используя рекомендованную производителем среду (SKBR-3: McCoy's 5A + 10% FBS, MDA-MB-453: DMEM + 10% FBS и MCF-7: DMEM + 10% FBS). Клетки 293F (Invitrogen), использованные для трансфекции, выдерживали в среде Freestyle 293F (Invitrogen). Клетки SKBR-3, MDA-MB-453 и MCF-7 выращивали в инкубаторе при 37 °C с 5% CO₂. Клетки 293F выращивали в качалочных колбах (2 л, Corning) при 37 °C с 8% CO₂ и при скорости вращения 120 об./мин. Все реагенты приобретали у Sigma Aldrich, VWR или JT Baker, если не указано иное, и использовали без дополнительной очистки.

Разработка и сборка антител герцептин-Flexmab и NIP228-Flexmab

Антитело дикого типа герцептин использовали в качестве матрицы для сборки герцептин-Flexmab. Легкая цепь герцептин-Flexmab состоит из двух мутаций, F118C и C214V, а тяжелая цепь содержит три мутации, L124C, C216V и C225V (см. Фиг. 3 и 5 – на Фигю 5, C представляет собой сконструированные цистеины, V представляет собой мутации с цистеина на валин, и C представляет собой цистеин, использованный для конъюгации/изменения мостиковой связи). Мутация F118C в легкой цепи образует дисульфидную связь с мутацией L124C в тяжелой цепи. Такой сконструированный дисульфид не является гидрофильным, но служит для защиты ковалентной связи между легкой и тяжелой цепями. Шарнирный цистеин C222 оставлен без модификации и служит в качестве места сайт-специфической конъюгации с лекарственным линкером на основе pBD. Последовательности легкой цепи и тяжелой цепи для герцептин-Flexmab были кодон-оптимизированы для экспрессии у млекопитающих, и их приобретали у компании GeneArt (Life Technologies). Оптимизированный конструкт герцептин-Flexmab субклонировали стандартными технологиями молекулярной биологии, используя сайты BssHII/NheI (легкая цепь) и сайты SalI/NotI (тяжелая цепь), в запатентованный вектор экспрессии млекопитающих MedImmune, который содержит сигнальный пептид легкой цепи IgG для секреции и промоторы цитомегаловируса для рекомбинантной экспрессии. Завершенную плазмиду экспрессии млекопитающих, pOE-герцептин-Flexmab, подтверждали секвенированием ДНК. Отрицательный контроль, антитело NIP228-флексмаб, получали так, как описано для герцептин-Flexmab, используя антитело NIP228 дикого типа (собственность MedImmune) в качестве матрицы.

Экспрессия и очистка антител герцептин-Flexmab и NIP228-Flexmab

Экспрессию и очистку антител герцептин-Flexmab и NIP228-Flexmab проводили в соответствии с опубликованными ранее способами (Dimasi, N., *et al.*, *Journal of Molecular Biology*, 2009, **393**, 672-692; DOI: 10.1016/j.jmb.2009.08.032). После транзientной экспрессии 293F и очистки белка А, антитела смешивали с буфером для конъюгации (1X PBS, 0,1 мМ ЭДТК, pH 7,2), используя диализные кассеты Slide-A-Lyzer при 4 °C (НОММ 10 кДа, Thermo), и концентрировали до 8,0 мг/мл (герцептин-Flexmab) и 5,52 мг/мл (NIP228-Flexmab), используя концентраторы Vivaspin (НОММ 10 кДа, GE Healthcare). Конечные концентрации определяли на спектрофотометре Nanodrop (A₂₈₀, Thermo). Через 6 дней выход транзientной экспрессии составлял 500 мг/л и 150 мг/л для герцептин-Flexmab и NIP228-Flexmab, соответственно.

Пример 7. Сборка ADC герцептин-Flexmab и NIP228-Flexmab

Герцептин-Flexmab (15 мг, 100 нмоль) в буфере для конъюгации (1X PBS, 1 мМ ЭДТК, pH 7,2, 3 мл) восстанавливали с помощью ТСЕР (3 экв., 300 нмоль, Thermo) в течение 2 часов при комнатной температуре. После восстановления к восстановленному антителу добавляли ДМСО (10% об./об., 300 мкл), затем добавляли соединение **10** (3 экв., 300 нмоль). Реакцию конъюгации проводили при комнатной

температуре в течение 3 часов. Избыток соединения **10** гасили *N*-ацетилцистеином (5 экв. относительно соединения **10**, 1,5 мкмоль, Sigma Aldrich) и диализовали ADC против трех замен буфера для конъюгации при 4 °С, используя диализную кассету Slide-A-Lyzer (НОММ 10 кДа, Thermo). ADC разбавляли 1:5 деионизированной H₂O и загружали на колонку из керамического гидроксипатита II типа (Bio-Rad) при 5 мл/мин., используя жидкостный хроматограф быстрого разрешения АКТА Pure (GE Healthcare), и промывали колонку 20 объемами колонки буфера СНТ А (10 мМ NaPO₃, pH 7). Элюирование ADC проводили с использованием линейного градиента буфера СНТ В (0-2 М NaCl в 10 мМ NaPO₃, pH 7) за 20 минут. Элюированный ADC диализовали в течение ночи при 4 °С в буфер для конъюгации, используя диализную кассету Slide-A-Lyzer (НОММ 10 кДа), и разбавляли 1:5 буфером НИС А (25 мМ Tris-HCl, 1,5 М (NH₄)₂SO₄, pH 8). ADC загружали на колонку для полупрепаративной хроматографии гидрофобных взаимодействий (НИС) (HiTrap Butyl-S FF, GE Healthcare) при 1 мл/мин., используя жидкостный хроматограф быстрого разрешения АКТА Pure, и промывали 20 объемами колонки буфера НИС А. ADC элюировали, используя линейный градиент буфера НИС В (25 мМ Tris-HCl, 5% изопропилового спирта) за 45 минут при 1 мл/мин. Очищенный герцептин-Flexmab-**10** диализовали в буфер для конъюгации в течение ночи при 4 °С, концентрировали в концентраторе Vivaspin (НОММ 10 кДа) до 2 мг/мл и стерильно отфильтровывали через шприц-фильтр 0,2 мкм (Pall Corporation). Предложенный способ схематически изображен на Фиг. 4. Выделенные V означают мутации валина.

Сайт-специфическую конъюгацию соединения **10** с NIP228-Flexmab и последующую очистку осуществляли так, как описано для герцептин-Flexmab-**10**.

Пример 8. Аналитическая характеристика ADC

ДСН-ПААК

ДСН-ПААГ использовали для подтверждения молекулярной массы конструкторов герцептин-Flexmab, герцептин-Flexmab-**10**, NIP228-Flexmab и NIP228-Flexmab-**10**. Образцы (2 мкг, в исходном или конъюгированном виде) смешивали 1:4 с буфером для образца LDS Bolt (Invitrogen), 1:10 с восстанавливающим буфером Nu-ПААГ (Invitrogen) и нагревали до 70 °С в течение 10 минут, затем загружали на 10% гель Bis-tris (Invitrogen). Гели подвергали электрофорезу при 150 В и окрашивали окрашивающим реагентом простым синим (Invitrogen) и удаляли краситель деионизированной H₂O. Гели визуализировали с помощью системы визуализации Gel Doc EZ (Bio-RAD).

Восстановленный ДСН-ПААГ использовали для подтверждения молекулярной массы очищенных антител герцептин-Flexmab и NIP228-Flexmab и ADC. Результаты демонстрируют разделение легких цепей (LC) и тяжелых цепей (HC) герцептин-Flexmab с молекулярной массой ~25 кДа и 50 кДа, соответственно. Конъюгирование полезной нагрузки соединения **10**, содержащего два малеимида, с герцептин-Flexmab приводило к весьма эффективному мостиковому связыванию тяжелых цепей с наличием полосы при 100 кДа. Такие же результаты наблюдали для NIP228-Flexmab, с четкой идентификацией легкой и тяжелой цепей в восстановительных условиях. Наблюдали весьма эффективное связывание через дисульфидные мостики тяжелых цепей NIP228-Flexmab с соединением **10**. Агрегацию не наблюдали ни для антител, ни для ADC.

Хроматография гидрофобного взаимодействия

Аналитическую хроматографию гидрофобного взаимодействия использовали для оценки эффективности конъюгации соединения **10** на антителах герцептин-Flexmab и NIP228-Flexmab и для оценки отношения лекарственного соединения к антителу (DAR) для каждого ADC. ADC (500 мкг в 50 мкл) по отдельности загружали на колонку Proteomix HIC Butyl-NP5 (внутренний диаметр 4,6 мм × 3,5 см × 5 мкм, Sepax), используя буфер HIC A (25 mM Tris-HCl, 1,5 M (NH₄)₂SO₄, pH 8), и элюировали ADC с использованием линейного градиента буфера HIC B (25 mM Tris-HCl, 5% изопропилового спирта, pH 7, 5-100%) за 13 минут при 0,8 мл/мин. Абсорбцию измеряли при 280_{нм} и 330_{нм} и вручную интегрировали элюированные пики для определения эффективности конъюгации каждого ADC. Эффективность конъюгации и DAR рассчитывали по уравнению 1 и уравнению 2, соответственно.

Уравнение 1: эффективность конъюгации

$$= \left[\frac{\text{Площадь}_{\text{конъюгированный}}}{(\text{Площадь}_{\text{неконъюгированный}} + \text{Площадь}_{\text{конъюгированный}})} \right] \times 100$$

Уравнение 2: DAR =
$$\left[\frac{\text{Площадь}_{\text{DAR1}} + 2(\text{Площадь}_{\text{DAR2}}) + n(\text{Площадь}_{\text{DAR...n}})}{(\text{Площадь}_{\text{DAR0}} + \text{Площадь}_{\text{DAR1}} + \text{Площадь}_{\text{DAR2}} + \text{Площадь}_{\text{DAR...n}})} \right]$$

ADC	Площадь _{DAR0}	Площадь _{DAR1}	Площадь _{DAR2}	Эфф. конъюг.	DAR
Герцептин-Flexmab3-10	138,4	1285,9	н/д	90,3	0,90
NIP228-Flexmab3-10	118,1	1191,4	н/д	90,1	0,90

15 Эксклюзионная хроматография

Эксклюзионную хроматографию ВЭЖХ (ЭХ-ВЭЖХ) проводили на исходных антителах и ADC для анализа чистоты и агрегации с помощью ВЭЖХ серии Agilent 1200. Образцы (100 мкг в 100 мкл буфера для конъюгации) вводили в колонку TSK Gel (G3000SW, внутренний диаметр 8 мм × 30 см × 5 мкм, Tosoh Bioscience), используя 0,1 M NaPO₄, 0,1 M NaSO₄, 10% изопропанола, pH 6,8 в качестве подвижной фазы при скорости потока 1 мл/мин. Абсорбцию элюированных пиков измеряли при 280_{нм} с последующим интегрированием вручную для определения чистоты и процентной агрегации каждого образца.

После очистки белка А каждое антитело обеспечивало получение высокого содержания мономера, превышающее 98%, и указанные характеристики сохранялись после конъюгации полезной нагрузки соединения **10** с образованием ADC с DAR = 1. Герцептин-Flexmab и герцептин-Flexmab-10 элюировали при времени удерживания (T_R) 8,65 минуты и 8,66 минуты, и 9,01 минуты, соответственно. NIP228-Flexmab и NIP228-Flexmab-10 элюировали при T_R=8,52 минуты и 8,54 минуты, соответственно.

Обращенно-фазовая ВЭЖХ восстановленных соединений

Для подтверждения сайт-специфической конъюгации соединения **10** на тяжелой цепи антител использовали обращенно-фазовую ВЭЖХ (воФ-ВЭЖХ) восстановленных соединений. ADC обрабатывали дитиотреитолом (DTT, 50 mM) в течение 30 минут при комнатной температуре. После восстановления ADC

5 вводили в колонку PLRP-S (1000Å, 2,1 мм × 50 мм, Agilent) и элюировали градиентной подвижной фазой растворителя А для ОФ-ВЭЖХ (0,1% трифторуксусной кислоты в воде) и растворителя В для ОФ-ВЭЖХ (0,1% трифторуксусной кислоты в ацетонитриле), от 5% растворителя В до 100% растворителя В за 25 минут. Градиентное элюирование проводили при 80 °С при скорости потока 1 мл/мин. Абсорбцию измеряли при 280_{нм}.

10 Хроматограммы герцептин-Flexmab и ADC герцептин-Flexmab-10 накладывали друг на друга. Легкие цепи обоих соединений элюировались вместе (герцептин-Flexmab-10 $T_R = 17,57$ мин.; герцептин-Flexmab $T_R = 17,54$ мин.), однако, наблюдали заметное изменение времени удерживания для тяжелой цепи герцептин-Flexmab-10 ($T_R = 21,31$ мин.), по сравнению с неконъюгированным антителом герцептин-Flexmab ($T_R = 19,75$ мин.). Небольшое количество неконъюгированной тяжелой цепи также наблюдали на хроматограмме герцептин-Flexmab-10 ($T_R = 19,97$ мин.).

15 Хроматограммы для отрицательных контрольных образцов NIP228-Flexmab и NIP228-Flexmab-10 также накладывали друг на друга для проведения сравнительного анализа. Тяжелая цепь ADC NIP228-Flexmab-10 демонстрировала изменение времени удерживания ($T_R = 21,57$ мин.) по сравнению с тяжелой цепью NIP228-Flexmab ($T_R = 20,09$ мин.). Наблюдали небольшое количество неконъюгированной тяжелой цепи для NIP228-Flexmab-10 ($T_R = 20,35$ мин.).

20 *Масс-спектрометрия*

Использовали обращенно-фазовую жидкостную хроматомасс-спектрометрию (ЖХМС) интактных и восстановленных соединений для подтверждения молекулярных масс антител герцептин-Flexmab и NIP228-Flexmab и ADC. Приблизительно 2 мкг (4 мкл) антитела или ADC вводили в колонку ВЭЖХ серии Agilent 1200, последовательно соединенную с времяпролетной (ВП) ЖХ-МС для точного измерения масс Agilent 25 6520. Антитело или ADC загружали на колонку быстрого разрешения Zorbax 300 Diphenyl HD (2,1 мм × 50 мм × 1,8 мкм) и элюировали при скорости потока 0,5 мл/мин. ступенчатым градиентом 1-80% растворителя В (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле) через 2 минуты (растворителя А: 0,1% муравьиной кислоты в воде). Данные записывали и анализировали с помощью программного обеспечения MassHunter (Agilent).

30 Очищенный герцептин-Flexmab демонстрировал пик при 147985,36 Да (G0f расч.: 147980,8 Да). После конъюгирования с полезной нагрузкой, соединением 10 (ММ: 2408,67 Да), ЖХМС демонстрировала молекулярную массу герцептин-Flexmab3-10, равную 150396,71 Да (G0f расч.: 150394,03 Да). Анализ NIP228-Flexmab с помощью ЖХМС выявил пик при 146770,36 Да (G0f расч.: 146743,98 Да). После конъюгирования с полезной нагрузкой, соединением 10, наблюдали пик с ММ 149199,75 Да (G0f расч.: 149152,65 Да).

