



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.26

(21) Номер заявки
201900561

(22) Дата подачи заявки
2018.05.09

(51) Int. Cl. *A61P 25/00* (2006.01)
A61K 31/566 (2006.01)
A61K 31/724 (2006.01)
C07J 41/00 (2006.01)
C07J 71/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОНЬЮГАТЫ ЦИКЛОДЕКСТРИН-БЕЛОК-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

(31) 62/508,315

(32) 2017.05.18

(33) US

(43) 2020.06.02

(86) PCT/US2018/031839

(87) WO 2018/213077 2018.11.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Хан Эми, Олсон Вильям (US)

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

(56) WO-A1-2012145632
WO-A2-2009001364
WO-A2-2004022099

ROMERO-HERNÁNDEZ LAURA L ET AL.: "Diosgenin-based thio(seleno)ureas and triazolyl glycoconjugates as hybrid drugs. Antioxidant and antiproliferative profile", EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, EDITIONS SCIENTIFIQUE ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 99, 14 May 2015 (2015-05-14), pages 67-81, XP029222662, ISSN: 0223-5234, DOI: 10.1016/J.EJMECH.2015.05.018, figure 1 * scheme 2 *

SULONG XIAO ET AL.: "Synthesis and biological evaluation of novel pentacyclic triterpene [alpha]-cyclodextrin conjugates as HCV entry inhibitors", EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 124, 1 November 2016 (2016-11-01), pages 1-9, XP055490888, FR, ISSN: 0223-5234, DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.08.020 * schemes 1, 2 * figure 1

TIAN ZHENYU ET AL.: "Inhibition of influenza virus infection by multivalent pentacyclic triterpene-functionalized per-O-methylated cyclodextrin conjugates", EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, EDITIONS SCIENTIFIQUE ELSEVIER, PARIS, FR, vol. 134, 2 April 2017 (2017-04-02), pages 133-139, XP029995979, ISSN: 0223-5234, DOI: 10.1016/J.EJMECH.2017.03.087 * schemes 1, 2 * abstract

JASBIR SINGH ET AL.: "Polymer Drug Conjugates: Recent Advancements in Various Diseases", CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, vol. 22, no. 19, 10 May 2016 (2016-05-10), pages 2821-2843, XP055490895, NL, ISSN: 1381-6128, DOI: 10.2174/1381612822666160217125515, figures 1, 25

CHRISTOPHER D. HEIN ET AL.: "The Synthesis of a Multiblock Osteotropic Polyrotaxane by Copper(I)-Catalyzed Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition", MACROMOLECULAR BIOSCIENCE, vol. 10, no. 12, 8 December 2010 (2010-12-08), pages 1544-1556, XP055052204, ISSN: 1616-5187, DOI: 10.1002/mabi.201000205 * scheme 1 *

HIDEKI YANO ET AL.: "Preparation of prednisolone-appended [alpha]-, [beta]- and [gamma]-cyclodextrins: Substitution at secondary hydroxyl groups and in vitro hydrolysis behavior", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY AND AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, US, vol. 90, no. 4 1 April 2001 (2001-04-01), pages 493-503, XP009506679, ISSN: 0022-3549, Retrieved from the Internet: URL:https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354916307353?via%3Dihub [retrieved on 2001-02-07] * scheme 1 * figure 3, abstract, paragraph [Conclusion]

WO-A1-2015189478

WO-A1-2017199046

WO-A2-2018089373

(57) В изобретении представлены соединения, композиции, конъюгаты и способы лечения заболеваний и/или состояний, таких как, но не ограничиваясь ими, пролиферативные заболевания. В определенных вариантах осуществления предлагаются соединения, композиции и конъюгаты, которые включают соединения линкер-полезные нагрузки на основе циклодекстрина и их белковые конъюгаты и/или в комбинации с другими агентами. При введении этих соединений, композиций и конъюгатов, как описано здесь, в конкретные клетки-мишени, побочные эффекты, обусловленные явлениями неспецифического связывания, например, с нецелевыми клетками, уменьшаются.

Перекрестная ссылка

Заявка на данный патент испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/508,315, поданной 18 мая 2017 года, которая включена в данное описание в качестве ссылки в полном объеме.

Область изобретения

В настоящем изобретении предложены новые конъюгаты белок-лекарственное вещество, содержащие циклодекстрин, и способы лечения различных заболеваний, расстройств и состояний, включая введение конъюгатов белок-лекарственное вещество, содержащих циклодекстрин. Здесь также изложены способы получения конъюгатов белок-лекарственное вещество, содержащих циклодекстрин.

Уровень техники

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) используют антитела для селективной доставки сильнодействующего лекарственного средства к клеткам, экспрессирующим мишень, что приводит к потенциальному снижению побочных эффектов и/или токсичности для клеток, не являющихся мишенями, и, следовательно, к повышению терапевтического индекса.

Липофильная природа многих полезных нагрузок (т.е. лекарственных средств) может отрицательно влиять на свойства ADC до такой степени, что полезные нагрузки неэффективно доставляются в клетки-мишени. Модуляция свойств ADC путем прикрепления полярных групп в линкерах может снизить агрегацию во время конъюгации и улучшить физико-химические свойства ADC, что приводит к улучшению фармакокинетики (ФК) и улучшению терапевтического индекса ADC (см., например, Nature Biotechnology, 2015, 33,733- 735). Модуляция линкера для осуществления изменения полярности или заряда конечного метаболита может улучшить активность в отношении клеток с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) благодаря лучшему удерживанию полезных нагрузок внутри клеток (см., например, Cancer Res; 70 (6) 15 марта 2010 г., с. 2528). Химические фрагменты на линкерах, например, группы полиэтиленгликоля (ПЭГ), сахара или серной кислоты (см., например, WO 2014062697, US 20100323973), не только влияют на эффективность конъюгации и простоту получения ADC, но также часто остаются как часть метаболитов и, следовательно, влияют на активность и безопасность ADC. Для улучшения ADC были использованы различные стратегии (см., например, Bioconjugate Chem., 2008, 19 (10), pp 1960-1963).

Циклодекстрины (ЦД) представляют собой биоразлагаемые растворимые пищевые волокна и пищевые ингредиенты, а также используются в качестве носителей лекарственных средств. Их безопасность была задокументирована. ЦД являются более растворимыми, чем ПЭГ, и они не имеют заряда, как сульфонаты, что позволяет легко работать с ними во время обработки. Кроме того, поскольку глюкозные звенья ковалентно соединены сквозным соединением α -1,4, каждая единица должна обладать одинаковыми химическими свойствами, а также образовывать уникальную гидрофильную внешнюю поверхность и гидрофобное внутреннее ядро.

Низкая биодоступность липофильных полезных нагрузок может усугубить терапевтические окна для лечения ADC. Разработка циклодекстрин-содержащих белковых конъюгатов, например, ADC, позволила бы улучшить модуляцию биологических мишеней, улучшить биодоступность и улучшить терапевтические окна, особенно когда липофильные полезные нагрузки включены в ADC. Следовательно, существует постоянная потребность в эффективных способах лечения, например, заболеваний с использованием агентов в конъюгатах с циклодекстриновым белком.

Краткое описание изобретения

В настоящем документе представлены соединения, полезные, например, для лечения заболеваний, состояний и расстройств, включая, без ограничения, метаболические заболевания, пролиферативные заболевания и другие заболевания и состояния.

В одном варианте осуществления, изложенном в настоящем документе, изобретение представляет собой соединение или его фармацевтически приемлемую соль, включая: белок, связанный по меньшей мере с одним фрагментом полезной нагрузки и связанный по меньшей мере с одним фрагментом циклодекстрина через ковалентный линкер, где указанный ковалентный линкер связан непосредственно или опосредованно для каждого из связующего агента, фрагмента полезной нагрузки и фрагмента циклодекстрина.

В одном варианте осуществления, изложенном в настоящем документе, изобретение представляет собой соединение или его фармацевтически приемлемую соль, включая: связывающий агент, связанный по меньшей мере с одним фрагментом полезной нагрузки и связанный по меньшей мере с одним фрагментом циклодекстрина через ковалентный линкер, где указанный ковалентный линкер связан непосредственно или опосредованно к каждому из связующего агента, части полезной нагрузки и части циклодекстрина.

В другом варианте осуществления, изложенном в данном документе, изобретение представляет собой соединение, включающее в себя: реакционноспособную группу, связанную по меньшей мере с одним фрагментом полезной нагрузки и связанную по меньшей мере с одним фрагментом циклодекстрина через ковалентный линкер, где указанный ковалентный линкер связан прямо или косвенно с каждой из реакционноспособных групп, фрагментом полезной нагрузки и фрагментом циклодекстрина.

В другом варианте осуществления в настоящем документе представлен конъюгат антитело-

лекарственное средство, имеющий вышеуказанное соединение, связанное с антителом или его антиген-связывающим фрагментом.

В другом варианте осуществления в настоящем документе представлен способ лечения заболевания, состояния или расстройства у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту соединения, изложенного в настоящем документе.

В другом варианте осуществления в настоящем документе описан способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство, включающий стадию контактирования связывающего агента с соединением линкер-полезная нагрузка, изложенными здесь, в условиях, подходящих для образования связи между связывающим агентом и соединением линкер-полезная нагрузка.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A показаны три различных типа полезных соединений.

На фиг. 1B показан синтетический процесс приготовления полезного соединения 1h или 1i.

На фиг. 1C показан синтетический процесс получения полезного соединения 1d.

На фиг. 2 показан синтетический способ получения промежуточных соединений 5a-c.

На фиг. 3 показан синтетический способ получения промежуточного соединения 6b.

На фиг. 4 показан процесс синтеза для получения промежуточных соединений 7a и 7b.

На фиг. 5 показан общий процесс синтеза, описывающий процедуру A для получения соединения 3 (3e, 3f и 3g) из 2a.

На фиг. 6 показан общий процесс синтеза, описывающий процедуру B для получения соединения 3 из соединения 2, а также для получения соединения 8 из соединения 3.

На фиг. 7 показан общий процесс синтеза, описывающий процедуру C для получения соединений 9a-L.

На фиг. 8 показан общий процесс синтеза, описывающий процедуру D для создания полезных нагрузок компоновщика.

На фиг. 9 показан синтетический процесс, описывающий процедуру создания соединений линкер-полезные нагрузки.

На фиг. 10 показан синтетический процесс, описывающий процедуру создания соединений линкер-полезные нагрузки в примере 38.

На фиг. 11 показан синтетический процесс, описывающий процедуру создания соединений линкер-полезные нагрузки в примере 39.

На фиг. 12 показан график растворимости для примера 49.

На фиг. 13 показан общий процесс синтеза для конъюгации с помощью реакции Майкла.

На фиг. 14 показан общий процесс синтеза для конъюгации ADC посредством клик-реакции [2+3], представленной Ab-Eh49.

На фиг. 15 показан ДСН-ПААГ-электрофорез (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) окрашенного Кумасси геля антител анти-Her2, анти-Her2-PEG₃-N₃ и анти-Her2-Eh49.

На фиг. 16 показана эксклюзионная хроматография (SEC) антител анти-Her2 Ab, анти-Her2-PEG₃-N₃ и анти-Her2-Eh49.

На фиг. 17 показывает график зависимости % жизнеспособности клеток от Log₁₀ [M] для некоторых соединений, протестированных в примере 72.

На фиг. 18 показана биологическая активность ADC-агонистов LXR с и без линкеров циклодекстрина на графике относительных световых единиц (RLU) по сравнению с Log₁₀ [M].

На фиг. 19 показана биологическая активность ADC-агонистов LXR с линкодекстриновыми линкерами и без них на графике относительных световых единиц (RLU) по сравнению с Log₁₀ [M].

На фиг. 20 показаны реагенты, которые можно использовать вместо D-Lys в способах, изложенных здесь.

Описание примерных вариантов осуществления

В данном документе представлены соединения, композиции и способы, полезные для лечения, например, дислипидемии, метаболического заболевания, воспаления или нейродегенеративного заболевания у субъекта.

Определения

При ссылке на соединения, представленные в настоящем документе, следующие термины имеют следующие значения, если не указано иное. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники. В случае наличия нескольких определений термина, упомянутого в данном документе, следует руководствоваться определением, представленным в данном разделе, если не указано иное.

Используемый здесь термин "алкил" относится к одновалентному и насыщенному углеводородному радикальному фрагменту. Алкил обязательно является замещенным и может быть линейным, разветвленным или циклическим, т.е. циклоалкилом. Алкил включает, но не ограничивается ими, те радикалы, которые имеют 1-20 атомов углерода, т.е. C₁₋₂₀алкил; 1-12 атомов углерода, т.е. C₁₋₁₂алкил; 1-8 атомов углерода, т.е. C₁₋₈алкил; 1-6 атомов углерода, т.е. C₁₋₆алкил; и 1-3 атома углерода, т.е. C₁₋₃алкил. Примеры

алкильных групп включают, но не ограничиваются этим: метил, этил, н-пропил, i-пропил, н-бутил, s-бутил, t-бутил, i-бутил, пентильную группу, гексильную группу, циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил. Пентильный фрагмент включает, но не ограничивается ими, н-пентил и i-пентил. Гексильная группа включает, но не ограничивается этим, н-гексил.

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

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

Используемый здесь термин "галогеналкил" относится к алкилу, как определено выше, где алкил включает, по меньшей мере, один заместитель, выбранный из галогена, например, фтор (F), хлор (Cl), бром (Br) или йод (I). Примеры галогеналкила включают, но не ограничиваются ими, -CF₃, -CH₂CF₃, -CCl₂F и -CCl₃.

Используемый здесь термин "алкенил" относится к одновалентному углеводородному радикальному фрагменту, содержащему по меньшей мере два атома углерода и одну или несколько неароматических углерод-углеродных двойных связей. Алкенил необязательно замещен и может быть линейным, разветвленным или циклическим. Алкенил включает, но не ограничивается ими, те радикалы, которые имеют 2-20 атомов углерода, т.е. C₂₋₂₀алкенил; 2-12 атомов углерода, т.е. C₂₋₁₂алкенил; 2-8 атомов углерода, т.е. C₂₋₈алкенил; 2-6 атомов углерода, т.е. C₂₋₆алкенил; и 2-4 атома углерода, т.е. C₂₋₄алкенил. Примеры алкенильных групп включают, но не ограничиваются этим, винил, пропенил, бутенил и циклогексенил.

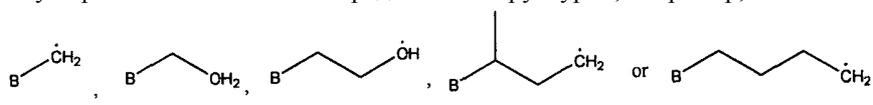
Используемый здесь термин "алкинил" относится к одновалентному углеводородному радикальному фрагменту, содержащему, по меньшей мере, два атома углерода и одну или несколько тройных связей углерод-углерод. Алкинил необязательно замещен и может быть линейным, разветвленным или циклическим. Алкинил включает, но не ограничивается ими, те радикалы, которые имеют 2-20 атомов углерода, т.е. C₂₋₂₀алкинил; 2-12 атомов углерода, т.е. C₂₋₁₂алкинил; 2-8 атомов углерода, т.е. C₂₋₈алкинил; 2-6 атомов углерода, т.е. C₂₋₆алкинил; и 2-4 атома углерода, т.е. C₂₋₄алкинил. Примеры алкинильных групп включают, но не ограничиваются этим, этинил, пропинил и бутинил.

Используемый здесь термин "алкокси" относится к одновалентному и насыщенному углеводородному радикальному фрагменту, где углеводород включает в себя одинарную связь с атомом кислорода и где радикал локализован на атоме кислорода, например, CH₃CH₂-O· для этокси. Алкоксизаместители связываются с соединением, которое они замещают через этот атом кислорода алкоксизаместителя. Алкокси необязательно замещен и может быть линейным, разветвленным или циклическим, т.е. циклоалкокси. Алкокси включает, но не ограничивается ими, те радикалы, которые имеют 1-20 атомов углерода, т.е. C₁₋₂₀алкокси; 1-12 атомов углерода, т.е. C₁₋₁₂алкокси; 1-8 атомов углерода, т.е. C₁₋₈алкокси; 1-6 атомов углерода, т.е. C₁₋₆алкокси; и 1-3 атома углерода, т.е. C₁₋₃алкокси. Примеры алкоксигрупп включают, но не ограничиваются ими, метокси, этокси, n-пропокси, i-пропокси, n-бутокси, s-бутокси, t-бутокси, i-бутокси, пентокси-группу, гексокси-группу, циклопропокси, циклобутокси, циклопентокси и циклогексокси.

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

Используемый здесь термин "арил" относится к одновалентному фрагменту, который является радикалом ароматического соединения, где атомы кольца представляют собой атомы углерода. Арил необязательно замещен и может быть моноциклическим или полициклическим, например, бициклическим или трициклическим. Примеры арильных фрагментов включают, но не ограничиваются ими, те, которые имеют от 6 до 20 кольцевых атомов углерода, т.е. C₆₋₂₀арил; от 6 до 15 атомов углерода в кольце, т.е. C₆₋₁₅арил, и от 6 до 10 атомов углерода в кольце, т.е. C₆₋₁₀арил. Примеры арильных фрагментов включают, но не ограничиваются ими, фенил, нафтил, флуоренил, азуленил, антрил, фенантрил и пиренил.

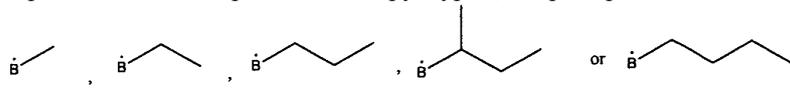
Используемый здесь термин "арилалкил" относится к одновалентному фрагменту, который является радикалом алкильного соединения, где алкильное соединение замещено ароматическим заместителем, т.е. ароматическое соединение включает одинарную связь с алкильной группой, и где радикал локализован на алкильной группе. Арилалкильная группа связывается с показанной химической структурой через алкильную группу. Арилалкил может быть представлен структурой, например,



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

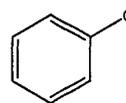
Используемый здесь термин "алкиларил" относится к одновалентному фрагменту, который являет-

ся радикалом арильного соединения, где арильное соединение замещено алкильным заместителем, т.е. арильное соединение включает одинарную связь с алкильной группой, и где радикал локализован на арильной группе. Алкиларильная группа связывается с показанной химической структурой через арильную группу. Алкиларил может быть представлен структурой, например,



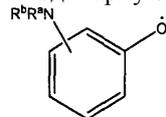
где В представляет собой ароматическую группу, например, фенил. Алкиларил необязательно замещен, т.е. арильная группа и/или алкильная группа могут быть замещены, как описано в настоящем документе. Примеры алкиларила включают, но не ограничиваются ими, толуил.

Используемый здесь термин "арилокси" относится к одновалентному фрагменту, который является радикалом ароматического соединения, где атомы кольца представляют собой атомы углерода и где кольцо замещено радикалом кислорода, т.е. ароматическое соединение включает простую связь с атомом

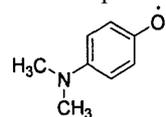


кислорода и где радикал локализован на атоме кислорода, например, для фенокси. Арилокси заместители связываются с соединением, которое они замещают через этот атом кислорода. Арилокси необязательно замещен. Арилокси включает, но не ограничивается ими, те радикалы, которые имеют от 6 до 20 атомов углерода в кольце, т.е. C_{6-20} арилокси; от 6 до 15 атомов углерода в кольце, т.е. C_{6-15} арилокси, и от 6 до 10 атомов углерода в кольце, т.е. C_{6-10} арилокси. Примеры арилокси групп включают, но не ограничиваются ими, фенокси, нафтокси и антрокси.

Используемый здесь термин " R^aR^bN -арилокси" относится к одновалентному фрагменту, который является радикалом ароматического соединения, где атомы кольца представляют собой атомы углерода и где кольцо замещено, по меньшей мере, одним заместителем R^aR^bN - и, по меньшей мере, одним радикалом кислорода, т.е. ароматическое соединение включает в себя одинарную связь с заместителем R^aR^bN и одинарную связь с атомом кислорода и где радикал локализован на атоме кислорода, например,



R^aR^bN -арилокси заместители связываются с соединением, которое они замещают через этот атом кислорода. R^aR^bN -арилокси необязательно замещен. R^aR^bN -арилокси включает, но не ограничивается ими, те, которые имеют от 6 до 20 атомов углерода в кольце, например, C_{6-20} (R^aR^bN)_n-арилокси, от 6 до 15 атомов углерода в кольце, например, C_{6-15} (R^aR^bN)_n-арилокси и от 6 до 10 атомов углерода в кольце, например, C_{6-10} (R^aR^bN)_n-арилокси, где n представляет собой число заместителей R^aR^bN . Пример R^aR^bN -арилокси группы включает, но не ограничивается этим, 4-(диметиламино)-фенокси, фенокси,



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

Используемый здесь термин "гетероалкил" относится к алкилу, в котором один или несколько атомов углерода заменены гетероатомами. Используемый здесь термин "гетероалкенил" относится к алкенилу, в котором один или несколько атомов углерода заменены гетероатомами. Используемый здесь термин "гетероалкинил" относится к алкинилу, в котором один или несколько атомов углерода заменены гетероатомами. Подходящие гетероатомы включают, но не ограничиваются ими, атомы азота, кислорода и серы. Гетероалкил является необязательно замещенным. Примеры гетероалкильных групп включают, но не ограничиваются ими, аминокалкил, сульфониалкил и сульфинилалкил. Примеры гетероалкильных групп также включают, но не ограничиваются ими, метиламин, метилсульфонил и метилсульфинил.

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

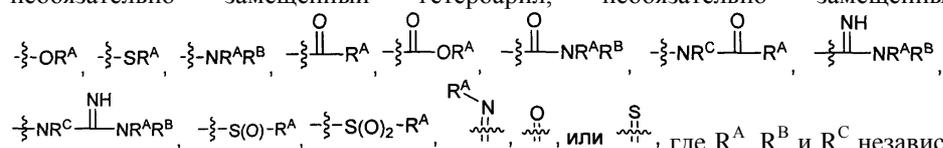
Используемый здесь термин "гетероарилен" относится к арилену, в котором один или несколько кольцевых атомов ароматического кольца заменены атомом кислорода, серы, азота или фосфора. Гетероарилен необязательно замещен.

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

Используемый здесь термин "кислота Льюиса" относится к молекуле или иону, который принимает электрон-неподеленную пару. Кислоты Льюиса, используемые в описанных здесь способах, представляют собой кислоты, отличные от протонов. Кислоты Льюиса включают, но не ограничиваются этим, неметаллические кислоты, металлические кислоты, твердые кислоты Льюиса и мягкие кислоты Льюиса. Кислоты Льюиса включают, но не ограничиваются ими, кислоты Льюиса из алюминия, бора, железа, олова, титана, магния, меди, сурьмы, фосфора, серебра, иттербия, скандия, никеля и цинка. Иллюстративные кислоты Льюиса включают, но не ограничиваются ими, $AlBr_3$, $AlCl_3$, BCl_3 , трихлорид бора, метилсульфид, BF_3 , метилэфират трифторида бора, трифторид метилсульфида бора, трифторид бора, тетрагидрофуран бора, дициклогексилборон трифторметансульфид железа (III) бромсульфат (III) хлорид, хлорид олова (IV), хлорид титана (IV), изопропоксид титана (IV), $Cu(OTf)_2$, $CuCl_2$, $CuBr_2$, хлорид цинка, галогениды алкилалюминия (R_nAlX_{3-n} , где R представляет собой гидрокарбил, X представляет собой галогенид и индекс n представляет собой целое число от 0 до 3), $Zn(OTf)_2$, $ZnCl_2$, $Yb(OTf)_3$, $Sc(OTf)_3$, $MgBr_2$, $NiCl_2$, $Sn(OTf)_2$, $Ni(OTf)_2$ и $Mg(OTf)_2$.

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

Используемый здесь термин "необязательно замещенный", когда он используется для описания радикального фрагмента, например, необязательно замещенного алкила, означает, что такой фрагмент необязательно связан с одним или несколькими заместителями. Примеры таких заместителей включают, но не ограничиваются ими, галоген, циано, нитро, необязательно замещенный галогеналкил, азидо, эпокси, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный гетероциклоалкил,



где R^A , R^B и R^C независимо находятся при в каждом случае атом водорода, алкил, алкенил, алкинил, арил, алкиларил, ариалкил, гетероалкил, гетероарил или гетероциклоалкил или R^A и R^B вместе с атомами, с которыми они связаны, образуют насыщенное или ненасыщенное карбоциклическое кольцо, где кольцо необязательно замещено, и где один или несколько кольцевых атомов необязательно замещены гетероатомом. В некоторых вариантах осуществления, когда радикальный фрагмент необязательно замещен необязательно замещенным гетероарилом, необязательно замещенным гетероциклоалкилом или необязательно замещенным насыщенным или ненасыщенным карбоциклическим кольцом, заместители необязательно замещенного гетероарила, необязательно замещенного гетероциклоалкила или необязательно замещенного насыщенного или ненасыщенного карбоциклического кольца если они замещены, не замещены заместителями, которые дополнительно необязательно замещены дополнительными заместителями. В некоторых вариантах осуществления, когда группа, описанная в данном документе, является необязательно замещенной, заместитель, связанный с группой, является незамещенным, если не указано иное.

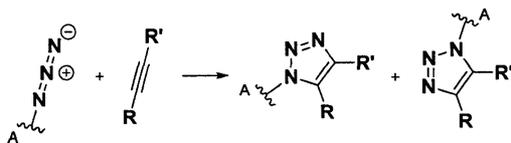
Используемый здесь термин "связывающий агент" относится к любой молекуле, например белку, способному специфически связываться с данным партнером по связыванию, например антигену.

Используемый здесь термин "линкер" относится к двухвалентному, трехвалентному или многовалентному фрагменту, который ковалентно связывает связывающий агент с одним или несколькими соединениями, описанными здесь, например соединениями с полезной нагрузкой и группой циклодекстрина, как описано здесь.

Используемый здесь термин "условия синтеза амида" относится к условиям реакции, подходящим для образования амида, например, путем реакции карбоновой кислоты, активированной карбоновой кислоты или ацилгалогенида с амином. В некоторых примерах условия синтеза амида относятся к условиям реакции, подходящим для осуществления образования амидной связи между карбоновой кислотой и амином. В некоторых из этих примеров карбоновая кислота сначала превращается в активированную карбоновую кислоту до того, как активированная карбоновая кислота вступает в реакцию с амином с образованием амида. Подходящие условия для осуществления образования амида включают, но не ограничиваются ими, условия, в которых используются реагенты для осуществления реакции между карбоновой кислотой и амином, включая, но не ограничиваясь этим, дициклогексилкарбодимид (DCC), ди-

зопропилкарбодиимид (DIC), (бензотриазол-1-илокси)трис(диметиламино)фосфони (BOP), (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинфосфония гексафторфосфат (PvBOP), (7-азабензотриазол-1-илокси) трипирролидинфосфония гексафторфосфат (PvAOP), гексафторфосфата бромтрипирролидинфосфоний (PvBrOP), O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурунийгексафторфосфат (HBTU), O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуруний тетрафторборат (TBTU), 1-[бис(диметиламино)метиле]-1H-1,2,3-триазоло [4,5-b]пиридиния, 3-оксид гексафторфосфата (HATU), N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохиолин (EEDQ), N-этил-N'-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC), 2-хлор-1,3-диметилимидазолидиния гексафторфосфат (CIP), 2-хлор-4,6-диметокси-1,3,5-триазин (CDMT) и карбонилдимидазол (CDI). В некоторых примерах карбоновую кислоту сначала превращают в активированный эфир карбоновой кислоты перед обработкой активированного эфира карбоновой кислоты амином с образованием амидной связи. В определенных вариантах осуществления карбоновую кислоту обрабатывают реагентом. Реагент активирует карбоновую кислоту, депротонируя карбоновую кислоту, а затем образуя комплекс продуктов с депротонированной карбоновой кислотой в результате нуклеофильной атаки депротонированной карбоновой кислоты на протонированный реагент. Активированные сложные эфиры карбоновых кислот для определенных карбоновых кислот впоследствии более восприимчивы к нуклеофильной атаке амина, чем карбоновая кислота до ее активации. Это приводит к образованию амидной связи. Как таковая, карбоновая кислота описана как активированная. Типичные реагенты включают DCC и DIC.

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

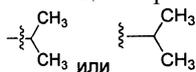


В некоторых вариантах осуществления более одного подходящего азидов и более чем одного подходящего алкина можно использовать в процессе синтеза на пути к продукту, где каждая пара азид-алкин может участвовать в одной или нескольких независимых клик-реакциях, чтобы получить смесь региоизомерных продуктов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

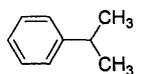
Используемый здесь термин "остаток" относится к химическому фрагменту в соединении, которое остается после химической реакции. Например, термин "аминокислотный остаток" или "N-алкильный аминокислотный остаток" относится к продукту амидного сочетания или пептидного сочетания аминокислоты или N-алкиламинокислоты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

Используемый здесь термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству (например, соединения), которое является достаточным для обеспечения терапевтической пользы для пациента при лечении или лечении заболевания или расстройства, или для задержки или минимизации одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием или расстройством.

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



и имеет следующую структуру:

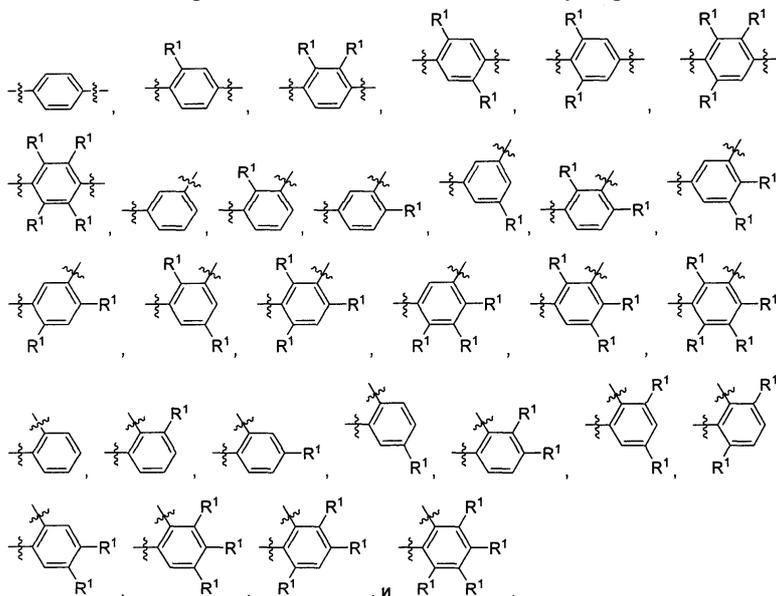


Как используется в данном документе, иллюстрации, показывающие заместители, связанные с циклической группой (например, ароматическим, гетероароматическим, конденсированным кольцом и насыщенным или ненасыщенным циклоалкилом или гетероциклоалкилом) через связь между атомами кольца, предназначены для указания,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

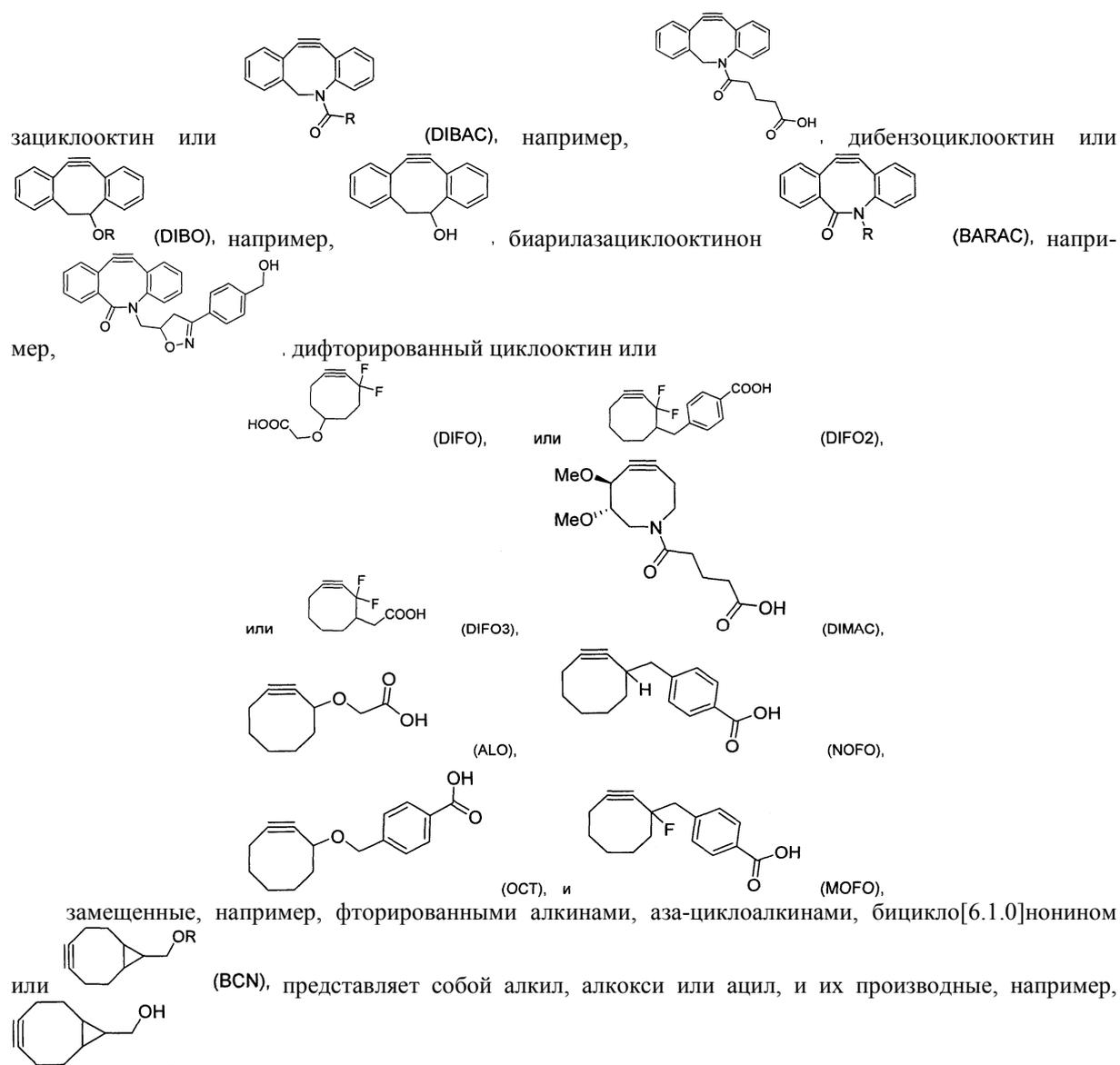
группе с конденсированным кольцом в соответствии с методиками, изложенными в настоящем документе, или известными в области, к которой относится настоящее раскрытие. Например, группа



, в которой индекс q представляет собой целое число от 0 до 4 и в котором положения заместителя R^1 описаны в общем, т.е. не связаны непосредственно с какой-либо вершиной структуры линии связи, т.е. кольцевой атом углерода включает следующие неограничивающие примеры групп, в которых заместитель R^1 связан с определенным кольцевым атомом углерода:



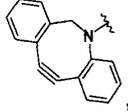
Используемое здесь выражение "реакционноспособный линкер" относится к одновалентной группе, которая включает реакционноспособную группу и спейсерную группу, изображенные, например, как $RG'-SP$, в которой RG' представляет собой реакционноспособную группу, а SP представляет собой спейсерную группу. Как описано здесь, реакционноспособный линкер может включать более одной реакционноспособной группы и более одной спейсерной группы. Спейсерная группа представляет собой любой двухвалентный или трехвалентный фрагмент, который связывает реакционноспособную группу с другой группой, такой как полезная нагрузка, или также со связующим агентом. Реакционноспособные линкеры (RL) вместе с полезными нагрузками, с которыми они связаны, обеспечивают промежуточные соединения ("линкер-полезные нагрузки"), используемые в качестве синтетических предшественников для получения конъюгатов антител, описанных здесь. Реакционноспособный линкер содержит реакционноспособную группу (RG'), которая представляет собой функциональную группу или фрагмент, который способен реагировать с реакционноспособной частью другой группы, например, антителом, модифицированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или циклодекстриновой группой, как описано здесь. Часть, полученная в результате реакции реакционноспособной группы с антителом, модифицированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, вместе со связывающей группой, включает в себя часть "линкер связывающего агента" ("BL") конъюгата, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления "реакционноспособная группа" представляет собой функциональную группу или фрагмент (например, сложный эфир малеимида или N-гидроксисукцинимид (NHS)), который реагирует с остатком цистеина или лизина антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления "реакционноспособная группа" представляет собой функциональную группу или группу, которая способна подвергаться химической клик-реакции (см., например, клик-химию, Huisgen Proc. Chem. Soc. 1961, Wang et al. J. Am. Chem. Soc. 2003 и Agard et al. J. Am. Chem. Soc. 2004). В некоторых вариантах осуществления указанной химической клик-реакции реакционноспособной группой является алкин, который способен подвергаться реакции 1,3-циклоприсоединения с азидом. Такие подходящие реакционноспособные группы включают, но не ограничиваются ими, напряженные алкины, например, те, которые подходят для активированных штаммами алкиназидных циклоприсоединений (SPAAC), циклоалкины, например, циклооктины, бензанилированные алкины и алкины, способные подвергаться 1,3-циклоприсоединению реакции с алкинами в отсутствие медных катализаторов. Подходящие алкины также включают, но не ограничиваются ими, дибензоа-

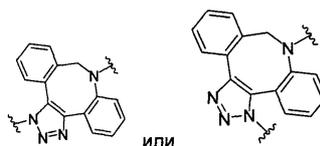


Особенно полезные алкины включают

Полезные нагрузки линкера, включающие такие реакционноспособные группы, полезны для конъюгирования антител, которые были функционализированы азидогруппами. Такие функционализированные антитела включают антитела, функционализированные азидо-полиэтиленгликолевые группы. В некоторых вариантах осуществления такое функционализированное антитело получают обработкой антитела, имеющего по меньшей мере один остаток глутамина, например, Gln295, Asn297Gln и/или Gln55, соединением, содержащим аминогруппу и азидную группу, в присутствии фермента транслугтаминазы.

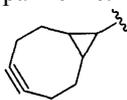
В некоторых примерах алкин, используемый в реакции биоконъюгации, пригоден для клик-химической реакции конъюгации с Cu(I). В некоторых примерах алкин, используемый в реакции конъюгации, реагирует с 1,2-аминотиолом в реакции СВТ. В некоторых примерах используемый алкин представляет собой BCN, производное BCN или транс-циклооктен (ТСО) в реакциях Дильса-Альдера с обратным электронным спросом. См., например, J. Am. Chem. Soc.; (Статья), 2012, 134 (6), 2950-2953.

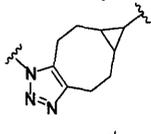
В некоторых примерах реакционноспособной группой является алкин, например, , который может реагировать посредством клик-химической реакции с азидом, например, $N=N=N$ с образова-



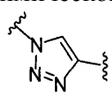
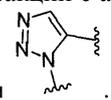
нием клик-химического продукта, такого как

В некоторых примерах группа реагирует с азидом на модифицированном антителе или его антигенсвязывающем фрагменте. В некоторых примерах реакционноспособная группа представляет собой ал-

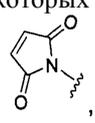
кин, например, , который может реагировать посредством клик-химической реакции с ази-

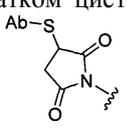
дом, например, $N=N=N$ с образованием клик-химического продукта, например, .

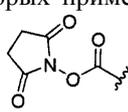
В некоторых примерах реакционноспособной группой является алкин, например, $\text{C}\equiv\text{CH}$, который может реагировать посредством клик-химической реакции с азидом, например, $N=N=N$ с образованием

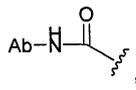
клик-химического продукта, например,  или .

В некоторых примерах реакционноспособная группа представляет собой функциональную группу,

например, , которая реагирует с остатком цистеина на антителе или его антигенсвязывающим

фрагментом, образуя с ним связь, например,  где Ab относится к антителу или его антигенсвязывающий фрагмент, и S относится к атому S остатка цистеина, через который функциональная группа связывается с Ab. В некоторых примерах реакционноспособная группа представляет собой функцио-

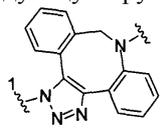
нальную группу, например,  которая реагирует с остатком лизина на антителе или его анти-

генсвязывающем фрагменте с образованием с ним связи, например, , где Ab относится к антителу или антигенсвязывающему его фрагмент и NH относится к атому NH остатка боковой цепи лизина, через который функциональная группа связывается с Ab.

Используемый здесь термин "линкер связывающего агента" или "BL" относится к любой двухвалентной, трехвалентной или многовалентной группе или фрагменту, который связывает или соединяет связывающий агент (например, антитело или фрагмент антигенсвязывающего вещества) с указанным здесь соединением полезной нагрузки (например, MMAE, бис-октагидрофенантренкарбоксамиды) и, необязательно, с одним или несколькими соединениями боковой цепи. Как правило, подходящие линкеры связывающего агента для конъюгатов антител, описанных в настоящем документе, представляют собой те, которые являются достаточно стабильными, чтобы использовать циркулирующий период полужизни антитела, и в то же время способны высвобождать его полезную нагрузку после опосредованной антигеном интернализации конъюгата. Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Расщепляемые линкеры представляют собой линкеры, которые расщепляются посредством внутриклеточного метаболизма после интернализации, например, расщепления посредством гидролиза, восстановления или ферментативной реакции. Нерасщепляемые линкеры представляют собой линкеры, которые высвобождают присоединенную полезную нагрузку посредством лизосомальной деградации антитела после интернализации. Подходящие линкеры включают, но не ограничиваются ими, кислотолабильные линкеры, гидролизно-лабильные линкеры, ферментативно расщепляемые линкеры, восстанавливающие лабильные линкеры, саморасщепляющиеся линкеры и нерасщепляемые линкеры. Подходящие линкеры также включают, но не ограничиваются ими, те, которые являются или включают пептиды, глюкуроныды, сукцинимид-тиоэферы, полиэтиленгликолевые (ПЭГ) звенья, гидразоны, малькапроильные звенья, дипептидные звенья, валин-цитруллинные звенья и пара-аминобензил (PAB) единицы. В некоторых вариантах осуществления линкер связывающего агента (BL) включает фрагмент, который образуется в

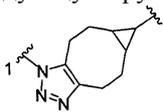
результате реакции реакционноспособной группы (RG) реакционноспособного линкера (RL) и реакционноспособной части связывающего агента, например, антитела, модифицированного антитела или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых примерах BL включает следующую группу:



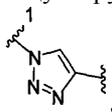
где $\overset{1}{\text{~}}$ указана связь со связующим агентом.

В некоторых примерах BL включает следующую группу:



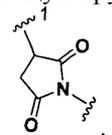
где $\overset{1}{\text{~}}$ указана связь со связующим агентом.

В некоторых примерах BL включает следующую группу:



где $\overset{1}{\text{~}}$ указана связь со связующим агентом.

В некоторых примерах BL включает следующую группу:



где $\overset{1}{\text{~}}$ представляет собой связь с цистеином антитела или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых примерах BL включает следующую группу:



где $\overset{1}{\text{~}}$ представляет собой связь с лизином антитела или его антигенсвязывающим фрагментом.

Соединения и полезные нагрузки.

В некоторых примерах, изложенных в настоящем документе, изобретение представляет собой соединение или его фармацевтически приемлемую соль, включая: связывающий агент, связанный по меньшей мере с одним фрагментом полезной нагрузки и связанный по меньшей мере с одним фрагментом циклодекстрина через ковалентный линкер, где указанный ковалентный линкер связан непосредственно или опосредованно к каждому из связывающего агента, части полезной нагрузки и части циклодекстрина.

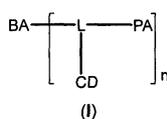
В некоторых примерах, изложенных в настоящем документе, изобретение представляет собой соединение или его фармацевтически приемлемую соль, включая: белок, связанный по меньшей мере с одним фрагментом полезной нагрузки и связанный по меньшей мере с одним фрагментом циклодекстрина через ковалентный линкер, где указанный ковалентный линкер связан непосредственно или опосредованно для каждого из связывающего агента, фрагмента полезной нагрузки и фрагмента циклодекстрина.

Как показано здесь, в некоторых примерах связывающий агент связан непосредственно с ковалентным линкером, таким как аминокислота лизин. Это означает, что связывающий агент находится на расстоянии одной связи от ковалентного линкера аминокислоты лизина. В некоторых из этих примеров ковалентный линкер также связан непосредственно с фрагментом полезной нагрузки. Это означает, что ковалентный линкер находится на расстоянии одной связи от полезной нагрузки, такой как, но не ограничиваясь этим, MMAE, стероид или любую полезную нагрузку, изложенную здесь. В некоторых из этих примеров ковалентный линкер также связан непосредственно с циклодекстриновым фрагментом. Это означает, что ковалентный линкер находится в одном положении связи от циклодекстрина, такого как циклодекстрины, изложенные здесь. В некоторых из этих примеров ковалентный линкер представляет собой аминокислоту лизина или ее производное.

В других примерах связывающий агент косвенно связан с ковалентным линкером. Это означает, что связывающий агент находится на расстоянии более, чем одной связи от ковалентного линкера. Это также означает, что связывающий агент связан через другой фрагмент с ковалентным линкером. Например, связывающий агент может быть связан с малеимидной группой, которая связана с полиэтиленгликолевой

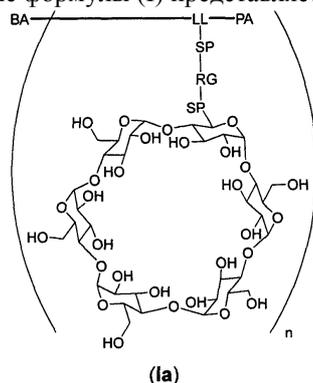
группой, которая связана с ковалентным линкером. В некоторых из этих примеров ковалентный линкер также косвенно связан с фрагментом полезной нагрузки. Это означает, что ковалентный линкер находится на расстоянии более, чем одной связи от полезной нагрузки, такой как, но не ограничиваясь этим, MMAE, стероид или любую полезную нагрузку, изложенную здесь. Это также означает, что ковалентный линкер связан с полезной нагрузкой через другую часть. Например, ковалентный линкер может быть связан с дипептидом, таким как, без ограничения, Val-Ala или Val-Cit, который может быть связан с PAB, который может быть связан с полезной нагрузкой. В некоторых из этих примеров ковалентный линкер также косвенно связан с циклодекстриновым фрагментом. Это означает, что ковалентный линкер находится на расстоянии более, чем одной связи от циклодекстрина, такого как циклодекстрины, изложенные здесь. Это также означает, что ковалентный линкер связан с циклодекстрином через другую часть. Например, ковалентный линкер может быть связан с полиэтиленгликолевой группой, которая может быть связана с реакционноспособной группой, которая может быть связана с циклодекстрином. В некоторых из этих примеров ковалентный линкер представляет собой аминокислоту лизина или ее производное.

В одном примере, изложенном в настоящем документе, представляет собой соединение в соответствии с формулой (I):



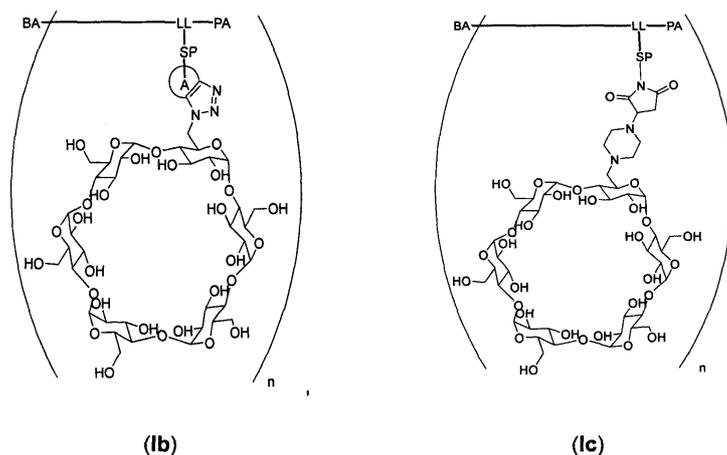
В формуле (I) BA представляет собой связующий агент, L представляет собой трехвалентный линкер, CD представляет собой остаток циклодекстрина, нижний индекс n представляет собой целое число от 1 до 30, PA представляет собой остаток полезной нагрузки. В некоторых примерах может присутствовать более одного трехвалентного линкера L. В определенных вариантах осуществления n равно от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления n равно 4. В определенных вариантах осуществления n равно 2. В определенных вариантах осуществления n равно 1. В определенных вариантах осуществления n равно 3.

В некоторых примерах соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (Ia):



В формуле (Ia) BA представляет собой связующий агент, LL представляет собой трехвалентный линкер, RG представляет собой реакционноспособный остаток линкера, SP независимо в каждом случае отсутствует или является спейсерной группой, индекс n представляет собой целое число от 1 до 30; и PA - полезная нагрузка. В определенных вариантах осуществления n равно от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления n равно 4. В определенных вариантах осуществления n равно 2. В определенных вариантах осуществления n равно 1. В определенных вариантах осуществления n равно 3.

В некоторых примерах соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (Ib) или (Ic):

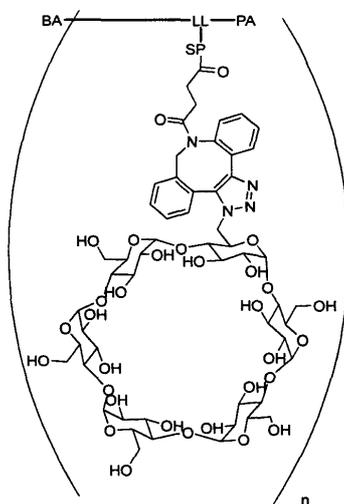


(Ib)

(Ic)

В формуле (Ib) или (Ic) BA представляет собой связующий агент, LL представляет собой трехвалентный линкер. SP независимо в каждом случае отсутствует или представляет собой спейсер, кольцо А конденсировано с триазолом и выбрано из группы, состоящей из циклоалкила, циклоалкенила, гетероциклоалкила и гетероциклоалкенила, где циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклоалкил и гетероциклоалкенил необязательно замещенный алкилом, OH или NR^aR^b , где каждый из R^a и R^b представляет собой алкил или H, n представляет собой целое число от 1 до 30, и PA представляет собой полезную нагрузку. В некоторых примерах кольцо А представляет собой необязательно замещенный циклоалкил. В некоторых примерах кольцо А представляет собой необязательно замещенный циклоалкенил. В некоторых примерах кольцо А представляет собой необязательно замещенный циклоалкинил. В некоторых примерах кольцо А представляет собой необязательно замещенный гетероциклоалкил. В некоторых примерах кольцо А представляет собой необязательно замещенный гетероциклоалкинил. В некоторых примерах в формулу (Ib) или (Ic) включены региоизомеры, стереоизомеры и их смеси соединений формулы (Ib) или (Ic).

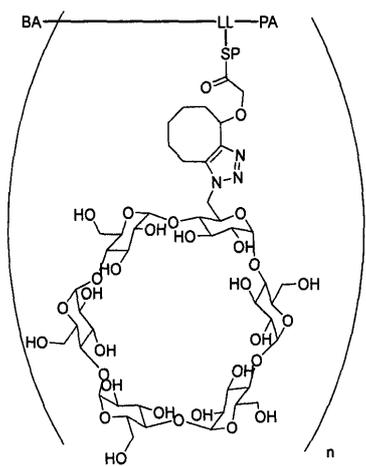
В некоторых примерах соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (Ib): В некоторых из этих примеров соединение формулы (Ib) представляет собой соединение формулы (Ib1), (Ib2), (Ib3), (Ib4), (Ib5) или (Ib6). В некоторых из этих примеров к формуле (Ib) относится соединение согласно формуле формулы (Ib1):



(Ib1).

В формуле (Ib1) BA представляет собой связующий агент, LL представляет собой трехвалентный линкер, SP независимо в каждом случае отсутствует или представляет собой спейсер, n представляет собой целое число от 1 до 30, а PA представляет собой полезную нагрузку. В формулу (Ib1) также включены региоизомеры (например, в отношении триазольной связи), стереоизомеры и их смеси. В определенных вариантах осуществления n равно от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления n равно 4. В определенных вариантах осуществления n равно 2. В определенных вариантах осуществления n равно 1. В определенных вариантах осуществления n равно 3.

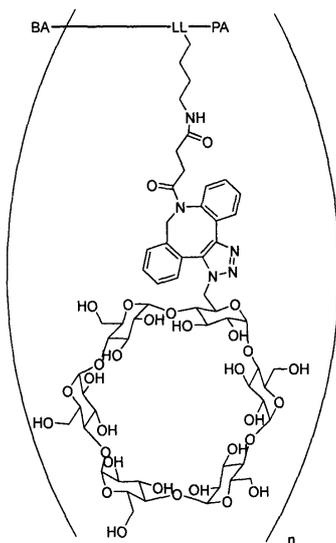
В некоторых из этих примеров к формуле (Ib) относится соединение согласно формуле формулы (Ib2):



(Ib2).

В формуле (Ib2) ВА представляет собой связующий агент, LL представляет собой трехвалентный линкер, SP независимо в каждом случае отсутствует или представляет собой спейсер, n представляет собой целое число от 1 до 30, а ПА представляет собой полезную нагрузку. В формулу (Ib2) также включены региоизомеры (например, в отношении триазольной связи), стереоизомеры и их смеси. В определенных вариантах осуществления n равно от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления n равно 4. В определенных вариантах осуществления n равно 2. В определенных вариантах осуществления n равно 1. В определенных вариантах осуществления n равно 3.

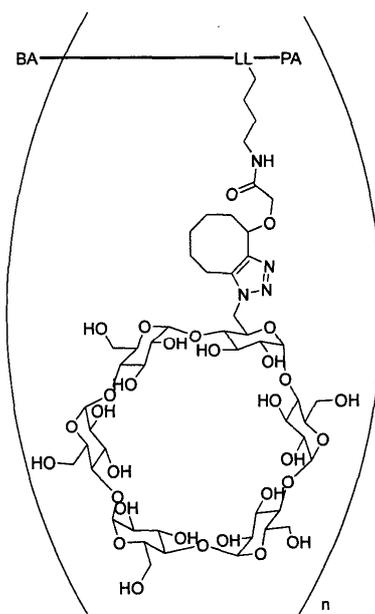
В некоторых из этих примеров к формуле (Ib) относится соединение согласно формуле формулы (Ib3):



(Ib3).

В формуле (Ib3) ВА представляет собой связующий агент, LL представляет собой трехвалентный линкер, n представляет собой целое число от 1 до 30, а ПА представляет собой полезную нагрузку. В формулу (Ib3) также включены региоизомеры (например, в отношении триазольной связи), стереоизомеры и их смеси. В определенных вариантах осуществления n равно от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления n равно 4. В определенных вариантах осуществления n равно 2. В определенных вариантах осуществления n равно 1. В определенных вариантах осуществления n равно 3.

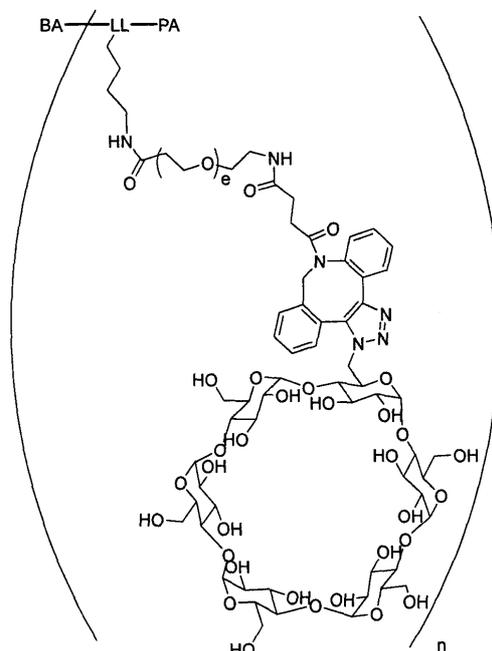
В некоторых из этих примеров к формуле (Ib) относится соединение согласно формуле формулы (Ib4):



(Ib4).

В формуле (Ib4) ВА представляет собой связующий агент, LL представляет собой трехвалентный линкер, n представляет собой целое число от 1 до 30, а РА представляет собой полезную нагрузку. В формулу (Ib4) также включены региоизомеры (например, в отношении триазольной связи), стереоизомеры и их смеси. В определенных вариантах осуществления n равно от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления n равно 4. В определенных вариантах осуществления n равно 2. В определенных вариантах осуществления n равно 1. В определенных вариантах осуществления n равно 3.

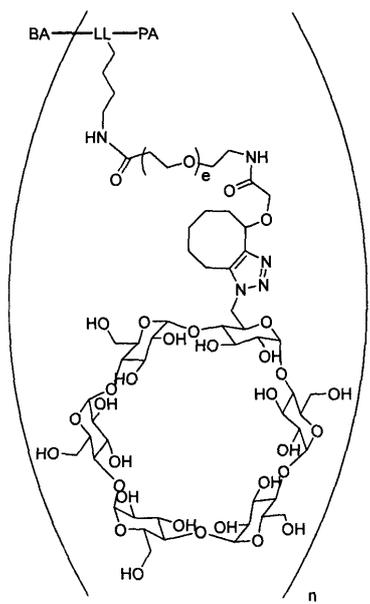
В некоторых из этих примеров к формуле (Ib) относится соединение согласно формуле формулы (Ib5):



(Ib5).

В формуле (Ib5) ВА представляет собой связующий агент, LL представляет собой трехвалентный линкер, e представляет собой целое число от 0 до 4, n представляет собой целое число от 1 до 30 и РА представляет собой полезную нагрузку. В формулу (Ib5) также включены региоизомеры (например, в отношении триазольной связи), стереоизомеры и их смеси. В определенных вариантах осуществления n равно от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления n равно 4. В определенных вариантах осуществления n равно 2. В определенных вариантах осуществления n равно 1. В определенных вариантах осуществления n равно 3.

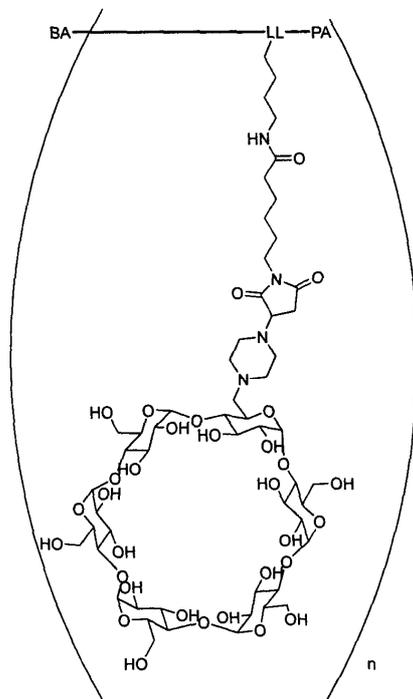
В некоторых из этих примеров к формуле (Ib) относится соединение согласно формуле формулы (Ib6):



(Ib6).

В формуле (Ib6) ВА представляет собой связующий агент, LL представляет собой трехвалентный линкер, e представляет собой целое число от 0 до 4, n представляет собой целое число от 1 до 30 и РА представляет собой полезную нагрузку. В формулу (Ib6) также включены региоизомеры (например, в отношении триазольной связи), стереоизомеры и их смеси. В определенных вариантах осуществления n равно от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления n равно 4. В определенных вариантах осуществления n равно 2. В определенных вариантах осуществления n равно 1. В определенных вариантах осуществления n равно 3.

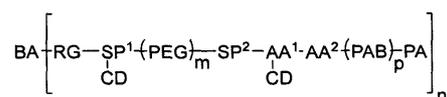
В некоторых примерах соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (Ic): В некоторых из этих примеров соединение формулы (Ic) представляет собой соединение формулы (Id):



(Ic1).

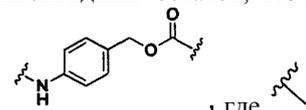
В формуле (Id) ВА представляет собой связующий агент, LL представляет собой трехвалентный линкер, n представляет собой целое число от 1 до 30, а РА представляет собой полезную нагрузку. В формулу (Ic1) также включены региоизомеры, стереоизомеры и их смеси. В определенных вариантах осуществления n равно от 1 до 4. В определенных вариантах осуществления n равно 4. В определенных вариантах осуществления n равно 2. В определенных вариантах осуществления n равно 1. В определенных вариантах осуществления n равно 3.

В некоторых примерах изложенное здесь представляет собой соединение в соответствии с формулой (Id):



(Id)

В формуле (Id) BA является связующим агентом; RG представляет собой остаток реакционноспособной группы; каждый из SP¹ и SP², независимо в каждом случае, отсутствует или является остатком спейсерной группы, и где SP¹ содержит трехвалентный линкер; AA¹ представляет собой трехвалентный линкер, содержащий аминокислотный остаток; AA² представляет собой дипептидный остаток; ПЭГ



представляет собой полиэтиленгликолевый остаток; PAB представляет собой обозначает атом, через который PAB связан со смежными группами в формуле, CD, независимо в каждом случае, отсутствует или представляет собой циклодекстриновый остаток, где присутствует по меньшей мере один CD, нижний индекс n представляет собой целое число от 1 до 30; индекс m представляет собой целое число от 0 до 5; индекс p равен 0 или 1; и PA представляет собой полезную нагрузку. В этих примерах индекс m равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых примерах индекс m равен 0. В некоторых примерах индекс m равен 1. В некоторых примерах индекс m равен 2. В некоторых примерах индекс m равен 3. В некоторых примерах индекс m равен 4. В некоторых примерах индекс m равен 5. В некоторых примерах индекс p равен 0. В некоторых примерах индекс p равен 1. В некоторых примерах любой из AA¹ или AA² содержит, независимо в каждом случае, аминокислоту, выбранную из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, триптофана, фенилаланина, пролина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина или цитруллина, их производные или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления AA¹ представляет собой аминокислоту, выбранную из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, триптофана, фенилаланина, пролина, глицина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина или цитруллина, их производных или их комбинаций. В определенных вариантах осуществления AA¹ представляет собой лизин. В определенных вариантах осуществления AA¹ представляет собой лизин или производное лизина. В определенных вариантах осуществления AA² представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой аланин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой валин-глицин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой глицин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA¹-AA² представляет собой глутамин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA¹-AA² представляет собой глутамин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA¹-AA² представляет собой лизин-валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления AA¹-AA² представляет собой лизин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA¹-AA² представляет собой глутамин-валин-цитруллин. В определенных вариантах осуществления лизин представляет собой L-лизин. В определенных вариантах осуществления лизин представляет собой D-лизин. В некоторых примерах SP¹ независимо в каждом случае выбран из группы, состоящей из C₁₋₆алкилена, -NH-, -C(O)-, (-CH₂-CH₂-O)_e, -NH-CH₂-CH₂-(-O-CH₂-CH₂)_e-C(O)-, -C(O)-(CH₂)_u-C(O)-, -C(O)-NH-(CH₂)_v- и их комбинации, где индекс e является целым числом от 0 до 4, индекс u является целым числом от 1 до 8, а индекс v является целым числом от 1 до 8. В некоторых примерах SP² независимо в каждом случае выбран из группы, состоящей из C₁₋₆алкилена, -NH-, -C(O)-, (-CH₂-CH₂-O)_e, -NH-CH₂-CH₂-(-O-CH₂-CH₂)_e-C(O)-, -C(O)-(CH₂)_u-C(O)-, -C(O)-NH-(CH₂)_v- и их комбинации, где индекс e является целым числом от 0 до 4, индекс u является целым числом от 1 до 8, а индекс v является целым числом от 1 до 8.

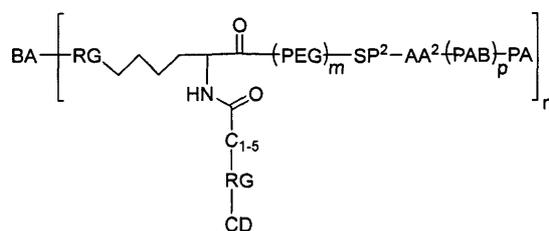
В некоторых случаях формулы (Id) CD представляет собой группу модифицированных CD в соответствии со структурой:



где RG независимо в каждом случае; остаток реакционноспособного линкера, SP³, независимо в каждом случае, отсутствует или остаток спейсерной группы выбран из группы, состоящей из C₁₋₆алкилена, -NH-, -C(O)-, (-CH₂-CH₂-O)_e, -NH-CH₂-CH₂-(-O-CH₂-CH₂)_e-C(O)-, -C(O)-(CH₂)_u-C(O)-, -C(O)-NH-(CH₂)_v- и их комбинации, где индекс e представляет собой целое число от 0 до 4, индекс u представляет собой целое число от 1 до 8, а индекс v представляет собой целое число от 1 до 8; q представляет

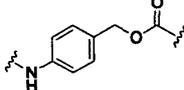
собой целое число от 0 до 5 и  представляет атом, через который группа модифицированного CD присоединена к SP¹ или AA¹.

В некоторых примерах изложенное здесь представляет собой соединение в соответствии с формулой (Ie):

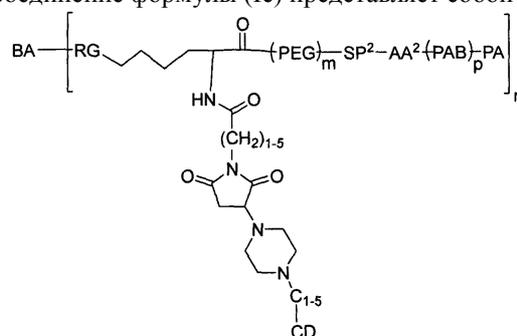


(Ie)

В формуле (Ie) BA является связующим агентом; RG независимо в каждом случае представляет собой реакционноспособный линкерный остаток; SP² независимо в каждом случае отсутствует или является остатком спейсерной группы; AA² представляет собой дипептидный остаток; ПЭГ представляет собой

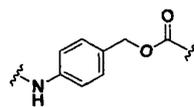
полиэтиленгликолевый остаток; PAB представляет собой , где  обозначает атом, через который PAB связан со смежными группами в формуле, CD - остаток циклодекстрина; индекс n представляет собой целое число от 1 до 30; индекс m представляет собой целое число от 0 до 5; индекс p равен 0 или 1; и PA представляет собой полезную нагрузку. В этих примерах индекс m равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых примерах индекс m равен 0. В некоторых примерах индекс m равен 1. В некоторых примерах индекс m равен 2. В некоторых примерах индекс m равен 3. В некоторых примерах индекс m равен 4. В некоторых примерах индекс m равен 5. В некоторых примерах индекс p равен 0. В некоторых примерах индекс p равен 1. В некоторых примерах любой из AA¹ или AA² содержит, независимо в каждом случае, аминокислоту, выбранную из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, триптофана, фенилаланина, пролина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, лизин, аргинин, гистидин или цитруллин, их производные или их комбинации. В определенных вариантах осуществления AA² представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой аланин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой валин-глицин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой глицин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой глутамин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой глутамин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой лизин-валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой лизин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой глутамин-валин-цитруллин. В некоторых примерах SP² независимо в каждом случае выбран из группы, состоящей из C₁₋₆алкилена, -NH-, -C(O)-, (-CH₂-CH₂-O)_e, -NH-CH₂-CH₂-(-O-CH₂-CH₂)_e-C(O)-, -C(O)-(CH₂)_u-C(O)-, -C(O)-NH-(CH₂)_v- и их комбинации, где индекс e является целым числом от 0 до 4, индекс u является целым числом от 1 до 8, а индекс v является целым числом от 1 до 8.

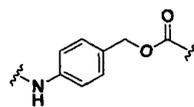
В некоторых примерах соединение формулы (Ie) представляет собой соединение формулы (Ie1):



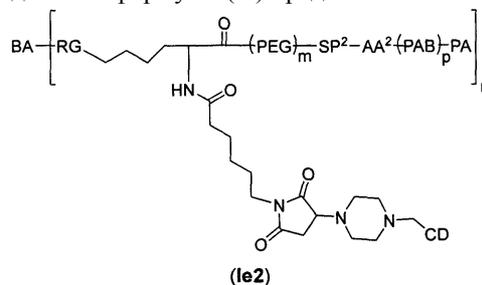
(Ie1)

В формуле (Ie1) BA представляет собой связующий агент; RG представляет собой реакционноспособный линкерный остаток; SP² независимо в каждом случае отсутствует или является остатком спейсерной группы; AA² представляет собой дипептидный остаток; ПЭГ представляет собой полиэтиленгли-

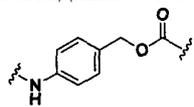


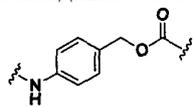
колевый остаток; РАВ представляет собой , где  обозначает атом, через который РАВ связан со смежными группами в формуле; CD представляет собой остаток циклодекстрина; индекс n является целым числом от 1 до 30, индекс m является целым числом от 0 до 5, индекс p равен 0 или 1, а РА является фрагментом полезной нагрузки. В этих примерах индекс m равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых примерах индекс m равен 0. В некоторых примерах индекс m равен 1. В некоторых примерах индекс m равен 2. В некоторых примерах индекс m равен 3. В некоторых примерах индекс m равен 4. В некоторых примерах индекс m равен 5. В некоторых примерах индекс p равен 0. В некоторых примерах индекс p равен 1. В некоторых примерах AA^2 представляет собой аминокислоту, выбранную из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, триптофана, фенилаланина, пролина, глицина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина или цитруллина, их производных или их комбинаций. В определенных вариантах осуществления AA^2 представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой аланин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой валин-глицин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой глицин-валин.

В некоторых примерах соединение формулы (Ie) представляет собой соединение формулы (Ie2):

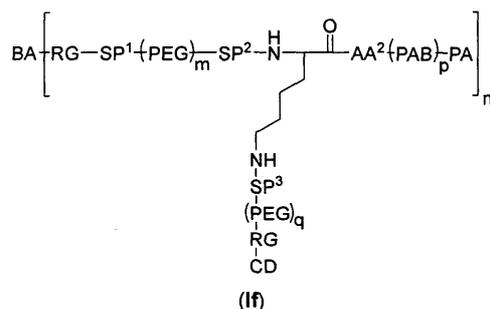


В формуле (Ie2) ВА представляет собой связующий агент; RG представляет собой реакционноспособный линкерный остаток; SP^2 независимо в каждом случае отсутствует или является остатком спейсерной группы; AA^2 представляет собой дипептидный остаток; ПЭГ представляет собой полиэтиленгли-

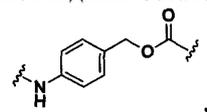


колевый остаток; РАВ представляет собой , где  обозначает атом, через который РАВ связан со смежными группами в формуле; CD представляет собой остаток циклодекстрина; индекс n является целым числом от 1 до 30, индекс m является целым числом от 0 до 5, индекс p равен 0 или 1, а РА является фрагментом полезной нагрузки. В этих примерах индекс m равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых примерах индекс m равен 0. В некоторых примерах индекс m равен 1. В некоторых примерах индекс m равен 2. В некоторых примерах индекс m равен 3. В некоторых примерах индекс m равен 4. В некоторых примерах индекс m равен 5. В некоторых примерах индекс p равен 0. В некоторых примерах индекс p равен 1. В некоторых примерах AA^2 представляет собой аминокислоту, выбранную из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, триптофана, фенилаланина, пролина, глицина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина или цитруллина, их производных или их комбинаций. В определенных вариантах осуществления AA^2 представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой аланин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой валин-глицин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой глицин-валин.

В некоторых примерах, изложенных в настоящем документе, представлено соединение по формуле (If):



В формуле (If) ВА является связующим агентом; RG независимо в каждом случае представляет собой реакционноспособный линкерный остаток; SP^1 , SP^2 и SP^3 , независимо в каждом случае, отсутствуют или являются остатком спейсерной группы; AA^2 представляет собой дипептидный остаток; ПЭГ пред-

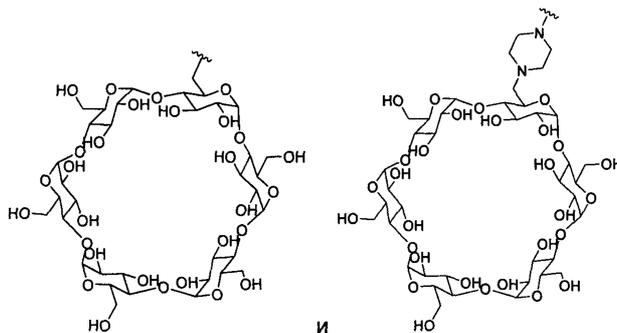
ставляет собой полиэтиленгликолевый остаток; PAB представляет собой , где  обозначает атом, через который PAB связан со смежными группами в формуле, CD представляет собой остаток циклодекстрина; индекс n представляет собой целое число от 1 до 30; индекс m представляет собой целое число от 0 до 5; индекс p равен 0 или 1, индекс q равен числу от 0 до 5 и PA представляет собой полезную нагрузку. В некоторых примерах формулы (If) SP^1 отсутствует, и SP^2 независимо в каждом случае выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкилена, $-\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_e$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_e-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_u-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_v-$ и их комбинации, где индекс e представляет собой целое число от 0 до 4, индекс u представляет собой целое число от 1 до 8, а индекс v представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых примерах AA^2 представляет собой аминокислоту, выбранную из аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, триптофана, фенилаланина, пролина, глицина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина или цитруллина, их производных или их комбинаций. В определенных вариантах осуществления AA^2 представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой аланин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой валин-глицин. В некоторых вариантах осуществления AA^2 представляет собой глицин-валин.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, соединение формулы (I) включает, по меньшей мере, одну группу CD. В конкретном примере соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (Ie), формулы (Ie1) или формулы (Ie2), как описано в настоящем документе, и содержит одну группу CD. В другом конкретном примере соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (If), как описано в настоящем документе, и содержит одну группу CD.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, CD независимо представляет собой циклодекстрин. В некоторых примерах CD представляет собой α -циклодекстрин. В некоторых примерах CD представляет собой β -циклодекстрин. В некоторых примерах CD представляет собой γ -циклодекстрин. В любом из этих примеров α -, β - или γ -циклодекстрин необязательно замещен.

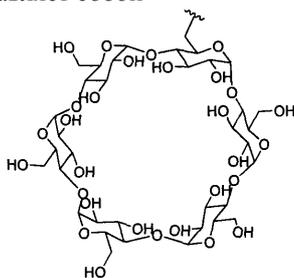
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, CD независимо в каждом случае выбран из группы, состоящей из α -циклодекстрина, β -циклодекстрина и γ -циклодекстрина. В некоторых примерах CD представляет собой α -циклодекстрин. В некоторых примерах CD представляет собой β -циклодекстрин. В некоторых примерах CD представляет собой γ -циклодекстрин.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, CD независимо в каждом случае выбирается из:

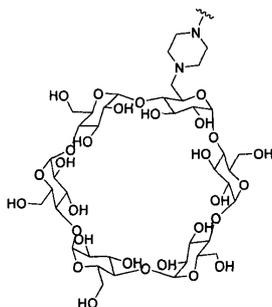


где  обозначает атом, через который CD связан с соседними группами в формуле.

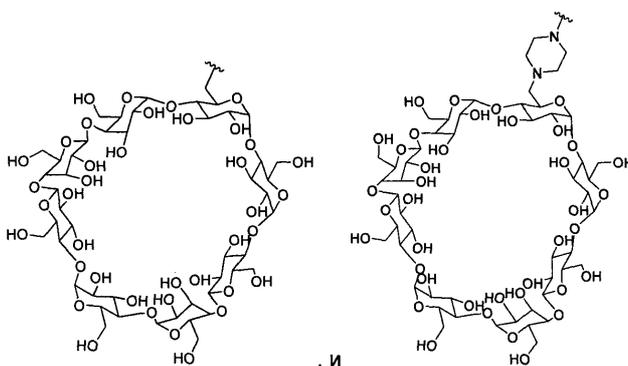
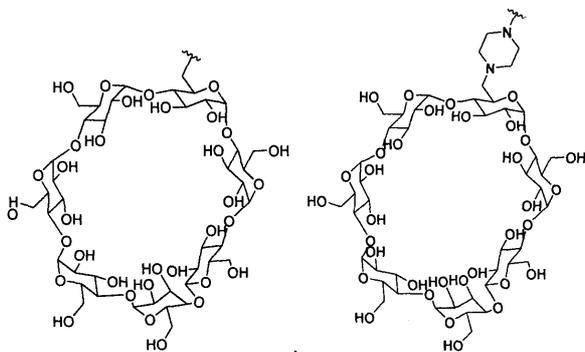
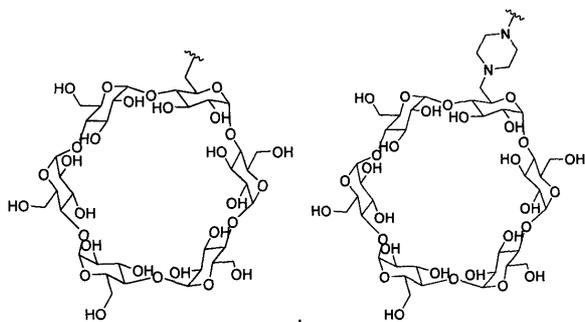
В некоторых примерах CD представляет собой



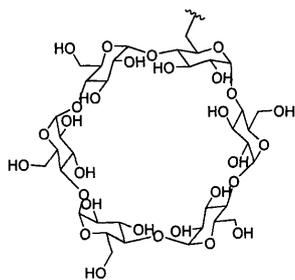
В некоторых примерах CD представляет собой



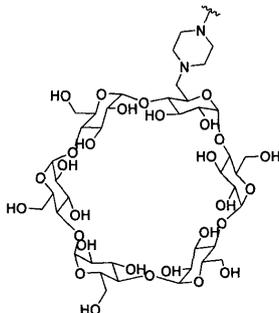
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, CD независимо в каждом случае выбирается из:



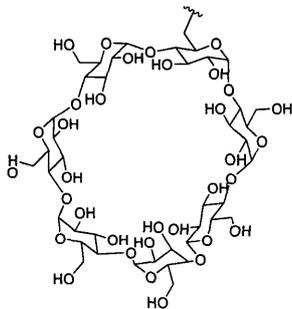
В некоторых примерах CD представляет собой



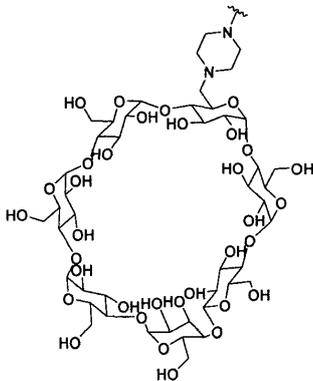
В некоторых примерах CD представляет собой



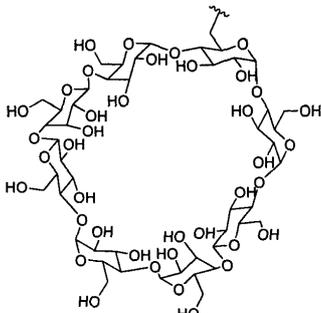
В некоторых примерах CD представляет собой



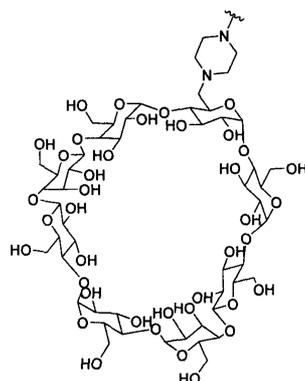
В некоторых примерах CD представляет собой



В некоторых примерах CD представляет собой

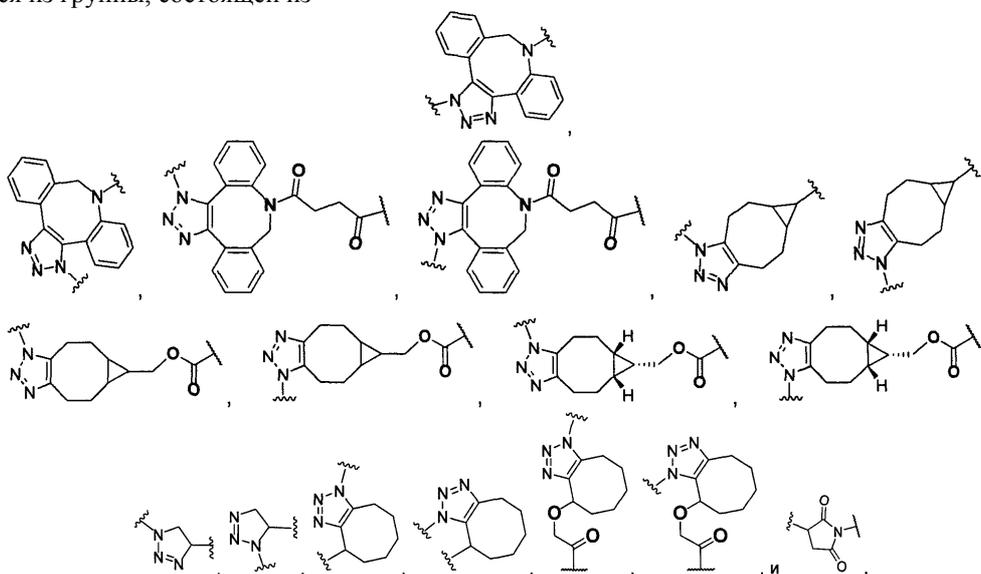


В некоторых примерах CD представляет собой

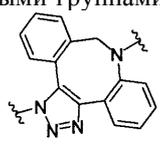


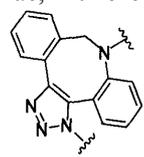
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, RG, независимо в каждом случае, является клик-химическим остатком. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, RG, независимо в каждом случае, включает триазол или конденсированный триазол.

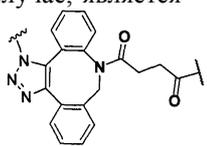
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, RG независимо в каждом случае выбирается из группы, состоящей из

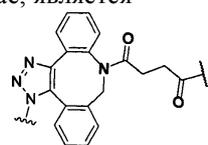


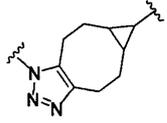
где  обозначает атом, через который RG связан со смежными группами в формуле. В некото-

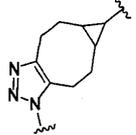
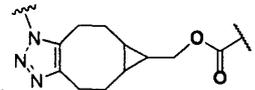
рых из этих примеров RG, независимо в каждом случае, является . В некоторых из этих

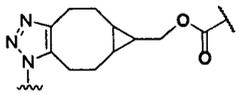
примеров RG, независимо в каждом случае, является . В некоторых из этих примеров RG,

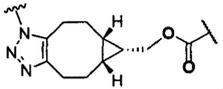
независимо в каждом случае, является . В некоторых из этих примеров RG, независимо

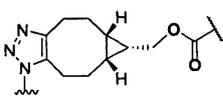
в каждом случае, является . В некоторых из этих примеров RG, независимо в каждом

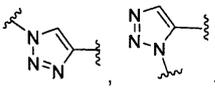
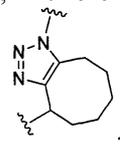
случае, является  . В некоторых из этих примеров RG, независимо в каждом случае, является

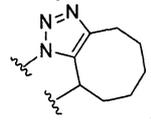
ся   . В некоторых из этих примеров RG, независимо в каждом случае,

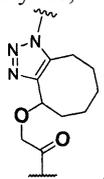
является  . В некоторых из этих примеров RG, независимо в каждом случае, является

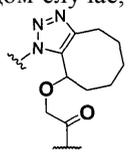
 . В некоторых из этих примеров RG, независимо в каждом случае, является

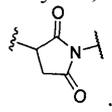
 . В некоторых из этих примеров, RG, независимо в каждом случае, является

 ,  . В некоторых из этих примеров RG, независимо в каждом случае, является  .