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)

40 Антитела и ADC подвергали тщательному диализу в 25 мМ гистидине с рН 6 при 4 °С и получали в концентрации 0,5 мг/мл. Эксперименты ДСК проводили на приборе MicroCal VP-DSC (Malvern). Исходные данные нормировали по концентрации и скорости сканирования (1 °С/мин.). Анализ данных и деконволюцию проводили с помощью программного обеспечения Origin 7 (Malvern). Деконволюционный анализ проводили с помощью недвухуровневой модели, и наилучшие совпадения получали, используя 10-15

циклов итерации. Для каждого конструкта определяли температуру денатурации, T_m , соответствующую максимуму переходных пиков.

5 Результаты экспериментов ДСК показали температуру перехода T_m для доменов CH2 и Fab герцептина (CH2 $T_{m1} = 68,95$ °C, Fab $T_{m2} = 81,43$ °C) и NIP228 (CH2 $T_{m1} = 69,09$ °C, Fab $T_{m2} = 74,22$ °C) антител дикого типа (Wakankar, A.A., *et al.*, *Bioconjugate Chemistry*, 2010, **21**, 1588-1595; DOI: 10.1021/bc900434c). Антитело NIP228 демонстрировало третью температуру перехода T_m для домена CH3 при 81,92 °C. Внедрение технологии Flexmab в указанные антитела обуславливало изменение указанных трех температур перехода T_m , при этом домен Fab имел более низкую температуру перехода T_m по сравнению с доменом CH2 (герцептин-Flexmab Fab $T_{m1} = 68,21$ °C, CH2 $T_{m1} = 81,05$ °C; NIP228-Flexmab Fab $T_{m1} = 66,58$ °C, CH2 $T_{m3} = 81,85$ °C). Как можно видеть для антитела NIP228 дикого типа, авторы изобретения наблюдали третью температуру перехода T_m у NIP228-Flexmab для домена CH3 ($T_{m2} = 76,28$ °C). Как и ожидалось, после конъюгации соединения **10** с антителами герцептин-Flexmab и NIP228-Flexmab, наблюдали самые минимальные изменения температур перехода T_m . (Герцептин-Flexmab-**10** Fab $T_{m1} = 67,83$ °C, CH2 $T_{m1} = 81,11$ °C; NIP228-Flexmab-**10** Fab $T_{m1} = 66,11$ °C, CH2 $T_{m3} = 82,19$ °C). Третья температура перехода T_m для домена CH3 NIP228-Flexmab-**10** ($T_{m2} = 78,78$ °C) минимально изменилась по сравнению с NIP228-Flexmab.

Пример 9 - *In vitro* характеристика антител герцептин-Flexmab и NIP228-Flexmab и ADC

Связывание клеток с использованием проточной цитометрии

20 Связывающую аффинность и специфичность ADC герцептин-Flexmab и NIP228-Flexmab подтверждали проточной цитометрией. В день исследования клетки SKBR-3 (HER2⁺) и MCF-7 (HER2⁻) отделяли от колбы с помощью трипсина TrypLE (Life Technologies) и повторно суспендировали в соответствующей среде для выращивания. Клетки подсчитывали на цитометре ViCell (Beckman Coulter) и доводили до концентрации 1×10^6 клеток/мл. Клетки в двух экземплярах переносили в лунки (5×10^4 клеток/лунка) 96-луночного планшета (Falcon) и центрифугировали при 1200 об./мин. при 4 °C. Гранулы клеток повторно суспендировали в 180 мкл буфера для проточной цитометрии (PBS pH 7,2, 2% FBS, на льду) и по отдельности добавляли к клеткам антитело или ADC (20 мкл серийного разбавления: 200 мкг/мл – 0,01 мкг/мл; конечная концентрация 20 мкг/мл – 0,001 мкг/мл). Антитела и клетки инкубировали при 4 °C в течение 1 часа, после чего их промывали буфером для проточной цитометрии и гранулировали центрифугированием (2х, 1200 об./мин.). После последнего поворота гранулированные клетки повторно суспендировали во вторичном античеловеческом антителе, конъюгированном с AlexaFluor 647 (150 мкл, 8 мкг/мл, в PBS pH 7,2, 2% FBS), и инкубировали при 4 °C в течение 1 часа. Клетки промывали буфером для проточной цитометрии и центрифугировали (2х, 1200 об./мин.), затем повторно суспендировали в 135 мкл буфера для проточной цитометрии. В каждую клеточную суспензию добавляли DAPI (15 мкл из 10X маточного раствора, конечная концентрация 1 мкМ, Sigma Aldrich), действующий как краситель для живых/погибших клеток. Данные флуоресценции клеток записывали на проточном цитометре LSRII (Beckton Dickson) и анализировали данные с помощью программного обеспечения FlowJo Analysis (версии 9, FlowJo, LLC). Кривые связывания строили с помощью GraphPad Prism (версии 6, GraphPad Software, Inc.).

35

40 ADC герцептин-Flexmab-**10** демонстрировал высокую аффинность ($EC_{50} = 0,24$ мкг/мл) и селективность в отношении клеточной линии SKBR-3 при отсутствии связывания с клеточной линией MCF-7.

Испытания стабильности сыворотки

Сыворотку мышей (Jackson Immunoresearch Labs) фильтровали через шприц-фильтр 0,2 мкм (Pall Corporation) в стерильные полипропиленовые пробирки и хранили на льду. К мышинной сыворотке добавляли ADC (200 мкг) до конечной концентрации 200 мкг/мл и инкубировали образцы при 37 °С. В качестве отрицательного контроля использовали PBS. Из каждого образца брали аликвоты по 200 мкл через время T = 0, 24, 72 и 148 часов инкубации. Образец, взятый в момент T = 0, помещали на сухой лед в первые минуты после добавления ADC к сыворотке. Образцы хранили при -80 °С до проведения аффинного захвата и анализа ЖХМС. Для аффинного захвата ADC из мышинной сыворотки использовали агарозу античеловеческого IgG (Fc-специфического) (Sigma Aldrich). Для каждого момента времени смешивали 50 мкл гранул агарозы античеловеческого Fc с 300 мкл PBS и 100 мкл образца сыворотки в течение 30 минут при комнатной температуре при непрерывном вращении. Гранулы три раза промывали 1× PBS для удаления несвязанных белков сыворотки и элюирования ADC, используя 100 мкл буфера для элюирования IgG (Thermo Scientific), и нейтрализовали, используя 20 мкл 1 М Tris с pH 8. Отдельные образцы (20 мкл) анализировали с помощью ЖХМС, как описано выше, и анализировали исходные данные с помощью программного обеспечения Masshunter.

Через семь дней инкубации ЖХМС показала, что утрачено менее 1% полезной нагрузки соединения **10** из герцептин-Flexmab-**10**. Такая высокая стабильность *in vitro* позволяет предположить, что может быть снижена нецелевая токсичность *in vivo*.

Анализ цитотоксичности

Клетки SKBR-3, MDA-MD-453 и MCF-7 хранили так, как описано выше. За день до обработки клетки отделяли от колбы с помощью трипсина TrypLE и повторно суспендировали в среде для выращивания. Клетки подсчитывали на цитометре ViCell и доводили до концентрации $1,0 \times 10^5$ клеток/мл в соответствующей среде для выращивания. Клеточные суспензии (100 мкл, $1,0 \times 10^4$ клеток/лунка) переносили в лунки 96-луночного планшета с белыми стенками и прозрачным дном (Corning). Клетки оставляли прикрепляться на ночь в инкубаторе при 37 °С с 5% CO₂. В день обработки получали серийные разбавления ADC в диапазоне 30 мкг/мл – 1,5 нг/мл и добавляли в лунки 50 мкл каждого разбавления в трех экземплярах (конечные концентрации ADC 10 мкг/мл – 0,5 нг/мл, общий объем в каждой лунке 150 мкл). В каждый планшет также включали соответствующие лунки без обработки, которые использовали в качестве контроля. На 5 день планшеты извлекали из инкубатора и оставляли уравниваться до комнатной температуры. Планшеты центрифугировали (1300 об./мин., 5 мин.) и аспирировали надосадочный раствор. В каждую лунку добавляли среду (SKBR-3: McCoу 5A, MDA-MB-453 и MCF-7: DMEM) без фенолового красного или FBS (50 мкл), затем добавляли реагент CellTiter-Glo® (50 мкл). Планшеты встряхивали в течение 1 часа в темноте при комнатной температуре и измеряли люминесценцию на планшет-ридере Envision™ (PerkinElmer). Процент жизнеспособности рассчитывали следующим образом: (неизвестное/сп. контроль)*100. Экспериментальные данные наносили на график с помощью GraphPad Prism для построения кривых IC₅₀.

Через 3 дня инкубации в клетках MDA-MB-453 (низкая экспрессия HER2; $7,7 \times 10^4$ рецепторов HER2 на лунку), герцептин-Flexmab-**10** демонстрировал IC₅₀ = 1,08 нМ с жизнеспособностью клеток ~90%. Через 5 дней герцептин-Flexmab-**10** демонстрировал IC₅₀ = 0,0375 нМ с жизнеспособностью клеток ~35%.

Через 3 дня инкубации в клетках SKBR-3 (высокая экспрессия HER2; $1,5 \times 10^6$ рецепторов HER2 на лунку), герцептин-Flexmab-10 демонстрировал $IC_{50} = 0,229$ нМ с жизнеспособностью клеток $\sim 30\%$. Через 5 дней герцептин-Flexmab-10 демонстрировал $IC_{50} = 0,0355$ нМ с жизнеспособностью клеток $\sim 5\%$.

5

Пример 10 - *In vivo* характеристика антител герцептин-Flexmab и NIP228-Flexmab и ADC

Все исследования, включающие использование животных, проводили гуманным образом по протоколу, одобренному институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию MedImmune в учреждении, аккредитованном компанией AAALAC International.

10

Ксенотрансплантаты

Клетки NCI-N87 (5×10^6) в 50% матрикеле подкожно инокулировали 4-6-недельным самкам бестимусных голых мышей (Harlan). По достижении объема опухолей 200 мм^3 , мышей случайным образом разделяли на группы, по 5 мышей в группе. ADC вводили IV в указанных дозах, причем введение осуществляли на 5 день после инокуляции клеток. Объем опухолей измеряли два раза в неделю с помощью штангенциркуля. Объем опухолей рассчитывали по формуле $\frac{1}{2} \times L \times W^2$ (L = длина; W = ширина). Измеряли массу тела для оценки переносимости лечения. Кривые роста опухоли и массы тела строили с помощью программного обеспечения Prism5 (GraphPad, Ла-Холья, штат Калифорния). Объем опухоли выражали как среднее значение \pm СОС.

15

20

На Фиг. 1 показано влияние однократной дозы 1,0 мг/кг (♦) по сравнению с отсутствием лечения (●) – указанная доза вызывала регрессию опухоли после стаза опухоли в течение 55 дней.

25

На Фиг. 2 показано влияние однократной дозы 0,3 мг/кг (♦) по сравнению с отсутствием лечения (●) – указанная доза вызывала регрессию опухоли после стаза опухоли в течение 55 дней.

Токсичность

Самцам крыс Спрага-Дули (в возрасте 8-12 недель, 5 на группу) вводили однократную IV инъекцию (1 день) 0,75, 1,5, 3 или 4 мг/кг герцептин-Flexmab-10 и проводили оценку крыс в течение 21 дня. Животных сателлитной токсикокинетической (ТК) группы (по 3 на группу) включали в каждую группу лечения для измерения концентрации в плазме суммарного антитела и ADC. Контрольным крысам (5 на группу) вводили однократную IV инъекцию контрольного носителя на 1 день. Всех животных, участвующих в основном исследовании, оценивали по клиническим признакам, изменениям массы тела, клинической патологии, макропатологии с массой органов и микроскопическим наблюдениям. Всех животных сателлитной ТК группы оценивали по клиническим признакам, изменениям массы тела и фармакокинетическим анализам. Образцы для анализов гематологии и химического состава сыворотки собирали и анализировали на 8 и 15 день. Дополнительные образцы для анализа коагуляции собирали и анализировали только на 22 день. Образцы крови для фармакокинетического анализа собирали в пробирки с K_2 ЭДТА до введения доз в несколько моментов времени на 1, 8, 15 и 22 день. Макроскопическое вскрытие проводили на всех животных, участвовавших в главном исследовании, и органы стандартного списка, включая головной мозг, легкие, печень, почки, селезенку, тимус, яички, сердце и кости, заливали в парафин, получали срезы, окрашивали гематоксилином и эозином и изучали под микроскопом с привлечением патологоанатома-

30

35

40

ветеринара.

Хорошо переносимыми были дозы герцептин-Flexmab-10 до 4 мг/кг.

5 *Терапевтический индекс*

Терапевтический индекс можно рассчитать делением максимальной переносимой однократной дозы (MTD) ADC ненаправленного действия у крыс на минимальную эффективную однократную дозу (MED) ADC направленного действия. MED представляет собой однократную дозу, необходимую для достижения стаза опухоли в *in vivo* модели через 28 дней (для ксенотрансплантата NCI-N87). Таким образом, рассчитанный
10 терапевтический индекс для герцептин-Flexmab-10 составляет по меньшей мере 13,3.

Пример 11

Герцептин и антитела R347, сконструированные так, что они содержат цистеин, внедренный между
положениями 239 и 240, получали способами, описанными в публикации Dimasi, N., et al., *Molecular*
15 *Pharmaceutics*, 2017, 14, 1501-1516 (DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00995).

HerC239i-10 ADC

ДТТ (100 молярных эквивалентов/антитело, 26,7 микромоль) добавляли к раствору антитела герцептин-
C239i (40 мг, 266,7 наномоль) в PBS, 1 мМ ЭДТК, pH 7,4, и доводили конечный объем до 8 мл.
20 Восстановление проводили при комнатной температуре в течение 4 часов при осторожном встряхивании,
затем удаляли ДТТ центробежным фильтрованием, используя центробежный фильтр Amicon Ultracell с
НОММ 30 кДа. Добавляли (L)-дегидроаскорбиновую кислоту (DHAA, 20 молярных эквивалентов/антитело,
5,3 микромоль, 106,7 мкл при 50 мМ в ДМСО) к восстановленному антителу (5 мг/мл, 8 мл) в PBS, 1 мМ
ЭДТК, pH 7,4, и проводили повторное окисление при комнатной температуре в течение ночи при
25 осторожном встряхивании. DHAA удаляли фильтрованием через мембранный фильтр 0,22 мкм и добавляли
соединение 10 в виде раствора в ДМСО (3 молярных эквивалента/антитело, 0,8 микромоль, в 0,9 мл ДМСО)
к 8,1 мл повторно окисленного антитела (40 мг, 266,7 наномоль) в PBS, 1 мМ ЭДТК, pH 7,4, до конечной
концентрации ДМСО 10% (об./об.). Раствор оставляли для протекания реакции при комнатной температуре
на 4 часа при осторожном встряхивании. Конъюгацию прекращали добавлением *N*-ацетилцистеина (4
30 микромоль, 40 мкл при 100 мМ) и очищали хроматографией гидрофобного взаимодействия, используя
колонку для жидкостной хроматографии быстрого разрешения и колонку HP-Butyl (5 мл) с градиентным
элюированием 1 М (NH₄)₂SO₄, 25 мМ калий-фосфатного буфера с pH 6,0, и 25 мМ калий-фосфатного
буфера с pH 6,0. Фракции, содержащие более 95% DAR1, объединяли, концентрировали, меняли буфер на
PBS с pH 7,4 с помощью центробежного фильтрования с использованием 15 мл центробежного фильтра
35 Amicon Ultracell с НОММ 50 кДа, стерильно отфильтровывали и анализировали.

Анализ СВЭЖХ на системе Shimadzu Prominence с использованием непористой колонки Proteomix HIC
Butyl-NP5, 5 мкм, 4,6 x 35 мм (Sepax), при элюировании градиентом 1,5 М сульфата аммония, 25 мМ ацетата
натрия с pH 7,4 и 25 мМ ацетата натрия с pH 7,4 с 20% ацетонитрила (об./об.) на неразбавленном образце
40 ADC HerC239i-10 при 214 нм выявил лишь однократно конъюгированное соединение 10, что согласуется с
отношением лекарственного соединения к антителу (DAR) 1,00 молекулы соединения 10 на антитело.

Анализ СВЭЖХ на системе Shimadzu Prominence с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР 4 мкм, 4,6 x 150 мм (с предколонкой 4 мкм, 3,0 x 20 мм), при элюировании со скоростью 0,3 мл/мин. стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с рН 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.) на неразбавленном образце ADC HerC239i-10 при 280 нм выявил чистоту мономера 99%. ЭХ-СВЭЖХ анализ выявил концентрацию конечного ADC HerC239i-10, равную 1,71 мг/мл в 11,1 мл, и массу полученного ADC HerC239i-10 18,9 мг (выход 47%).

R347C239i-10 ADC

ДТТ (100 молярных эквивалентов/антитело, 133,3 микромоляр) добавляли к раствору антитела R347-Maia (200 мг, 1,33 микромоляр) в PBS, 1 мМ ЭДТК, рН 7,4, и доводили конечный объем до 40 мл. Восстановление проводили при комнатной температуре в течение 4 часов при осторожном встряхивании, затем удаляли ДТТ тангенциальной поточной фильтрацией (волоконный фильтр 30 кДа). Добавляли (L)-дегидроаскорбиновую кислоту (ДНАА, 20 молярных эквивалентов/антитело, 26,7 микромоляр, 533,3 мкл при 50 мМ в ДМСО) к восстановленному антителу (4 мг/мл, 50 мл) в PBS, 1 мМ ЭДТК, рН 7,4, и проводили повторное окисление при комнатной температуре в течение ночи при осторожном встряхивании. ДНАА удаляли фильтрованием через мембранный фильтр 0,22 мкм и добавляли соединение **10** в виде раствора в ДМСО (2 молярных эквивалента/антитело, 2,67 микромоляр, в 5,6 мл ДМСО) к 50,5 мл повторно окисленного антитела (200 мг, 1,33 микромоляр) в PBS, 1 мМ ЭДТК, рН 7,4, до конечной концентрации ДМСО 10% (об./об.). Раствор оставляли для протекания реакции при комнатной температуре на 4 часа при осторожном встряхивании. Конъюгацию прекращали добавлением *N*-ацетилцистеина (6,7 микромоляр, 66,7 мкл при 100 мМ) и очищали хроматографией гидрофобного взаимодействия, используя колонку для жидкостной хроматографии быстрого разрешения и колонку HP-Butyl (5 мл) с градиентом элюированием 1 М (NH₄)₂SO₄, 25 мМ калий-фосфатного буфера с рН 6,0, и 25 мМ калий-фосфатного буфера с рН 6,0. Фракции, содержащие более 95% DAR1, объединяли, концентрировали, меняли буфер на 25 мМ гистидина, 200 мМ сахарозы с рН 6,0 с помощью центробежного фильтрования с использованием 15 мл центробежного фильтра Amicon Ultracell с НОММ 50 кДа, стерильно отфильтровывали и анализировали.

Анализ СВЭЖХ на системе Shimadzu Prominence с использованием непористой колонки Proteomix HIC Butyl-NP5, 5 мкм, 4,6 x 35 мм (Sepax), при элюировании градиентом 1,5 М сульфата аммония, 25 мМ ацетата натрия с рН 7,4 и 25 мМ ацетата натрия с рН 7,4 с 20% ацетонитрила (об./об.) на неразбавленном образце ADC R347C239i-10 при 214 нм выявил лишь однократно конъюгированное соединение **10**, что согласуется с отношением лекарственного соединения к антителу (DAR) 1,00 молекулы соединения **10** на антитело.

Анализ СВЭЖХ на системе Shimadzu Prominence с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР 4 мкм, 4,6 x 150 мм (с предколонкой 4 мкм, 3,0 x 20 мм), при элюировании со скоростью 0,3 мл/мин. стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с рН 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.) на неразбавленном образце ADC R347C239i-10 при 280 нм выявил чистоту мономера 99%. ЭХ-СВЭЖХ анализ выявил концентрацию конечного ADC R347C239i-10, равную 1,72 мг/мл в 55 мл, и массу полученного ADC R347C239i-10 94,5 мг (выход 47%).

1C1C239i-10 ADC

ДТТ (100 молярных эквивалентов/антитело, 3,3 микромоляр) добавляли к раствору антитела 1C1-Maia (5 мг,

33,3 наномоль) в PBS, 1 mM ЭДТК, pH 7,4, и доводили конечный объем до 2,5 мл. Восстановление проводили при комнатной температуре в течение 5 часов при осторожном встряхивании, затем удаляли DTT центробежным фильтрованием, используя центробежный фильтр Amicon Ultracell с НОММ 30 кДа. Добавляли (L)-дегидроаскорбиновую кислоту (ДНАА, 20 молярных эквивалентов/антитело, 0,67 микромоль, 13,3 мкл при 50 mM в ДМСО) к восстановленному антителу (2 мг/мл, 2,5 мл) в PBS, 1 mM ЭДТК, pH 7,4, и проводили повторное окисление при комнатной температуре в течение ночи при осторожном встряхивании. ДНАА удаляли фильтрованием через мембранный фильтр 0,22 мкм и добавляли соединение **10** в виде раствора в ДМСО (3 молярных эквивалента/антитело, 0,1 микромоль, в 0,27 мл ДМСО) к 2,5 мл повторно окисленного антитела (5 мг, 33,3 наномоль) в PBS, 1 mM ЭДТК, pH 7,4, до конечной концентрации ДМСО 10% (об./об.). Раствор оставляли для протекания реакции при комнатной температуре на 5 часа при осторожном встряхивании. Конъюгацию прекращали добавлением *N*-ацетилцистеина (2 микромоль, 39,6 мкл при 100 mM) и очищали препаративной эксклюзионной хроматографией, используя колонку для жидкостной хроматографии быстрого разрешения и колонку Superdex 200 26/600 с PBS при pH 7,4 в качестве элюирующего буфера. Фракции, содержащие более 95% мономеров, объединяли, концентрировали, меняли буфер на 25 mM гистидина, 200 mM сахарозы с pH 6,0 с помощью центробежного фильтрования с использованием 15 мл центробежного фильтра Amicon Ultracell с НОММ 50 кДа, стерильно отфильтровывали и анализировали.

Анализ СВЭЖХ на системе Shimadzu Prominence с использованием непористой колонки Proteomix HIC Butyl-NP5, 5 мкм, 4,6 x 35 мм (Sepax), при элюировании градиентом 1,5 M сульфата аммония, 25 mM ацетата натрия с pH 7,4 и 25 mM ацетата натрия с pH 7,4 с 20% ацетонитрила (об./об.) на неразбавленном образце ADC 1C1C239i-10 при 214 нм выявил неконъюгированное антитело и смесь однократно конъюгированного и двукратно конъюгированного соединения **10**, что согласуется с отношением лекарственного соединения к антителу (DAR) 1,04 молекулы соединения **10** на антитело.

Анализ СВЭЖХ на системе Shimadzu Prominence с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb НТР 4 мкм, 4,6 x 150 мм (с предколонкой 4 мкм, 3,0 x 20 мм), при элюировании со скоростью 0,3 мл/мин. стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 mM фосфата калия с pH 6,95, 250 mM хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.) на неразбавленном образце ADC 1C1C239i-10 при 280 нм выявил чистоту мономера 100%. ЭХ-СВЭЖХ анализ выявил концентрацию конечного ADC 1C1C239i-10, равную 1,45 мг/мл в 2,3 мл, и массу полученного ADC 1C1C239i-10 3,34 мг (выход 67%).

HerC239i-11 ADC

DTT (100 молярных эквивалентов/антитело, 3,3 микромоль) добавляли к раствору антитела герцептин-Maia (5 мг, 33,3 наномоль) в PBS, 1 mM ЭДТК, pH 7,4, и доводили конечный объем до 2,5 мл. Восстановление проводили при комнатной температуре в течение 5 часов при осторожном встряхивании, затем удаляли DTT центробежным фильтрованием, используя центробежный фильтр Amicon Ultracell с НОММ 30 кДа. Добавляли (L)-дегидроаскорбиновую кислоту (ДНАА, 20 молярных эквивалентов/антитело, 0,67 микромоль, 13,3 мкл при 50 mM в ДМСО) к восстановленному антителу (2 мг/мл, 2,5 мл) в PBS, 1 mM ЭДТК, pH 7,4, и проводили повторное окисление при комнатной температуре в течение ночи при осторожном встряхивании. ДНАА удаляли фильтрованием через мембранный фильтр 0,22 мкм и добавляли соединение **11** в виде раствора в ДМСО (1,5 молярных эквивалента/антитело, 0,05 микромоль, в 0,27 мл

- ДМСО) к 2,5 мл повторно окисленного антитела (5 мг, 33,3 наномоль) в PBS, 1 mM ЭДТК, pH 7,4, до конечной концентрации ДМСО 10% (об./об.). Раствор оставляли для протекания реакции при комнатной температуре на ночь при осторожном встряхивании. Конъюгацию прекращали добавлением *N*-ацетилцистеина (2 микромоляр, 39,6 мкл при 100 mM) и очищали препаративной эксклюзионной
- 5 хроматографией, используя колонку для жидкостной хроматографии быстрого разрешения и колонку Superdex 200 26/600 с PBS при pH 7,4 в качестве элюирующего буфера. Фракции, содержащие более 95% мономеров, объединяли, концентрировали, меняли буфер на 25 mM гистидина, 200 mM сахарозы с pH 6,0 с помощью центробежного фильтрования с использованием 15 мл центробежного фильтра Amicon Ultracell с
- НОММ 50 кДа, стерильно отфильтровывали и анализировали.
- 10 Анализ СВЭЖХ на системе Shimadzu Prominence с использованием непористой колонки Proteomix HIC Butyl-NP5, 5 мкм, 4,6 x 35 мм (Sepax), при элюировании градиентом 1,5 M сульфата аммония, 25 mM ацетата натрия с pH 7,4 и 25 mM ацетата натрия с pH 7,4 с 20% ацетонитрила (об./об.) на неразбавленном образце ADC HerC239i-11 при 214 нм выявил неконъюгированное антитело и смесь однократно конъюгированного
- 15 и двукратно конъюгированного соединения **11**, что согласуется с отношением лекарственного соединения к антителу (DAR) 1,10 молекулы соединения **11** на антитело.
- Анализ СВЭЖХ на системе Shimadzu Prominence с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 мкм, 4,6 x 150 мм (с предколонкой 4 мкм, 3,0 x 20 мм), при элюировании со скоростью
- 20 0,3 мл/мин. стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 mM фосфата калия с pH 6,95, 250 mM хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.) на образце ADC HerC239i-11 при 280 нм выявил чистоту мономера 99%. ЭХ-СВЭЖХ анализ выявил концентрацию конечного ADC HerC239i-11, равную 1,29 мг/мл в 4,0 мл, и массу полученного ADC HerC239i-11 3,23 (выход 65%).
- 25 IC1C239i-11 ADC
- DTT (100 молярных эквивалентов/антитело, 3,3 микромоляр) добавляли к раствору антитела IC1-Maia (5 мг, 33,3 наномоль) в PBS, 1 mM ЭДТК, pH 7,4, и доводили конечный объем до 2,5 мл. Восстановление проводили при комнатной температуре в течение 5 часов при осторожном встряхивании, затем удаляли DTT центробежным фильтрованием, используя центробежный фильтр Amicon Ultracell с НОММ 30 кДа.
- 30 Добавляли (L)-дегидроаскорбиновую кислоту (DHAA, 20 молярных эквивалентов/антитело, 0,67 микромоляр, 13,3 мкл при 50 mM в ДМСО) к восстановленному антителу (2 мг/мл, 2,5 мл) в PBS, 1 mM ЭДТК, pH 7,4, и проводили повторное окисление при комнатной температуре в течение ночи при осторожном встряхивании. DHAA удаляли фильтрованием через мембранный фильтр 0,22 мкм и добавляли
- 35 соединение **11** в виде раствора в ДМСО (1,5 молярных эквивалента/антитело, 0,05 микромоляр, в 0,27 мл ДМСО) к 2,5 мл повторно окисленного антитела (5 мг, 33,3 наномоль) в PBS, 1 mM ЭДТК, pH 7,4, до конечной концентрации ДМСО 10% (об./об.). Раствор оставляли для протекания реакции при комнатной температуре на ночь при осторожном встряхивании. Конъюгацию прекращали добавлением *N*-ацетилцистеина (2 микромоляр, 39,6 мкл при 100 mM) и очищали препаративной эксклюзионной
- 40 хроматографией, используя колонку для жидкостной хроматографии быстрого разрешения и колонку Superdex 200 26/600 с PBS при pH 7,4 в качестве элюирующего буфера. Фракции, содержащие более 95% мономеров, объединяли, концентрировали, меняли буфер на 25 mM гистидина, 200 mM сахарозы с pH 6,0 с помощью центробежного фильтрования с использованием 15 мл центробежного фильтра Amicon Ultracell с

НОММ 50 кДа, стерильно отфильтровывали и анализировали.