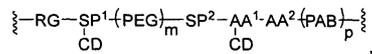
В некоторых из этих примеров RG, независимо в каждом случае, является  . В некоторых из

этих примеров RG, независимо в каждом случае, является  . В некоторых из этих примеров RG,

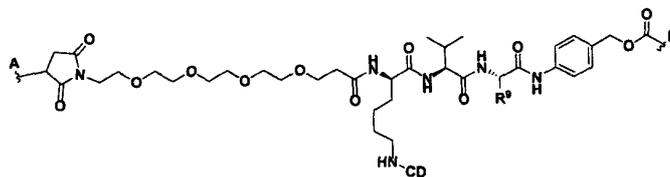
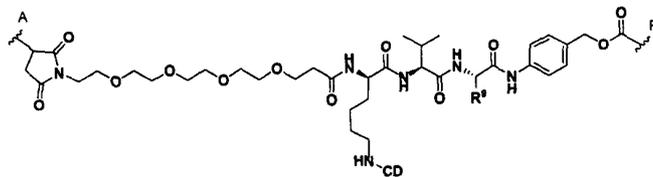
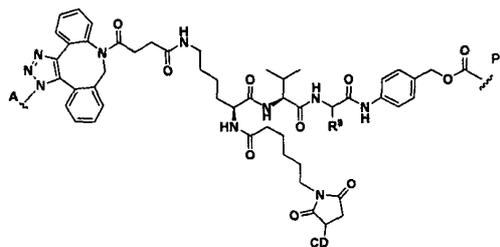
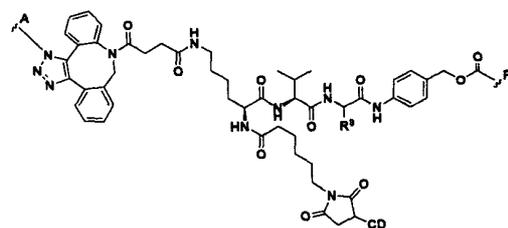
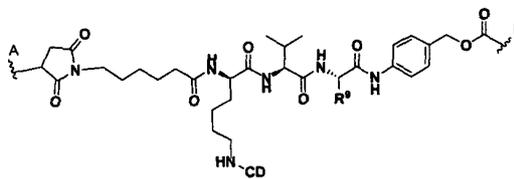
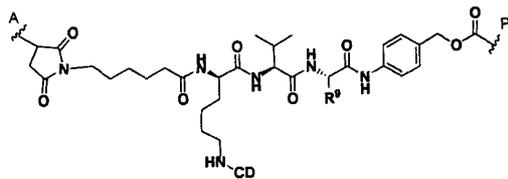
независимо в каждом случае, является  . В некоторых из этих примеров RG, независимо в каж-

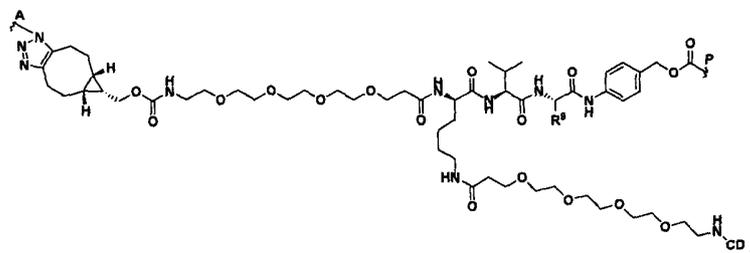
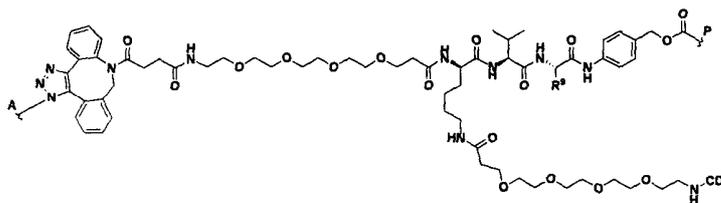
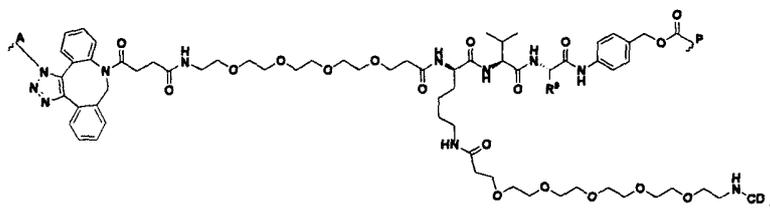
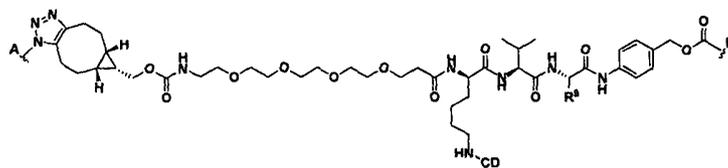
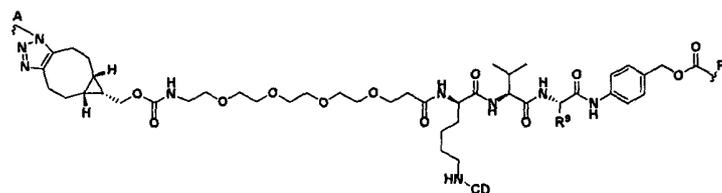
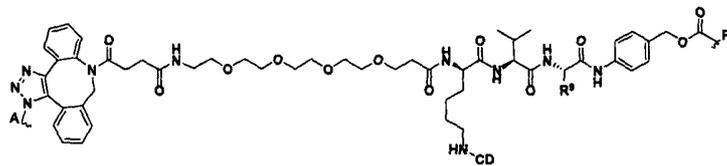
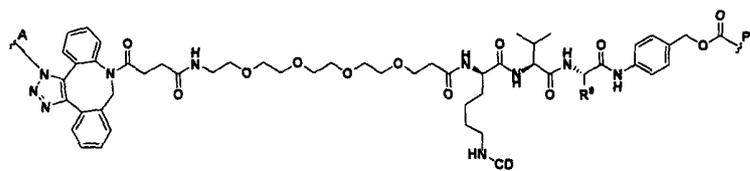
дом случае, является  .

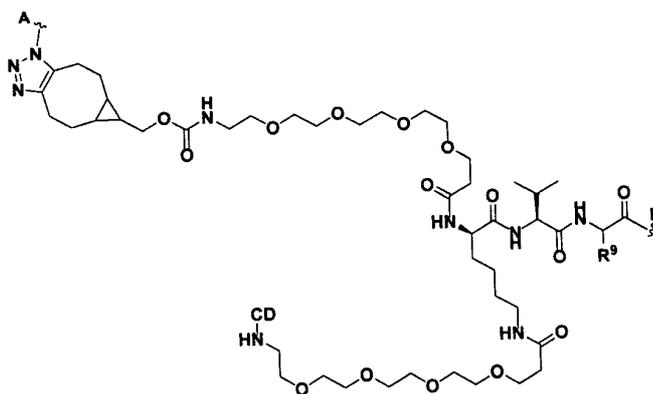
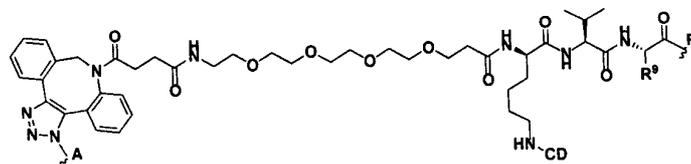
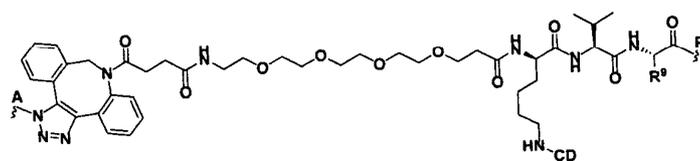
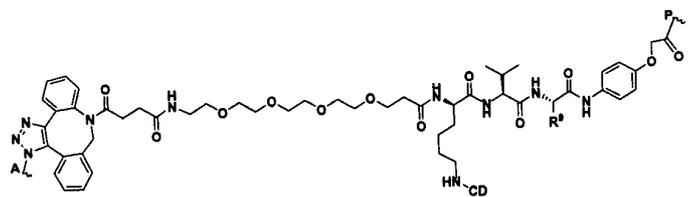
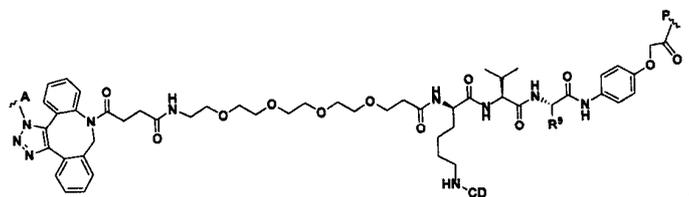
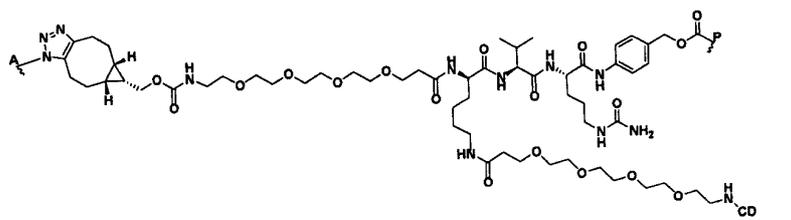
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, соединение формулы (I) включает группу



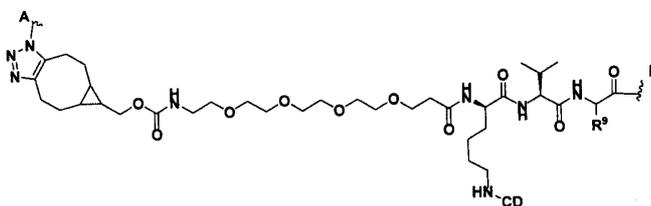
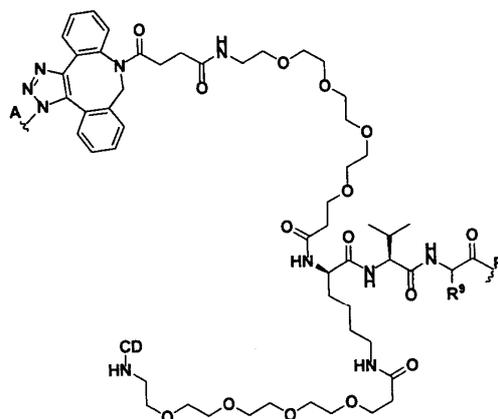
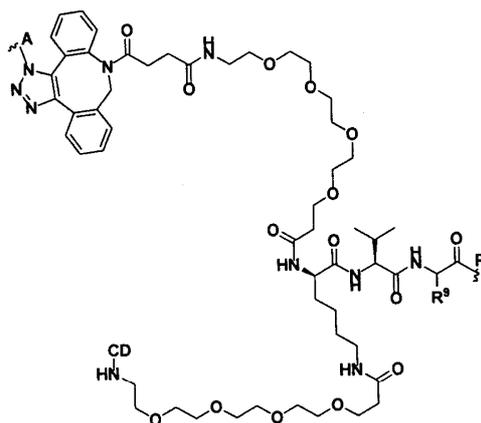
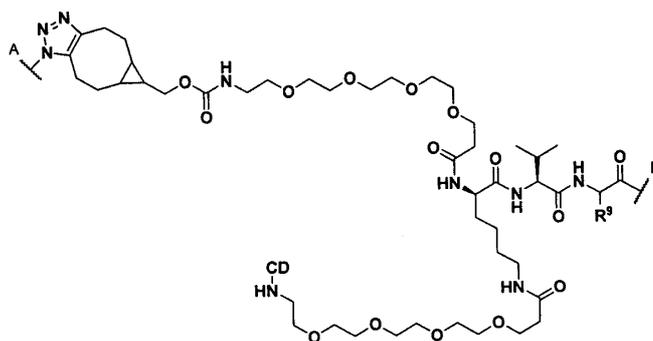
которая выбрана из группы, состоящей из

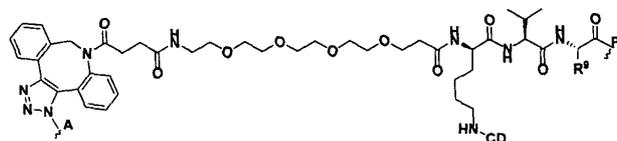
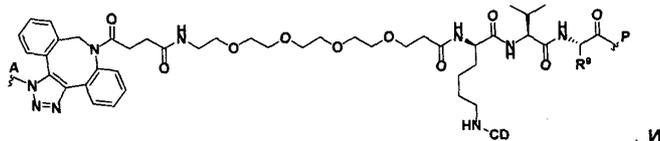
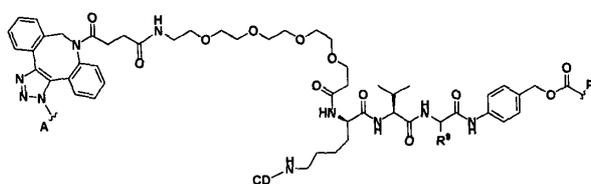
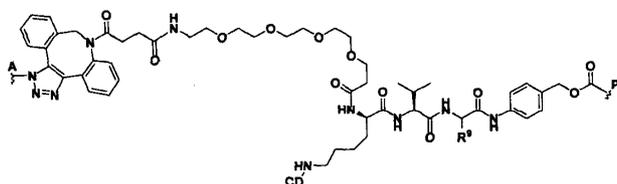
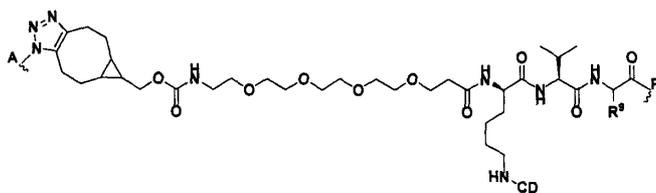






046545





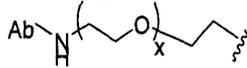
Где  обозначает связь со связывающим агентом, таким как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и где R⁹ представляет собой -CH₃ или -(CH₂)₃N(H)C(O)NH₂.

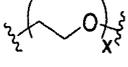
 обозначает связь с циклодекстрином.

 указывает на связь с полезной нагрузкой. В некоторых примерах R⁹ представляет собой -CH₃. В некоторых примерах R⁹ представляет собой -(CH₂)₃N(H)C(O)NH₂. В этих примерах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть прямо или косвенно связаны с группой, с которой связан .

В некоторых примерах, когда антитело или его антигенсвязывающий фрагмент косвенно связаны с группой, с которой связан .

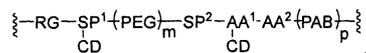
В некоторых примерах, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент косвенно связан с

группой, с которой  он связан, тогда  представляет собой , где индекс x представляет собой целое число от 1 до 4. В некоторых примерах индекс x равен 1. В некоторых примерах индекс x равен 2. В некоторых примерах индекс x равен 3. В некоторых примерах индекс x равен 4. Здесь Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых примерах

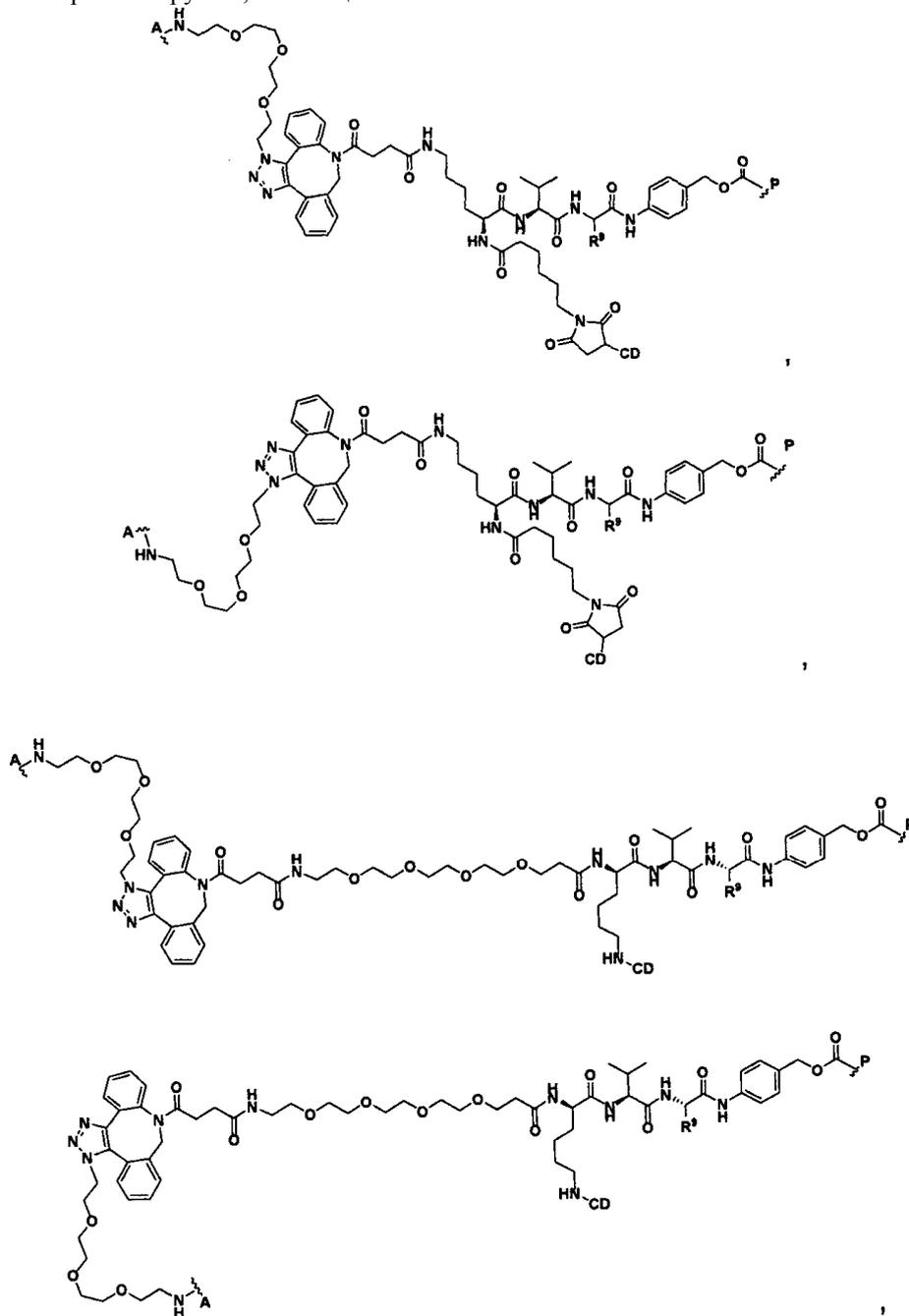
проиллюстрированная группа ПЭГ, т.е.  связана с глутамином на Ab. В некоторых примерах, изображенных в этом параграфе и описанных или изображенных в других вариантах осуществления в настоящем документе, боковая цепь лизина в линкере происходит от L-лизина или D-лизина. В некоторых примерах, изображенных в этом параграфе, и описанных или изображенных в других вариантах осуществления в данном документе, стереохимия боковой цепи лизина в линкере представляет собой (R). В некоторых примерах, изображенных в этом параграфе, и описанных или изображенных в других

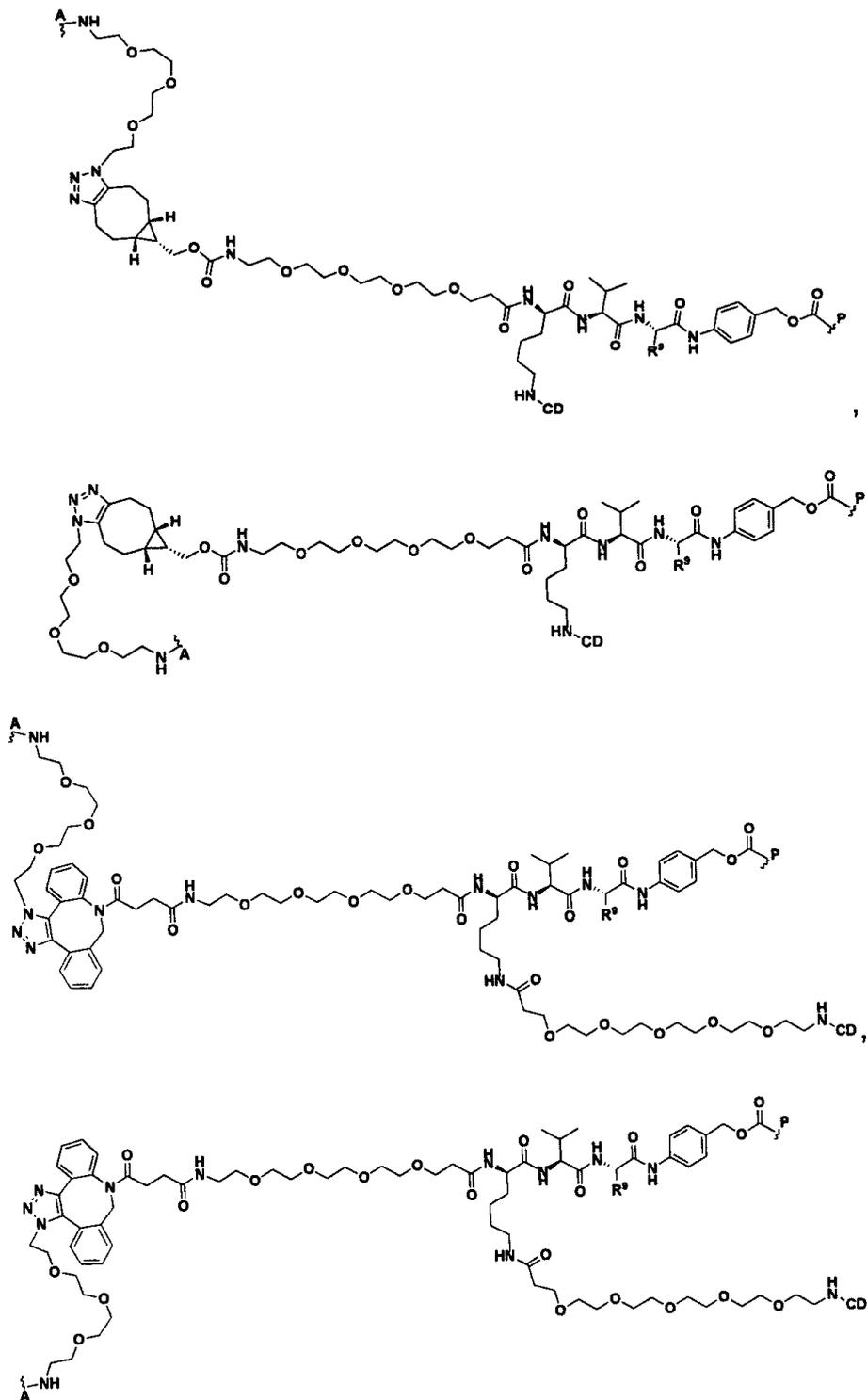
вариантах осуществления в данном документе, стереохимия боковой цепи лизина в линкере представляет собой (S).

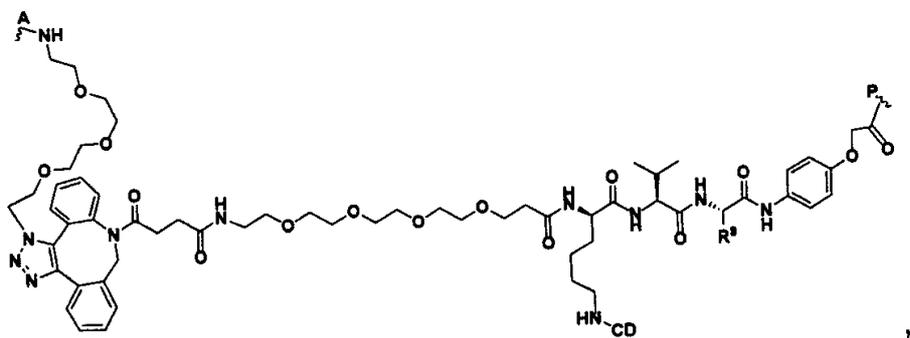
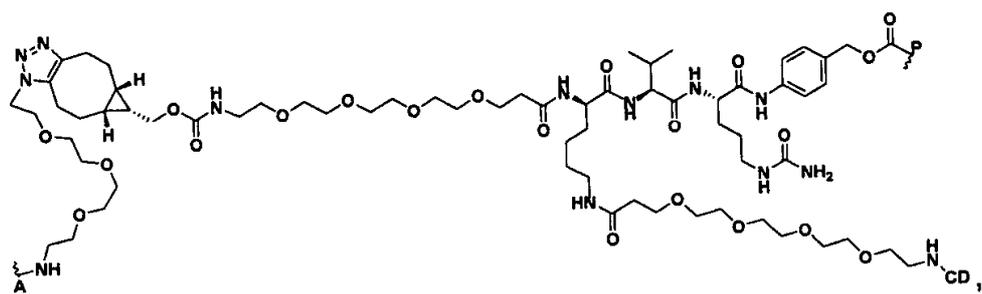
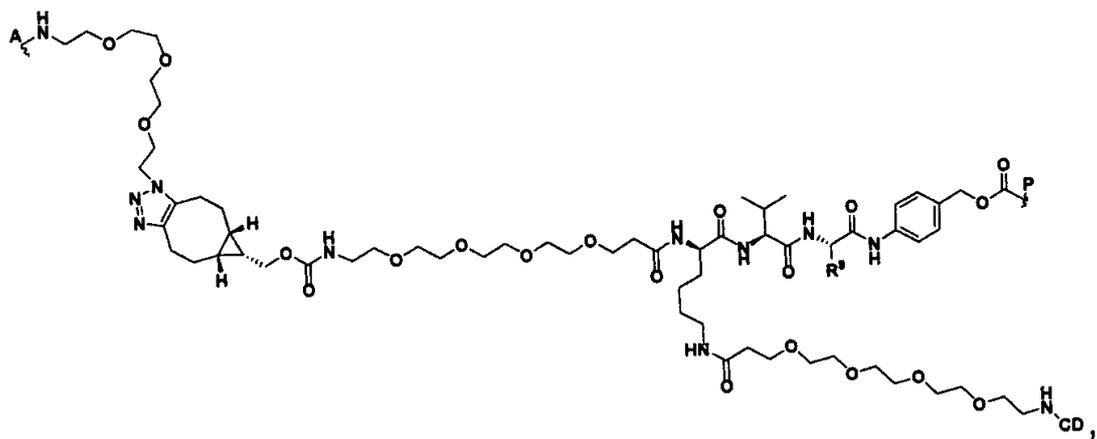
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, соединение формулы (I) включает группу

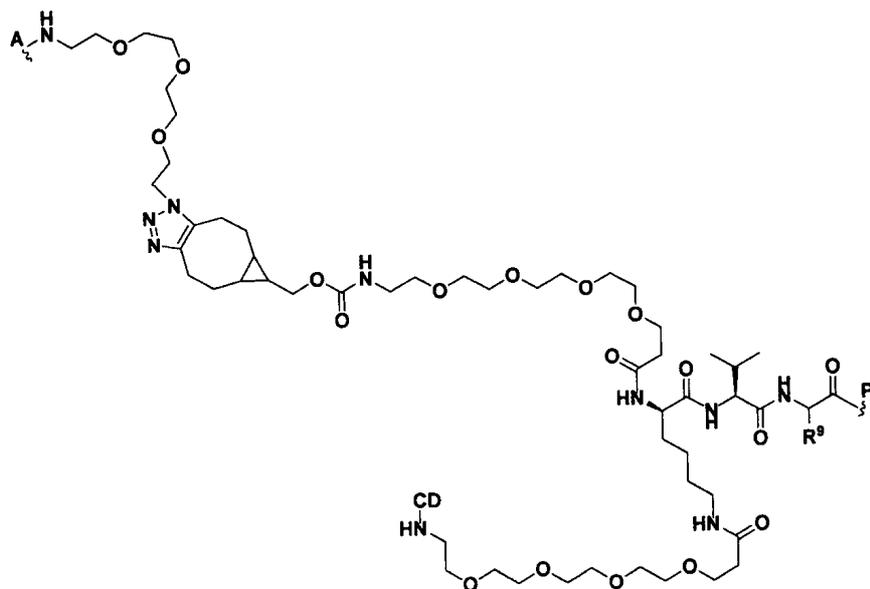
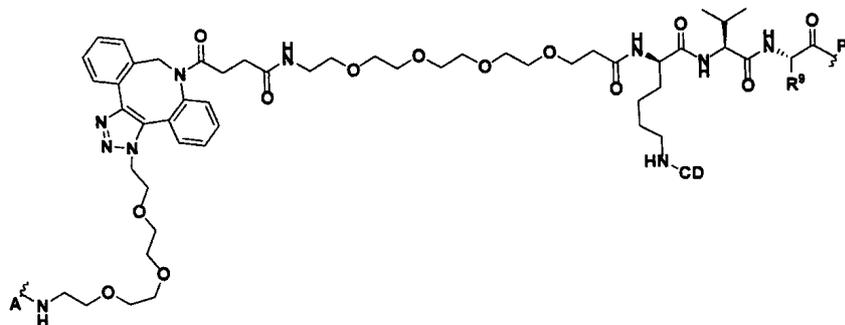
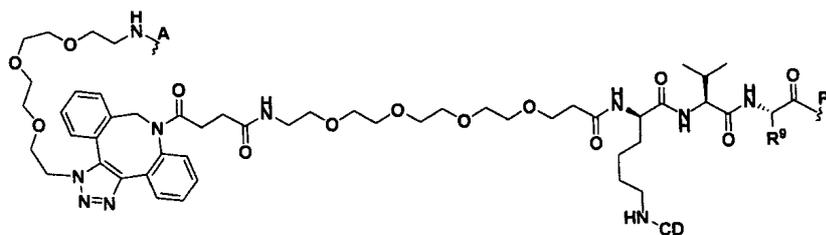
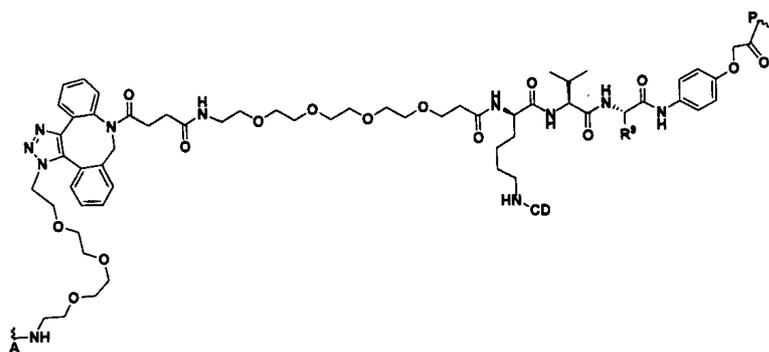


которая выбрана из группы, состоящей из

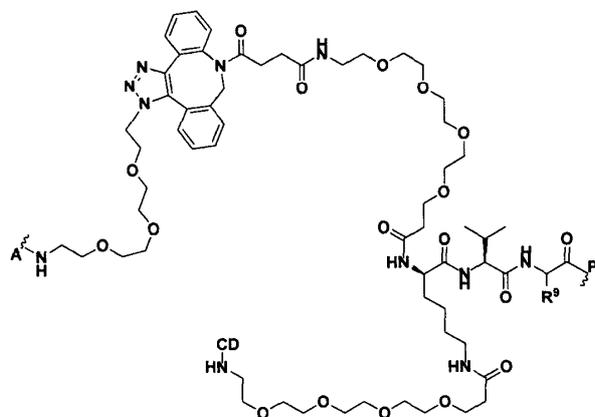
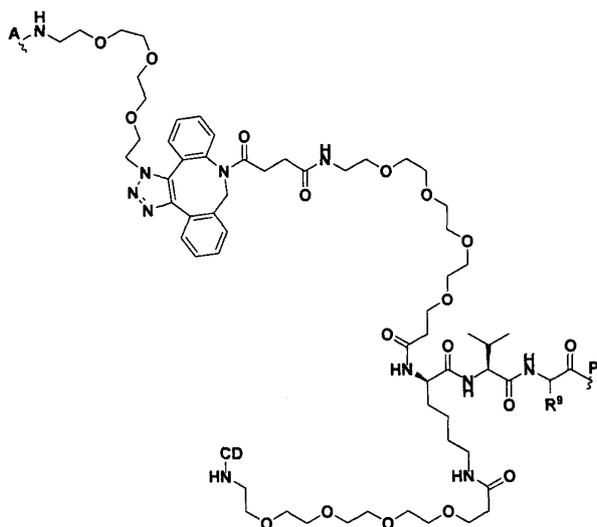
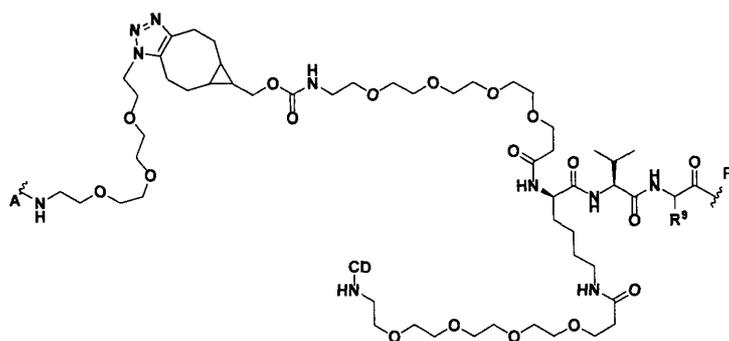


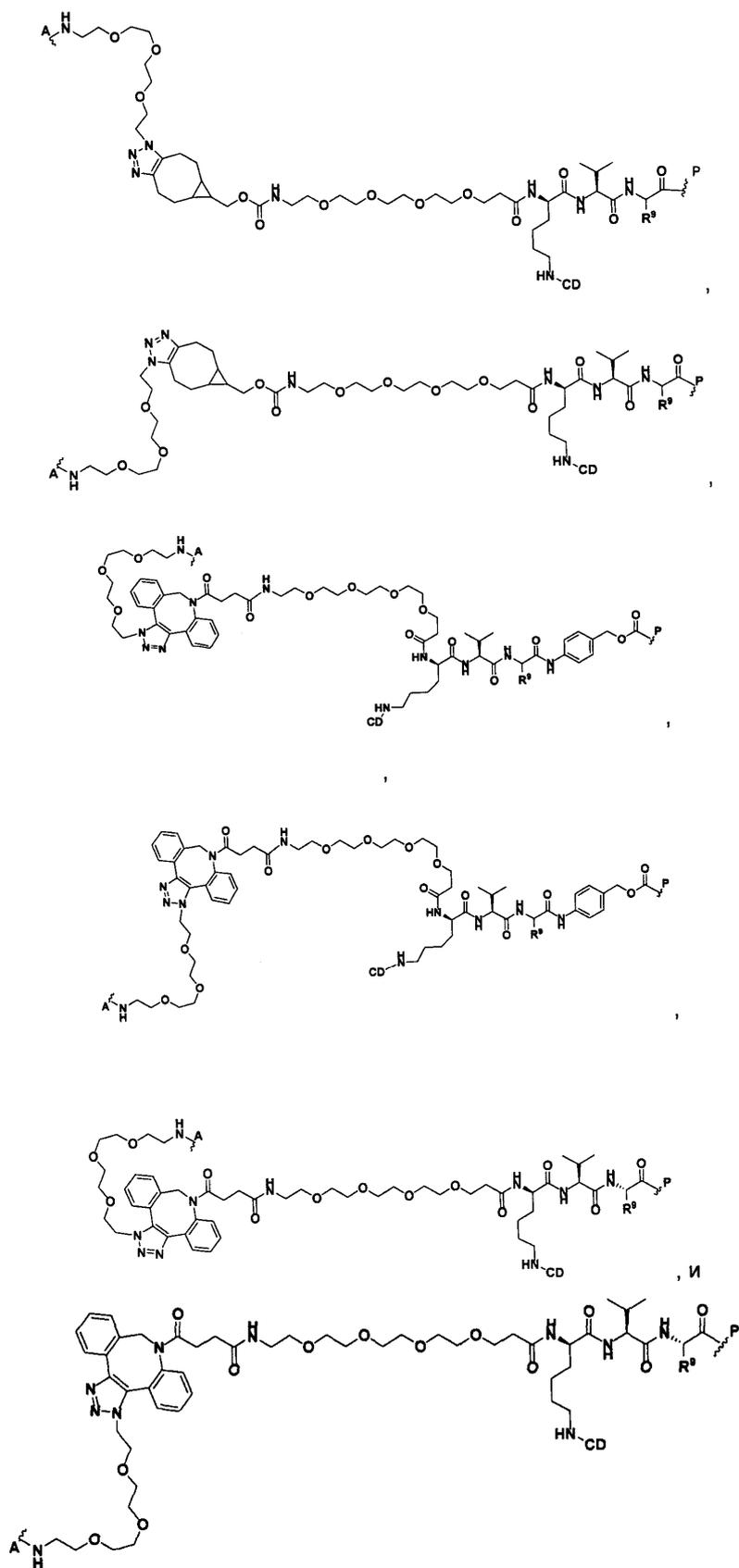






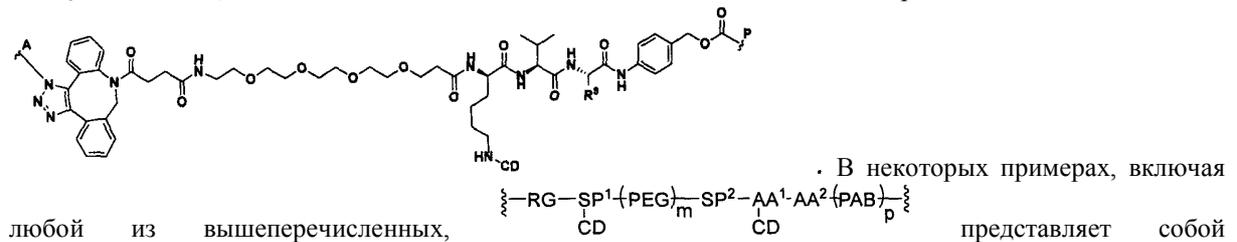
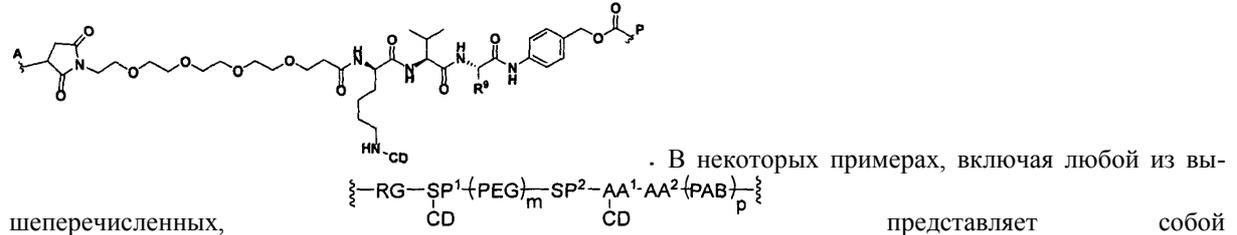
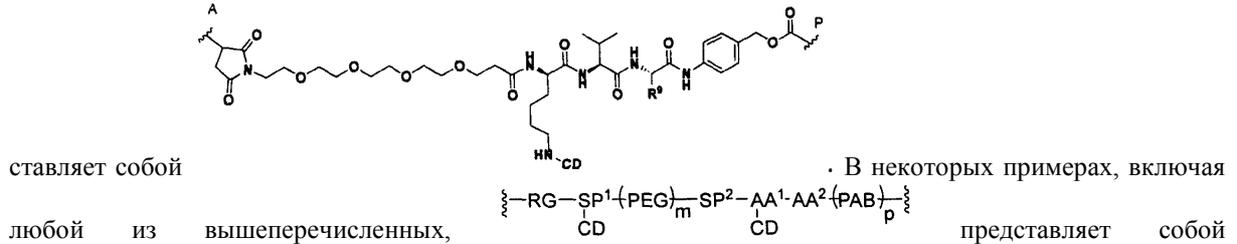
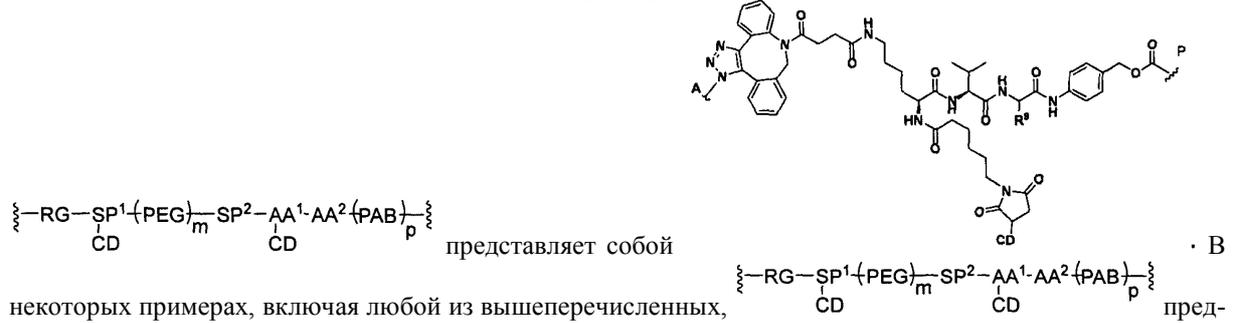
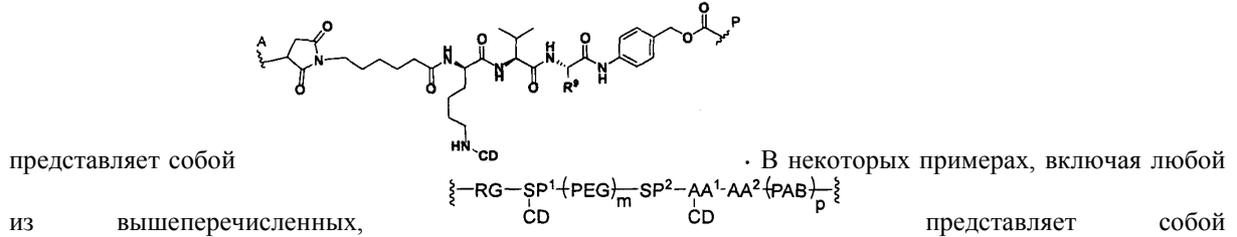
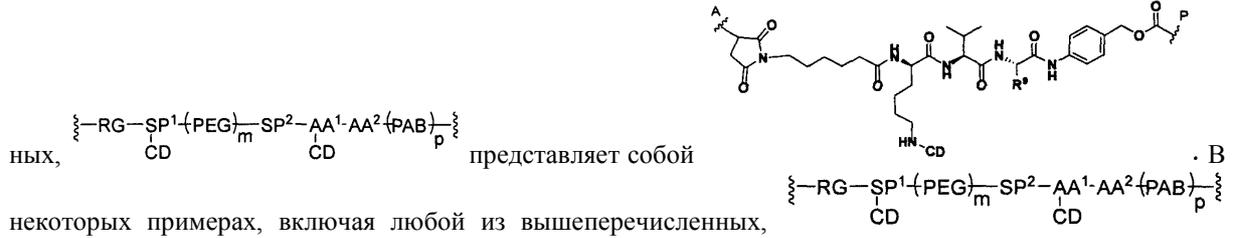
046545

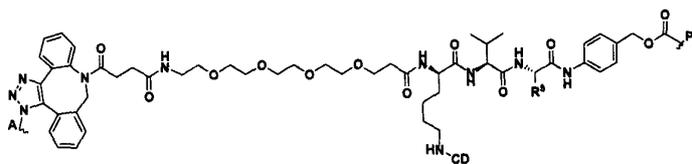




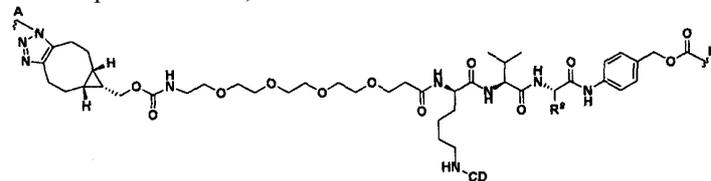
В эти примеры также включены его фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, их региоизомер или смесь их региоизомеров, где каждый $\frac{A}{\sim}$ представляет собой связь со связывающим агентом; каждый $\frac{P}{\sim}$ является связью с полезной нагрузкой; и R⁹ представляет собой -CH₃ или -(CH₂)₃N(H)C(O)NH₂. В некоторых примерах R⁹ представляет собой -CH₃. В некоторых примерах R⁹

представляет собой $-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечислен-

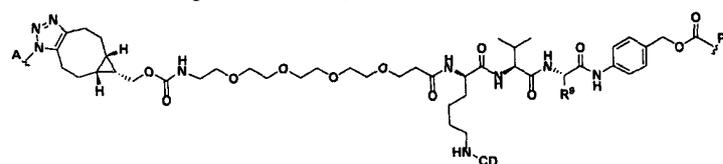




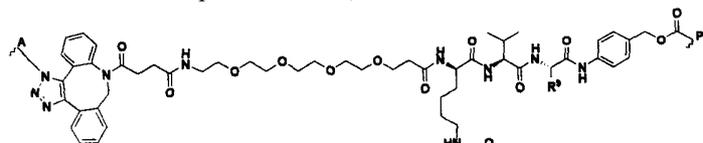
· В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $\left\{ \text{RG-SP}^1\text{(PEG)}_m\text{-SP}^2\text{-AA}^1\text{-AA}^2\text{(PAB)}_p \right\}$ представляет собой



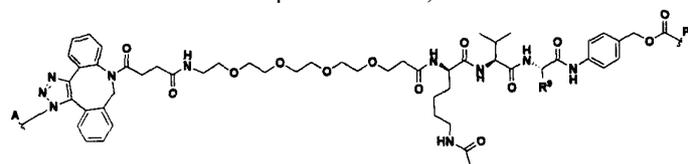
· В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $\left\{ \text{RG-SP}^1\text{(PEG)}_m\text{-SP}^2\text{-AA}^1\text{-AA}^2\text{(PAB)}_p \right\}$ представляет собой



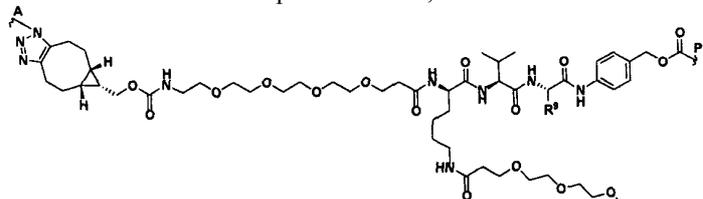
· В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $\left\{ \text{RG-SP}^1\text{(PEG)}_m\text{-SP}^2\text{-AA}^1\text{-AA}^2\text{(PAB)}_p \right\}$ представляет собой



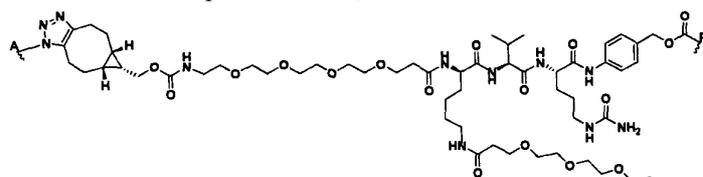
· В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $\left\{ \text{RG-SP}^1\text{(PEG)}_m\text{-SP}^2\text{-AA}^1\text{-AA}^2\text{(PAB)}_p \right\}$ представляет собой



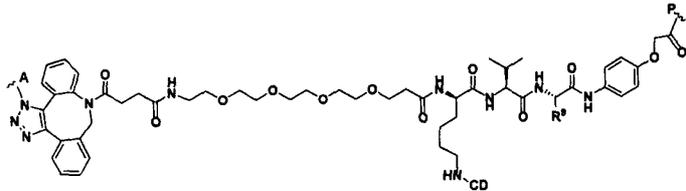
· В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $\left\{ \text{RG-SP}^1\text{(PEG)}_m\text{-SP}^2\text{-AA}^1\text{-AA}^2\text{(PAB)}_p \right\}$ представляет собой



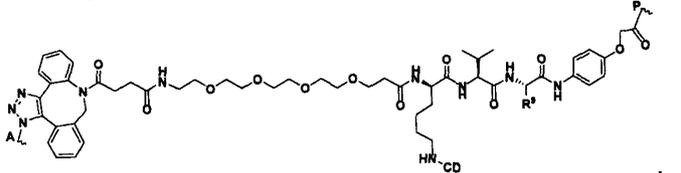
· В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $\left\{ \text{RG-SP}^1\text{(PEG)}_m\text{-SP}^2\text{-AA}^1\text{-AA}^2\text{(PAB)}_p \right\}$ представляет собой



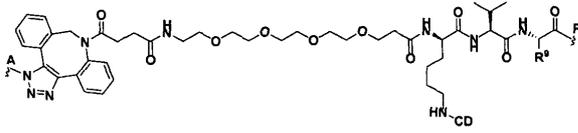
· В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $\left\{ \text{RG-SP}^1\text{(PEG)}_m\text{-SP}^2\text{-AA}^1\text{-AA}^2\text{(PAB)}_p \right\}$ представляет собой



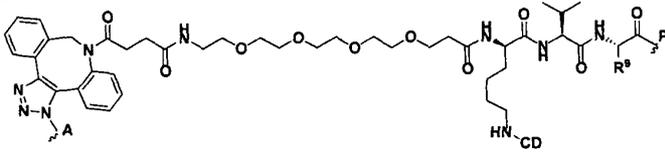
· В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $\left\{ \text{RG-SP}^1(\text{PEG})_m\text{-SP}^2\text{-AA}^1\text{-AA}^2(\text{PAB})_p \right\}$ представляет собой



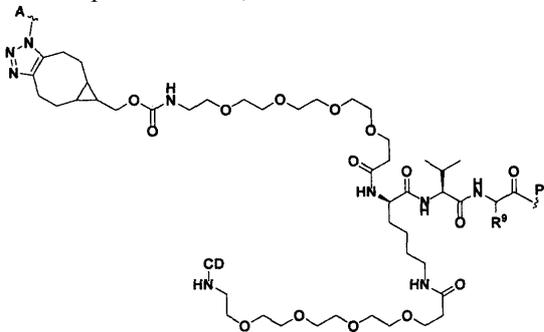
· В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $\left\{ \text{RG-SP}^1(\text{PEG})_m\text{-SP}^2\text{-AA}^1\text{-AA}^2(\text{PAB})_p \right\}$ представляет собой



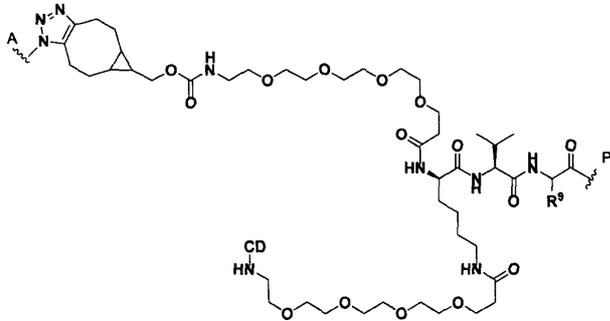
· В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $\left\{ \text{RG-SP}^1(\text{PEG})_m\text{-SP}^2\text{-AA}^1\text{-AA}^2(\text{PAB})_p \right\}$ представляет собой



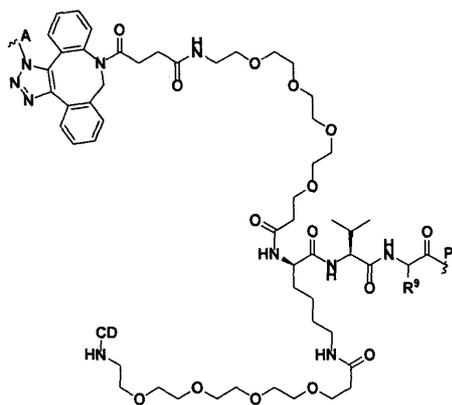
· В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $\left\{ \text{RG-SP}^1(\text{PEG})_m\text{-SP}^2\text{-AA}^1\text{-AA}^2(\text{PAB})_p \right\}$ представляет собой



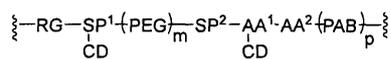
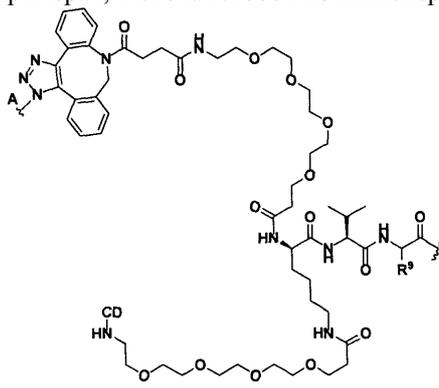
· В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $\left\{ \text{RG-SP}^1(\text{PEG})_m\text{-SP}^2\text{-AA}^1\text{-AA}^2(\text{PAB})_p \right\}$ представляет собой



· В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $\left\{ \text{RG-SP}^1(\text{PEG})_m\text{-SP}^2\text{-AA}^1\text{-AA}^2(\text{PAB})_p \right\}$ представляет собой

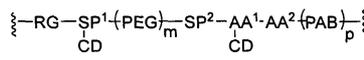


. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных,

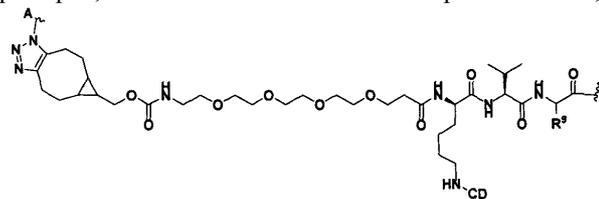


представляет собой

рых примерах, включая любой из вышеперечисленных,

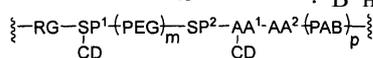


. В некото-
представляет



собой

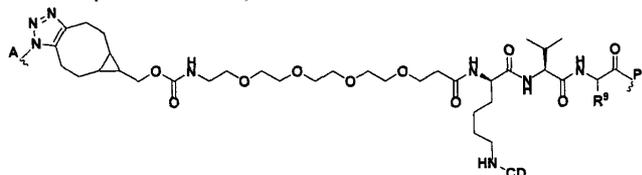
вышеперечисленных,



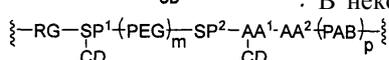
. В некоторых примерах, включая любой из

представляет

собой



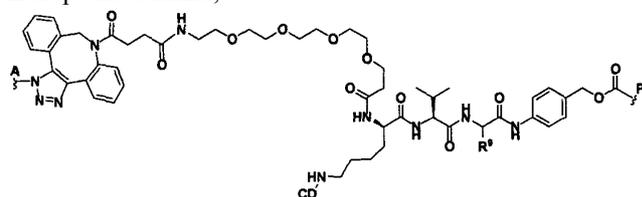
шеперечисленных,



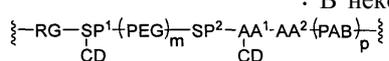
. В некоторых примерах, включая любой из вы-

представляет

собой



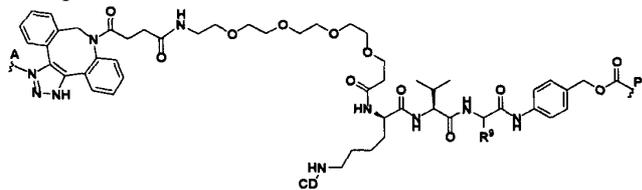
шеперечисленных,



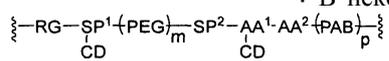
. В некоторых примерах, включая любой из вы-

представляет

собой



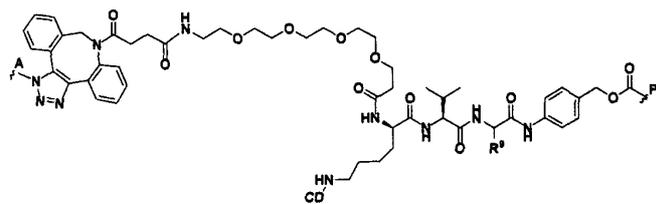
шеперечисленных,



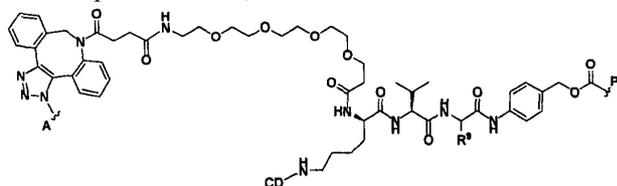
. В некоторых примерах, включая любой из вы-

представляет

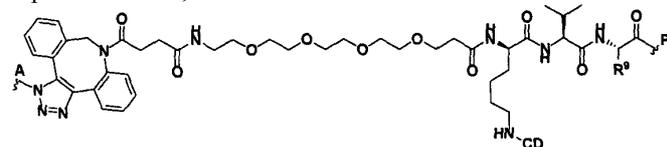
собой



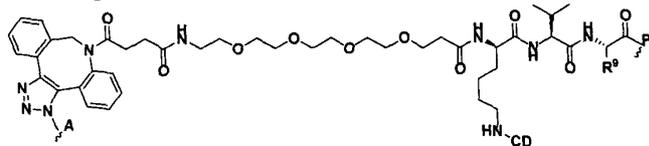
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $\left\{ \text{RG-SP}^1 \text{-(PEG)}_m \text{-SP}^2 \text{-AA}^1 \text{-AA}^2 \text{(PAB)}_p \right\}$ представляет собой



В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $\left\{ \text{RG-SP}^1 \text{-(PEG)}_m \text{-SP}^2 \text{-AA}^1 \text{-AA}^2 \text{(PAB)}_p \right\}$ представляет собой



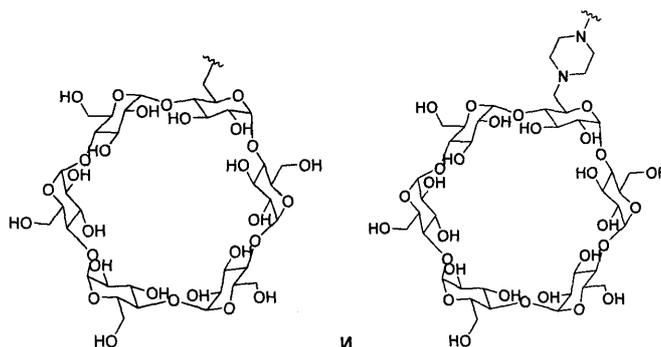
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $\left\{ \text{RG-SP}^1 \text{-(PEG)}_m \text{-SP}^2 \text{-AA}^1 \text{-AA}^2 \text{(PAB)}_p \right\}$ представляет собой



В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, CD независимо представляет собой циклодекстрин. В некоторых примерах CD представляет собой α -циклодекстрин. В некоторых примерах CD представляет собой β -циклодекстрин. В некоторых примерах CD представляет собой γ -циклодекстрин. В любом из этих примеров α -, β - или γ -циклодекстрин необязательно замещен.

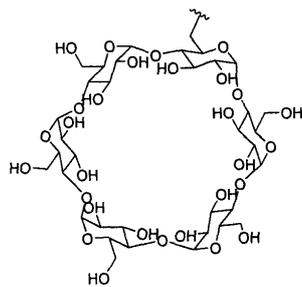
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, CD независимо в каждом случае выбран из группы, состоящей из α -циклодекстрина, β -циклодекстрина и γ -циклодекстрина. В некоторых примерах CD представляет собой α -циклодекстрин. В некоторых примерах CD представляет собой β -циклодекстрин. В некоторых примерах CD представляет собой γ -циклодекстрин.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, CD независимо в каждом случае выбирается из:

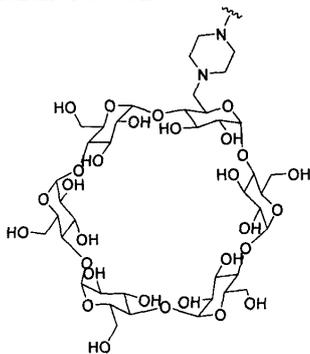


где  обозначает атом, через который CD связан с соседними группами в формуле. В некоторых примерах CD представляет собой

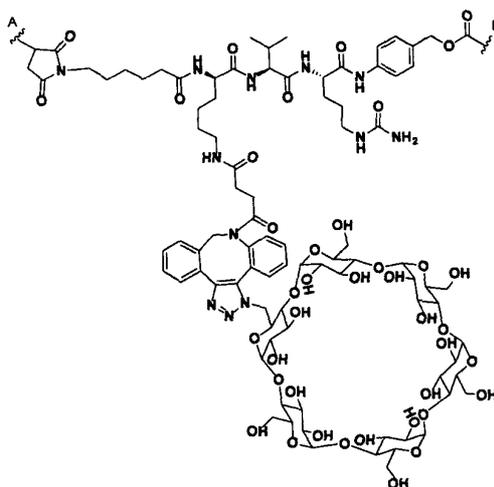
046545



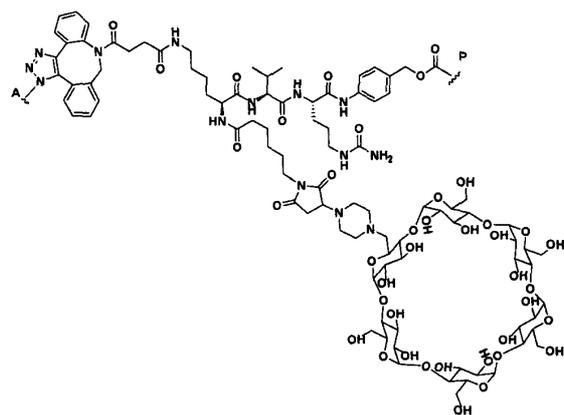
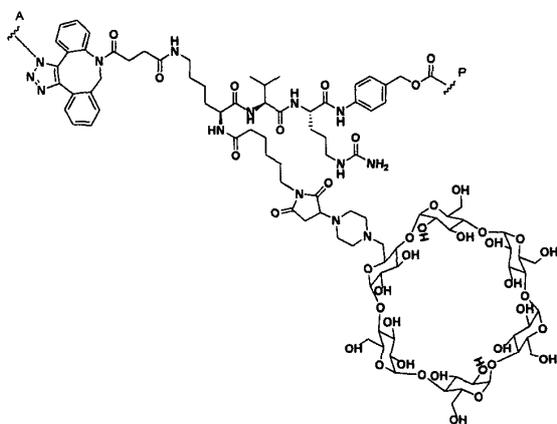
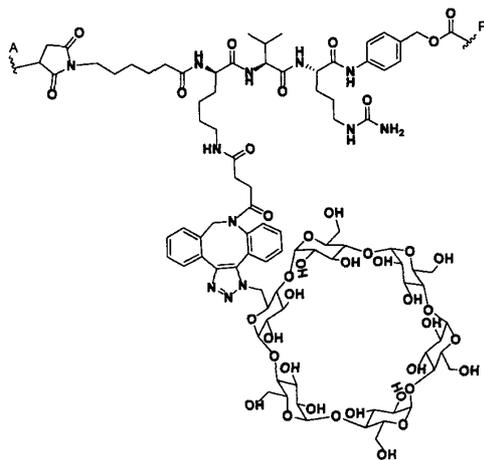
В некоторых примерах CD представляет собой



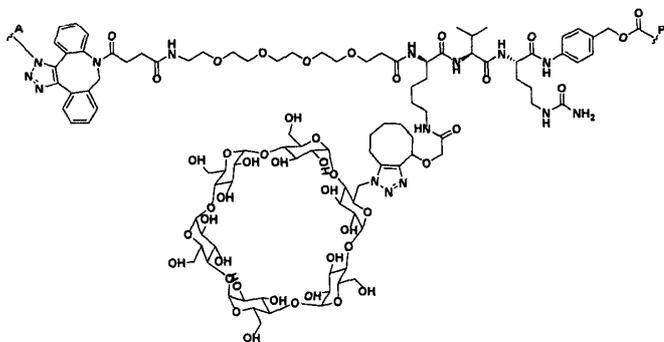
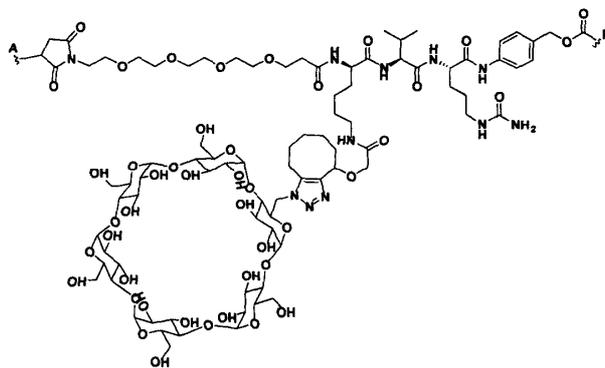
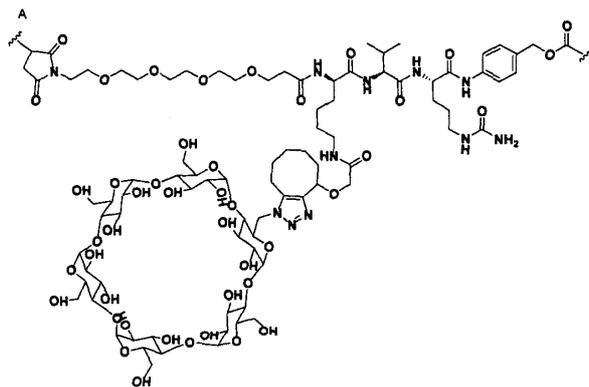
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, соединение формулы (I) включает группу, выбранную из



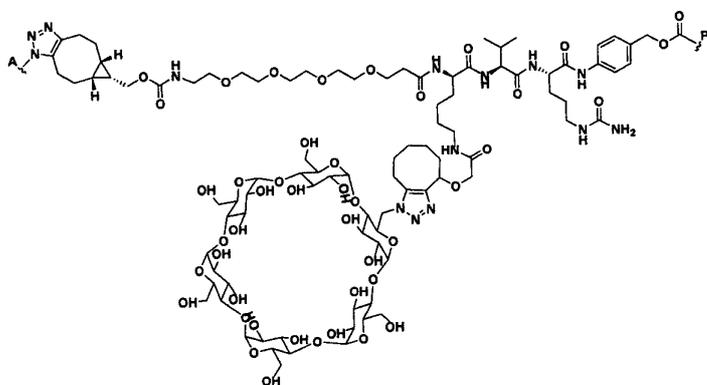
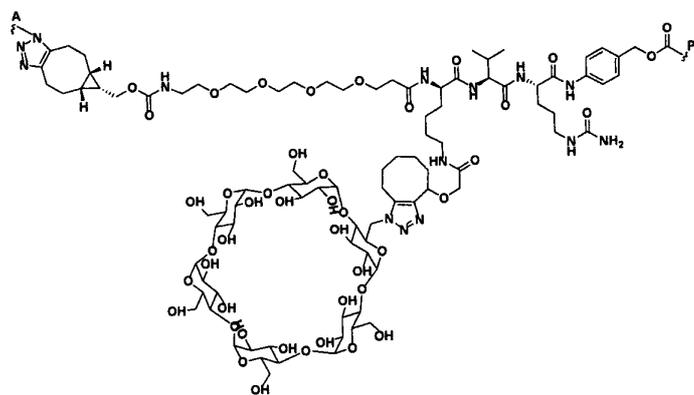
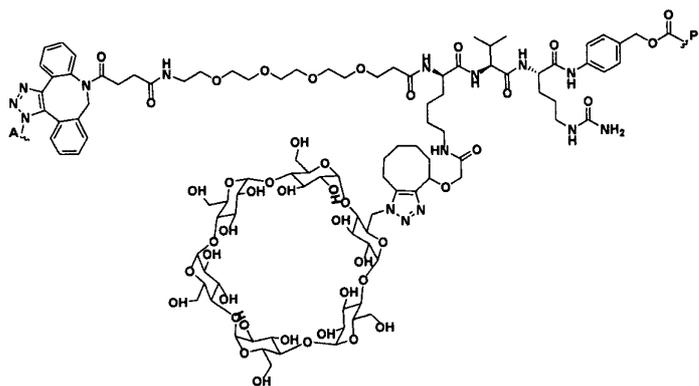
046545

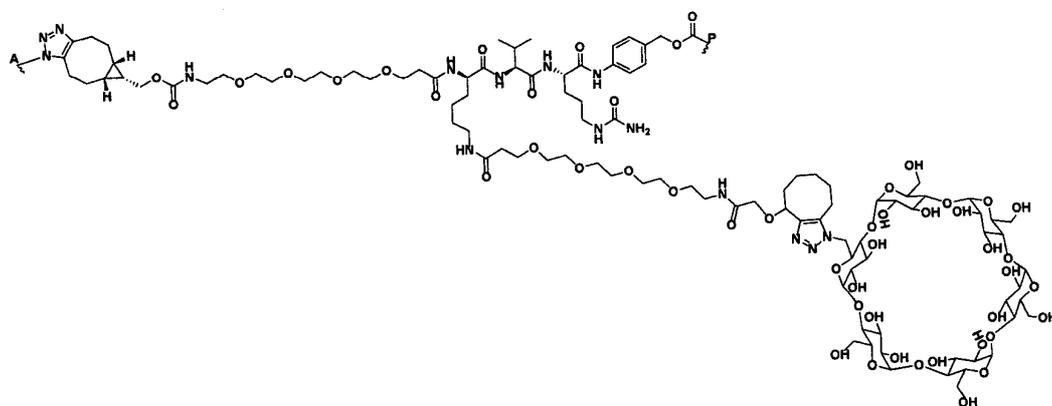
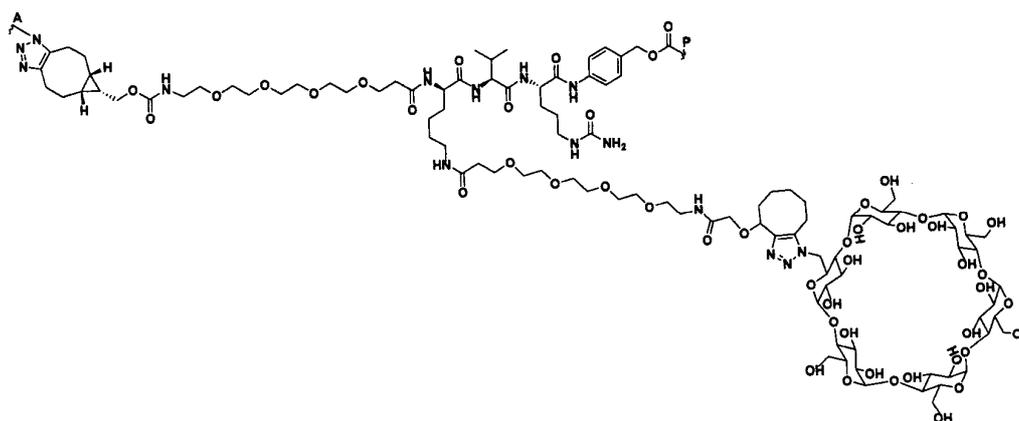
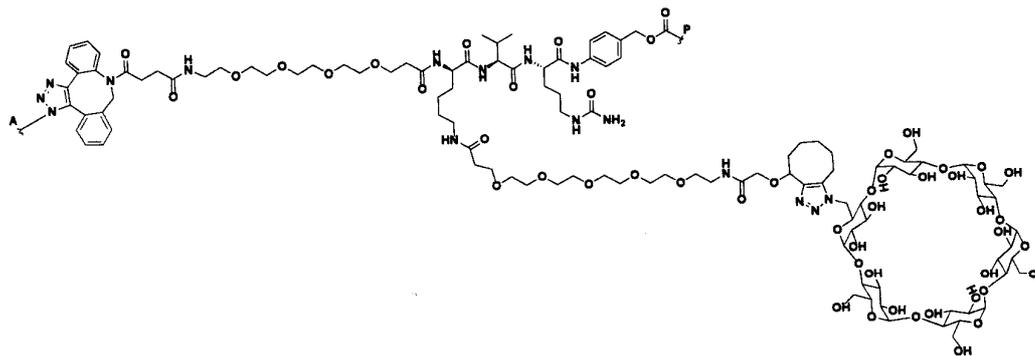
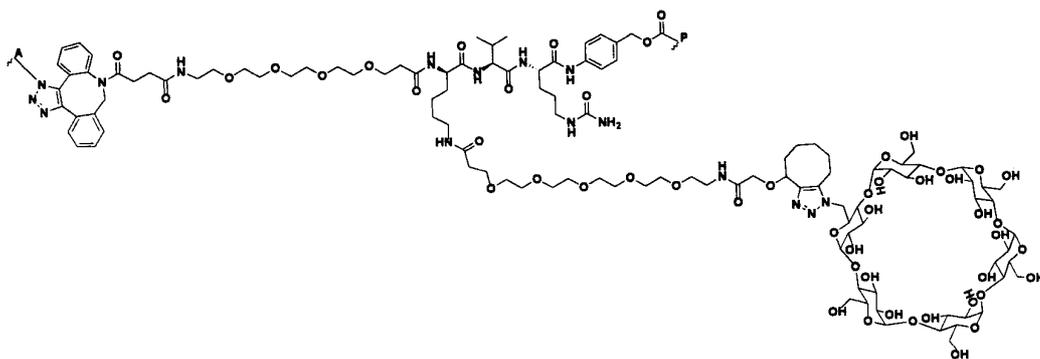


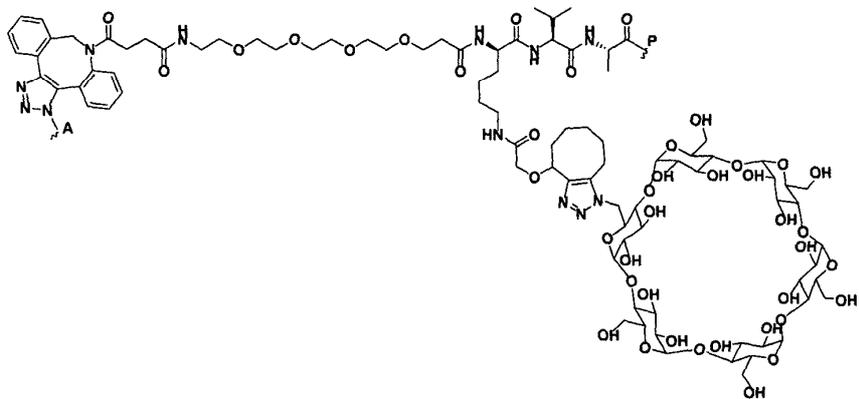
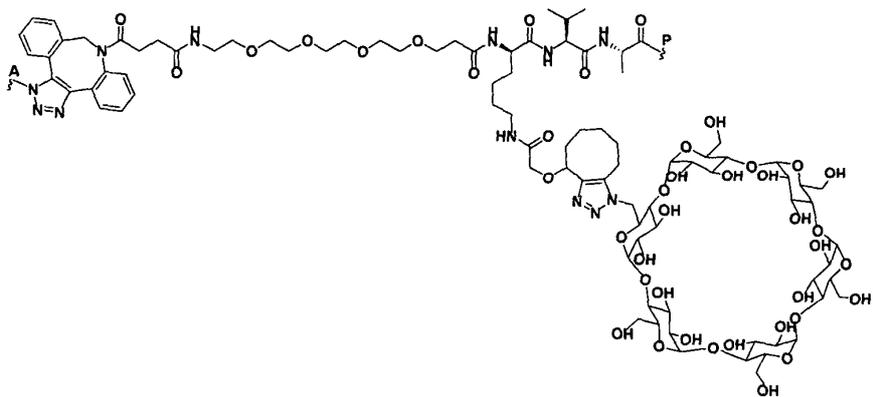
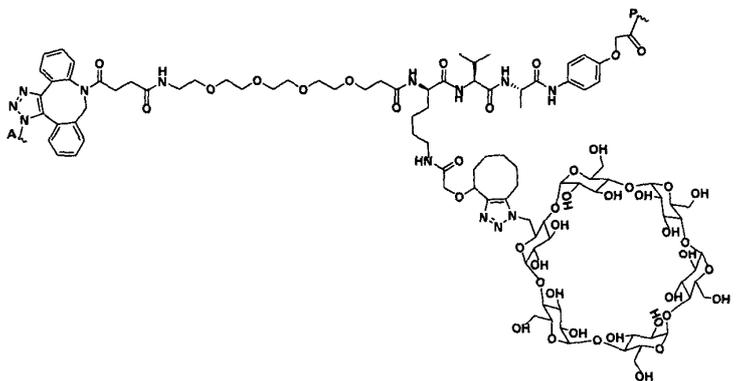
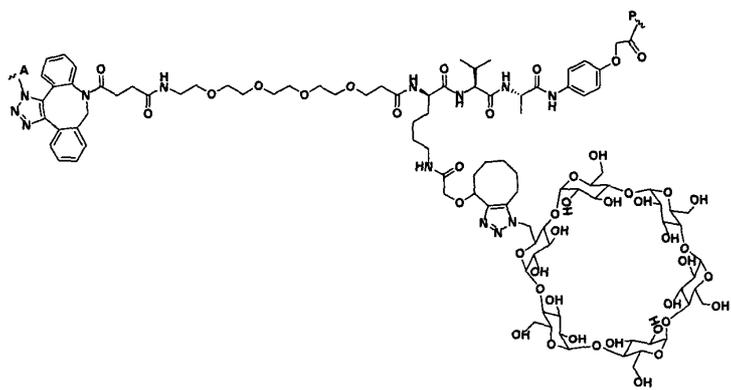
046545

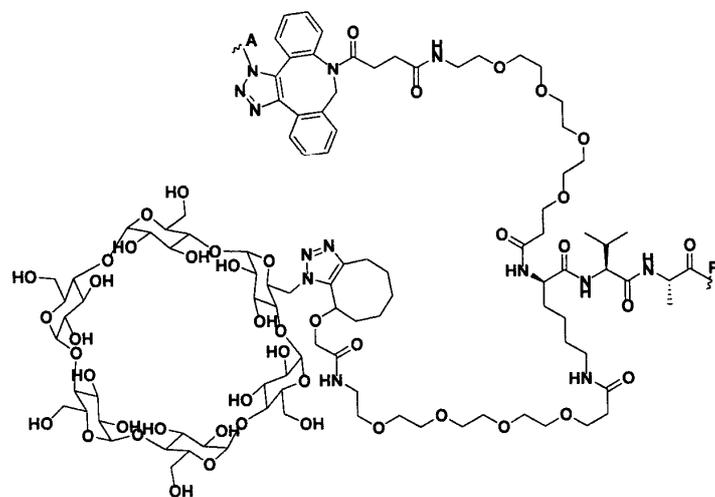
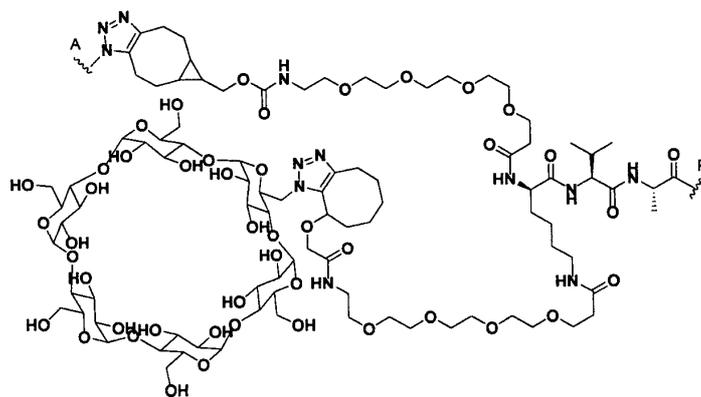
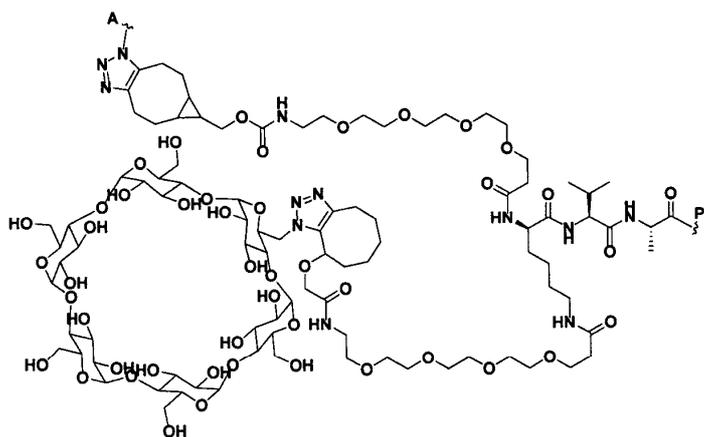


046545

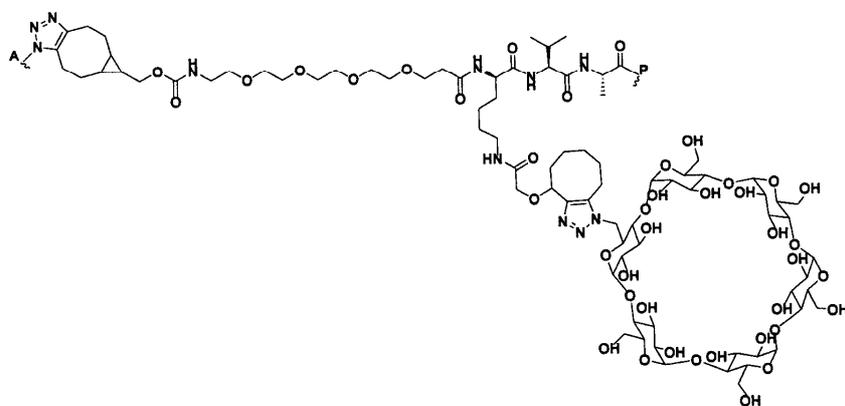
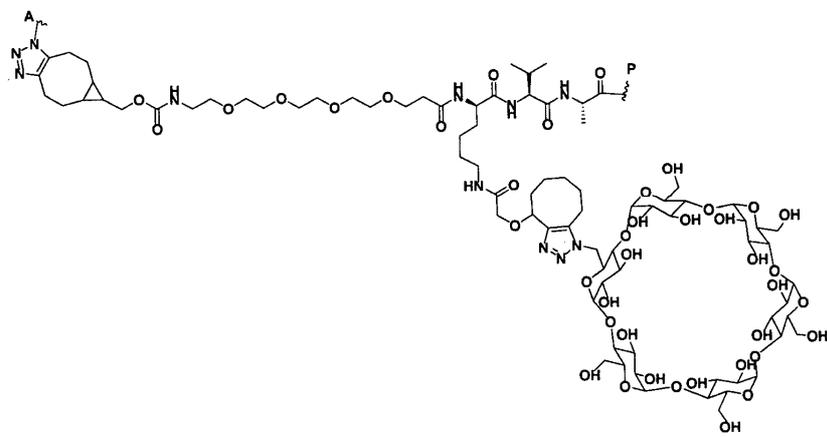
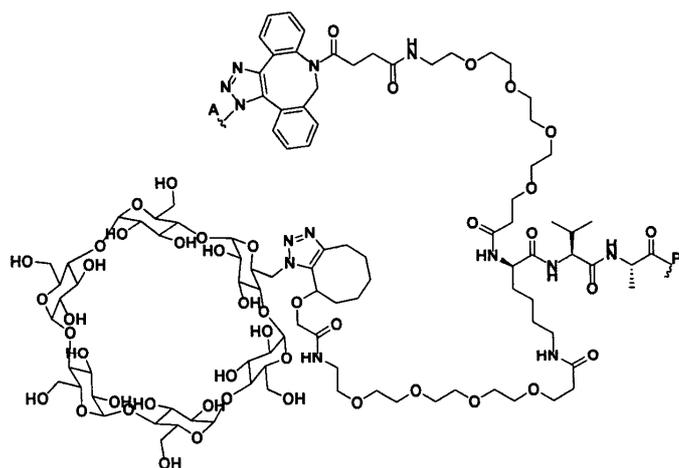


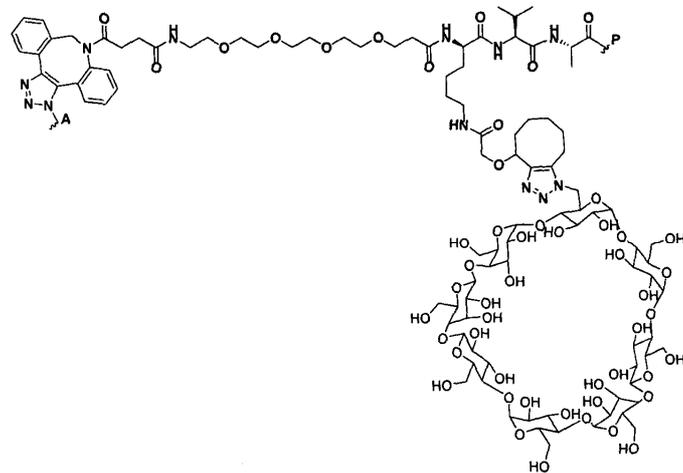
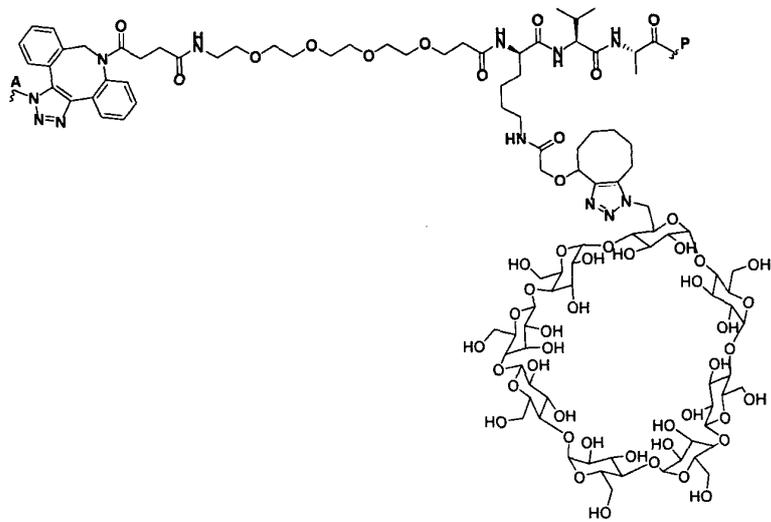
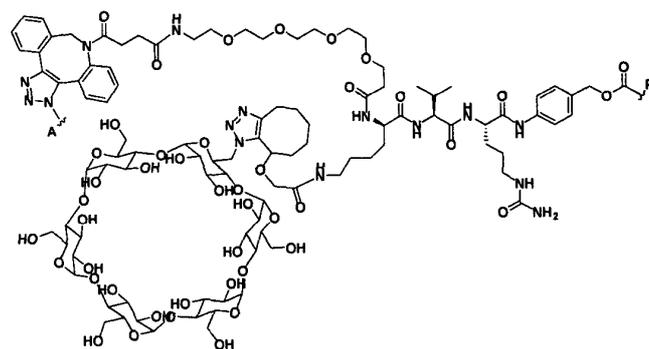
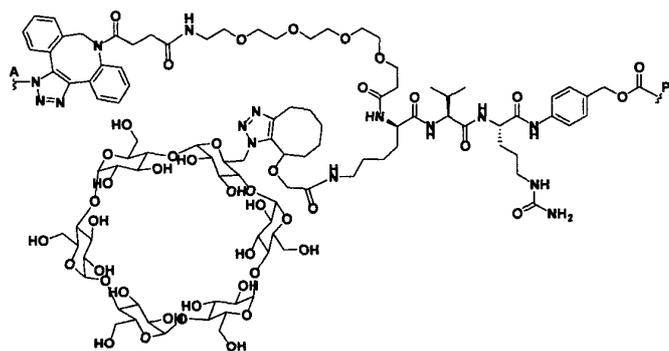






046545

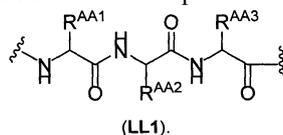




В эти примеры также включены фармацевтически приемлемая соль, сольват, их стереоизомерная

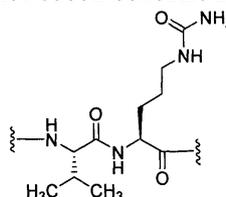
форма, их региоизомер или их смесь региоизомеров, где каждый $\begin{matrix} A \\ | \\ -\text{C}- \\ | \\ P \end{matrix}$ представляет собой связь со связующим агентом; и каждый $\begin{matrix} P \\ | \\ -\text{C}- \\ | \\ \end{matrix}$ является связью с полезной нагрузкой.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, -LL-соответствует формуле (LL1):

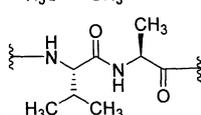


В формуле (LL1) R^{AA1} , R^{AA2} и R^{AA3} , каждый независимо, представляют собой боковые цепи аминокислот, по меньшей мере, одна из которых связана прямо или косвенно с -SP-RG-SP-CD. В некоторых примерах SP может отсутствовать. В некоторых примерах SP присутствует. В некоторых примерах в формуле (LL1) R^{AA1} , R^{AA2} и R^{AA3} , каждый независимо, представляют собой боковые цепи аминокислот, по меньшей мере, одна из которых связана прямо или косвенно с -RG-CD. В некоторых примерах R^{AA1} представляет собой боковую цепь аминокислоты лизина. В некоторых примерах R^{AA1} представляет собой боковую цепь аминокислоты L-лизина. В некоторых примерах R^{AA1} представляет собой боковую цепь аминокислоты D-лизина. В некоторых примерах R^{AA2} представляет собой боковую цепь аминокислоты валина. В некоторых примерах R^{AA3} представляет собой боковую цепь аминокислоты аланина. В некоторых примерах R^{AA3} представляет собой боковую цепь аминокислоты цитрулина. В некоторых примерах R^{AA1} представляет собой боковую цепь аминокислоты лизина, связанную прямо или косвенно с CD, а R^{AA2} и R^{AA3} независимо представляют собой боковые цепи аминокислот валина и аланина. В некоторых примерах R^{AA1} представляет собой боковую цепь аминокислоты лизина, связанную прямо или косвенно с CD, а R^{AA2} и R^{AA3} независимо представляют собой боковые цепи аминокислоты валина и цитрулина.