- Анализ СВЭЖХ на системе Shimadzu Prominence с использованием непористой колонки Proteomix HiC Butyl-NP5, 5 мкм, 4,6 x 35 мм (Sepax), при элюировании градиентом 1,5 М сульфата аммония, 25 мМ ацетата натрия с pH 7,4 и 25 мМ ацетата натрия с pH 7,4 с 20% ацетонитрила (об./об.) на неразбавленном образце ADC 1C1C239i-11 при 214 нм выявил неконъюгированное антитело и смесь однократно конъюгированного и двукратно конъюгированного соединения **11**, что согласуется с отношением лекарственного соединения к антителу (DAR) 1,05 молекулы соединения **11** на антитело.
- 10 Анализ СВЭЖХ на системе Shimadzu Prominence с использованием колонки Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 мкм, 4,6 x 150 мм (с предколонкой 4 мкм, 3,0 x 20 мм), при элюировании со скоростью 0,3 мл/мин. стерильно отфильтрованным буфером SEC, содержащим 200 мМ фосфата калия с pH 6,95, 250 мМ хлорида калия и 10% изопропанола (об./об.) на образце ADC 1C1C239i-11 при 280 нм выявил чистоту мономера 99%. ЭХ-СВЭЖХ анализ выявил концентрацию конечного ADC 1C1C239i-11, равную 1,50 мг/мл
- 15 в 2,2 мл, и массу полученного ADC 1C1C239i-11 3,3 мг (выход 66%).

Проводили дополнительные реакции конъюгации следующих антител с соединением **10**: RSV- C239i; B7H4-E02- C239i; PSMA- C239i; и CDH6-50B- C239i.

20 **Пример 12**

In vitro анализ PC3 IC1

- Среду из субконфлюэнтной (конфлюэнтность 80-90%) клеток PC3 в колбе T75 аспирировали и промывали колбу PBS (около 20 мл) и опустошали. Добавляли трипсин-ЭДТК (5 мл), колбу возвращали в насыщенный газом инкубатор при 37 °С примерно на 5 минут, затем резко постукивали для отделения осадка и
- 25 открепления клеток от пластика. Клеточную суспензию переносили в стерильную центрифужную пробирку объемом 50 мл с винтовой крышкой, разбавляли средой для выращивания до конечного объема 15 мл, затем центрифугировали (400g в течение 5 минут). Надосадочный раствор аспирировали и повторно суспендировали осадок в 10 мл культуральной среды. Может потребоваться повторный отбор пипеткой для
- 30 получения монодисперсной клеточной суспензии. Концентрацию и жизнеспособность клеток измеряли по клеткам, окрашенным трипановым синим, с помощью LUNA-II. Клетки разбавляли до 1500 клеток/лунка, распределяли (50 мкл/лунка) в 96-луночные плоскодонные планшеты и инкубировали в течение ночи перед использованием.

- Исходный раствор (1 мл) конъюгата антитело-лекарственное соединение (ADC) (20 мкг/мл) получали
- 35 разбавлением стерилизованного через фильтр ADC в среде для клеточных культур. Серию 8x10-кратных разбавлений исходного ADC проводили в 24-луночном планшете посредством серийного переноса 100 мкл в 900 мкл среды для клеточных культур. Разбавленный ADC распределяли (50 мкл/лунка) в 4 экземплярах в лунки 96-луночного планшета, содержащие 50 мкл клеточной суспензии, высеянной в предыдущий день. В
- 40 контрольные лунки помещали 50 мкл среды для клеточных культур. 96-луночный планшет, содержащий клетки и ADC, инкубировали при 37 °С в насыщенном CO₂ инкубаторе в течение 6 дней. По окончании периода инкубации планшеты уравнивали до комнатной температуры в течение 30 минут, затем в каждую лунку вводили CellTiter-Glo (Promega) (100 мкл на лунку). Планшеты устанавливали на

орбитальный шейкер на 2 минуты, после чего проводили стабилизацию при комнатной температуре в течение 10 минут. Измеряли люминесценцию лунок и рассчитывали процентное выживание клеток по средней люминесценции в 4 лунках, обработанных ADC, по сравнению со средней люминесценцией в 4 контрольных, не обработанных лунках (100%). IC₅₀ определяли по данным зависимости ответа от дозы с помощью GraphPad Prism, используя алгоритм нелинейного сглаживания кривой: сигмоидальная зависимость ответа от дозы, X представляет собой log(концентрации). Среда для выращивания клеток для РС3 представляла собой: F12K с глутамином, 10% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки HyClone™.

ADC	EC50 (мкг/мл)
1C1C239i-10 ADC	0,002247
1C1C239i-11 ADC	0,003987

10 *In vitro* анализ MTS

Активность ADC *in vitro* измеряли в клеточной линии NCI-N87, экспрессирующей Her2, и в Her2-негативной клеточной линии MDA-MB-468.

15 Концентрацию и жизнеспособность клеток из субконфлюэнтной (конфлюэнтность 80-90%) клеточной культуры в колбе T75 измеряли по клеткам, окрашенным трипановым синим, и подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток LUNA-II™. Клетки разбавляли до 2x10⁵/мл, распределяли (50 мкл/лунка) в 96-луночные плоскодонные планшеты.

Исходный раствор (1 мл) конъюгата антитело-лекарственное соединение (ADC) (20 мкг/мл) получали разбавлением стерилизованного через фильтр ADC в среде для клеточных культур. Серию 8x10-кратных разбавлений исходного ADC проводили в 24-луночном планшете посредством серийного переноса 100 мкл в 900 мкл среды для клеточных культур. Разбавленный ADC распределяли (50 мкл на лунку) в 4 экземплярах в лунки 96-луночного планшета, содержащие 50 мкл клеточной суспензии, высеянной ранее. В контрольные лунки помещали 50 мкл среды для клеточных культур. 96-луночный планшет, содержащий клетки и ADC, инкубировали при 37 °C в насыщенном CO₂ инкубаторе в течение времени воздействия.

25 По окончании периода инкубации измеряли жизнеспособность клеток с помощью анализа MTS. MTS (Promega) помещали (20 мкл на лунку) в каждую лунку и инкубировали в течение 4 часов при 37 °C в насыщенном CO₂ инкубаторе. Поглощение в лунках измеряли при 490 нм. Процентное выживание клеток рассчитывали по среднему поглощению в 4 лунках, обработанных ADC, в сравнении со средним поглощением в 4 контрольных, необработанных лунках (100%). IC₅₀ определяли по данным зависимости ответа от дозы с помощью GraphPad Prism, используя алгоритм нелинейного сглаживания кривой: сигмоидальная кривая зависимости ответа от дозы с переменным углом наклона.

30 Время инкубации ADC составляло 4 дня с MDA-MB-468 и 7 дней для NCI-N87. MDA-MB-468 и NCI-N87 выращивали в среде RPMI 1640 с Glutamax + 10% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки HyClone™.

EC50 (мкг/мл)	NCI-N87	MDA-MB-468
HerC239i-10 ADC	0,0002893	14,9
HerC239i-11 ADC	0,0005823	11,4

35 **Пример 13**

Мыши

Возраст самок мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (Fox Chase SCID®, C.B-17/Isr-Prkdcscid, Charles River) составлял десять недель, диапазон массы тела (BW) от 16,2 до 21,9 г на 1 день исследования. Животных обеспечивали водой *ad libitum* (обратный осмос, 1 м.д. Cl) и модифицированным кормом NIH 31, а также облученным кормом Lab Diet®, состоящим из 18,0% неочищенного белка, 5,0% неочищенного жира и 5,0% неочищенного волокна. Мышей содержали на подстилке для лабораторных животных Envigo[®] cobs™ в статических микроизоляторах с 12-часовым циклом освещения при 20–22°C (68–72°F) и влажности 40–60%. Компания CR Discovery Services, в частности, действует в соответствии с рекомендациями Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных в отношении обездвиживания, содержания, хирургических операций и регуляции обеспечения корма и жидкости, а также ветеринарного ухода. Программа по содержанию и использованию животных в компании CR Discovery Services аккредитована Международной ассоциацией по аттестации и аккредитации содержания лабораторных животных (AAALAC), что гарантирует соблюдение принятых стандартов по содержанию и использованию лабораторных животных.

15 Ксенотрансплантаты JIMT-1

Культура опухолевых клеток

Клетки карциномы молочной железы человека JIMT-1 выращивали в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамина, 100 единиц/мл пенициллина G натрия, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата и 25 мкг/мл гентамицина. Клетки выращивали в колбах для тканевых культур в увлажненном инкубаторе при 37 °C, в атмосфере 5% CO₂ и 95% воздуха.

In Vivo имплантация и рост опухоли

В день имплантации клетки JIMT-1 собирали на логарифмической фазе роста и повторно суспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) в концентрации 1×10^8 клеток/мл в 50% Matrigel™ (BD Biosciences). Ксенотрансплантаты получали подкожной имплантацией 1×10^7 клеток JIMT-1 (0,1 мл суспензии) в правый бок каждого экспериментального животного. Опухоли наблюдали по мере увеличения их объема, приближающегося к целевому диапазону от 100 до 150 мм³, и измеряли в двух направлениях с помощью штангенциркуля. Объем опухоли рассчитывали по формуле:

$$30 \quad \text{Объем опухоли (мм}^3\text{)} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

где w = ширина, и l = длина, в мм, опухоли. Массу опухоли можно оценить, допуская, что 1 мг эквивалентен 1 мм³ объема опухоли.

Лечение

35 Через четырнадцать дней после имплантации опухоли, обозначенной как 1 день исследования, животных разделяли на группы ($n = 10$) с отдельными объемами опухоли от 75 до 162 мм³, и средние объемы опухоли в группах составляли 115-117 мм³.

ADC HerC239i-10 и ADC HerC239i-SG3249 вводили внутривенно в однократной дозе 0,3 мг/кг на 1 день. Группу, которой вводили носитель, использовали в качестве контрольной группы роста опухоли. Опухоли измеряли два раза в неделю.

HerC239i-**SG3249** представляет собой конъюгат, полученный из SG32349, как описано, например, в публикации Dimasi, N., et al., Molecular Pharmaceutics, 2017, 14, 1501-1516 (DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00995), и имеет значение DAR ???

5

Влияние на объем опухоли показано на Фиг. 6, где:

Носитель	●
HerC239i- SG3249	◆
HerC239i- 10 ADC	▲

10

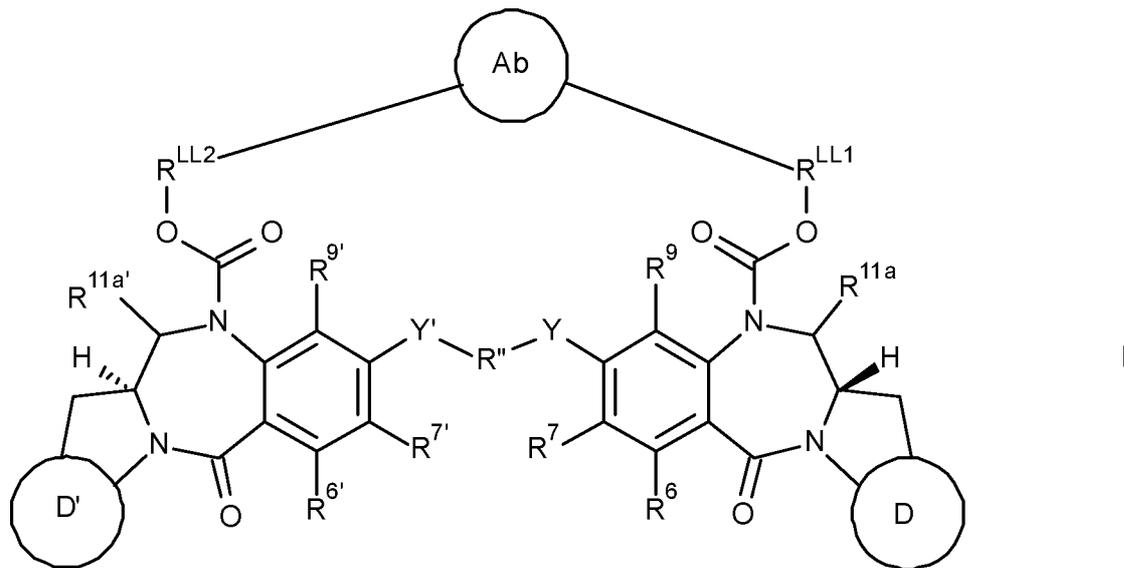
ADC HerC239i-**10** демонстрирует такую же активность, как ADC HerC239i-**SG3249**, несмотря на то, что содержит вдвое меньше димерных активных фрагментов PBD.

Все документы и другие ссылки, упомянутые выше, включены в данный документ посредством ссылки.

15

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

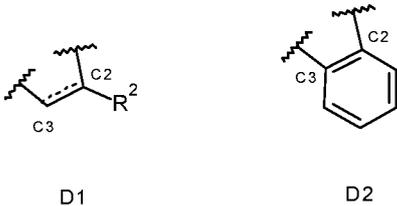
1. Конъюгат формулы I:



5 где

Ab представляет собой модифицированное антитело, содержащее по меньшей мере один свободный сайт конъюгации в каждой тяжелой цепи;

D означает группу D1 или D2:



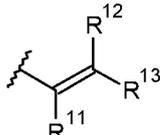
10 пунктирная линия означает необязательное наличие двойной связи между C2 и C3;

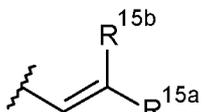
при наличии двойной связи между C2 и C3, R² выбран из группы, состоящей из:

(ia) C₅₋₁₀ арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, содержащей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир, C₁₋₇ алкил, C₃₋₇ гетероцикл и бис-окси-C₁₋₃ алкилен;

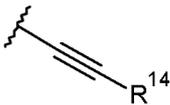
15 (ib) C₁₋₅ насыщенного алифатического алкила;

(ic) C₃₋₆ насыщенного циклоалкила;

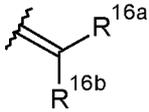
(id)  , где каждый из R¹¹, R¹² и R¹³ независимо выбран из H, C₁₋₃ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, C₂₋₃ алкинила и циклопропила, и общее количество атомов углерода в группе R² составляет не более 5;

20 (ie)  , где один из R^{15a} и R^{15b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила,

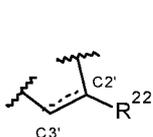
необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила метокси; пиридила; и тиофенила; и

(if)  , где R¹⁴ выбран из: C₁₋₃ насыщенного алкила; C₂₋₃ алкенила; C₂₋₃ алкинила; циклопропила; фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила;

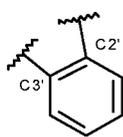
5 при наличии одинарной связи между C2 и C3

R² выбран из H, OH, F, diF и  , где R^{16a} и R^{16b} независимо выбраны из H, F, C₁₋₄ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, причем указанные алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из C₁₋₄ алкиламида и сложного C₁₋₄ алкилового эфира; или, если один из R^{16a} и R^{16b} представляет собой H, то другой выбран из нитрила и сложного C₁₋₄ алкилового эфира;

10 D' представляет собой группу D'1 или D'2:



D'1

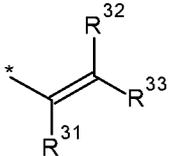


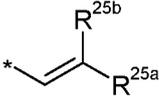
D'2

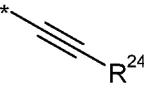
где пунктирная линия означает необязательное наличие двойной связи между C2' и C3';

при наличии двойной связи между C2' и C3', R²² выбран из группы, состоящей из:

- 15 (ia) C₅₋₁₀ арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, содержащей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир, C₁₋₇ алкил, C₃₋₇ гетероцикл и бис-окси-C₁₋₃ алкилен;
- (ib) C₁₋₅ насыщенного алифатического алкила;
- (ic) C₃₋₆ насыщенного циклоалкила;

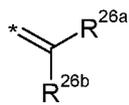
(iid)  , где каждый из R³¹, R³² и R³³ независимо выбран из H, C₁₋₃ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, C₂₋₃ алкинила и циклопропила, и общее количество атомов углерода в группе R²² составляет не более 5;

(iie)  , где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила метокси; пиридила; и тиофенила; и

(iif)  , где R²⁴ выбран из: C₁₋₃ насыщенного алкила; C₂₋₃ алкенила; C₂₋₃ алкинила; циклопропила; фенила, необязательно замещенного группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила;

25

при наличии одинарной связи между C2' и C3',



R²² выбран из H, OH, F, diF и $\begin{array}{c} \text{R}^{26a} \\ \diagdown \\ \text{C}^* \\ \diagup \\ \text{R}^{26b} \end{array}$, где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C₁₋₄ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, причем указанные алкильные и алкенильные группы необязательно замещены группой, выбранной из C₁₋₄ алкиламида и сложного C₁₋₄ алкилового эфира; или, если один из R^{26a} и R^{26b}

5 представляет собой H, то другой выбран из нитрила и сложного C₁₋₄ алкилового эфира;

R⁶ и R⁹ независимо выбраны из H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', нитро, Me₃Sn и галогена;

где R и R' независимо выбраны из необязательно замещенных C₁₋₁₂ алкильных, C₃₋₂₀ гетероциклических и C₅₋₂₀ арильных групп;

R⁷ выбран из H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', нитро, Me₃Sn и галогена;

10 R'' представляет собой C₃₋₁₂ алкиленовую группу, цепь которой может прерываться одним или более гетероатомами, например, O, S, NR^{N2} (где R^{N2} представляет собой H или C₁₋₄ алкил), и/или ароматические кольца, например, бензол или пиридин;

Y и Y' выбраны из O, S или NH;

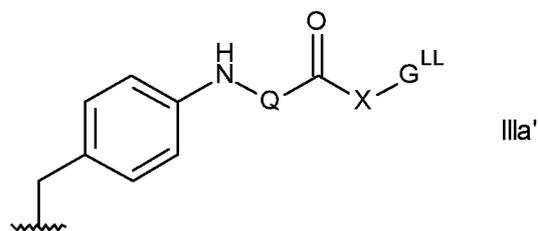
R^{11a} выбран из OH, OR^A, где R^A представляет собой C₁₋₄ алкил;

15 R^{6'}, R^{7'}, R^{9'} и R^{11a'} выбраны из таких же групп, как R⁶, R⁷, R⁹ и R^{11a}, соответственно;

и

R^{LL1} и R^{LL2} представляют собой линкеры, связанные с антителом в разных сайтах, которые независимо выбраны из:

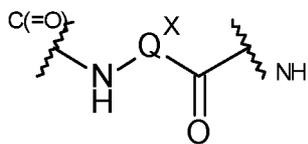
(iii):



20

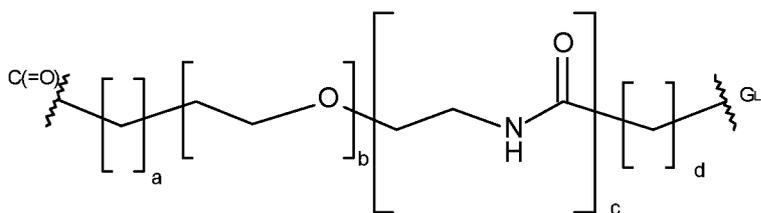
где

Q представляет собой:



, где Q^X является таким, что Q представляет собой аминокислотный остаток, дипептидный остаток или трипептидный остаток;

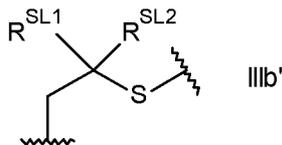
25 X представляет собой:



где a = 0 – 5, b = 0 – 16, c = 0 или 1, d = 0 – 5;

G^{LL} представляет собой линкер, связанный с антителом; и

(iiib):



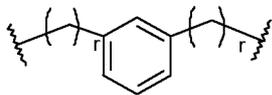
где R^{SL1} и R^{SL2} независимо выбраны из H и метила, или вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую или циклобутиленовую группу.

5

2. Конъюгат по п. 1, отличающийся тем, что Y и Y' оба представляют собой O.
3. Конъюгат по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что R'' представляет собой C₃₋₇ алкилен.

10

4. Конъюгат по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что R'' представляет собой группу формулы:



где g равен 1 или 2.

15

5. Конъюгат по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что R⁹ представляет собой H.
6. Конъюгат по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что R⁶ представляет собой H.
7. Конъюгат по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что R⁷ выбран из H, OH и -OR.

20

8. Конъюгат по п. 7, отличающийся тем, что R⁷ представляет собой C₁₋₄ алкокси-группу.
9. Конъюгат по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что D представляет собой D1, существует двойная связь между C2 и C3, и R² представляет собой C₅₋₇ арильную группу.

25

10. Конъюгат по п. 9, отличающийся тем, что R² представляет собой фенил.
11. Конъюгат по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что D представляет собой D1, существует двойная связь между C2 и C3, и R² представляет собой C₈₋₁₀ арильную группу.

30

12. Конъюгат по любому из пп. 9-11, отличающийся тем, что R² имеет от одной до трех групп заместителей.

13. Конъюгат по любому из пп. 9-12, отличающийся тем, что заместители выбраны из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-оксиметилена, метилпиперазина, морфолина и метилтиофенила.

35

14. Конъюгат по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что D представляет собой D1, существует

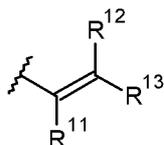
двойная связь между C2 и C3, и R² представляет собой C₁₋₅ насыщенную алифатическую алкильную группу.

15. Конъюгат по п. 14, отличающийся тем, что R² представляет собой метил, этил или пропил.

5 16. Конъюгат по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что существует двойная связь между C2 и C3, и R² представляет собой C₃₋₆ насыщенную циклоалкильную группу.

17. Конъюгат по п. 16, отличающийся тем, что R² представляет собой циклопропил.

10 18. Конъюгат по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что D представляет собой D1, существует двойная связь между C2 и C3, и R² представляет собой группу формулы:



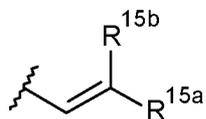
15 19. Конъюгат по п. 18, отличающийся тем, что общее количество атомов углерода в группе R² составляет не более 4.

20. Конъюгат по п. 19, отличающийся тем, что общее количество атомов углерода в группе R² составляет не более 3.

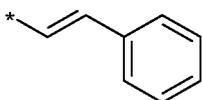
20 21. Конъюгат по любому из пп. 18-20, отличающийся тем, что один из R¹¹, R¹² и R¹³ представляет собой H, а другие две группы выбраны из H, C₁₋₃ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, C₂₋₃ алкинила и циклопропила.

25 22. Конъюгат по любому из пп. 18-20, отличающийся тем, что два из R¹¹, R¹² и R¹³ представляют собой H, а другая группа выбрана из H, C₁₋₃ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, C₂₋₃ алкинила и циклопропила.

23. Конъюгат по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что D представляет собой D1, существует двойная связь между C2 и C3, и R² представляет собой группу формулы:

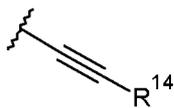


30 24. Конъюгат по п. 23, отличающийся тем, что R² представляет собой группу:



25. Конъюгат по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что D представляет собой D1, существует

двойная связь между C2 и C3, и R² представляет собой группу формулы:



26. Конъюгат по п. 25, отличающийся тем, что R¹⁴ выбран из H, метила, этила, этенила и этинила.

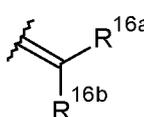
5

27. Конъюгат по п. 26, отличающийся тем, что R¹⁴ выбран из H и метила.

28. Конъюгат по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что D представляет собой D1, существует одинарная связь между C2 и C3, и R² представляет собой H.

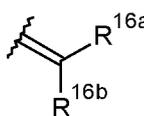
10

29. Конъюгат по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что D представляет собой D1, существует

одинарная связь между C2 и C3, R² представляет собой , и R^{16a} и R^{16b} оба представляют собой H.

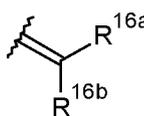
15

30. Конъюгат по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что D представляет собой D1, существует

одинарная связь между C2 и C3, R² представляет собой , и R^{16a} и R^{16b} оба представляют собой метил.

31. Конъюгат по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что D представляет собой D1, существует

20

одинарная связь между C2 и C3, R² представляет собой , один из R^{16a} и R^{16b} представляет собой H, а другой выбран из C₁₋₄ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, и указанные алкильные и алкенильные группы являются необязательно замещенными.

25

32. Конъюгат по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что D' представляет собой D'1, существует двойная связь между C2' и C3', и R²² представляет собой C₅₋₇ арильную группу.

33. Конъюгат по п. 32, отличающийся тем, что R²² представляет собой фенил.

30

34. Конъюгат по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что D' представляет собой D'1, существует двойная связь между C2' и C3', и R²² представляет собой C₈₋₁₀ арильную группу.

35. Конъюгат по любому из пп. 32-34, отличающийся тем, что R²² имеет от одной до трех групп заместителей.

36. Конъюгат по любому из пп. 32-35, отличающийся тем, что заместители выбраны из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-оксиметилена, метилпиперазина, морфолина и метилтиофенила.

5 37. Конъюгат по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что D' представляет собой $D'1$, существует двойная связь между $C2'$ и $C3'$, и R^{22} представляет собой C_{1-5} насыщенную алифатическую алкильную группу.

38. Конъюгат по п. 37, отличающийся тем, что R^{22} представляет собой метил, этил или пропил.

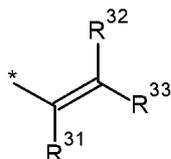
10

39. Конъюгат по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что D' представляет собой $D'1$, существует двойная связь между $C2'$ и $C3'$, и R^{22} представляет собой C_{3-6} насыщенную циклоалкильную группу.

40. Конъюгат по п. 39, отличающийся тем, что R^{22} представляет собой циклопропил.

15

41. Конъюгат по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что D' представляет собой $D'1$, существует двойная связь между $C2'$ и $C3'$, и R^{22} представляет собой группу формулы:



20 42. Конъюгат по п. 41, отличающийся тем, что общее количество атомов углерода в группе R^{22} составляет не более 4.

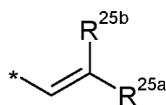
43. Конъюгат по п. 42, отличающийся тем, что общее количество атомов углерода в группе R^{22} составляет не более 3.

25

44. Конъюгат по любому из пп. 41-43, отличающийся тем, что один из R^{31} , R^{32} и R^{33} представляет собой H, а другие две группы выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

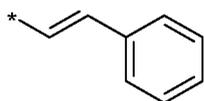
30 45. Конъюгат по любому из пп. 41-43, отличающийся тем, что два из R^{31} , R^{32} и R^{33} представляют собой H, а другая группа выбрана из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

46. Конъюгат по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что D' представляет собой $D'1$, существует двойная связь между $C2'$ и $C3'$, и R^{22} представляет собой группу формулы:



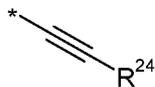
35

47. Конъюгат по п. 46, отличающийся тем, что R^{22} представляет собой группу:



48. Конъюгат по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что D' представляет собой D'1, существует двойная связь между C2' и C3', и R²² представляет собой группу формулы:

5



49. Конъюгат по п. 48, отличающийся тем, что R²⁴ выбран из H, метила, этила, этенила и этинила.

50. Конъюгат по п. 49, отличающийся тем, что R²⁴ выбран из H и метила.

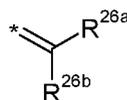
10

51. Конъюгат по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что D' представляет собой D'1, существует одинарная связь между C2' и C3', и R²² представляет собой H.

52. Конъюгат по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что D' представляет собой D'1, существует

15

одинарная связь между C2' и C3', R²² представляет собой H.

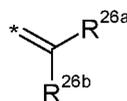


, и R^{26a} и R^{26b} оба представляют собой

53. Конъюгат по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что D' представляет собой D'1, существует

20

одинарная связь между C2' и C3', R²² представляет собой метил.

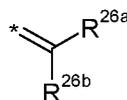


, и R^{26a} и R^{26b} оба представляют собой

54. Конъюгат по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что D' представляет собой D'1, существует

25

одинарная связь между C2' и C3', R²² представляет собой H, а другой выбран из C₁₋₄ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, и указанные алкильные и алкенильные группы являются необязательно замещенными.



, один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, а другой выбран из C₁₋₄ насыщенного алкила, C₂₋₃ алкенила, и указанные алкильные и алкенильные группы являются необязательно замещенными.

55. Соединение по любому из пп. 1-54, отличающееся тем, что R^{11a} представляет собой OH.

30

56. Соединение по любому из пп. 1-54, отличающееся тем, что R^{11a} представляет собой OR^A, где R^A представляет собой C₁₋₄ алкил.