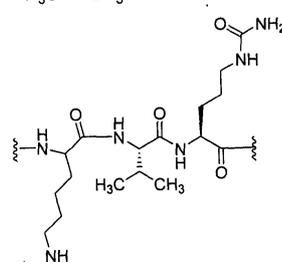
В некоторых примерах LL включает



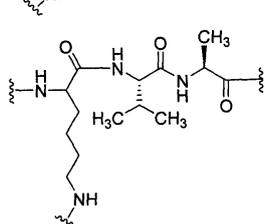
В некоторых примерах LL включает



В некоторых примерах LL включает



В некоторых примерах LL включает



В некоторых примерах SP, SP^1 , SP^2 или их комбинация представляет собой спейсерную группу. В некоторых примерах SP независимо в каждом случае выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкилена, -NH-, -C(O)-, $(-CH_2-CH_2-O)_e$, $-NH-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_e-C(O)-$, $-C(O)-(CH_2)_u-C(O)-$, $-C(O)-NH-(CH_2)_v-$ и их комбинации, где индекс e является целым числом от 0 до 4, индекс u является целым числом от 1 до 8, а индекс v является целым числом от 1 до 8. В некоторых примерах SP^1 независимо в каждом случае выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкилена, -NH-, -C(O)-, $(-CH_2-CH_2-O)_e$, $-NH-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_e-C(O)-$, $-C(O)-(CH_2)_u-C(O)-$, $-C(O)-NH-(CH_2)_v-$ и их комбинации, где индекс e представляет собой целое число от 0 до 4, индекс u представляет собой целое число от 1 до 8, а индекс v представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых примерах SP^2 независимо в каждом случае выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкилена, -NH-, -C(O)-, $(-CH_2-CH_2-O)_e$, $-NH-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_e-C(O)-$, $-C(O)-(CH_2)_u-C(O)-$, $-C(O)-NH-(CH_2)_v-$ и их комбинации, где индекс e является целым числом от 0 до 4, индекс u является целым числом от 1 до 8, а индекс v является целым числом от 1 до 8.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс m , q или e равен 1. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс m равен 1. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс q равен 1. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс e равен 1.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс m , q или e равен 2. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс m равен 2. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс q равен 2. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс e равен 2.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс m , q или e равен 3. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс m равен 3. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс q равен 3. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс e равен 3.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс m , q или e равен 4. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс m равен 4. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс q равен 4. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс e равен 4.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс p равен 1.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 2-4.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 2.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 3.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 4.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, связывающий агент (ВА) выбран из любого полипептида. Примеры полипептидов включают, но не ограничиваются ими, природные полипептиды и неприродные полипептиды. Примеры полипептидов включают, но не ограничиваются ими, полипептиды, полученные из генетически модифицированных организмов.

Здесь полипептиды включают, но не ограничиваются ими, рецепторы, белки, ферменты, связывающие агенты, молочные пептиды, рибосомные пептиды, нерибосомные пептиды, пептоны и пептидные фрагменты. Здесь полипептиды включают, но не ограничиваются ими, антимикробные пептиды, тахикининовые пептиды, вазоактивные кишечные пептиды, пептиды, связанные с панкреатическим полипептидом, опиодные пептиды и кальцитониновые пептиды. Другие пептиды, включенные в настоящее раскрытие, включают, но не ограничиваются ими, натрийуретический пептид типа В (BNP), лакотрипептиды, нейропептиды, липопептиды, протеазы или гормоны.

Полипептиды дополнительно включают, но не ограничиваются ими, короткие аминокислотные цепи, содержащие две или более аминокислоты, связанные вместе. Полипептиды включают, но не ограничиваются ими, дипептиды (Val-Cit), трипептиды и тетрапептиды (например, Val-Gly-Ser-Ala), имеющие две, три или четыре аминокислоты, связанные вместе, соответственно. Полипептиды включают более длинные цепи, содержащие пять или более аминокислот. Полипептиды включают более длинные цепи, включающие пятьдесят или более аминокислот (например, белки). В некоторых примерах полипептиды в данном документе выбраны из дипептидов, трипептидов, тетрапептидов, пентапептидов, гексапептидов, гептапептидов, октапептидов, нонапептидов, декапептидов, ундекапептидов и икосапептидов.

Полипептиды включают белки. В некоторых примерах белки включают только природные аминокислоты. В некоторых примерах белки дополнительно включают неприродные аминокислоты.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, связывающий агент (ВА) представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых примерах связывающий агент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, селективный в отношении антигена, выбранного из группы, состоящей из AXL, BAFFR, BCMA, компонентов списка BCR, BDCA2, BDCA4, BTLA, BTNL2, BTNL3, BTNL8, BTNL9, C10 или f54, CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CCR10, CD11c, CD137, CD138, CD14, CD168, CD177, CD19, CD20, CD209, CD209L, CD22, CD226, CD248, CD25, CD27, CD274, CD276, CD28, CD30, CD300A, CD33, CD37, CD38, CD4, CD40, CD44, CD45, CD46, CD48, CD5, CD52, CD55, CD56, CD59, CD62E, CD68, CD69, CD70, CD74, CD79a, CD79b, CD8, CD80, CD86, CD90.2, CD96, CLEC12A, CLEC12B, CLEC7A, CLEC9A, CR1, CR3, CRTAM, CSF1R, CTLA4, CXCR1/2, CXCR4, CXCR5, DDR1, DDR2, DEC-205, DLL4, DR6, FAP, FcγR, FcγR, FELD1, Fire, GPCR, HER2, HHLA2, HLA класса II, HVEM, ICOSLG, IFNLR1, IL10R1, IL10R2, IL12R, IL13RA1, IL13RA2, IL15R, IL15R, IL15R, IL17R, IL15R, IL15R, IL15R IL17RC, IL17RE, IL20R1, IL20R2, IL21R, IL22R1, IL22RA, IL23R, IL27R, IL29R, IL2Rg, IL31R, IL36R, IL3RA, IL4R, IL6R, IL5R, IL7R, IL9R, Integrins, LAG3, LIFR, MAG/Siglec-4, MMR, MSR1, NCR3LG1, NKG2D, NKp30, NKp46, PDCD1, PRLR, PROKR1, PVR, PVRIG, PVRL2, PVRL3, RELT, SIGIRR, SIGIRR, SIGIRR Siglec-10, Siglec-5, Siglec-6, Siglec-7, Siglec-8, Siglec-9, SIRPA, SLAMF7, TACI, компонентов/ассоц. списка TCR, PTCRA, TCRb, CD3z, CD3, TEK, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TIGIT, TLR2, TLR4, TROY, TSLPR, TYRO, VLDLR, VSIG4 и VTCN1.

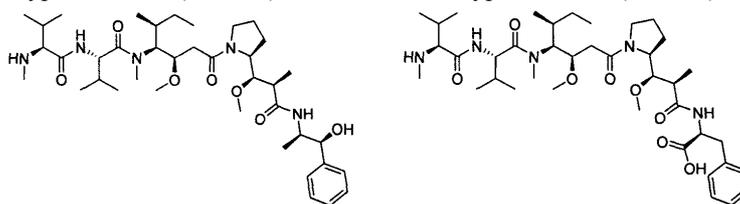
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, РА представляет собой остаток группы, выбранной из группы, состоящей из доластатина, ауристатиона, майтансиноида, растительного

алкалоида, таксана, алкалоида барвинка, стероида и модулятора LXR. В некоторых случаях РА представляет собой доластатин. В некоторых случаях РА является ауристатином.

В некоторых случаях РА является мейтансиноидом. В некоторых случаях РА является растительным алкалоидом. В некоторых случаях РА является таксаном. В некоторых случаях РА представляет собой алкалора барвинка. В некоторых случаях РА является стероидом. В некоторых случаях РА является модулятором LXR. В некоторых случаях модулятор LXR является агонистом LXR. В некоторых вариантах осуществления модулятор LXR представляет собой антагонист LXR. Другие подходящие полезные нагрузки включают те, которые являются высокогидрофобными, например, те, которые не поддаются условиям конъюгации Ab из-за их гидрофобной природы, например, полезные нагрузки, такие как пирролобензодиазепины (PBD), SN38 (7-этил-10-гидрокси-камптотecin), и т.п. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе представлены конъюгаты антитело-лекарственное средство, в которых РА представляет собой гидрофобный фрагмент полезной нагрузки.

В некоторых примерах РА представляет собой любое соединение, указанное на любой из фиг. 1.

В определенных вариантах осуществления РА представляет собой ауристатин. В некоторых вариантах осуществления РА представляет собой ауристатин E, ауристатин F, монометилауристатин-D (MMAD), монометилауристатин-E (MMAE) или монометилауристатин F (MMAF).

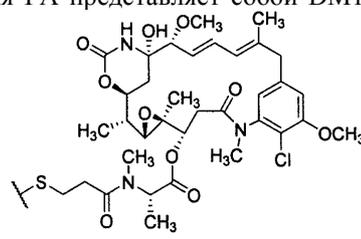


MMAE

MMAF

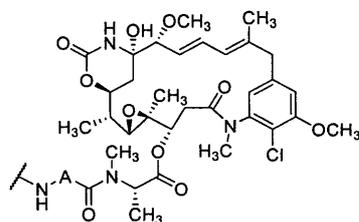
В определенных вариантах осуществления РА представляет собой мейтансиноид. Мейтансиноид может представлять собой любую полезную нагрузку мейтансиноида, которая считается подходящей специалисту в данной области техники. Полезные нагрузки мейтансиноидов, раскрытые в предварительной заявке США № 15/081759, поданной 25 марта 2016 г., под названием "ПРОИЗВОДНЫЕ МЕЙТАНСИНОИДОВ, ИХ СПОСОБЫ И МЕТОДЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ", опубликованные в публикации заявки на патент США № 2016/0375147 и во Временной заявке США № 15/445373, поданной 24 января 2017 года и озаглавленной "ПРОИЗВОДНЫЕ МЕЙТАНСИНОИДОВ, ИХ КОНЪЮГАТЫ И СПОСОБЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ", выданной в качестве патента США № 9950076, включены сюда посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления РА представляет собой DM1, DM3 или DM4. В определенных

вариантах осуществления РА является



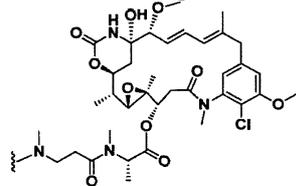
. В некоторых вариантах осуществ-

вления РА представляет собой



, где А представляет собой необязательно

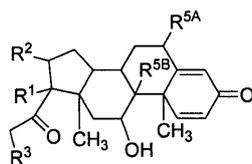
замещенный арилен или гетероарилен. В определенных вариантах осуществления РА является



LL.

. В конкретных вариантах осуществления волнистая линия обозначает связь с

В некоторых вариантах осуществления полезные нагрузки в соединениях формулы (I) представляют собой глюкокортикоиды, которые имеют структуру формулы (A):



(A);

или его фармацевтически приемлемый стереоизомер или его производное, в котором:

R^1 и R^2 независимо представляют собой -H, алкил, алкил-C(O)-O-, -OH или галоген; или R^1 и R^2

вместе образуют

где R^4 представляет собой алкил, арил, арилалкил или N-содержащий гетероциклоалкил,

где алкил, арил, арилалкил и N-содержащий гетероциклоалкил независимо в каждом случае необязательно замещены $-NR^{Aa}R^{Ab}$;

R^3 обозначает -OH, $R^Z-C(O)-X$ -, гетероалкил, пиперидинил, $-NR^{Aa}R^{Ab}$ -, -оксиарил- $-NR^{Aa}R^{Ab}$ или $-Z-A'(R^P)$;

R^5 независимо представляет собой -OH, галоген, алкил или арилалкил;

R^Z представляет собой алкил;

X обозначает O или N^{RAa} ;

Z представляет собой S, S(O), S(O)₂, SO₂NR^{Aa}, O, C(O)NR^{Aa}, C(O) или NR^{Aa};

A' представляет собой арил, арилалкил или гетероарил;

В каждом случае R^P независимо представляет собой галоген, необязательно замещенный алкил, -OH или $-NR^{Aa}R^{Ab}$;

R^{Aa} и R^{Ab} , независимо в каждом случае, представляют собой -H, необязательно замещенный алкил или необязательно замещенный арил;

индекс a представляет собой целое число от 0 до 19; и t является целым числом от 1 до 3; при условии, что:

(1) R^3 не является -OH (a), когда R^1 является -OH, или (b) когда R^1 и R^2 вместе образуют

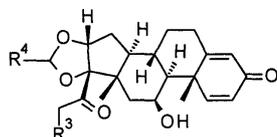
R^4 представляет собой C₁₋₉алкил или

(2) R^3 не является

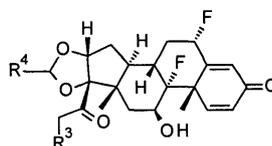
В некоторых вариантах осуществления R^3 представляет собой NH₂. В некоторых из таких вариантов

осуществления R^3 представляет собой

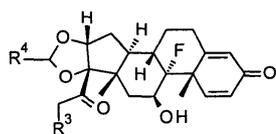
В определенных вариантах осуществления PA представляет собой стероид. В определенных вариантах осуществления PA выбран из



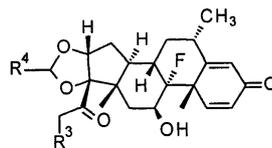
1110



1120



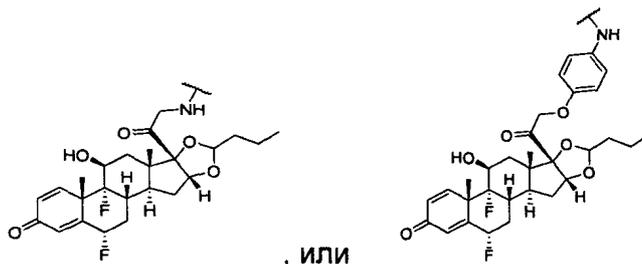
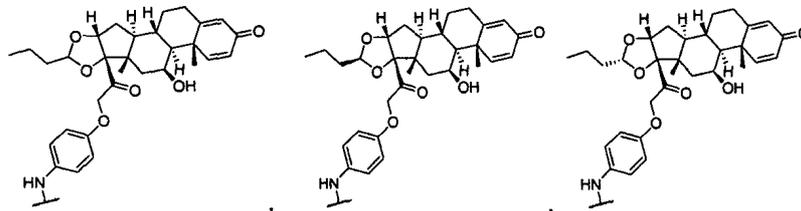
1130



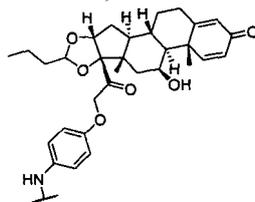
1140

или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или стереоизомера. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любой из формул 1110-1140, R^3 представляет собой -O-арил, $-NR^{Aa}R^{Ab}$ -, алкилен- $-NR^{Aa}R^{Ab}$ -, -X-арилен-Y- $-NR^{Aa}R^{Ab}$ -, -X-гетероарилен-Y- $-NR^{Aa}R^{Ab}$ -, или N-содержащий гетероциклоалкил; где X отсутствует или является -N-, -CH₂- или -O-; где Y отсутствует или является -CH₂-; и R^4 представляет собой алкил, арил, алкиларил или арилалкил. В некоторых вариантах осуществления R^3

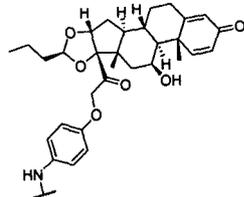
представляет собой $-O-NR^{Aa}R^{Ab}$, $-O$ -гетероарил- $-NR^{Aa}R^{Ab}$; где арил или гетероарил необязательно замещен галогеном, дейтерием, гидроксилем или метоксилем. В определенных вариантах осуществления R^3 представляет собой $-O$ -фенил- $-NR^{Aa}R^{Ab}$, $-O$ -гетероарил- $-NR^{Aa}R^{Ab}$, где фенил или гетероарил необязательно замещен галогеном или дейтерием. В определенных вариантах осуществления R^4 представляет собой n -пропил. В определенных вариантах осуществления R^{Aa} и R^{Ab} , каждый независимо, представляют собой водород или алкил. В конкретных вариантах осуществления один из R^{Aa} и R^{Ab} замещен связью с LL. В определенных вариантах осуществления PA представляет собой



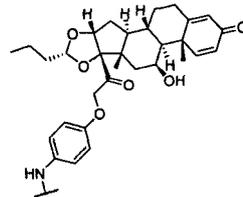
или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или стереоизомера. В некоторых вариантах



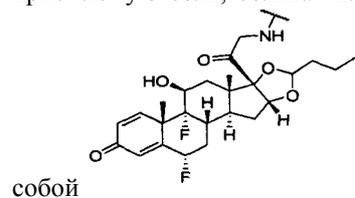
осуществления PA представляет собой , или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомер. В некоторых вариантах осуществления PA представляет собой



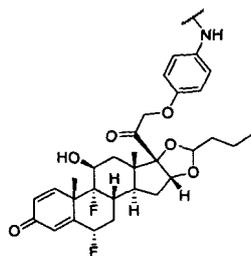
, или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомер. В некото-



рых вариантах осуществления PA представляет собой , или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомер. В некоторых вариантах осуществления PA представляет

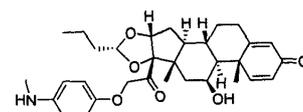
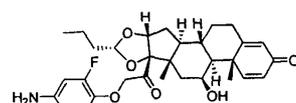
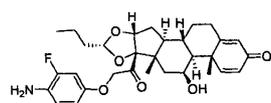
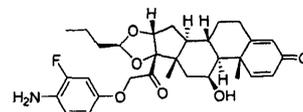
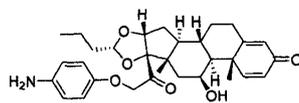
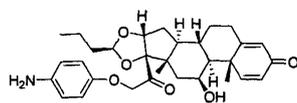
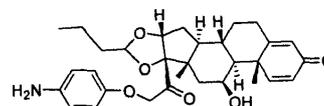
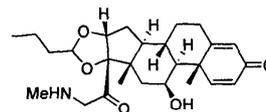
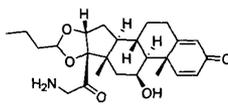
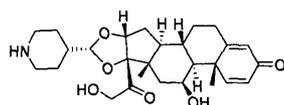
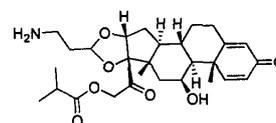
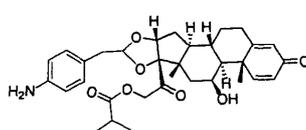
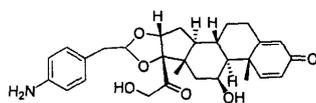
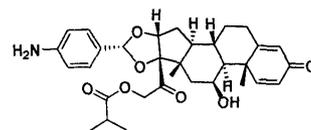
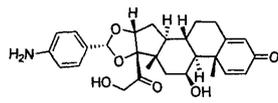
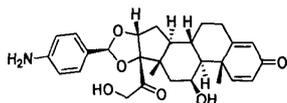


собой , или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомер. В

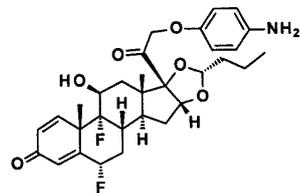
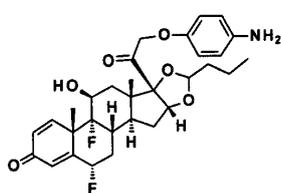
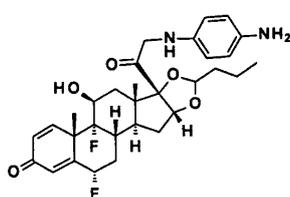
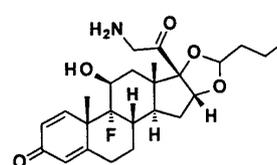
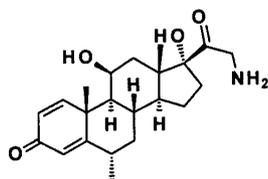
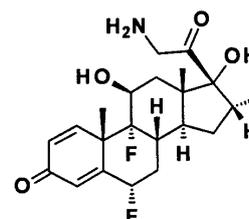
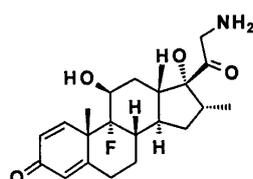
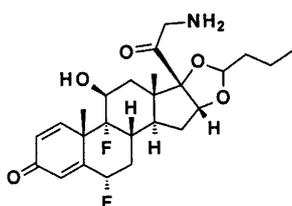
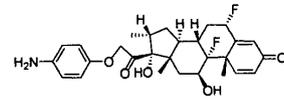
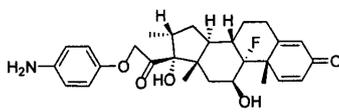
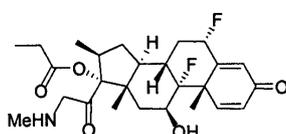
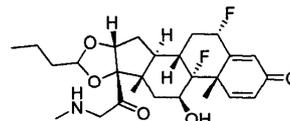
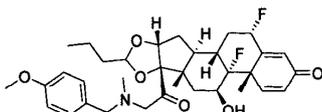
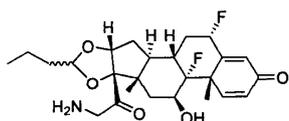
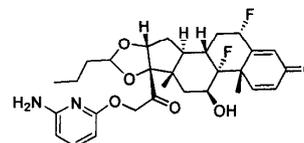
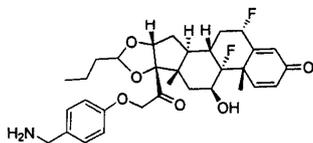
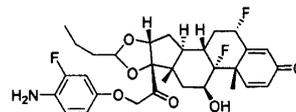
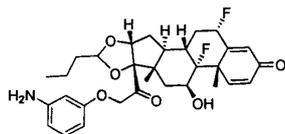
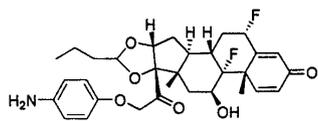


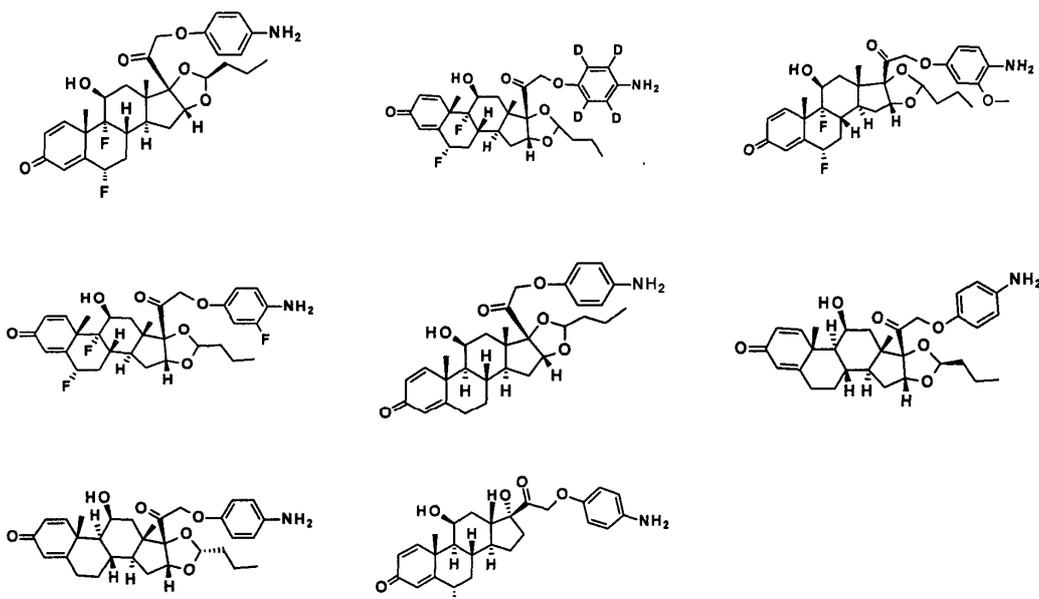
некоторых вариантах осуществления ПА , или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или стереоизомер. В конкретных вариантах осуществления волнистая линия обозначает связь с LL.

Здесь также представлены полезные нагрузки формулы (A), имеющие следующие структуры:



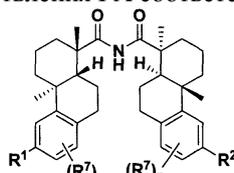
046545





или его фармацевтически приемлемый стереоизомер. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты содержат полезную нагрузку, указанную выше, связанную с линкером через связь с остатком первичного или вторичного амина полезной нагрузки. Полезные нагрузки стероидов, раскрытые в предварительной заявке США № 15/806197, поданной 7 ноября 2017 года под названием "СТЕРОИДЫ И ИХ БЕЛКОВЫЕ КОНЬЮГАТЫ", включены сюда посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления РА представляет собой модулятор X-рецептора печени (LXR). В определенных вариантах осуществления РА соответствует формуле В:



Формула В

или фармацевтически приемлемая соль, сольват или стереоизомерная форма, где W представляет собой $-CH_2-$, $-N(H)-$ или $-O-$; R^{B1} представляет собой $-H$, $-OH$, $-NH_2$, алкил или $-OP(O)(OR^6)_2$;

R^{B2} представляет собой $-H$, $-OH$, $-CH_2NH_2$, RB_3 , RB_4 , R^{B5} , или $-O-R^{B5}$, где R^{B1} и R^{B2} не являются одновременно $-H$;

R^{B3} представляет собой $-N(R^6)_2$; R^{B4} представляет собой $-X-Y-Z$; X выбран из группы, состоящей из $-O-$ и $-N(H)-$;

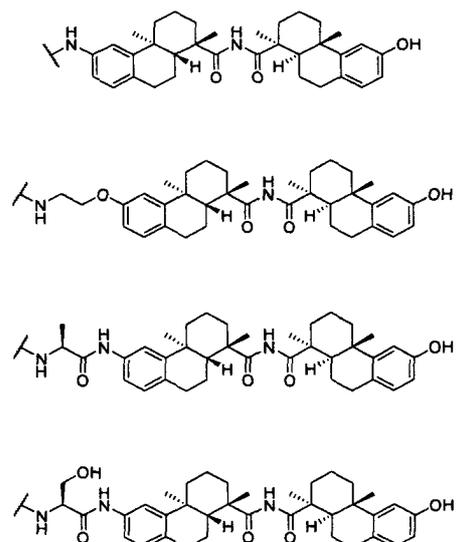
Y выбран из группы, состоящей из алкилена, замещенного алкилена (включая, без ограничения, оксосамещение, т.е. $=O$), гетероалкилена и замещенного гетероалкилена (включая, без ограничения, оксисамещение (т.е. $=O$));

Z выбран из группы, состоящей из $-OH$ и $-NH_2$;

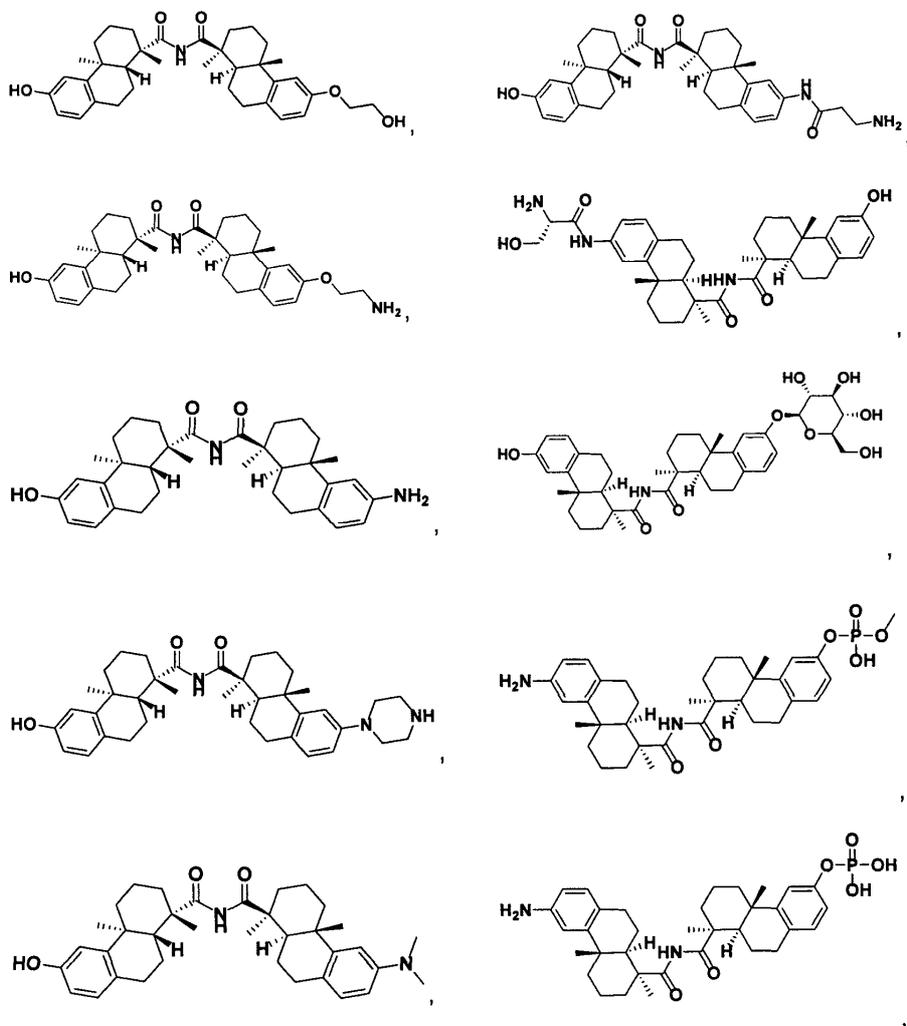
R^{B5} представляет собой алкил, гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил, где каждый гетероциклоалкил или замещенный гетероциклоалкил включает один, два или три гетероатома, выбранных из азота и кислорода, и включает, по меньшей мере, один заместитель $-OH$ и $-CH_2OH$ или, по меньшей мере, один первичный или вторичный азот например, O-глюкоза;

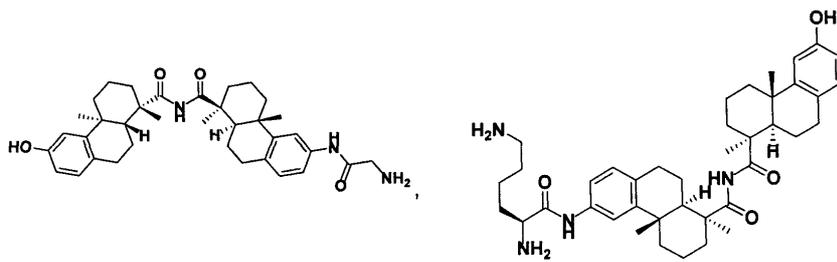
каждый R^6 в каждом случае представляет собой $-H$, аминокислотный остаток, N-алкильный аминокислотный остаток, пептид или алкил; и

каждый R^7 независимо представляет собой галоген, C_{1-6} алкил, C_{1-6} алкокси, $-CN$, O-глюкозу, O-аминокислотный остаток и O-PEG_b, где каждый нижний индекс b представляет собой целое число от 0 до 3. В конкретных вариантах осуществления R^{B1} или R^{B2} замещены связью с LL. В определенных вариантах осуществления РА выбран из:



В конкретных вариантах осуществления волнистая линия обозначает связь с LL.
 В определенных вариантах осуществления полезная нагрузка формулы (B) выбрана из группы, состоящей из:

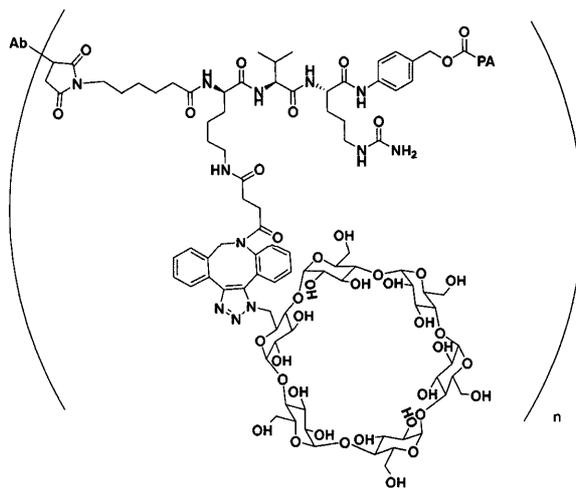


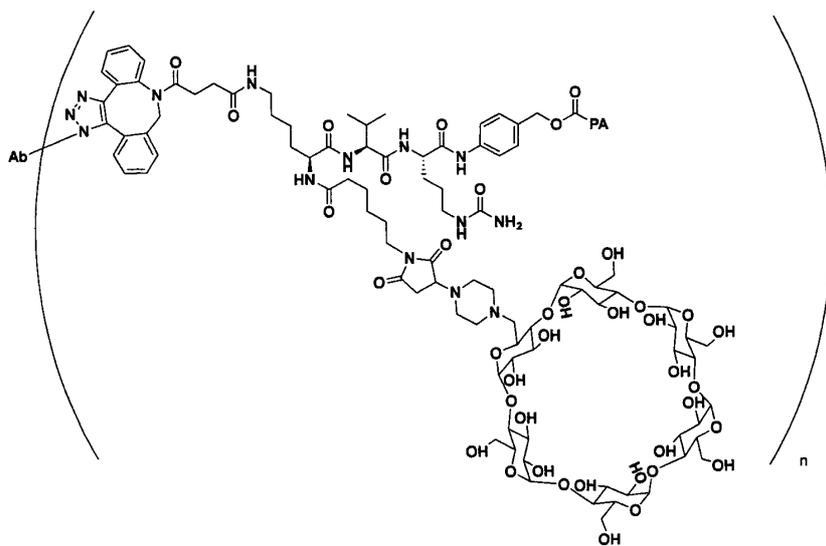
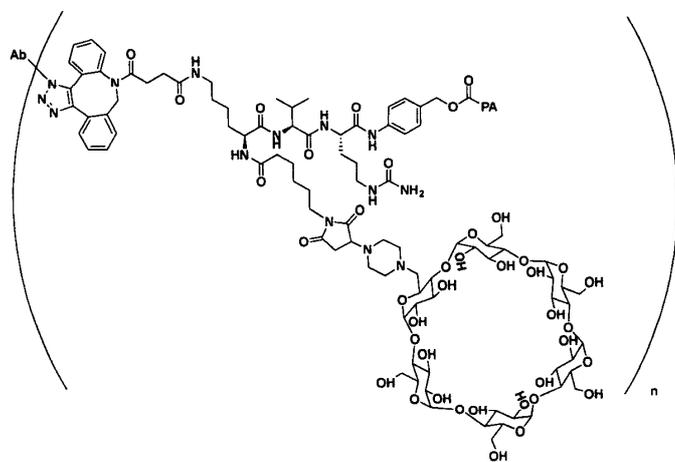
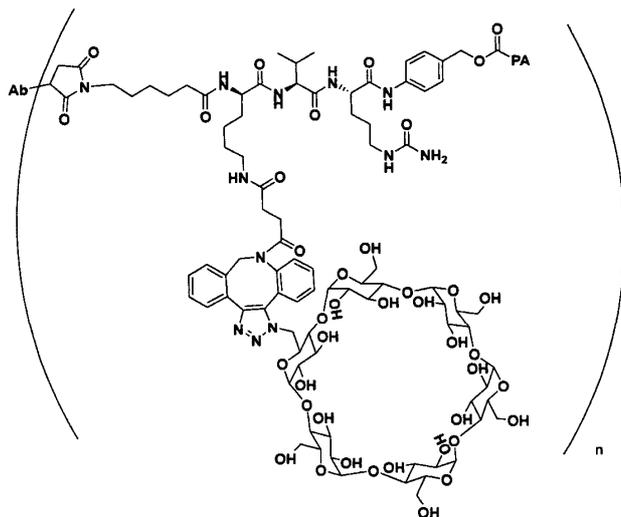


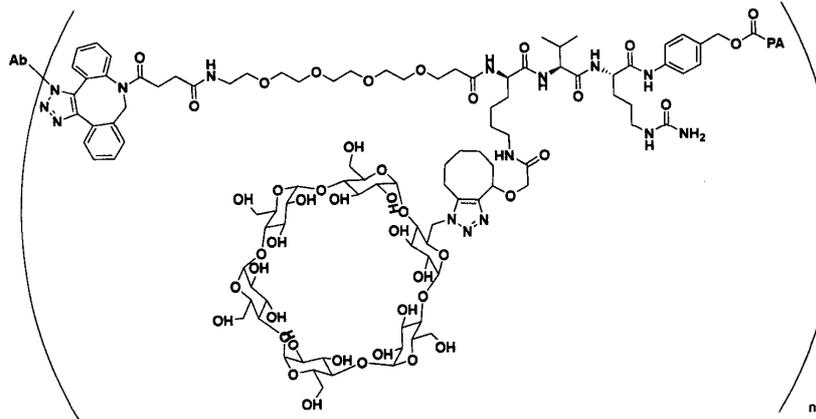
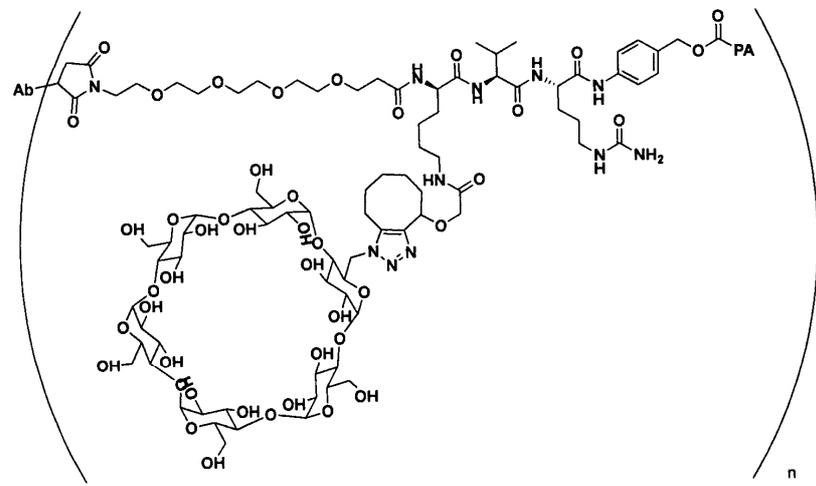
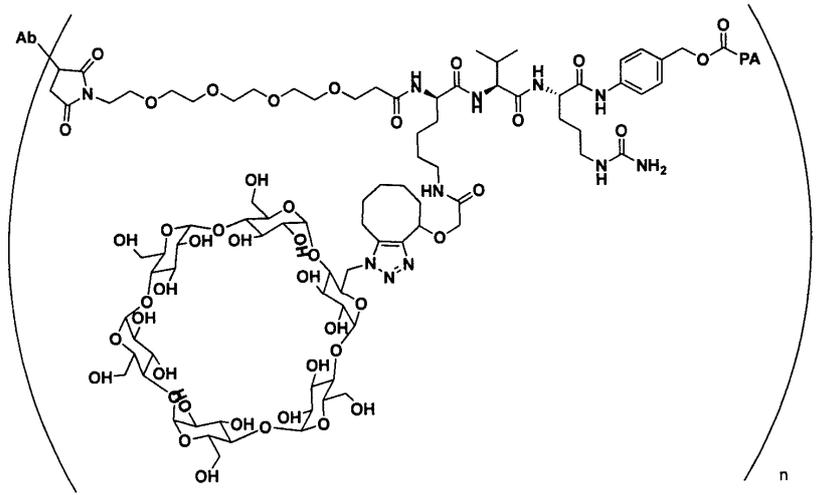
или его фармацевтически приемлемая стереоизомерная форма. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты содержат полезную нагрузку, указанную выше, связанную с линкером через связь с остатком первичного или вторичного амина полезной нагрузки. Полезные нагрузки модулятора LXR, раскрытые в предварительной заявке США № 62/508327, поданной 18 мая 2017 года под названием "Бис-октагидрофенантроновые карбоксамиды и их белковые соединения", включены в настоящий документ посредством ссылки.

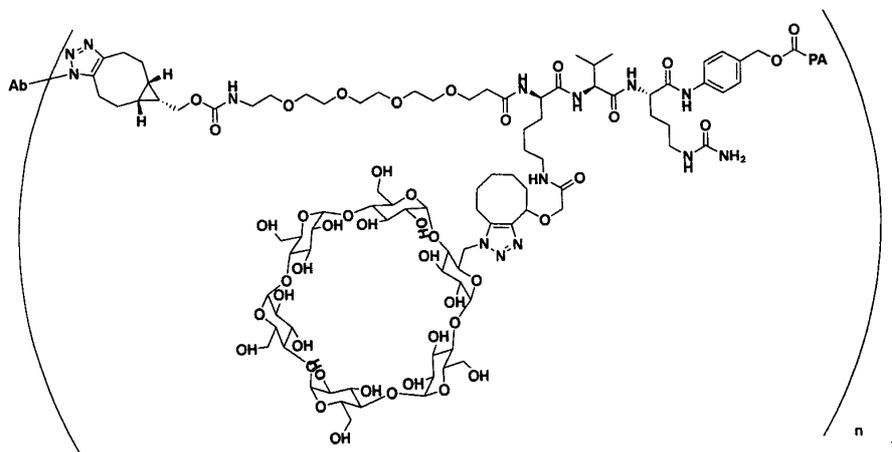
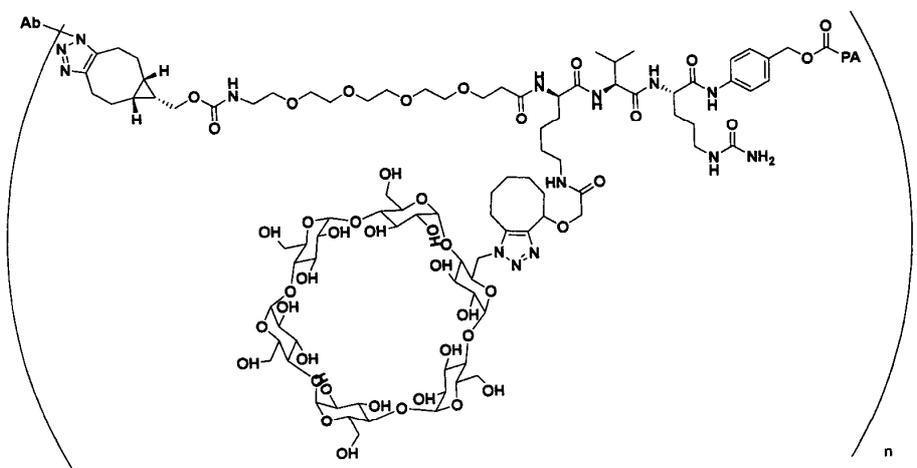
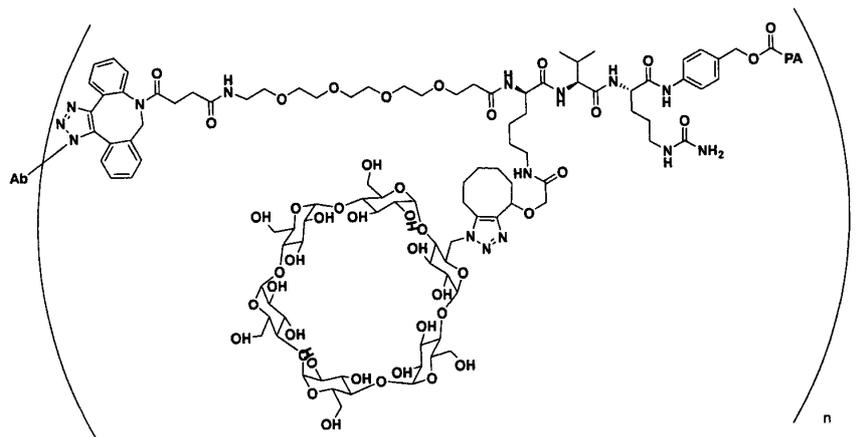
В объем вариантов осуществления, представленных в настоящем документе, также включены полезные нагрузки, раскрытые в предварительной заявке США № 14/776 668, поданной 14 сентября 2015 года, под названием "Биологически активные молекулы, их конъюгаты и терапевтическое применение", опубликованные в публикации заявки на патент США № 2016/0030591 и обычной заявке США № 14/913 965, поданной 23 февраля 2016 г. под названием "Фармацевтические композиции, содержащие макролидные диастереомеры, методы их синтеза и терапевтического использования", опубликованной как публикация заявки на патент США № 2016/0354482, раскрытие упомянутых полезных нагрузок включено в настоящий документ посредством ссылки.

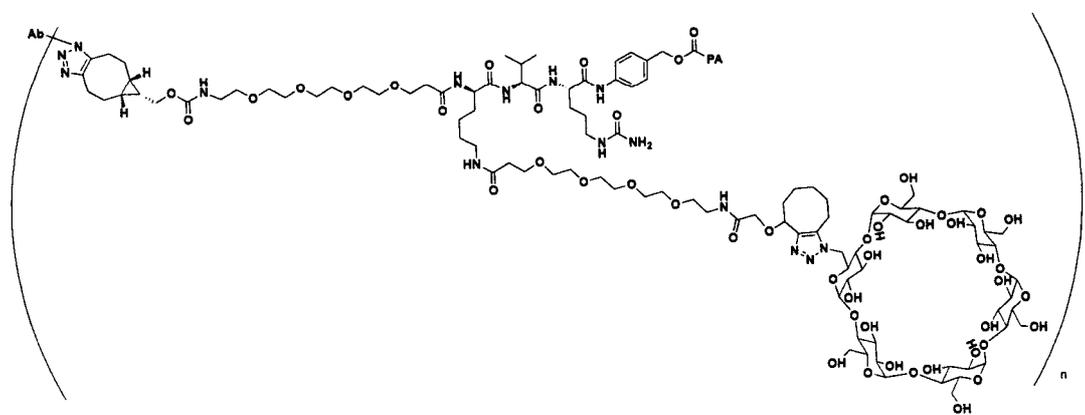
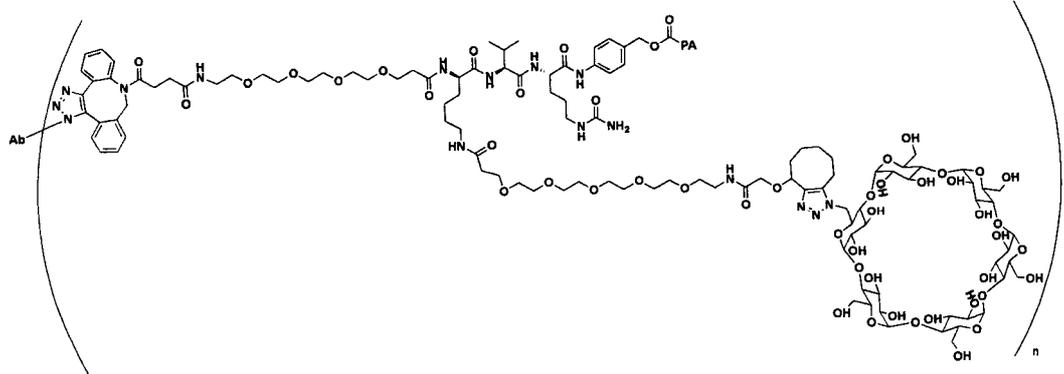
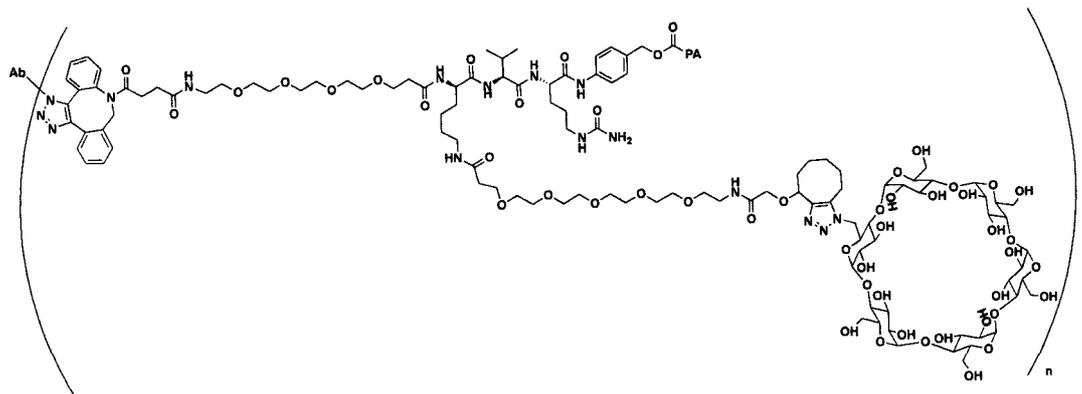
В некоторых примерах соединение формулы (I) выбрано из:

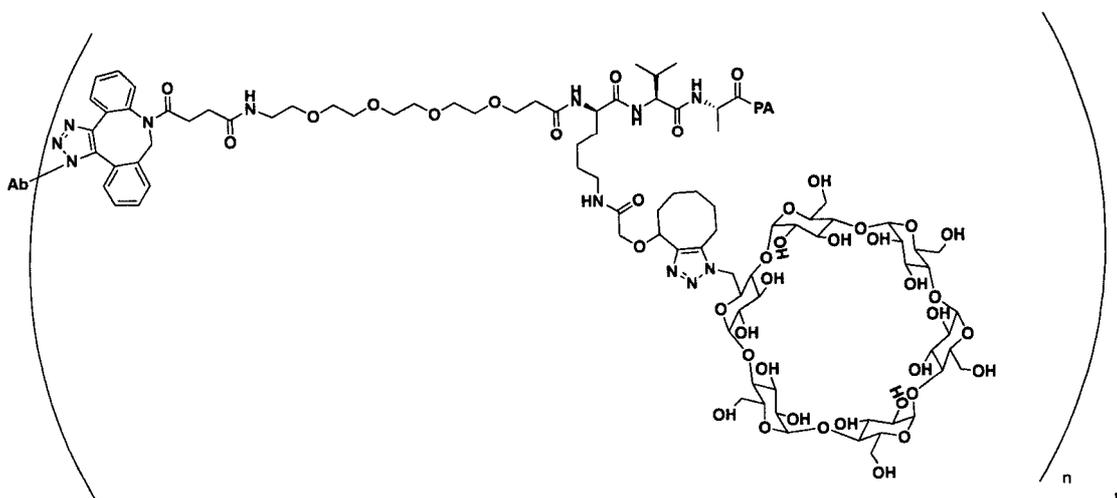
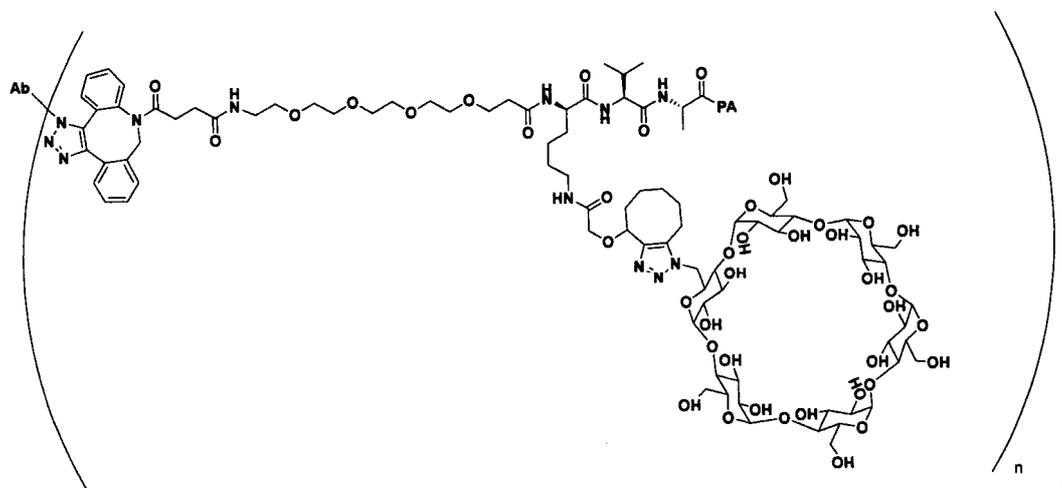
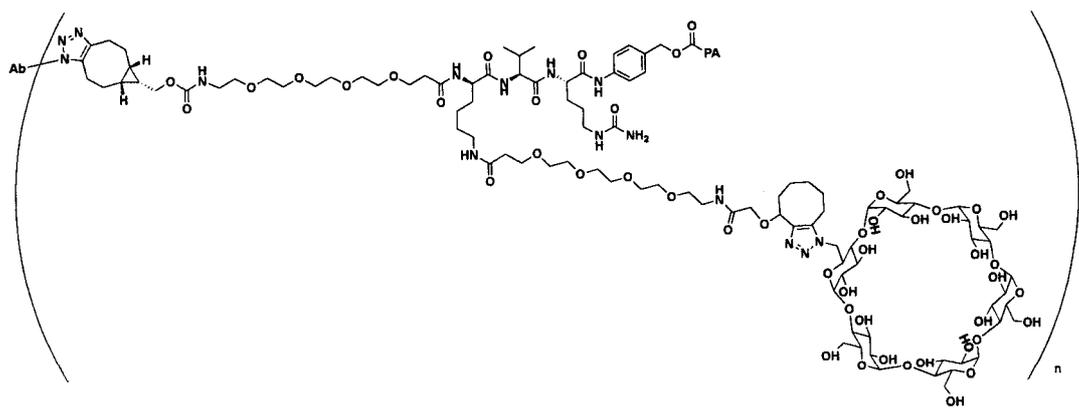




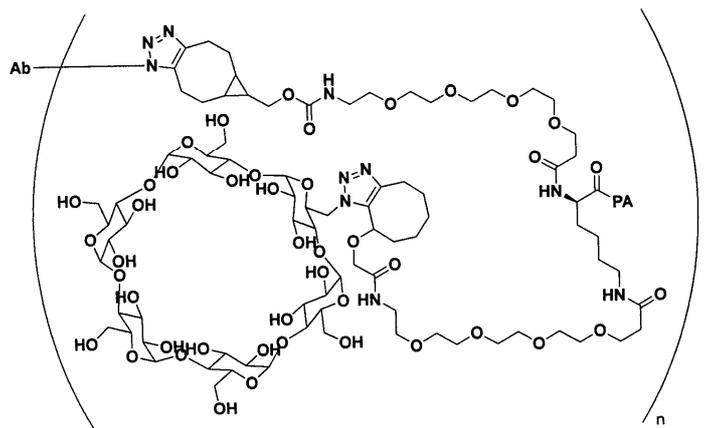
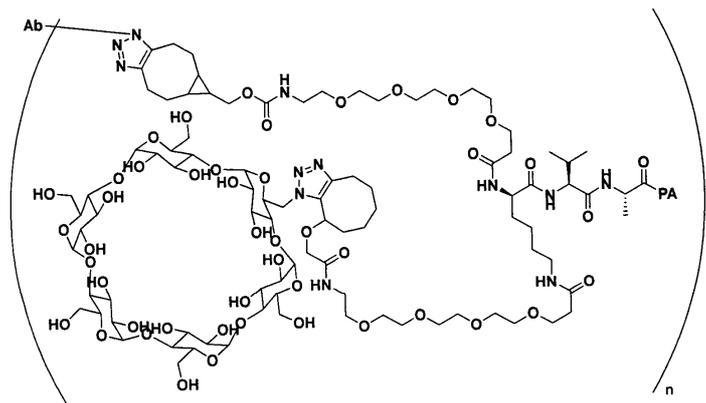


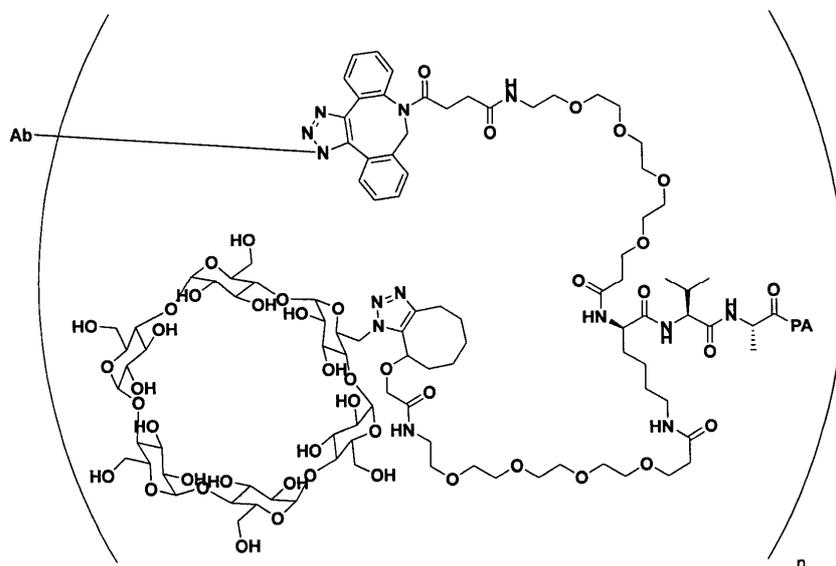
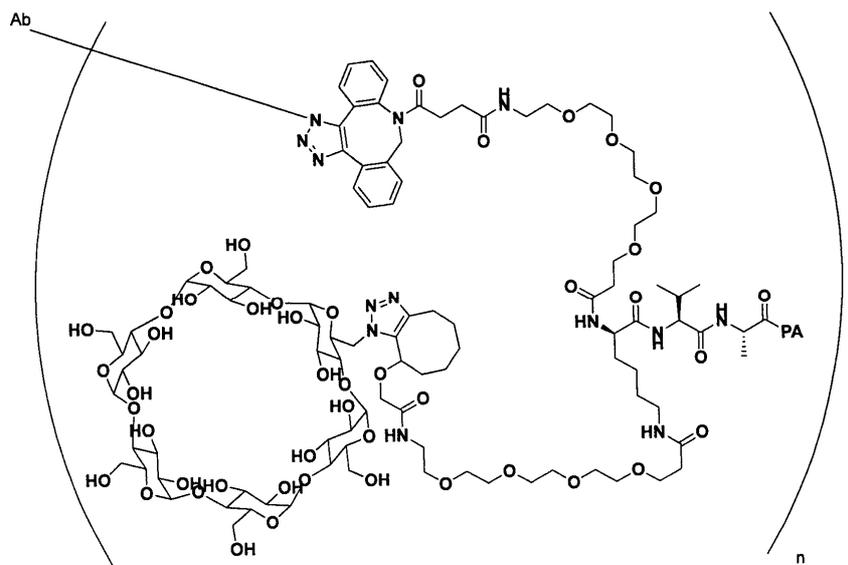


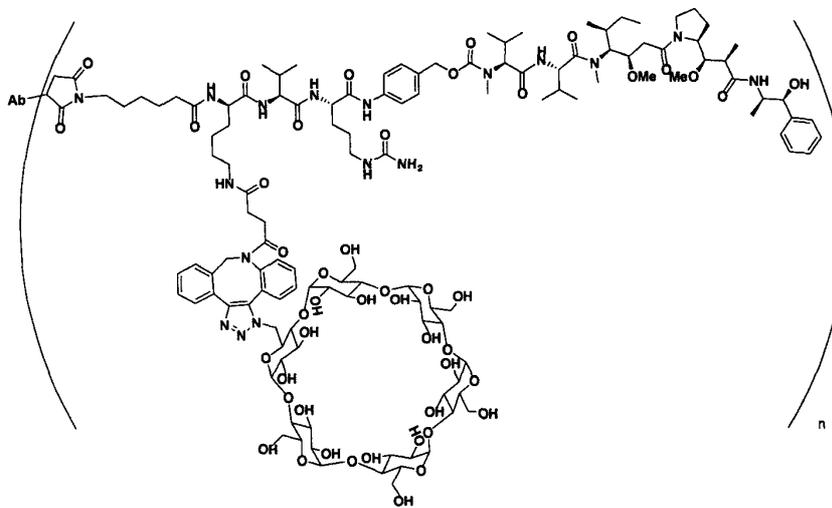
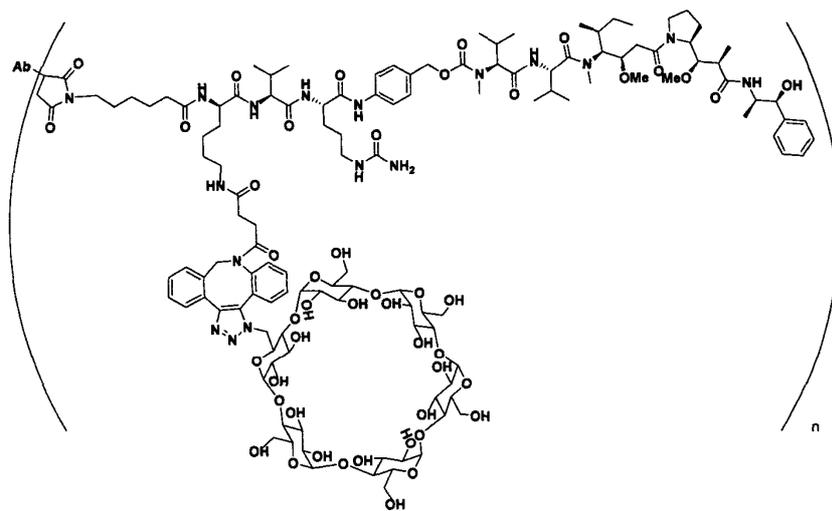


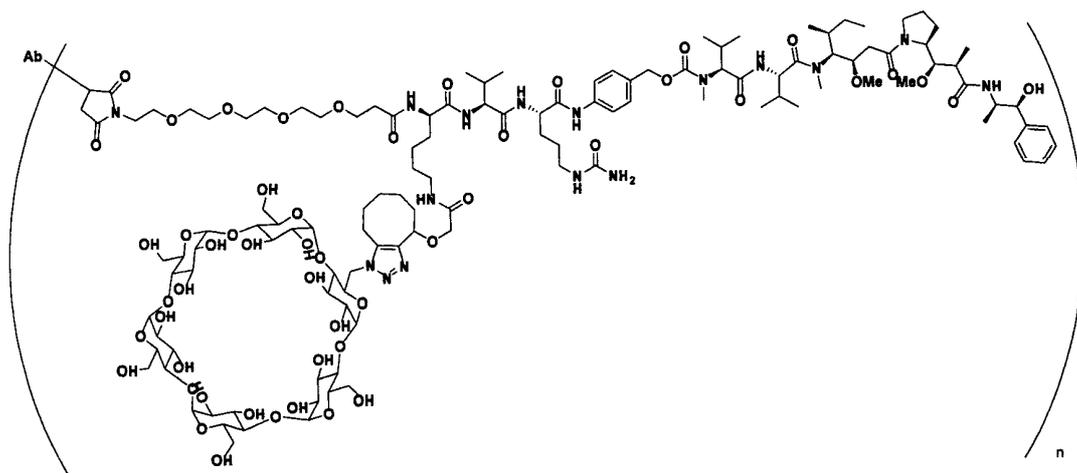
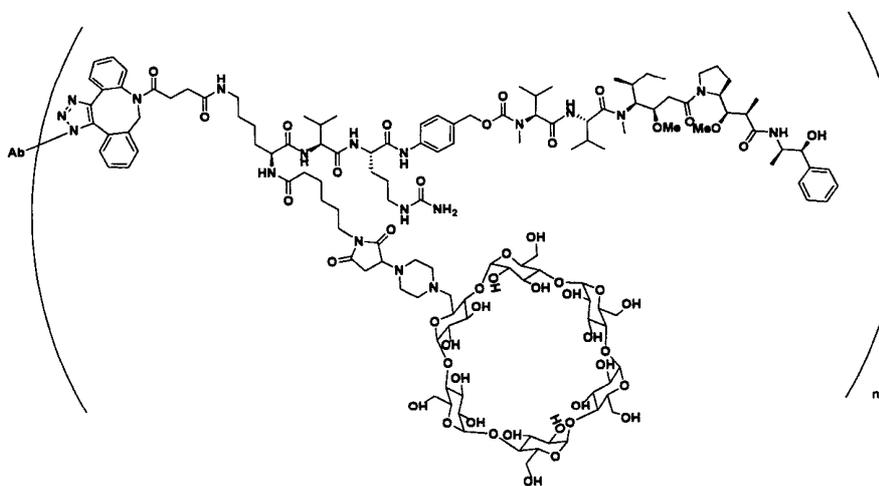
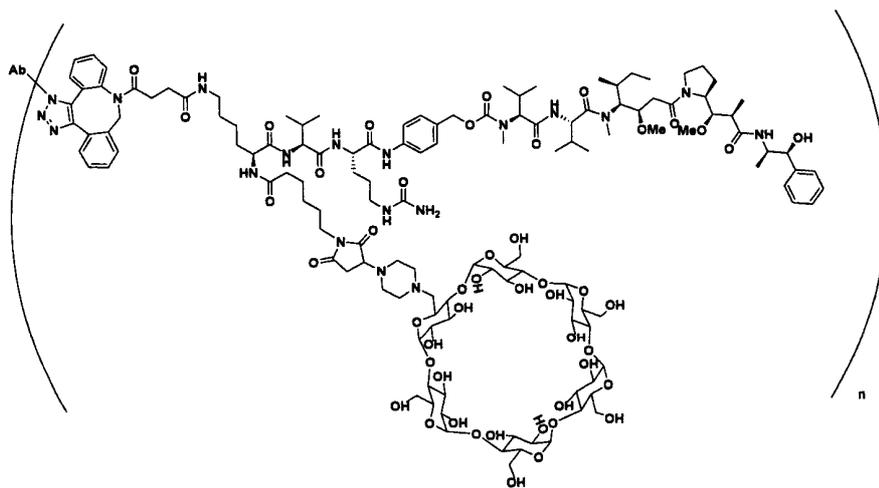


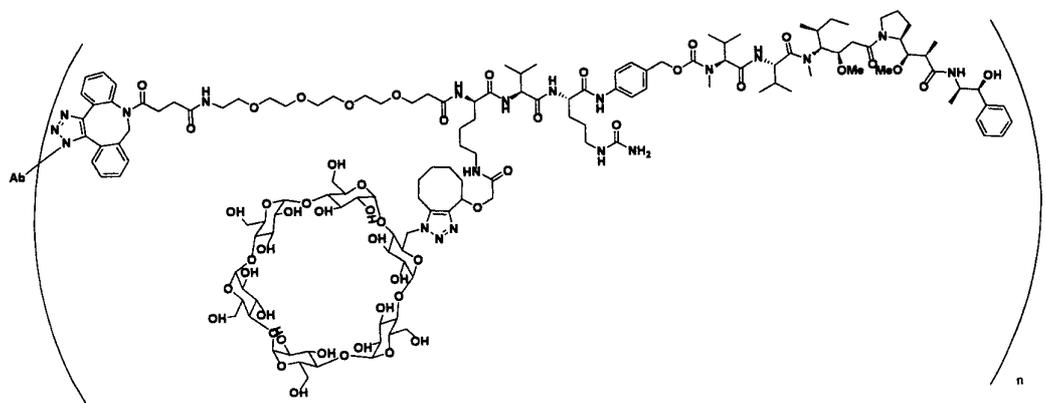
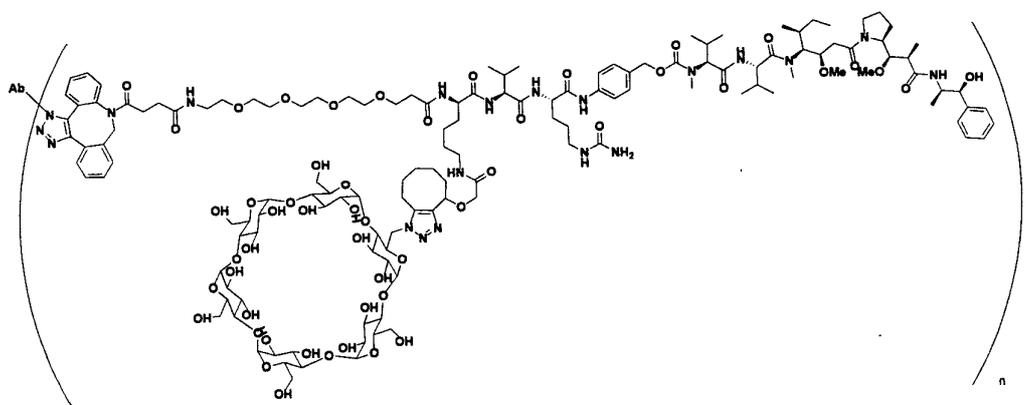
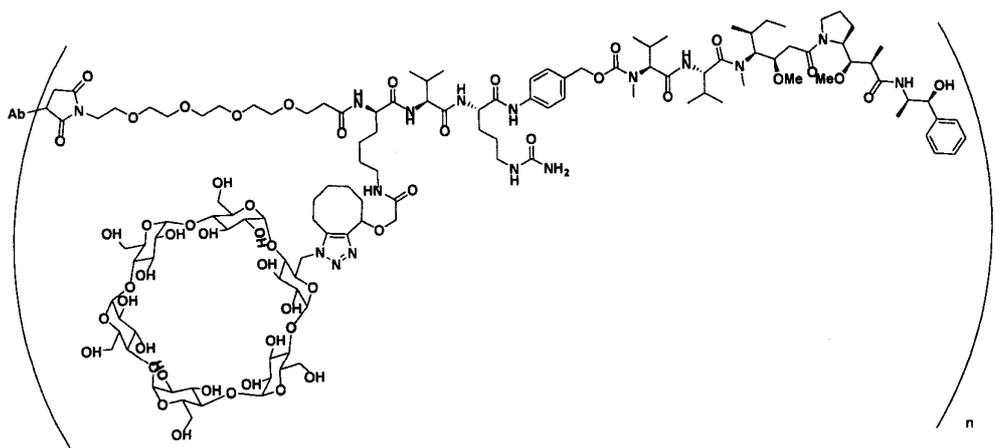
046545

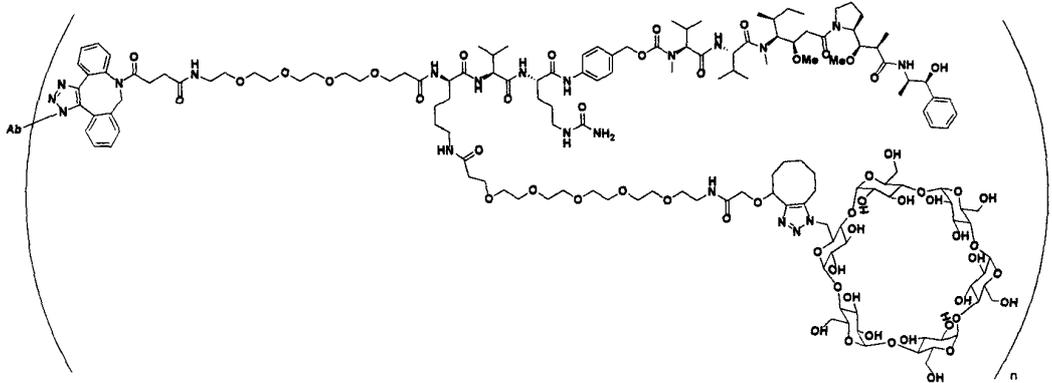
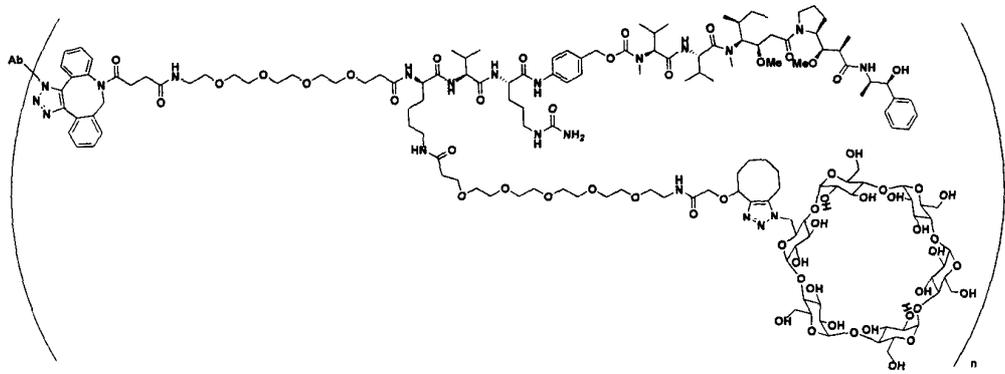
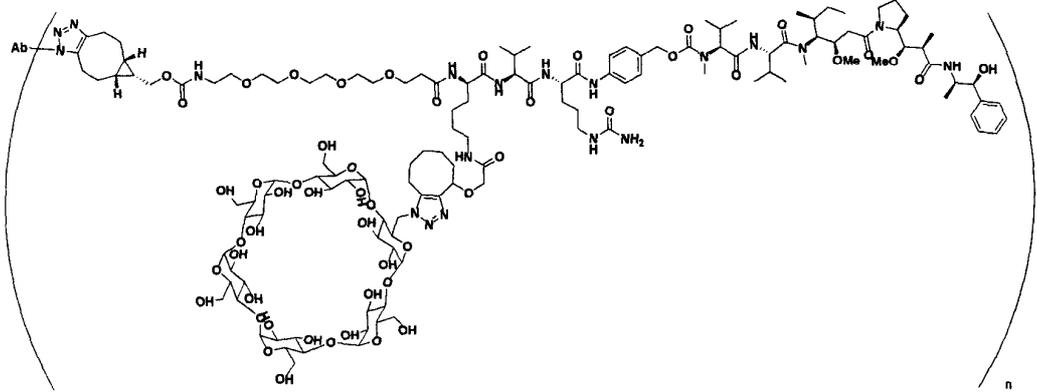
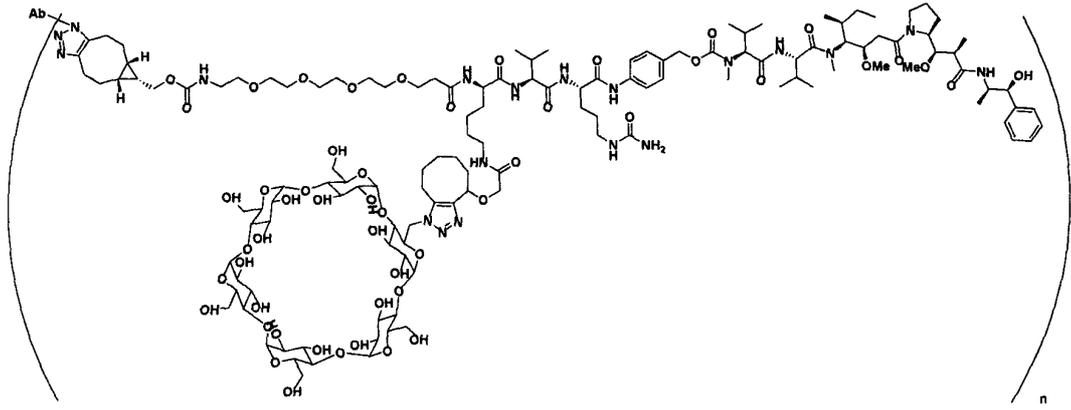


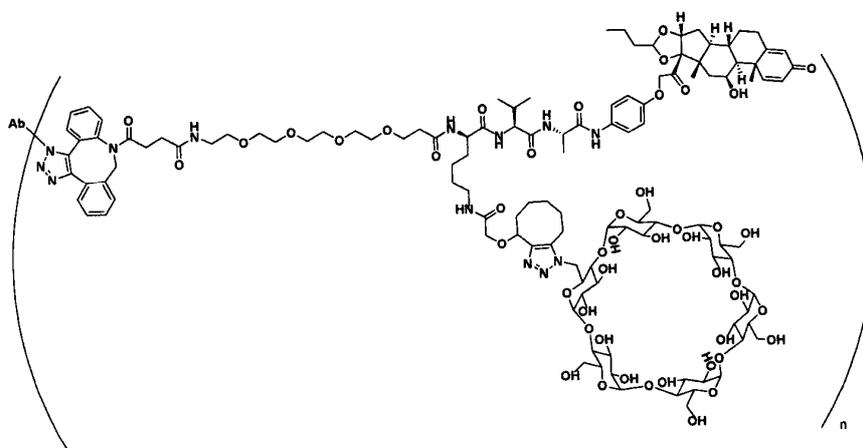
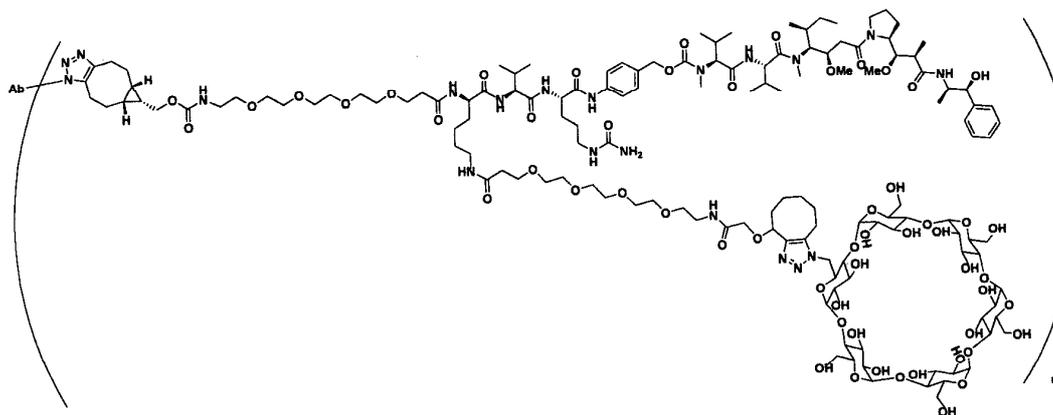
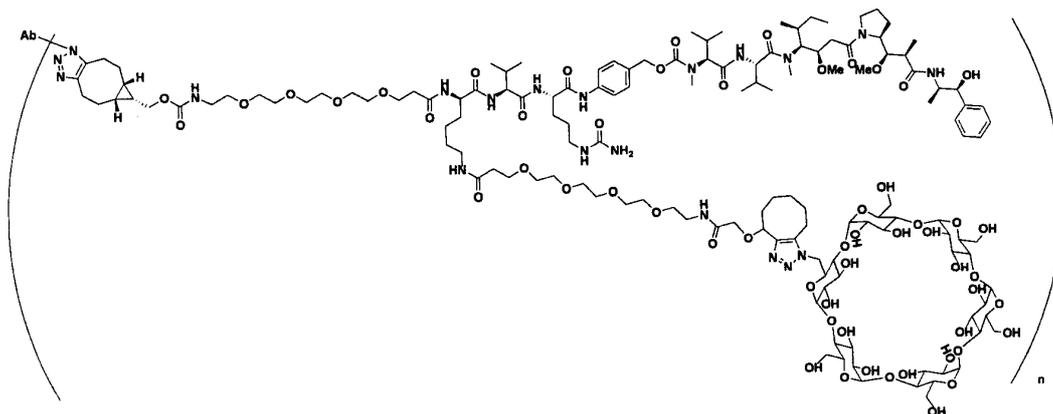


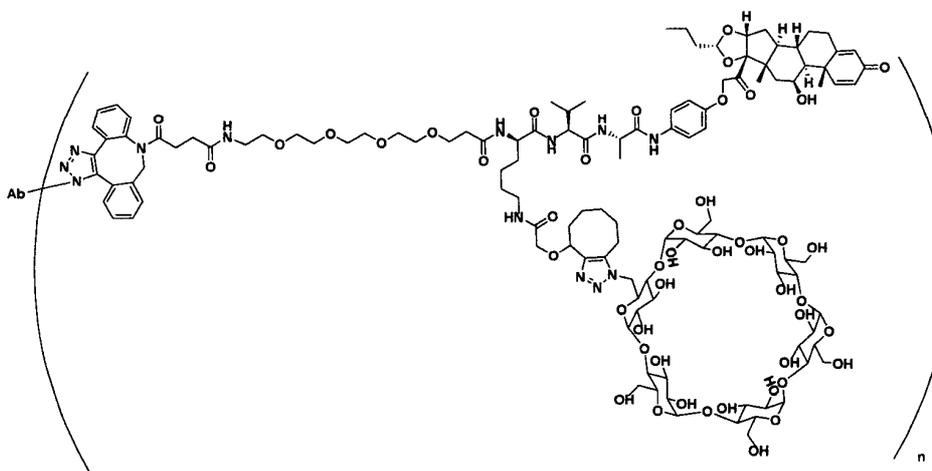
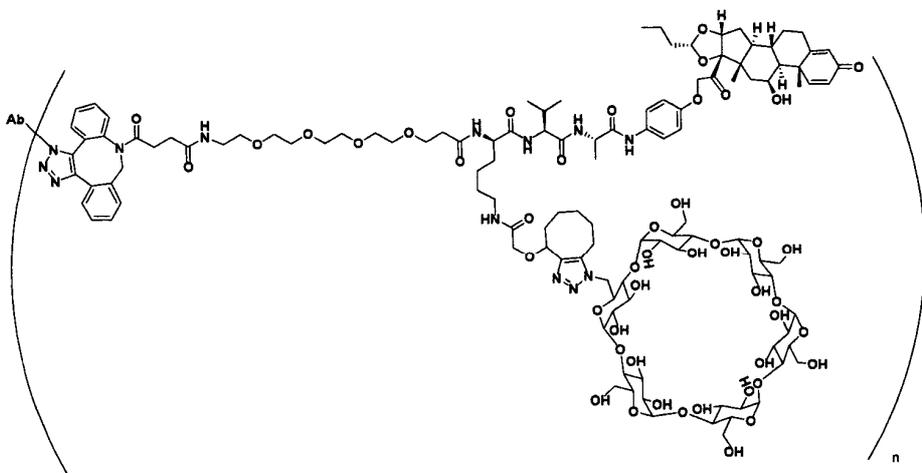
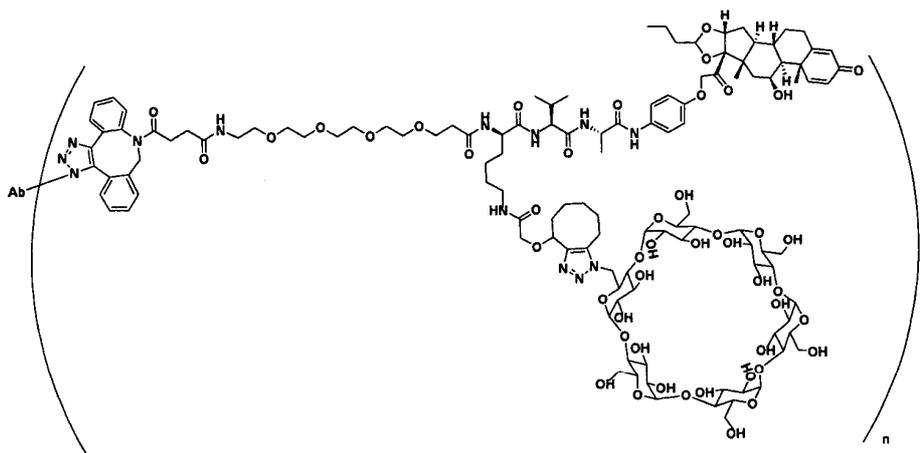


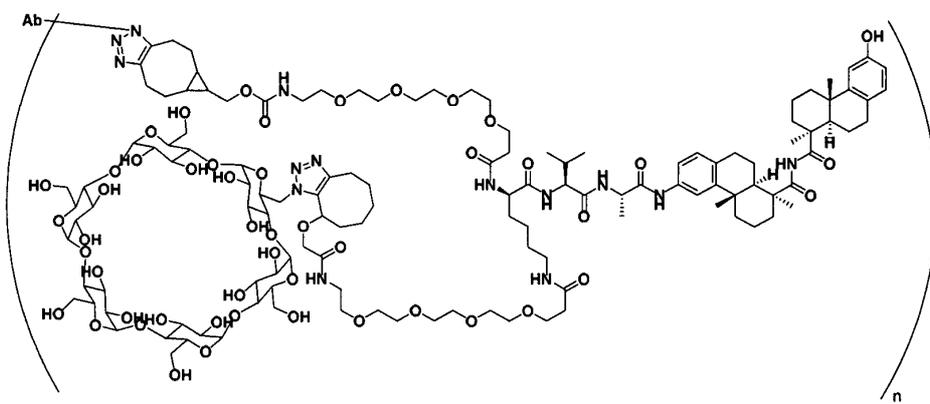
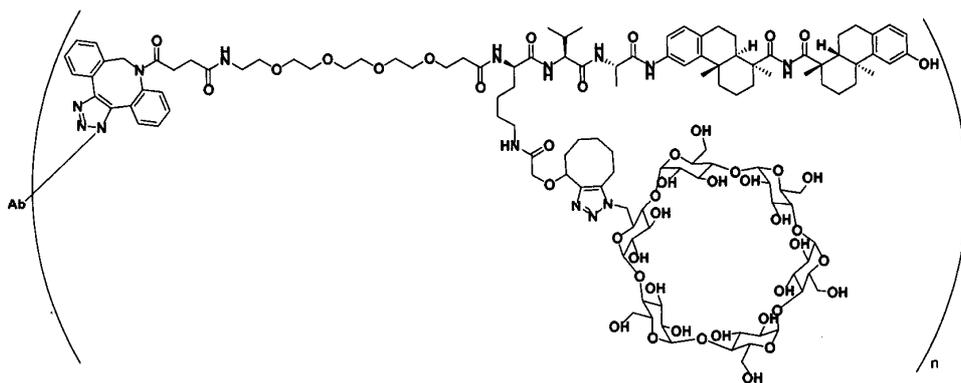
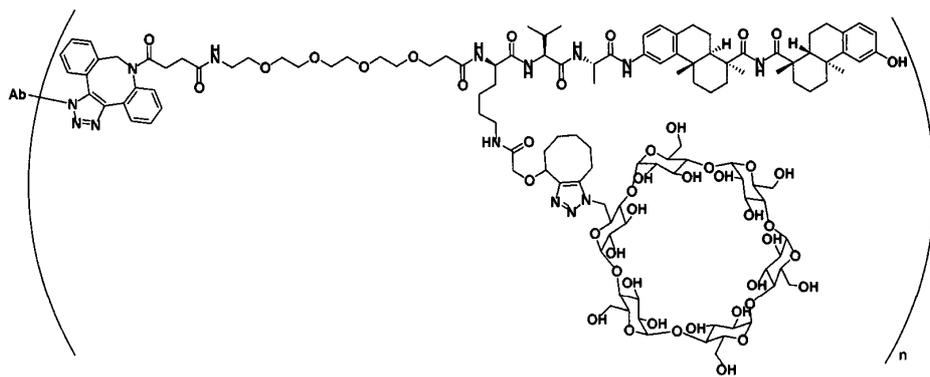