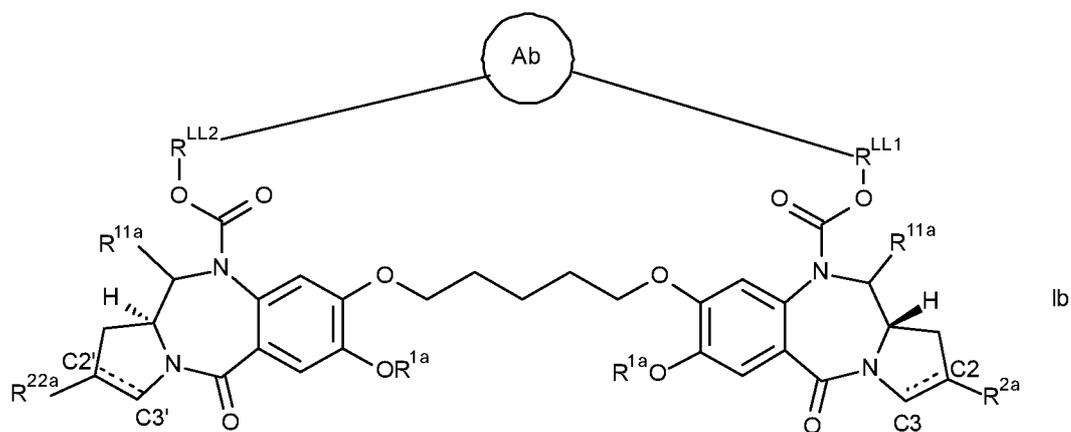
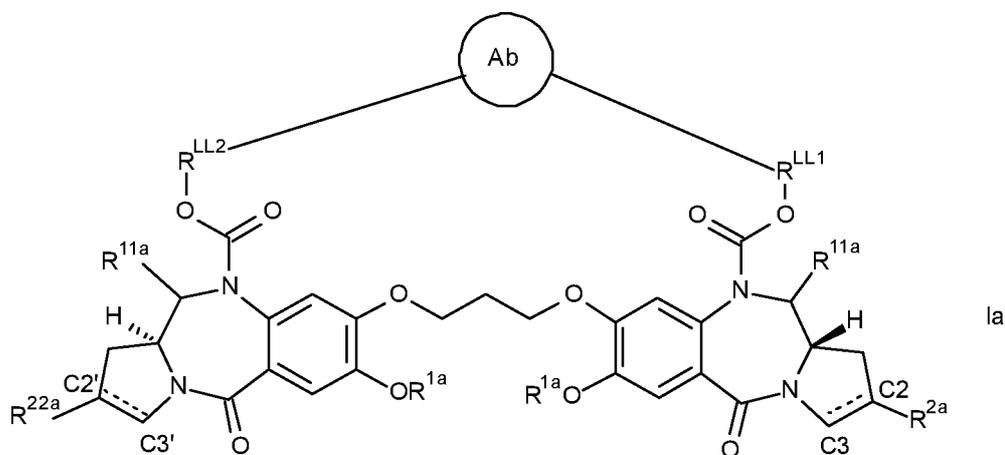
57. Соединение по п. 56, отличающееся тем, что R^A представляет собой метил.

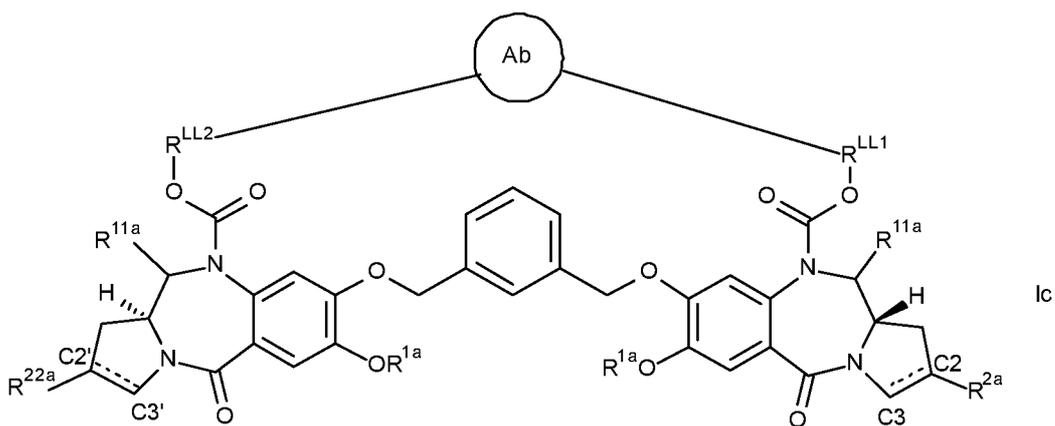
58. Конъюгат по любому из пп. 1-57, отличающийся тем, что $R^{6'}$ выбран из тех же групп, что и R^6 , $R^{7'}$ выбран из тех же групп, что и R^7 , $R^{9'}$ выбран из тех же групп, что и R^9 , $R^{11a'}$ выбран из тех же групп, что и R^{11a} , и Y' выбран из тех же групп, что и Y .

5 59. Конъюгат по п. 58, отличающийся тем, что $R^{6'}$ представляет собой ту же группу, что и R^6 , $R^{7'}$ представляет собой ту же группу, что и R^7 , $R^{9'}$ представляет собой ту же группу, что и R^9 , $R^{11a'}$ представляет собой ту же группу, что и R^{11a} , и Y' представляет собой ту же группу, что и Y .

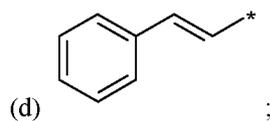
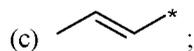
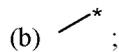
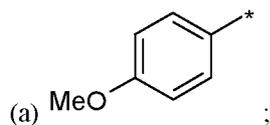
10 60. Конъюгат по любому из пп. 1-59, отличающийся тем, что R^{22} представляет собой ту же группу, что и R^2 .

61. Конъюгат по п. 1, имеющий формулу Ia-1, Ia-2 или Ia-3:

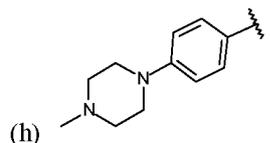
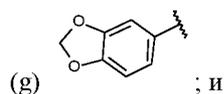
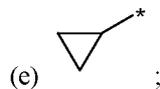




где R^{2a} и R^{22a} являются одинаковыми и выбраны из:



5



10 R^{1a} выбран из метила и бензила;

R^{LL1}, R^{LL2} и R^{11a} являются такими, как определено в п. 1.

62. Конъюгат по любому из пп. 1-61, отличающийся тем, что R^{LL1} имеет формулу IIIa', и Q^x представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp.

15

63. Конъюгат по любому из пп. 1-61, отличающийся тем, что R^{LL1} имеет формулу IIIa', и Q^x представляет собой дипептидный остаток, выбранный из:



20

CO-Val-Cit-NH,
 CO-Phe-Cit-NH,
 CO-Leu-Cit-NH,
 CO-Ile-Cit-NH,
 CO-Phe-Arg-NH и
 CO-Trp-Cit-NH.

5

64. Конъюгат по п. 63, отличающийся тем, что Q^x выбран из CO-Phe-Lys-NH, CO-Val-Cit-NH и CO-Val-Ala-NH.

10

65. Конъюгат по любому из пп. 1-61, отличающийся тем, что R^{LL1} имеет формулу IIIa', и Q^x представляет собой трипептидный остаток.

15 66. Конъюгат по любому из пп. 1-65, отличающийся тем, что R^{LL1} имеет формулу IIIa', и a равен от 0 до 3.

67. Конъюгат по п. 66, отличающийся тем, что a равен 0.

20 68. Конъюгат по любому из пп. 1-67, отличающийся тем, что R^{LL1} имеет формулу IIIa', и b равен от 0 до 12.

69. Конъюгат по п. 68, отличающийся тем, что b равен от 0 до 8.

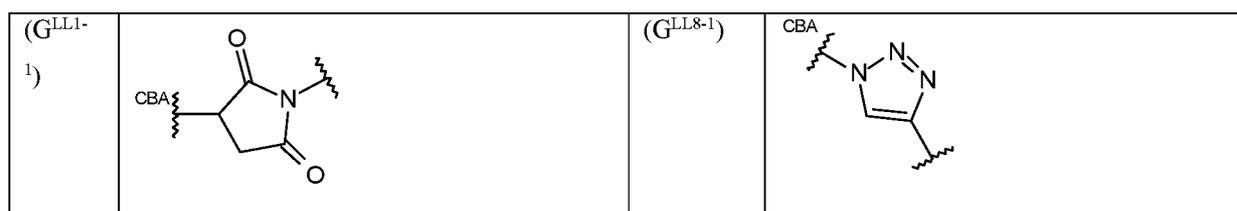
25 70. Конъюгат по любому из пп. 1-69, отличающийся тем, что R^{LL1} имеет формулу IIIa', и d равен от 0 до 3.

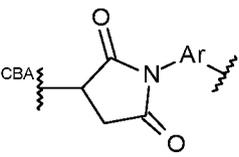
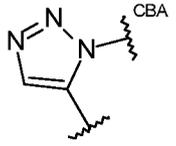
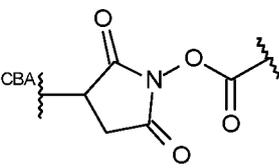
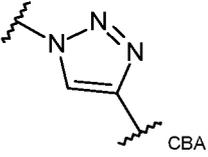
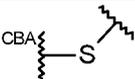
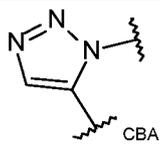
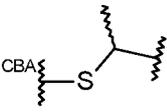
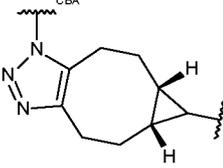
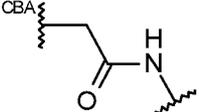
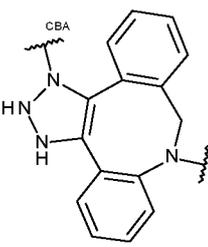
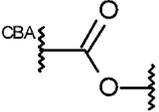
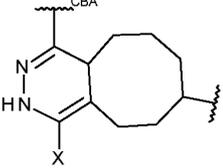
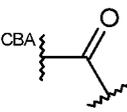
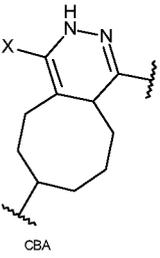
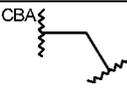
71. Конъюгат по п. 70, отличающийся тем, что d равен 2.

30 72. Конъюгат по любому из пп. 1-68, отличающийся тем, что R^{LL1} имеет формулу IIIa', и a равен 0, c равен 1, и d равен 2, и b равен от 0 до 8.

73. Конъюгат по п. 72, отличающийся тем, что b равен 0, 4 или 8.

35 74. Конъюгат по любому из пп. 1-73, отличающийся тем, что R^{LL1} имеет формулу IIIa', и G^{LL} выбран из:



(G ^{LL1-} 2)		(G ^{LL8-2})	
(G ^{LL2})		(G ^{LL9-1})	
(G ^{LL3-} 1)		(G ^{LL9-2})	
(G ^{LL3-} 2)		G ^{L10}	
(G ^{LL-4})		G ^{L11}	
(G ^{LL5})		G ^{L12}	
(G ^{LL6})		G ^{L13}	
(G ^{LL7})			

где Ar представляет собой C₅₋₆ ариленовую группу, например, фенилен, и X представляет собой C¹⁻⁴ алкил.

75. Конъюгат по п. 74, отличающийся тем, что Ar представляет собой фениленовую группу.

5 76. Конъюгат по п. 74 или п. 75, отличающийся тем, что G^{LL} выбран из G^{LL1-1} и G^{LL1-2}.

77. Конъюгат по п. 76, отличающийся тем, что G^{LL} представляет собой G^{LL-1} .
78. Конъюгат по любому из пп. 1-61, отличающийся тем, что R^{LL1} имеет формулу IIIb, и R^{SL1} и R^{SL2} оба представляют собой H.
- 5
79. Конъюгат по любому из пп. 1-61, отличающийся тем, что R^{LL1} имеет формулу IIIb, R^{SL1} представляет собой H, и R^{SL2} представляет собой метил.
80. Конъюгат по любому из пп. 1-61, отличающийся тем, что R^{LL1} имеет формулу IIIb, и R^{SL1} и R^{SL2} оба представляют собой метил.
- 10
81. Конъюгат по любому из пп. 1-61, отличающийся тем, что R^{LL1} имеет формулу IIIb, и R^{SL1} и R^{SL2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу.
82. Конъюгат по любому из пп. 1-61, отличающийся тем, что R^{LL1} имеет формулу IIIb, и R^{SL1} и R^{SL2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.
- 15
83. Конъюгат по любому из пп. 1-61, отличающийся тем, что R^{LL2} имеет формулу IIIa', и Q^x представляет собой аминокислотный остаток, выбранный из Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg и Trp.
- 20
84. Конъюгат по любому из пп. 1-82, отличающийся тем, что R^{LL2} имеет формулу IIIa', и Q^x представляет собой дипептидный остаток, выбранный из:
- CO-Phe-Lys-NH,
CO-Val-Ala-NH,
CO-Val-Lys-NH,
CO-Ala-Lys-NH,
CO-Val-Cit-NH,
CO-Phe-Cit-NH,
CO-Leu-Cit-NH,
CO-Ile-Cit-NH,
CO-Phe-Arg-NH и
CO-Trp-Cit-NH.
- 25
85. Конъюгат по п. 84, отличающийся тем, что Q^x выбран из CO-Phe-Lys-NH, CO-Val-Cit-NH и CO-Val-Ala-NH.
- 35
86. Конъюгат по любому из пп. 1-82, отличающийся тем, что R^{LL2} имеет формулу IIIa', и Q^x представляет собой трипептидный остаток.
87. Конъюгат по любому из пп. 1-86, отличающийся тем, что R^{LL2} имеет формулу IIIa', и a равен от 0 до 3.
- 40

88. Конъюгат по п. 87, отличающийся тем, что a равен 0.

89. Конъюгат по любому из пп. 1-88, отличающийся тем, что R^{LL2} имеет формулу IIIa', и b равен от 0 до 12.

5

90. Конъюгат по п. 89, отличающийся тем, что b равен от 0 до 8.

91. Конъюгат по любому из пп. 1-90, отличающийся тем, что R^{LL2} имеет формулу IIIa', и d равен от 0 до 3.

10

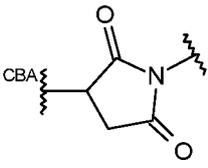
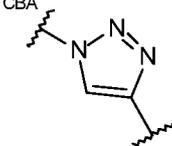
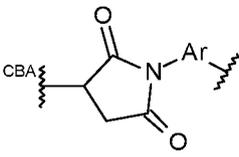
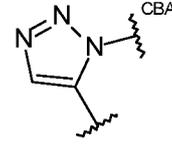
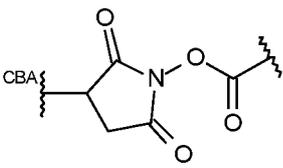
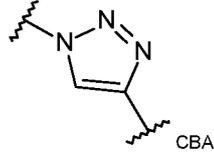
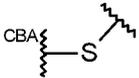
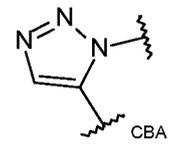
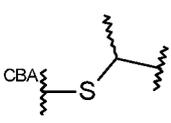
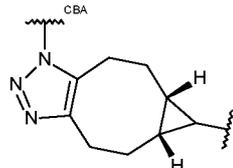
92. Конъюгат по п. 91, отличающийся тем, что d равен 2.

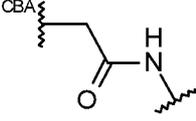
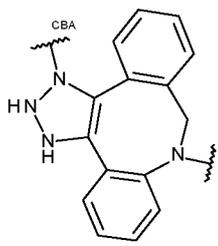
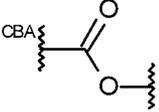
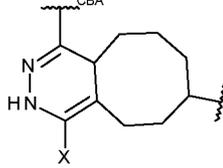
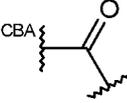
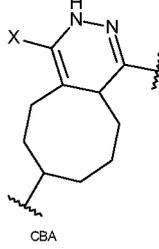
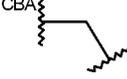
93. Конъюгат по любому из пп. 1-86, отличающийся тем, что R^{LL2} имеет формулу IIIa', и a равен 0, c равен 1, и d равен 2, и b равен от 0 до 8.

15

94. Конъюгат по п. 93, отличающийся тем, что b равен 0, 4 или 8.

95. Конъюгат по любому из пп. 1-94, отличающийся тем, что R^{LL2} имеет формулу IIIa', и G^{LL} выбран из:

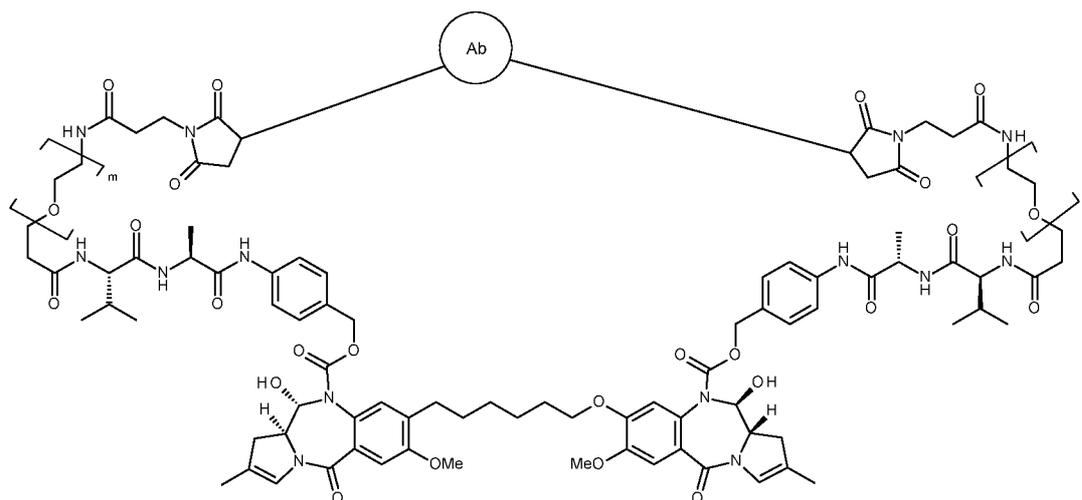
(G^{LL1-1})		(G^{LL8-1})	
(G^{LL1-2})		(G^{LL8-2})	
(G^{LL2})		(G^{LL9-1})	
(G^{LL3-1})		(G^{LL9-2})	
(G^{LL3-2})		G^{L10}	

(G ^{LL-4})		G ^{L11}	
(G ^{LL5})		G ^{L12}	
(G ^{LL6})		G ^{L13}	
(G ^{LL7})			

где Ag представляет собой C₅₋₆ ариленовую группу, например, фенилен, и X представляет собой C¹⁻⁴ алкил.

96. Конъюгат по п. 95, отличающийся тем, что Ag представляет собой фениленовую группу.
- 5 97. Конъюгат по п. 95 или п. 96, отличающийся тем, что G^{LL} выбран из G^{LL1-1} и G^{LL1-2}.
98. Конъюгат по п. 98, отличающийся тем, что G^{LL} представляет собой G^{LL-1}.
99. Конъюгат по любому из пп. 1-82, отличающийся тем, что R^{LL2} имеет формулу IIIб, и R^{SL1} и R^{SL2} оба представляют собой H.
- 10 100. Конъюгат по любому из пп. 1-82, отличающийся тем, что R^{LL2} имеет формулу IIIб, R^{SL1} представляет собой H, и R^{SL2} представляет собой метил.
- 15 101. Конъюгат по любому из пп. 1-82, отличающийся тем, что R^{LL2} имеет формулу IIIб, и R^{SL1} и R^{SL2} оба представляют собой метил.
102. Конъюгат по любому из пп. 1-82, отличающийся тем, что R^{LL2} имеет формулу IIIб, и R^{SL1} и R^{SL2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу.
- 20 103. Конъюгат по любому из пп. 1-82, отличающийся тем, что R^{LL2} имеет формулу IIIб, и R^{SL1} и R^{SL2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.

104. Конъюгат по п. 1 формулы Id:



где m представляет собой целое число от 2 до 8.

5 105. Конъюгат по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что модифицированное антитело, содержащее по меньшей мере один свободный сайт конъюгации в каждой тяжелой цепи, представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

10 106. Конъюгат по п. 105, отличающийся тем, что модифицированное антитело, содержащее по меньшей мере один свободный сайт конъюгации в каждой тяжелой цепи, представляет собой антитело человека.

15 107. Конъюгат по п. 105, отличающийся тем, что модифицированное антитело, содержащее по меньшей мере один свободный сайт конъюгации в каждой тяжелой цепи, представляет собой гуманизированное антитело.

108. Конъюгат по любому из пп. 105-107, отличающийся тем, что природные межцепочечные цистеиновые остатки заменены на аминокислотные остатки, не содержащие тиольных групп.

20 109. Конъюгат по п. 108, содержащий по меньшей мере одну дополнительную замену в каждой тяжелой цепи аминокислотного остатка, содержащую реакционноспособную группу, пригодную для конъюгации с линкером.

110. Конъюгат по п. 109, отличающийся тем, что дополнительно замещенная аминокислота представляет собой цистеин или неприродную аминокислоту.

25 111. Конъюгат по п. 108 или 109, отличающийся тем, что замещенное положение выбрано из положений, перечисленных ниже:

Антитело	Изотип	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Положение (по	239	Ser	Ser	Ser	Ser

Кабату, ЕС) и соответствующая аминокислота	282	Val	Val	Val	Val
	289	Thr	Thr	Thr	Thr
	297	Asn	Asn	Asn	Asn
	312	Asp	Asp	Asp	Asp
	324	Ser	Ser	Ser	Ser
	330	Ala	Ala	Ala	Ser
	335	Thr	Thr	Thr	Thr
	337	Ser	Ser	Ser	Ser
	339	Ala	Thr	Thr	Ala
	356	Glu	Glu	Glu	Glu
	359	Thr	Thr	Thr	Thr
	361	Asn	Asn	Asn	Asn
	383	Ser	Ser	Ser	Ser
	384	Asn	Asn	Ser	Asn
	398	Leu	Leu	Leu	Leu
	400	Ser	Ser	Ser	Ser
	422	Val	Val	Ile	Val
440	Ser	Ser	Ser	Ser	
442	Ser	Ser	Ser	Ser	
SEQ ID NO:		1	2	3	4

112. Конъюгат по любому из пп. 1-111 для применения в терапии.

5 113. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп. 1-111, фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

114. Конъюгат по любому из пп. 1-111 или фармацевтическая композиция по п. 113 для применения при лечении пролиферативного заболевания у субъекта.

10 115. Конъюгат для применения по п. 114, отличающийся тем, что заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак.

15 116. Применение конъюгата по любому из пп. 1-111 или фармацевтической композиции по п. 113 в способе медицинского лечения.

117. Способ медицинского лечения, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п. 113.

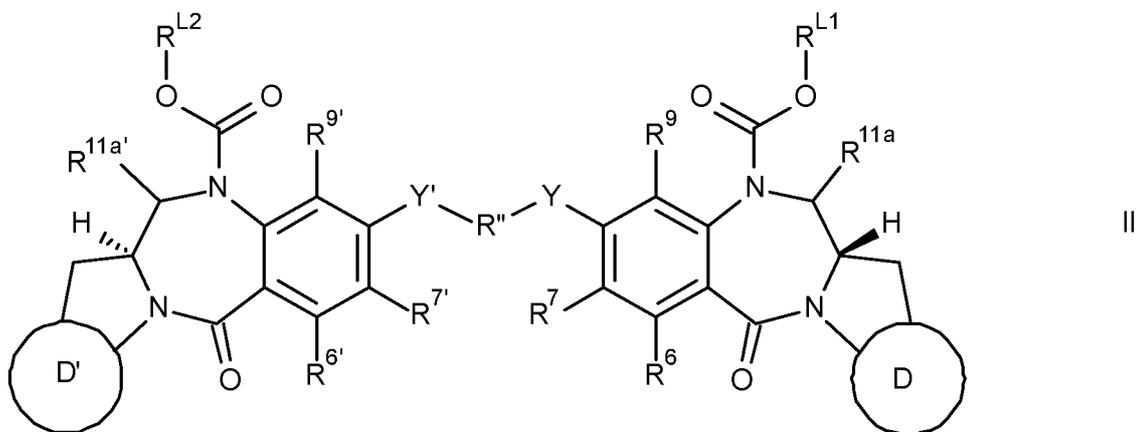
20 118. Способ по п. 117, отличающийся тем, что способ медицинского лечения предназначен для лечения рака.

119. Способ по п. 118, отличающийся тем, что в комбинации с указанным конъюгатом пациенту вводят химиотерапевтический агент.

120. Применение конъюгата по любому из пп. 1-111 в способе производства лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания.

121. Способ лечения млекопитающего, страдающего от пролиферативного заболевания, включающий введение эффективного количества конъюгата по любому из пп. 1-111 или фармацевтической композиции по п. 113.

122. Соединение формулы II:

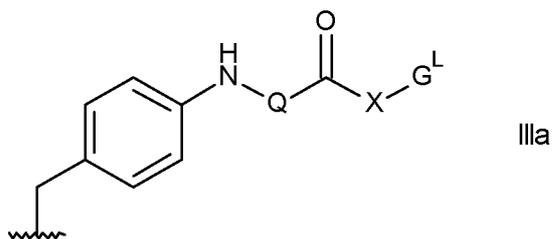


и его соли и сольваты,

15 где D, R², R⁶, R⁷, R⁹, R^{11a}, Y, R'', Y', D', R⁶', R⁷', R⁹', R^{11a}' и R¹² (включая наличие или отсутствие двойных связей между C2 и C3 и между C2' и C3', соответственно) являются такими, как определено в любом из пп. 1-61;

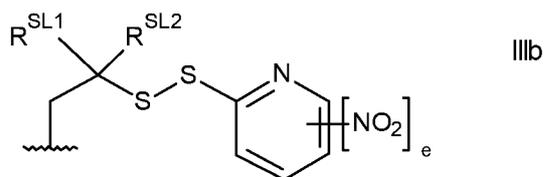
R^{L1} и R^{L2} представляют собой линкеры для связывания с клеточносвязывающим агентом, которые независимо выбраны из:

(iii a):



20 где Q и X являются такими, как определено в любом из пп. 1, 62-73 и 83-94, и G^L представляет собой линкер для связывания с антителом; и

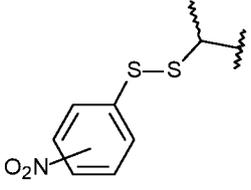
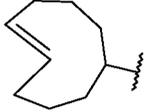
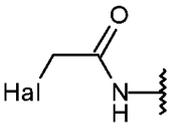
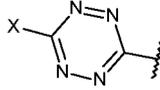
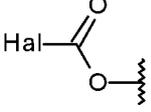
(iii b):



где R^{SL1} и R^{SL2} являются такими, как определено в любом из пп. 1, 78-82 и 99-103;
и e равен 0 или 1.

5 123. Соединение по п. 122, отличающееся тем, что R^{L1} имеет формулу IIIa, и G^L выбран из:

(G^{L1-1})		(G^{L6})	
(G^{L1-2})		(G^{L7})	
(G^{L2})		(G^{L8})	
(G^{L3-1})		(G^{L9})	
(G^{L3-2})		(G^{L10})	
(G^{L3-3})		(G^{L11})	

(G ^{L3-} 4)	 <p>где группа NO₂ является необязательной</p>	(G ^{L12})	
(G ^{L4})	 <p>где Hal = I, Br, Cl</p>	(G ^{L13})	
(G ^{L5})			

где Ag представляет собой C₅₋₆ ариленовую группу, например, фенилен, и X представляет собой C¹⁻⁴ алкил.

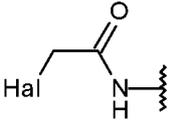
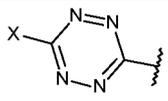
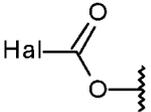
124. Соединение по п. 123, отличающееся тем, что Ag представляет собой фениленовую группу.
- 5 125. Соединение по п. 123 или п. 124, отличающееся тем, что G^L выбран из G^{L1-1} и G^{L1-2}.
126. Соединение по п. 125, отличающееся тем, что G^L представляет собой G^{L1-1}.
127. Соединение по п. 122, отличающееся тем, что R^{L1} имеет формулу IIIб, и R^{SL1} и R^{SL2} оба представляют собой H.
- 10 128. Соединение по п. 122, отличающееся тем, что R^{L1} имеет формулу IIIб, R^{SL1} представляет собой H, и R^{SL2} представляет собой метил.
- 15 129. Соединение по п. 122, отличающееся тем, что R^{L1} имеет формулу IIIб, и R^{SL1} и R^{SL2} оба представляют собой метил.
130. Соединение по п. 122, отличающееся тем, что R^{L1} имеет формулу IIIб, и R^{SL1} и R^{SL2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу.
- 20 131. Соединение по п. 122, отличающееся тем, что R^{L1} имеет формулу IIIб, и R^{SL1} и R^{SL2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.
132. Соединение по любому из пп. 122 и 127-131, отличающееся тем, что R^{L1} имеет формулу IIIб, и e равен 0.
- 25 133. Соединение по любому из пп. 122 и 127-131, отличающееся тем, что R^{L1} имеет формулу IIIб, и e равен 1.

134. Соединение по п. 133, отличающееся тем, что нитро-группа находится в пара-положении.