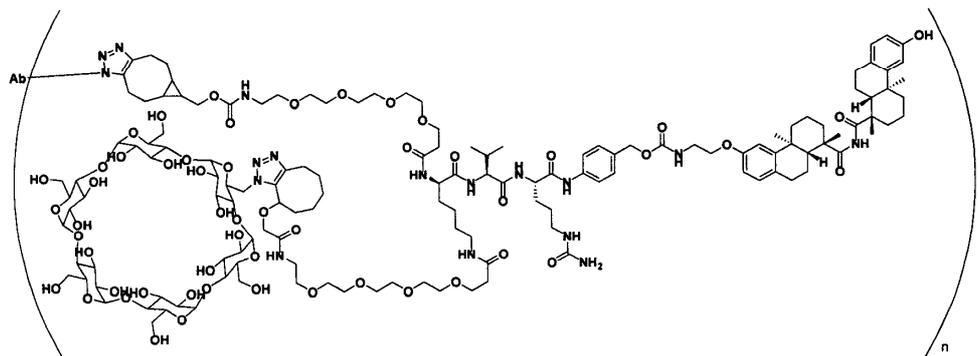
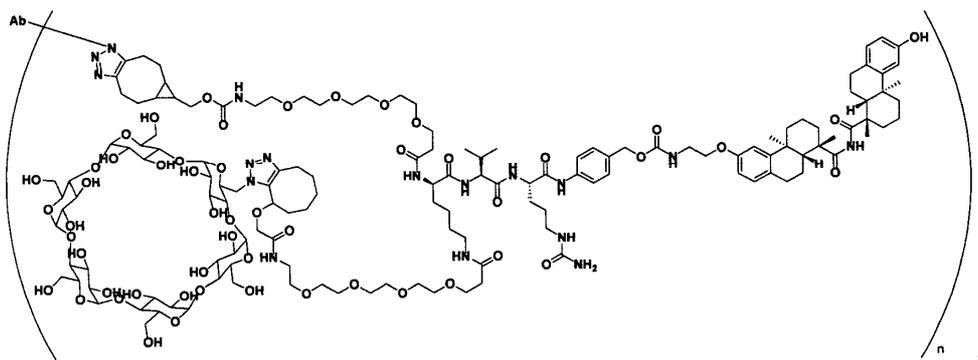
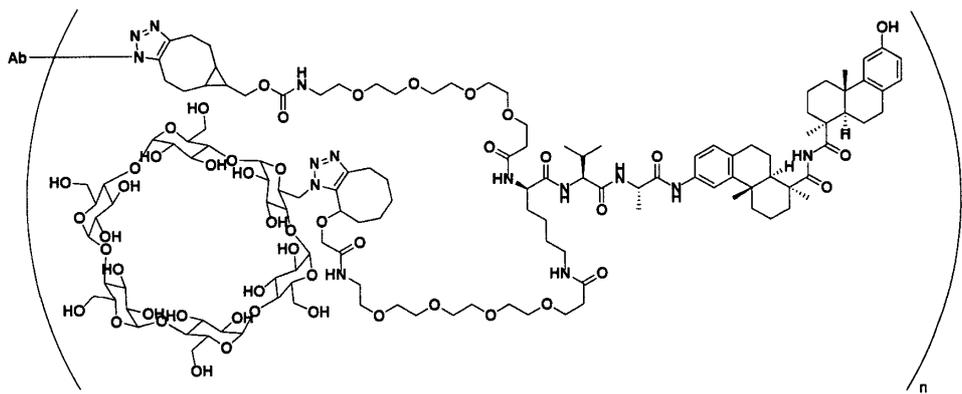


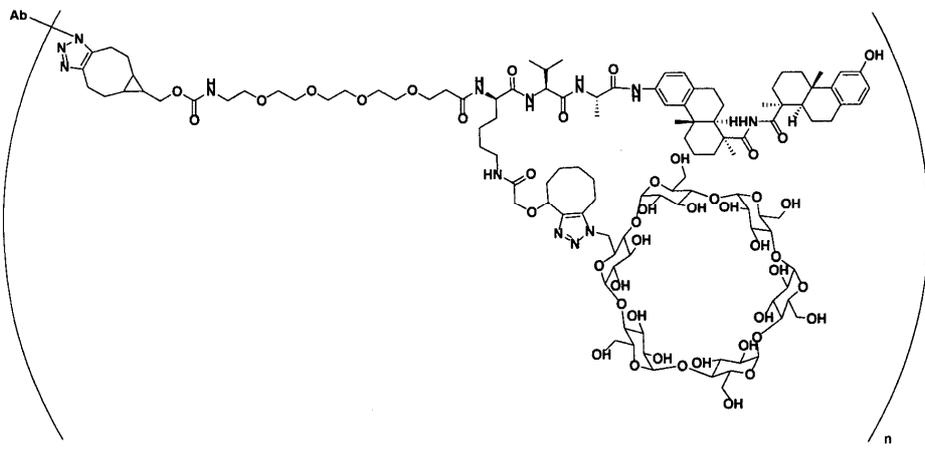
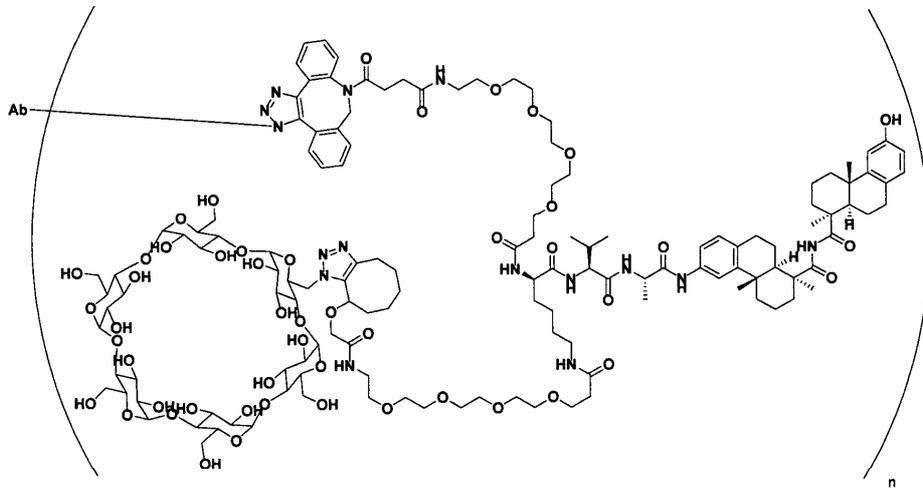
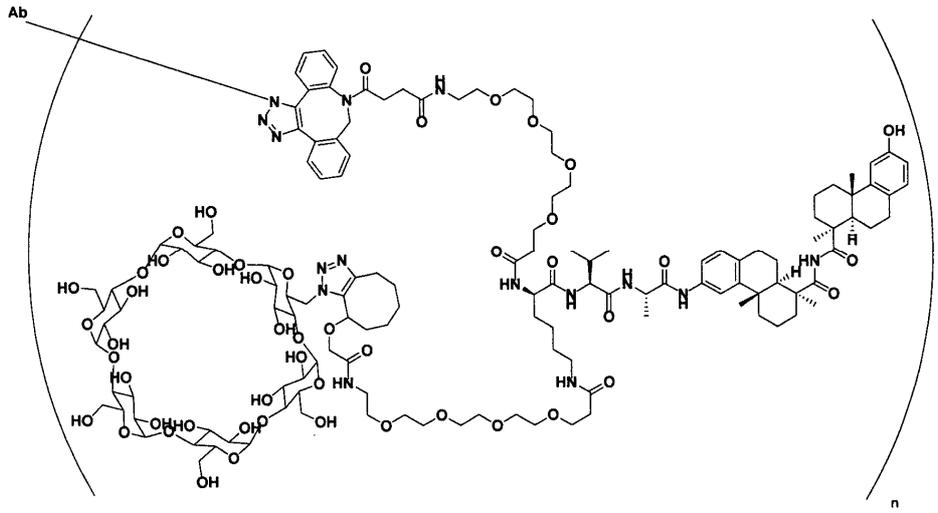


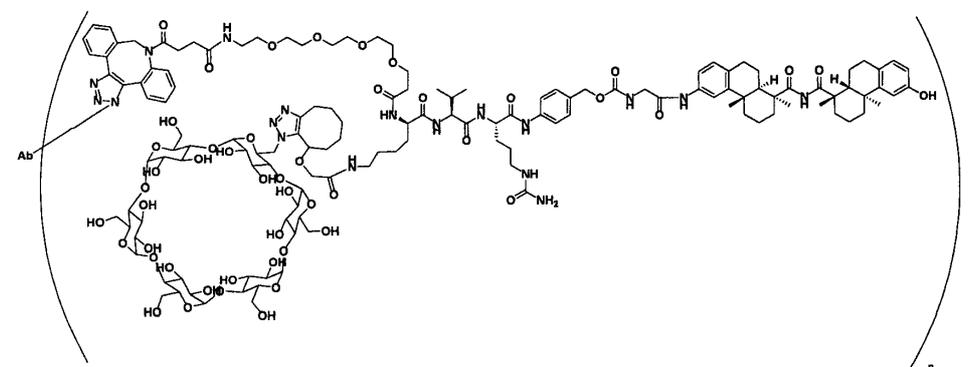
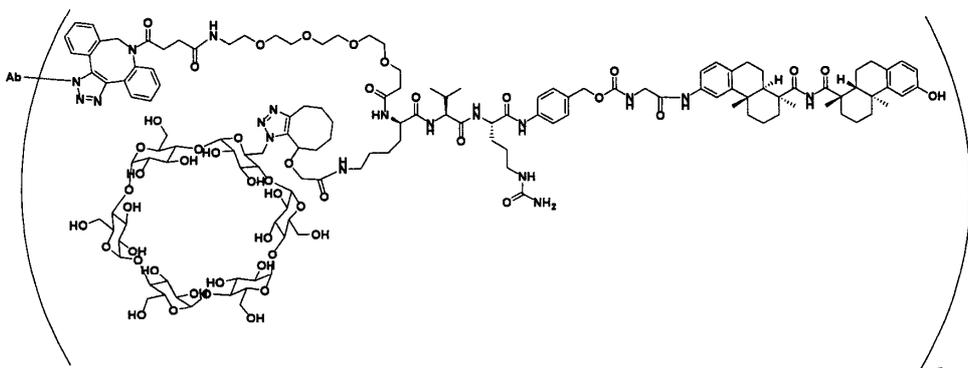
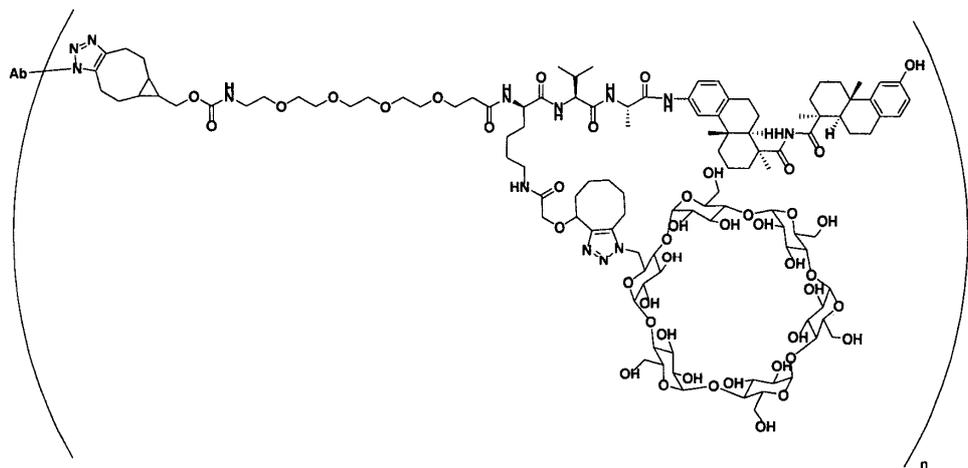


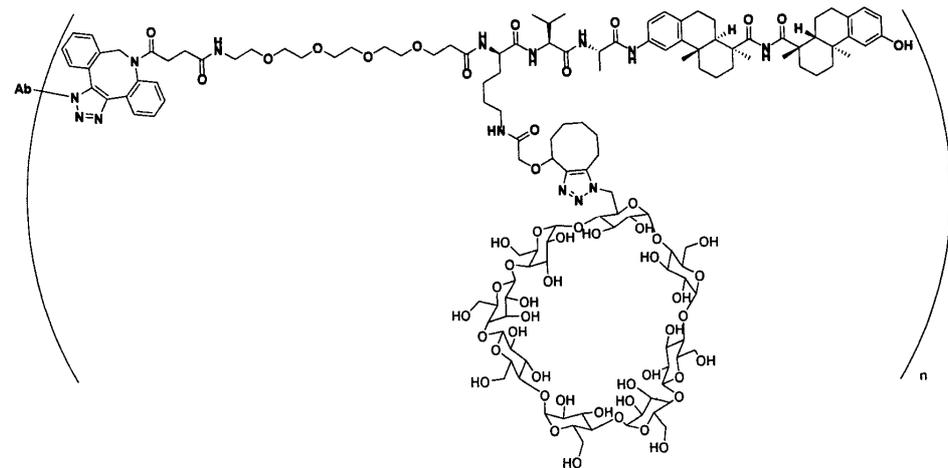
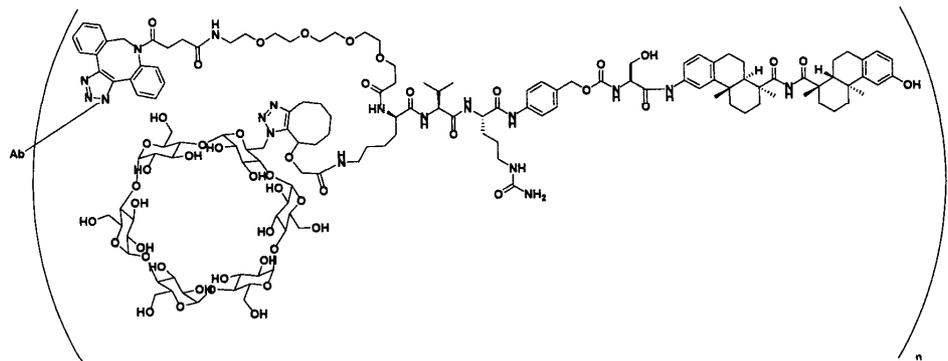
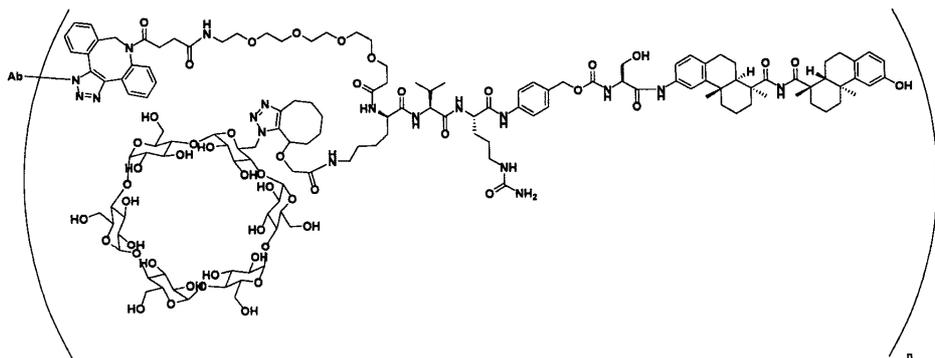


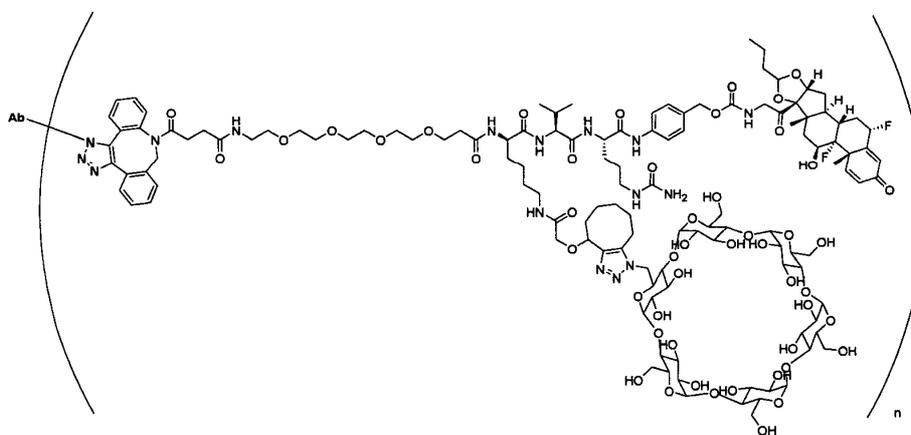
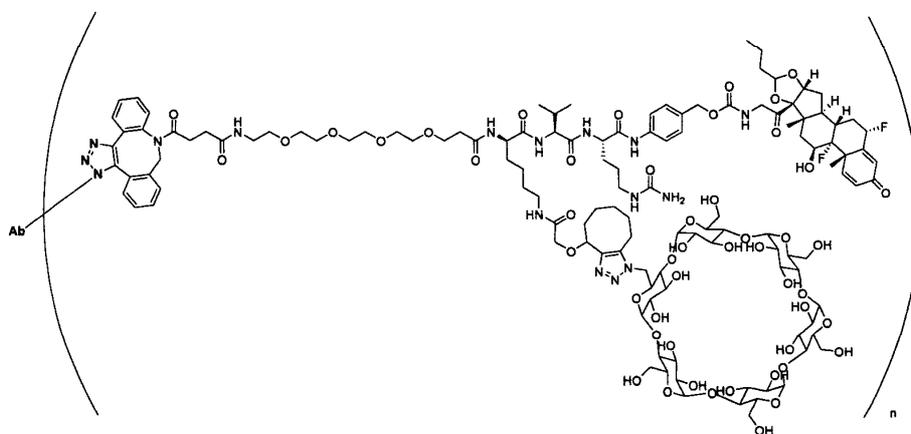
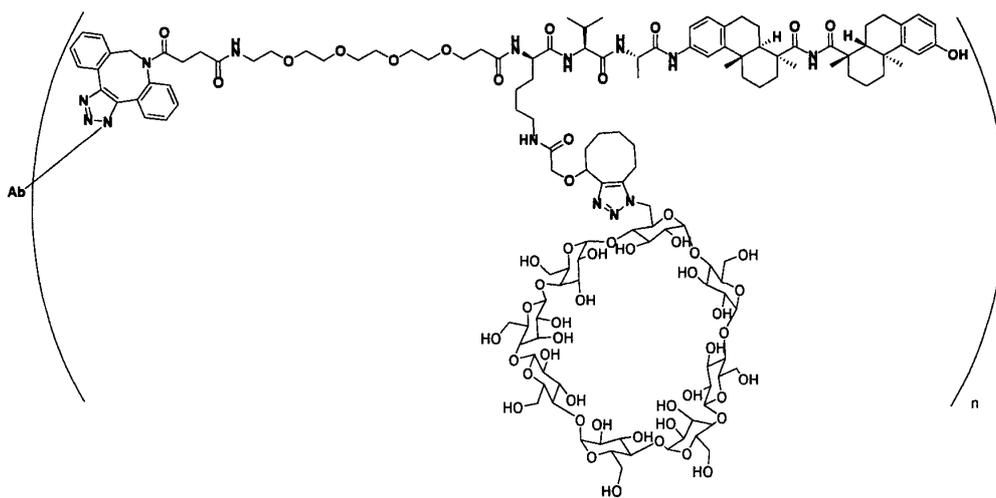


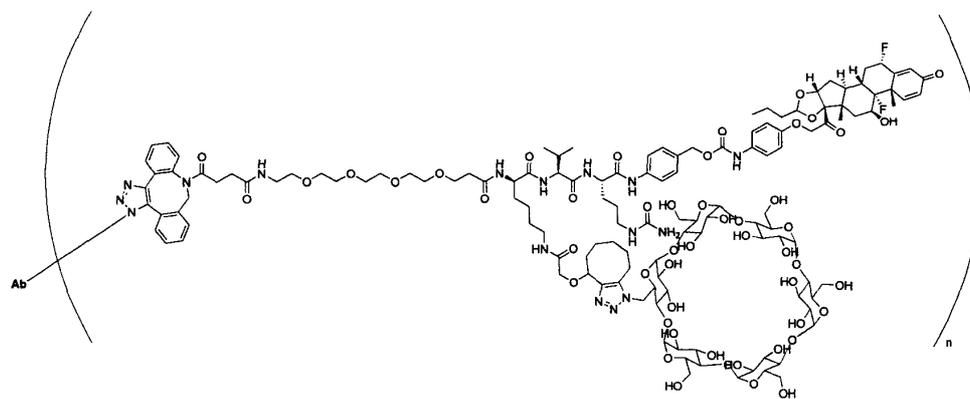
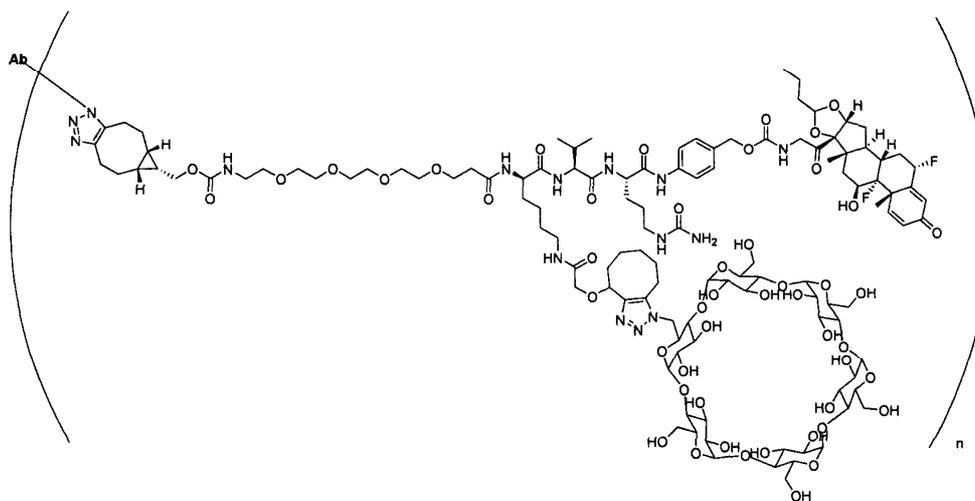
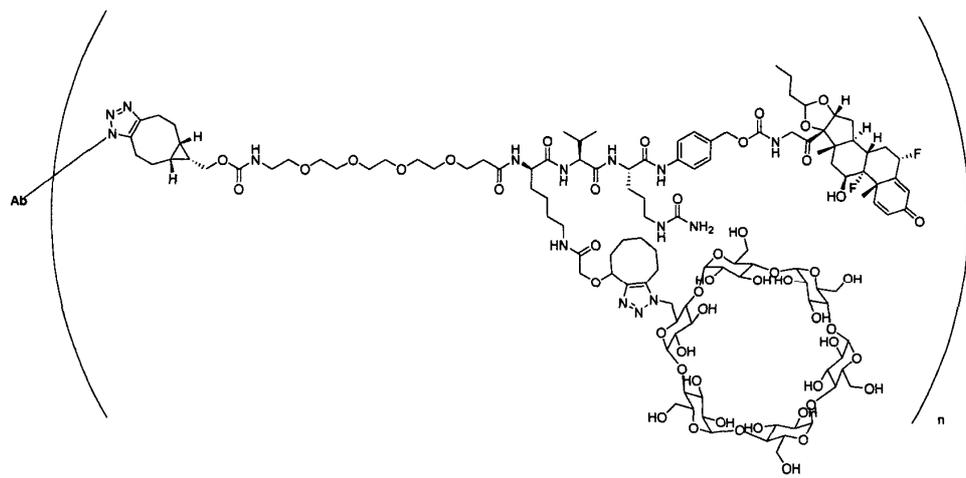


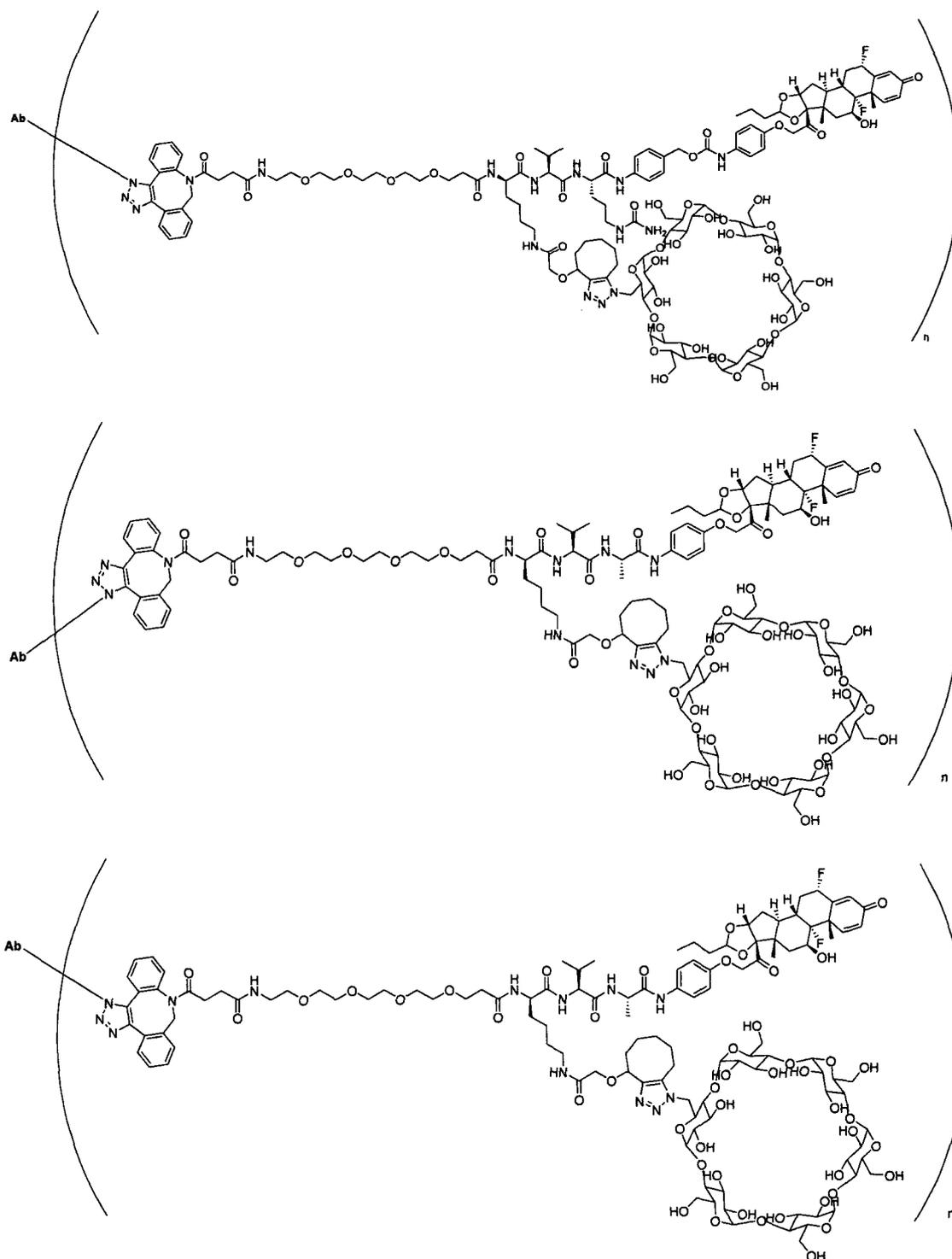










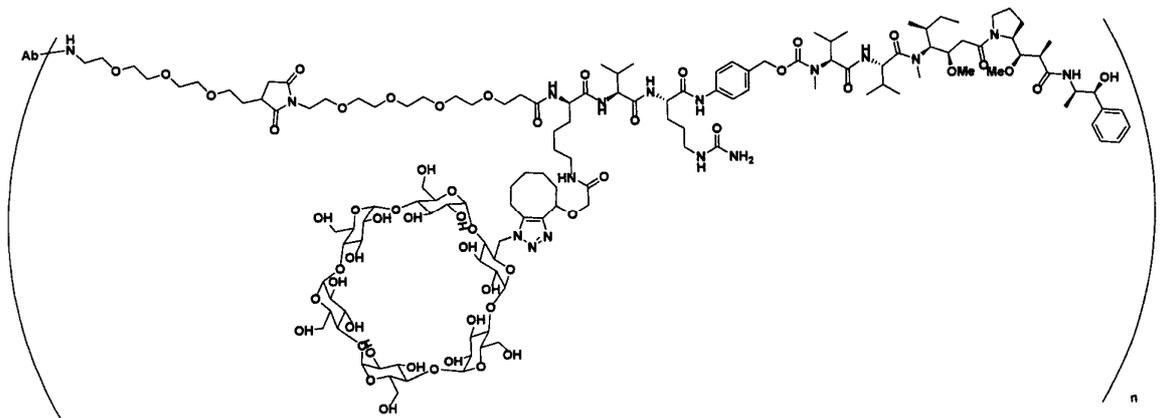
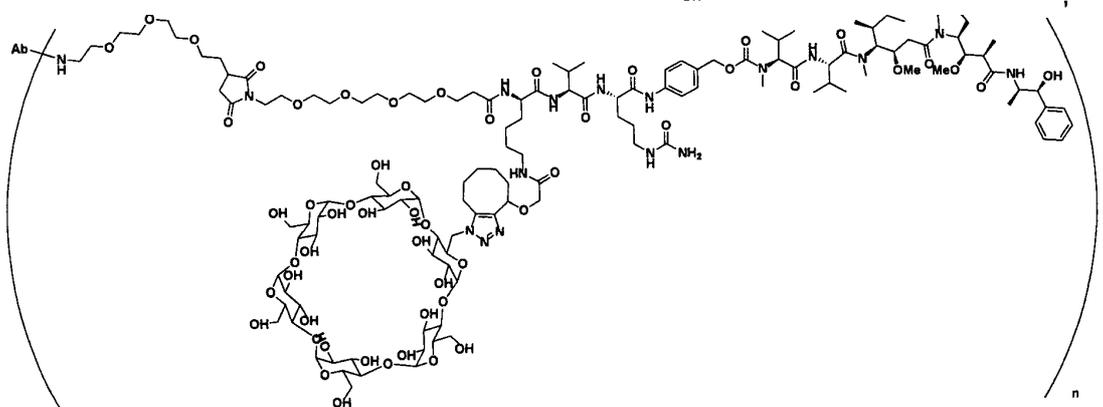
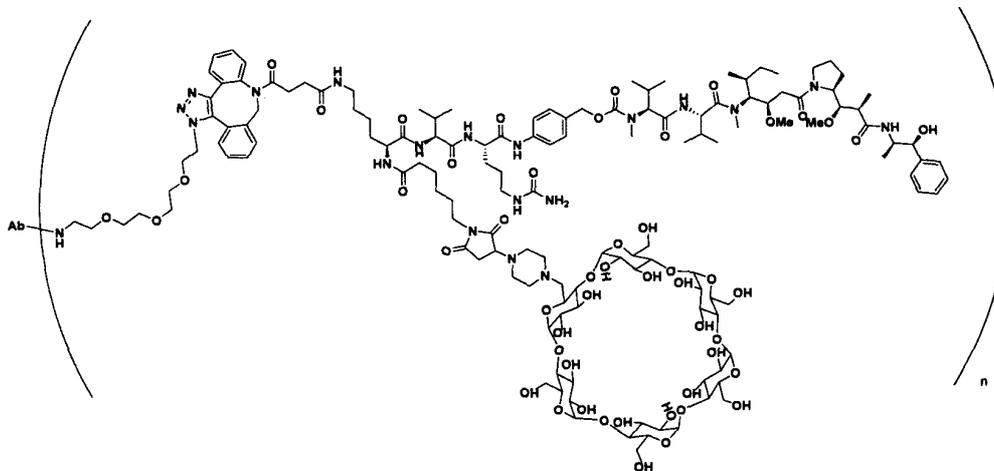
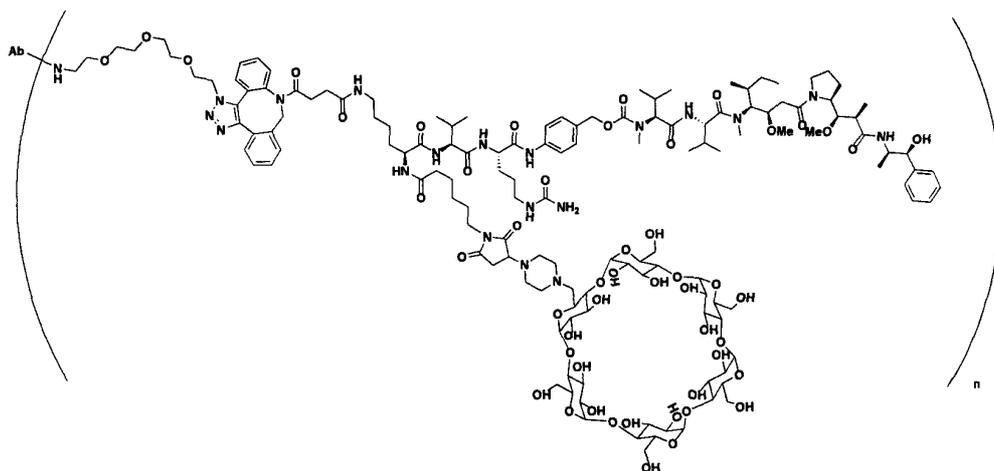


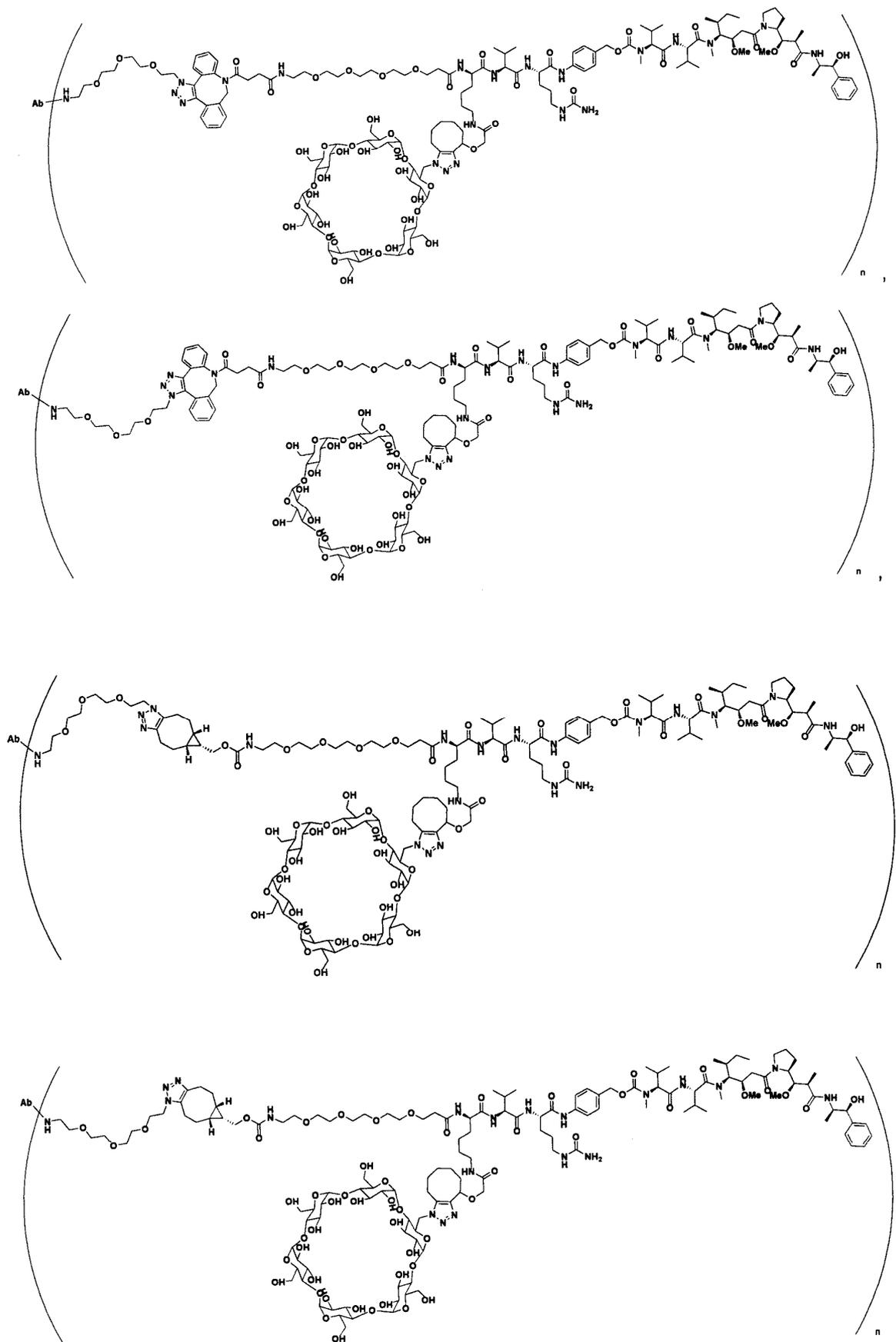
или региоизомер, стереоизомерная форма, фармацевтически приемлемая соль, их сольват или их смесь, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В этих примерах Ab может быть прямо или косвенно связан с полезной нагрузкой. В некоторых примерах, когда Ab косвенно

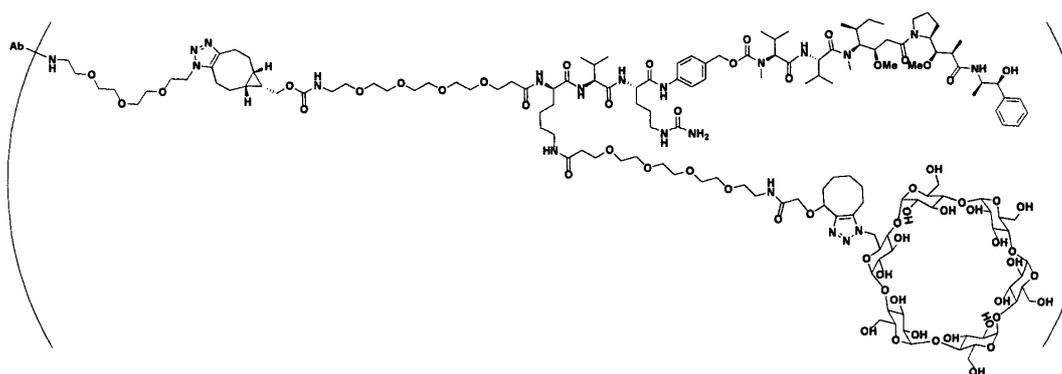
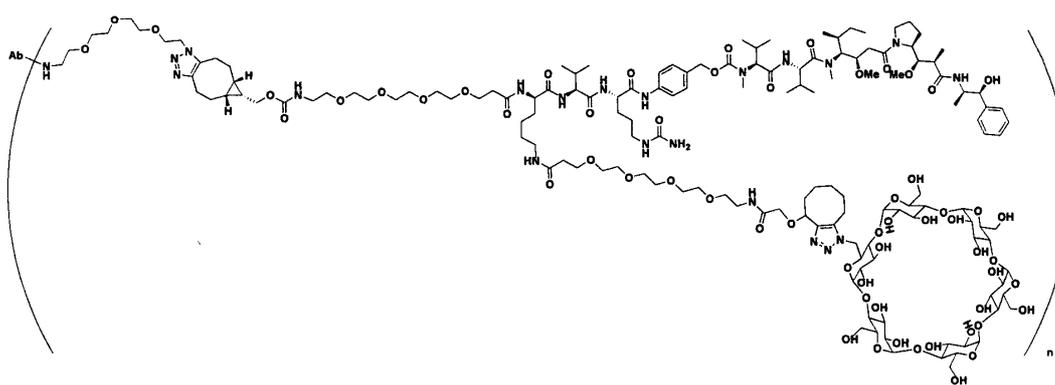
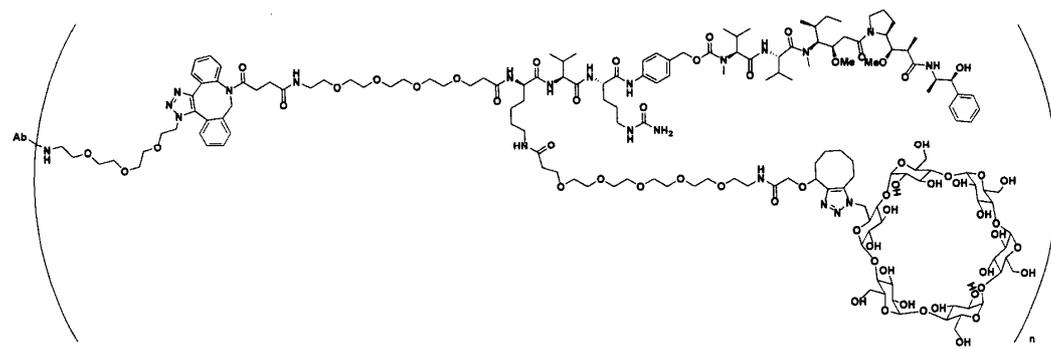
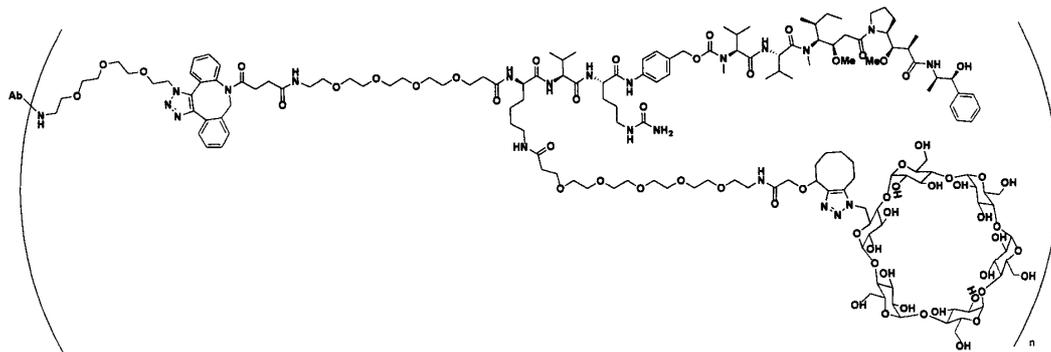
связан с полезной нагрузкой компоновщика, тогда $Ab-\text{NH}-(\text{CH}_2)_x-\text{NH}_2$ представляет собой $Ab-\text{NH}-(\text{CH}_2)_x-\text{NH}_2$, где индекс x представляет собой целое число от 1 до 4. В некоторых примерах индекс x равен 1. В некоторых примерах индекс x равен 2. В некоторых примерах индекс x равен 3. В некоторых примерах индекс x равен 4. Здесь Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых

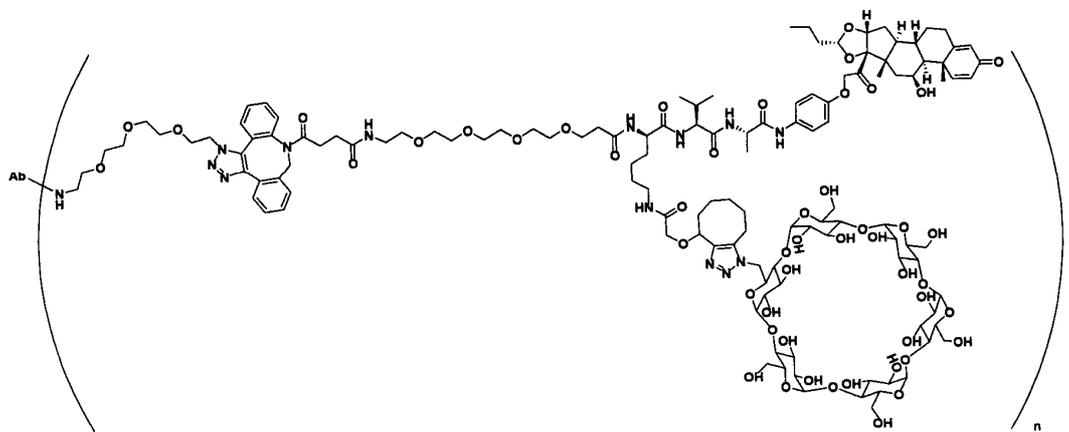
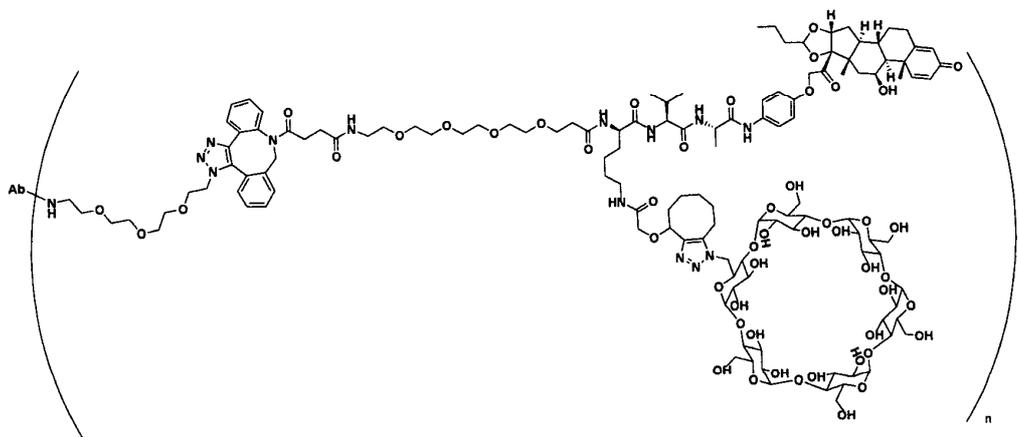
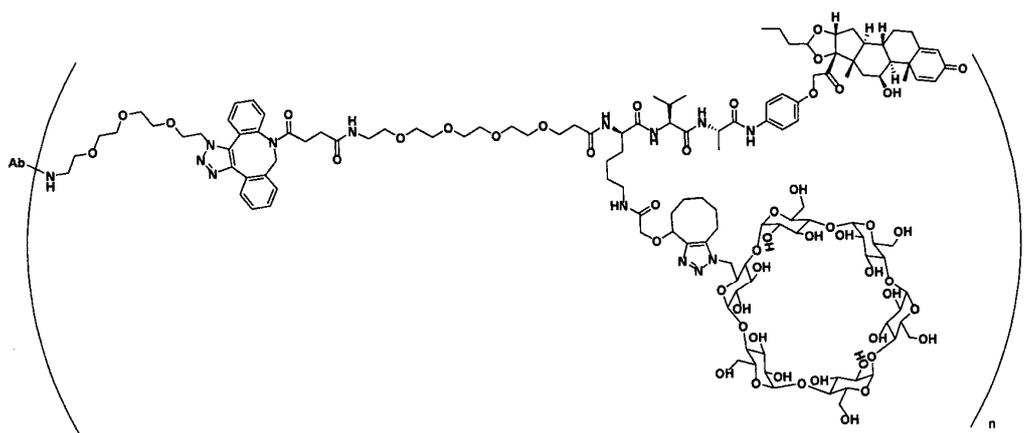
примерах проиллюстрированная группа ПЭГ, т.е. $-(\text{CH}_2)_x-\text{O}-$ связана с глутамином на Ab. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число от 1 до 30, например от 1 до 4, например 1, 2, 3 или 4.

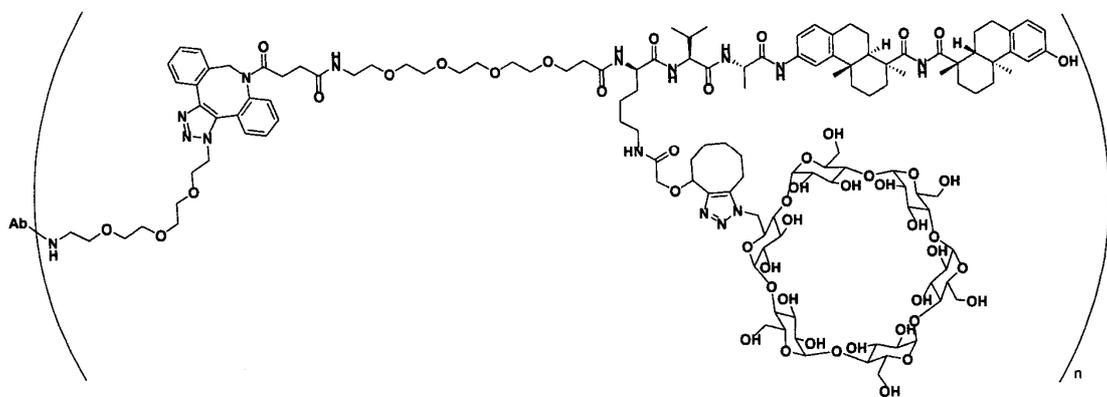
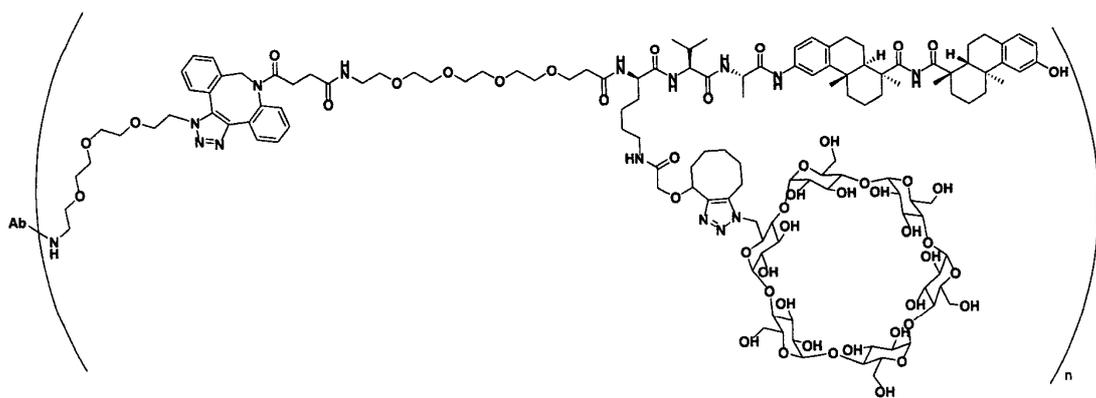
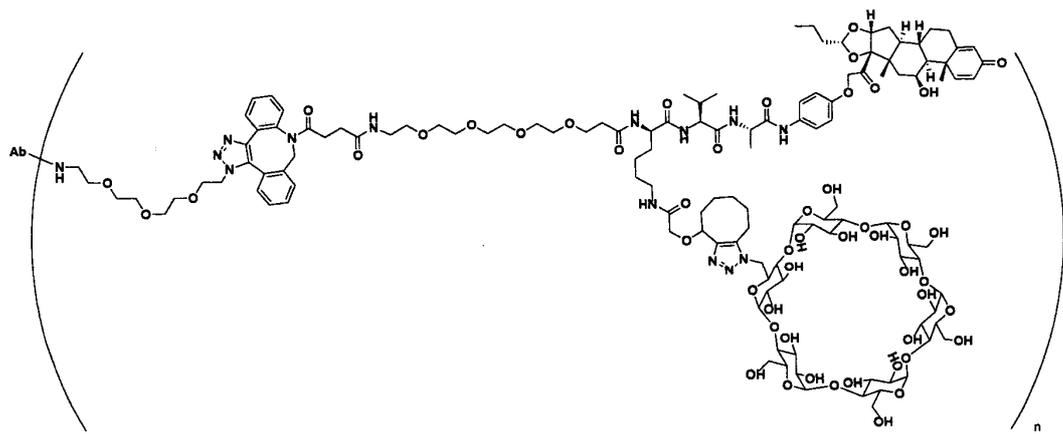
В некоторых примерах соединение формулы (I) выбрано из:

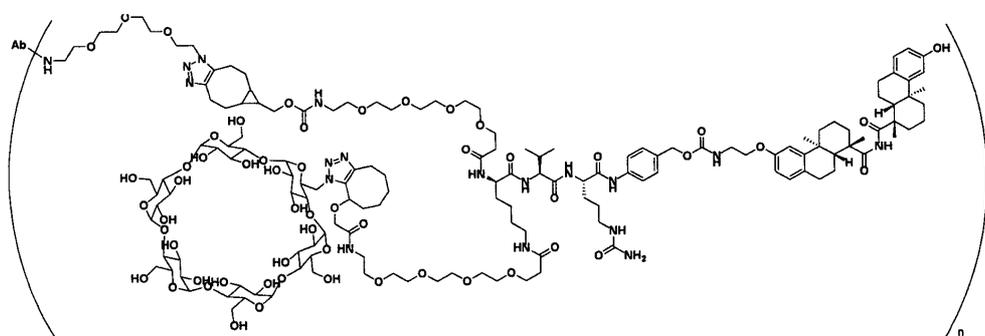
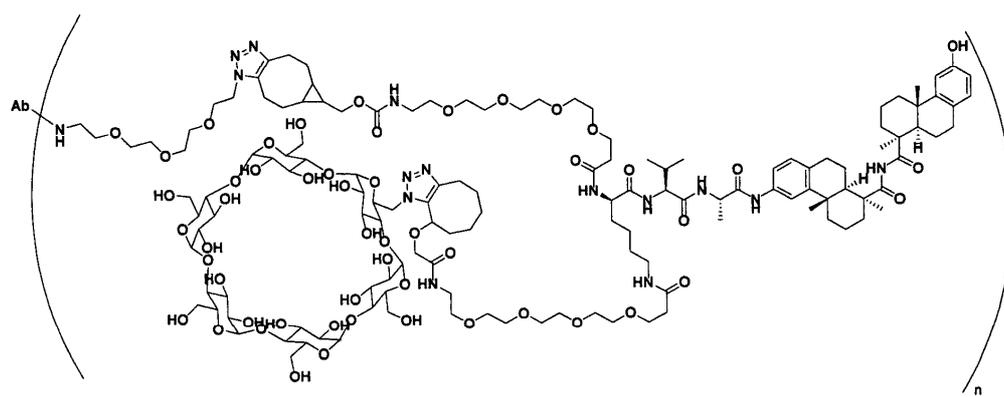
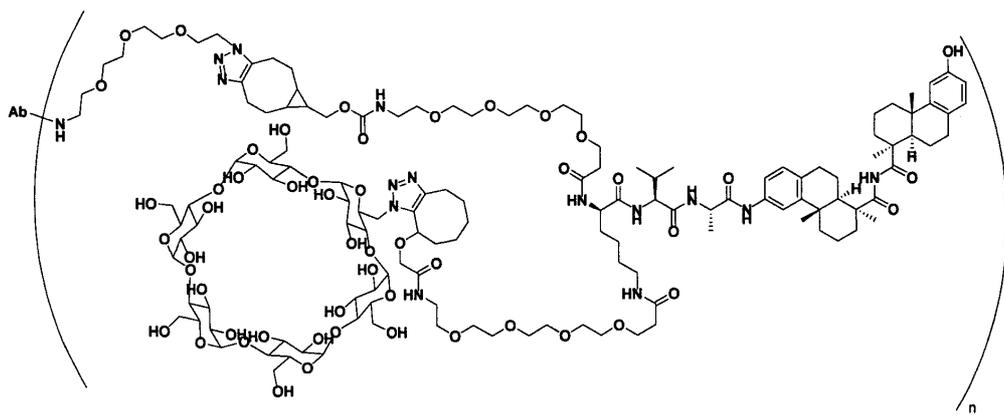


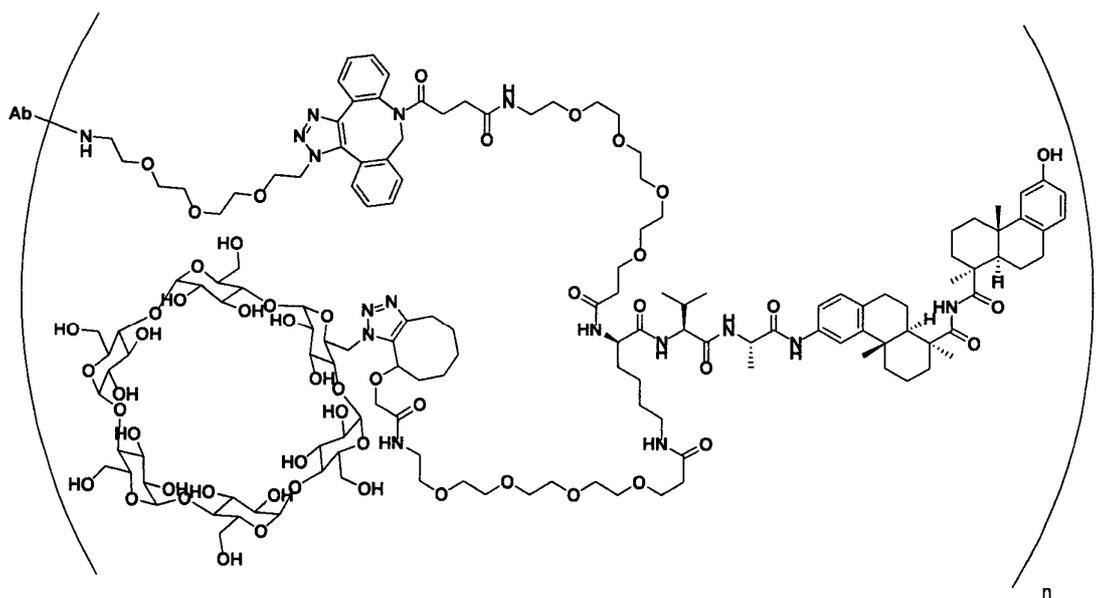
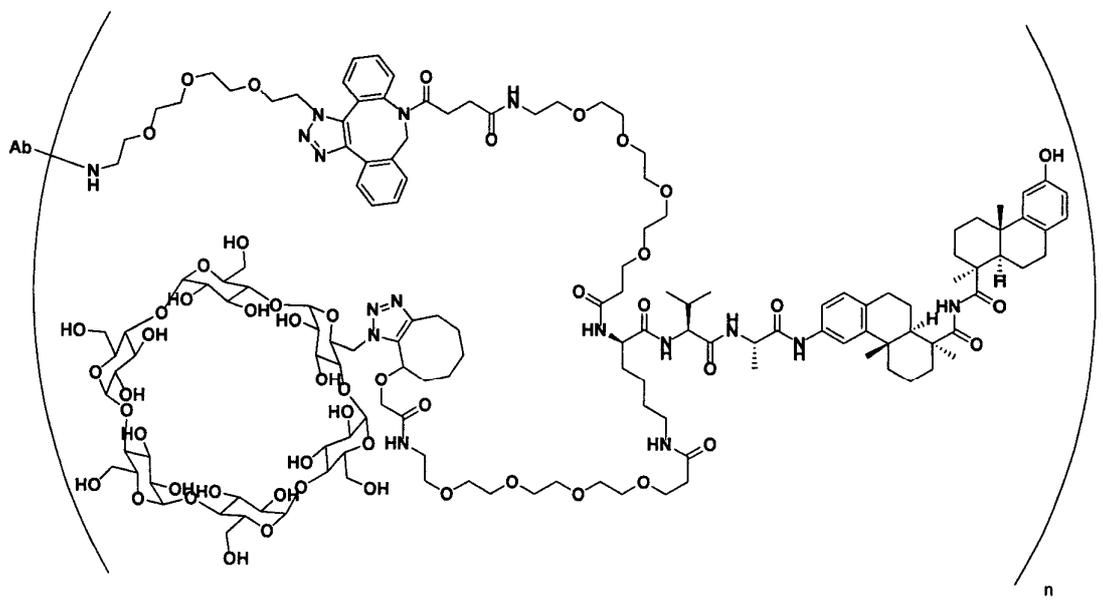
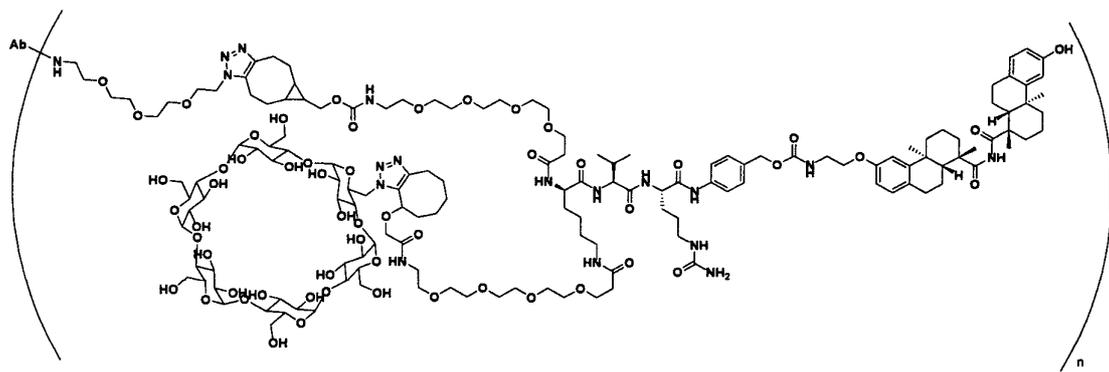


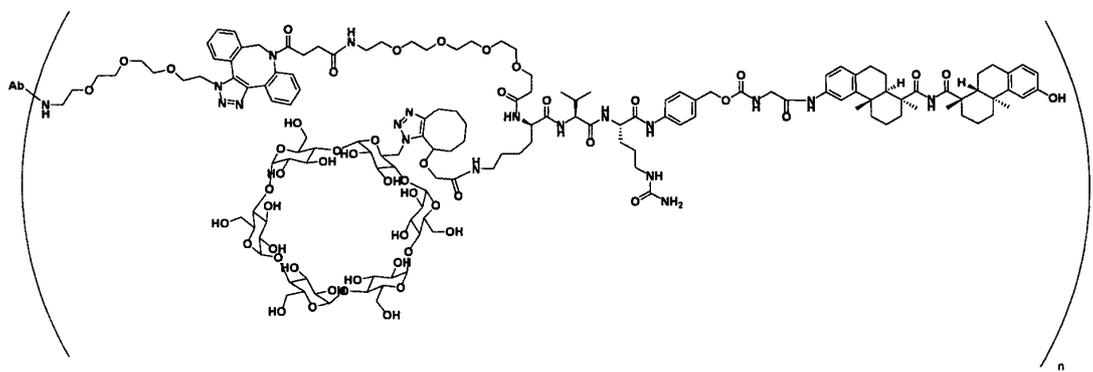
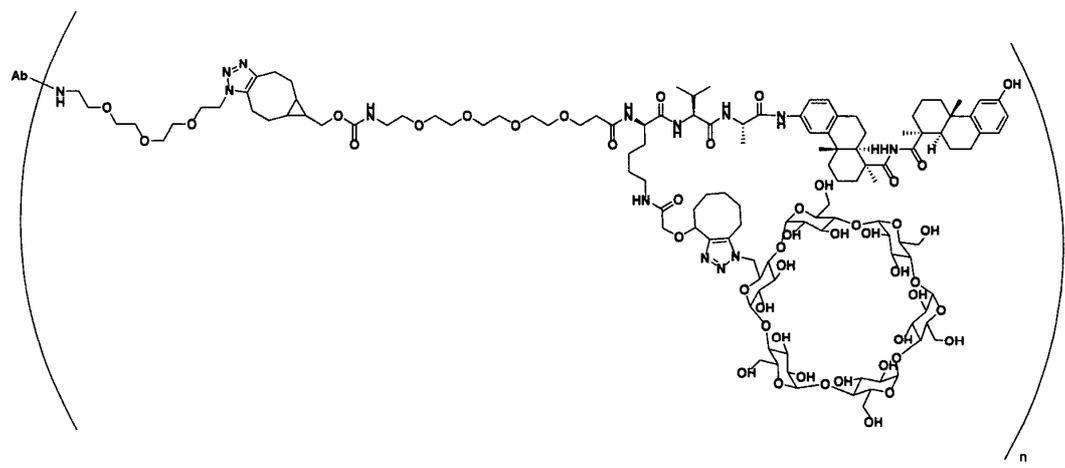
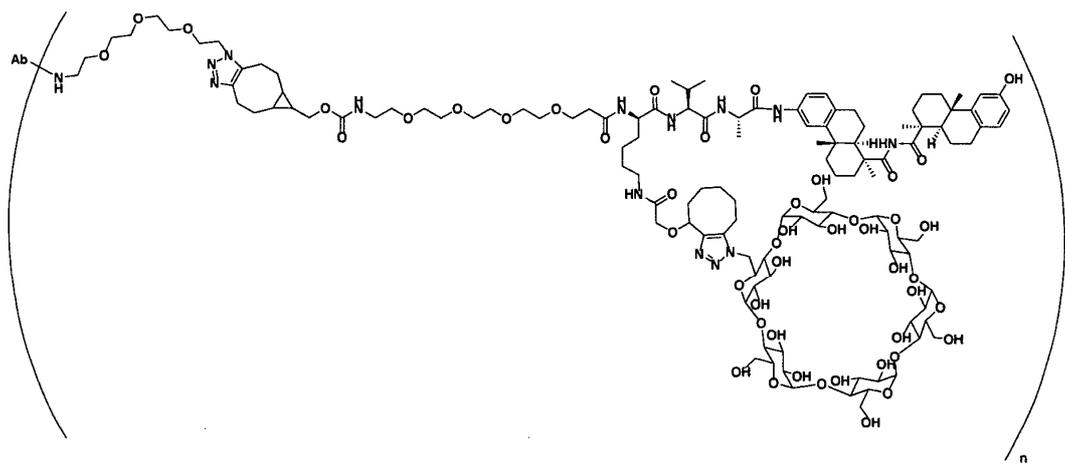


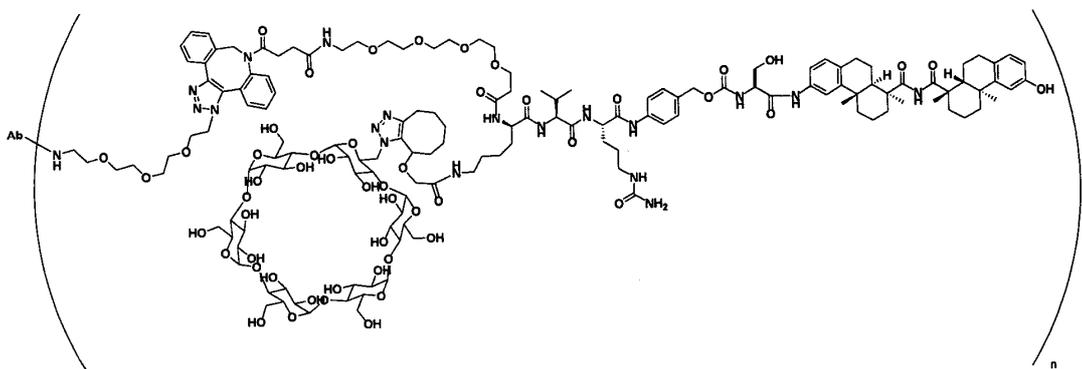
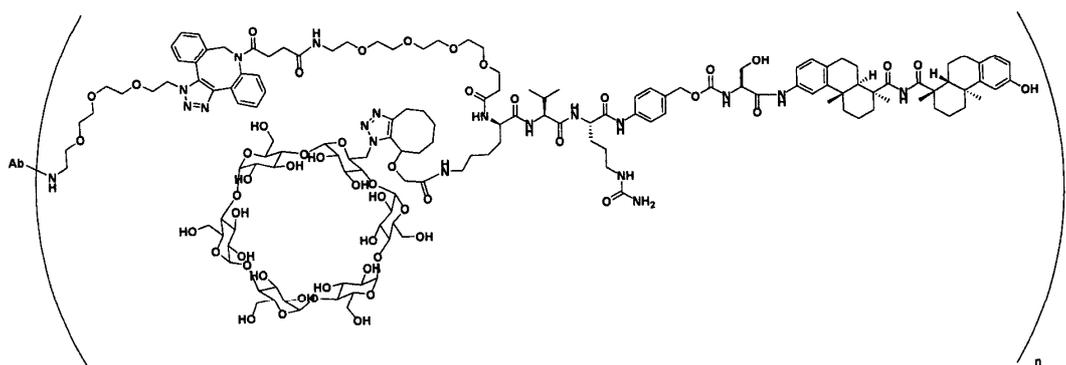
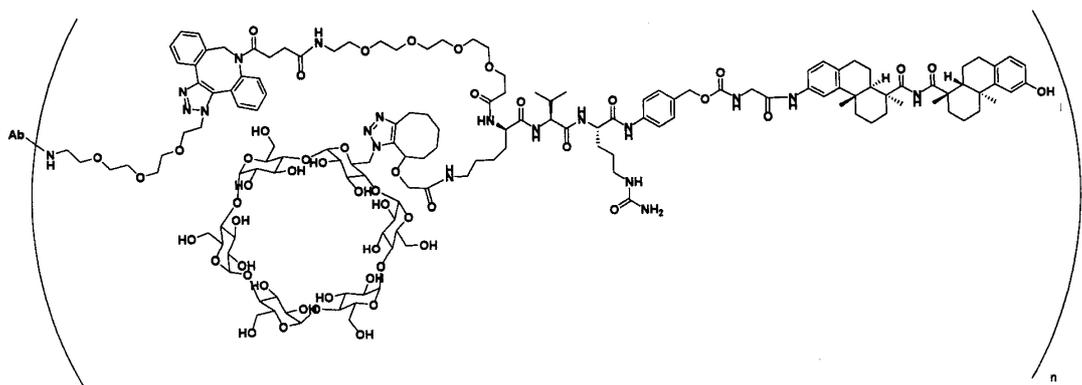


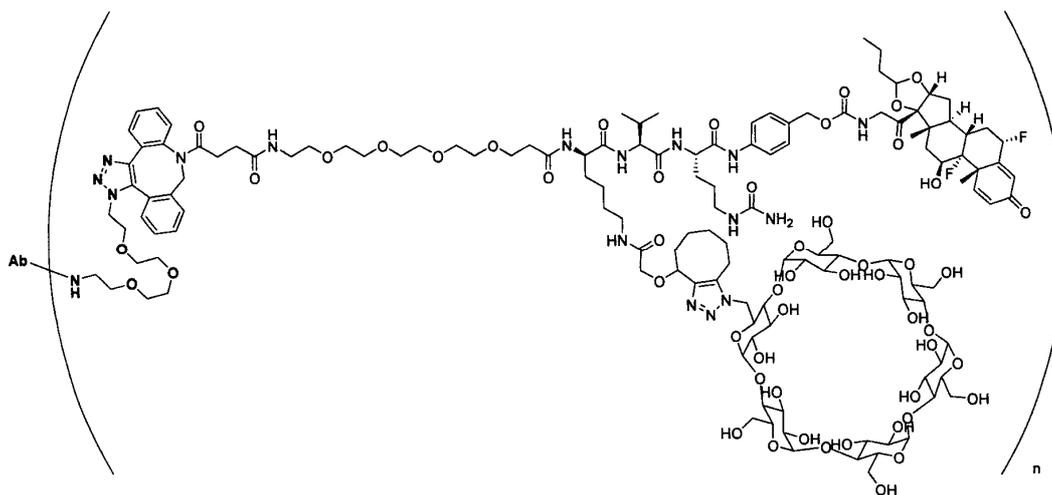
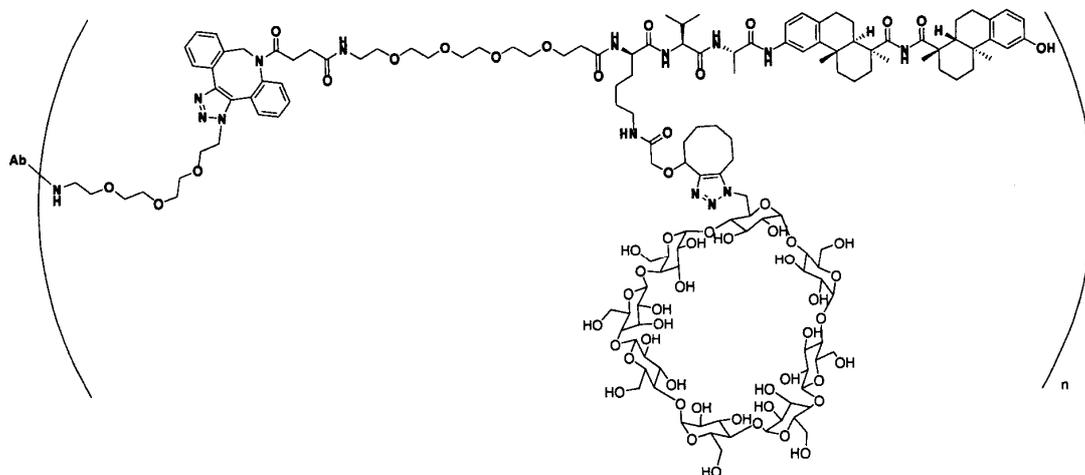
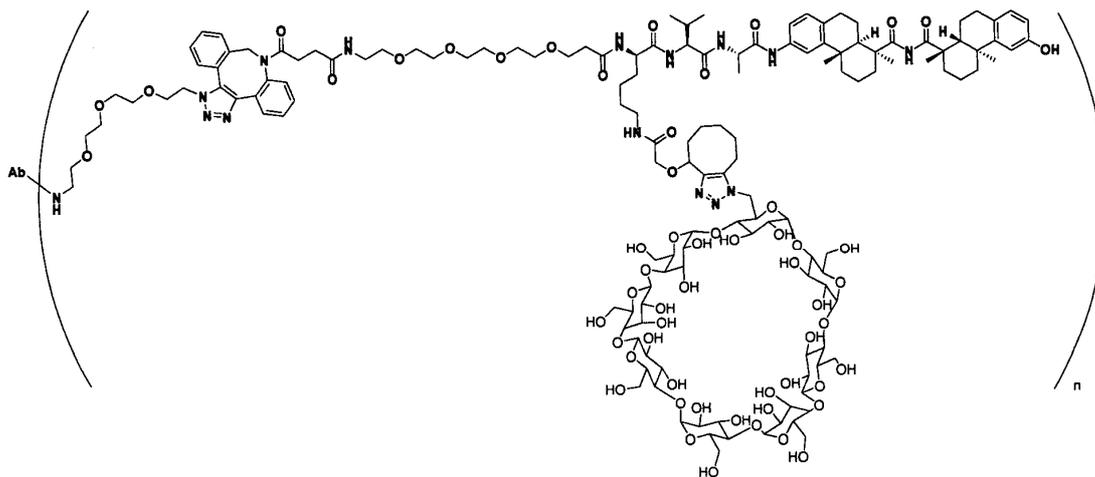


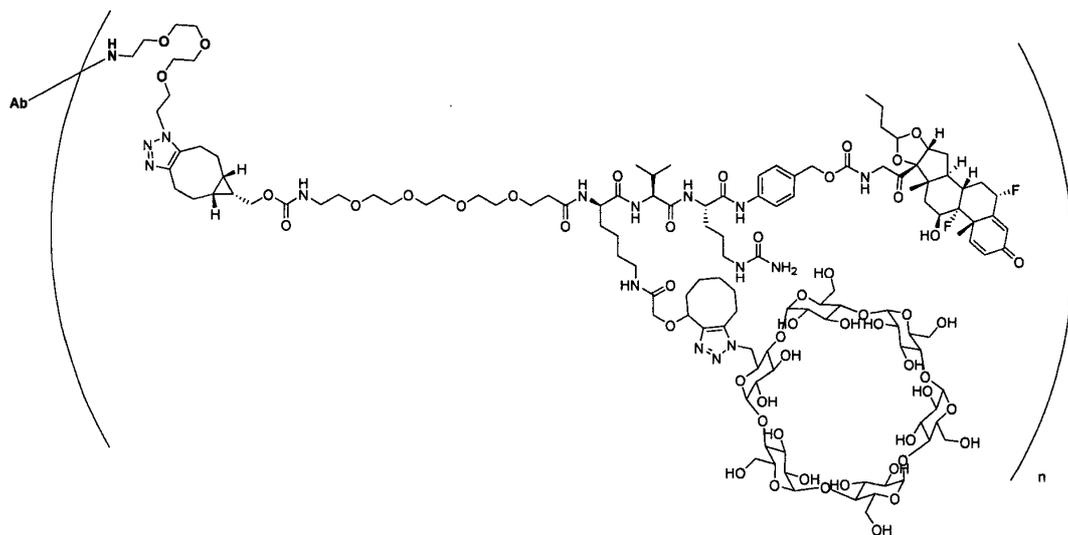
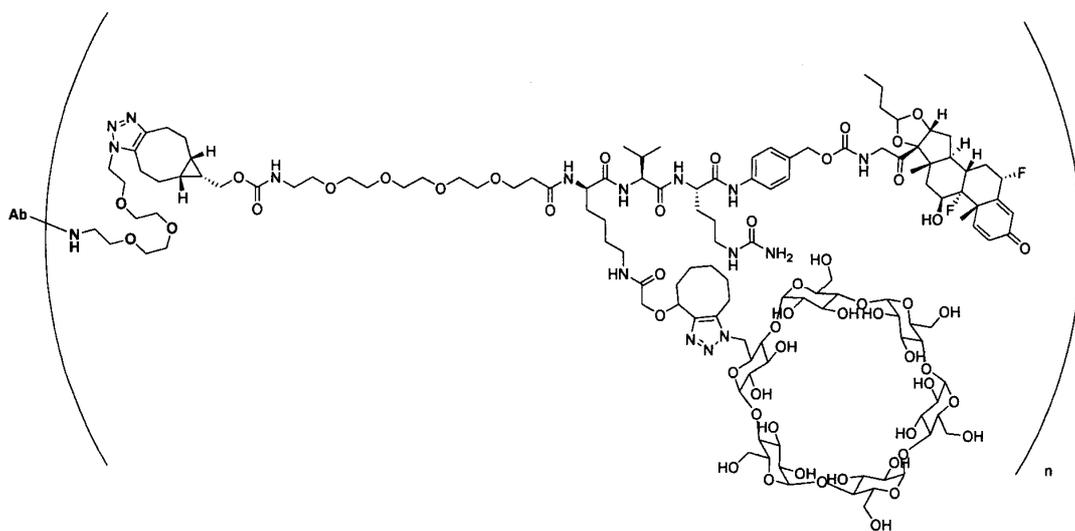
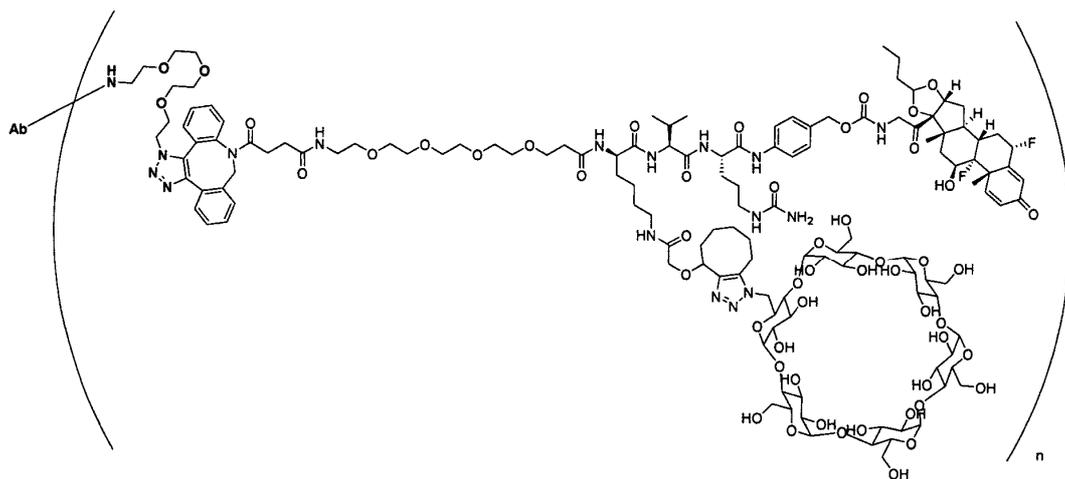


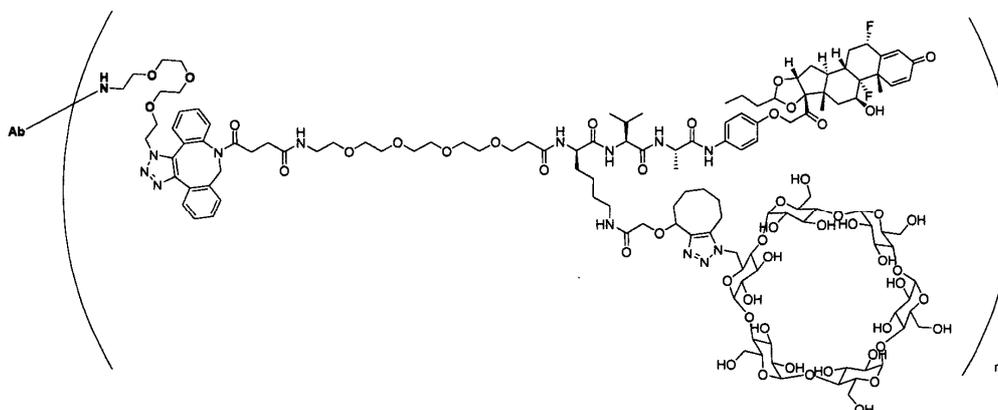
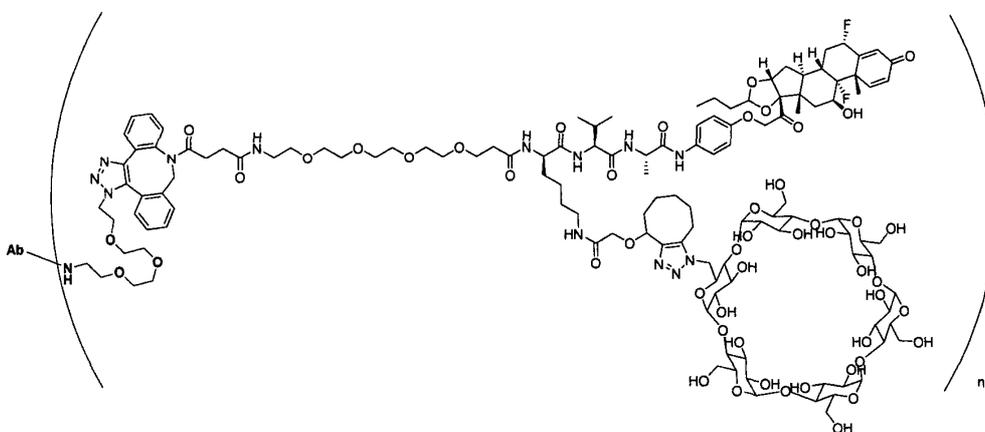
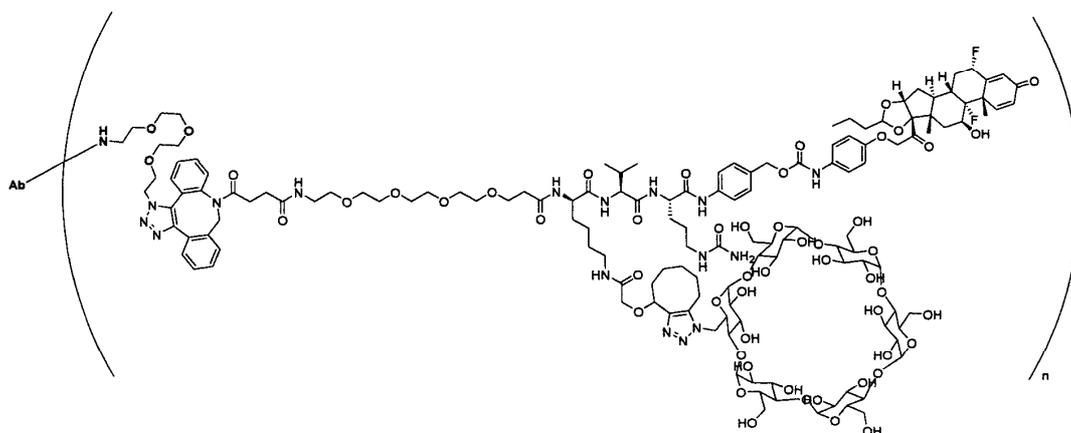
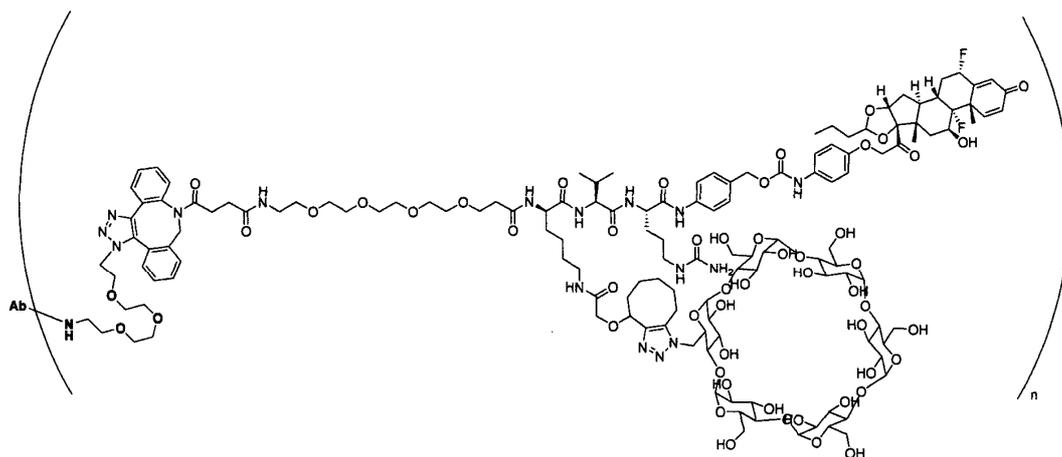












или региоизомер или его стереоизомерная форма, его фармацевтически приемлемая соль или его сольват, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых примерах, изложенных в настоящем документе, представляют собой фармацевтическую композицию, содержащую соединение, изложенное в данном документе, включая любое из вышеупомянутых соединений или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

Специалистам в данной области будет понятно, что аминокислотный остаток может быть ахиральным или хиральным, например, L-аминокислотой или D-аминокислотой. Аминокислоты обычно включают аминокислотную боковую цепь. Боковая цепь может быть боковой цепью любых аминокислот, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления боковая цепь представляет собой боковую цепь гистидина, аланина, изолейцина, аргинина, лейцина, аспарагина, лизина, аспарагиновой кислоты, метионина, цистеина, фенилаланина, глутаминовой кислоты, треонина, глутамина, триптофана, валина, орнитина, селеноцистеина, серин, глицин, гомоглицин (например, β -гомоглицин) или тирозин. Специалистам в данной области будет понятно, что пептид может быть ахиральным или хиральным, например, включая рацемические DL-аминокислоты или нерацемические D- или L-аминокислоты и их диастереомерные смеси. Боковые цепи пептидов являются такими, как описано в контексте аминокислот выше. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что N-алкильный аминокислотный остаток включает алкильный заместитель, как определено здесь, в концевой аминогруппе аминокислоты или концевой аминогруппе пептида.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, нижний индекс n представляет собой целое число от 0 до 30. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 0. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 1. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 2. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 3. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 4. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 5. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 6. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 7. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 8. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 9. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 10. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 11. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 12. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 13. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 14. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 15. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 16. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 17. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 18. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 19. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 20. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 21. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 22. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 23. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 24. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 25. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 26. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 27. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 28. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 29. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс n равен 30.

Связывающие агенты

Подходящие связывающие вещества для любого из конъюгатов, представленных в мгновенном раскрытии, включают, но не ограничиваются антителами, лимфокинами, гормонами, факторами роста, вирусными рецепторами, интерлейкинами или любыми другими связывающими клетки или пептидными связывающими молекулами или веществами. Подходящие связывающие агенты также включают полипептиды.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, связывающий агент (ВА) выбран из любого полипептида. Примеры полипептидов включают, но не ограничиваются ими, природные полипептиды и неприродные полипептиды. Примеры полипептидов включают, но не ограничиваются ими, полипептиды, полученные из генетически модифицированных организмов.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, ВА выбирают из рецепторов, цитокинов, белков, ферментов, связывающих агентов, молочных пептидов, рибосомных пептидов, нерибосомальных пептидов, пептонов и пептидных фрагментов. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, ВА выбирают из антимикробных пептидов, тахикининовых пептидов, вазоактивных кишечных пептидов, пептидов, связанных с панкреатическим полипептидом, опиодных пептидов и кальцитониновых пептидов. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, ВА представляет собой выбранный натрийуретический пептид В-типа (BNP), лактотрипептиды, нейропептиды, липопептиды, протеозы или гормоны.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, ВА выбран из коротких аминокислотных цепей, содержащих две или более аминокислот, связанных вместе. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, ВА выбран из дипептидов (Val-Cit), трипептидов и тетрапептидов (например, Val-Gly-Ser-Ala), имеющих две, три или четыре аминокислоты, связанные вместе, соответственно. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, ВА выбран из дипептидов, трипептидов, тетрапептидов, пентапептидов, гексапептидов, гептапептидов, октапептидов, нонапептидов, декапептидов, ундекапептидов и икосапептидов.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, ВА выбран из любых белков. В некоторых примерах белки включают только природные аминокислоты. В некоторых примерах белки дополнительно включают неприродные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент представляет собой антитело его антигенсвязывающего фрагмента. Антитело может быть в любой форме, известной специалистам в данной области. Используемый здесь термин "антитело" означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном. Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (в настоящем описании используется сокращение HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три константных домена, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (в настоящем описании используется сокращение LCVR и V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Указанные области V_H и V_L можно дополнительно разделить на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), разделенные более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждый V_H и V_L содержит три CDR и четыре FR, расположенные от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В различных вариантах осуществления изобретения FR антител, подходящие для соединений по настоящему изобретению (или их антигенсвязывающей части), могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть природно или искусственно модифицированы. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR. Используемый здесь термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобное, используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, ферментативно полученный, синтетический или генно-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген для образования комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антитела, используя любые подходящие стандартные методы, такие как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной генной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антитела) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и манипулировать химически или с помощью методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или нескольких вариабельных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д. Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂ фрагмента; (iii) Fd-фрагменты; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как доменно-специфические антитела, однодоменные антитела, доменно-делеционные антитела, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), малые модульные иммунофармацевтические препараты (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акул также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент", как используется в данном документе. Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом или в рамке с одной или несколькими каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H , связанный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть размещены относительно друг друга в любом подходящем расположении. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димерь V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L . В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный с по

меньшей мере одним константным доменом.

Неограничивающие примерные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H-C_{H1} ; (ii) V_H-C_{H2} ; (iii) V_H-C_{H3} ; (iv) $V_H-C_{H1}-C_{H2}$; (v) $V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (vi) $V_H-C_{H2}-C_{H3}$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_{H1} ; (ix) V_L-C_{H2} ; (x) V_L-C_{H3} ; (xi) $V_L-C_{H1}-C_{H2}$; (xii) $V_L-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$; (xiii) $V_L-C_{H2}-C_{H3}$; and (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации переменного и константного доменов, включая любую из примерных конфигураций, перечисленных выше, переменный и константный домены могут быть либо непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны полной или частичной шарнирной или линкерной областью. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одном полипептиде молекулы. Как и в случае полных молекул антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Полиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере два разных переменных домена, где каждый переменный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифических антител, включая примеры форматов биспецифических антител, раскрытых в данном документе, может быть адаптирован для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием рутинных методик, доступных в данной области. В определенных вариантах осуществления изобретения антитела по изобретению представляют собой антитела человека. Предполагается, что термин "человеческое антитело" в контексте настоящего описания включает антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человеческого иммуноглобулина зародышевой линии (например, мутациями, введенными случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако, термин "человеческое антитело", в данном контексте, не подразумевает включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, присоединены к каркасной последовательности человека. Термин "человеческое антитело" не включает встречающиеся в природе молекулы, которые обычно существуют без модификации или вмешательства/манипуляции человека во встречающемся в природе немодифицированном живом организме. Антитела по изобретению могут в некоторых вариантах осуществления быть рекомбинантными человеческими антителами. Термин "рекомбинантное человеческое антитело", как используется в данном документе, предназначен для включения всех человеческих антител, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такими как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описано ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки человеческих антител (описано далее ниже), антитела, выделенные от животного (например, мыши), которое трансгенно для генов человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, когда используется трансгенное для человеческих Ig-последовательностей животное, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, следовательно, аминокислотным последовательностям областей V_H и V_L рекомбинантного антитела представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и связаны с ними, в естественных условиях не могут существовать в репертуаре зародышевой линии человеческого антитела *in vivo*. Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе дисульфидной связью тяжелой цепи между цепями. Во второй форме димеры не связаны через межцепные дисульфидные связи, и образуется молекула около 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепи (полуантитела). Эти формы чрезвычайно трудно разделить, даже после аффинной очистки. Частота появления второй формы в различных интактных изоформах IgG обусловлена, но не ограничивается структурными различиями, связанными с изоформой шарнирной области антитела. Одна аминокислотная замена в шарнирной области шарнира IgG4 человека может значительно уменьшить появление второй формы (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) до уровней, обычно наблюдаемых с использованием шарнира человеческого IgG1. Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие одну или несколько мутаций в области петли, области C_{H2} или C_{H3} , которые могут быть желательными, например, при производстве, для улучшения выхода желаемой формы антитела. Антитела согласно изобретению могут быть изолированными антителами. "Выделенное антитело", как используется

в настоящем документе, означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено, по меньшей мере, из одного компонента его естественной среды. Например, антитело, которое было отделено или удалено, по меньшей мере, из одного компонента организма или из ткани или клетки, в которой антитело существует в природе или продуцируется естественным путем, является "выделенным антителом" для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела представляют собой антитела, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Согласно определенным вариантам осуществления выделенное антитело может быть по существу не содержащим другого клеточного материала и/или химических веществ. Антитела, используемые в данном документе, могут включать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации можно легко установить путем сравнения раскрытых здесь аминокислотных последовательностей с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или несколько аминокислот в одной или нескольких каркасных и/или CDR-областях мутированы в соответствующий остаток(и) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или к соответствующему остатку(ам) другой последовательности зародышевой линии человека, или к консервативной аминокислотной замене соответствующего остатка(ей) зародышевой линии (такие изменения последовательности упоминаются в настоящем документе совместно как "мутации зародышевой линии"). Специалист в данной области, начиная с описанных здесь последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко продуцировать многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все остатки каркаса и/или CDR в доменах V_H и/или V_L мутируют обратно в остатки, обнаруженные в исходной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только определенные остатки мутируют обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или несколько остатков каркаса и/или CDR мутируют в соответствующий остаток(и) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально было получено антитело). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркаса и/или областей CDR, например, в которых определенные отдельные остатки мутированы в соответствующий остаток конкретной последовательности зародышевой линии, тогда как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или мутируют до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко проверить на одно или несколько желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или улучшенные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств быть), снижена иммуногенность и др. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные этим общим способом, включены в настоящее изобретение. Антитела, полезные для соединений по настоящему изобретению, также включают антитела, содержащие варианты любой из раскрытых здесь аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющих одну или несколько консервативных замен. Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в переменной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с различными участками антигена и могут иметь разные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно сопоставленными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать фрагменты сахаридов, фосфорильных групп или сульфонильных групп на антигене.

В определенных вариантах осуществления антитело содержит легкую цепь. В определенных вариантах осуществления легкая цепь представляет собой легкую каппа-цепь. В определенных вариантах осуществления легкая цепь представляет собой легкую лямбда-цепь. В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgA. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgD. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgE. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgG. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgM. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgG1. В

некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgG2. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgG3. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgG4. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgA1. В некоторых аспектах тяжелая цепь представляет собой IgA2.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой фрагмент антитела. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fv. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой Fab-фрагмент. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент F(ab')₂. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой Fab'-фрагмент. В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент scFv (sFv).

В некоторых аспектах фрагмент антитела представляет собой фрагмент scFv-Fc.

В некоторых вариантах осуществления антитело является моноклональным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является поликлональным антителом.

В некоторых вариантах осуществления антитело является химерным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является гуманизированным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело является антителом человека.

Антитело может обладать специфичностью связывания для любого антигена, который считается подходящим для специалистов в данной области. В определенных вариантах осуществления антиген представляет собой трансмембранную молекулу (например, рецептор) или фактор роста. Типичные антигены включают, но не ограничиваются ими, молекулы, такие как ренин; гормон роста, включая гормон роста человека и бычий гормон роста; фактор высвобождения гормона роста; гормон парашитовидной железы; гормон, стимулирующий щитовидную железу; липопротеины; альфа1-антитрипсин; А-цепь инсулина; В-цепь инсулина; проинсулин; фолликулостимулирующий гормон; кальцитонин; лютеинизирующий гормон; глюкагон; факторы свертывания крови, такие как фактор vmc, фактор IX, тканевой фактор (TF) и фактор фон Виллебранда; противосвертывающие факторы, такие как белок С; предсердный натрийуретический фактор; поверхностно-активное вещество легкого; активатор плазминогена, такой как урокиназа или активатор плазминогена мочи человека или тканевого типа (t-PA); бомбезин; тромбин; кроветворный фактор роста; фактор некроза опухоли альфа и бета; энкефалиназа; RANTES (регулируется при активации нормально экспрессируемых и секретируемых Т-клеток); воспалительный белок макрофагов человека (MIP-I-альфа); сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин; ингибирующее вещество Мюллера; Релаксин А-цепь; релаксиновая В-цепь; прорелаксин; мышинный гонадотропин-ассоциированный пептид; микробный белок, такой как беталактамаза; ДНКазы; 19Е; цитотоксический антиген, ассоциированный с Т-лимфоцитами (CTLA), такой как CTLA-4; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов (VEGF); рецепторы для гормонов или факторов роста; белок А или D; ревматоидные факторы; нейротрофический фактор, такой как костный нейротрофический фактор (BDNF), нейротрофин-3, -4, -5 или -6 (NT-3, NT4, NT-5 или NT-6), или фактор роста нервов, такой как NGF-β; полученный из тромбоцитов фактор роста (PDGF); фактор роста фибробластов, такой как aFGF и bFGF; рецептор фактора роста фибробластов 2 (FGFR2), эпидермальный фактор роста (EGF); трансформирующий фактор роста (TGF), такой как TGF-альфа и TGF-бета, включая TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 или TGF-β5; инсулиноподобный фактор роста-1 и -II (IGF-1 и IGF-II); дез (I-3)-IGF-1 (IGF-1 мозга), инсулиноподобные белки, связывающие факторы роста, ЕрCAM, GD3, FLT3, PSMA, PSCA, MUC1, MUC16, STEAP, CEA, TENB2, рецепторы EphA, рецепторы EphB рецептор фолата, FOLR1, мезотелин, крипто, alpha/beta6, интегрины, VEGF, VEGFR, EGFR, рецептор трансферрина, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5; CD белки, такие как CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, CD152 или антитело, которое связывается с одним или несколькими связанными с опухолью антигенами или рецепторами на поверхности клеток, раскрытыми в публикации патента США № 2008/0171040 или в публикации патента США № 2008/0305044 и включены в их полном объеме путем ссылки; эритропоэтин; остеоиндуктивных факторов; иммунотоксинов; костный морфогенетический белок (КМБ); интерферон, такие как интерферон-альфа, -бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (CSFs), например, M-CSF, GM-CSF и G-CSF; интерлейкины (IL), например ИЛ-1 - ИЛ-10; супероксиддисмутаза; Т-клеточные рецепторы; белки поверхностных мембран; ускоряющий фактор распада; вирусный антиген, например, часть оболочки ВИЧ; транспортные белки; рецепторы самонаведения; адресины; регуляторные белки; интегралы, такие как CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 и VCAM; антиген, связанный с опухолями, такой как белки AFP, ALK, B7H4, BAGE, β-катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9 (углекислый ангидрат IX), каспаза-8, CD20, CD40, CD123, CDK4, CEA, CLEC12A, c-kit, cMET, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, эндоглин, Ерcam, EphA2, ErbB2/Her2, ErbB3/Her3, ErbB4/Her4, ETV6-AML, Fra-1, FOLR1, белки GAGE (например, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/EBNA1, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R, LGR5, LMP2, MAGE протеины (например, ETV6-AML, Fra-1, FOLR1, ErbB4/Her4, ETV6-AML, Fra-1, FOLR1, GAGE белки (например, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, glypican-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/EBNA1, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, IGF1R, LGR5, LMP2, MAGE белки (например, ErbB2/Her3), FOLR1, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 и -12), MART-1, мезо-

телин, ML-IAP, Muc1, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NGEF, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PDGFR- α , PDGFR- β , PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PLAC1, PRLR, PRAME, PSCA, PSGR, PSMA (FOLH1), белки RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, STn, survivin, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, Tn, TNFRSF17, TRP-1, TRP-2, тирозиназа и уроплакин-3, а также фрагменты любого из вышеперечисленных полипептидов. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой опухолевый антиген, включая антигены, специфичные для типа опухоли, или антигены, которые являются общими, сверхэкспрессированными или модифицированными для определенного типа опухоли. Примеры включают, но не ограничиваются ими: альфа-актинин-4 с раком легких, ARTC1 с меланомой, слитый белок BCR-ABL с хроническим миелолейкозом, B-RAF, CLPP или Cdc27 с меланомой, CASP-8 с плоскоклеточной карциномой, и hsp70-2 с почечно-клеточным раком, а также следующими общими опухолеспецифическими антигенами, например: BAGE-1, GAGE, GnTV, KK-LC-1, MAGE-A2, NA88-A, TRP2-INT2. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой PRLR или HER2. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело против PRLR или против HER2.

Линкеры связывающего агента могут быть связаны со связывающим агентом, например антителом или антигенсвязывающей молекулой, посредством присоединения к определенной аминокислоте внутри антитела или антигенсвязывающей молекулы. Типичные аминокислотные присоединения, которые можно использовать в контексте этого аспекта раскрытия, включают, например, лизин (см., например, US 5,208,020; US 2010/0129314; Hollander et al., *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19: 358-361; WO 2005/089808; US 5714586; US 2013/0101546 и US 2012/0585592), цистеин (см., например, US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546 и US 7 750 116), селеноцистеин (см., например, WO 2008/122039; и Hofer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2008, 105: 12451-12456), формилглицин (см., например, Carrico et al., *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321-322; Agarwal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., США*, 2013, 110: 46-51, и Rabuka et al., *Nat. Protocols*, 2012, 10: 1052-1067), неприродные аминокислоты (см., например, WO 2013/068874 и WO 2012/166559) и кислые аминокислоты (см., например, WO 2012/05982). Линкеры также могут быть конъюгированы с антигенсвязывающим белком посредством присоединения к углеводам (см., например, US 2008/0305497, WO 2014/065661 и Ryan et al., *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, 13:127-130).

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

Линкеры также могут быть конъюгированы с одним или несколькими глутаминовыми остатками посредством химио-ферментативного конъюгирования на основе трансглутаминазы (см., например, Dennler et al., *Bioconjugate Chem.* 2014, 25, 569-578). Например, в присутствии трансглутаминазы один или несколько остатков глутамин антитела могут быть связаны с соединением первичного амина. Первичные аминные соединения включают полезные нагрузки или линкер-полезные нагрузки, которые непосредственно обеспечивают конъюгаты антител с лекарственными средствами посредством опосредованного трансглутаминазой связывания. Соединения первичного амина также включают линкеры и спейсеры, которые функционализированы реакционноспособными группами, которые впоследствии могут реагировать с другими соединениями в направлении синтеза конъюгатов лекарственных средств-антитела. Антитела, содержащие остатки глутамин, могут быть выделены из природных источников или сконструированы так, чтобы содержать один или несколько остатков глутамин. Методики встраивания остатков глутамин в полипептидную цепь антитела (антитела, модифицированные глутаминилом или антигенсвязывающие молекулы) известны специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления антитело является агликозильированным.

В определенных вариантах осуществления антитело или глутаминил-модифицированное антитело или антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере один остаток глутамин по меньшей мере в одной последовательности полипептидной цепи. В определенных вариантах осуществления антитело или глутаминил-модифицированное антитело или антигенсвязывающая молекула содержит два полипептида тяжелой цепи, каждый с одним остатком Gln295. В других вариантах осуществления антитело или глутаминил-модифицированное антитело или антигенсвязывающая молекула содержит один или несколько остатков глутамин в сайте, отличном от тяжелой цепи Gln 295. Здесь включены антитела, несущие мутацию(и) N297Q, описанную(ые) здесь. Вкратце, в некоторых вариантах осуществления антитело, включающее в себя остаток глутамин, обрабатывают соединением первичного амина, более подробно описанным ниже, в присутствии фермента трансглутаминазы. В некоторых вариантах осуществления антитело, включающее мутацию Asn297Gln (N297Q), обрабатывают соединением первичного амина, более подробно описанным ниже, в присутствии фермента трансглутаминазы. В некоторых вариантах осуществления антитело, включающее остаток Gln295 (Q295), обрабатывают соединением первичного амина, более подробно описанным ниже, в присутствии фермента трансглутаминазы. В некоторых вариантах осуществления антитело, включающее остаток Gln55 (Q55), обрабатывают соединением первичного амина, более подробно описанным ниже, в присутствии фермента трансглутаминазы. Например,

в некоторых вариантах осуществления такое антитело может быть получено с помощью сайт-направленного мутагенеза для удаления или отключения последовательности или для вставки остатка глутамин в сайт отдельно от любой мешающей структуры. Такое антитело также может быть выделено из природных или искусственных источников.

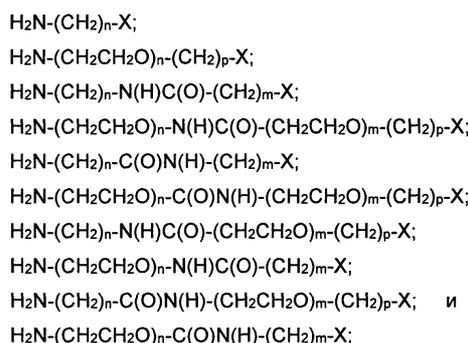
Первичные аминные соединения

Первичное аминное соединение, используемое для связывания трансклутаминазы антителом (или антигенсвязывающим соединением), содержащим глутамин, может представлять собой любое первичное аминное соединение, которое может быть признано практикующим специалистом в данной области техники обычным. Обычно соединение первичного амина имеет формулу H_2N-R , где R может быть любой группой, совместимой с антителом и условиями реакции. В некоторых вариантах осуществления R представляет собой алкил, замещенный алкил, гетероалкил или замещенный гетероалкил.

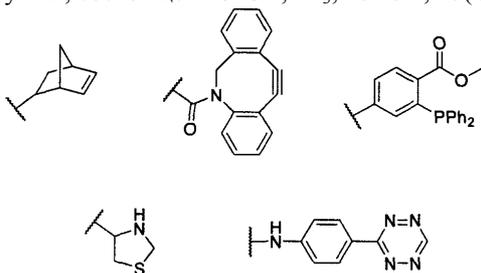
В некоторых вариантах осуществления первичное аминное соединение содержит реакционноспособную группу или защищенную реакционноспособную группу. Полезные реакционноспособные группы включают азиды, алкины, циклоалкины, тиолы, спирты, кетоны, альдегиды, кислоты, сложные эфиры, гидразиды, анилины и амины.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

В некоторых вариантах осуществления соединение первичного амина соответствует формуле $H_2N-LL-X$, где LL представляет собой двухвалентный спейсер, а X представляет собой реакционноспособную группу или защищенную реакционноспособную группу. В конкретных вариантах осуществления LL представляет собой двухвалентную группу полиэтиленгликоля (PEG). В некоторых вариантах осуществления X выбран из группы, состоящей из $-SH$, $-N_3$, алкина, альдегида и тетразола. В конкретных вариантах осуществления X представляет собой $-N_3$.

В некоторых вариантах осуществления соединение первичного амина соответствует одной из следующих формул:

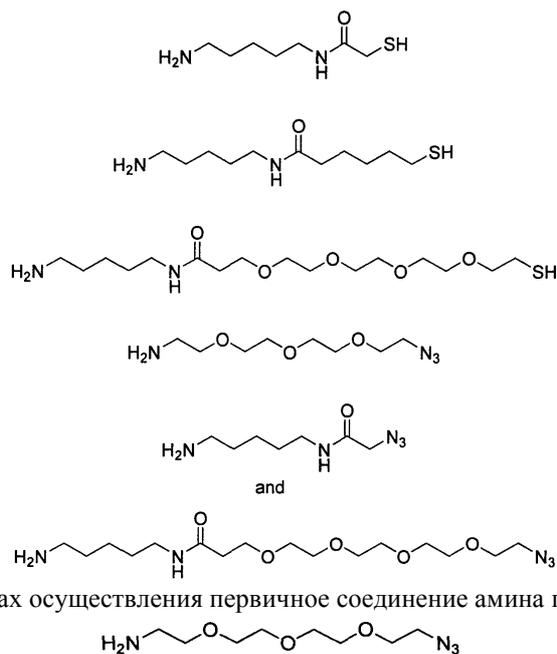


где n представляет собой целое число, выбранное из диапазона от 1 до 12; m представляет собой целое число, выбранное из диапазона от 0 до 12; p представляет собой целое число, выбранное из диапазона от 0 до 2; и X выбран из группы, состоящей из $-SH$, $-N_3$, $-C\equiv CH$, $-C(O)H$, тетразола и любого из

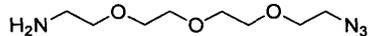


В приведенном выше описании любая из алкильных или алкиленовых (т.е. $-CH_2-$) групп может быть необязательно замещена, например, C_{1-8} алкилом, метилформилом или $-SO_3H$. В определенных вариантах осуществления алкильные группы являются незамещенными.

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



В конкретных вариантах осуществления первичное соединение амина представляет собой



Примерные условия для вышеуказанных реакций представлены в примерах ниже.

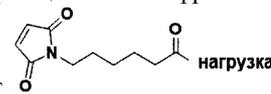
Линкеры.

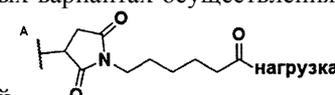
Линкерная часть (LL) конъюгатов, описанных в настоящем документе, представляет собой группу, например двухвалентную группу, которая ковалентно связывает связывающий агент с соединением полезной нагрузки, описанным в данном документе. В других случаях линкер LL представляет собой трехвалентный или многовалентный фрагмент, который ковалентно связывает связывающий агент с соединением полезной нагрузки, описанным в настоящем документе. Подходящие линкеры можно найти, например, в конъюгатах антитело-лекарственное средство и иммунотоксины; Phillips, G.L., Ed.; Springer Verlag: Нью-Йорк, 2013; Конъюгаты антитело-лекарственное средство; Ducry, L., Ed.; Humana Press, 2013; Конъюгаты антитело-лекарственное средство; Wang, J., Shen, W.-C., и Zaro, J.L., Eds.; Springer International Publishing, 2015, содержание каждого из которых включено в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

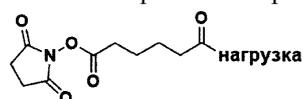
Соединения полезной нагрузки включают соединения фиг. 1, и их остатки после связывания или включения с линкером LL. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что определенные функциональные группы фрагментов полезной нагрузки удобны для связывания или связывания с линкерами и/или связующими агентами. Эти группы включают амины, гидроксилы, фосфаты и сахара.

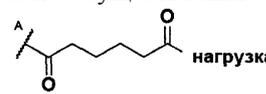
В определенных вариантах осуществления линкеры являются стабильными в физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления линкеры расщепляются, например, способны высвободить, по меньшей мере, часть полезной нагрузки в присутствии фермента или при конкретном диапазоне или значении pH. В некоторых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

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит нерасщепляемый фрагмент. В некоторых

вариантах осуществления нерасщепляемый линкер происходит от  или его остатка. В некоторых вариантах осуществления нерасщепляемое соединение линкер-полезная нагрузка пред-

ставляет собой  или его региоизомер. В некоторых вариантах осуществления

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

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

(MCC). В структурах $\overset{\text{A}}{\text{---}}\text{---}$ указывает связь со связующим агентом. В структурах, в некоторых примерах, $\overset{\text{A}}{\text{---}}\text{---}$ указывает клик-химический остаток, который является результатом реакции, например, связующего агента и полезной нагрузки линкера.

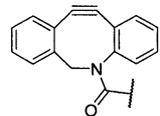
В некоторых вариантах осуществления подходящие линкеры включают, но не ограничиваются ими, те, которые химически связаны с двумя остатками цистеина одного связывающего агента, например, антитела. Такие линкеры могут служить для имитации дисульфидных связей антитела, которые разрушаются в результате процесса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

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

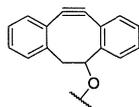
В некоторых вариантах осуществления линкер содержит саморасщепляющуюся группу. Саморасщепляющейся группой может быть любая такая группа, известная специалистам в данной области. В конкретных вариантах осуществления саморасщепляющаяся группа представляет собой p-аминобензил (PAB) или его производное.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

В некоторых вариантах осуществления реакционноспособная группа RG' может быть любой реакционноспособной группой, известной специалистам в данной области техники, которая способна образовывать одну или несколько связей со связующим агентом. Реакционноспособная группа RG' представляет собой фрагмент, содержащий в своей структуре часть, которая способна реагировать со связывающим агентом (например, реагировать с антителом по его остаткам цистеина или лизина или по азидному фрагменту, например, PEG-N₃ функционализированное антитело в одном или нескольких остатках глутамина) с образованием соединения формулы A, Aa или Ab. После сопряжения со связующим агентом реакционноспособная группа становится реакционноспособной группой (RG) или остатком линкера. Иллюстративные реакционноспособные группы включают, но не ограничиваются ими, группы, которые включают галоацетил, изотиоцианат, сукцинимид, N-гидроксисукцинимид или малеимид, участки, которые способны реагировать со связующим агентом.

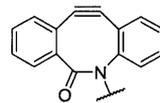
В некоторых вариантах осуществления реакционноспособные группы включают, но не ограничиваются ими, алкины. В некоторых вариантах осуществления алкины представляют собой алкины, способные подвергаться реакциям 1,3-циклоприсоединения с алкинами в отсутствие медных катализаторов, таких как напряженные алкины. Напряженные алкины пригодны для активируемых штаммами алкиназидных циклоприсоединений (SPAAC), циклоалкинов, например, циклооктинов, бензобензилированных алкинов. К подходящим алкинам относятся, в частности, дибензоазациклооктины или



(DIBAC), дибензоциклооктины или

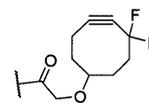


(DIBO), биарилазацациклооктинон или

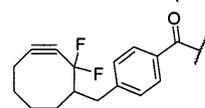


(BARAC),

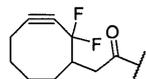
дифторированные циклооктины или



, или

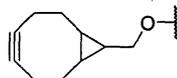


, или



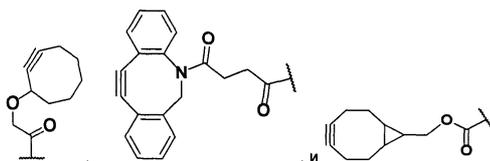
(DIFO),

замещенные, например, фторированные алкины, аза-



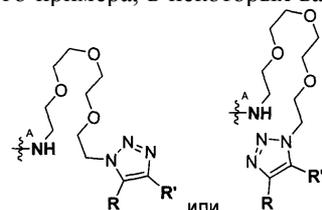
(BCN),

а также его производные. Особенно по-



лезные алкины включают

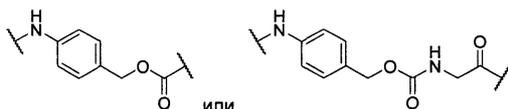
В определенных вариантах осуществления связующий агент связан непосредственно с RG. В определенных вариантах осуществления связующий агент связан с RG через спейсер. В конкретных вариантах осуществления связывающий агент связан с RG через спейсер PEG. В определенных вариантах осуществления связующий агент получают функционализацией с одной или несколькими азидогруппами. Каждая азидогруппа способна реагировать с RG' с образованием RG. В конкретных вариантах осуществления связующий агент дериватизируется с помощью -PEG-N₃, связанного с остатком глутамина. Приведенные в качестве примера дериватизированные связующие агенты -N₃, способы их получения и способы их применения при взаимодействии с RG' представлены здесь. В некоторых вариантах осуществления RG' представляет собой алкин, подходящий для участия в 1,3-циклоприсоединении, и RG' представляет собой 1,2,3-триазолильную группу, образованную в результате реакции RG' с азидофункционализированным связывающим агентом. В качестве дополнительного примера, в некоторых ва-



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

В формулах в данном документе каждый AA¹ представляет собой аминокислоту. В некоторых примерах в формулах в данном документе каждый AA² представляет собой аминокислоту. В некоторых примерах в формулах в данном документе каждый AA² представляет собой дипептид. В некоторых примерах в формулах в данном документе каждый AA² представляет собой трипептид. Подходящие аминокислоты для каждой AA¹ или AA² включают природные, неприродные, стандартные, нестандартные, протеиногенные, непротеиногенные и L- или D-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер включает аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, триптофан, фенилаланин, пролин, глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, гистидин или цитруллин, его производное или их комбинация. В определенных вариантах осуществления одна или несколько боковых цепей аминокислот связаны с группой боковой цепи, описанной ниже. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой аланин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой валин-глицин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой глицин-валин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой цитруллин-валин. В некоторых вариантах AA² глутамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой глутамин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой лизин-валин-аланин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой лизин-валин-цитруллин. В некоторых вариантах AA² представляет собой глутамат-валин-цитруллин. В некоторых вариантах осуществления AA² представляет собой глутамин-валин-цитруллин.

Специалисты в данной области распознают PABC как остаток p-аминобензилоксикарбонила со следующей структурой:



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

В некоторых примерах линкер представляет собой MC-Suc-PEG_m-vc-PAB. Индекс m представляет собой целое число от 0 до 4. В некоторых примерах индекс m равен 0. В некоторых примерах индекс m равен 1. В некоторых примерах индекс m равен 2. В некоторых примерах индекс m равен 3. В некоторых примерах индекс m равен 4.

В некоторых примерах линкер представляет собой DIBAC-Suc-PEG_m-vc-PAB. Индекс m представляет собой целое число от 0 до 4. В некоторых примерах индекс m равен 0. В некоторых примерах индекс m равен 1. В некоторых примерах индекс m равен 2. В некоторых примерах индекс m равен 3. В некоторых примерах индекс m равен 4.

В некоторых примерах линкер представляет собой BCN-PEG₄-Lys(COT-CD)-vc-PAB.
 В некоторых примерах линкер представляет собой DIBAC-Suc-PEG₄-d-Lys(PEG₄-COT-CD)-vc-PAB.
 В некоторых примерах линкер представляет собой BCN-PEG₄-D-Lys-(PEG₄-COT-CD)-vc-PAB.
 В некоторых примерах линкер представляет собой DIBAC-suc-PEG₄-Val-Ala.
 В некоторых примерах линкер представляет собой DIBAC-suc-PEG₄-D-Lys(COT-CD)-Val-Ala.
 В некоторых примерах линкер представляет собой DIBAC-suc-PEG₄-D-Lys(COT-CD)-Val-Ala.
 В некоторых примерах линкер представляет собой DIBAC-suc-PEG₄-Val-Ala.
 В некоторых примерах линкер представляет собой DIBAC-suc-PEG₄-d-Lys(COT-CD)-Val-Ala.
 В некоторых примерах линкер представляет собой DIBAC-suc-PEG₄-D-Lys(PEG₄-COT-CD)-vcPAB.
 В некоторых примерах линкер представляет собой BCN-PEG₄-D-Lys(PEG₄-COT-CD)-Val-Ala.
 В некоторых примерах линкер представляет собой BCN-PEG₄-D-Lys(PEG₄-COT-CD)-vcPAB.
 В некоторых примерах линкер представляет собой DIBAC-suc-PEG₄-D-Lys(PEG₄-COT-CD)-Val-Ala.
 В некоторых примерах линкер представляет собой BCN-PEG₄-D-Lys(COT-CD)-Val-Ala.
 В некоторых примерах линкер представляет собой DIBAC-suc-PEG₄-D-Lys(COT-CD)-vc-PAB.
 Реакционноспособный линкер-полезная нагрузка

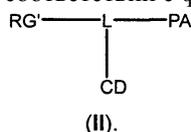
Конъюгаты, представленные в настоящем документе, могут быть получены из соединений реакционноспособный линкер-полезная нагрузка с реакционноспособными группами RG', как описано выше. Полезные нагрузки реакционноспособного линкера могут быть связаны с группами циклодекстрина, как описано в настоящем документе, и/или связующими агентами в соответствии со способами, описанными ниже.

В некоторых вариантах осуществления здесь представлено соединение реакционноспособный линкер-полезная нагрузка, которое содержит реакционноспособную группу, связанную по меньшей мере с одним фрагментом полезной нагрузки и связанную по меньшей мере с одним фрагментом циклодекстрина через ковалентный линкер, где указанный ковалентный линкер связан прямо или косвенно связан с каждой из реакционноспособной группы, полезной группы, циклодекстриновой группы.

Как показано здесь, в некоторых примерах реакционноспособная группа связана непосредственно с ковалентным линкером, таким как аминокислота лизин. Это означает, что реакционноспособная группа находится на расстоянии одной связи от ковалентного линкера. В некоторых из этих примеров ковалентный линкер также связан непосредственно с фрагментом полезной нагрузки. Это означает, что ковалентный линкер находится на расстоянии одной связи от полезной нагрузки, такой как, но не ограничиваясь этим, MMAE, стероид или любую полезную нагрузку, изложенную здесь. В некоторых из этих примеров ковалентный линкер также связан непосредственно с циклодекстриновым фрагментом. Это означает, что ковалентный линкер находится в одном положении связи от циклодекстрина, такого как циклодекстрины, изложенные здесь. В некоторых из этих примеров ковалентный линкер представляет собой аминокислоту лизина или ее производное.

В других примерах реакционноспособная группа связана косвенно с ковалентным линкером. Это означает, что реакционноспособная группа находится на расстоянии более, чем одной связи от ковалентного линкера. Это также означает, что реакционноспособная группа связана через другой фрагмент с ковалентным линкером. Например, реакционноспособная группа может быть связана с полиэтиленгликолевой группой, которая связана с ковалентным линкером. В некоторых из этих примеров ковалентный линкер также косвенно связан с фрагментом полезной нагрузки. Это означает, что ковалентный линкер находится на расстоянии более, чем одной связи от полезной нагрузки, такой как, но не ограничиваясь этим, MMAE, стероид или любую полезную нагрузку, изложенную здесь. Это также означает, что ковалентный линкер связан с полезной нагрузкой через другую часть. Например, ковалентный линкер может быть связан с дипептидом, таким как, без ограничения, Val-Ala или Val-Cit, который может быть связан с PAB, который может быть связан с полезной нагрузкой. В некоторых из этих примеров ковалентный линкер также косвенно связан с циклодекстриновым фрагментом. Это означает, что ковалентный линкер находится на расстоянии более, чем одной связи от циклодекстрина, такого как циклодекстрины, изложенные здесь. Это также означает, что ковалентный линкер связан с циклодекстрином через другую часть. Например, ковалентный линкер может быть связан с полиэтиленгликолевой группой, которая может быть связана с реакционноспособной группой, которая может быть связана с циклодекстрином. В некоторых из этих примеров ковалентный линкер представляет собой аминокислоту лизина или ее производное.

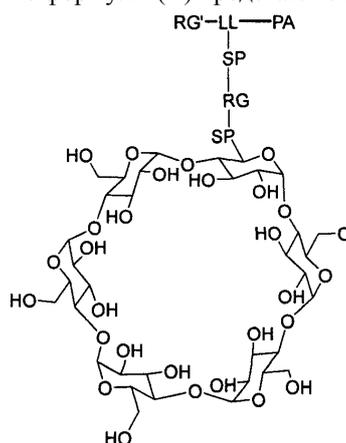
В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описывается соединением реакционноспособный линкер-полезная нагрузка в соответствии с формулой (II):



В формуле (II) RG' представляет собой реакционноспособную группу, L представляет собой трехвалентный линкер, CD представляет собой остаток циклодекстрина; и PA является остатком полезной

нагрузки.

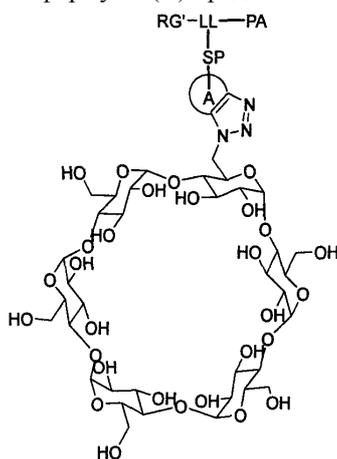
В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIa):



(IIa).

В формуле (IIa) RG' представляет собой реакционноспособную группу, RG представляет собой остаток реакционноспособного линкера, LL представляет собой трехвалентный линкер, SP в каждом случае независимо отсутствует или спейсерная группа; и PA - полезная нагрузка.

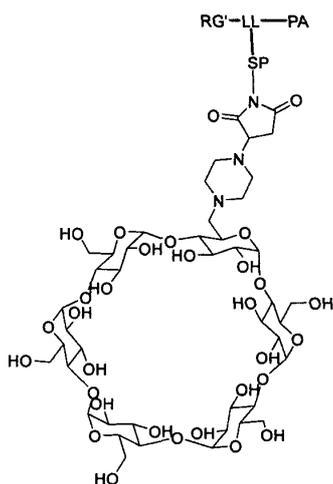
В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIb) или (IIc). В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIb):



(IIb).

В формуле (IIb) или (IIc) RG' представляет собой реакционноспособную группу, LL представляет собой трехвалентный линкер. SP независимо в каждом случае отсутствует или представляет собой спейсер, кольцо A конденсировано с триазолом и выбрано из группы, состоящей из циклоалкила, циклоалкенила, циклоалкинила, гетероциклоалкила, гетероциклоалкенила и гетероциклоалкинила, где циклоалкил, циклоалкенил, циклоалкинил, гетероциклоалкил гетероциклоалкенил и гетероциклоалкинил необязательно замещены алкилом, OH или NR^aR^b , где каждый из R^a и R^b представляет собой алкил или H , а PA представляет собой полезную нагрузку. В некоторых примерах кольцо A представляет собой необязательно замещенный циклоалкил. В некоторых примерах кольцо A представляет собой необязательно замещенный циклоалкенил. В некоторых примерах кольцо A представляет собой необязательно замещенный циклоалкинил. В некоторых примерах кольцо A представляет собой необязательно замещенный гетероциклоалкил. В некоторых примерах кольцо A представляет собой необязательно замещенный гетероциклоалкенил. В некоторых примерах в формулу (IIb) или (IIc) включены региоизомеры (например, в отношении триазольной связи), стереоизомеры и их смеси соединений формулы (IIb) или (IIc).

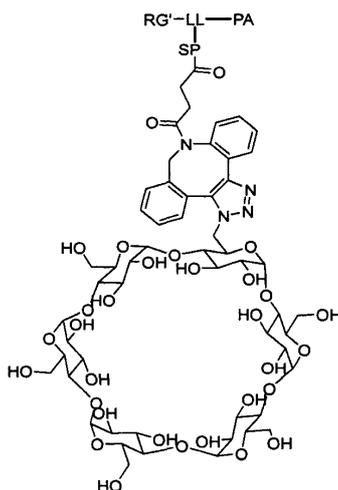
В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIc):



(IIc)

В формуле (IIc) RG' представляет собой реакционноспособную группу, LL представляет собой трехвалентный линкер. SP отсутствует или является спейсером, а PA является полезной нагрузкой. В некоторых примерах в формулу (IIb) (IIc) включены региоизомеры (например, в отношении сукцинимидной связи), стереоизомеры и их смеси формулы (IIc).

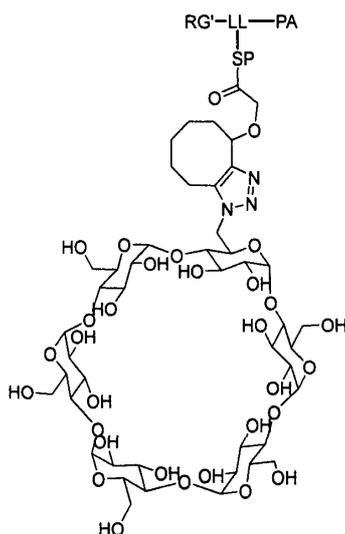
В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIb1), (IIb2), (IIb3), (IIb4), (IIb5) или (IIb6). В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIb1):



(IIb1).

В формуле (IIb1) RG' представляет собой реакционноспособную группу, LL представляет собой трехвалентный линкер. SP отсутствует или является спейсером, а PA является полезной нагрузкой. В некоторых примерах в формулу (IIb1) включены региоизомеры (например, в отношении триазольной связи), стереоизомеры и их смеси соединений формулы (IIb1).

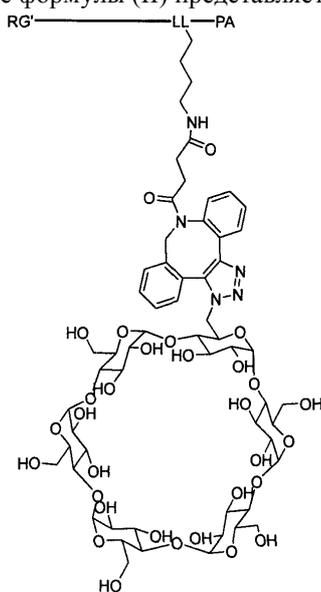
В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIb2):



(IIb2).

В формуле (IIb2) RG' представляет собой реакционноспособную группу, LL представляет собой трехвалентный линкер, SP отсутствует или представляет собой спейсер, а PA представляет собой полезную нагрузку. В некоторых примерах в формулу (IIb2) включены региоизомеры (например, в отношении триазольной связи), стереоизомеры и их смеси соединений формулы (IIb2).

В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIb3):

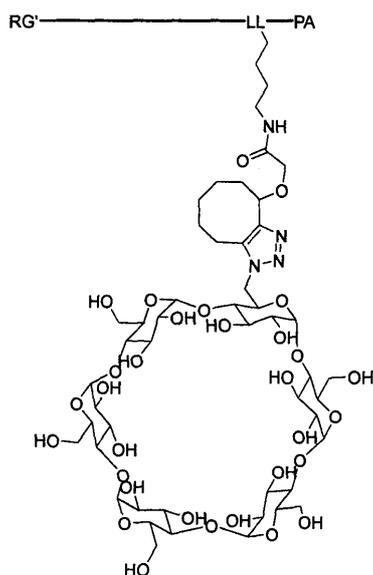


(IIb3).

В формуле (IIb3) RG' представляет собой реакционноспособную группу, LL представляет собой трехвалентный линкер, а PA представляет собой полезную нагрузку. В некоторых примерах в формулу (IIb3) включены региоизомеры (например, в отношении триазольной связи), стереоизомеры и их смеси соединений формулы (IIb3).

В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIb4):

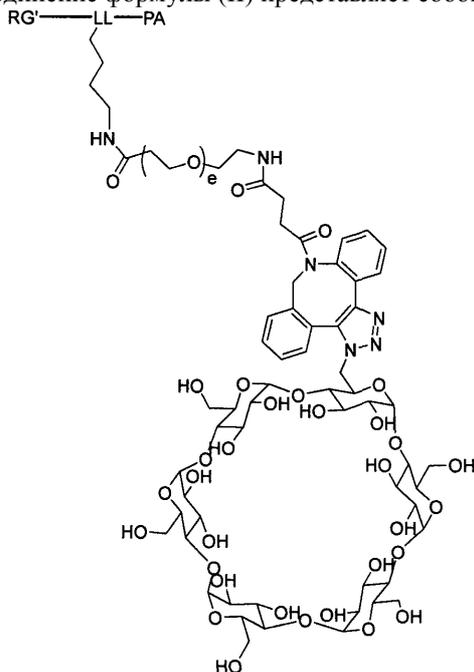
046545



(IIb4)

В формуле (IIb4) RG' представляет собой реакционноспособную группу, LL представляет собой трехвалентный линкер, а PA представляет собой полезную нагрузку. В некоторых примерах в формулу (IIb4) включены региоизомеры (например, в отношении триазольной связи), стереоизомеры и их смеси соединений формулы (IIb4).

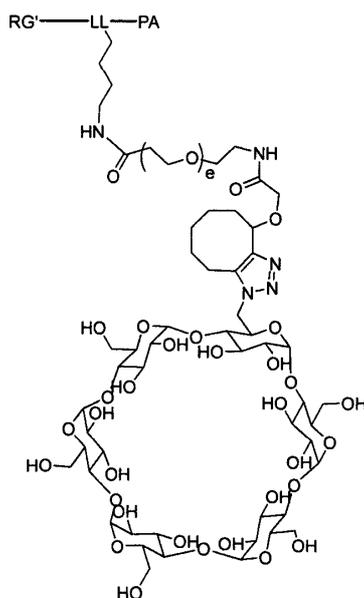
В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIb5):



(IIb5).

В формуле (IIb5) RG' представляет собой реакционноспособную группу, LL представляет собой трехвалентный линкер, не представляет собой целое число от 0 до 4, а PA представляет собой полезную нагрузку. В некоторых примерах e равно 0. В некоторых примерах e равно 1. В некоторых примерах e равно 2. В некоторых примерах e равно 3. В некоторых примерах e равно 4. В некоторых примерах в формулу (IIb5) включены региоизомеры (например, в отношении триазольной связи), стереоизомеры и их смеси соединений формулы (IIb5).

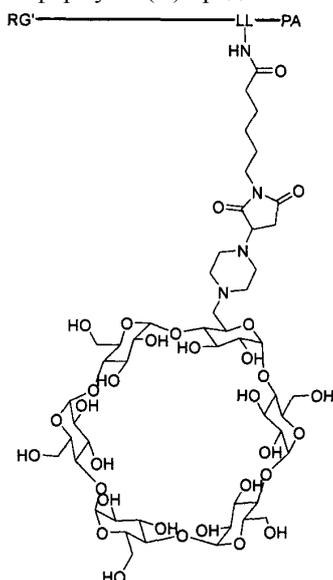
В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIb6):



(IIb6).

В формуле (IIb6) RG^1 представляет собой реакционноспособную группу, LL представляет собой трехвалентный линкер, не представляет собой целое число от 0 до 4, а PA представляет собой полезную нагрузку. В некоторых примерах e равно 0. В некоторых примерах e равно 1. В некоторых примерах e равно 2. В некоторых примерах e равно 3. В некоторых примерах e равно 4. В некоторых примерах в формулу (IIb6) включены региоизомеры (например, в отношении триазольной связи), стереоизомеры и их смеси соединений формулы (IIb6).

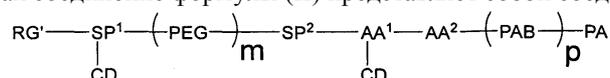
В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIc1):



(IIc1).

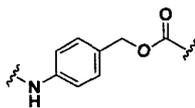
В формуле (IIc1) RG' представляет собой связующий агент, LL представляет собой трехвалентный линкер, а PA представляет собой полезную нагрузку. В формулу (IIc1) также включены региоизомеры (например, в отношении сукцинимидной связи), стереоизомеры и их смеси.

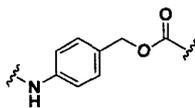
В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IId):



(IId).

В формуле (IId) RG' представляет собой реакционноспособную группу, каждый из SP^1 и SP^2 , независимо, в каждом случае, отсутствует или является остатком спейсерной группы, и где SP^1 представляет собой трехвалентный линкер, AA^1 представляет собой трехвалентный линкер, содержащий аминокислотный остаток; AA^2 представляет собой дипептидный остаток, PEG представляет собой остаток поли-



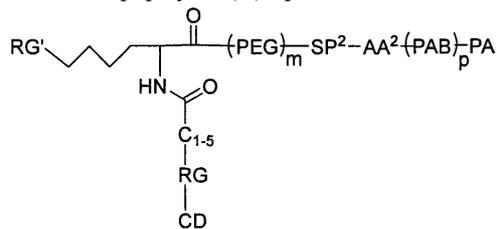
этиленгликоля, PAB представляет собой , где  указывает атом, через который PAB связан со смежными группами в формуле, CD независимо в каждом случае или отсутствует или представляет собой остаток циклодекстрина, где присутствует, по меньшей мере, один CD, индекс m представляет собой целое число от 0 до 5, индекс p равен 0 или 1; и PA представляет собой полезную нагрузку. В этих примерах индекс m равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых примерах индекс m равен 0. В некоторых примерах индекс m равен 1. В некоторых примерах индекс m равен 2. В некоторых примерах индекс m равен 3. В некоторых примерах индекс m равен 4. В некоторых примерах индекс m равен 5. В некоторых примерах индекс p равен 0. В некоторых примерах индекс p равен 1.

В некоторых случаях формулы (Id) CD представляет собой группу модифицированных CD в соответствии со структурой:



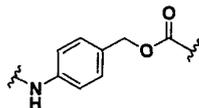
где RG независимо в каждом случае; остаток реакционноспособного линкера, SP^3 , независимо в каждом случае, отсутствует или остаток спейсерной группы выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкилена, $-NH-$, $-C(O)-$, $(-CH_2-CH_2-O)_e$, $-NH-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_e-C(O)-$, $-C(O)-(CH_2)_u-C(O)-$, $-C(O)-NH-(CH_2)_v-$ и их комбинации, где индекс e представляет собой целое число от 0 до 4, индекс u представляет собой целое число от 1 до 8, а индекс v представляет собой целое число от 1 до 8; q представляет собой целое число от 0 до 5 и  представляет атом, через который группа модифицированного CD присоединена к SP^1 или AA^1 .

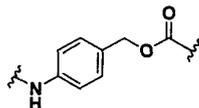
В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIe):



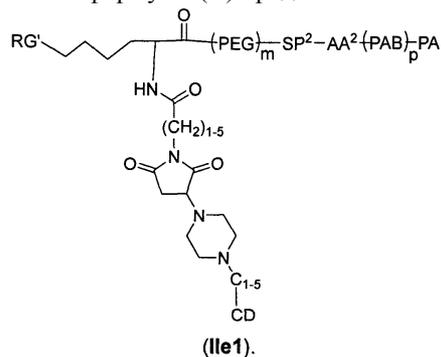
(IIe).

В формуле (IIe) RG' представляет собой реакционноспособную группу, RG представляет собой остаток реакционноспособной группы; SP^2 независимо в каждом случае отсутствует или является остатком спейсерной группы, и где AA^2 представляет собой дипептидный остаток, PEG представляет собой оста-



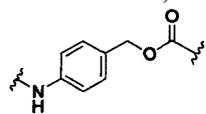
ток полиэтиленгликоля, PAB представляет собой , где  указывает атом, через который PAB связан со смежными группами в формуле, CD отсутствует или представляет собой остаток циклодекстрина, индекс m представляет собой целое число от 0 до 5, индекс p равен 0 или 1; и PA представляет собой полезную нагрузку. В этих примерах индекс m равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых примерах индекс m равен 0. В некоторых примерах индекс m равен 1. В некоторых примерах индекс m равен 2. В некоторых примерах индекс m равен 3. В некоторых примерах индекс m равен 4. В некоторых примерах индекс m равен 5. В некоторых примерах индекс p равен 0. В некоторых примерах индекс p равен 1.

В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIe1):



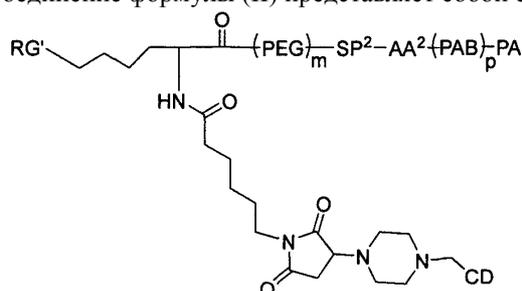
(IIe1).

В формуле (Ie1) RG^1 представляет собой реакциюноспособную группу, SP^2 независимо в каждом случае отсутствует или является остатком спейсерной группы, и где AA^2 представляет собой дипептидный остаток, PEG представляет собой остаток полиэтиленгликоля, PAB представляет собой



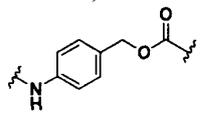
, где  указывает атом, через который PAB связан со смежными группами в формуле, CD отсутствует или представляет собой остаток циклодекстрина, индекс m представляет собой целое число от 0 до 5, индекс p равен 0 или 1; и PA представляет собой полезную нагрузку. В этих примерах индекс m равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых примерах индекс m равен 0. В некоторых примерах индекс m равен 1. В некоторых примерах индекс m равен 2. В некоторых примерах индекс m равен 3. В некоторых примерах индекс m равен 4. В некоторых примерах индекс m равен 5. В некоторых примерах индекс p равен 0. В некоторых примерах индекс p равен 1.

В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (Ie2):



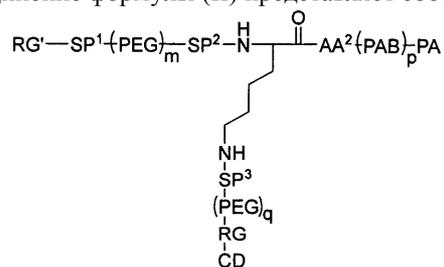
(Ie2).

В формуле (Ie) RG^1 представляет собой реакциюноспособную группу, SP^2 независимо в каждом случае отсутствует или является остатком спейсерной группы, AA^2 представляет собой дипептидный остаток, PEG представляет собой остаток полиэтиленгликоля, PAB представляет собой



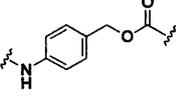
, где  указывает атом, через который PAB связан со смежными группами в формуле, CD представляет собой остаток циклодекстрина, индекс m представляет собой целое число от 0 до 5, индекс p равен 0 или 1; и PA представляет собой полезную нагрузку. В этих примерах индекс m равен 0, 1, 2, 3, 4 или 5. В некоторых примерах индекс m равен 0. В некоторых примерах индекс m равен 1. В некоторых примерах индекс m равен 2. В некоторых примерах индекс m равен 3. В некоторых примерах индекс m равен 4. В некоторых примерах индекс m равен 5. В некоторых примерах индекс p равен 0. В некоторых примерах индекс p равен 1.

В некоторых примерах соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (If):



(If).

В формуле (If) RG^1 представляет собой связывающий агент, RG представляет собой остаток реакцияноспособной группы, SP^1 , SP^2 , и SP^3 , независимо в каждом случае, отсутствуют или представляют собой остаток спейсерной группы, AA^2 представляет собой дипептидный остаток, PEG представляет со-

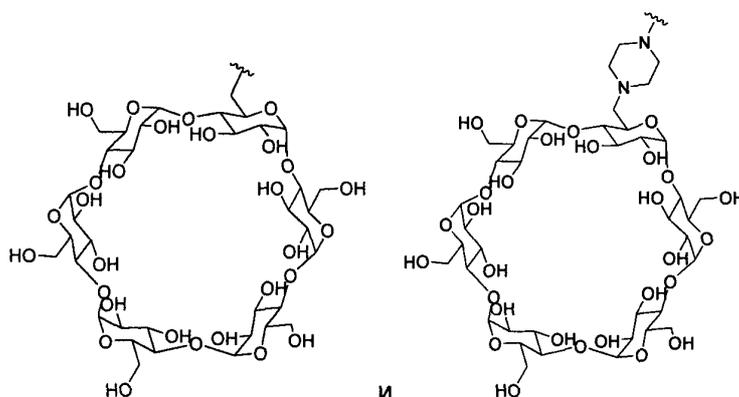
бой остаток полиэтиленгликоля, PAB представляет собой , где  обозначает атом, через который PAB связан с соседними группами в формуле, CD - остаток циклодекстрина, индекс q представляет собой целое число от 0 до 5, индекс m представляет собой целое число от 0 до 5, индекс p равен 0 или 1; и PA представляет собой полезную нагрузку. В некоторых примерах индекс m равен 0. В некоторых примерах индекс m равен 1. В некоторых примерах индекс m равен 2. В некоторых примерах индекс m равен 3. В некоторых примерах m равно 4. В некоторых примерах индекс m равен 5. В некоторых примерах индекс p равен 0. В некоторых примерах индекс p равен 1. В некоторых примерах q равно 0. В

некоторых примерах q равно 1. В некоторых примерах q равно 2. В некоторых примерах q равно 3. В некоторых примерах q равно 4. В некоторых примерах q равно 5. В некоторых примерах формулы (II) SP^1 отсутствует, и SP^2 независимо в каждом случае выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкилена, $-NH-$, $-C(O)-$, $(-CH_2-CH_2-O)_e$, $-NH-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_e-C(O)-$, $-C(O)-(CH_2)_u-C(O)-$, $-C(O)-NH-(CH_2)_v-$ и их комбинации, где индекс e представляет собой целое число от 0 до 4, индекс u представляет собой целое число от 1 до 8, а индекс v представляет собой целое число от 1 до 8.

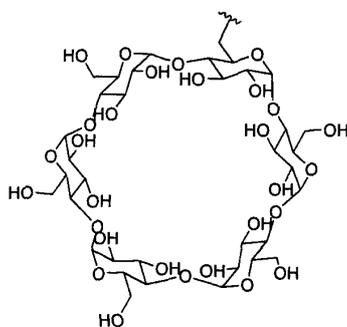
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, соединение формулы (II) включает, по меньшей мере, одну группу CD. В конкретном примере соединение формулы (I) представляет собой соединение формулы (IIe), формулы (IIe1) или формулы (IIe2), как описано в настоящем документе, и содержит одну группу CD. В другом конкретном примере соединение формулы (II) представляет собой соединение формулы (IIf), как описано в настоящем документе, и содержит одну группу CD.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, CD независимо представляет собой циклодекстрин. В некоторых примерах CD представляет собой α -циклодекстрин. В некоторых примерах CD представляет собой β -циклодекстрин. В некоторых примерах CD представляет собой γ -циклодекстрин. В любом из этих примеров α -, β - или γ -циклодекстрин необязательно замещен.

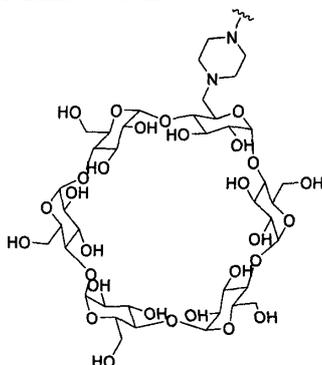
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, CD независимо в каждом случае выбирается из:



где  обозначает атом, через который CD связан с соседними группами в формуле. В некоторых примерах CD представляет собой



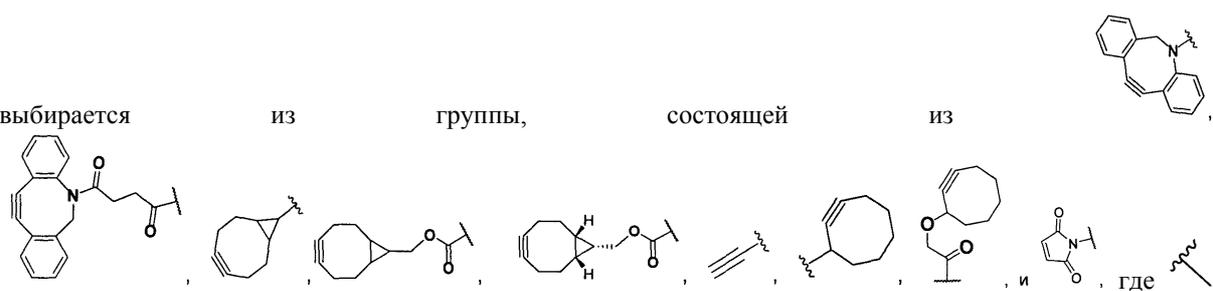
В некоторых примерах CD представляет собой



В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, RG независимо в каждом случае является остатком от клик-химической реакции. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, RG, независимо в каждом случае, включает триазол или конденсированный триазол.

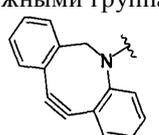
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, RG независимо в каждом случае

выбирается из группы, состоящей из



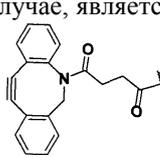
где обозначает атом, через который RG связан со смежными группами в формуле. В некоторых из этих при-

меров RG', независимо в каждом случае, является



. В некоторых из этих примеров RG', неза-

висимо в каждом случае, является



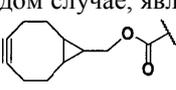
. В некоторых из этих примеров RG', независимо в каж-

дом случае, является

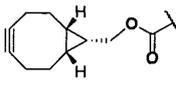


. В некоторых из этих примеров RG', независимо в каждом случае, является

. В некоторых из этих примеров RG', независимо в каждом случае, является

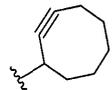


. В некоторых из этих примеров RG', независимо в каждом случае, является



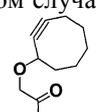

. В

некоторых из этих примеров RG', независимо в каждом случае, является



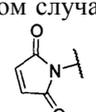
. В некоторых из этих

примеров RG', независимо в каждом случае, является



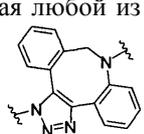
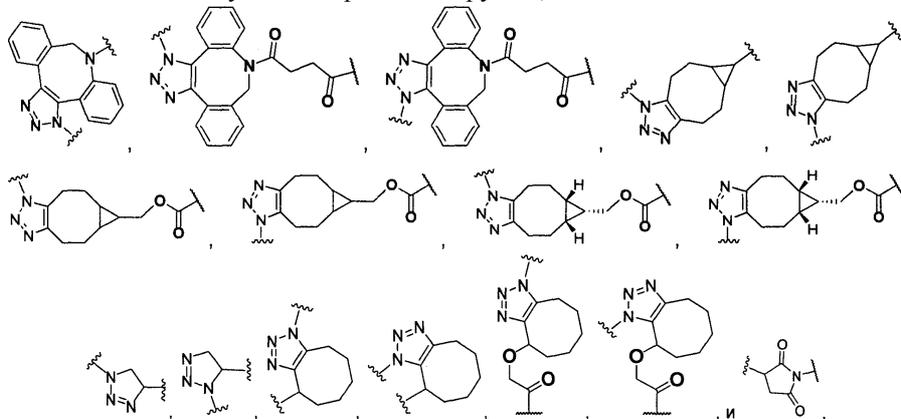
. В некоторых из этих примеров RG', неза-

висимо в каждом случае, является

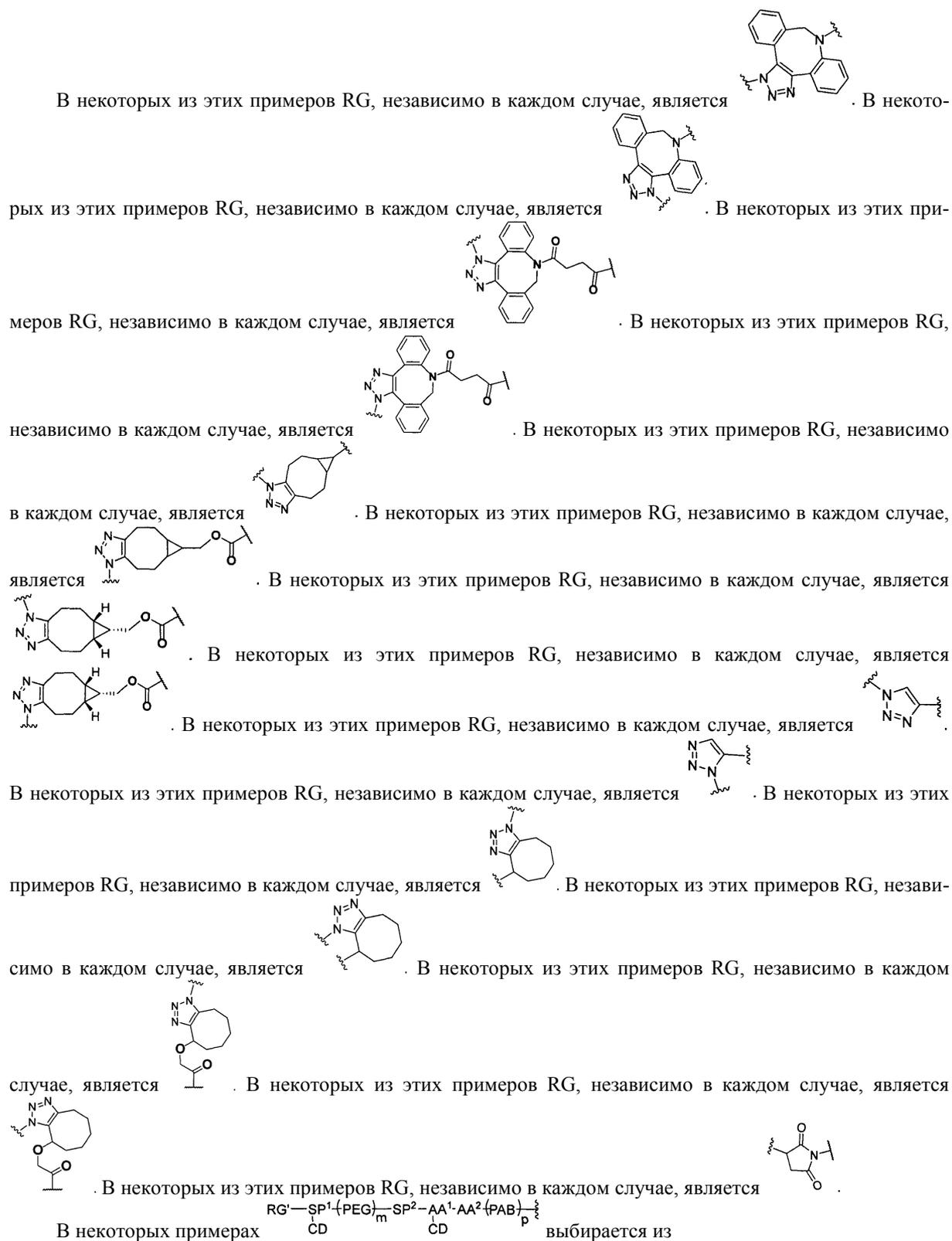


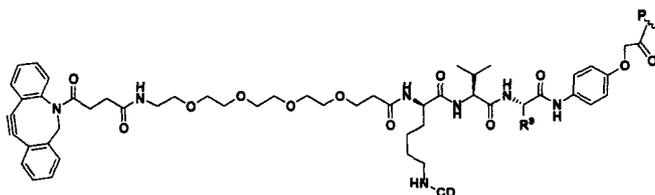
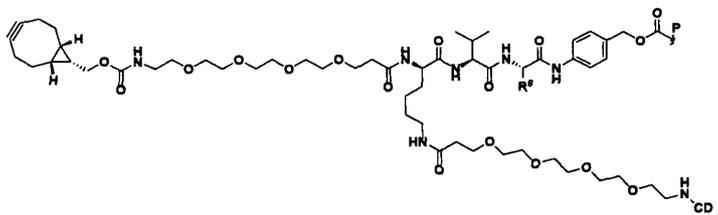
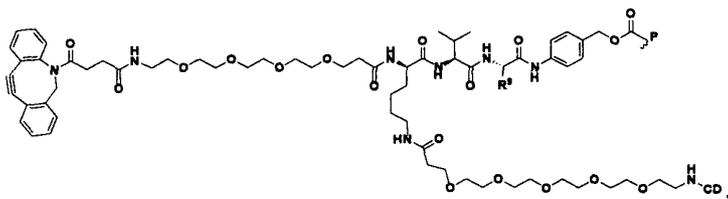
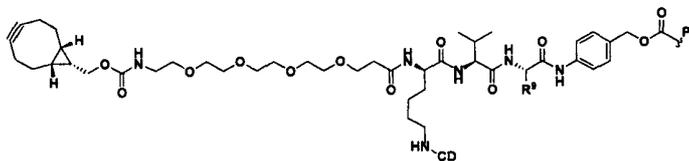
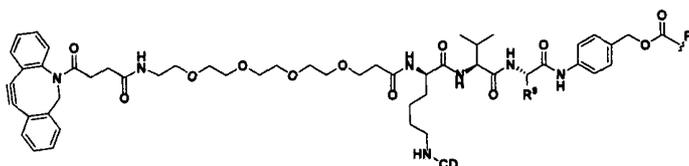
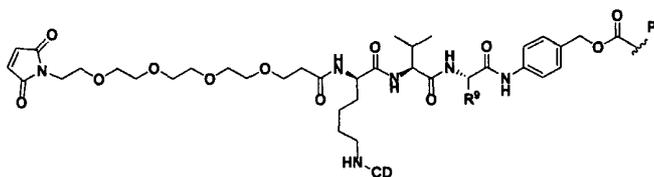
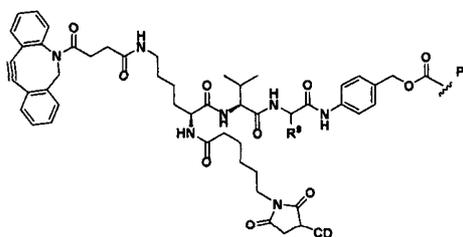
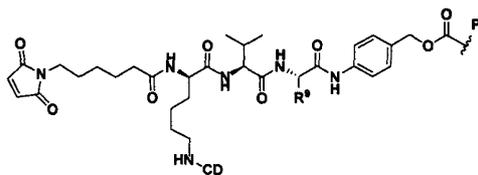
. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечислен-

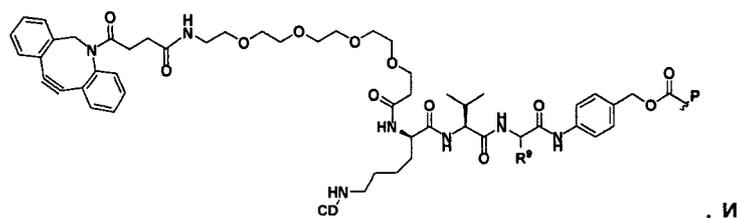
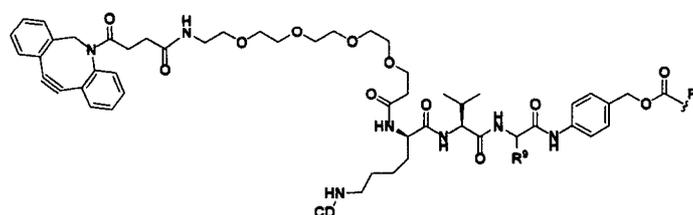
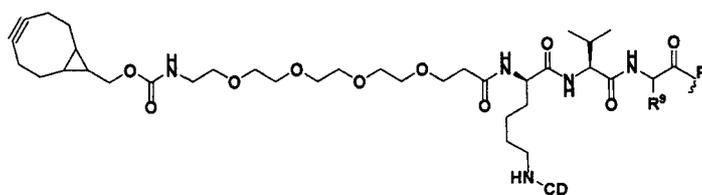
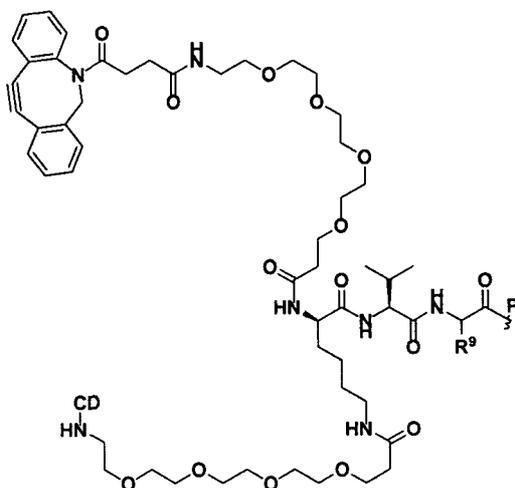
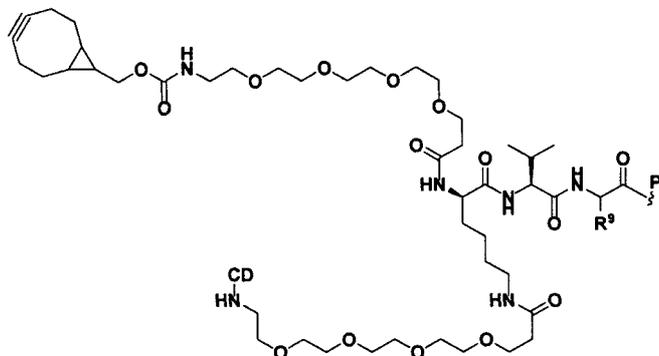
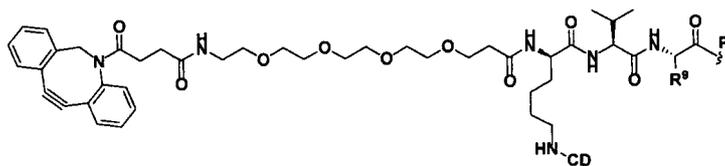
ных, RG независимо в каждом случае выбирается из группы, состоящей из

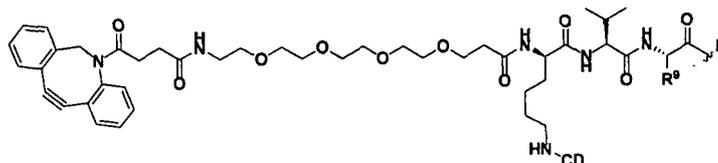



где обозначает атом, через который RG связан со смежными группами в формуле.







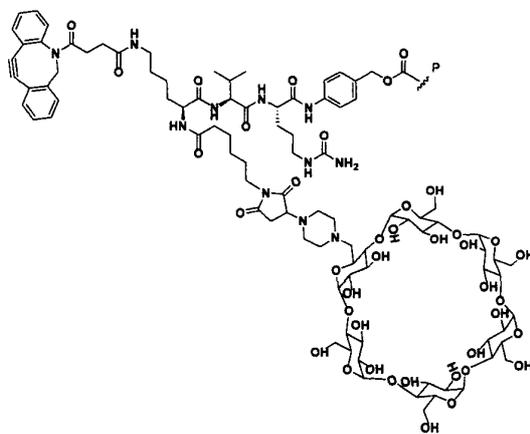
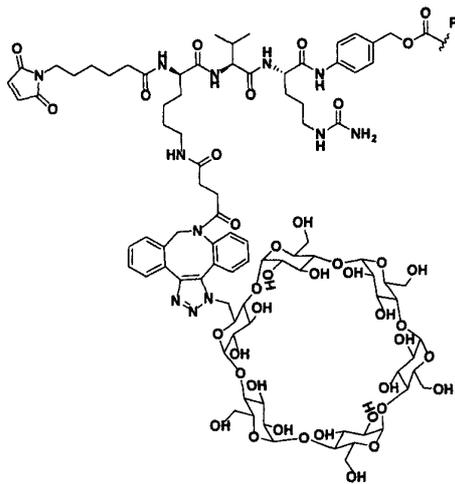


Также включены соли, сольваты, их стереоизомерные формы, их региоизомеры или их смеси региоизомеров, где каждая $\frac{P}{\text{---}}$ является связью с полезной нагрузкой;

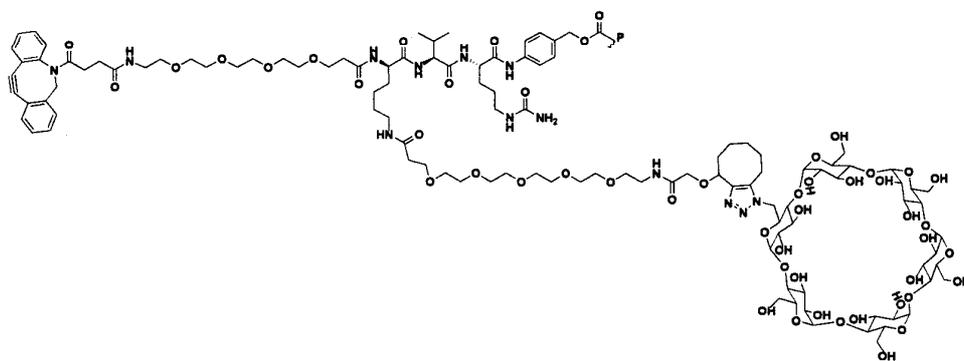
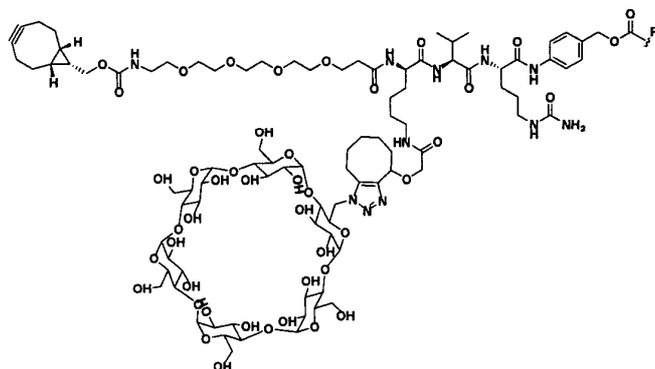
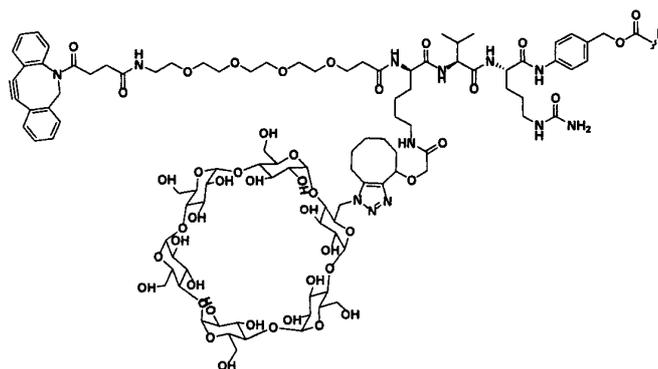
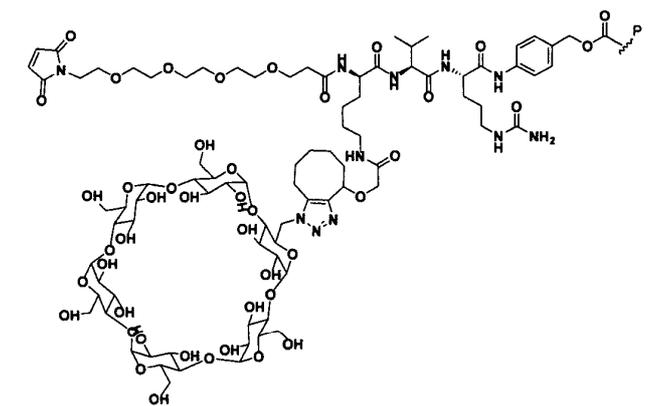
и R^9 представляет собой $-\text{CH}_3$ или $-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$.

В некоторых примерах R^9 представляет собой $-\text{CH}_3$. В некоторых примерах R^9 представляет собой $-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$.

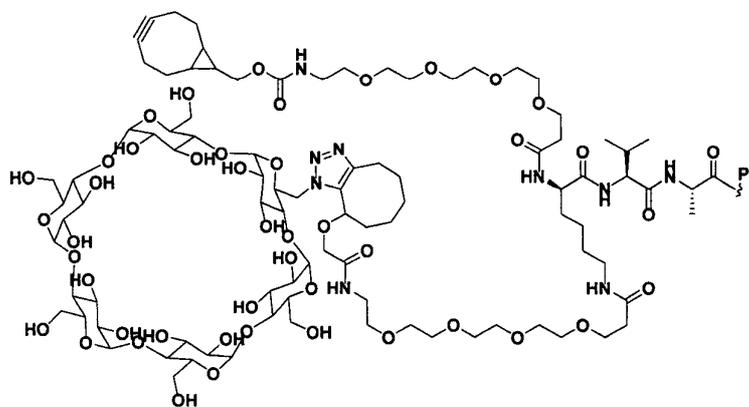
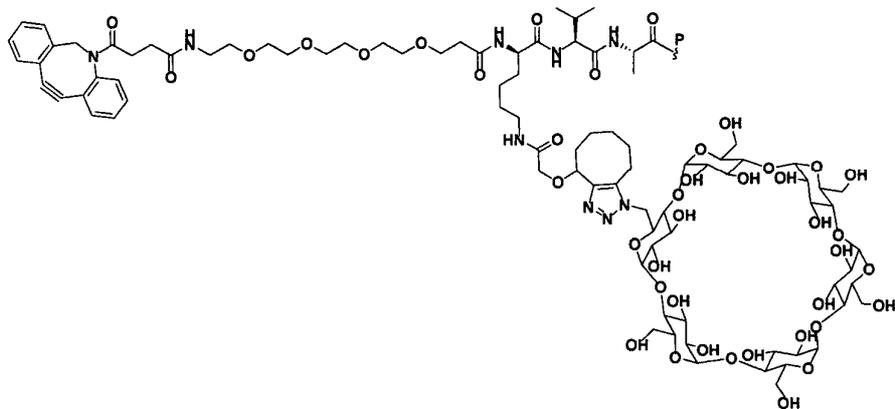
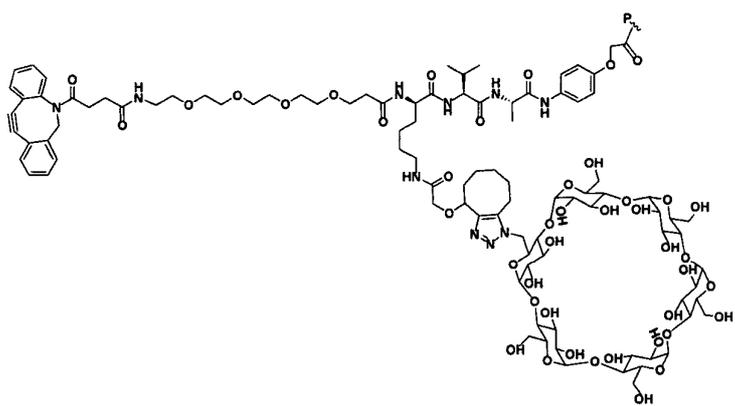
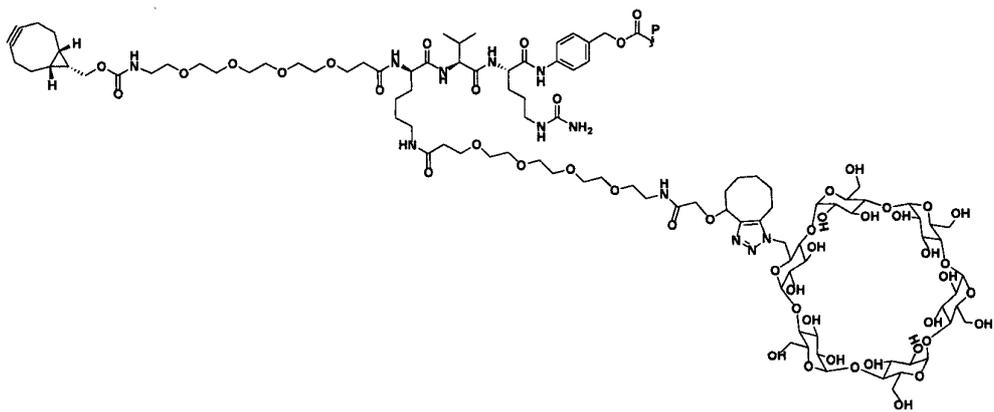
В некоторых примерах соединение формулы (II) включает группу, выбранную из



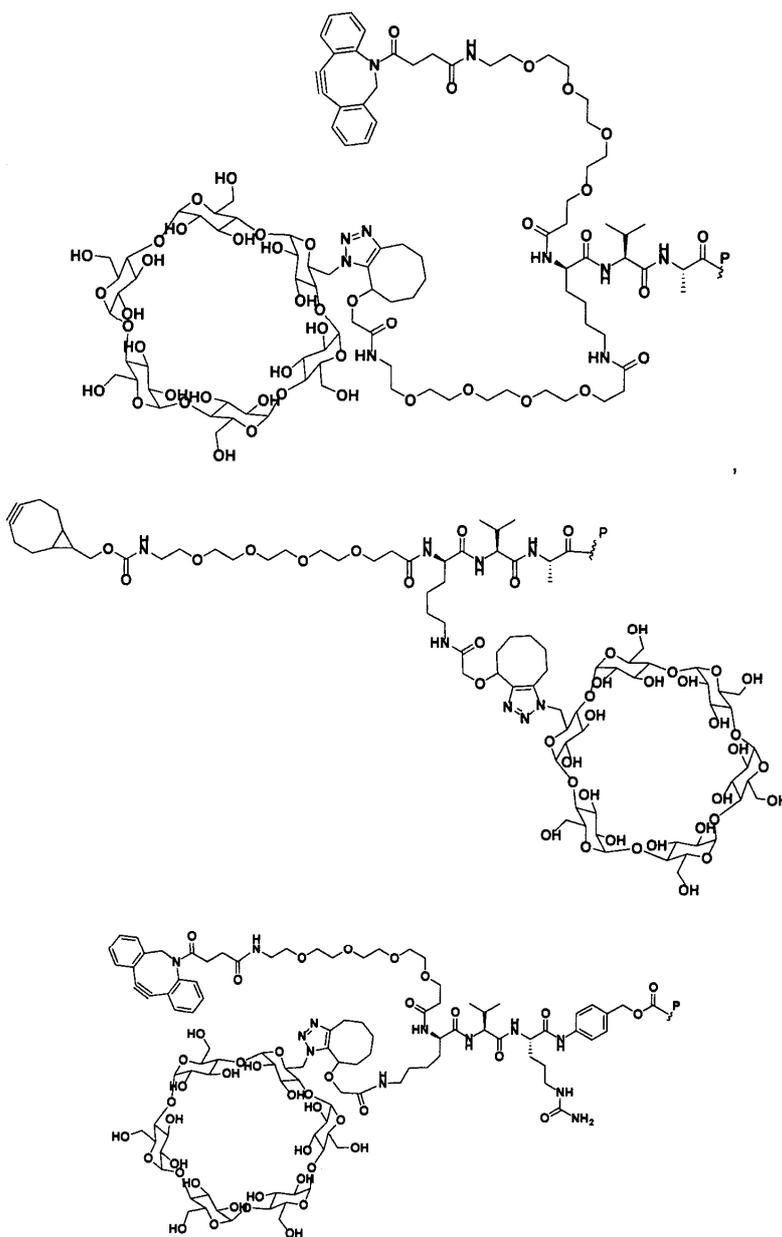
046545

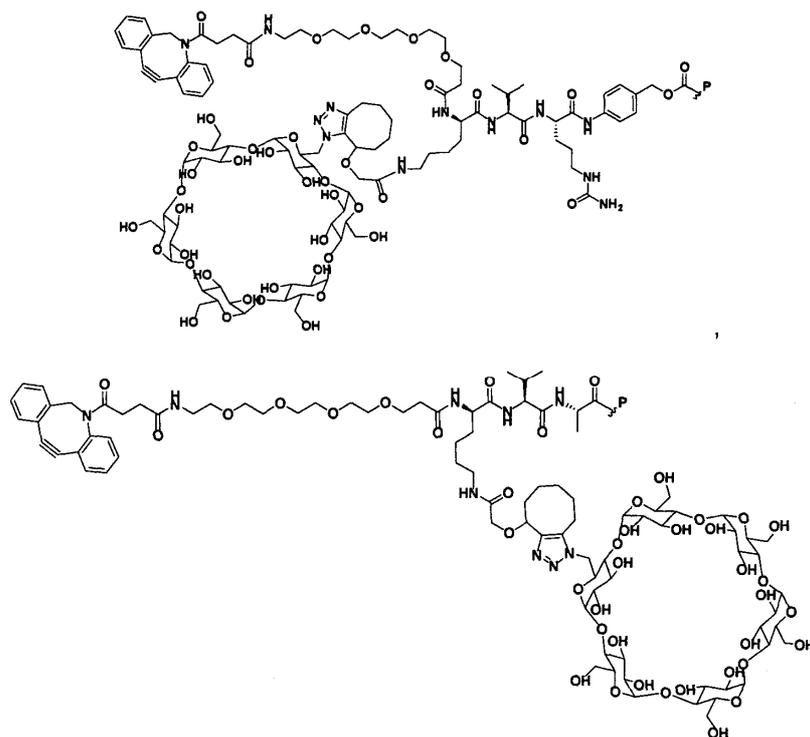


046545



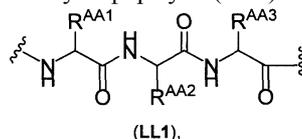
046545





или его соль, сольват, стереоизомерная форма, его региоизомер или их смесь региоизомеров, где каждый $\frac{P}{\xi}$ представляет собой связь с полезной нагрузкой.