135. Соединение по любому из пп. 122-134, отличающийся тем, что R^{L2} имеет формулу IIIa, и G^L выбран из:

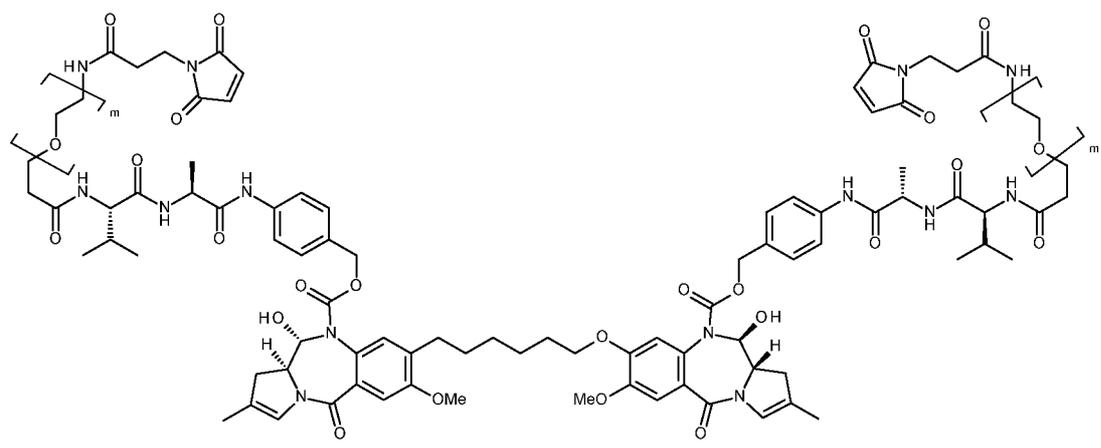
5

(G ^{L1-} 1)		(G ^{L6})	
(G ^{L1-} 2)		(G ^{L7})	
(G ^{L2})		(G ^{L8})	
(G ^{L3-} 1)		(G ^{L9})	
(G ^{L3-} 2)		(G ^{L10})	
(G ^{L3-} 3)		(G ^{L11})	
(G ^{L3-} 4)		(G ^{L12})	

	где группа NO ₂ является необязательной		
(G ^{L4})	 <p>где Hal = I, Br, Cl</p>	(G ^{L13})	
(G ^{L5})			

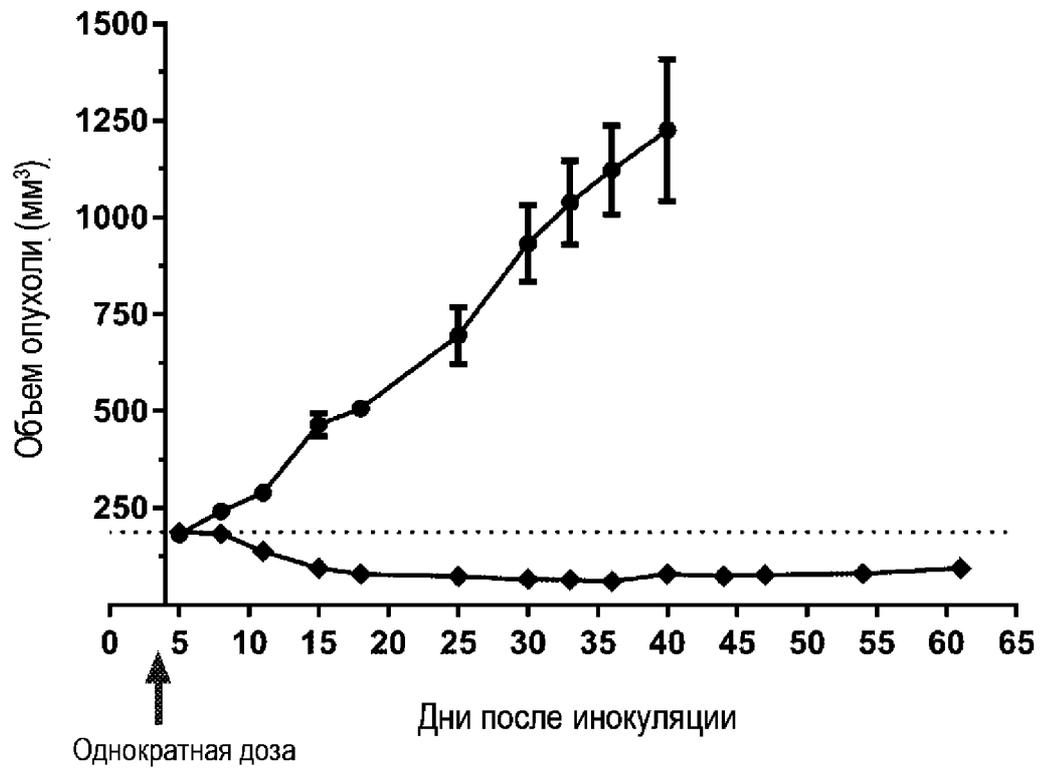
где Ag представляет собой C₅₋₆ ариленовую группу, например, фенилен, и X представляет собой C^{L4} алкил.

136. Соединение по п. 135, отличающееся тем, что Ag представляет собой фениленовую группу.
- 5 137. Соединение по п. 135 или п. 136, отличающееся тем, что G^L выбран из G^{L1-1} и G^{L1-2}.
138. Соединение по п. 137, отличающееся тем, что G^L представляет собой G^{L1-1}.
139. Соединение по любому из пп. 122-134, отличающееся тем, что R^{L1} имеет формулу IIIb, и R^{SL1} и R^{SL2} оба представляют собой H.
- 10 140. Соединение по любому из пп. 122-134, отличающееся тем, что R^{L1} имеет формулу IIIb, R^{SL1} представляет собой H, и R^{SL2} представляет собой метил.
- 15 141. Соединение по любому из пп. 122-134, отличающееся тем, что R^{L1} имеет формулу IIIb, и R^{SL1} и R^{SL2} оба представляют собой метил.
142. Соединение по любому из пп. 122-134, отличающееся тем, что R^{L1} имеет формулу IIIb, и R^{SL1} и R^{SL2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклопропиленовую группу.
- 20 143. Соединение по любому из пп. 122-134, отличающееся тем, что R^{L1} имеет формулу IIIb, и R^{SL1} и R^{SL2} вместе с атомом углерода, с которым они связаны, образуют циклобутиленовую группу.
144. Соединение по любому из пп. 122-134 и 139-143, отличающееся тем, что R^{L1} имеет формулу IIIb, и e равен 0.
- 25 145. Соединение по любому из пп. 122 и 139-143, отличающееся тем, что R^{L1} имеет формулу IIIb, и e равен 1.
- 30 146. Соединение по п. 145, отличающееся тем, что нитро-группа находится в пара-положении.
147. Соединение по п. 122, отличающееся тем, что указанное соединение имеет формулу Id:

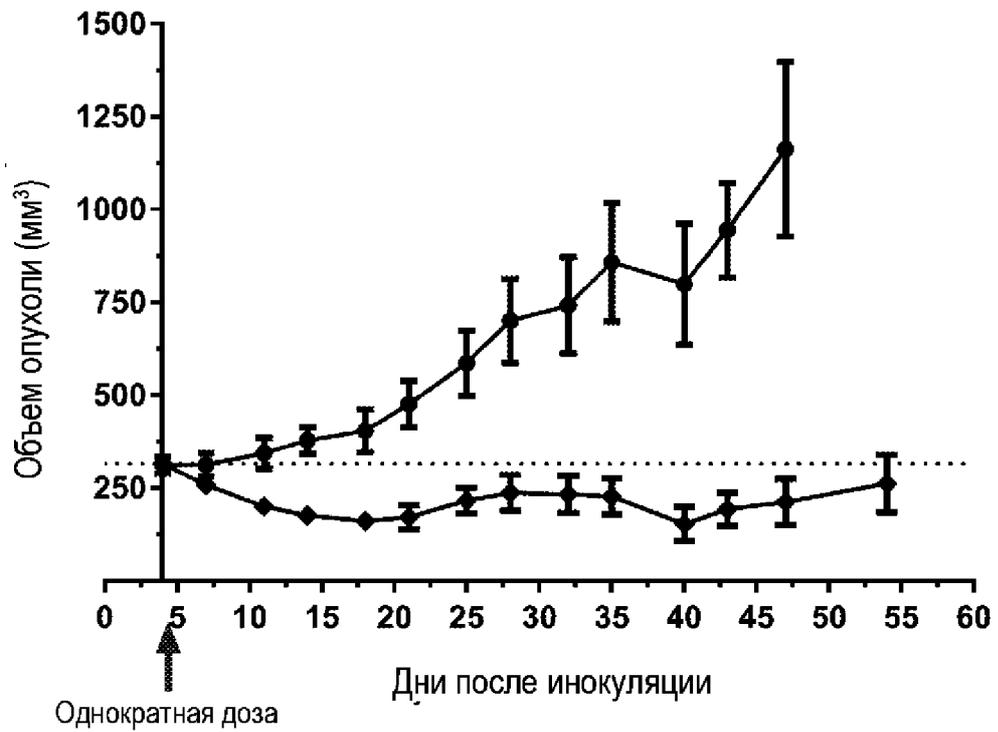


где m представляет собой целое число от 2 до 8.

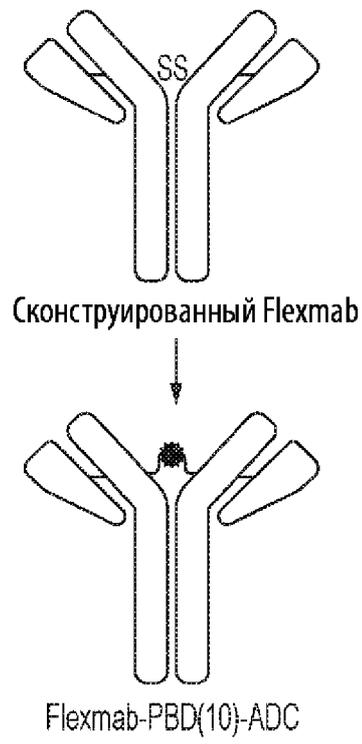
5



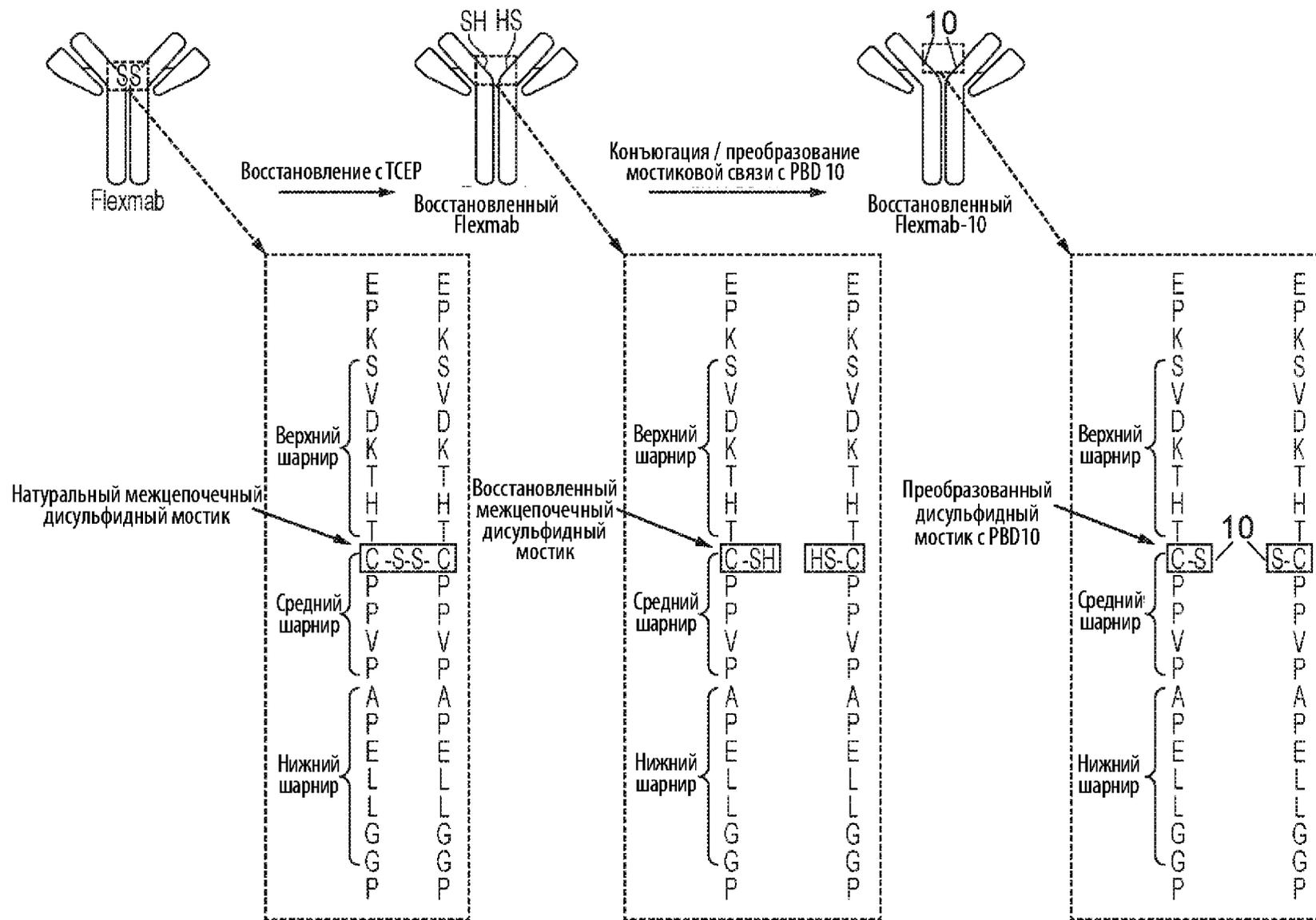
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

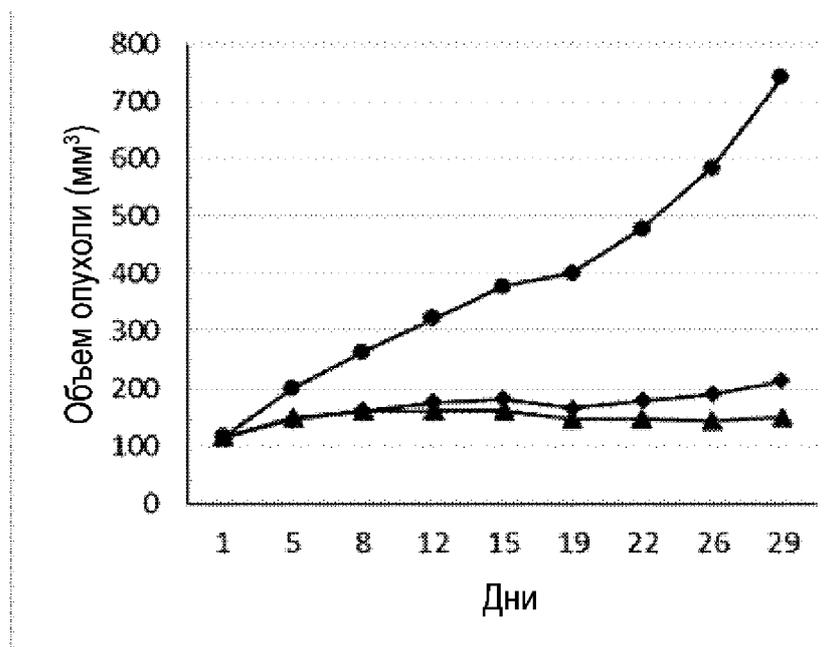
Герцептин-Flexmab: легкая цепь

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIY
 SASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF
 GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFQPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
 WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEV

Герцептин-Flexmab: тяжелая цепь

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW
 VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC
 SRWGGDGFYAMDYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPQAPSSKSTSGGT
 AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPSVDKTHHTCPPVPAPPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
 EALHNHYTQKSLSLSPGK

Фиг. 5



Фиг. 6