В некоторых примерах -LL- соответствует формуле (LL1)

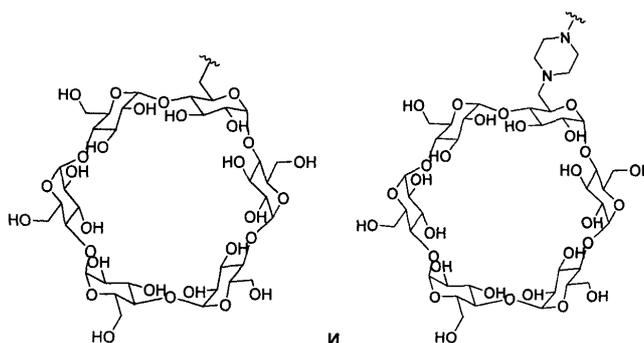


где R^{AA1} , R^{AA2} и R^{AA3} , каждый независимо, представляют собой боковые цепи аминокислот, по меньшей мере, одна из которых связана прямо или косвенно с -SP-RG-SP-CD. В некоторых примерах R^{AA1} представляет собой боковую цепь аминокислоты лизина. В некоторых примерах R^{AA2} представляет собой боковую цепь аминокислоты валина. В некоторых примерах R^{AA3} представляет собой боковую цепь аминокислоты аланина. В некоторых примерах R^{AA3} представляет собой боковую цепь аминокислоты цитрулина. В некоторых примерах R^{AA1} представляет собой боковую цепь аминокислоты лизина, связанную прямо или косвенно с CD, а R^{AA2} и R^{AA3} независимо представляют собой боковые цепи аминокислот валина и аланина. В некоторых примерах R^{AA1} представляет собой боковую цепь аминокислоты лизина, связанную прямо или косвенно с CD, а R^{AA2} и R^{AA3} независимо представляют собой боковые цепи аминокислоты валина и цитрулина.

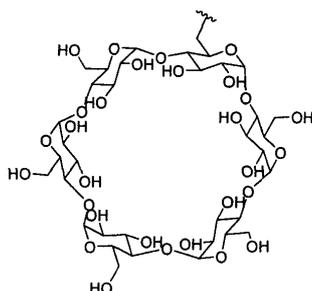
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, R^{AA1} представляет собой боковую цепь лизина, связанную прямо или косвенно с CD, а R^{AA2} и R^{AA3} представляют собой либо лизин и валин, либо боковые цепи валина и лизина соответственно.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, CD независимо представляет собой циклодекстрин. В некоторых примерах CD представляет собой α -циклодекстрин. В некоторых примерах CD представляет собой β -циклодекстрин. В некоторых примерах CD представляет собой γ циклодекстрин. В любом из этих примеров α -, β - или γ -циклодекстрин необязательно замещен.

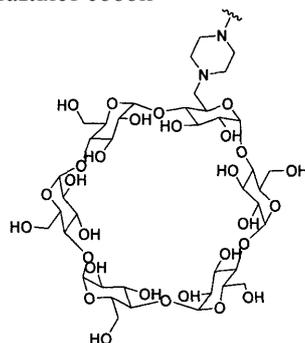
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, CD независимо в каждом случае выбирается из:



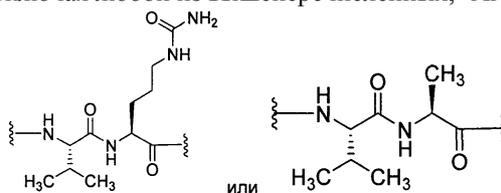
где  обозначает атом, через который CD связан с соседними группами в формуле. В некоторых примерах CD представляет собой



В некоторых примерах CD представляет собой



В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, $-AA^2-$ является



В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, спейсерная группа независимо в каждом случае выбирается из группы, состоящей из C_{1-6} алкилена, $-NH-$, $-C(O)-$, $(-CH_2-CH_2-O)_e$, $-NH-CH_2-CH_2-(-O-CH_2-CH_2)_e-C(O)-$.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс m , q или e равен 1. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс m равен 1. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс q равен 1. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс e равен 1.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс m , q или e равен 2. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс m равен 2. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс q равен 2. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс e равен 2.

В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс m , q или e равен 3. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс m равен 3. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс q равен 3. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс e равен 3.

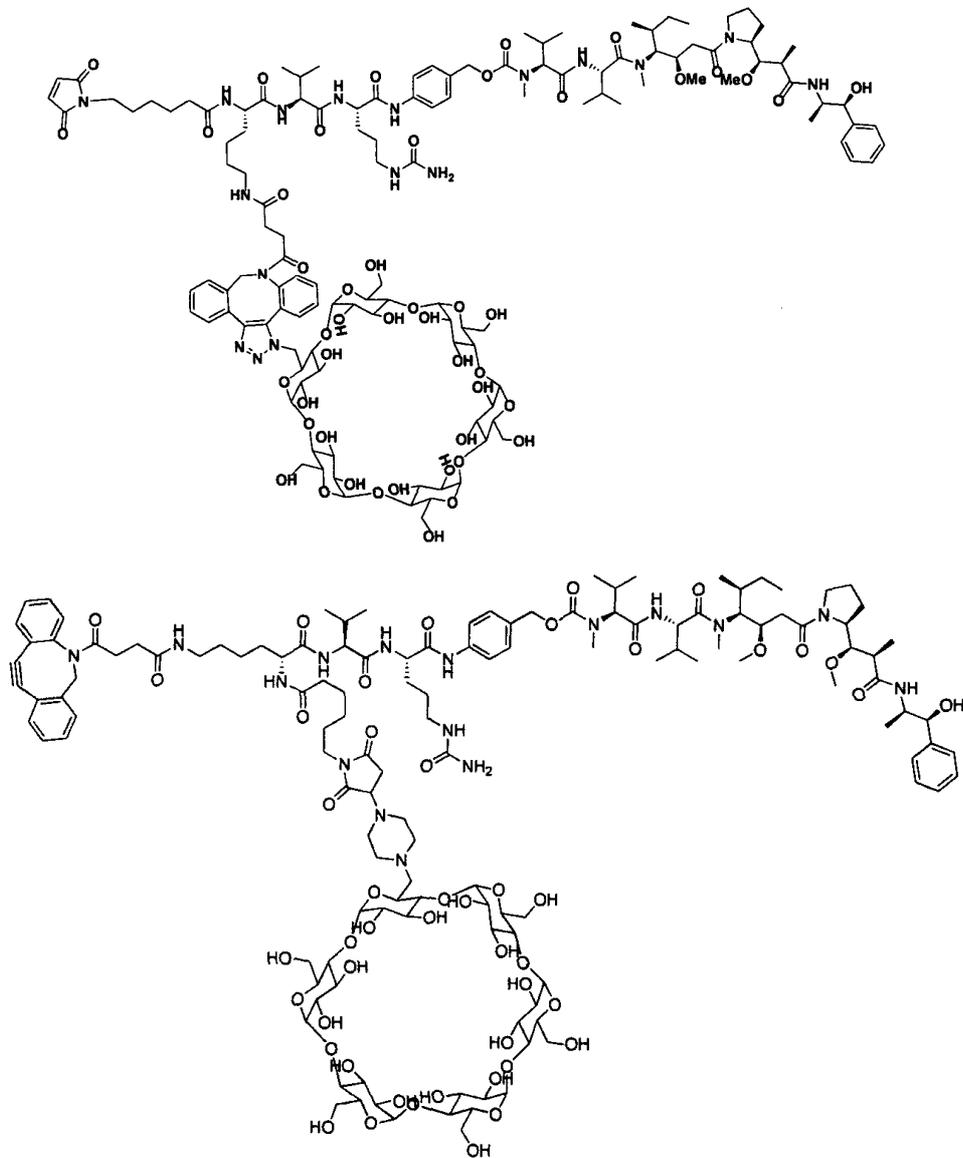
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс m , q или e равен 4. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс m равен 4. В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс q равен 4. В некоторых примерах, включая любой из

вышеперечисленных, индекс e равен 4.

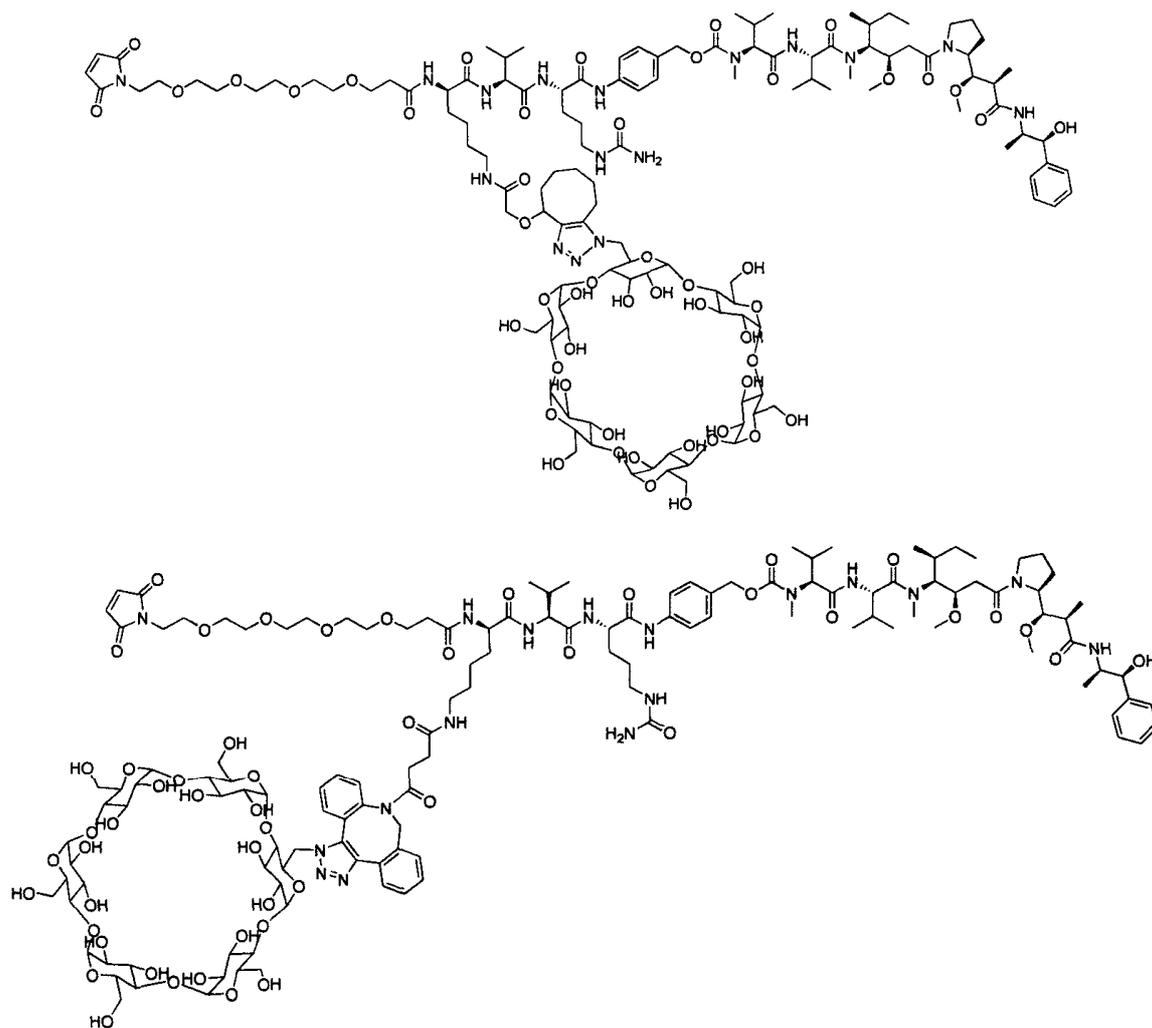
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, индекс r равен 1.

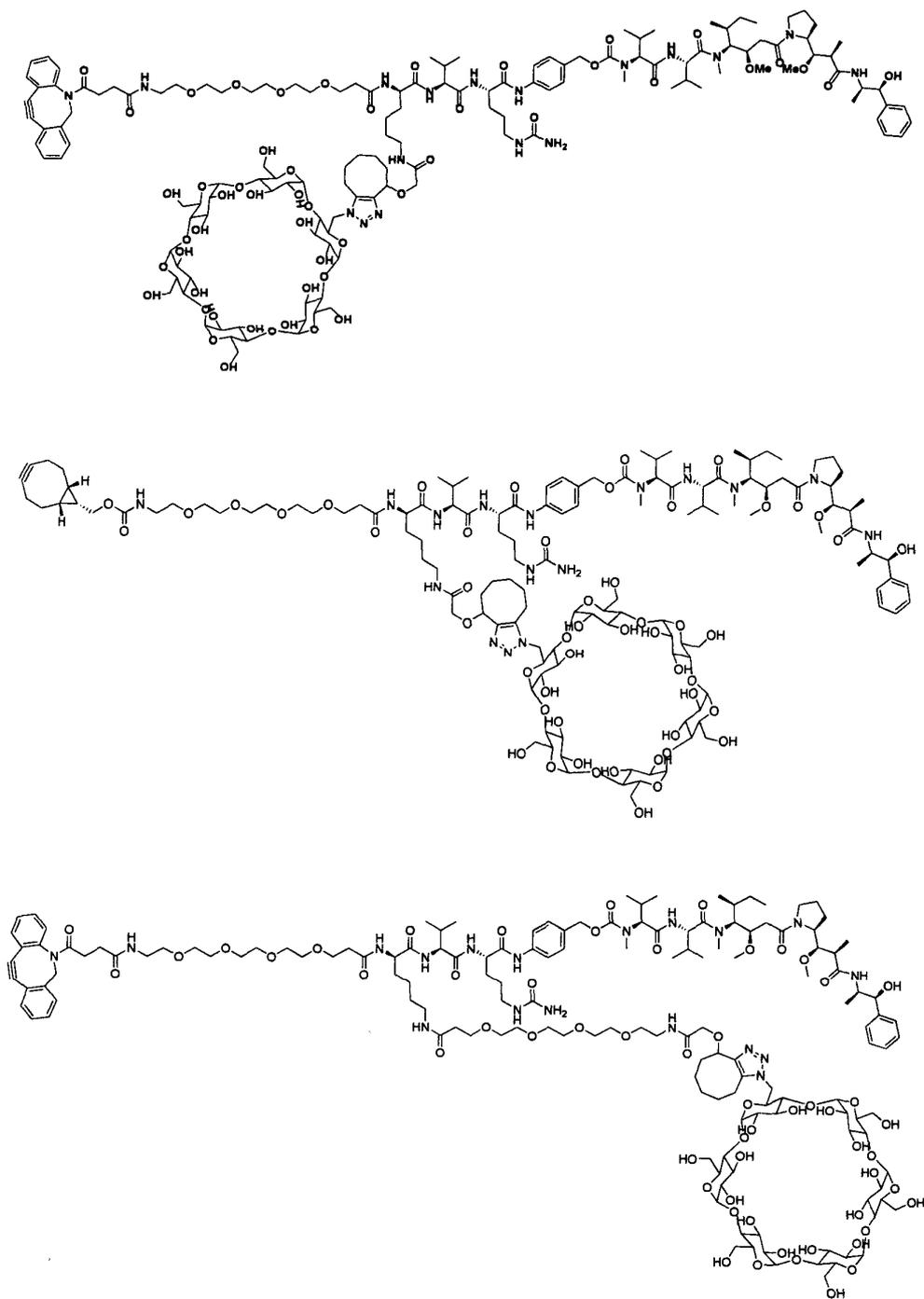
В некоторых примерах, включая любой из вышеперечисленных, РА представляет собой остаток группы, выбранной из группы, состоящей из доластатина, ауристатина, майтансиноида, растительного алкалоида, таксана, алкалоида барвинка. В некоторых примерах РА представляет собой любое соединение, указанное на любой из фиг. 1.

В некоторых примерах соединение формулы (II) выбрано из:

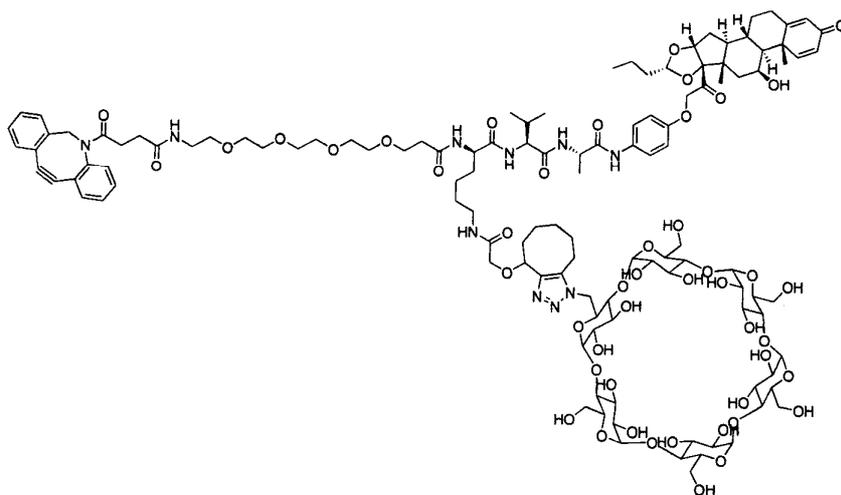
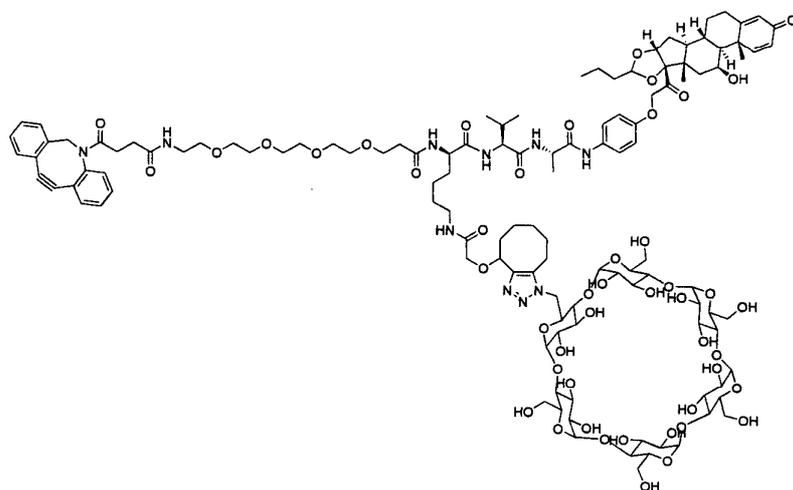
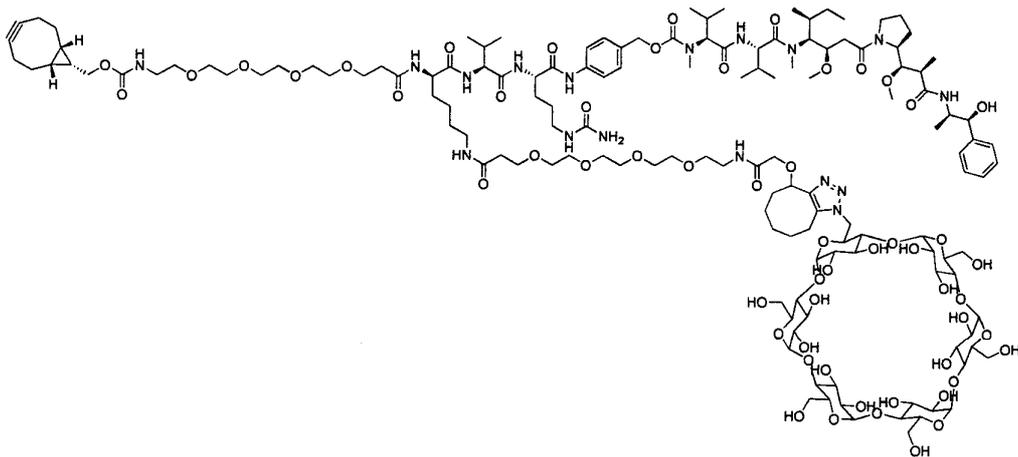


046545

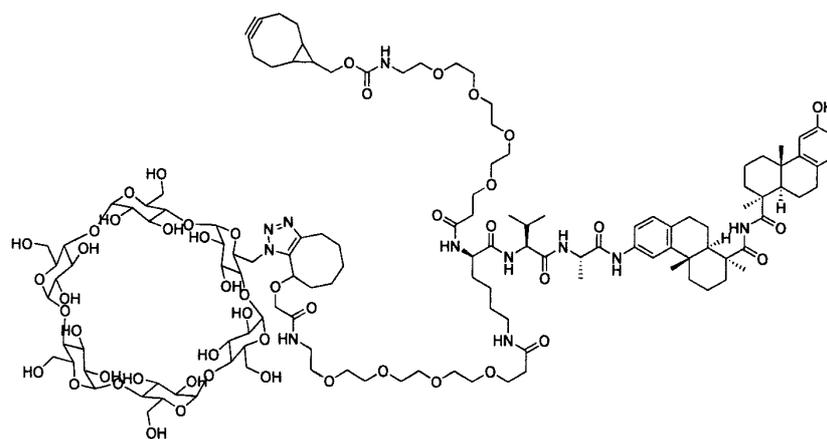
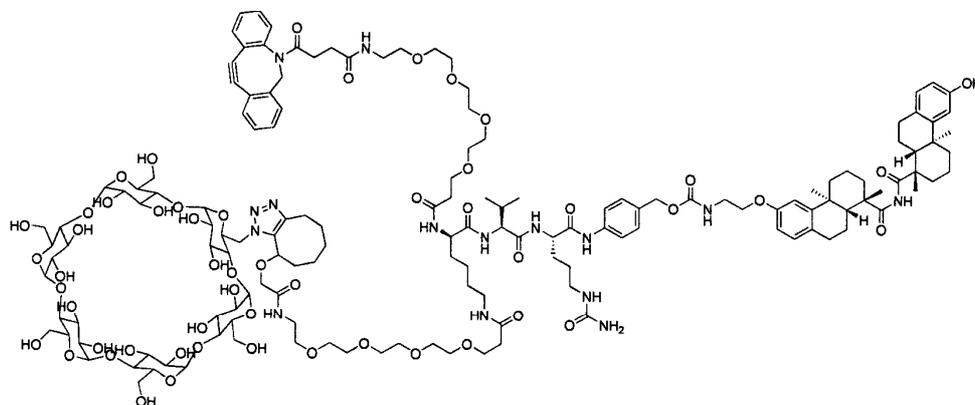
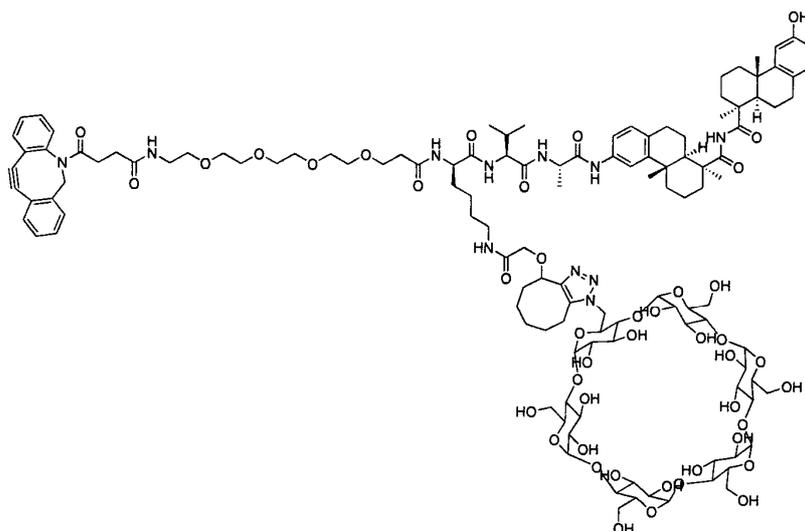




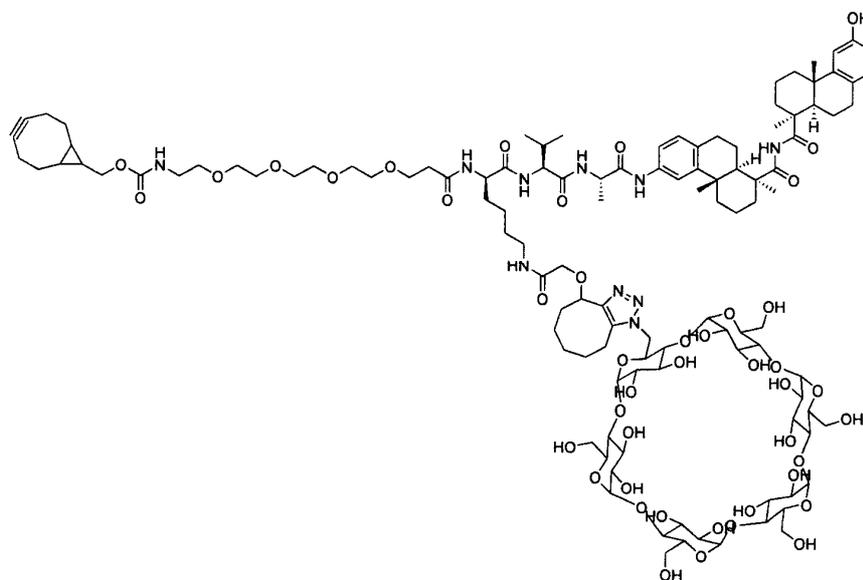
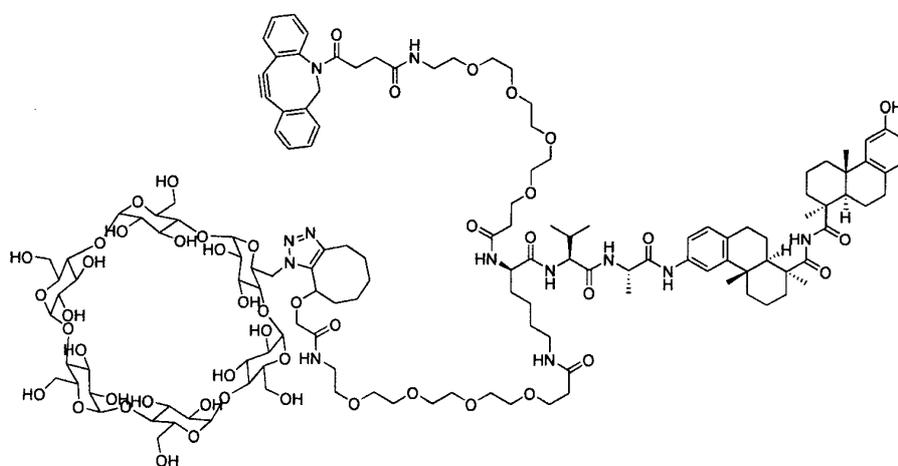
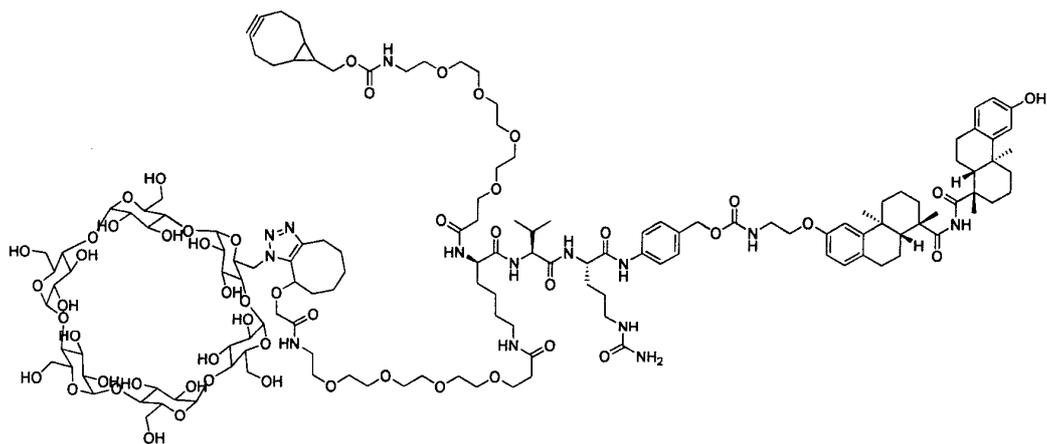
046545



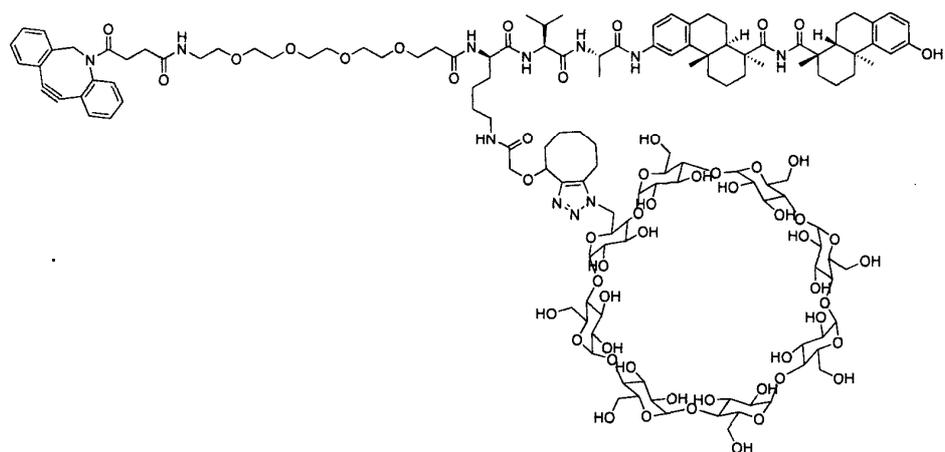
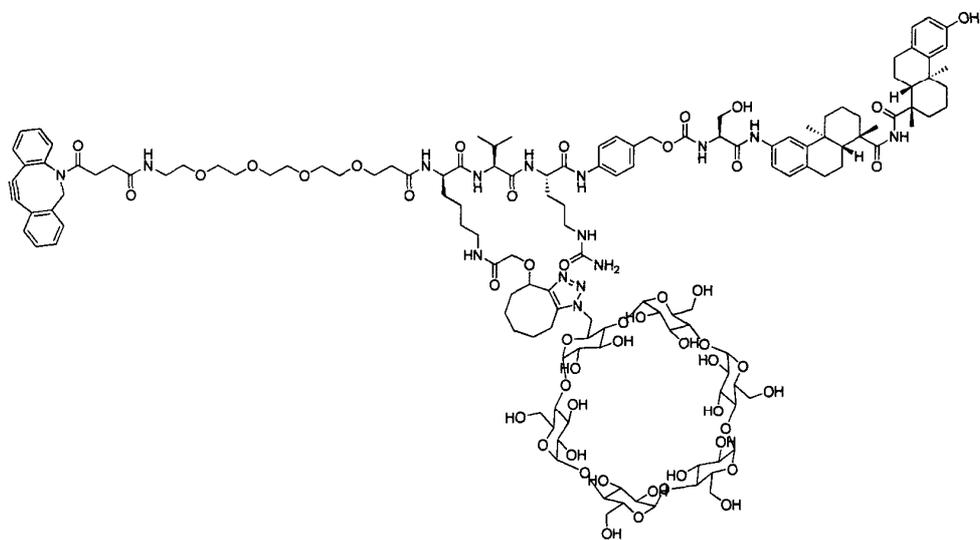
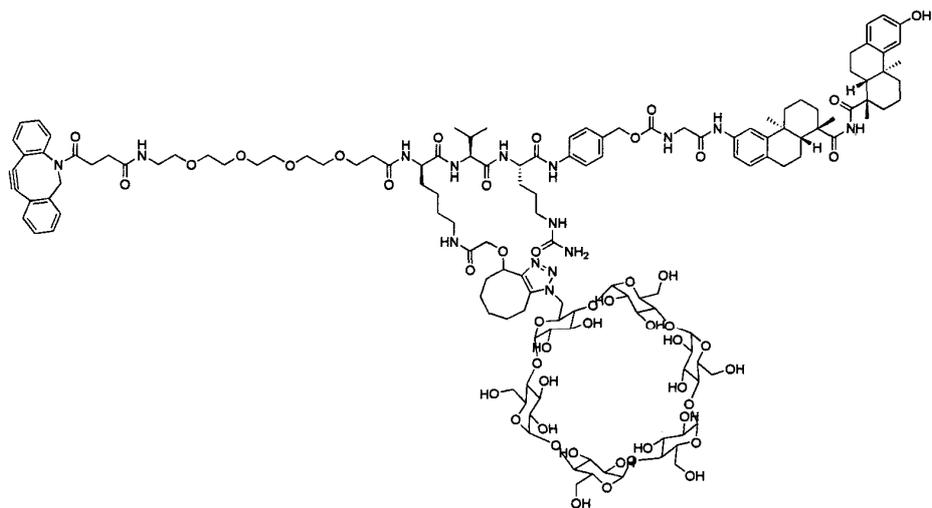
046545

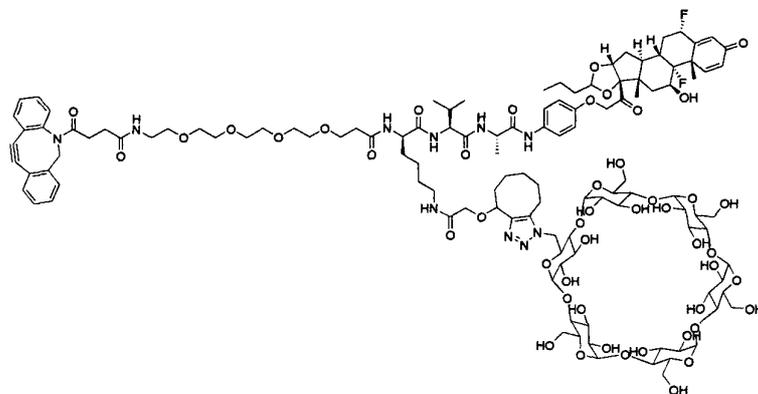
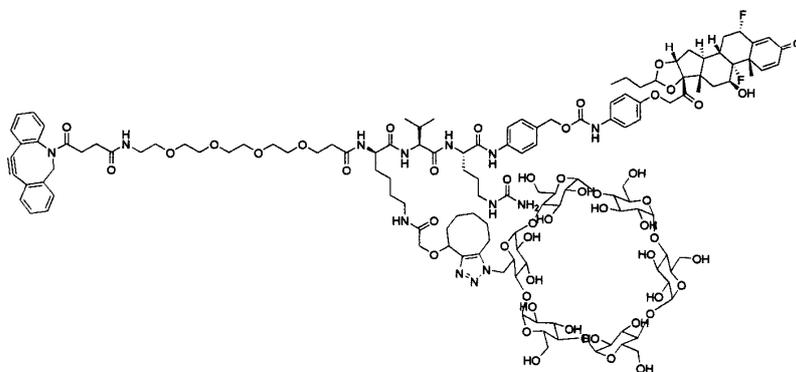
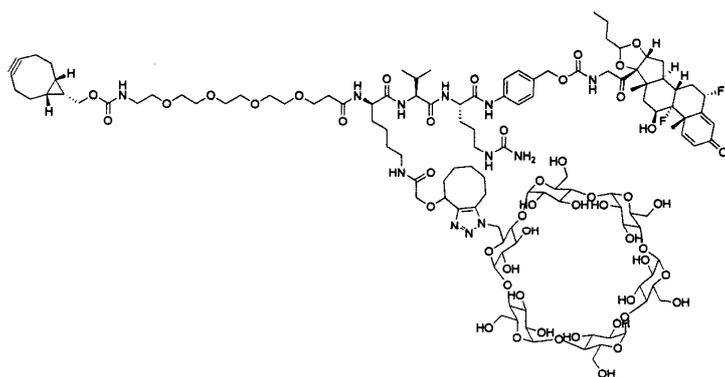
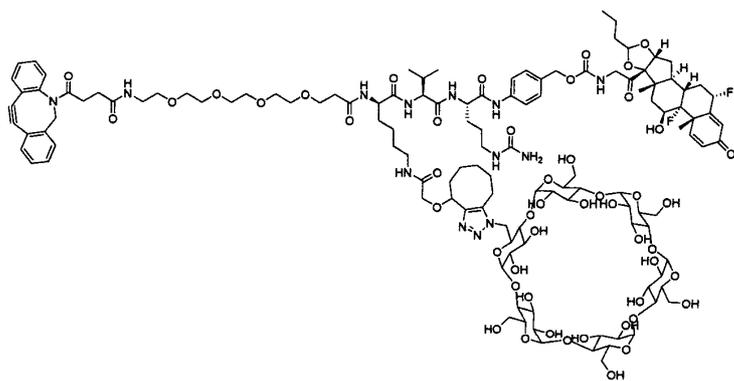


046545



046545





или его стереоизомерная форма, или его региоизомер, или смесь их региоизомеров.
В некоторых примерах, изложенных в настоящем документе, представляет собой линкер-полезную нагрузку, содержащую соединение, изложенное в данном документе.
В некоторых примерах, изложенных здесь, представляет собой линкер-полезную нагрузку, содер-

жащую соединение, изложенное в настоящем документе, связанное с кислородом или первичным или вторичным азотом любого соединения, описанного в настоящем документе.

В некоторых примерах, изложенных в настоящем документе, представляет собой конъюгат антители-лекарственное средство, включающий соединение или линкер-полезную нагрузку, изложенные в настоящем документе, связанные с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

Способы приготовления соединений.

Представленные здесь соединения могут быть получены, выделены или получены любым способом, очевидным для специалистов в данной области. Примерные способы приготовления подробно описаны в приведенных ниже примерах. В определенных вариантах осуществления соединения, представленные в настоящем документе, могут быть получены согласно фиг. 1-11 и 13-14.

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

Связующие агенты, например антитела, также могут быть конъюгированы посредством клик-химических реакций. В некоторых вариантах осуществления упомянутых клик-химических реакций линкер-полезная нагрузка включает реакционноспособную группу, например, алкин, которая способна подвергаться реакции 1,3-циклоприсоединения с азидом. Такие подходящие реакционноспособные группы описаны выше. Антитело включает одну, включает одну или несколько азидных групп. Такие антитела включают антитела, функционализированные, например, азидо-полиэтиленгликолевыми группами. В некоторых вариантах осуществления такое функционализированное антитело получают обработкой антитела, имеющего по меньшей мере один остаток глутамина, например тяжелой цепи Gln295 и/или Gln55, соединением первичного амина в присутствии фермента транслгутаминазы. Такие антитела могут также включать мутанты Asn297Gln (N297Q). В некоторых вариантах осуществления такое функционализированное антитело получают обработкой антитела, имеющего, по меньшей мере, два остатка глутамина, например, тяжелой цепи Gln295 и тяжелой цепи Gln297, первичным соединением амина в присутствии фермента транслгутаминазы. Такие антитела включают мутанты Asn297Gln (N297Q). В некоторых вариантах осуществления антитело имеет две тяжелые цепи, как описано в этом параграфе, всего два или четыре остатка глутамина. В некоторых случаях конъюгированные антитела содержат один или несколько дополнительных природных остатков глутамина в их переменных областях, которые могут быть доступны для транслгутаминазы и, следовательно, могут быть конъюгированы, например Gln55. В этих случаях антитела после конъюгации через транслгутаминазу могут иметь значение DAR выше 4. Такие антитела включают мутанты Asn297Gln (N297Q). В некоторых вариантах осуществления антитело имеет две тяжелые цепи, как описано в этом параграфе, в общей сложности два или всего четыре или всего пять или шесть остатков глутамина.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит остаток глутамина в одном или нескольких положениях тяжелой цепи, пронумерованных 295 в системе нумерации ЕС. В настоящем раскрытии эта позиция упоминается как глутамин 295, или как Gln295, или как Q295. Специалистам в данной области понятно, что это консервативный глутаминовый остаток в последовательности многих антител дикого типа. В других полезных вариантах осуществления антитело может быть сконструировано так, чтобы оно содержало остаток глутамина. Способы модификации последовательности антитела для включения остатка глутамина известны специалистам в данной области (см., например, Ausubel et al. *Current Protoc. Mol. Biol.*).

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

тельно содержит остаток Q55.

Специалистам в данной области понятно, что антитела часто гликозилированы по остатку N297, около остатка Q295 в последовательности тяжелой цепи. Гликозилирование по остатку N297 может влиять на трансглутаминазу по остатку Q295 (Dennler et al., выше). Соответственно, в предпочтительных вариантах осуществления антитело не гликозилировано. В определенных вариантах осуществления антитело является дегликозилированным или агликозилированным. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь антитела имеет мутацию N297. В качестве альтернативы указано, что антитело мутировано, чтобы больше не иметь остатка аспарагина в положении 297. В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь антитела имеет мутацию N297Q. Такое антитело может быть получено путем сайт-направленного мутагенеза для удаления или отключения последовательности гликозилирования или путем сайт-направленного мутагенеза для вставки остатка глутамина в сайт, отличный от любого мешающего сайта гликозилирования или любой другой мешающей структуры. Такое антитело также может быть выделено из природных или искусственных источников.

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

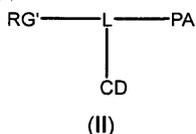
Первичный амин может быть любым первичным амином, который способен образовывать ковалентную связь с остатком глутамина в присутствии трансглутаминазы. Полезные первичные амины описаны здесь. Трансглутаминаза может представлять собой любую трансглутаминазу, которая считается подходящей для специалистов в данной области. В некоторых вариантах осуществления трансглутаминаза представляет собой фермент, который катализирует образование изопептидной связи между свободной аминогруппой на первичном аминном соединении и ацильной группой на боковой цепи глутаминового остатка. Трансглутаминаза также известна как белок-глутамин- γ -глутамилтрансфераза. В конкретных вариантах осуществления трансглутаминаза классифицируется как ЕС 2.3.2.13. Трансглутаминаза может быть из любого источника, который считается подходящим. В определенных вариантах осуществления трансглутаминаза является микробной. Полезные трансглутаминазы были выделены из *Streptomyces mobaraense*, *Streptomyces cinnamomeum*, *Streptomyces griseo-cameum*, *Streptomyces lavendulae* и *Bacillus subtilis*. Также можно использовать немикробные трансглутаминазы, включая трансглутаминазы млекопитающих. В определенных вариантах осуществления трансглутаминаза может быть получена любым способом или получена из любого источника, который считается подходящим для специалиста в данной области. В конкретных вариантах осуществления трансглутаминаза получена из коммерческого источника.

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

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

Примерные реакции представлены в примерах ниже.

В некоторых примерах в настоящем документе описан способ получения конъюгата, включающий обработку или контактирование соединения со связующим агентом в условиях сочетания, где соединение содержит реакционноспособный линкер, связанный по меньшей мере с одним фрагментом полезной нагрузки и связанный по меньшей мере с одним фрагментом циклодекстрина через ковалентный линкер, где указанный ковалентный линкер связан прямо или косвенно с каждым из реакционноспособного линкера, фрагмента полезной нагрузки, фрагмента циклодекстрина. В некоторых примерах соединение, которое реагирует со связующим агентом, представляет собой соединение формулы (II):



В формуле (II) RG' представляет собой реакционноспособную группу, L представляет собой трех-

валентный линкер, CD представляет собой остаток циклодекстрина; и РА является остатком полезной нагрузки.

В некоторых примерах связывающий агент, который реагирует с соединением формулы (II), представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых примерах здесь D-Lys может быть заменен реагентом, представленным на фиг. 20.

В некоторых примерах содержащие циклодекстрин фрагменты могут реагировать в биоортогональной реакции, выбранной из клик-реакции [3+2], реакции Дильса-Альдера, восстановительного аминирования, реакции фотоклика или других реакций.

Другие полезные биоортогональные реакции, подходящие для использования с описанными здесь способами, включают, но не ограничиваются ими, лигирование по Штаудингеру, клик-реакцию, тетразиновое лигирование и фото-клик-реакцию.

Следующая ссылка показывает примерные реакции и реагенты, которые могут использоваться с биоортогональными реакциями, изложенными в данном документе: Zheng, Mengmeng и др., *Molecules* 2015, 20, 3190-3205, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте для все цели.

Фармацевтические композиции и методы лечения.

Здесь предоставлены способы лечения и профилактики заболеваний, состояний или расстройств, включающие введение терапевтически или профилактически эффективного количества одного или нескольких соединений, раскрытых здесь, например, одного или нескольких соединений формулы, представленных здесь. Специалист в данной области поймет, что заболевания, расстройства и/или состояния включают, но не ограничиваются ими, заболевания, связанные с антигенами, перечисленными здесь.

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

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

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

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения соединений, описанных здесь. Таким образом, "начальная доза" представляет собой доза, которая вводится в начале схемы лечения (также называемая "базовой дозой"); "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут содержать одинаковое количество соединения, описанного в настоящем документе, но, как правило, могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. В некоторых вариантах осуществления количество соединения, содержащегося в начальной, вторичной и/или третичной дозах, изменяется друг от друга (например, корректируется в зависимости от ситуации) в течение курса лечения. В некоторых вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале схемы лечения в виде "нагрузочных доз" с последующими последующими дозами, которые вводят реже (например, "поддерживающие дозы").

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

мой следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

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

В вариантах осуществления, включающих множество вторичных доз, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждая вторичная доза может вводиться пациенту через 1-2 недели или через 1-2 месяца после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, в вариантах осуществления, включающих множественные третичные дозы, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждая третичная доза может вводиться пациенту через 2-12 недель после непосредственно предшествующей дозы. В определенных вариантах осуществления изобретения частота, с которой вторичные и/или третичные дозы вводятся пациенту, может варьироваться в течение курса лечения. Частота введения может также регулироваться врачом в течение курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

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

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

В некоторых примерах, изложенных в настоящем документе, представляет собой способ лечения заболевания, расстройства или состояния, включающий введение пациенту, имеющему указанное расстройство, терапевтически эффективного количества соединения формул (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ib2), (Ib3), (Ib4), (Ib5), (Ib6), (Ic), (Ic1), (Id), (Ie), (Ie1), (Ie2), (If) или его фармацевтическая композиция.

В некоторых примерах, изложенных в настоящем документе, представляет собой способ предотвращения заболевания, расстройства или состояния, включающий введение пациенту, имеющему указанное расстройство, профилактически эффективного количества соединения формул (I), (Ia), (Ib), (Ib1), (Ib2), (Ib3), (Ib4), (Ib5), (Ib6), (Ic), (Ic1), (Id), (Ie), (Ie1), (Ie2), (If) или его фармацевтическая композиция.

В некоторых примерах, изложенных в настоящем документе, представляет собой способ лечения или профилактики заболевания, расстройства или состояния, выбранного из группы, состоящей из пролиферативного расстройства, нейродегенеративного расстройства, иммунологического расстройства, аутоиммунного заболевания, воспалительного расстройства, дерматологического заболевания, нарушение обмена веществ, сердечнососудистые заболевания и желудочно-кишечные заболевания.

В настоящем документе представлены способы модулирования экспрессии белка LDLR (рецептора липопротеина низкой плотности) или оттока холестерина в клетке, включающие контактирование указанной клетки с конъюгатом лекарственное средство-антитело (ADC), где ADC содержит антитело, нацеленное на указанную клетку, циклодекстрин и агонист LXR.

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

документе предлагаются способы лечения или профилактики рака полости рта. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики плоскоклеточного рака полости рта. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики рака предстательной железы. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики лимфомы Ходжкина. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики рака молочной железы.

Нейродегенеративное расстройство может быть любым нейродегенеративным расстройством, известным специалистам в данной области. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики болезни Альцгеймера. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики болезни Паркинсона. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики болезни Хантингтона. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики бокового амиотрофического склероза. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или предотвращения экспрессии гена миелина. В определенных вариантах осуществления в настоящем документе предлагаются способы лечения или профилактики состояний, заболеваний или нарушений миелинизации и ремиелинизации.

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

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

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

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

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

В некоторых примерах, изложенных в настоящем документе, представляет собой способ лечения

заболевания или расстройства у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту соединения или фармацевтической композиции, изложенных здесь. В некоторых примерах вводимое соединение представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, изложенный здесь.

В некоторых примерах в настоящем документе представлен способ конъюгата антитело-лекарственное средство, включающий стадию контактирования связывающего агента с соединением линкер-полезная нагрузка в условиях, подходящих для образования связи между связывающим агентом и соединением.

В некоторых примерах, изложенных в настоящем документе, представляет собой способ лечения пролиферативного заболевания, метаболического заболевания, воспаления или нейродегенеративного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества для лечения соединения или фармацевтической композиции, указанных в настоящем документе. В некоторых примерах вводимое соединение представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, изложенный здесь.

В некоторых примерах, изложенных в настоящем документе, представляет собой способ лечения заболевания, расстройства или состояния у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества для лечения соединения или фармацевтической композиции, изложенных в настоящем документе. В некоторых примерах вводимое соединение представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, изложенный здесь.

В некоторых примерах изложенный здесь представляет собой способ лечения пролиферативного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества для лечения соединения или фармацевтической композиции, изложенных здесь. В некоторых примерах вводимое соединение представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, изложенный здесь.

В некоторых примерах изложенный здесь представляет собой способ лечения метаболического заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества для лечения соединения или фармацевтической композиции, изложенных здесь. В некоторых примерах вводимое соединение представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, изложенный здесь.

В некоторых примерах изложенный здесь представляет собой способ лечения воспаления у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества для лечения соединения или фармацевтической композиции, изложенных здесь. В некоторых примерах вводимое соединение представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, изложенный здесь.

В некоторых примерах изложенный здесь представляет собой способ лечения нейродегенеративного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества для лечения соединения или фармацевтической композиции, изложенных здесь. В некоторых примерах вводимое соединение представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, изложенный здесь.

Примеры

В примерах изложены линкеры циклодекстрин-(PEG)_n, которые связывают антитела по меньшей мере с тремя типами полезных нагрузок (см. фиг. 1). В конъюгациях использовали два антитела: анти-HER2-антитело и анти-PRLR (анти-PRLR Ab) антитело. Антитела были связаны либо непосредственно с полезными нагрузками малеимидного линкера (см. фиг. 13), либо через азидо-функциональную группу с полезными нагрузками DIBAC-линкерного соединения посредством реакций щелчка [3+2] (см. фиг. 14).

По сравнению с таковыми без остатков циклодекстрина конъюгаты с линкерами циклодекстрин-(PEG)_n показали более низкие рассчитанные значения LogP/LogD, более короткие времена удерживания при обратной ВЭЖХ и лучшую растворимость в воде, что указывает на лучшую гидрофильность (табл. 8). Эти новые линкер-полезные нагрузки были также расщеплены в анализах катепсина В (табл. 8). Кроме того, эти ADC показали сопоставимую биологическую активность с активностями без CD-фрагментов в анализах *in vitro* (табл. 10, 11, 12).

Используемые здесь символы и условные обозначения, используемые в процессах, и примеры, приведенные в настоящем документе, соответствуют тем, которые используются в современной научной литературе, например, в журнале Американского химического общества или в журнале биологической химии, если не указано иное или обратное. В частности, но без ограничения, следующие сокращения могут быть использованы в примерах и во всем описании:

| Аббревиатура | Термин |
|-----------------------------|---|
| ADC | Конъюгат антитело-лекарственное средство |
| Агликозилированное антитело | Антитело, не имеющее гликана |
| API | Ионизация при атмосферном давлении |
| aq | Водный |
| Boc | N-трет-бутоксикарбонил |
| BupH™ | Термическое наукоёмкое изделие № 28372, содержащее 100 мМ фосфата натрия и 150 мМ хлорида натрия, без калия, рН довели до 7,2-7,6-7,8 Мк, если не указано иное. |
| capB | Катепсин В |
| CD | Циклодекстрин |
| COT | Циклооктинол |
| Da | Дальтон |
| DAD | Диодно-матричный детектор |
| DAR | Отношение лекарственного средства к антителу |
| DCM | Дихлорметан |
| DIBAC | 11,12-дидегидро-5,6-дигидро-дibenzo[b,e]азоцин |
| DIBAC–Suc | 11,12-дидегидро-5,6-дигидро-дibenzo[b,e]азоцин сукцинаминовая кислота |
| DIBAC–Suc–PEG4–VC–pAB–PNP | {4–[(2S)–2–[(2S)–2–[1–(4–{2–азатрицикло[10.4.0.0 ^{4,9}]гексадека-1 (12),4(9),5,7,13,15-гексан-10-ин-2-ил)-4-оксобутанамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино-)пентанамидо]фенил}метил 4–нитрофенилкарбонат |
| DIBACT | 3H–бензо[c]-1,2,3–триазоло[4,5–e][1]бензазоцин, 8,9–дигидро– |
| DIPEA | Диизопропилэтиламин |
| D-Lys | D-Лизин |
| DMF | N,N-диметилформамид |
| DMSO | Диметилсульфоксид |
| EC | Ферментная комиссия |
| ELSD | Испарительный детектор рассеяния света |
| ESI | Ионизация электрораспылением |
| Fmoc | Флуоренилметилоксикарбонил |
| Fmoc–vcPAB–PNP | N-Fmoc-L-валин-L-цитруллин-p-аминобензиловый спирт p-нитрофенилкарбонат |
| г | Грамм |
| HATU | 2–(7–аза–1H–бензотриазол–1–ил)–1,1,3,3–тетраметилурония гексафторфосфат |
| HC | Тяжелая цепь иммуноглобулина |
| HEK | Эмбриональная почка человека (клетки) |

| | |
|-----------------|---|
| ВЭЖХ | Высокоэффективная жидкостная хроматография |
| час, ч или часы | часы |
| LC | Легкая цель иммуноглобулина |
| LCh | Газожидкостная хроматография |
| MAL | Малеимид |
| MALDI | Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация |
| MC | Малеимидокапроил |
| мг | миллиграммы |
| мин. | минуты |
| мл | миллилитры |
| mmh | метка мик-мик-гексагистидин |
| мкл | микролитры |
| мМ | миллимоляр |
| мкм | микромоль |
| MMAE | Монометил ауристатин E |
| МС | Масс-спектрометрия |
| MsCl | Метансульфонилхлорид |
| MSD | Масс-селективный детектор |
| MTG | Микробная трансглутаминаза (MTG EC 2.3.2.13, Zedira, Дармштадт, Германия) |
| м.м. | Молекулярная масса |
| ncADC | Конъюгат нецитотоксическое антитело-лекарственное средство |
| NHS | N-гидроксисукцинимид |
| нМ | наномоль |
| ЯМР | Ядерно-магнитный резонанс |

| | |
|-------------------|--|
| NOESY | Эффект Оверхаузера при спектроскопии |
| PAB | Пара-аминобензилокси(карбонил) |
| PBS | 10 мМ натрий-фосфатный буфер и 150 мМ хлорид натрия |
| PBSg | 10 мМ натрий-фосфатный буфер, 150 мМ хлорид натрия и 5% глицерина |
| PEG | Полиэтиленгликоль |
| PNP | p-нитрофенил |
| MC-VC-PAB-PNP | Малеимидокапроил-L-валин-L-цитруллин-пара-аминобензилокси(карбонил)-p-нитрофенилкарбонат |
| ppm (част./млн) | Частей на миллион (химический сдвиг, δ) |
| RP | Обращенная фаза |
| R _t | Время удержания |
| rt | комнатная температура |
| SDS-PAGE | Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия |
| SEC | Гель-фильтрация |
| Suc или SC | Сукциновая кислота |
| TCEP | Трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид |
| TEA | Триэтиламин |
| TMS | тетраметилсилан |
| TFA | Трифторуксусная кислота |
| TG | Трансглутаминаза |
| THF | Тetraгидрофуран |
| TOF | Время пролета |
| TsCl | 4-толуолсульфонилхлорид |
| UPLC | Ультразэффективная жидкостная хроматография |
| УФ | Ультрафиолет |
| VA | Валин-аланин |
| VC или vc | Валин-цитруллин |
| VC-PAB или vc-PAB | Валин-цитруллин-p-аминобензилокси (карбонил) |

Некоторые варианты реализации данного изобретения проиллюстрированы следующими неограничивающими примерами.

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

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

Измерения ВЭЖХ-МС проводились в системе Agilent 1200 HPLC/6100 SQ при следующих условиях.

Метод А для измерения ВЭЖХ-МС включает в качестве подвижной фазы: А: воду (0,01% трифторуксусной кислоты (TFA)), В: ацетонитрил (0,01% TFA); Фаза градиента: 5% В увеличилось до 95% В в течение 15 мин (мин); Скорость потока: 1,0 мл/мин; Колонка: SunFire C18, 4,6×50 мм, 3,5 мкм; Температура колонки: 50°C. Детекторы: аналого-цифровой преобразователь (АЦП), испарительный светорассеивающий детектор (ELSD), ионно-матричный детектор (DAD) (214 нм и 254 нм), электрораспылительная ионизация, атмосферная ионизация (ES-API).

Метод В для измерений ВЭЖХ-МС включал в качестве подвижной фазы: А: вода (10 мМ NH₄HCO₃), В: ацетонитрил; Градиентная фаза: от 5% до 95% В в течение 15 мин; Скорость потока: 1,0 мл/мин; Колонка: XBridge C18, 4,6×50 мм, 3,5 мкм; Температура колонки: 50°C. Детекторы: АЦП ELSD, DAD (214 нм и 254 нм), масс-селективный детектор (MSD) (ES-API).

Измерение ЖХ-МС проводилось в системе Agilent 1200 HPLC/6100 SQ с использованием следующих условий.

Метод А для измерения ЖХ-МС включен в качестве прибора: WATERS 2767; колонка: Shimadzu Shim-Pack, PRC-ODS, 20×250 мм, 15 мкм, два соединенных последовательно; Подвижная фаза: А: вода (0,01% TFA), В: ацетонитрил (0,01% TFA); Фаза градиента: 5% В увеличилось до 95% В в течение 3 мин; Скорость потока: 1,8-2,3 мл/мин; Колонка: SunFire C18, 4,6×50 мм, 3,5 мкм; Температура колонки: 50°C. Детекторы: АЦП ELSD, DAD (214 нм и 254 нм), ES-API.

Метод В для измерения ЖХ-МС включен, в качестве прибора: Gilson GX-281; колонка: Xbridge Prep C18 10 мкм OBD, 19×250 мм; Подвижная фаза: А: вода (10 мМ NH₄HCO₃), В: ацетонитрил; Градиентная фаза: от 5% до 95% В в течение 3 мин; Скорость потока: 1,8-2,3 мл/мин; Колонка: XBridge C18, 4,6×50 мм, 3,5 мкм; Температура колонки: 50°C. Детекторы: АЦП ELSD, DAD (214 нм и 254 нм), MSD (ES-API).

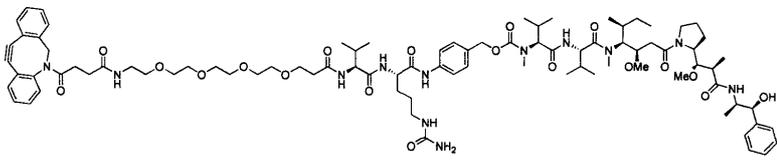
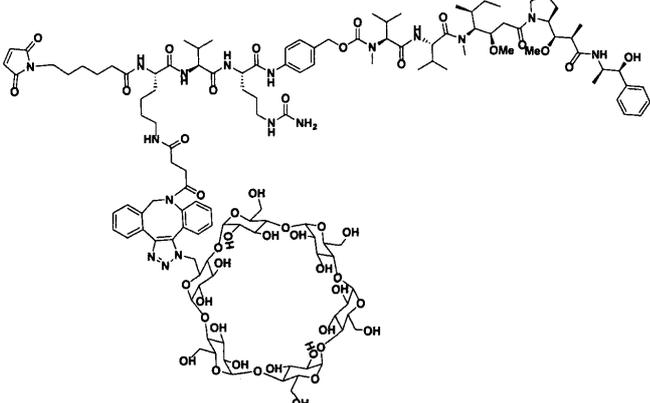
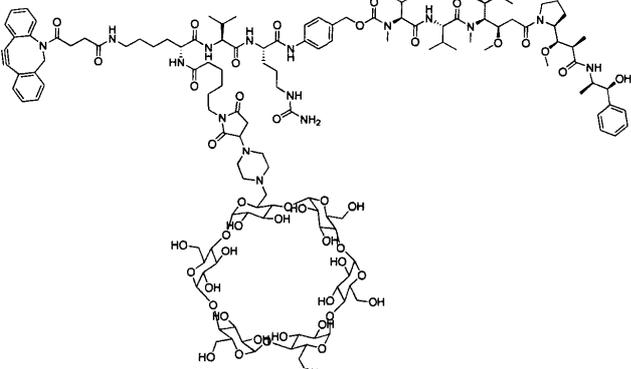
Препаративная жидкостная хроматография высокого давления (Prep-HPLC) в кислотной (метод А) или основной (метод В) системе растворителей использовалась на приборе Gilson GX-281. В системе кислых растворителей использовалась колонка Waters SunFire 10 мкм C18 (100 Å, 250×19 мм), а растворитель А для препаративной ВЭЖХ представлял собой воду/0,05% TFA, а растворитель В - ацетонитрил. Условия элюирования представляли собой линейное увеличение градиента растворителя В с 5% до 100% в течение периода времени 20 мин при скорости потока 30 мл/мин. Основная система растворителей включала в себя колонку Waters Xbridge 10 мкм C18 (100 Å, 250×19 мм), и растворитель А, используемый для препаративной ВЭЖХ, представлял собой воду/10 мМ бикарбонат аммония (NH₄HCO₃), а растворитель В - ацетонитрил. Условия элюирования представляли собой линейное увеличение градиента растворителя В с 5% до 100% в течение периода времени 20 мин при скорости потока 30 мл/мин.

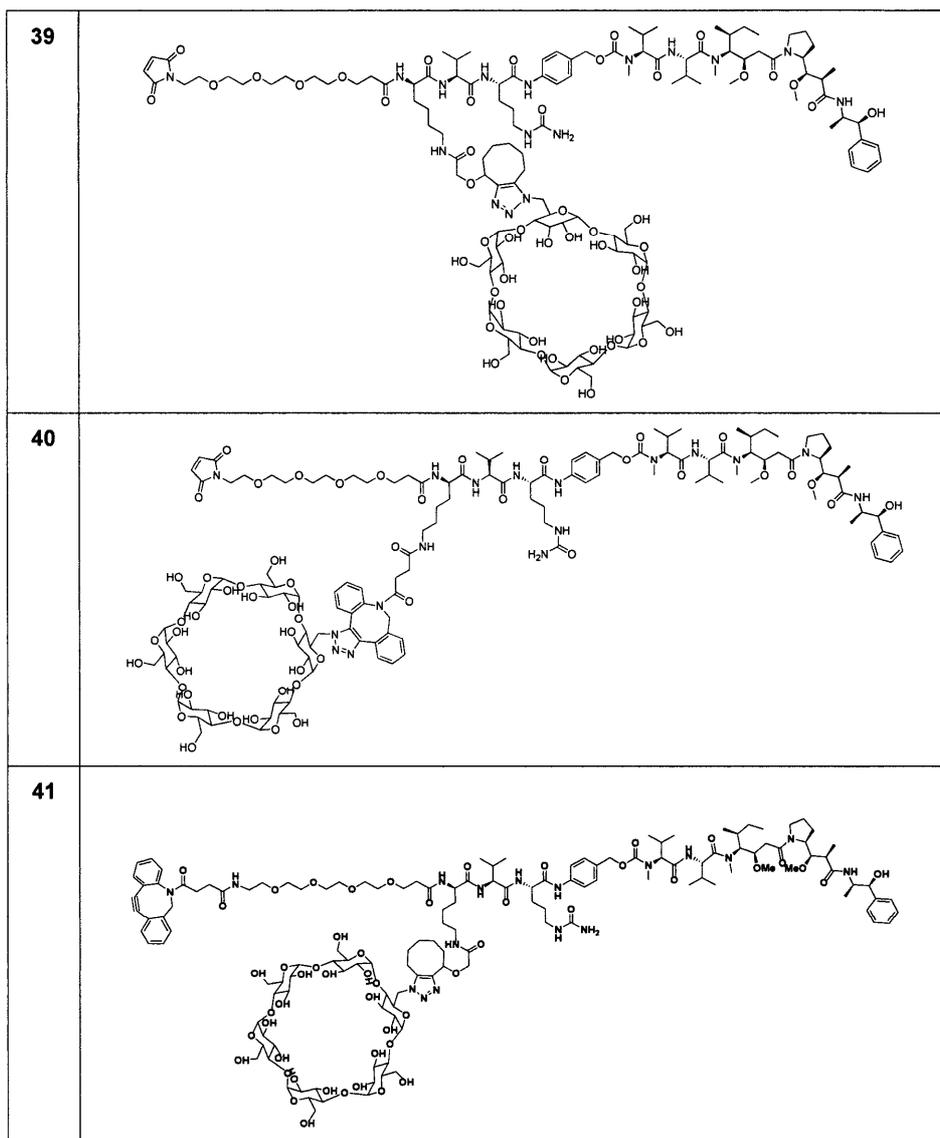
Флэш-хроматография проводилась на приборе Biotage с картриджами Agela Flash Column на основе диоксида кремния-CS; Флэш-хроматографию с обращенной фазой проводили на приборе Biotage с картриджами Boston ODS или Agela C18.

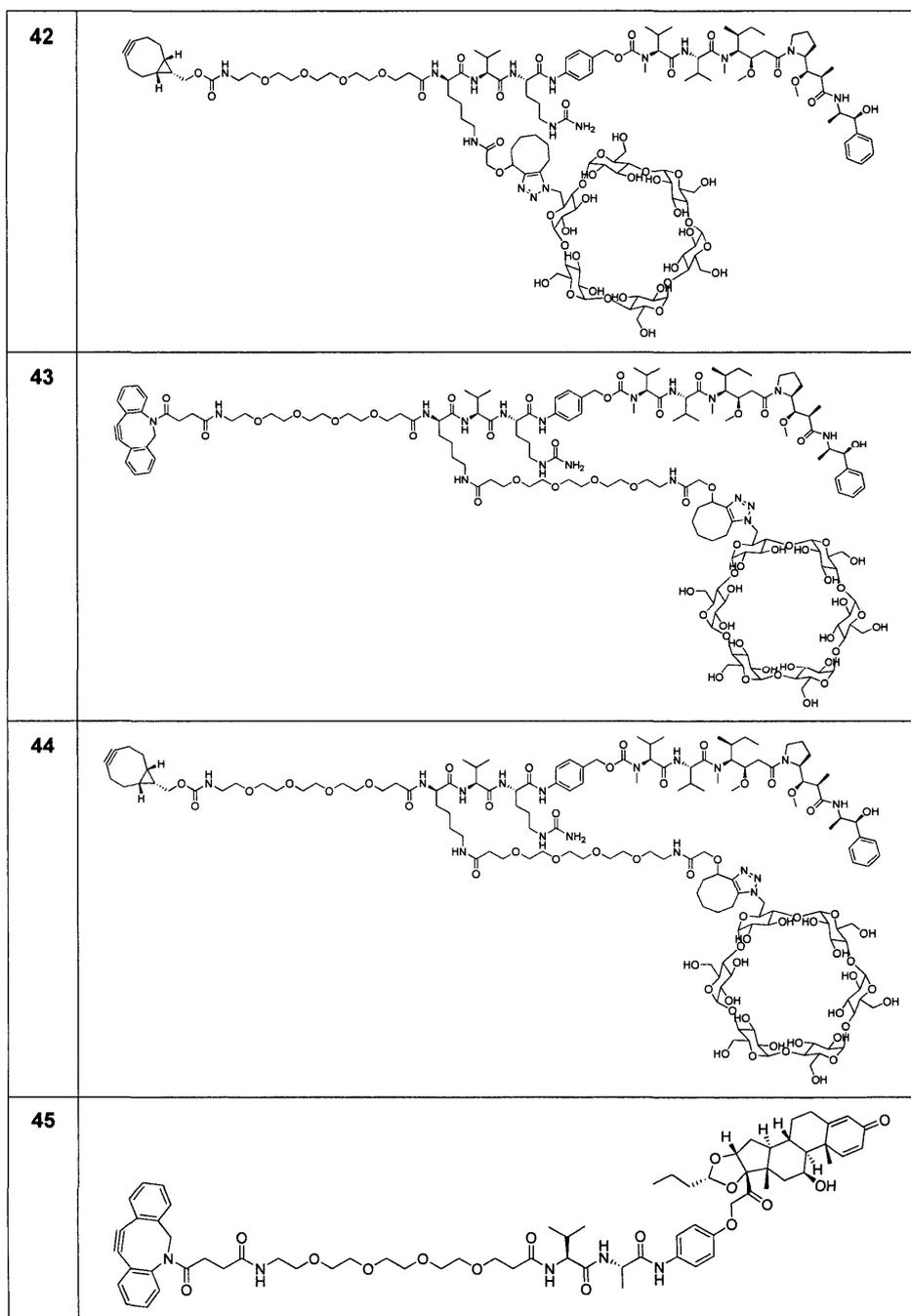
Таблица 1
Список соединений линкер-полезная нагрузка

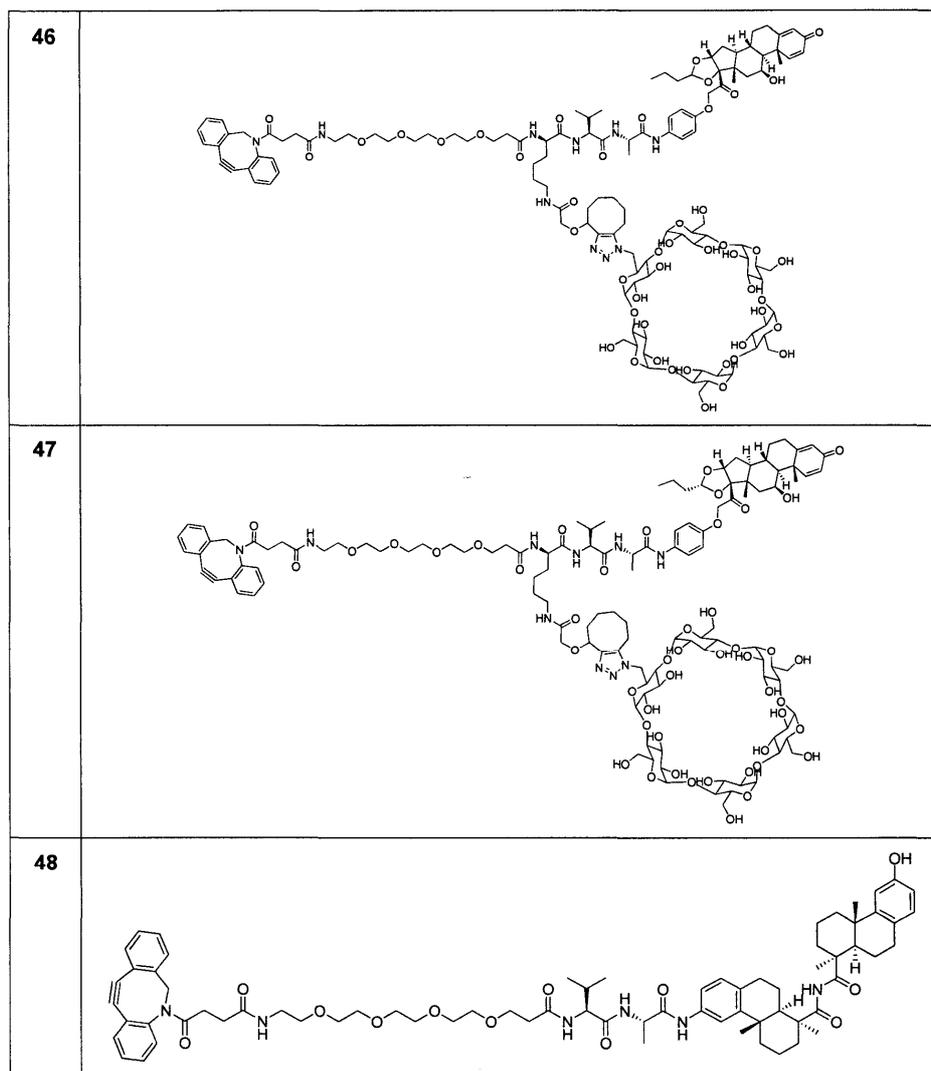
| Линкер-полезная нагрузка | Линкер | Полезная нагрузка |
|--------------------------|---|-------------------|
| Ex36 | DIBAC-suc-PEG ₄ -vc-PAB | ММАЕ (1а) |
| Ex37 | MAL-Lys(suc-DIBAC-CD)-vc-PAB | ММАЕ (1а) |
| Ex38 | DIBAC-suc-Lys(mc-pip-CD)-vc-PAB | ММАЕ (1а) |
| Ex39 | MAL-PEG ₄ -Lys(COT-CD)-vc-PAB | ММАЕ (1а) |
| Ex40 | MAL-PEG ₄ -N(suc-DIBAC-CD)Lys-vc-PAB | ММАЕ (1а) |
| Ex41 | DIBAC-Suc-PEG ₄ -N(CD-COT)Lys-vc-PAB | ММАЕ (1а) |
| Ex42 | BCN-PEG ₄ -Lys(COT-CD)-vc-PAB | ММАЕ (1а) |
| Ex43 | DIBAC-Suc-PEG ₄ -D-Lys(PEG ₄ -COT-CD)-vc-PAB | ММАЕ (1а) |
| Ex44 | BCN-PEG ₄ -D-Lys(PEG ₄ -COT-CD)-vc-PAB | ММАЕ (1а) |
| Ex45 | DIBAC-suc-PEG ₄ -Val-Ala | 1с на Фиг. 1 |
| Ex46 | DIBAC-suc-PEG ₄ -D-Lys(COT-CD)-Val-Ala | 1b на Фиг. 1 |
| Ex47 | DIBAC-suc-PEG ₄ -D-Lys(COT-CD)-Val-Ala | 1с на Фиг. 1 |
| Ex48 | DIBAC-suc-PEG ₄ -Val-Ala | 1d на Фиг. 1 |
| Ex49 | DIBAC-suc-PEG ₄ -D-Lys(COT-CD)-Val-Ala | 1d на Фиг. 1 |
| Ex50 | DIBAC-suc-PEG ₄ -D-Lys(PEG ₄ -COT-CD)-vcPAB | 1d на Фиг. 1 |
| Ex51 | BCN-PEG ₄ -D-Lys(PEG ₄ -COT-CD)-Val-Ala | 1d на Фиг. 1 |
| Ex52 | BCN-PEG ₄ -D-Lys(PEG ₄ -COT-CD)-vcPAB | 1e на Фиг. 1 |
| Ex53 | DIBAC-suc-PEG ₄ -D-Lys(PEG ₄ -COT-CD)-Val-Ala | 1d на Фиг. 1 |
| Ex54 | BCN-PEG ₄ -D-Lys(COT-CD)-Val-Ala | 1d на Фиг. 1 |
| Ex55 | DIBAC-suc-PEG ₄ -D-Lys(COT-CD)-vcPAB | 1f на Фиг. 1 |
| Ex56 | DIBAC-suc-PEG ₄ -D-Lys(COT-CD)-vcPAB | 1g на Фиг. 1 |
| Ex57 | DIBAC-suc-PEG ₄ -D-Lys(COT-CD)-vcPAB | 1d на Фиг. 1 |
| Ex58 | DIBAC-suc-PEG ₄ -vcPAB | 1h на Фиг. 1 |
| Ex59 | DIBAC-suc-PEG ₄ -dLys(COT-CD)-vc-PAB | 1h на Фиг. 1 |
| Ex60 | BCN-PEG ₄ -dLys(COT-CD)-vc-PAB | 1h на Фиг. 1 |
| Ex61 | DIBAC-suc-PEG ₄ -vc-PAB | 1i на Фиг. 1 |
| Ex62 | DIBAC-suc-PEG ₄ -dLys(COT-CD)-vc-PAB | 1i на Фиг. 1 |
| Ex63 | DIBAC-suc-PEG ₄ -dLys(COT-CD)-Val-Ala | 1i на Фиг. 1 |

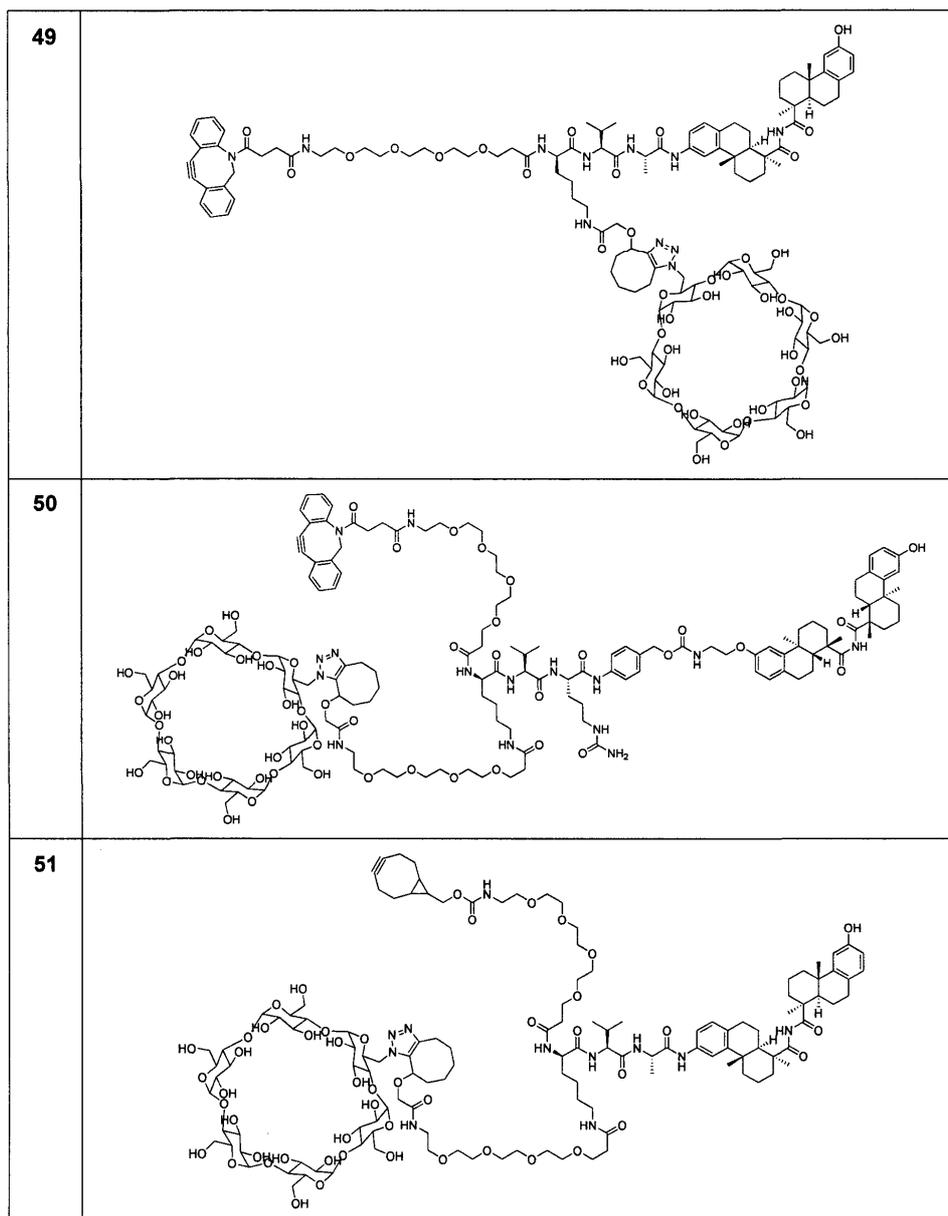
Таблица 2А
Структуры соединений линкер-полезная нагрузка

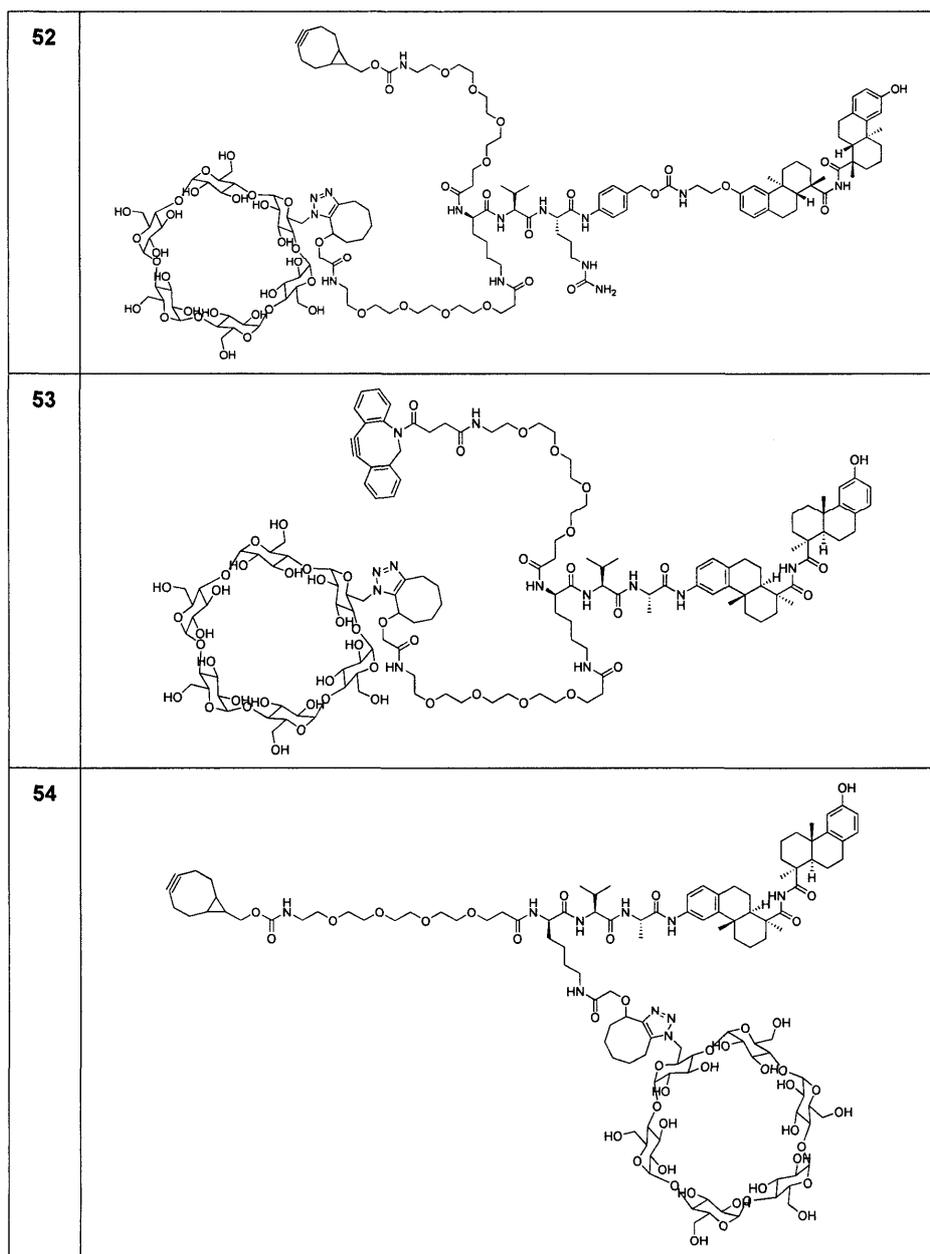
| Ex | Структуры соединения линкер-полезная нагрузка |
|----|--|
| 36 |  |
| 37 |  |
| 38 |  |

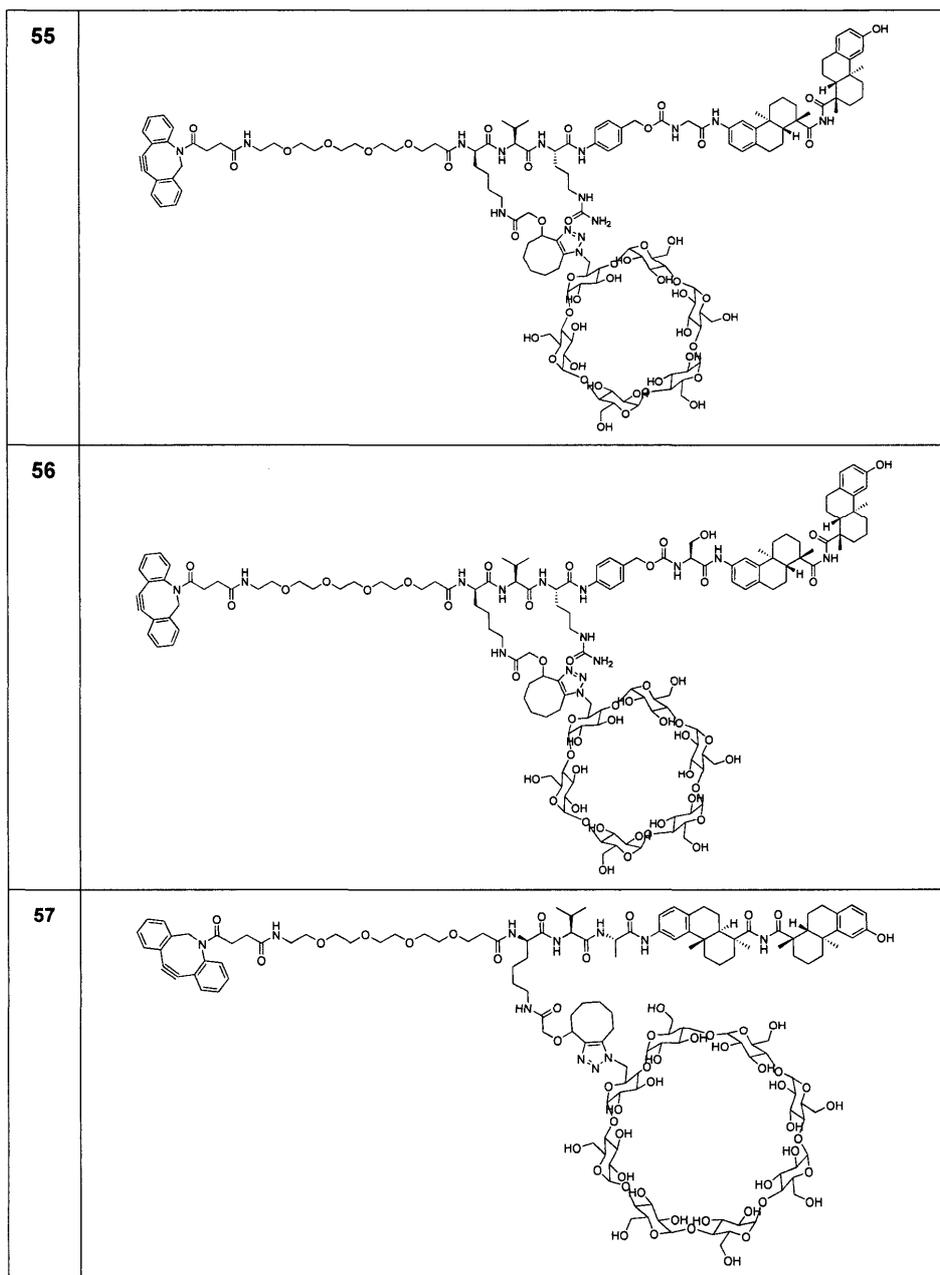












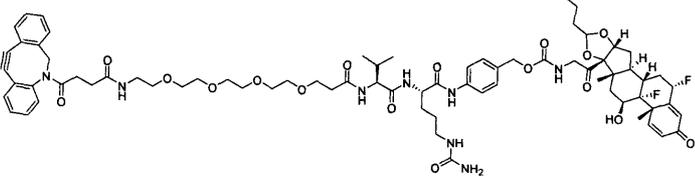
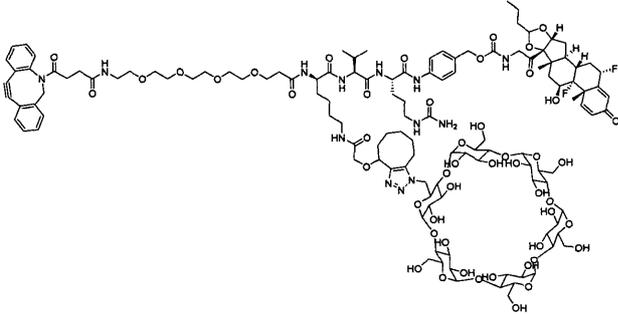
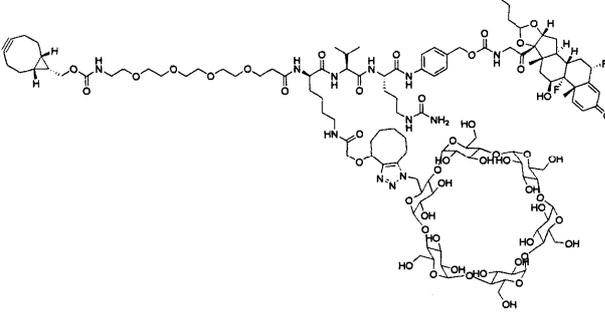
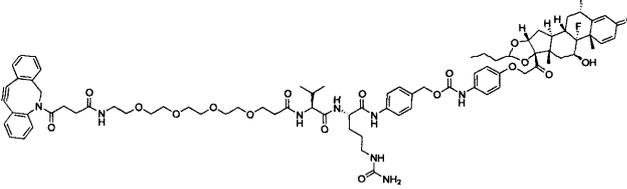
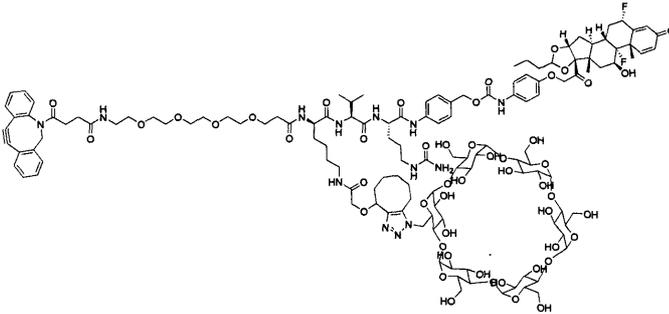
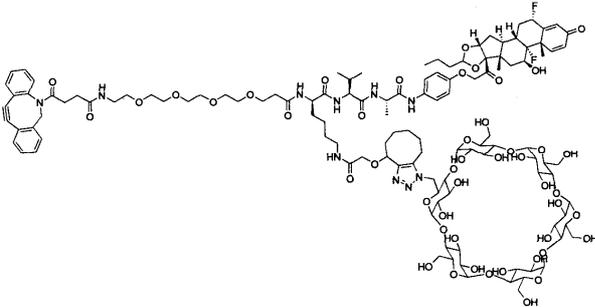
| | |
|----|--|
| 58 |  |
| 59 |  |
| 60 |  |
| 61 |  |
| 62 |  |
| 63 |  |

Таблица 2В
Линкер-полезная нагрузка cLogP

| Пример | cLogP | Название линкера |
|--------|-------|---|
| Ex36 | +++++ | DIBAC-suc-PEG4-vc-PAB-MMAE |
| Ex37 | ++ | mc-Lys(suc-DIBAC-CD)-vc-PAB-MMAE |
| Ex38 | ++ | DIBAC-suc-Lys(mc-pip-CD)-vc-PAB-MMAE |
| Ex39 | + | MAL-PEG4-Lys(COT-CD)-vc-PAB-MMAE |
| Ex40 | ++ | MAL-PEG4-N(suc-DIBAC-CD)Lys-vc-PAB-MMAE |
| Ex41 | ++ | DIBAC-Suc-PEG4-N(CD-COT)Lys-vc-PAB-MMAE |
| Ex42 | ++ | BCN-PEG4-Lys(COT-CD)-vc-PAB-MMAE |
| Ex43 | ++ | DIBAC-Suc-PEG4-D-Lys (PEG4-COT-CD)-vc-PAB-MMAE |
| Ex44 | ++ | BCN-PEG4-D-Lys(PEG4-COT-CD)-vc-PAB-MMAE |
| Ex45 | +++++ | DIBAC-suc-PEG ₄ -Val-Ala-1c |
| Ex46 | ++ | DIBAC-suc-PEG ₄ -D-Lys (CD-COT)-Val-Ala-1b |
| Ex47 | ++ | DIBAC-suc-PEG ₄ -D-Lys(CD-COT)-Val-Ala-1c |
| Ex48 | +++++ | DIBAC-suc-PEG ₄ -Val-Ala-1d |
| Ex49 | +++ | DIBAC-suc-PEG ₄ -D-Lys(CD-COT)-Val-Ala-1d |
| Ex50 | +++ | DIBAC-suc-PEG ₄ -D-Lys(PEG4-COT-CD)-vcPAB-1d |
| Ex51 | +++ | BCN-PEG ₄ -D-Lys(PEG4-COT-CD)-Val-Ala-1d |
| Ex52 | +++ | BCN-PEG ₄ -D-Lys(PEG4-COT-CD)-vcPAB-1e |
| Ex53 | +++ | DIBAC-suc-PEG ₄ -D-Lys(PEG4-COT-CD)-Val-Ala-1d |
| Ex54 | +++ | BCN-PEG ₄ -D-Lys(COT-CD)-Val-Ala-1d |
| Ex55 | +++ | DIBAC-suc-PEG ₄ -D-Lys(COT-CD)-vcPAB-1f |
| Ex56 | +++ | DIBAC-suc-PEG ₄ -D-Lys(COT-CD)-vcPAB-1g |
| Ex57 | ++ | DIBAC-suc-PEG ₄ -D-Lys(COT-CD)-vcPAB-1d |
| Ex58 | ++++ | DIBAC-suc-PEG ₄ -vcPAB-1h |
| Ex59 | ++ | DIBAC-suc-PEG ₄ -dLys(COT-CD)-vcPAB-1h |
| Ex60 | ++ | BCN-PEG ₄ -dLys(COT-CD)-vcPAB-1h |
| Ex61 | +++++ | DIBAC-suc-PEG ₄ -vcPAB-1i |
| Ex62 | ++ | DIBAC-suc-PEG ₄ -dLys(COT-CD)-vcPAB-1i |
| Ex63 | ++ | DIBAC-suc-PEG ₄ -dLys(COT-CD)-Val-Ala-1i |

+ ≤ -6; -6 < ++ ≤ -3; -3 < +++ ≤ 1; 1 < ++++ ≤ 5; 5 < +++++ ≤ 9.5

Таблица 3А
Аналитические результаты для соединений линкер-полезная нагрузка

| | Полезная нагрузка | MF | М.м. |
|-------------|-------------------|--|---------|
| Ex36 | ММАЕ | C ₈₈ H ₁₂₈ N ₁₂ O ₁₉ | 1658,0 |
| Ex37 | | C ₁₃₃ H ₁₉₈ N ₁₆ O ₄₇ | 2773,1 |
| Ex38 | | C ₁₂₉ H ₁₈₉ N ₁₇ O ₄₇ | 2730,0 |
| Ex39 | | C ₁₃₄ H ₁₉₉ N ₁₇ O ₅₁ | 2864,1 |
| Ex40 | | C ₁₂₅ H ₁₉₈ N ₁₆ O ₅₁ | 2741,0 |
| Ex41 | | C ₁₄₀ H ₂₁₁ N ₁₇ O ₅₁ | 2948,3 |
| Ex42 | | C ₁₃₂ H ₂₁₀ N ₁₆ O ₅₁ | 2837,2 |
| Ex43 | | C ₁₅₁ H ₂₃₂ N ₁₈ O ₅₆ | 3195,5 |
| Ex44 | | C ₁₄₃ H ₂₃₁ N ₁₇ O ₅₆ | 3084,4 |
| Ex45 | 1с на Фиг. 1 | C ₆₉ H ₈₇ N ₅ O ₁₅ | 1226,5 |
| Ex46 | 1b на Фиг. 1 | C ₁₂₁ H ₁₇₀ N ₁₀ O ₄₇ | 2516,7 |
| Ex47 | 1с на Фиг. 1 | C ₁₂₁ H ₁₇₀ N ₁₀ O ₄₇ | 2516,7 |
| Ex48 | 1d на Фиг. 1 | C ₇₂ H ₉₂ N ₆ O ₁₂ | 1233,5 |
| Ex49 | | C ₁₂₄ H ₁₇₅ N ₁₁ O ₄₄ | 2523,8 |
| Ex50 | | C ₁₄₈ H ₂₁₃ N ₁₅ O ₅₃ | 3050,3 |
| Ex51 | | C ₁₂₇ H ₁₉₅ N ₁₁ O ₄₉ | 2660,0 |
| Ex52 | 1e на Фиг. 1 | C ₁₄₀ H ₂₁₂ N ₁₄ O ₅₃ | 2939,2 |
| Ex53 | 1d на Фиг. 1 | C ₁₃₅ H ₁₉₆ N ₁₂ O ₄₉ | 2771,1 |
| Ex54 | 1d на Фиг. 1 | C ₁₁₆ H ₁₇₄ N ₁₀ O ₄₄ | 2412,7 |
| Ex55 | 1f на Фиг. 1 | C ₁₃₇ H ₁₉₁ N ₁₅ O ₄₈ | 2816,1 |
| Ex56 | 1g на Фиг. 1 | C ₁₃₈ H ₁₉₃ N ₁₅ O ₄₉ | 2846,1 |
| Ex57 | 1d на Фиг. 1 | C ₁₃₆ H ₁₉₅ N ₁₁ O ₅₄ | 2846,3 |
| Ex58 | 1h на Фиг. 1 | C ₇₄ H ₉₄ F ₂ N ₈ O ₁₇ | 1405,6 |
| Ex59 | 1h на Фиг. 1 | C ₁₂₆ H ₁₇₇ F ₂ N ₁₃ O ₄₉ | 2695,8 |
| Ex60 | 1h на Фиг. 1 | C ₁₁₈ H ₁₇₆ F ₂ N ₁₂ O ₄₉ | 2584,7 |
| Ex61 | 1i на Фиг. 1 | C ₈₀ H ₉₈ F ₂ N ₈ O ₁₈ | 1497,67 |
| Ex62 | 1i на Фиг. 1 | C ₁₃₂ H ₁₈₁ F ₂ N ₁₃ O ₅₀ | 2787,9 |
| Ex63 | 1i на Фиг. 1 | C ₁₂₁ H ₁₆₈ F ₂ N ₁₀ O ₄₇ | 2552,7 |

Таблица 3В
Аналитические результаты для соединений линкер-полезная нагрузка

| | МС | | ВЭЖХ | |
|------|----------------------------------|--------------------------------|-------------|----------------------|
| | масса/заряд (100%) | масса/заряд (самый высокий МС) | Чистота (%) | R _t (мин) |
| Ex36 | 829,7 (M/2+H) | 1659,7 (M+H) | 98 | 8,25 (B) |
| Ex37 | 925,1 (M/3+H) | 1387,2 (M/2+H) | 96 | 7,22 (B) |
| Ex38 | 910,6 (M/3+H) | 1365,8 (M/2+H) | 100 | 7,19 (A) |
| Ex39 | 1432.6 (M/2+H) | 1432.6 (M/2+H) | 100 | 5,88 (A) |
| Ex40 | 1371.1 (M/2+H) | 1371.1 (M/2+H) | 100 | 5,78 (A) |
| Ex41 | 983.4 (M/3+H) | 1475.0 (M/2+H) | 100 | 7,29 (B) |
| Ex42 | 946.3 (M/3+H) | 1418.9 (M/2+H) | 100 | 7,33 (B) |
| Ex43 | 1065.9 (M/3+H) | 1598.4 (M/2+H) | 98 | 5.79 (B) |
| Ex44 | 1028.7 (M/3+H) | 1541.8 (M/2+H) | 100 | 5,66 (B) |
| Ex45 | 1226.6 (M+H) | 1226.6 (M+H) | 99 | 8,55 (B) |
| Ex46 | 839.5 (M/3+H) | 1259.1 (M/2+H) | 97 | 6,62 (A), 6,67 (B) |
| Ex47 | 839.5 (M/3+H) | 1258.6 (M/2+H) | 98 | 6,61 (A), 6,73 (B) |
| Ex48 | 617.3 (M/2+H) | 1233.6 (M+H) | 100 | 9,21 (B) |
| Ex49 | 841.8 (M/3+H) | 1262.4 (M/2+H) | 98 | 6,45 (A) 6,55 (B) |
| Ex50 | 1017.3 (M/3+H) | 1017.3 (M/3+H) | 96 | 6,68 (B) |
| Ex51 | 837.2 [(M-BCN)/3+H] | 1330.3 (M/2+H) | 100 | 6,33 (B) |
| Ex52 | 980.3 (M/3+H) | 1470.2 (M/2+H) | 100 | 6.62 (B) |
| Ex53 | 924.5 (M/3+H) | 1385.2 (M/2+H) | 98 | 6,42 (B) |
| Ex54 | 1215.2 (M+H ₂ O)/2+H] | 1207.1 (M/2+H) | 100 | 6,37 (B) |
| Ex55 | 939.5 (M/3+H) | 1408.7 (M/2+H) | 99 | 6,33 (A), 6,44 (B) |
| Ex56 | 949.0 (M/3+H) | 1423.3 (M/2+H) | 100 | 6,11 (A), 6,21 (B) |
| Ex57 | 1424.2 (M/2 + H)*. | 1424.2 (M/2+H)* | 99 | 7,54 (B) |
| Ex58 | 703.5 (M/2+H) | 1405.7 (M+H) (5%) | 100 | 7,40 (B) |
| Ex59 | 899.2 (M/3+H) | 1348.6 (M/2+H) (40%) | 100 | 6,23 (B) |
| Ex60 | 1293.6 (M/2+H) | 1293.6 (M/2+H) | 100 | 7,37, 7,41 (B) |
| Ex61 | 749.5 (M/2+H) | 1497.7 (M+H) (5%) | 100 | 7,99 (B) |
| Ex62 | 930.3 (M/3+H) | 1394.2 (M/2+H) (33%) | 100 | 7,94, 8,02 (B) |
| Ex63 | 851.4 (M/3+H) | 1276.8 (M/2+H) (83%) | 100 | 7,76 (B) |

Примеры 1-6 описывают получение определенных соединений, полезных, среди прочего, для синтетических промежуточных соединений для синтеза линкеров, линкеров-полезных нагрузок и/или конъюгатов, описанных здесь.

Пример 1.

Получение промежуточного соединения 5a (см. фиг. 2).

(2R)-6-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4,6,8,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо]гексановая кислота (5a).

К смеси H-D-Lys(Вос)-ОН (11a, 0,25 г, 1,0 ммоль) в DMF (10 мл) добавляли 6-малеимидокапроновую кислоту-NHS (10a, 0,31 г, 1,0 ммоль) и DIPEA (0,26 г, 2,0 ммоль) последовательно при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, пока соединение 11a не было полностью израсходовано, что контролировали с помощью ЖХМС. Смесь непосредственно разделяли с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрил в воде (0,05% TFA)), получая промежуточное соединение Вос-12a (ESI масса/заряд: 440 (M+H)⁺) в виде бесцветного масла, которое растворяют в DCM (5 мл). К раствору по каплям добавляли TFA (0,5 мл) при 0°C и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа. Реакцию контролировали ЖХМС до тех пор, пока промежуточное соединение Вос-12a не было полностью израсходовано. Летучие вещества удаляли в вакууме, получая сырой 12a (ESI масса/заряд: 340 (M/2+H)⁺), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. К смеси неочищенного соединения 12a (0,21 г, 0,62 ммоль) в DMF (5 мл) последовательно добавляли активированный эфир 10b (0,20 г, 0,50 ммоль) и DIPEA (50 мг, 0,39 ммоль) при комнатной температуре. После того как реакционную смесь перемешивали при

комнатной температуре в течение ночи, соединение 12а полностью израсходовали, что контролировали с помощью ЖХМС. Затем реакционную смесь непосредственно разделяли с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в воде), получая соединение 5а (0,10 г, 20% выход в 3 этапа из 10а) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 627 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (DMSO-d₆, 400 МГц): δ 7.89 (d, J=13.2 Гц, 1H), 7.69-7.62 (m, 3H), 7.48-7.47 (m, 3H), 7.36-7.28 (m, 3H), 6.99 (s, 2H), 5.03 (d, J=13.6 Гц, 1H), 4.09-4.04 (m, 1H), 3.60 (d, J=13.6 Гц, 1H), 3.38-3.34 (m, 1H), 2.90-2.87 (m, 2H), 2.61-2.55 (m, 1H), 2.25-2.17 (m, 1H), 2.08-1.51 (m, 5H), 1.46-1.15 (m, 12H) ч/млн.

Пример 2.

Получение промежуточного соединения 5а (см. фиг. 2).

(2S)-6-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4,6,8,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо]гексановая кислота (5b).

Следуя процедурам примера 1 для промежуточного соединения 5а, за исключением того, что Hd-Lys (Woc)-OH (11a) заменяют на HL-Lys(Woc)-OH (11b), получают промежуточное соединение 5b (0,16 г, 19% выход из 11b) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 627 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (DMSO-d₆, 400 МГц) δ 7.94-7.15 (m, 10H), 6.99 (s, 2H), 5.02 (d, J=14.0 Гц, 1H), 4.09-4.04 (m, 1H), 3.60 (d, J=14.0 Гц, 1H), 3.38-3.34 (m, 1H), 2.91-2.86 (m, 2H), 2.58-2.54 (m, 1H), 2.23-2.18 (m, 1H), 2.07-2.04 (m, 2H), 1.98-1.92 (m, 1H), 1.77-1.73 (m, 1H), 1.63-1.58 (m, 1H), 1.47-1.12 (m, 12H) ч/млн.

Пример 3.

Получение промежуточного соединения 5с (см. фиг. 2).

(2R)-2-амино-6-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4,6,8,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)гексановая кислота (12с).

К смеси коммерчески доступного HD-Lys(Fmoc)-OH (11с, 0,55 г, 1,5 ммоль) в сухом DMF (3,0 мл) добавляли DIPEA (0,38 г, 3,0 ммоль) и соединение 10b (см. Отчеты о химических исследованиях), 2011, 805-815) (0,60 г, 1,5 ммоль) последовательно при комнатной температуре. Полученный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, пока соединение 11с не было полностью израсходовано, что контролировали с помощью ЖХМС. Затем смесь очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-80% ацетонитрила в воде) с получением промежуточного соединения Fmoc-12с (0,48 г, выход 49%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 656,3 (M+H)⁺. К смеси промежуточного соединения Fmoc-12с (0,15 г, 0,23 ммоль) в ДМФА (3 мл) добавляли диэтиламин (0,1 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа, и ЖХМС показала, что Fmoc-12с полностью израсходован. Смесь фильтровали и фильтрат очищали препаративной ВЭЖХ (метод В), получая соединение 12с (42 мг, выход 42%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 434 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (DMSO-d₆, 400 МГц) δ 7.71-7.60 (m, 3H), 7.50-7.42 (m, 3H), 7.39-7.27 (m, 3H), 5.02 (d, J=14.0 Гц, 1H), 3.60 (d, J=14.0 Гц, 1H), 3.08-3.07 (m, 1H), 2.89-2.88 (m, 2H), 2.61-2.52 (m, 1H), 2.25-2.17 (m, 1H), 2.00-1.96 (m, 1H), 1.80-1.72 (m, 1H), 1.65-1.62 (m, 1H), 1.52-1.44 (m, 1H), 1.23-1.21 (m, 5H) ч/млн.

(2R)-6-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4,6,8,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-2-[1-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]гексановая кислота (5с).

К смеси соединения 12с (40 мг, 92 мкмоль) в DMF (2 мл) последовательно добавляли соединение 4d (41 мг, 0,11 ммоль) и TEA (18 мг, 0,18 ммоль) в DMF при комнатной температуре. После того как смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа, большая часть соединения 4d была израсходована, что контролировали с помощью ЖХМС. Затем полученную смесь непосредственно разделяли с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрила в воде), получая промежуточное соединение 5с (33 мг, выход 47%) в виде светло-желтого масла. ESI масса/заряд: 761 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ 7.96 (d, J=12.8 Гц, 1H), 7.69-7.62 (m, 3H), 7.51-7.30 (m, 6H), 7.02 (s, 2H), 5.04 (d, J=14.4 Гц, 1H), 4.06 (m, 1H), 3.62-3.46 (m, 18H), 2.89 (m, 2H), 2.63-2.57 (m, 4H), 2.39-2.19 (m, 3H), 2.01-1.20 (m, 6H) ч/млн.

Пример 4.

Получение промежуточного соединения 6b (см. фиг. 3).

[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраоктан-5-ил]метил 4-метилбензол-1-сульфонат (14)².

К раствору α-циклодекстрина (13, 10 г, 10 ммоль) в сухом пиридине (Py) (0,32 л) добавляли 4-толуолсульфонилхлорид (TsCl) (20 г, 0,10 моль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при этой температуре в течение 15 мин и немедленно гасили водой (60 мл). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, чтобы удалить летучие вещества (пиридин и воду). Остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-25% ацетонитрила в воде), получая продукт 14 (1,1 г, 10% выход) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1127 (M+H)⁺.

5,10,15,20,25-пентакис(гидроксиметил)-30-(пиперазин-1-илметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраоктан-31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекол (6b)

Смесь соединения 14 (1,2 г, 1,0 ммоль) в пиперазине (1,7 г, 20 ммоль) герметично закрывали и перемешивали при 120°C в течение 16 ч. После охлаждения реакционной смеси до комнатной температуры смесь разбавляли DMF (3 мл) и ацетонитрилом (30 мл). Осадки собирали фильтрованием и затем неочищенный продукт очищали препаративной ВЭЖХ (метод В), получая промежуточное соединение 6b (0,32 г, 30% выход) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1041 (M+H)⁺.

Пример 5.

Получение промежуточного соединения 7a (см. фиг. 4).

(2R)-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]-2-[[9H-флуорен-9-илметокси]карбонил]аминогексановая кислота (7a).

К смеси коммерческого соединения 17 (65 мг, 0,23 ммоль, CAS: 1425803-45-7) в DMF (2 мл) добавляли Fmoc-D-Lys-OH (15a, 85 мг, 0,23 ммоль) и триэтиламин (52 мг, 0,51 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Смесь непосредственно разделяли с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (0-100% ацетонитрил в воде (0,05% TFA)), получая промежуточное соединение 7a (85 мг, выход 70%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 533 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (MeOD-d₄, 500 МГц): δ 7.70 (d, J=7.5 Гц, 2H), 7.59 (t, J=8.0 Гц, 2H), 7.30 (t, J=7.5 Гц, 2H), 7.22 (t, J=7.4 Гц, 2H), 4.35-4.22 (m, 2H), 4.22-4.09 (m, 2H), 4.09-3.99 (m, 1H), 3.94-3.81 (m, 1H), 3.79-3.67 (m, 1H), 3.15 (t, J=6.9 Hz, 2H), 2.17-1.96 (m, 3H), 1.96-1.86 (m, 1H), 1.85-1.66 (m, 4H), 1.66-1.41 (m, 5H), 1.41-1.25 (m, 3H) ppm.

Пример 6.

Получение промежуточного соединения 7b (см. фиг. 4).

(R)-26-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбониламино)-2,2-диметил-4,20-диоксо-3,8,11,14,17-пентакса-5,21-диазахептакозан-27-оевая кислота (16).

К смеси соединения 10c (4,6 г, 10 ммоль, CAS: 859230-20-9) в DMF (10 мл) добавляли 15a (3,6 г, 10 ммоль) и триэтиламин (2,0 г, 20 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 25°C в течение часа до полного расходования соединения 15a, которое контролировали с помощью ТСХ. Смесь разбавляли DCM и промывали водой и рассолом. Органическую фракцию сушат над безводным натрия сульфатом и упаривают в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-5% метанол в DCM), получая 16 (5,5 г, 77% выход) в виде бесцветного масла. ESI масса/заряд: 716,2 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (DMSO-d₆, 500 МГц) δ 7.89 (d, J=7.5 Гц, 2H), 7.84-7.80 (m, 1H), 7.74-7.72 (d, J=7.5 Гц, 2H), 7.61-7.59 (m, 1H), 7.42 (t, J=7.5 Гц, 2H), 7.33 (t, J=7.5 Гц, 2H), 6.76-6.74 (m, 1H), 4.28-4.21 (m, 3H), 3.93-3.85 (m, 1H), 3.58 (t, J=6.5 Гц, 2H), 3.48-3.47 (m, 12H), 3.16 (d, J=5.5 Гц, 1H), 3.07-2.97 (m, 3H), 2.28 (t, J=6.5 Гц, 2H), 2.02-1.94 (m, 1H), 1.71-1.56 (m, 2H), 1.36 (s, 9H), 1.23-1.15 (m, 6H) ppm.

(24R)-24-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбониламино)-1-(циклоокт-2-инилокси)-2,18-диоксо-6,9,12,15-тетракса-3,19-диазапентакозан-25-оевая кислота (7b)

К раствору соединения 16 (0,60 г, 0,84 ммоль) в DCM (10 мл) добавляли трифторуксусную кислоту (2,0 мл) при 0°C. Реакционный раствор нагревали и перемешивали при 25°C в течение ночи, пока соединение 16 не было полностью израсходовано, что контролировали с помощью ЖХМС (ESI масса/заряд: 616,3 (M+H)⁺). Летучие вещества удаляли в вакууме, получая сырой 15b, который непосредственно использовали для следующего этапа.

Следуя процедуре примера 5 для получения промежуточного соединения 7a, за исключением замены 15a на 15b, получали указанное в заголовке соединения 7b (0,38 г, выход 49%) в виде бесцветного масла после очистки колоночной хроматографией на силикагеле (0-5% метанол в DCM). ESI масса/заряд: 780,3 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ 7.75 (d, J=7.6 Гц, 2H), 7.61 (t, J=7.6 Гц, 2H), 7.39 (t, J=7.6 Гц, 2H), 7.32-7.27 (m, 2H), 7.05-7.01 (m, 1H), 6.86-6.83 (m, 1H), 5.85 (d, J=7.6 Гц, 1H), 4.38-4.37 (m, 3H), 4.27-4.15 (m, 2H), 4.11-4.05 (m, 1H), 3.91-3.87 (m, 1H), 3.69 (t, J=5.6 Hz, 2H), 3.62-3.47 (m, 17H), 3.28-3.19 (m, 2H), 2.46 (t, J=5.6 Hz, 2H), 2.27-2.01 (m, 3H), 1.91-1.72 (m, 5H), 1.66-1.55 (m, 4H), 1.42-1.34 (m, 3H) ppm.

Пример 7.

Общая процедура А (см. фиг. 5).

К раствору Fmoc-vc-PAV-PNP (2a, 0,68-1,0 экв.) и соединению 1 (1e, 1f, 1g, 1h, 1i или 1m, 1,0 экв.) в DMF добавляли DIPEA (5 экв.) при комнатной температуре с помощью шприца. Смесь перемешивали при 25°C в течение 16-24 ч и большую часть 2a израсходовали в соответствии с ЖХМС. К полученной смеси добавляли пиперидин (0,1-1 мл, избыток) и ее перемешивали при 25°C в течение 2 ч до полного удаления Fmoc, что контролировали с помощью ЖХМС. После фильтрации через мембрану фильтрат непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (метод В), получая соединение 3 (выход 32-73%) в виде белого твердого вещества. В табл. 4 приведены конкретные условия реакции для получения соединений 3e-3g, 3h и 3i.

Таблица 4

| Прод. | Полезная нагрузка 1 Mg (ммоль) | | Fmoc-vcFAB-PNP (2a) (ммоль) | Шаг 1 | | | | Шаг 2 | | | Очистка * | Выход мг. % | м/з (M + H) |
|-------|-----------------------------------|---------------|--------------------------------|-----------------------------|----------|-----------------|------------|-----------|-----------------|------------|-----------|-------------|-------------|
| | | | | Основание: DIPEA (ммоль) | DMF (мл) | Температура(°C) | Время, (ч) | Пип.*(Мл) | Температура(°C) | Время, (ч) | | | |
| 3e | 1e на ФИГ. 1 | 18 (0.031) | 0.02 1 | 0.16 | 5 | 25 | 24 | 0.1 | 25 | 2 | B | 14 68% | 978 |
| 3f | 1f на ФИГ. 1 | 160 (0.27) | 0.27 | 1.4 | 10 | 25 | 24 | 1 | 25 | 2 | B | 85 32% | 990 |
| 3g | 1g на ФИГ. 1 | 33 (0.054) | 0.05 4 | 0.27 | 5 | 25 | 24 | 0.1 | 25 | 2 | B | 22 40% | 1021 |
| 3H | (1h) | 93 (0.20) | 0.22 | 0.40 | 3 | 25 | 3 | 0.3 | 25 | 1 | B | 127 73% | 871 |
| 3I | (1i) | 87 (0.15) | 0.13* * | 0.52 | 5 | 25 | 3 | 1 | 25 | 1 | B | 80 64% | 963 |

Пип.* = Пиперидин; Очистка*: метод препаративной ВЭЖХ; **: с таким же эквивалентом НОВt.

Пример 8.

Общая процедура B (см. фиг. 6).

К раствору кислоты (Fmoc-Val-Ala-OH (2b), Fmoc-dLys (COT) -OH (7a) или Fmoc-dLys (PEG₄-COT) -OH (7b), 1,0-1,8 эквив.) в DMF (или DCM/THF для 8a) добавляли HATU (1,0-2,8 эквив.) и DIPEA или TEA (2,0-5,0 эквив.) при 25°C. После того как смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин, с помощью шприца добавляли раствор амина (1b-d, 1i или 3a-I, 1,0 экв.) в DMF (1 мл). Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 2-24 ч до тех пор, пока амин в основном не потреблялся в соответствии с ЖХМС. Затем к смеси добавляли пиперидин или диэтиламин (избыток) и смесь перемешивали при 25°C в течение 1-20 ч до полного удаления Fmoc, что контролировали с помощью ЖХМС. Реакционную смесь фильтровали через мембрану и фильтрат непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (метод B) или флэш-хроматографией с обращенной фазой с получением соединения 3b-d или 8a-J (выход 23-80%) в виде белого твердого вещества.

Таблица 5

Условия реакции для синтеза соединений 3b-d, 3j и 8a-l в соответствии с общей методикой В

| Продукт | Амин мг (ммоль) | | Кислота мг (ммоль) | | Шаг 1 | | | | Шаг 2 | | Очистка* | % выхода, мг | масса/ заряд (M+1) ⁺ |
|---------|--------------------|----------------|-----------------------|---------------|--------------------|------------------------|-------------|-----------------|--------------------------------|--------------|----------|-----------------|---------------------------------------|
| | 1b | 0.20 (0.38) | 2b | 190 (0.46) | HATU мг (ммоль) | DIPEA мг (ммоль) | DMF (мл) | Время (час.) | Пиперидин (мл) | Время (ч) | | | |
| 3b | 1b | 0.20 (0.38) | 2b | 190 (0.46) | 200 (0.54) | 150 (1.1) | 4 | 2 | 0.5 | 2 | В | 60, 23% | 692 |
| 3c | 1c | 100 -0.19 | 2b | 94 (0.23) | 100 (0.27) | 74 (0.57) | 2 | 2 | 0.25 | 2 | В | 36, 28% | 692 |
| 3d | 1d | 1000 (1.9) | 2b | 930 (2.3) | 860 (2.3) | 490 (3.8) | 10 | 2 | Et ₂ NH, 0.5 | 2 | RP-B | 880, 67% | 699 |
| 8a | 3a | 38 (0.034) | 7a | 34 (0.064) | 36 (0.096) | TEA 19 (0.19) | S** | 2 | Et ₂ NH, 0.2 | 16 | RP-A | 17, 35% | 1415 |
| 8b | 3b | 60 (0.087) | 7a | 55 (0.10) | 46 (0.12) | 34 (0.26) | 1 | 2 | 0.1 | 1 | RP | 50, 49% | 984 |
| 8c | 3c | 100 (0.15) | 7a | 92 (0.173) | 77 (0.20) | 56 (0.44) | 2 | 2 | 0.1 | 1 | В | 80, 56% | 984 |
| 8d | 3d | 45 (0.064) | 7a | 35 (0.064) | 24 (0.064) | 41 (0.32) | 1 | 16 | 0.1 | 3 | В | 30, 47% | 991 |
| 8e | 3f | 80 (0.064) | 7a | 53 (0.097) | 37 (0.097) | 41 (0.32) | 2 | 16 | 0.1 | 3 | RP-B | 65, 62% | 1283 |
| 8f | 3g | 35 (0.034) | 7a | 19 (0.034) | 13 (0.034) | 22 (0.17) | 1 | 16 | 0.1 | 3 | В | 15, 33% | 1313.6 |
| 8g | 3a | 85 (0.076) | 7b | 69 (0.088) | 69 (0.18) | TEA 18 (0.18) | 3 | 2 | Et ₂ NH, 0.5 | 16 | RP | 17, 43% | 832.2 (M/2 + H) ⁺ |
| 8h | 3d | 60 (0.086) | 7b | 67 (0.086) | 33 (0.086) | 55 (0.43) | 2 | 16 | 0.1 | 3 | В | 54, 50% | 620 (M/2 + 1) ⁺ |
| 8i | 3e | 85 (0.087) | 7b | 68 (0.087) | 69 (0.18) | 55 (0.43) | 2 | 16 | 0.1 | 3 | В | 40, 30% | 759 (M/2 + 1) ⁺ |
| 8j | 3h | 174 (0.20) | 7a | 117 (0.22) | 114 (0.30) | 77 (0.60) | 10 | 3 | 1 | 0.5 | RP-B | 120 52% | 1163 |
| 8k | 3i | 185 (0.19) | 7a | 120 (0.23) | 110 (0.29) | 74 (0.57) | 10 | 4 | 1 | 4 | RP-B | 192 80% | 1256 |
| 8l | 3j | 699 (0.96) | 7a | 562 (1.06) | 511 (1.34) | 372 (2.88) | 10 | 16 | Et ₂ NH, 225 mg* | 3 | В | 205 46%* | 1021 |

Для очистки - В: метод препаративной ВЭЖХ В; А: метод препаративной ВЭЖХ А; RP: RP-флэш; RP-B: метод RP-флэш В; RP-A: метод RP-флэш А.

S**: DCM/THF = 4/8 (мл).

*: 40% продукта на этапе 1 использовалось на этапе 32.

Пример 9.

Получение соединения 3a (см. фиг. 6 и табл. 5).

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метилбетанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-[(1S)-1-[(1S)-1-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-[(1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил]карбамоил]-1-метокси-2-метилэтил]пирролидин-1-ил]-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил](метил)карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил]-2-метилпропил]-N-метилкарбамат (3a).

(См. WO 2012/166560, полностью включенную в настоящий документ посредством ссылки).

В 25 мл круглодонную колбу добавляли Fmoc-vc-PAB-PNP (2a) (0,33 г, 0,43 ммоль) и безводный DMF (5 мл). К раствору добавляли MMAE (1a, 0,21 г, 0,21 ммоль), HOBt (38 мг, 0,28 ммоль) и DIPEA (74 мг, 0,57 ммоль) последовательно при 25°C. Смесь перемешивали при 25-30°C в течение 16 ч, пока MMAE полностью не израсходовали согласно ЖХМС. Реакционную смесь фильтровали через мембрану и фильтрат очищали препаративной ВЭЖХ (метод А), получая Fmoc-3a в виде белого твердого вещества, которое растворяли в DMF (5 мл). К раствору добавляли диэтиламин (0,3 мл). Реакционную смесь перемешивали при 30°C в течение часа до удаления Fmoc в соответствии с ЖХМС. Реакционную смесь фильтровали через мембрану и фильтрат очищали препаративной ВЭЖХ (метод А), получая vcPAB-MMAE (3a) (0,20 г, выход 58%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 562,5 (M/2+H)⁺.

Пример 10.

Получение соединения 3b (см. фиг. 6 и табл. 5).

(2S)-2-амино-N-[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}}]икоза-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}фенилкарбамоил]этил]-3-метилбутанамид (3b).

Следуя общей процедуре В, соединение 3b (60 мг, выход 23%) получали в виде белого твердого

вещества. ESI масса/заряд: 692 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 8.90-8.77 (m, 1H), 7.87 (t, J=7.9 Гц, 1H), 7.48-7.36 (m, 2H), 7.26-7.20 (m, 1H), 6.88-6.81 (m, 2H), 6.30-6.25 (m, 1H), 6.05-6.00 (m, 1H), 5.21-5.17 (m, 1H), 5.06-5.00 (m, 0.5H), 4.96-4.90 (m, 1H), 4.73-4.54 (m, 2.5H), 4.53-4.46 (m, 1H), 3.33-3.28 (m, 1H), 2.95-2.90 (m, 1H), 2.62-2.52 (m, 1H), 2.39-2.28 (m, 2H), 2.22-2.03 (m, 4H), 1.85-1.51 (m, 10H), 1.48-1.34 (m, 5H), 1.21-1.10 (m, 2H), 1.03-0.89 (m, 9H), 0.86-0.75 (m, 3H) ч/млн.

Пример 11.

Получение соединения 3с (см. фиг. 6 и табл. 5).

(2S)-2-амино-N-[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]}икоза-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтоксифенил)-карбамоил]этил]-3-метилбутанамид (3с).

Следуя общей процедуре В, соединение 3с (36 мг, выход 28%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 692 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, CDCl₃) δ 8.94-8.83 (m, 1H), 7.93-7.84 (m, 1H), 7.49-7.38 (m, 2H), 7.24 (d, J=10.1 Гц, 1H), 6.89-6.80 (m, 2H), 6.30-6.24 (m, 1H), 6.03 (s, 1H), 4.99-4.88 (m, 2H), 4.74-4.55 (m, 3H), 4.51 (s, 1H), 3.31 (t, J=3.9 Гц, 1H), 3.02-2.96 (m, 1H), 2.62-2.52 (m, 1H), 2.38-2.28 (m, 2H), 2.21-2.03 (m, 4H), 1.80-1.55 (m, 10H), 1.48-1.38 (m, 5H), 1.21-1.09 (m, 2H), 1.03-0.92 (m, 9H), 0.86-0.76 (m, 3H) ч/млн.

Пример 12.

Получение соединения 3d (см. фиг. 6 и табл. 5).

(1S,4aS,10aR)-6-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)пропанамидо)-N-((1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбонил)-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (3d).

Следуя общей методике В, соединение 3d (0,88 г, 67% выход) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 699 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, метанол-d₄) δ 8.40 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.32 (d, J=8.0 Гц, 1H), 7.03 (d, J=8.3 Гц, 1H), 6.88 (d, J=8.2 Гц, 1H), 6.72 (d, J=2.4 Гц, 1H), 6.56 (dd, J=8.3, 2.4 Гц, 1H), 4.60-4.48 (m, 1H), 3.22-3.11 (m, 1H), 3.02-2.93 (m, 1H), 2.92-2.76 (m, 3H), 2.74-2.70 (m, 1H), 2.43-2.31 (m, 3H), 2.28 (d, J=14.1 Гц, 3H), 2.16-1.96 (m, 3H), 1.81 (s, 1H), 1.78-1.65 (m, 4H), 1.53-1.42 (m, 4H), 1.38 (d, J=5.3 Гц, 6H), 1.33-1.22 (m, 2H), 1.14 (d, J=6.6 Гц, 6H), 1.09 (d, J=18.6 Гц, 6H) ч/млн.

Пример 13.

Получение соединения 3е (см. фиг. 5 и табл. 4).

4-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил 2-((4bS,8S,8aR)-8-((1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбонилкарбамоил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8а,9,10-октагидрофенантрен-3-илокси)этилкарбамат (3е).

Следуя общей методике А, соединение 3е (14 мг, выход 68%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 978 (M+1)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 10.22 (s, 1H), 9.04 (s, 1H), 8.71 (d, J=7.5 Гц, 1H), 8.12 (s, 2H), 7.59 (d, J=8.3 Гц, 2H), 7.42 (t, J=5.4 Гц, 1H), 7.29 (d, J=8.2 Гц, 2H), 6.94 (d, J=8.5 Гц, 1H), 6.84-6.76 (m, 2H), 6.67 (d, J=8.4 Гц, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.51 (dd, J=8.1, 2.0 Гц, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.52 (s, 2H), 4.96 (s, 2H), 4.51 (d, J=5.1 Гц, 1H), 3.92 (s, 2H), 3.66 (d, J=5.7 Гц, 1H), 3.32 (d, J=5.6 Гц, 2H), 3.13-2.63 (m, 6H), 2.26 (d, J=7.2 Гц, 2H), 2.22-2.03 (m, 4H), 1.89-1.82 (m, 4H), 1.79-1.69 (m, 1H), 1.68-1.53 (m, 4H), 1.46-1.40 (m, 2H), 1.27 (d, J=3.3 Гц, 8H), 1.19-1.08 (m, 4H), 1.03-0.89 (m, 12H) ч/млн.

Пример 14.

Получение соединения 3f (см. фиг. 5 и табл. 4).

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-({(4bS,8S,8aR)-8-[(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8а,9,10-октагидрофенантрен-3-ил)карбамоил}метил-карбамат (3f).

Следуя общей методике А, соединение 3f (85 мг, выход 32%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 991 (M+1)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, метанол-d₄) δ 8.40 (s, 1H, NH имидина), 7.58 (d, J=8.5 Гц, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.37 (d, J=8.5 Гц, 2H), 7.30 (d, J=7.5 Гц, 1H), 7.02 (d, J=8.3 Гц, 1H), 6.88 (d, J=8.3 Гц, 1H), 6.72 (d, J=2.4 Hz, 1H), 6.56 (dd, J=8.2, 2.5 Гц, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.66-4.52 (m, 1H), 3.92 (s, 2H), 3.75 (d, J=5.7 Гц, 1H), 3.26-2.75 (m, 6H), 2.42-2.22 (m, 7H), 2.14-1.59 (m, 11H), 1.40 (t, J=15.9 Гц, 8H), 1.34-1.27 (m, 3H), 1.16-1.12 (m, 6H), 1.10 (d, J=6.9 Гц, 3H), 1.07 (d, J=6.9 Гц, 3H) ч/млн.

Пример 15.

Получение соединения 3g (см. фиг. 5 и табл. 4).

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-[(1S)-1-[(4bS,8S,8aR)-8-[(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8а,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}-2-гидроксиэтил]карбамат (3g).

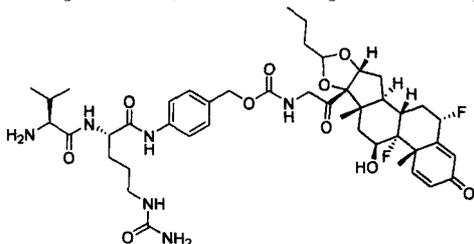
Следуя общей методике А, соединение 3g (22 мг, выход 40%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1021 (M+1)⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 10.02 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.69-8.65 (m, 1H), 8.11-8.00 (m, 4H), 7.65-7.53 (m, 3H), 7.40-7.30 (m, 3H), 7.30-7.20 (m, 1H), 6.96 (d, J=8.0 Гц, 1H), 6.81 (d, J=8.0 Гц, 1H), 6.65-6.61 (m, 1H), 6.50 (dd, J=8.0 Гц, 2.0 Hz, 1H), 6.00-5.95 (m, 1H), 5.48 (s, 2H), 5.00-4.95 (m, 3H), 4.60-4.40 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 4H), 3.15-2.55 (m, 10H), 2.40-2.20 (m, 3H), 2.20-2.00 (m, 5H), 2.00-1.80 (m, 4H), 1.86-1.55 (m, 6H), 1.27 (d, J=4.8 Гц, 9H), 1.20-1.10 (m, 2H), 0.97-0.90 (m, 6H) ч/млн.

Пример 15-А.

Получение соединения 3H - см. фиг. 5 и табл. 4.

4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил метил N-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил} карбамат (3H)

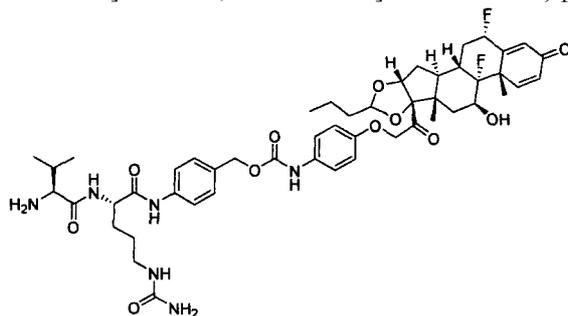


Следуя общей методике, описанной в примере 7, соединение 3H (127 мг, 73% выход) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 871 (M+1)⁺.

Пример 15-В.

Получение соединения 3I - см. фиг. 5 и табл. 4.

4-[(2S)-2-[(2S)-2-амино-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил метил N-(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси} фенил)карбамат (3I)



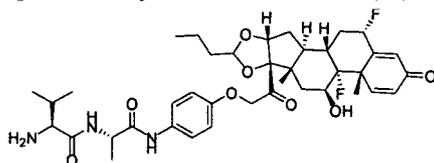
Следуя общей методике, описанной в примере 7, соединение 3I (80 мг, 64% выход) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 963 (M+1)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 10.22 (s, 1H), 9.57 (s, 1H), 8.69 (d, J=7.5 Гц, 1H), 8.08 (s, 3H), 7.61 (d, J=6.8 Гц, 2H), 7.36 (d, J=6.8 Гц, 3H), 7.27 (d, J=8.0 Гц, 1H), 7.22-7.00 (m, 1H), 6.84 (d, J=7.2 Гц, 2H), 6.30 (dd, J=8.0 Гц, 1.6Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.10-6.00 (m, 1H), 5.72-5.55 (m, 1H), 5.52 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 5.16-5.05 (m, 3H), 4.88-4.80 (m, 1H), 4.80-4.76 (m, 1H), 4.75-4.70 (m, 1H), 4.55-4.48 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.70-3.60 (m, 1H), 3.12-2.90 (m, 2H), 2.70-2.55 (m, 1H), 2.40-2.20 (m, 1H), 2.15-2.00 (m, 3H), 1.86-1.75 (m, 1H), 1.75-1.65 (m, 1H), 1.64-1.54 (m, 5H), 1.49 (s, 4H), 1.46-1.34 (m, 4H), 0.97-0.91 (m, 5H), 0.90-0.85 (m, 4H), 0.85-0.80 (m, 3H) ч/млн.

Пример 15-С.

Получение соединения 3J - см. фиг. 6.

(2S)-2-амино-N-[(1S)-1-(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси} фенил)карбамоил]этил]-3-метилбутанамид соль TFA (3J)



К раствору Вос-Val-Ala-OH (2d, 0,31 г, 1,1 ммоль) в DMF (15 мл) добавляли НАТУ (0,48 г, 1,3 ммоль) и DIPEA (0,35 г, 2,7 ммоль) при 10°C. После перемешивания смеси при 10°C в течение 30 мин в смесь добавляли амин (1i, 0,50 г, 0,90 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 10°C в течение часа до полного расхода амина. Смесь гасили водой и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органи-

ческий раствор промывали рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (50% этилацетат в петролейном эфире), получая Вос-3J, который растворяли в DCM (9 мл). К раствору добавляли TFA (3 мл) при 10°C. Реакционную смесь перемешивали при 10°C в течение 2 ч и затем концентрировали в вакууме, получая соединение 3J (0,53 г, выход 84%) в виде соли TFA, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ESI масса/заряд: 728 (M+1)⁺.

Пример 16.

Получение соединения 8a (см. фиг. 6 и табл. 5).

4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-амино-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-[(1S)-1-[(1S)-1-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-[(1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил]карбамоил]-1-метокси-2-метилэтил]пирролидин-1-ил]-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил](метил)карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил]-2-метилпропил]-N-метилкарбамат (8a).

Следуя общей методике В, соединение 8a (17 мг, 35% выход) получали в виде белого твердого вещества после очистки флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрил в воде (0,05% TFA)). ESI масса/заряд: 1415 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (DMSO-d₆, 400 МГц) δ 10.09-10.02 (m, 1H), 8.54 (d, J=8.4 Гц, 1H), 8.38 (d, J=7.5 Гц, 1H), 8.35-8.26 (m, 0.5H), 8.12-8.02 (m, 3H), 7.94-7.85 (m, 0.5H), 7.66-7.54 (m, 3H), 7.34-7.23 (m, 6H), 7.20-7.13 (m, 1H), 6.08-5.97 (m, 1H), 5.54-5.37 (m, 3H), 5.13-4.94 (m, 2H), 4.52-4.21 (m, 6H), 4.03-3.70 (m, 4H), 3.63-3.51 (m, 1H), 3.25-3.17 (m, 8H), 3.13-2.82 (m, 10H), 2.31-1.91 (m, 10H), 1.85-1.64 (m, 9H), 1.64-1.25 (m, 15H), 1.07-0.96 (m, 6H), 0.90-0.74 (m, 26H) ppm.

Пример 17.

Получение соединения 8b (см. фиг. 6 и табл. 5).

(2R)-2-амино-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]-N-[(1S)-1-[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}фенил)карбамоил]этил]карбамоил]-2-метилпропил]гексанамид (8b).

Следуя общей процедуре В, соединение 8b (50 мг, выход 49%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 984 (M+1)⁺.

Пример 18.

Получение соединения 8c (см. фиг. 6 и табл. 5).

(2R)-2-амино-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]-N-[(1S)-1-[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}фенил)карбамоил]-этил]карбамоил]-2-метилпропил]гексанамид (8c).

Следуя общей процедуре В, соединение 8c (80 мг, выход 56%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 984 (M+1)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 10.08 (s, 0.5H), 9.46 (s, 0.5H), 8.43 (d, J=7.5 Гц, 0.5H), 8.22 (d, J=7.0 Гц, 0.5H), 8.07-7.91 (m, 1H), 7.61 (dd, J=13.1, 6.2 Гц, 1H), 7.56 (d, J=9.0 Гц, 1H), 7.51 (d, J=9.0 Гц, 1H), 7.32 (d, J=10.1 Гц, 1H), 6.85 (d, J=7.0 Гц, 2H), 6.18 (d, J=10.0 Гц, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.10 (d, J=18.4 Гц, 1H), 4.85-4.66 (m, 4H), 4.46-4.08 (m, 4H), 3.85-3.17 (m, 3H), 3.09-3.00 (m, 2H), 2.40-1.69 (m, 15H), 1.66-1.48 (m, 8H), 1.45-1.15 (m, 15H), 1.05-0.94 (m, 2H), 0.91-0.79 (m, 12H) ppm.

Пример 19.

Получение соединения 8d (см. фиг. 6 и табл. 5).

(1S,4aS,10aR)-6-((2S)-2-((2S)-2-((2R)-2-амино-6-(2-(циклоокт-2-инилокси)ацетиамидо)гексанамидо)-3-метилбутанамидо)пропанамидо)-N-((1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбонил)-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбоксамид (8d).

Следуя общей процедуре В, соединение 8d (30 мг, выход 47%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 991 (M+1)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, метанол-d₄) δ 7.51 (d, J=1.5 Гц, 1H), 7.37 (dd, J=8.3, 2.0 Гц, 1H), 7.02 (d, J=8.3 Гц, 1H), 6.89 (d, J=8.4 Гц, 1H), 6.72 (d, J=2.4 Гц, 1H), 6.56 (dd, J=8.3, 2.5 Гц, 1H), 4.64-4.57 (m, 1H), 4.48 (q, J=7.1 Гц, 1H), 4.33-4.27 (m, 1H), 4.20 (d, J=6.7 Гц, 1H), 3.93 (m, 2H), 3.43 (t, J=6.6 Гц, 1H), 3.24 (t, J=6.9 Гц, 2H), 3.02-2.93 (m, 2H), 2.92-2.76 (m, 3H), 2.40-2.32 (m, 2H), 2.33-2.23 (m, 4H), 2.22-2.12 (m, 3H), 2.12-2.00 (m, 5H), 1.99-1.91 (m, 1H), 1.91-1.81 (m, 2H), 1.78-1.66 (m, 6H), 1.66-1.58 (m, 1H), 1.58-1.49 (m, 2H), 1.45 (d, J=7.1 Гц, 6H), 1.38 (d, J=4.0 Гц, 6H), 1.34-1.22 (m, 4H), 1.14 (d, J=7.0 Гц, 6H), 1.06-0.98 (m, 6H) ppm.

Пример 20.

Получение соединения 8e (см. фиг. 6 и табл. 5).

4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-амино-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-({[(4bS,8S,8aR)-8-[(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил]-4b,8-диметил-

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

Следуя общей процедуре В, соединение 8e (65 мг, выход 62%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1283 (M+1)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, метанол-d₄) δ 7.53-7.33 (m, 3H), 7.28-7.14 (m, 3H), 6.89 (d, J=8.4 Гц, 1H), 6.76 (d, J=8.3 Гц, 1H), 6.60 (d, J=2.5 Гц, 1H), 6.43 (dd, J=8.3, 2.5 Гц, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.53-4.46 (m, 2H), 4.41 (dd, J=8.9, 5.0 Гц, 1H), 4.18 (t, J=6.0 Гц, 1H), 4.09 (d, J=7.1 Гц, 1H), 3.92-3.72 (m, 4H), 3.31 (t, J=6.6 Гц, 1H), 3.16-3.05 (m, 3H), 3.06-2.97 (m, 1H), 2.90-2.62 (m, 4H), 2.27-2.09 (m, 7H), 2.09-1.87 (m, 7H), 1.86-1.68 (m, 4H), 1.66-1.40 (m, 12H), 1.36-1.22 (m, 10H), 1.20-1.09 (m, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.89 (t, J=7.0 Гц, 6H) ppm.

Пример 21.

Получение соединения 8f (см. фиг. 6 и табл. 5).

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-амино-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-[(1S)-1-[(4bS,8S,8aR)-8-[(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}метил}карбамат (8f).

Следуя общей процедуре В, соединение 8f (15 мг, выход 33%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1313,6 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, метанол-d₄) δ 7.59 (d, J=8.5 Гц, 2H), 7.51 (s, 1H), 7.36-7.26 (m, 3H), 7.01 (d, J=8.5 Гц, 1H), 6.88 (d, J=8.0 Гц, 1H), 6.72-6.71 (m, 1H), 6.57-6.54 (m, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.64-4.52 (m, 1H), 4.35-4.28 (m, 2H), 4.21 (d, J=7.0 Гц, 1H), 4.01-3.98 (m, 1H), 3.88-3.84 (m, 3H), 3.43 (t, J=6.5 Гц, 1H), 3.26-3.10 (m, 4H), 3.00-2.76 (m, 3H), 2.38-2.24 (m, 7H), 2.19-2.02 (m, 9H), 1.98-1.78 (m, 4H), 1.74-1.54 (m, 12H), 1.45-1.26 (m, 14H), 1.13 (s, 6H), 1.00 (t, J=7.5 Гц, 6H) ppm.

Пример 22.

Получение соединения 8d (см. фиг. 6 и табл. 5).

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-амино-6-{1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]-фенил}метил N-[(1S)-1-[(1S)-1-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-[(1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил]карбамоил]-1-метокси-2-метилэтил]пирролидин-1-ил]-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил](метил)карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил]-2-метилпропил]-N-метилкарбамат (8g).

Следуя общей процедуре В, соединение 8g (17 мг, выход 43%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 832,2 (M/2+H)⁺.

¹H ЯМР (метанол-d₄, 500 МГц): δ 7.61 (d, J=8.0 Гц, 2H), 7.41-7.30 (m, 6H), 7.25-7.22 (m, 1H), 5.23-5.08 (m, 2H), 4.78-4.50 (m, 3H), 4.33-4.10 (m, 5H), 4.04-3.88 (m, 2H), 3.74 (t, J=6.0 Гц, 3H), 3.65-3.57 (m, 15H), 3.46-3.29 (m, 9H), 3.24-3.12 (m, 6H), 3.01-2.88 (m, 3H), 2.56-2.44 (m, 4H), 2.30-2.10 (m, 6H), 2.07-1.67 (m, 14H), 1.63-1.32 (m, 13H), 1.21-1.13 (m, 6H), 1.07-0.78 (m, 26H) ppm.

Пример 23.

Получение соединения 8h (см. фиг. 6 и табл. 5).

N-[(5K)-5-амино-5-[(1S)-1-[(1S)-1-[(4bS,8S,8aR)-8-[(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил]-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил}этил]карбонил]-2-метилпропил]карбамоил}пентил]-1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (8h).

Следуя общей процедуре В, соединение 8h (54 мг, выход 50%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 620 (M/2+1)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, метанол-d₄) δ 7.61-7.48 (m, 1H), 7.35-7.29 (m, 1H), 7.02 (d, J=8.3 Гц, 1H), 6.88 (d, J=8.3 Гц, 1H), 6.71 (d, J=1.8 Гц, 1H), 6.56 (dd, J=8.2, 1.7 Гц, 1H), 4.52-4.44 (m, 1H), 4.27 (dd, J=21.9, 7.2 Гц, 2H), 4.03 (dd, J=15.1, 2.4 Гц, 1H), 3.96 (dt, J=22.5, 6.5 Гц, 1H), 3.89 (dd, J=15.1, 3.1 Гц, 1H), 3.75 (t, J=5.8 Гц, 2H), 3.64 (t, J=8.6 Гц, 12H), 3.60-3.54 (m, 3H), 3.44 (dd, J=11.7, 5.9 Гц, 2H), 3.23 (t, J=6.7 Гц, 2H), 3.02-2.91 (m, 1H), 2.91-2.74 (m, 3H), 2.46 (t, J=5.9 Гц, 2H), 2.40-2.31 (m, 3H), 2.26-2.22 (m, 5H), 2.21-1.79 (m, 12H), 1.77-1.65 (m, 6H), 1.62-1.53 (m, 3H), 1.47-1.43 (m, 5H), 1.38 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.33-1.22 (m, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.06-0.95 (m, 6H) ppm.

Пример 24.

Получение соединения 8i (см. фиг. 6 и табл. 5).

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-амино-6-{1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]-фенил}метил N-(2-[(4bS,8S,8aR)-8-[(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]окси)этил}карбамат (8i).

Следуя общей процедуре В, соединение 8i (40 мг, выход 30%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 759 (M/2+1)⁺.

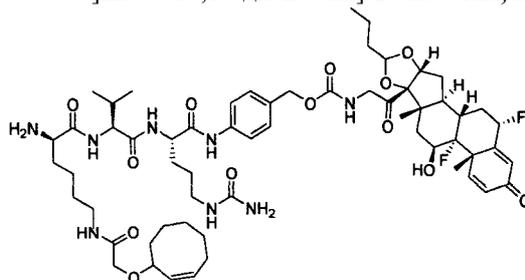
¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 10.01 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.24-8.09 (m, 1H), 8.06-7.74 (m, 1H), 7.64-

7.36 (m, 3H), 7.28 (d, J=8.3 Гц, 2H), 6.94 (d, J=8.5 Гц, 1H), 6.82 (d, J=8.4 Гц, 2H), 6.68 (d, J=7.6 Гц, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.51 (d, J=6.4 Гц, 1H), 6.00 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 4.96 (s, 2H), 4.39 (s, 1H), 4.28-2.21 (m, 2H), 4.05 (s, 2H), 3.93 (t, J=5.6 Гц, 2H), 3.86-3.79 (m, 2H), 3.59 (t, J=6.5 Гц, 2H), 3.53-3.47 (m, 11H), 3.43 (t, J=5.9 Гц, 2H), 3.36 (s, 6H), 3.24 (dt, J=12.8, 6.1 Гц, 3H), 3.10-2.91 (m, 4H), 2.85 (t, J=17.2 Гц, 2H), 2.75-2.69 (m, 2H), 2.34-2.10 (m, 10H), 2.10-1.66 (m, 12H), 1.67-1.54 (m, 8H), 1.47-1.24 (m, 16H), 1.14 (t, J=13.3 Гц, 2H), 1.01 (d, J=11.8 Гц, 6H), 0.88(s, 3H) 0.84 (s, 3H) ppm.

Пример 24А.

Получение соединения 8J - (см. фиг. 6 и табл. 5).

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-амино-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил} метил N-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил} карбамат (8J)



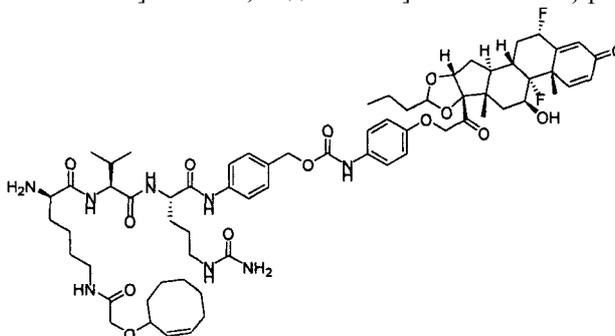
Следуя общей методике, описанной в примере 8, соединение 8J (120 мг, 52% выход) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1163 (M+1)⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD-d₄) δ 7.65-7.55 (m, 2H), 7.40-7.26 (m, 3H), 6.39-6.27 (m, 2H), 5.65-5.45 (m, 1H), 5.13-5.01 (m, 2H), 4.71-4.50 (m, 2H), 4.40-4.14 (m, 4H), 4.11-3.82 (m, 3H), 3.46-3.39 (m, 1H), 3.29-3.09 (m, 4H), 2.76-2.54 (m, 1H), 2.41-2.10 (m, 7H), 2.09-1.99 (m, 1H), 1.96-1.80 (m, 5H), 1.78-1.21 (m, 23H), 1.06-0.82 (m, 12H) ppm.

Пример 24В.

Получение соединения 8K - (см. фиг. 6 и табл. 5).

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-амино-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил} метил N-(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси} фенил)карбамат (8K)

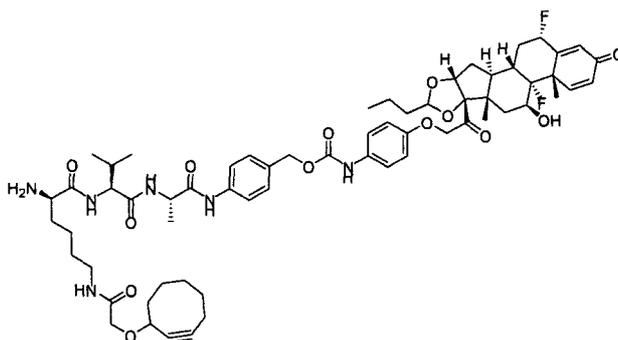


Следуя общей методике, описанной в примере 8, соединение 8K (192 мг, 80% выход) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1256 (M+1)⁺.

Пример 24С.

Получение соединения 8L - (см. фиг. 6 и табл. 5).

(2R)-2-амино-6-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетиамидо]-N-[(1S)-1-[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси} фенил)карбамоил]-этил]карбамоил]-2-метилпропил]гексанамид (8L)



Следуя общей методике, описанной в примере 8, соединение 8L (192 мг, 80% выход) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1021 (M+1)⁺. ESI масса/заряд: 1021,5 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD-d₄) δ 7.33-7.60 (m, 3H), 6.87-6.91 (m, 2H), 6.32-6.37 (m, 2H), 5.47-5.65 (m, 1H), 5.07-5.30 (m, 1H), 4.72-4.86 (m, 3H), 4.34-4.51 (m, 3H), 3.83-4.20 (m, 3H), 3.33-3.49 (m, 1H), 3.14-3.27 (m, 3H), 2.59-2.75 (m, 1H), 1.31-2.39 (m, 33 H), 0.93-1.05 (m, 12H) ppm.

Пример 25.

Общая процедура С для получения соединений 9а-і и J-L. (См. фиг. 7).

К раствору алкина 8а-і, J-L (1,0 эквив.) в соответствующем растворителе(ях) добавляли α-циклодекстрин-азид 6а (см. Synth. Commun., 2002, 32(21), 3367-3372; J. Am. Chem. Soc., 2012, 134(46), 19108-19117; J. Med. Chem., 1997, 40(17), 2755-2761; J. Am. Chem. Soc, 1993, 115 (12), 5035-5040) (1,5-3,0 эквив.). Полученную смесь затем перемешивали при 20-30°C в течение от 16 ч до 3 дней до тех пор, пока соединение 8 в основном не израсходовалось и не была обнаружена желаемая промежуточная масса, что контролировали с помощью ЖХМС. После фильтрации полученную смесь непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (или использовали напрямую), получая соединение 9 (9а-1, J-L) (выход 16-78%) в виде белого твердого вещества (с региоизомерами триазола).

Таблица 6

Условия реакции для синтеза соединений 9а-і в соответствии с общей процедурой С

| Продукт | Алкин | | 6а мг (ммоль) | Растворитель (мл) | Темп. (°C) | Время (ч) | Очистка | Выход | масса/заряд |
|------------|-------|----------------|---------------------|----------------------|---------------|--------------|---------|--------------------------------------|----------------------------------|
| | 8а | 20 (0.014) | | | | | | | |
| 9а | 8а | 20 (0.014) | 28 (0.028) | DMSO (1) | 25 | 16 | A | 9.6 mg, 25% | 1207 (M/2 + H) ⁺ |
| 9bA 9bB | 8b | 30 (0.030) | 76 (0.076) | DMF (2) | 30 | 40 | B | A: 13 mg, 22% B: 19 mg, 32% | 991 (M + H) ⁺ |
| 9с | 8с | 80 (0.0 81) | 120 (0.12) | DMF (4) | 30 | 24 | B | 80 mg, 40% | 991 (M + H) ⁺ |
| 9d | 8d | 310 (0.31) | 620 (0.63) | DMF (6) | 20-25 | 72 | B | 0.38 g, 60% | 995 (M/2 + H) ⁺ |
| 9e | 8e | 60 (0.047) | 95 (0.095) | DMF (1) | 20-25 | 72 | RP-B | 67 mg, 64% | 1141 (M/2 + 1) ⁺ |
| 9f | 8f | 20 (0.015) | 30 (0.03) | DMF (0.5) | 20-25 | 72 | B | 20 mg, 57% | 1156 (M/2 + 1) ⁺ |
| 9g | 8g | 50 (0.030) | 60 (0.06) | DMSO (2) | 25 | 48 | RP-B | 46 mg, 58% | 887.9 (M/3 + H) ⁺ |
| 9h | 8h | 23 (0.019) | 40 (0.04) | DMF (0.5) | 20-25 | 72 | RP-B | 30 mg, 72% | 1118 (M/2 + 1) ⁺ |
| 9i | 8i | 40 (0.026) | 52 (0.052) | DMF (1) | 20-25 | 72 | RP-B | 51 mg, 78% | 1258 (M/2 + 1) ⁺ |
| 9J | 8J | 120 (0.10) | 300 (0.30) | DMF (5) | 50 | 3 | RP-B | 110 mg, 51% | 1081 (M/2 + 1) ⁺ |
| 9K | 8K | 100 (0.080) | 160 (0.16) | DMF (10) | 50 | 3 | RP-B | 105 mg, 58% | 751 (M/3 + 1) ⁺ |
| 9L | 8L | 60 (0.059) | 117 (0.12) | DMF (3) | 50 | 6 | B | 40 mg, 34% | 1009.5 (M/2 + 1) ⁺ |

*: 9bA и 9bB - два триазольных региоизомера.

Для очистки - B: метод препаративной ВЭЖХ B; A: метод препаративной ВЭЖХ A; RP: RP-флэш; RP-B: метод RP-флэш B; RP-A: метод RP-флэш A.

Пример 26.

Получение соединения 9а (см. фиг. 7 и табл. 6).

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

циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-[(1S)-1-{{(1S)-1-{{(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-{{(1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил]карбамоил}-1-метокси-2-метилэтил]пирролидин-1-ил]-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил}(метил)карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-2-метилпропил]-N-метилкарбамат (9a).

Следуя общей методике C, соединение 9a (9,6 мг, 25% выход) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1207 (M/2+H)⁺.

¹H ЯМР (метанол-d₄, 500 МГц): δ 7.64-7.55 (m, 2H), 7.50-7.39 (m, 3H), 7.39-7.29 (m, 3H), 7.26-7.20 (m, 1H), 5.22-4.93 (m, 11H), 4.70-4.54 (m, 6H), 4.25-4.20 (m, 4H), 4.09-3.78 (m, 21H), 3.69-3.42 (m, 18H), 3.38-3.36 (s, 6H), 3.28 (s, 4H), 3.24-3.12 (m, 5H), 2.97-2.94 (m, 6H), 2.73-2.47 (m, 3H), 2.28-1.77 (m, 12H), 1.71-1.37 (m, 12H), 1.35-1.28 (m, 1H), 1.21-1.14 (m, 6H), 1.03-0.78 (m, 24H) ч/млн.

Пример 27.

Получение соединения 9b (см. фиг. 7 и табл. 6).

(2R)-2-амино-6-{2-[(1-{{31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6,2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]}дотетраоктантан-5-ил}метил}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}-N-(1S)-1-{{(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]}икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}фенил)карбамоил]этил]-карбамоил}-2-метилпропил}гексанамида (9b).}

В соответствии с общей процедурой C триазольные региоизомеры 9bA (первый пик в ЖХМС, 13 мг, выход 22%) и 9bB (второй пик в ЖХМС, 19 мг, выход 32%) были разделены и получены в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд для обоих соединений: 991 (M+H)⁺.

Пример 28.

Получение соединения 9c (см. фиг. 7 и табл. 6).

(2R)-2-амино-6-{2-[(1-{{31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6,2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]}дотетраоктантан-5-ил}метил}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}-N-(1S)-1-{{(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]}икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}фенил)карбамоил]этил]карбамоил}-2-метилпропил}гексанамида (9c).}

Следуя общей процедуре C, соединение 9c (80 мг, выход 40%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 991 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 9.92-9.73 (m, 1H), 8.52-8.19 (m, 2H), 8.11-7.93 (m, 1H), 7.90-7.76 (m, 1H), 7.70-7.47 (m, 3H), 7.32 (d, J=10.0 Гц, 1H), 7.03-6.77 (m, 3H), 6.49-6.29 (m, 1H), 6.18 (d, J=10.0 Гц, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.71-5.53 (m, 5H), 5.51-5.33 (m, 5H), 5.21-3.51 (m, 42H), 3.50-2.64 (m, 19H), 2.43-2.26 (m, 3H), 2.16-1.93 (m, 4H), 1.90-1.78 (m, 3H), 1.74-1.11 (m, 24H), 1.07-0.72 (m, 16H) ppm.

Пример 29.

Получение соединения 9d (см. фиг. 7 и табл. 6).

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

Следуя общей методике C, соединение 9d (0,38 г, 60% выход) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 995 (M/2+1)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, метанол-d₄) δ 8.40 (s, 1H, имидин-Н), 7.56-7.52 (m, 1H), 7.32 (t, J=7.7 Гц, 1H), 7.03 (d, J=8.4 Гц, 1H), 6.88 (d, J=8.3 Гц, 1H), 6.72 (d, J=2.4 Гц, 1H), 6.56 (dd, J=8.2, 2.3 Гц, 1H), 5.24-5.16 (m, 1H), 5.01-4.95 (m, 6H), 4.65-3.43 (m, 40H), 3.14-2.72 (m, 7H), 2.55-1.26 (m, 44H), 1.16 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.09-0.93 (m, 6H) ч/млн.

Пример 30.

Получение соединения 9e (см. фиг. 7 и табл. 6).

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

Следуя общей процедуре С, соединение 9e (67 мг, выход 64%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1141 (M/2+1)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, метанол-d₄) δ 8.40 (s, 1H), 7.65-7.45 (m, 3H), 7.40-7.26 (m, 3H), 7.02 (d, J=8.3 Гц, 1H), 6.88 (d, J=8.3 Гц, 1H), 6.72 (d, J=2.4 Гц, 1H), 6.56 (dd, J=8.3, 2.4 Гц, 1H), 5.24-5.16 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 5.02-4.93 (m, 4H), 4.66-4.51 (m, 2H), 4.43-4.22 (m, 2H), 4.15-3.73 (m, 22H), 3.64-3.42 (m, 12H), 3.37 (s, 3H), 3.24-3.03 (m, 4H), 3.01-2.75 (m, 6H), 2.42-2.25 (m, 6H), 2.18-1.98 (m, 8H), 1.94-1.58 (m, 15H), 1.56-1.50 (m, 3H), 1.47-1.40 (m, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.34-1.25 (m, 4H), 1.16-1.10 (m, 6H), 1.09-0.93 (m, 7H) ppm.

Пример 31.

Получение соединения 9f (см. фиг. 7 и табл. 6).

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

Следуя общей процедуре С, соединение 9f (20 мг, выход 57%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1156,0 (M/2+1)⁺.

Пример 32.

Получение соединения 9g (см. фиг. 7 и табл. 6).

4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-амино-6-(1-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42]-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]}дотетраконтан-5-ил]метил}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-[(1S)-1-[(1S)-1-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-({[(1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил]карбамоил}-1-метокси-2-метилэтил]пирролидин-1-ил]-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил](метил)карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-2-метилпропил]-N-метилкарбамат (9g).

Следуя общей процедуре С, соединение 9g (46 мг, выход 58%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 887,9 (M/3+H)⁺.

¹H ЯМР (метанол-d₄, 500 МГц) δ 7.61 (d, J=6.5 Гц, 2H), 7.46-7.27 (m, 6H), 7.23 (t, J=7.2 Гц, 1H), 5.38-5.02 (m, 3H), 5.00-4.91 (m, 6H), 4.72-4.50 (m, 5H), 4.44-4.15 (m, 5H), 4.12-3.78 (m, 21H), 3.77-3.69 (m, 5H), 3.68-3.41 (m, 30H), 3.39-3.35 (m, 4H), 3.30-3.26 (m, 3H), 3.24-2.84 (m, 12H), 2.59-2.40 (m, 4H), 2.31-1.86 (m, 11H), 1.84-1.69 (m, 5H), 1.67-1.50 (m, 8H), 1.48-1.37 (m, 4H), 1.36-1.29 (m, 3H), 1.22-1.11 (m, 6H), 1.06-0.76 (m, 24H) ppm.

Пример 33.

Получение соединения 9h (см. фиг. 7 и табл. 6).

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

Следуя общей процедуре С, соединение 9h (30 мг, выход 72%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1118 (M/2+1)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 9.91-9.85 (m, 1H), 9.13-8.90 (m, 1H), 8.58 (t, J=9.3 Гц, 2H), 8.50-8.47 (m, 1H), 8.17-8.00 (m, 6H), 7.88-7.78 (m, 2H), 7.53-7.49 (m, 1H), 7.36-7.30 (m, 1H), 6.97 (d, J=8.5 Гц, 1H), 6.82 (d, J=8.3 Гц, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.51 (d, J=8.3 Гц, 1H), 5.52-5.50 (m, 11H), 5.14 (s, 1H), 4.86-4.67 (m, 10H), 4.54 (d, J=12.9 Гц, 2H), 4.46-4.32 (m, 5H), 4.06-3.94 (m, 3H), 3.89-3.76 (m, 4H), 3.73-3.61 (m, 5H), 3.57 (t, J=6.5 Гц, 3H), 3.53-3.34 (m, 12H), 3.33-3.19 (m, 4H), 3.17-3.08 (m, 3H), 3.00 (dd, J=12.6, 6.2 Гц, 3H), 2.91-2.68 (m, 8H), 2.31-2.22 (m, 5H), 2.18-2.07 (m, 6H), 1.93-1.78 (m, 6H), 1.74-1.35 (m, 15H), 1.28 (d, J=6.6 Гц, 17H), 1.19-1.06 (m, 5H), 1.01-0.94 (m, 9H), 0.89-0.79 (m, 6H) ppm.

Пример 34.

Получение соединения 9i (см. фиг. 7 и табл. 6).

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

(([(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]окси}этил)карбамат (9i).

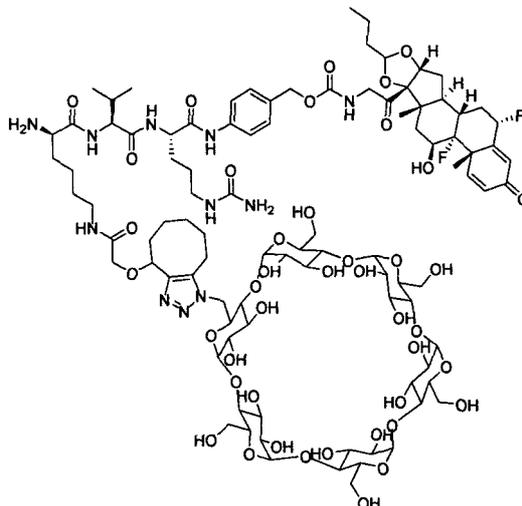
Следуя общей процедуре C, соединение 9i (51 мг, выход 78%) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1258 (M/2+1)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 10.08 (s, 1H), 9.09-8.91 (m, 1H), 8.56 (d, J=8.7 Гц, 1H), 8.39 (d, J=7.3 Гц, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.85-7.78 (m, 2H), 7.58 (d, J=8.5 Гц, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.29 (d, J=8.5 Гц, 2H), 6.94 (d, J=8.5 Гц, 1H), 6.85-6.78 (m, 2H), 6.68 (d, J=8.3 Гц, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.51 (d, J=8.2 Гц, 1H), 6.06 (s, 1H), 5.50 (br s, 25H), 5.15 (s, 1H), 4.96 (s, 3H), 4.85-4.78 (m, 12H), 4.70 (s, 3H), 4.56 (s, 3H), 4.39 (s, 5H), 3.89-3.75 (m, 14H), 3.74-3.56 (m, 8H), 3.54-3.39 (m, 8H), 3.38-3.29 (m, 7H), 3.14 (s, 2H), 3.01 (d, J=5.5 Гц, 5H), 2.86-2.8 (m, 2H), 2.74 (s, 4H), 2.32-2.23 (m, 5H), 2.16 (d, J=11.2 Гц, 3H), 2.00 (d, J=6.6 Гц, 2H), 1.93-1.86 (m, 5H), 1.77-1.54 (m, 10H), 1.46-1.42 (m, 6H), 1.30-1.27 (m, 11H), 1.14 (s, 3H), 1.00 (d, J=12.5 Гц, 6H), 0.88 (s, 3H) 0.84 (s, 3H) ppm.

Пример 34A.

Получение соединения 9J (см. фиг. 7 и табл. 6).

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-амино-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42]-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]-дотетраконтан-5-ил]метил}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]-икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил}карбамат (9J)



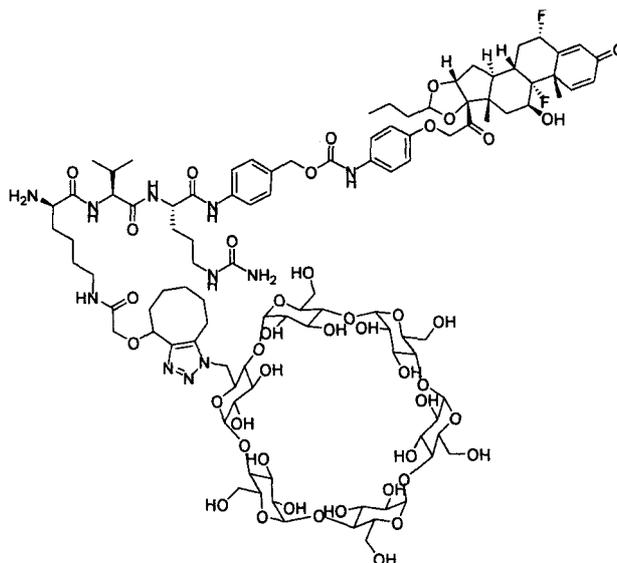
Следуя общей методике, описанной в примере 25, соединение 9J (0,11 г, 51% выход) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1081 (M/2+1)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 10.05 (s, 1H), 8.30-7.80 (m, 3H), 7.80-7.55 (m, 2H), 7.50-7.40 (m, 1H), 7.40-7.25 (m, 3H), 6.30 (d, J=12.5 Гц, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.00 (s, 1H), 5.80-5.35 (m, 16H), 5.25-5.05 (m, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.90-4.50 (m, 13H), 4.50-4.00 (m, 5H), 3.95-3.55 (m, 22H), 3.30-3.20 (m, 8H), 3.20-3.00 (m, 4H), 3.00-2.85 (m, 5H), 2.25-2.20 (m, 2H), 2.10-1.95 (m, 4H), 1.80-1.00 (m, 30H), 1.00-0.90 (m, 4H), 0.90-0.80 (m, 14H) ч/млн.

Пример 34B.

Получение соединения 9K - (см. фиг. 7 и табл. 6).

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-амино-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42]-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]-дотетраконтан-5-ил]метил}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]-икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}фенил)карбамат (9K)

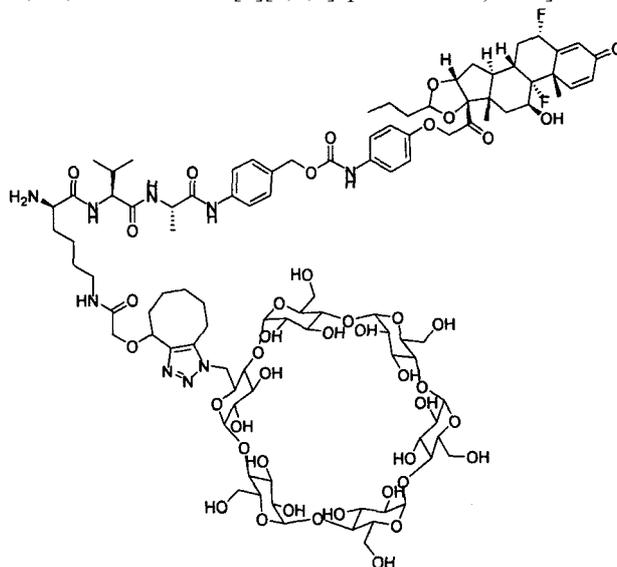


Следуя общей методике, описанной в примере 25, соединение 9K (0,11 г, 58% выход) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 751 (M/3+1)⁺.

Пример 34С.

Получение соединения 9L - (см. фиг. 7 и табл. 6).

(2R)-2-амино-N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}фенил)карбамоил]этил]карбамоил]-2-метилпропил]-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло [26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]]дотетрактан-5-ил]метил}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетиамидо}гексанамид (9L)



Следуя общей методике, описанной в примере 25, соединение 9L (40 мг, 34% выход) получали в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1009,5 (M/2+1)⁺.

Пример 35.

Некоторые полезные нагрузки линкера были синтезированы в соответствии со следующей процедурой (общая методика D (см. фиг. 8).

Общая методика D: К раствору кислоты 4a или 4c (1,0-2,5 экв.) в DMF (или DCM/DMF) последовательно добавляли DIPEA (1,5-10 экв.) и HATU (2,5-4,0 экв.) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали при этой температуре в течение 0,5-1 ч, после чего добавляли амин (3a, 3c, 3d, 3H, 3I или 9a-i, 9J-L) (1,0 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2-16 ч до полного расхода амина, что контролировали с помощью ЖХМС. Реакционную смесь фильтруют через мембрану и затем фильтрат разделяют препаративной ВЭЖХ, получая соединение примера (выход 20-69%) в виде белого твердого вещества.

Таблица 7
Условия реакции для прим. 36 и 41-61 - общая методика D

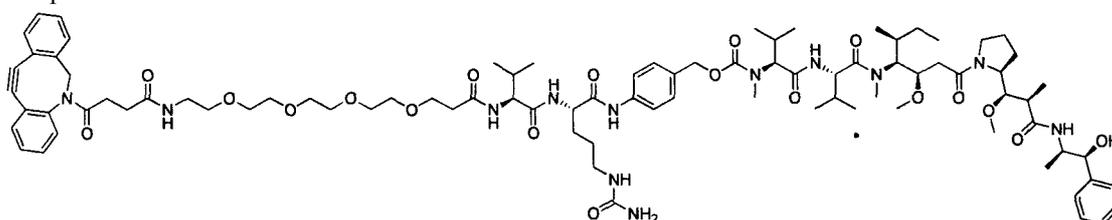
| LP из Прим. № | Амин мг (мкмоль) | | Кислота мг (мкмоль) | | Шаг 11 | | | | | Очистка | мг % выхода | МС масса/заярд |
|---------------|------------------|-----------|---------------------|-----------|------------------|-------------------|---------------------|------------|-----------|---------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 3a | 6.9 (6.1) | 4a | 5.1 (9.2) | НАТУ мг (мкмоль) | DIPEA мг (мкмоль) | DMF (мл) | Темп. (°C) | Время (ч) | | | |
| Ex36 | 3a | 6.9 (6.1) | 4a | 5.1 (9.2) | 3.5 (9.2) | 1.7 (13) | 1 | 25 | 16 | В | 2.0 20% | 829.7 (M/2+H) ⁺ |
| Ex41 | 9a | 11 (4.7) | 4a | 2.6 (4.7) | 2.7 (7.1) | 1.2 (9.4) | 2 | 25 | 16 | В | 6.0 25% | 983.4 (M/3+H) ⁺ |
| Ex42 | 9a | 11 (4.7) | 4c | 3.0 (6.9) | 4.0 (10) | 2.0 (16) | 1 | 25 | 2 | В | 4.0 31% | 946.3 (M/3+H) ⁺ |
| Ex43 | 9g | 15 (5.6) | 4a | 3.4 (6.2) | 4.0 (10) | 1.5 (11) | DCM /DMF (1:1, 2mL) | 25 | 2 | В | 7.5 42% | 1065.9 (M/3+H) ⁺ |
| Ex44 | 9g | 21 (7.9) | 4c | 9.0 (20) | 7.8 (20) | 0.04 mL, excess | DCM /DMF (1:1, 2mL) | 25 | 2 | В | 8.5 35% | 1028.7 (M/3+H) ⁺ |
| Ex45 | 3c | 30 (43) | 4a | 48 (87) | 40 (105) | 17 (132) | 1 | 25 | 16 | В | 30 56% | 1226 (M+H) ⁺ |
| Ex46 | 9b B | 13 (6.0) | 4a | 20 (36) | 15 (39) | 4.0 (31) | 2 | 25 | 2 | В | 6.0 36% | 1258 (M/2+H) ⁺ |
| Ex47 | 9c | 30 (15) | 4a | 10 (18) | 8.0 (21) | 6.0 (47) | 1 | 15-20 | 16 | В | 18 47% | 1258 (M/2+H) ⁺ |
| Ex48 | 3d | 20 (29) | 4a | 18 (33) | 33 (87) | 33 (87) | 1 | 15-20 | 16 | В | 10 28% | 1234 (M+H) ⁺ |
| Ex49 | 9d | 300 (150) | 4a | 82 (150) | 57 (0.15) | 38 (0.30) | 8 | 15 | 3 | В | 260 69% | 1262 (M/2+H) ⁺ |
| Ex51 | 9h | 12 (5.4) | 4c | 3.0 (6.7) | 6.2 (16) | 2.1 (16) | 1 | 15-20 | 16 | В | 2.0 14% | 1330 (M/2+H) ⁺ |
| Ex52 | 9i | 20 (8.0) | 4c | 5.3 (12) | 4.6 (12) | 4.1 (32) | 1 | 15-20 | 16 | В | 5.0 21% | 1470 (M/2 + H) ⁺ |
| Ex53 | 9h | 28 (13) | 4a | 8.9 (16) | 6.1 (16) | 5.2 (40) | 1 | 15-20 | 16 | В | 8.0 32% | 1386 (M/2+H) ⁺ |
| Ex54 | 9d | 30 (15) | 4c | 10 (22) | 8.4 (22) | 7.7 (60) | 1 | 15-20 | 16 | В | 16 43% | 1206 (M/2+H) ⁺ |
| Ex55 | 9e | 65 (28) | 4a | 18 (34) | 33 (87) | 33 (87) | 1 | 15-20 | 16 | В | 28 35% | 1409 (M/2+H) ⁺ |
| Ex56 | 9f | 15 (6.5) | 4a | 4.3 (7.8) | 7.6 (20) | 26 (20) | 1 | 15-20 | 16 | В | 10 42% | 1424.3 (M/2+H) ⁺ |
| Ex 57 | 3H | 43 (50) | 4a | 30 (54) | 31 (81) | 13 (100) | 5 | 25 | 3 | В | 16 23% | 1406 (M+H) ⁺ |
| Ex58 | 9J | 100 (46) | 4a | 30 (54) | 26 (69) | 18 (138) | 5 | 25 | 4 | В | 26 22% | 1349 (M/2+H) ⁺ |
| Ex59 | 9J | 22 (10) | 4c | 4.5 (10) | 6.0 (16) | 3 (23) | 1.5 | 20 | 2 | В | 10 38% | 1293 (M/2+H) ⁺ |
| Ex60 | 3I | 58 (60) | 4a | 37 (67) | 34 (90) | 15 (120) | 5 | 25 | 3 | В | 20 22% | 1499 (M+H) ⁺ |
| Ex61 | 9K | 100 (44) | 4a | 30 (54) | 26 (69) | 18 (138) | 5 | 25 | 4 | В | 29 24% | 1394 (M/2+H) ⁺ |
| Ex 62 | | 100 (44) | 4a | 30 (54) | 26 (69) | 18 (138) | 5 | 25 | 4 | В | 29 24% | 1394 (M/2+H) |
| Ex63 | 9 L | 19 (9.4) | 4 b | 7.0 (11) | 2.3 (18) | 2 | 25 | 16 | В | 7 29% | 1276.8 (M/2+H) ⁺ | |

Для очистки - В: препаративная ВЭЖХ метод В.

Пример 36.

Приготовление линкера-ММАЕ (см. фиг. 8 и табл. 7).

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]}гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил]-4-оксобутаноидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбетаноидо]-5-(карбамоиламино)пентаноидо]фенил}метил N-[(1S)-1-{[(1S)-1-{[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-[[[(1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил]карбамоил]-1-метокси-2-метилэтил]пирролидин-1-ил]-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил](метил)карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил]-2-метилпропил]-N-метилкарбамат



ESI масса/заряд: 829,7 (M/2+H)⁺ (100%), 1659,7 (M+H)⁺ (20%).

¹H ЯМР (DMSO-d₆, 500 МГц): δ 9.98 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.11 (d, J=7.3 Гц, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.92-7.82 (m, 2H), 7.75 (t, J=5.1 Гц, 1H), 7.68 (d, J=7.2 Гц, 1H), 7.65-7.53 (m, 3H), 7.53-7.42 (m, 3H), 7.41-7.22 (m, 9H), 7.22-7.10 (m, 1H), 6.06-5.91 (m, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.33 (d, J=4.8 Гц, 1H), 5.15-4.91 (m, 3H), 4.79-4.57 (m, 1H), 4.54-4.17 (m, 5H), 4.08-3.88 (m, 2H), 3.67-3.40 (m, 16H), 3.27-2.80 (m, 18H), 2.62-2.53 (m, 1H), 2.41-1.27 (m, 21H), 1.07-0.95 (m, 6H), 0.90-0.67 (m, 26H) ч/млн.

Анал. ВЭЖХ: 98%, время удерживания: 8,25 мин (метод В). Растворимость: <0,1 мг/мл воды.

Пример 37.

Этот пример предоставляет типичный синтетический маршрут для создания определенных линкеро-полезных нагрузок (см. фиг. 9).

4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо]-6-[4-(3-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-3,4,5,13-тетраазатетрацикло[13.4.0.0^{2,6}.0^{7,12}]нонадека-1(19),2(6),4,7(12),8,10,15,17-октаен-13-ил)-4-оксобутанамидо]гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-пентанамидо]фенил}метил N-[(1S)-1-[(1S)-1-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-[(1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил]карбамоил]-1-метокси-2-метилэтил]пирролидин-1-ил]-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил](метил)карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил]-2-метилпропил]-N-метилкарбамат.

К раствору Mc-(L) D-Lys(suc-DIBAC)-ОН (5b, 2,0 мг, 3,1 мкмоль) в сухом THF (1 мл) последовательно добавляли HATU (1,8 мг, 4,7 мкмоль) и DIPEA (0,8 мг, 6,2 мкмоль) при комнатной температуре. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего в реакционную смесь добавляли раствор соединения 3a (3,6 мг, 3,1 мкмоль) в сухом THF (1 мл). Полученную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 16 ч до тех пор, пока ЖХМС не сочтет, что реакция завершена. Летучие вещества удаляли в вакууме и остаток 8j (ESI масса/заряд: 866,3 (M/2+H)⁺) растворяли в ацетонитриле (1 мл). К раствору добавляли раствор αCD-азида 6a (4,6 мг, 4,7 мкмоль) в воде (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч и контролировали с помощью ЖХМС. Смесь непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (метод А), получая соединение линкера с полезной нагрузкой, указанное в этом примере (2 мг, 25% выход) в виде белого твердого вещества.

ESI масса/заряд: 910.8 (M/3+H)⁺ (100%), 1365.4 (M/2+H)⁺ (20%). Анал. ВЭЖХ: >99,9%, время удерживания: 6,97 мин (метод В).

Пример 38.

Получение 4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-6-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4,6,8,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-2-{6-[3-(4-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}пиперазин-1-ил)-2,5-диоксопирролидин-1-ил]гексанамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-[(1S)-1-[(1S)-1-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-[(1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил]карбамоил]-1-метокси-2-метилэтил]пирролидин-1-ил]-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил](метил)карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил]-2-метилпропил]-N-метилкарбамат (см. фиг. 10).

Смесь промежуточного соединения 5a (15 мг, 24 мкмоль) и HATU (15 мг, 39 мкмоль) в THF (1 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение получаса. Затем добавляли раствор vs-РАВ-ММАЕ (I, 26 мг, 23 мкмоль) в DMF (2 мл) и DIPEA (8,9 мг, 69 мкмоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакцию контролировали с помощью ЖХМС до тех пор, пока не был израсходован vs-РАВ-ММАЕ и не было обнаружено желаемое соединение. Летучие вещества удаляли в вакууме и остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрил в воде), получая Ex38-Int (18 мг, выход 26%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 1732 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (DMSO-d₆, 400 МГц): δ 9.61 (s, 1H), 8.31-7.87 (m, 6H), 7.68-7.61 (m, 5H), 7.49-7.37 (m, 4H), 7.30-7.12 (m, 13H), 6.98 (s, 2H), 5.95 (m, 1H), 5.38-5.33 (m, 4H), 5.12-5.02 (m, 2H), 4.76-4.26 (m, 7H), 4.16-4.14 (m, 2H), 4.04-3.94 (m, 3H), 3.79-3.43 (m, 5H), 3.3 (s, 6H), 3.24-3.23 (m, 5H), 3.20 (s, 3H), 3.17 (s, 2H), 3.11 (m, 2H), 3.04-2.84 (m, 8H), 2.64-2.57 (m, 2H), 2.43-2.36 (m, 2H), 2.29-2.14 (m, 2H), 2.04-1.94 (m, 5H), 1.80-1.72 (m, 3H), 1.57-1.24 (m, 5H), 1.11-0.97 (m, 6H), 0.89-0.75 (m, 24H) ppm.

Указанное выше промежуточное соединение растворяли в DMF (0,7 мл). К раствору последовательно добавляли TEA (0,5 мг, 5,0 мкмоль) и αCD-рп 6b (9,6 мг, 9,4 мкмоль) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч до завершения реакции в соответствии с ЖХМС. Смесь непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (метод В), получая соединение линкера с полезной нагрузкой, указанное в этом примере (3 мг, 23% выход) в виде белого твердого вещества.

ESI масса/заряд: 925.1 (M/3+H)⁺ (100%), 1387 (M/2+H)⁺ (10%).

¹H ЯМР (DMSO-d₆, 500 МГц): δ 9.68 (s, 1H), 8.34-7.83 (m, 4H), 7.72-7.56 (m, 5H), 7.55-7.24 (m, 12H), 7.21-7.12 (m, 1H), 5.97 (s, 1H), 5.69-5.26 (m, 14H), 5.25-4.70 (m, 9H), 4.69-4.38 (m, 7H), 4.36-4.21 (m, 3H),

4.17 (s, 1H), 4.06-3.88 (m, 2H), 3.87-3.53 (m, 25H), 3.52-3.35 (m, 14H), 3.32-3.08 (m, 21H), 3.08-2.80 (m, 7H), 2.79-2.52 (m, 9H), 2.46-1.88 (m, 11H), 1.87-1.10 (m, 21H), 1.07-0.96 (m, 6H), 0.90-0.74 (m, 24H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: 96%, время удерживания: 7,22 мин (метод В). Растворимость: 0,25 мг/мл воды.

Пример 39.

Этот пример предоставляет типичный синтетический маршрут для создания определенных линкеро-полезных нагрузок (см. фиг. 11).

4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-[1-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-6-{2-[(1-{{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42]-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксапентацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]}дотетраконтан-5-ил]метил}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метил N-[(1S)-1-{{(1S)-1-{{(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-{{(1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил]карбамоил}-1-метокси-2-метилэтил]пирролидин-1-ил}-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил}(метил)карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-2-метилпропил]-N-метилкарбамат.

К смеси соединения 8a (10 мг, 7,1 мкмоль) и соединения 4d (6,2 мг, 14 мкмоль) в DMF (0,5 мл) добавляли TEA (2,1 мг, 21 мкмоль) при 25°C с помощью шприца. Смесь перемешивали при 20-25°C в течение 16 ч, пока большая часть 8a не была израсходована, что контролировали с помощью ЖХМС. Реакционную смесь очищают флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-100% ацетонитрил в воде (с 0,03% TFA)), получая белое твердое вещество (ESI масса/заряд: 1743 (M+H)⁺), которое растворяют в DMF (1 мл) и воде (1 мл). К раствору добавляли азид 6a (3,0 мг, 3,0 мкмоль) при 25°C и смесь перемешивали при этой температуре в течение 3 дней. Затем реакция была признана завершенной с помощью ЖХМС. Летучие вещества удаляли в вакууме и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (метод А), получая соединение линкера с полезной нагрузкой, указанное в этом примере (1,5 мг, выход 9%) в виде белого твердого вещества.

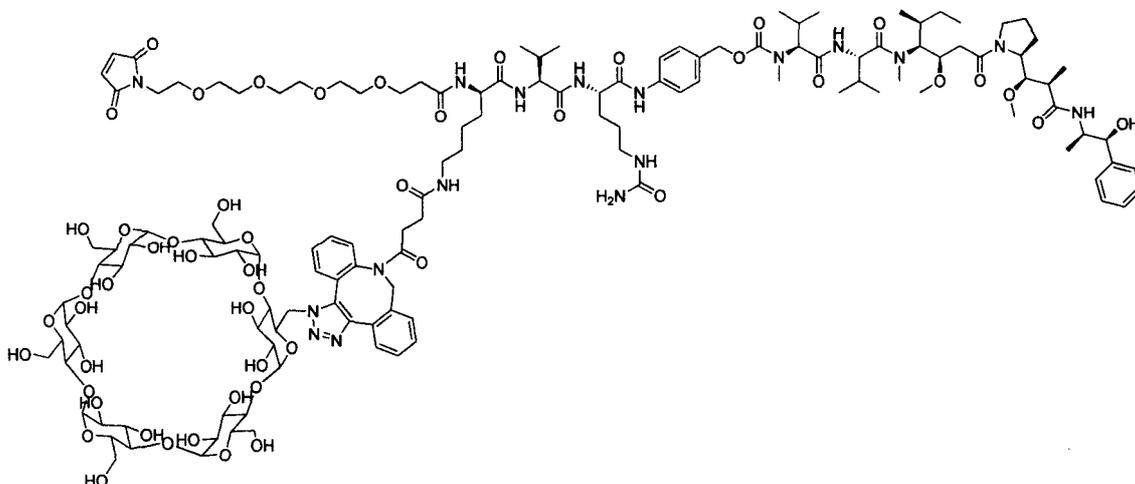
ESI масса/заряд: 1371 (M/2+H)⁺.

¹H ЯМР (DMSO-d₆, 500 МГц): δ 9.70 (s, 1H), 8.36-7.54 (m, 8H), 7.37-7.09 (m, 8H), 7.01 (s, 2H), 6.55 (s, 1H), 6.05-5.94 (m, 1H), 5.76 (s, 3H), 5.64-5.29 (m, 16H), 5.24-4.91 (m, 3H), 4.89-4.67 (m, 8H), 4.62-4.14 (m, 13H), 4.07-3.89 (m, 3H), 3.87-3.53 (m, 28H), 3.53-3.15 (m, 15H), 3.15-3.03 (m, 9H), 3.01-2.80 (m, 10H), 2.43-2.35 (m, 3H), 2.31-2.22 (m, 2H), 2.16-1.94 (m, 5H), 1.90-1.11 (m, 23H), 1.07-0.94 (m, 8H), 0.92-0.68 (m, 28H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: > 99,9%, время удерживания: 5,78 мин (метод А).

Пример 40.

Получение 4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-[1-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-6-[4-(3-{{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42]-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксапентацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]}дотетраконтан-5-ил]метил}-3,4,5,13-тетраазатетрацикло[13.4.0.0^{2,6}.0^{7,12}]}нонадека-1(19),2(6),4,7(12),8,10,15,17-октаен-13-ил)-4-оксобутанамидо]гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-пентанамидо]фенил}метил N-[(1S)-1-{{(1S)-1-{{(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-{{(1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил]карбамоил}-1-метокси-2-метилэтил]пирролидин-1-ил}-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил}(метил)карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-2-метилпропил]-N-метилкарбамат (см. фиг. 9)



См. путь синтеза в примере 37. Следуя процедуре из примера 37, за исключением замены соединения 5c на 5b, соединение полезной нагрузки линкера, указанное в этом примере (8,0 мг, выход 36%), получили в виде белого твердого вещества.

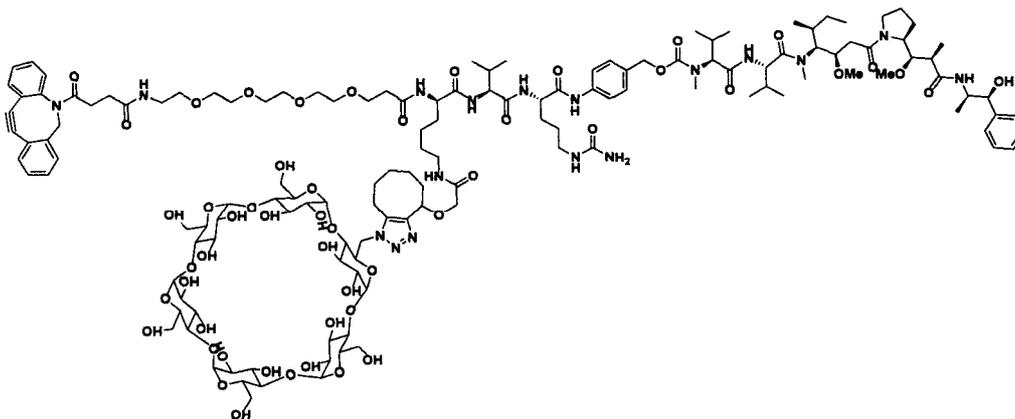
ESI масса/заряд: 1432 (M/2+H)⁺.

¹H ЯМР (DMSO-d₆, 500 МГц): δ 9.68 (s, 1H), 8.10-8.07 (m, 4H), 7.89-7.81 (m, 1H), 7.67-7.39 (m, 10H), 7.31-7.10 (m, 12H), 7.01 (s, 2H), 5.98-5.87 (m, 1H), 5.67-5.22 (m, 14H), 5.05-4.67 (m, 11H), 4.49-4.16 (m, 13H), 4.04-3.69 (m, 12H), 3.68-2.85 (m, 54H), 2.71-1.29 (m, 28H), 1.05-0.97 (m, 7H), 0.89-0.68 (m, 29H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: >99,9%, время удерживания: 6,84 мин (метод В). Растворимость: 0,33 мг/мл воды.

Пример 41.

Получение {4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетиамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-[(1S)-1-[(1S)-1-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-[(1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил]карбамоил]-1-метокси-2-метилэтил]пирролидин-1-ил]-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил](метил)карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил]-2-метилпропил]-N-метилкарбамат (см. фиг. 8 и табл. 7)



ESI масса/заряд: 983.4 (M/3+H)⁺ (100%), 1475 (M/2+H)⁺ (5%).

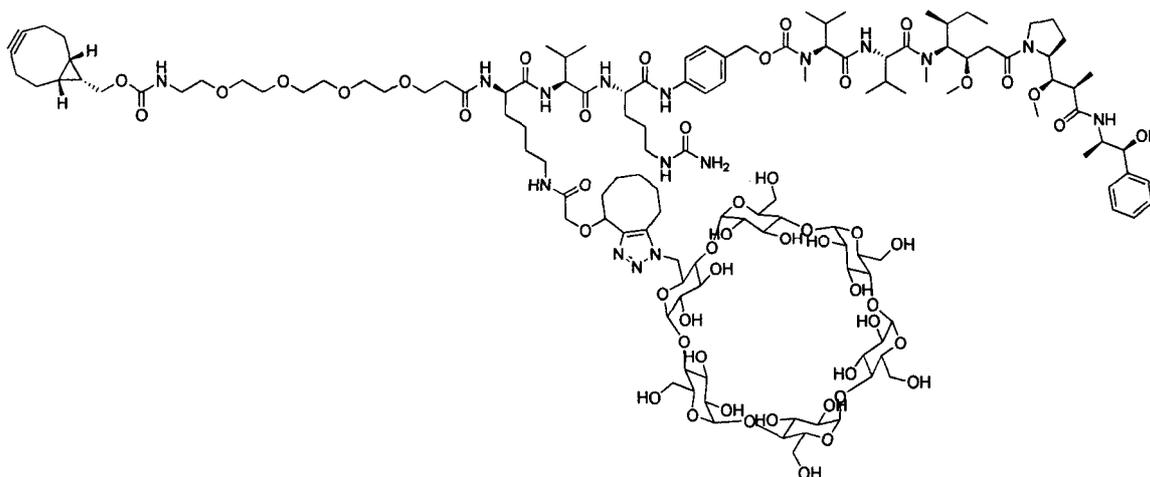
¹H ЯМР (DMSO-d₆, 500 МГц): δ 9.70 (s, 1H), 8.39-7.09 (m, 24H), 5.97 (s, 1H), 5.79-5.30 (m, 15H), 5.22-4.92 (m, 4H), 4.90-4.64 (m, 8H), 4.64-4.14 (m, 13H), 4.06-3.90 (m, 4H), 3.90-2.81 (m, 77H), 2.65-2.55 (m, 2H), 2.44-1.93 (m, 9H), 1.89-1.59 (m, 8H), 1.57-1.40 (m, 8H), 1.35-1.18 (m, 7H), 1.07-0.95 (m, 6H), 0.90-0.67 (m, 24H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: >99,9%, время удерживания: 7,29 мин (метод В).

Растворимость: 0,25 мг/мл воды.

Пример 42.

Получение (1R,8S,9S)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметил N-(14-{[(1R)-1-[(1S)-1-[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-(4-[(1S)-1-[(1S)-1-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-[(1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил]карбамоил]-1-метокси-2-метилэтил]пирролидин-1-ил]-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил](метил)карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил]-2-метилпропил](метил)карбамоил}окси)метил]фенил}карбамоил]бутил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-5-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетиамидо}пентил]карбамоил}-3,6,9,12-тетраоксатетрадекан-1-ил]карбамат (см. фиг. 8 и табл. 7)



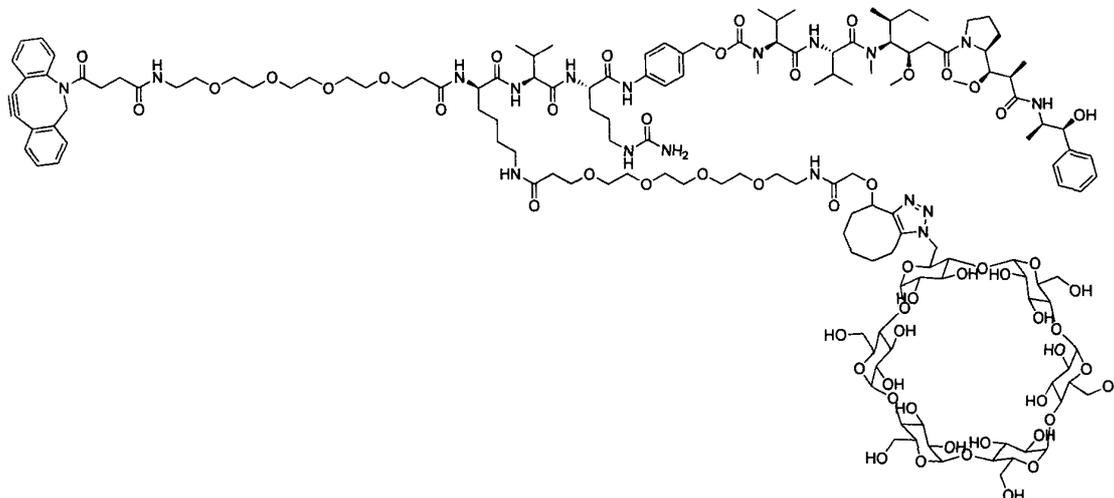
ESI масса/заряд: 946.3 (M/3+H)⁺ (100%), 1418.9 (M/2+H)⁺ (20%).

¹H ЯМР (метанол-d₄, 500 МГц): δ 7.59-7.58 (m, 2H), 7.29-7.10 (m, 7H), 5.25-4.98 (m, 4H), 4.86-4.81 (m, 5H), 4.58-4.31 (m, 4H), 4.22-4.03 (m, 6H), 3.92-3.61 (m, 21H), 3.53-3.32 (m, 36H), 3.26-3.25 (m, 5H), 3.18-2.83 (m, 13H), 2.56-2.54 (m, 1H), 2.44-1.43 (m, 33H), 1.35-1.01 (m, 15H), 0.91-0.69 (m, 29H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: >99,9%, время удерживания: 7,33 мин (метод В). Растворимость: 1,0 мг/мл воды.

Пример 43.

Получение {4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-6-(1-(2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42]-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил)-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетиамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-[[[(1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил]карбамоил]-1-метокси-2-метилэтил]пирролидин-1-ил]-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил](метил)карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил]-2-метилпропил]-N-метилкарбамат (см. фиг. 8 и табл. 7)



ESI масса/заряд: 1065.9 (M/3+H)⁺ (100%), 1598.4 (M/2+H)⁺ (20%).

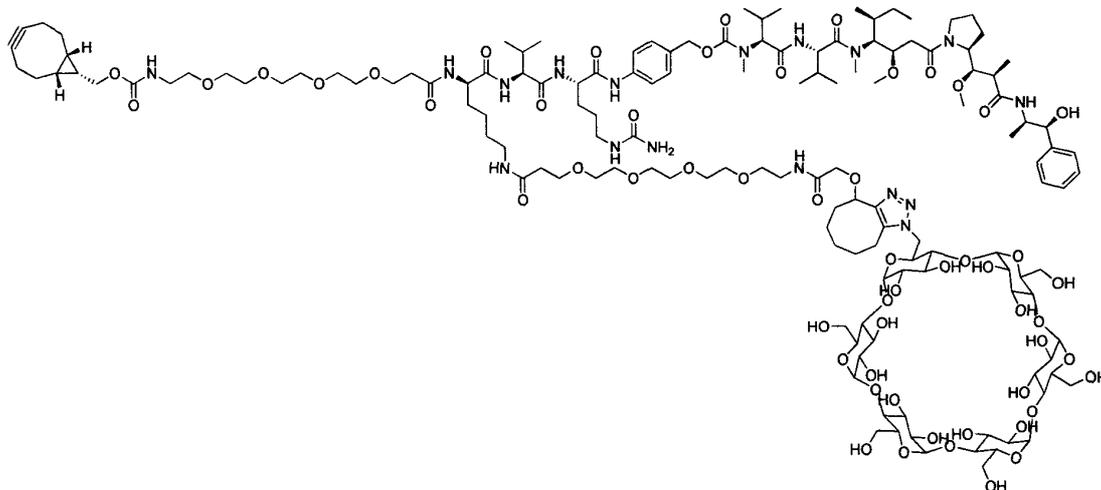
¹H ЯМР (500 МГц, метанол-d₄) δ 7.67-7.04 (m, 17H), 5.24 (t, J=4.7 Гц, 1H), 5.13-4.82 (m, 10H), 4.60-4.41 (m, 5H), 4.37-4.31 (m, 1H), 4.22-4.04 (m, 5H), 3.99-3.66 (m, 18H), 3.65-3.57 (m, 4H), 3.55-3.29 (m, 40H), 3.29-2.65 (m, 24H), 2.64-2.55 (m, 1H), 2.45-1.12 (m, 46H), 1.09-1.00 (m, 6H), 0.94-0.66 (m, 24H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: 98,2%, время удерживания: 5,79 мин (метод В). Растворимость: 0,5 мг/мл воды.

Пример 44.

Получение [(1R,8S,9S)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил]метил N-(14-[[[(1R)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-({4-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-[[[(1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил]карбамоил]-1-метокси-2-метилэтил]пирролидин-1-ил]-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил](метил)карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил]-2-метилпропил](метил)карбамоил]окси]фенил}карбамоил]бутил]карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил]-5-(1-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42]-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-

додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-1Н,4Н,5Н,6Н,7Н,8Н,9Н-циклоокта[d][1,2,3]триазол-9-ил]окси]ацетамидо}-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо)пентил]карбамоил}-3,6,9,12-тетраоксатетрадекан-1-ил]карбамат (см. фиг. 8 и табл. 7)



ESI масса/заряд: 1028.7 (M/3+H)⁺ (100%), 1541.5 (M/2+H)⁺ (5%).

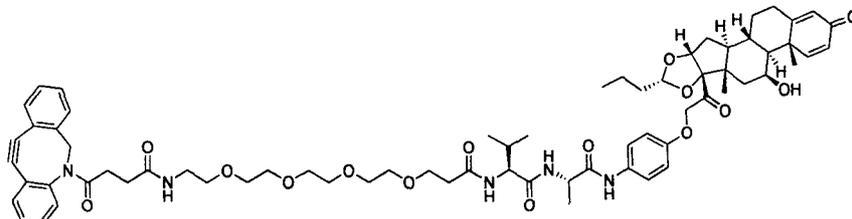
¹H ЯМР (500 МГц, метанол-d₄): δ 7.58 (d, J=8.0 Гц, 2H), 7.29-7.09 (m, 7H), 5.26-4.98 (m, 4H), 4.87-4.85 (m, 3H), 4.54-4.43 (m, 3H), 4.35-4.32 (m, 1H), 4.19-4.03 (m, 10H), 3.93-3.71 (m, 19H), 3.65-3.47 (m, 30H), 3.39-3.25 (m, 32H), 3.24-3.17 (m, 5H), 3.10-2.90 (m, 5H), 2.89-2.69 (m, 4H), 2.50-2.34 (m, 7H), 2.23-1.97 (m, 13H), 1.97-1.34 (m, 16H), 1.22-1.20 (m, 7H), 1.08-0.91 (m, 7H), 0.82-0.67 (m, 26H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: >99,9%, время удерживания: 7,02 мин (метод В). Растворимость: 1,0 мг/мл воды.

Пример 45.

Этот пример показывает синтез стероида линкер-глюкокортикоид (GC) (см. фиг. 8 и табл. 7).

1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-N-[(1S)-1-[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси)фенил]карбамоил]этил]карбамоил]-2-метилпропил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид



ESI масса/заряд: 1227 (M+H)⁺.

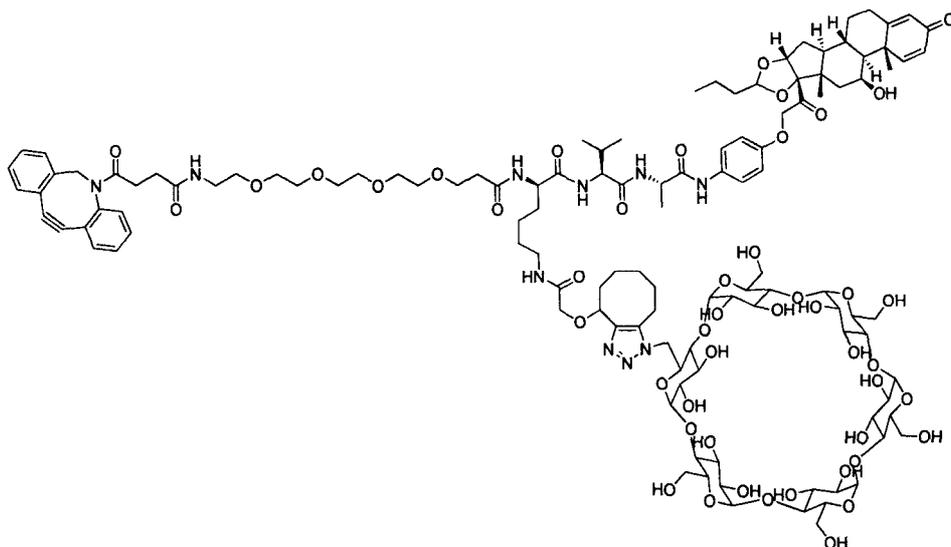
¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) (ротамеры) δ 9.79 (s, 0.5H), 9.70 (s, 0.5H), 8.41 (d, J=7.5 Гц, 0.5H), 8.17 (d, J=7.0 Гц, 0.5H), 8.02 (d, J=8.0 Гц, 0.5H), 7.89 (d, J=8.6 Гц, 0.5H), 7.77 (t, J=4.8 Гц, 1H), 7.68 (d, J=7.3 Гц, 1H), 7.62 (d, J=7.3 Гц, 1H), 7.58 (d, J=9.0 Гц, 1H), 7.53-7.43 (m, 4H), 7.40-7.28 (m, 4H), 6.88-6.82 (m, 2H), 6.18 (d, J=9.1 Гц, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.10 (d, J=18.4 Гц, 1H), 5.03 (d, J= 14.0 Гц, 1H), 4.83-4.67 (m, 4H), 4.45-4.29 (m, 2H), 4.23-4.17 (m, 0.5H), 4.11 (t, J=7.7 Гц, 0.5H), 3.64-3.40 (m, 15H), 3.31-3.26 (m, 2H), 3.13-3.03 (m, 2H), 2.65-2.52 (m, 2H), 2.47-1.26 (m, 24H), 1.06-0.93 (m, 2H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: 99%, время удерживания: 8,55 мин (метод В).

Растворимость: <0,1 мг/мл воды; 0,06 мг/мл 20% ДМСО в воде; 0,07 мг/мл 30% ДМСО в воде.

Пример 46.

Получение 1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-N-[(1R)-5-{2-[(1-[(31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-1Н,4Н,5Н,6Н,7Н,8Н,9Н-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил]окси]ацетамидо}-1-[(1S)-1-[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси)фенил]карбамоил]этил]карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил]пентил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (см. фиг. 8 и табл. 7)



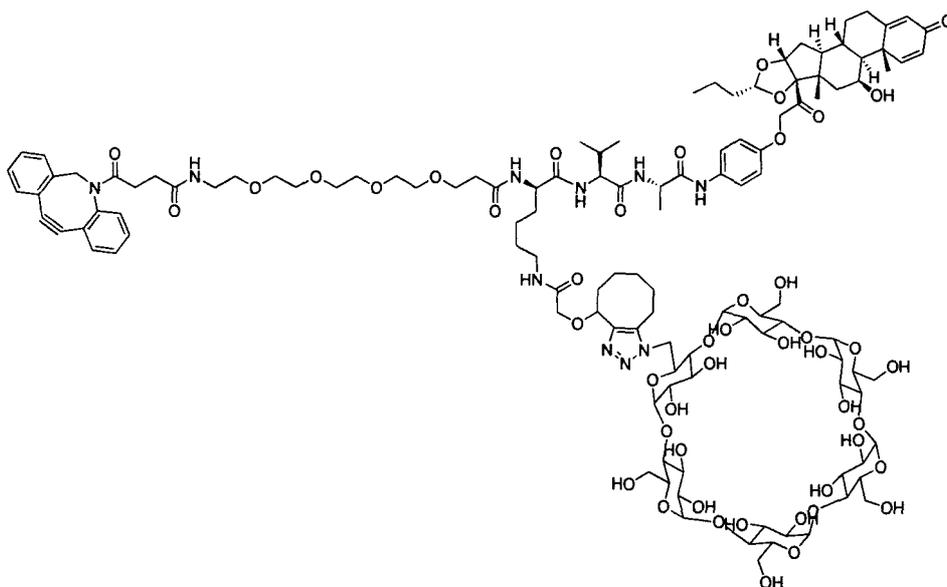
ESI масса/заряд: 1259 (M/2+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) (ротамеры) δ 9.84 (s, 1H), 8.34 (s, 0.5H), 8.15 (d, J=7.3 Гц, 1H), 8.04 (d, J=6.6 Гц, 1H), 7.90-7.84 (m, 1H), 7.81-7.74 (m, 1.5H), 7.72-7.56 (m, 4H), 7.56-7.27 (m, 11H), 6.89-6.79 (m, 2H), 6.17 (d, J=10.0 Гц, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.64-5.44 (m, 12H), 5.24-5.00 (m, 5H), 4.86-4.51 (m, 16H), 4.40-4.16 (m, 5H), 4.05-3.96 (m, 1H), 3.86-3.73 (m, 10H), 3.67-2.88 (m, 35H), 2.80-2.69 (m, 1H), 2.62-2.55 (m, 1H), 2.41-2.20 (m, 6H), 2.10-1.71 (m, 10H), 1.66-1.07 (m, 26H), 1.05-0.79 (m, 17H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: 97%, время удерживания: 6,62 и 6,67 мин (метод В).

Пример 47.

Получение 1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]}гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-N-[(1R)-5-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42]-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]}дотетраконтан-5-ил]метил}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}-1-[(1S)-1-[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12S,13R)-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]}икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}фенил)карбамоил]этил)карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил}пентил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (см. фиг. 8 и табл. 7)



ESI масса/заряд: 839.5 (M/3+H)⁺, 1259 (M/2+H)⁺ (60%).

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) (с региоизомером триазола) δ 9.77-9.42 (m, 1H), 8.27-8.20 (m, 0.5H), 8.17-8.01 (m, 2H), 7.86-7.74 (m, 2.5H), 7.70-7.60 (m, 4H), 7.57-7.43 (m, 7H), 7.39-7.28 (m, 6H), 6.88-6.81 (m, 2H), 6.21-6.14 (m, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.61-5.42 (m, 10H), 5.16-4.97 (m, 4H), 4.89-4.48 (m, 17H), 4.40-4.28 (m, 4H), 4.16-4.10 (m, 1H), 4.04-3.94 (m, 1H), 3.83-3.74 (m, 7H), 3.65-3.56 (m, 9H), 3.48-3.21 (m, 23H), 3.15-3.06 (m, 4H), 2.97-2.89 (m, 1H), 2.81-2.69 (m, 1H), 2.61-2.53 (m, 2H), 2.40-2.20 (m, 6H), 2.14-2.06 (m, 2H), 2.03-

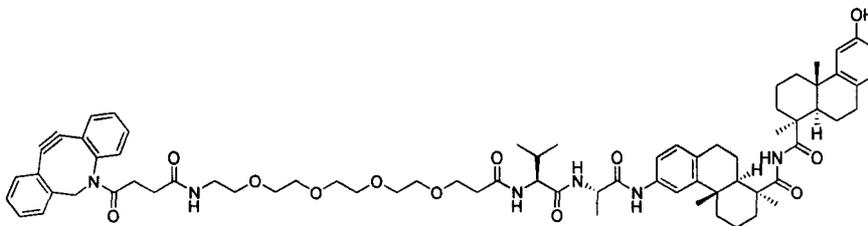
1.95 (m, 4H), 1.91-1.70 (m, 5H), 1.64-1.52 (m, 9H), 1.49-1.25 (m, 14H), 1.13-0.81 (m, 19H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: 98%, время удерживания: 6,61 (59%) и 6,73 (39%) мин (метод В).

Растворимость: 0,1 мг/мл 10% DMSO в воде.

Пример 48.

Получение 1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-N-[(1S)-1-{(1S)-1-{(4bS,8S,8aR)-8-{(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбонил}карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8а,9,10-октагидрофенантрен-3-ил}карбамоил}этил}карбамоил}-2-метилпропил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (см. фиг. 8 и табл. 7)



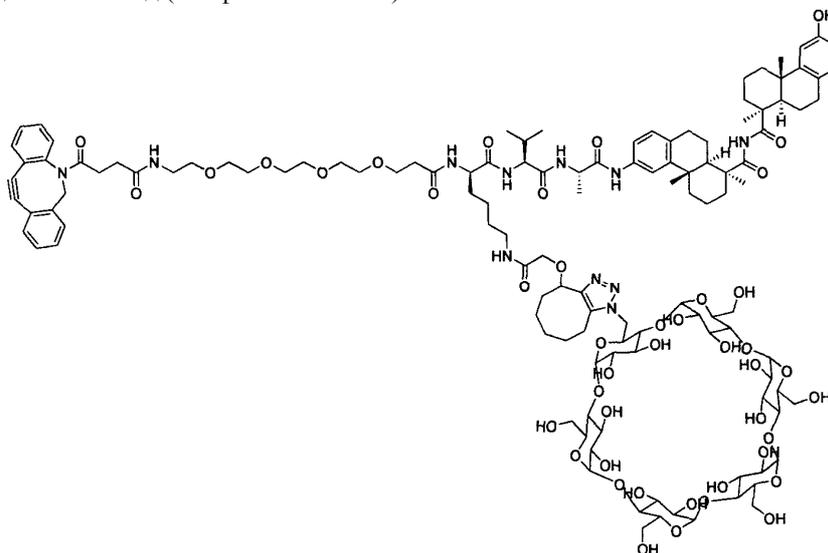
ESI масса/заряд: 1234 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, метанол-d₄) δ 7.65 (d, J=7.4 Гц, 1H), 7.62-7.51 (m, 2H), 7.48-7.28 (m, 6H), 7.27-7.21 (m, 1H), 7.00 (d, J=8.5 Гц, 1H), 6.88 (d, J=8.0 Гц, 1H), 6.72 (d, J=2.4 Гц, 1H), 6.56 (dd, J=8.3, 2.4 Гц, 1H), 5.15-5.10 (m, 1H), 4.52-4.43 (m, 1H), 4.20 (d, J=6.5 Гц, 0.5H), 4.04 (d, J=7.9 Гц, 0.5H), 3.77-3.64 (m, 3H), 3.63-3.49 (m, 12H), 3.47-3.39 (m, 2H), 3.24 (t, J=5.5 Гц, 2H), 2.99-2.66 (m, 5H), 2.57-2.42 (m, 2H), 2.42-1.94 (m, 14H), 1.76-1.63 (m, 4H), 1.48-1.21 (m, 13H), 1.14-1.10 (m, 6H), 1.05-0.97 (m, 6H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: > 99%, время удерживания: 9,21 мин (метод В). Растворимость: <0,1 мг/мл воды.

Пример 49.

Получение 1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-N-[(1R)-1-{(1S)-1-{(1S)-1-{(4bS,8S,8aR)-8-{(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-ил}формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8а,9,10-октагидрофенантрен-3-ил}карбамоил}этил}карбамоил}-2-метилпропил}карбамоил}-5-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил}метил)-1Н,4Н,5Н,6Н,7Н,8Н,9Н-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}пентил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (см. фиг. 8 и табл. 7)



ESI масса/заряд: 1261 (M/2+H)⁺.

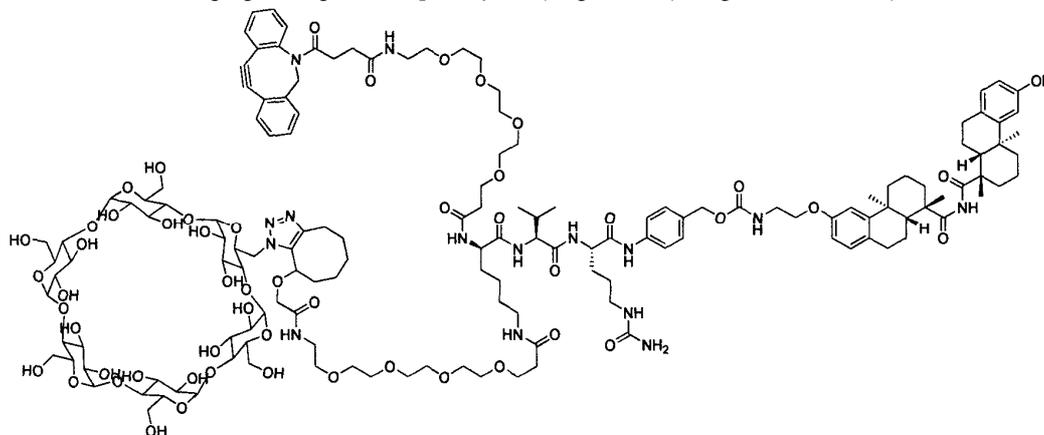
¹H ЯМР (500 МГц, метанол-d₄) δ 7.69-7.44 (m, 6H), 7.41-7.30 (m, 3H), 7.26 (d, J=6.8 Гц, 1H), 7.04-6.96 (m, 1H), 6.88 (d, J=8.4 Гц, 1H), 6.72 (d, J=1.9 Гц, 1H), 6.56 (dd, J=8.3, 2.4 Гц, 1H), 5.25-4.94 (m, 6H), 4.75-4.55 (m, 16H), 4.53-3.41 (m, 49H), 3.33-1.20 (m, 53H), 1.18-1.10 (m, 6H), 1.06-0.94 (m, 6H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: 99%, время удерживания: 6,55 мин (метод В). Растворимость: 0,05 мг/мл воды.

Пример 50.

Получение {4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-6-(1-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-

ил]метил}-1Н,4Н,5Н,6Н,7Н,8Н,9Н-циклокта[*d*][1,2,3]триазол-9-ил)окси]ацетиамидо}-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил} метил N-(2-{{(4*bS*,8*S*,8*aR*)-8-{{(1*S*,4*aS*,10*aR*)-6-гидрокси-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-ил]формаидо} карбонил)-4*b*,8-диметил-4*b*,5,6,7,8,8а,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]окси} этил)карбамат (см. фиг. 8 и табл. 7).



К раствору соединения 9*i* (25 мг, 9,9 мкмоль) и DIBAC-Suc-PEG₄-OSu 4*b* (6,8 мг, 12 мкмоль) в DMF (1 мл) добавляли триэтиламин (2,0 мг, 20 мкмоль) и смесь перемешивали, при 20-25°C в течение 16 ч. Затем реакцию считали завершённой согласно ЖХМС. Большинство летучих компонентов удаляли в вакууме и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (метод В), получая (12 мг, 39% выход) в виде белого твердого вещества.

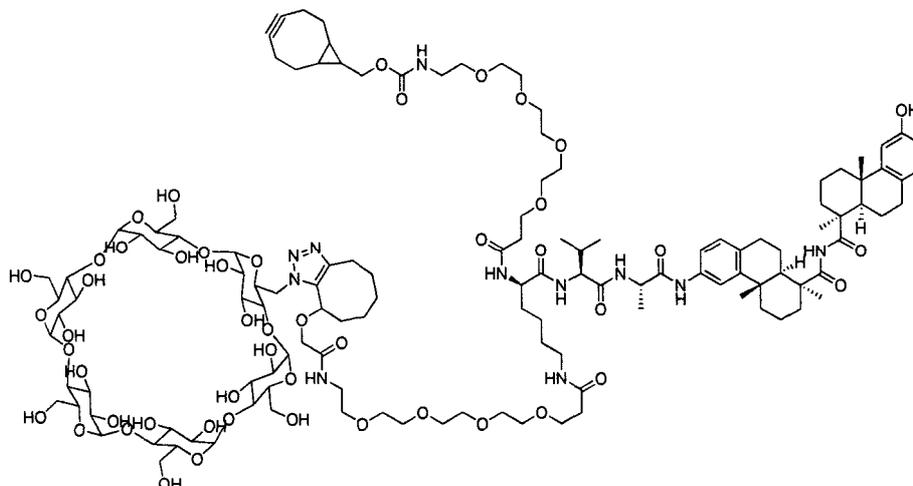
ESI масса/заряд: 1017 (M/3+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-*d*₆) δ 9.68 (s, 1H), 8.21-8.04 (m, 3H), 7.88-7.74 (m, 2H), 7.71-7.56 (m, 3H), 7.52-7.21 (m, 8H), 6.93 (d, J=8.6 Гц, 1H), 6.84-6.77 (m, 1H), 6.70-6.58 (m, 2H), 6.51 (d, J=8.1 Гц, 1H), 6.01 (s, 1H), 5.78-5.33 (m, 12H), 5.22-4.51 (m, 14H), 4.43-4.12 (m, 4H), 4.07-3.55 (m, 35H), 3.53-3.33 (m, 38H), 3.33-2.52 (m, 32H), 2.43-1.21 (m, 41H), 1.20-0.77 (m, 14H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: 96%, время удерживания: 6,68 мин (метод В). Растворимость: 0,33 мг/мл воды.

Пример 51.

Получение {бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил} метил N-(14-{{(1*R*)-1-{{(1*S*)-1-{{(1*S*)-1-{{(4*bS*,8*S*,8*aR*)-8-{{(1*S*,4*aS*,10*aR*)-6-гидрокси-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбонил]карбамоил}-4*b*,8-диметил-4*b*,5,6,7,8,8а,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил} этил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-5-(1-{{(1-{{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-1Н,4Н,5Н,6Н,7Н,8Н,9Н-циклокта[*d*][1,2,3]триазол-9-ил)окси]ацетиамидо}-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо)пентил]карбамоил}-3,6,9,12-тетраоксатетрадекан-1-ил)карбамат (см. фиг. 8 и табл. 7)



ESI масса/заряд: 1330 (M/2+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-*d*₆) δ 9.70 (br s, 0.6H), 9.28 (br s, 0.4H), 9.00 (s, 1H), 8.26-7.75 (m, 5H), 7.56-7.35 (m, 2H), 7.16-7.03 (m, 1H), 7.01-6.86 (m, 1H), 6.81 (d, J=8.3 Гц, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.50 (d, J=8.8 Гц, 1H), 5.71-5.32 (m, 12H), 4.87-4.49 (m, 12H), 4.42-3.93 (m, 8H), 3.90-3.54 (m, 25H), 3.52-3.33 (m, 28H), 3.33-2.66

(m, 17H), 2.33-1.20 (m, 58H), 1.19-0.77 (m, 21H) ppm.

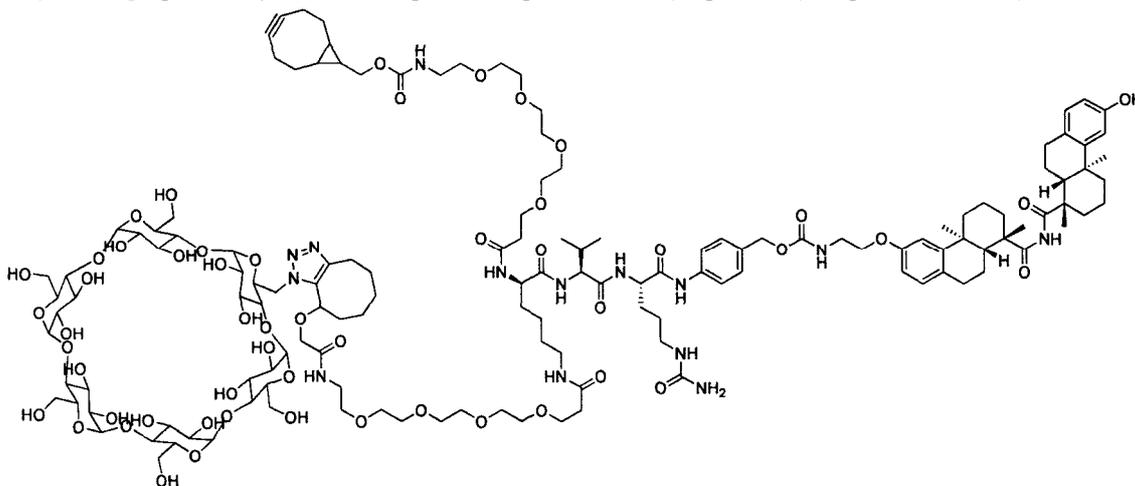
Анал. ВЭЖХ: >99%, время удерживания: 6,33 мин (метод В).

Растворимость: 0,33 мг/мл воды.

Пример 52.

Подготовлено в соответствии с фиг. 8 и табл. 7.

Получение {бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил}метил N-(14-{{(1R)-1-{{(1S)-1-{{(1S)-1-{{(2-{{(4b5,8S,8aR)-8-{{(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-ил}формаидо} карбонил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8а,9,10-октагидрофенантрен-3-ил}окси} этил}карбамоил}окси} метил}фенил}карбамоил}-4-(карбамоиламино)бутил}карбамоил}-2-метилпропил}карбамоил}-5-(1-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]}дотетраконтан-5-ил}метил}-1Н,4Н,5Н,6Н,7Н,8Н,9Н-циклоокта[d][1,2,3]триазол-9-ил)окси]ацетаидо}-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо)пентил}карбамоил}-3,6,9,12-тетраоксатетрадекан-1-ил}карбамат (см. фиг. 8 и табл. 7)



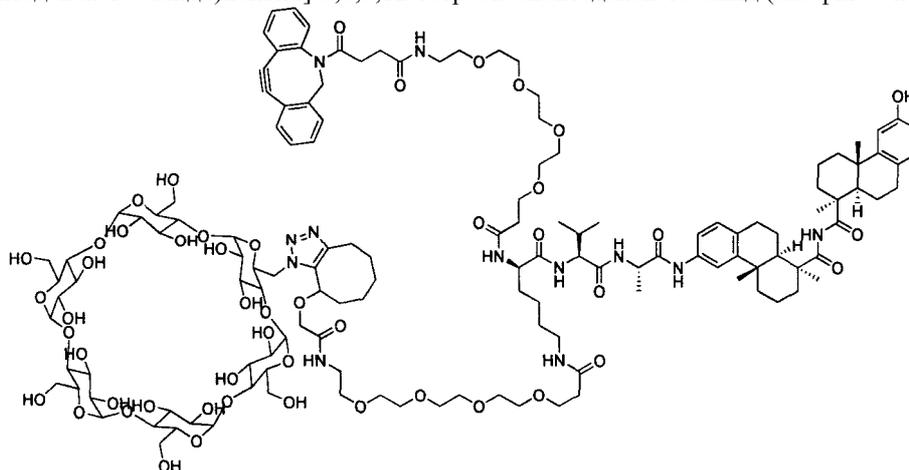
ESI масса/заряд: 1470 (M/2+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 9.68 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.21-8.03 (m, 2H), 7.62 (d, J=8.4 Гц, 2H), 7.27 (d, J=8.3 Гц, 2H) 6.93 (d, J=8.8 Гц, 1H) 6.81 (d, J=8.4 Гц, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.67 (d, J=8.6 Гц, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.50 (d, J=7.9 Гц, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.64-5.37 (m, 12H), 5.14 (s, 1H), 5.00-4.50 (m, 13H), 4.38-4.29 (m, 3H), 4.20-4.13 (m, 1H), 4.09-3.97 (m, 10H), 3.95-3.89 (m, 2H), 3.86-3.54 (m, 23H), 3.52-3.33 (m, 28H), 3.16-2.61 (m, 17H), 2.45-1.20 (m, 66H), 1.18-0.80 (m, 21H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: >99%, время удерживания: 6,62 мин (метод В). Растворимость: 0,29 мг/мл воды.

Пример 53.

Получение 1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ин}-4-оксобутанаидо)-N-[(1R)-1-{{(1S)-1-{{(1S)-1-{{(4bS,8S,8aR)-8-{{(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбонил}карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8а,9,10-октагидрофенантрен-3-ил}карбамоил} этил}карбамоил}-2-метилпропил}карбамоил}-5-(1-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]}дотетраконтан-5-ил}метил}-1Н,4Н,5Н,6Н,7Н,8Н,9Н-циклоокта[d][1,2,3]триазол-9-ил)окси]ацетаидо}-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо)пентил}-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (см. фиг. 8 и табл. 7)



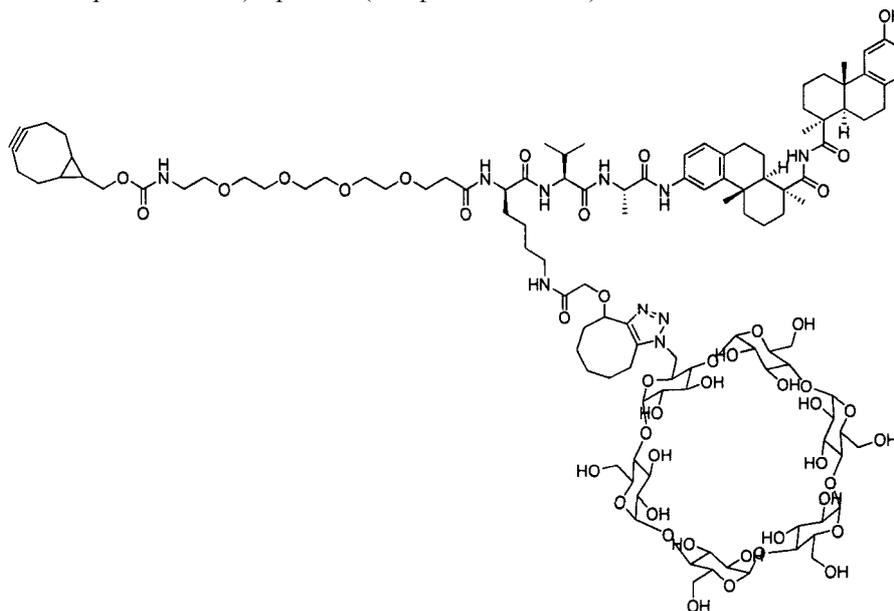
ESI масса/заряд: 1385.9 (M/2+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 9.71 (br s, 0.6H), 9.30 (brs, 0.4H), 9.01 (s, 1H), 8.29-7.99 (m, 4H), 7.89-7.76 (m, 3H), 7.74-7.60 (m, 2H), 7.58-7.27 (m, 7H), 7.01-6.92 (m, 1H), 6.82 (d, J=8.1 Гц, 1H), 6.68-6.48 (m, 2H), 5.71-5.45 (m, 12H), 5.17-4.69 (m, 2H), 4.90-4.50 (m, 12H), 4.44-3.54 (m, 33H), 3.54-3.41 (m, 38H), 3.33-2.54 (m, 15H), 2.43-1.19 (m, 44H), 1.18-0.66 (m, 18H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: 98%, время удерживания: 6,42 мин (метод В). Растворимость: 0,18 мг/мл воды.

Пример 54.

Получение {бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил}метил N-(14-{{(1R)-1-{{(1S)-1-{{(1S)-1-{{(4bS,8S,8aR)-8-{{(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4а-диметил-1,2,3,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбонил}карбамоил}-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8а,9,10-октагидрофенантрен-3-ил}карбамоил}этил}карбамоил}-2-метилпропил}карбамоил}-5-(1-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил}метил}-1Н,4Н,5Н,6Н,7Н,8Н,9Н-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетиамидо}пентил}карбамоил}-3,6,9,12-тетраоксатетрадекан-1-ил)карбамат (см. фиг. 8 и табл. 7)



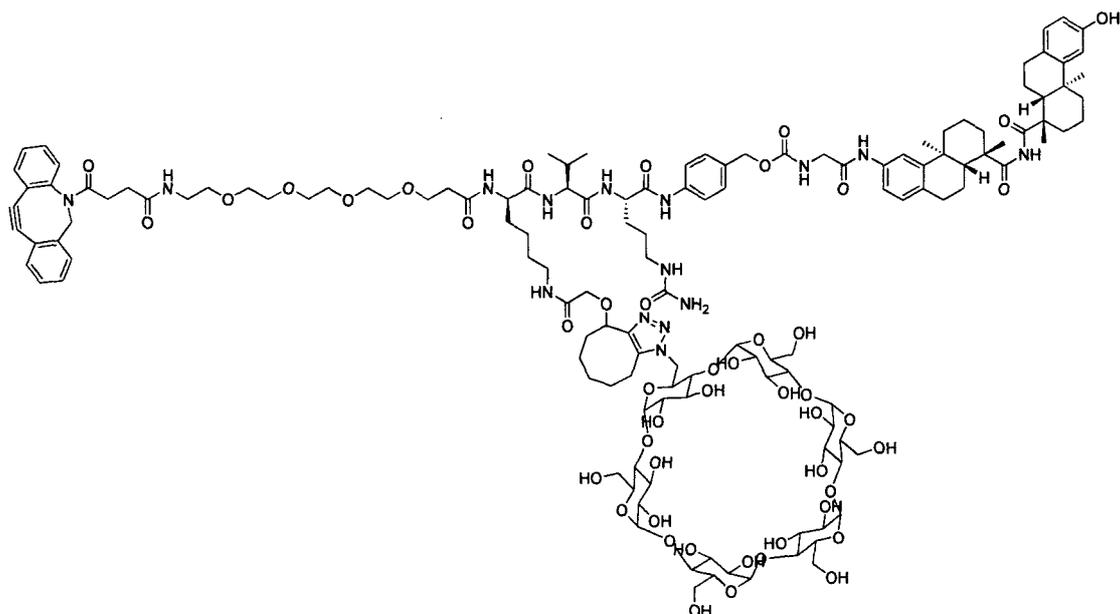
ESI масса/заряд: 1207 (M/2+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, метанол-d₄) δ 7.62 (s, 1H) 7.39 (d, J=8.2 Гц, 1H), 7.03 (d, J=8.4 Гц, 1H), 6.89 (d, J=8.3 Гц, 1H), 6.72 (d, J=2.3 Гц, 1H), 6.56 (dd, J=8.2, 2.4 Гц, 1H), 5.21 (t, J=2.8 Гц, 1H), 4.99-4.95 (m, 4H), 4.65-3.43 (m, 57H), 3.31-2.74 (m, 11H), 2.55-1.22 (m, 55H), 1.16 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.06-0.87 (m, 9H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: >99%, время удерживания: 6,37 мин (метод В).

Пример 55.

Получение 1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-N-[(1R)-1-{{(1S)-1-{{(1S)-1-{{(4bS,8S,8aR)-8-({(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4а-диметил-1,2,3,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-ил}формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8а,9,10-октагидрофенантрен-3-ил}карбамоил}этил}карбамоил}-2-метилпропил}карбамоил}-5-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил}метил}-1Н,4Н,5Н,6Н,7Н,8Н,9Н-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетиамидо}пентил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (см. фиг. 8 и табл. 7)



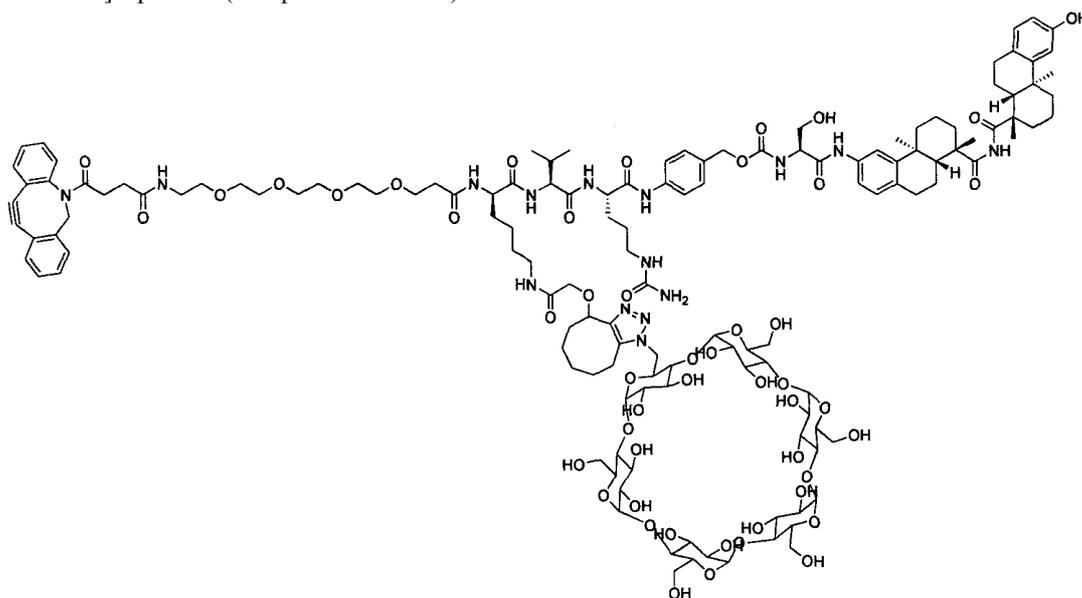
ESI масса/заряд: 1409 (M/2+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 9.79 (s, 1H), 9.68 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.24-8.05 (m, 3H), 7.86-7.73 (m, 2H), 7.71-7.58 (m, 3H), 7.54-7.42 (m, 4H), 7.42-7.25 (m, 5H), 6.96 (d, J=8.5 Гц, 1H), 6.81 (d, J=8.4 Гц, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.57-6.45 (m, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.69-5.31 (m, 12H), 5.17-4.49 (m, 14H), 4.39-3.95 (m, 5H), 3.90-3.51 (m, 25H), 3.50-3.33 (m, 32H), 3.33-2.53 (m, 21H), 2.44-1.20 (m, 41H), 1.21-0.77 (m, 16H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: 99%, время удерживания: 6,33 и 6,44 мин (метод В).

Пример 56.

Получение {4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетраоктан-5-ил}метил}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклокта[d][1,2,3]триазол-9-ил)окси]ацетиламино}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-[(1S)-1-[[{(4bS,8S,8aR)-8-[[{(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамино}карбонил]-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил]-2-гидроксиэтил]карбамат (см. фиг. 8 и табл. 7).



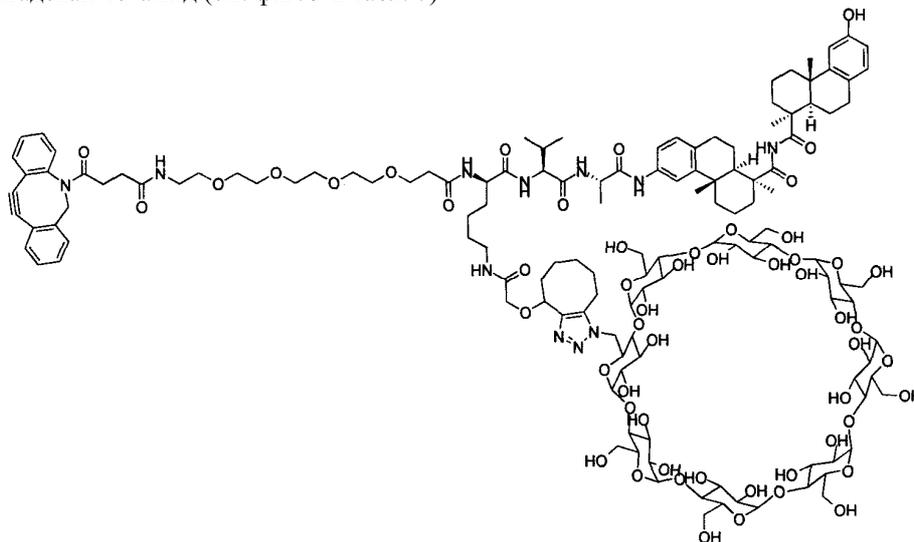
ESI масса/заряд: 1424.3 (M/2+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 9.81 (s, 1H), 9.65 (s, 1H), 8.97 (s, 1H), 8.28-8.04 (m, 3H), 7.91-7.73 (m, 2H), 7.73-7.16 (m, 12H), 6.95 (d, J=8.8 Гц, 1H), 6.81 (d, J=7.8 Гц, 1H), 6.73-6.59 (m, 1H), 6.59-6.44 (m, 1H), 5.98 (s, 1H), 5.71-5.27 (m, 12H), 5.23-4.48 (m, 14H), 4.43-3.93 (m, 5H), 4.09-3.50 (m, 24H), 3.51-3.33 (m, 31H), 3.33-2.53 (m, 17H), 2.42-1.08 (m, 51H), 1.06-0.67 (m, 14H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: >99%, время удерживания: 6,11 и 6,21 мин (метод В). Растворимость: <0,1 мг/мл воды.

Пример 57.

Получение 1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0+]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-N-[(1R)-1-{[(1S)-1-{[(1S)-1-{(4bS,8S,8aR)-8-({[(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо} карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамоил} этил]карбамоил}-2-метилпропил]карбамоил}-5-{2-[(1-{41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56-гексадекагидрокси-10,15,20,25,30,35,40-гептакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29,32,34,37,39-гексадекаоксонацикло[36.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}.2^{28,31}.2^{33,36}]гексапентаконтан-5-ил]метил}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетиамидо} пентил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (см. фиг. 9 и табл. 7)



$C_{136}H_{195}N_{11}O_{54}$, точная масса: 2846,3.

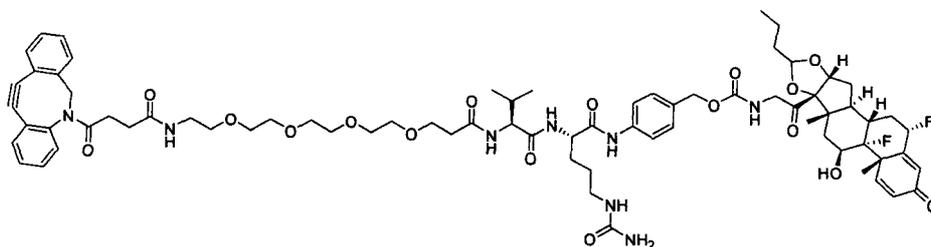
ESI масса/заряд: 1424.2 ($M/2+H$)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 9.26 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.24-7.98 (m, 4H), 7.81 (d, J=5.6 Гц, 1H), 7.72 (t, J=5.5 Гц, 1H), 7.67 (d, J=8.1 Гц, 1H), 7.61 (d, J=7.4 Гц, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.53-7.25 (m, 7H), 6.95 (d, J=8.5 Гц, 1H), 6.81 (d, J=8.4 Гц, 1H), 6.63 (d, J=2.1 Hz, 1H), 6.50 (dd, J=8.2, 2.1 Гц, 1H), 5.94-5.58 (m, 15H), 5.39-4.43 (m, 17H), 4.37-4.24 (m, 3H), 4.13-4.08 (m, 1H), 3.98-3.33 (m, 52H), 3.26-2.52 (m, 18H), 2.40-1.18 (m, 48H), 1.18-0.63 (m, 19H) ppm.

Пример 58.

Подготовлено в соответствии с фиг. 8 и табл. 7.

4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил]метил N-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил} карбамат



$C_{74}H_{94}F_2N_8O_{17}$, точная масса: 1404,7

ESI масса/заряд: 1406 ($M+H$)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 9.99 (s, 1H), 8.11 (d, J=7.5 Гц, 1H), 7.88 (d, J=8.5 Гц, 1H), 7.80-7.75 (m, 1H), 7.70-7.66 (m, 1H), 7.65-7.60 (m, 3H), 7.53-7.33 (m, 6H), 7.33-7.28 (m, 3H), 6.30 (dd, J=10.0 Гц, 1.5 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.10-6.00 (m, 1H), 5.72-5.55 (m, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.05-5.01 (m, 1H), 4.97 (s, 2H), 4.80-4.72 (m, 1H), 4.60-4.58 (m, 1H), 4.43-4.33 (m, 1H), 4.25-4.10 (m, 3H), 3.88-3.80 (m, 1H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 12H), 3.30-3.25 (m, 2H), 3.12-2.90 (m, 4H), 2.70-2.55 (m, 2H), 2.48-2.35 (m, 2H), 2.30-2.20 (m, 2H), 2.15-1.95 (m, 4H), 1.86-1.65 (m, 3H), 1.64-1.54 (m, 5H), 1.49 (s, 4H), 1.46-1.34 (m, 5H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm.

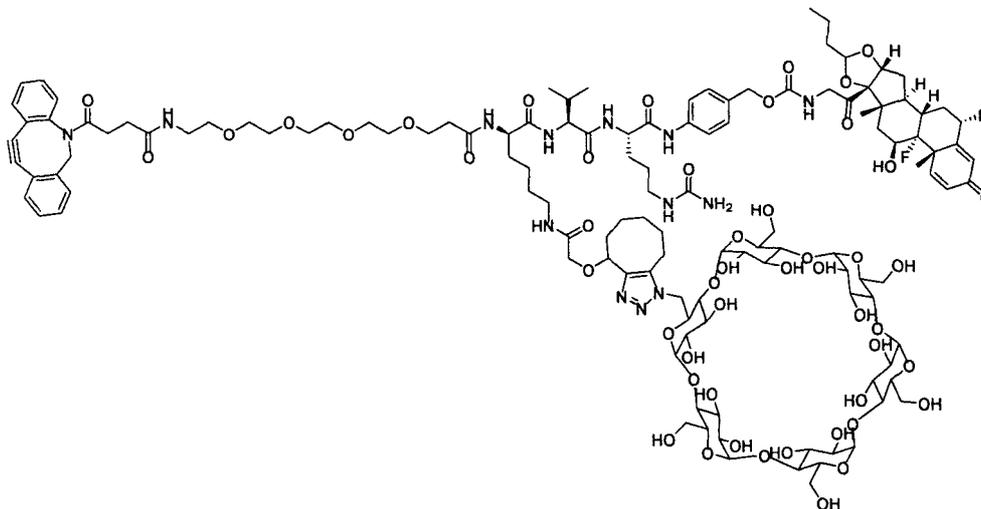
Анал. ВЭЖХ: 100%, время удерживания: 7,40 мин (метод В).

Растворимость: 0,02 мг/мл воды.

Пример 59.

Подготовлено в соответствии с фиг. 8 и табл. 7.

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутаноидо)-3,6,9,12-тетраоксопентадекан-15-амидо]-6-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6,2}.2^{8,11,2}.2^{13,16,2}.2^{18,21,2}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-1Н,4Н,5Н,6Н,7Н,8Н,9Н-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетиамидо}гексанамидо]-3-метилбутаноидо]-5-(карбамоиламино)пентаноидо]фенил}метил N-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диокапентацикло[10.8.0.0^{2,9,0}.0^{4,8,0}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил}карбамат



C₁₂₆H₁₇₇F₂N₁₃O₄₉, точная масса: 2694,2.

ESI масса/заряд: 1349 (M+H)⁺.

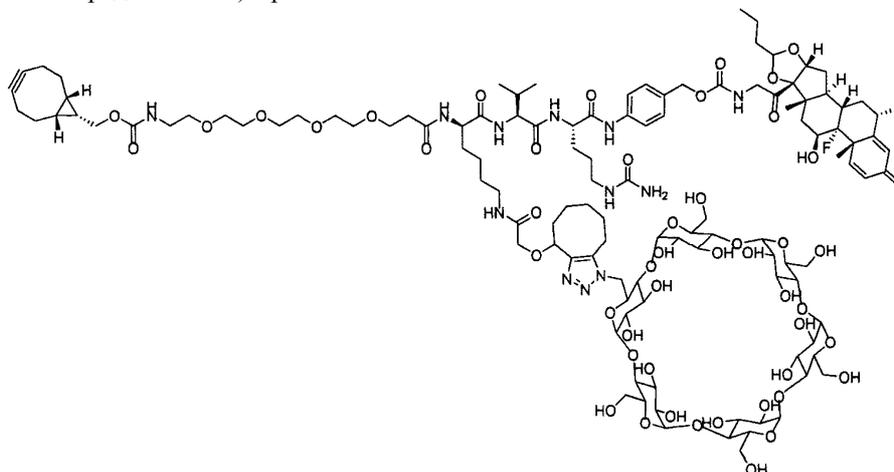
¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 9.71 (s, 1H), 8.30-8.00 (m, 3H), 8.00-7.74 (m, 2H), 7.70-7.58 (m, 5H), 7.52-7.20 (m, 12H), 6.35-6.20 (m, 2H), 6.15-5.85 (m, 3H), 5.80-5.35 (m, 18H), 5.25-4.90 (m, 6H), 4.90-4.50 (m, 14H), 4.40-4.25 (m, 4H), 4.25-4.10 (m, 3H), 4.10-3.95 (m, 2H), 3.95-3.55 (m, 22H), 3.55-3.40 (m, 22H), 3.20-3.00 (m, 6H), 3.00-2.85 (m, 3H), 2.65-2.55 (m, 1H), 2.25-2.20 (m, 4H), 2.10-1.95 (m, 6H), 1.80-1.70 (m, 5H), 1.70-1.50 (m, 10H), 1.50-1.45 (m, 9H), 0.90-0.80 (m, 14H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: 100%, время удерживания: 6,23 мин (метод В). Растворимость: 0,026 мг/мл воды.

Пример 60.

Подготовлено в соответствии с фиг. 8 и табл. 7.

(1R,8S,9S)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил метил N-(14-{[(1R)-1-[(1S)-1-[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-(4-{[(2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диокапентацикло[10.8.0.0^{2,9,0}.0^{4,8,0}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил}карбамоил)окси]метил}фенил)карбамоил]бутил}карбамоил}-2-метилпропил}карбамоил}-5-{2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6,2}.2^{8,11,2}.2^{13,16,2}.2^{18,21,2}.2^{23,26}]дотетраконтан-5-ил]метил}-1Н,4Н,5Н,6Н,7Н,8Н,9Н-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетиамидо]пентил}карбамоил}-3,6,9,12-тетраоксатетрадекан-1-ил)карбамат



C₁₁₈H₁₇₆F₂N₁₂O₄₉, точная масса: 2583,2.

ESI масса/заряд: 1292,8 (M/2+1)⁺.

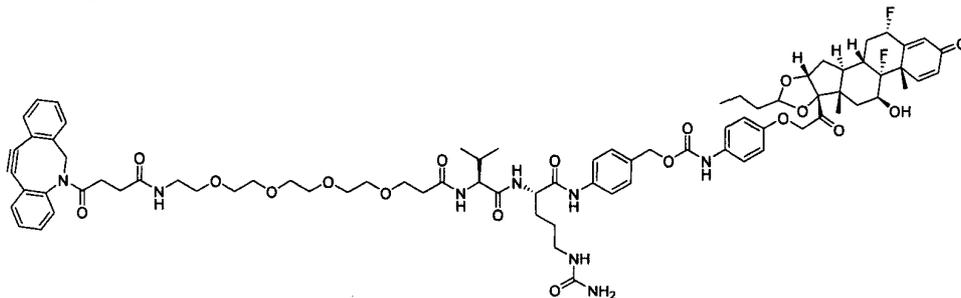
¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 9.68 (s, 1H), 8.14-7.08 (m, 11H), 6.30 (d, J=10.0 Гц, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.67-5.31 (m, 15H), 5.21-3.33 (m, 61H), 3.13-2.60 (m, 22H), 2.30-1.96 (m, 46H), 0.95-0.80 (m, 17H) ppm.

Анал. ВЭЖХ (с изомерами триазольного региона): 48%, время удерживания: 7,31 мин и 52%, время удерживания: 7,41 мин (метод В).

Пример 61.

Подготовлено в соответствии с фиг. 8 и табл. 7.

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]}гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил]-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]}икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}фенил)карбамат



C₈₀H₉₈F₂N₈O₁₈, точная масса: 1496,7

ESI масса/заряд: 1499 (M+H)⁺.

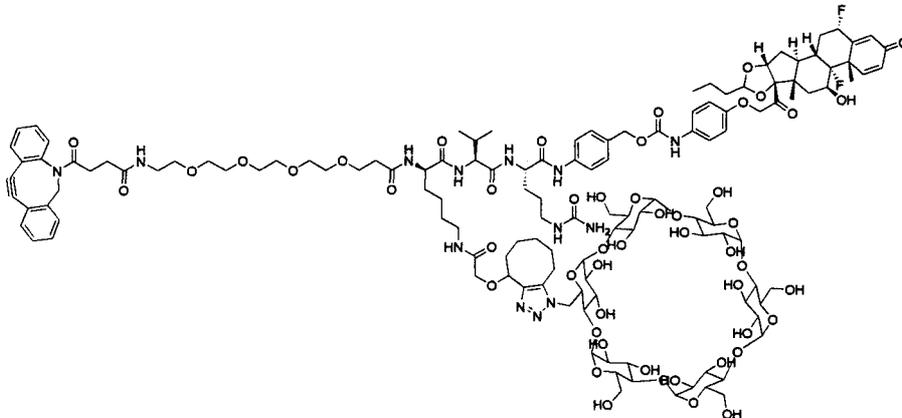
¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 10.02 (s, 1H), 9.59 (s, 1H), 8.14 (d, J=7.6 Гц, 1H), 7.88 (d, J=8.8 Гц, 1H), 7.80-7.75 (m, 1H), 7.70-7.66 (m, 1H), 7.65-7.60 (m, 3H), 7.53-7.45 (m, 3H), 7.40-7.28 (m, 7H), 6.84 (d, J=9.2 Гц, 2H), 6.30 (dd, J=10.4 Гц, 1.6 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.10-6.00 (m, 1H), 5.72-5.55 (m, 1H), 5.52 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.16-5.05 (m, 4H), 4.88-4.70 (m, 3H), 4.43-4.33 (m, 1H), 4.25-4.20 (m, 2H), 3.65-3.55 (m, 3H), 3.50-3.40 (m, 12H), 3.30-3.25 (m, 2H), 3.12-2.90 (m, 4H), 2.70-2.55 (m, 2H), 2.48-2.43 (m, 1H), 2.40-2.35 (m, 1H), 2.30-2.20 (m, 2H), 2.15-1.95 (m, 4H), 1.86-1.75 (m, 2H), 1.64-1.54 (m, 5H), 1.49 (s, 4H), 1.46-1.34 (m, 4H), 1.23 (s, 2H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm.

Анал. ВЭЖХ: 100%, время удерживания: 7,99 мин (метод В). Растворимость: <0,01 мг/мл воды.

Пример 62.

Подготовлено в соответствии с фиг. 8 и табл. 7.

{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(2R)-2-[1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]}гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил]-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксопентадекан-15-амидо]-6-2-[(1-{[31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]}дотетраконтан-5-ил]метил}-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}гексанамидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил N-(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]}икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}фенил)карбамат



C₁₃₂H₁₈₁F₂N₁₃O₅₀, точная масса: 2786,2.

ESI масса/заряд: 1394 (M/2+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 9.67 (s, 1H), 9.56 (s, 1H), 8.20-8.05 (m, 2H), 7.85-7.70 (m, 2H), 7.70-7.60 (m, 4H), 7.50-7.25 (m, 12H), 6.90-6.80 (m, 2H), 6.30 (d, J=12.5 Гц, 1H), 6.11 (s, 1H), 6.0 (s, 1H), 5.80-

5.35 (m, 16H), 5.25-5.00 (m, 6H), 4.90-4.65 (m, 10H), 4.65-4.45 (m, 4H), 4.40-4.00 (m, 6H), 3.95-3.55 (m, 22H), 3.50-3.30 (m, 22H), 3.20-2.85 (m, 12H), 2.65-2.55 (m, 2H), 2.45-2.35 (m, 2H), 2.35-2.20 (m, 3H), 2.15-1.95 (m, 5H), 1.90-1.70 (m, 4H), 1.70-1.50 (m, 10H), 1.50-1.00 (m, 18H), 0.90-0.80 (m, 12H) ppm.

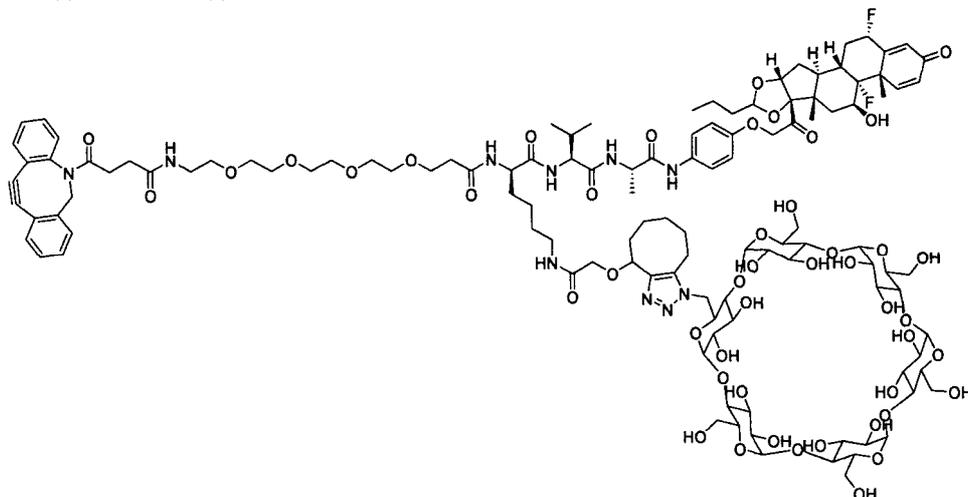
Анал. ВЭЖХ (с изомерами триазольного региона): 82%, время удерживания: 7,93 мин и 18%, время удерживания: 8,02 мин (метод В).

Растворимость: 0,02 мг/мл воды.

Пример 63.

Подготовлено в соответствии с фиг. 8 и табл. 7.

1-(4-{2-азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-N-[(1R)-1-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[(4-{2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтокси}фенил)карбамоил]этил]карбамоил]-2-метилпропил]карбамоил]-5-{2-[(1-{31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42-додекагидрокси-10,15,20,25,30-пентакис(гидроксиметил)-2,4,7,9,12,14,17,19,22,24,27,29-додекаоксагептацикло[26.2.2.2^{3,6}.2^{8,11}.2^{13,16}.2^{18,21}.2^{23,26}]дотетрактан-5-ил]метил]-1H,4H,5H,6H,7H,8H,9H-циклоокта[d][1,2,3]триазол-4-ил)окси]ацетамидо}пентил]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид



К раствору соединения 9L (19 мг, 9,4 мкмоль) в DMF (2 мл) добавляли DIBAC-Suc-PEG₄-OSu 4b (7,0 мг, 11 мкмоль) и DIPEA (2,3 мг, 18 мкмоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи полученную смесь непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (метод В), получая Ex 105 (7 мг, выход 29%) в виде белого твердого вещества.

C₁₂₁H₁₆₈F₂N₁₀O₄₇, точная масса: 2551,1.

ESI масса/заряд: 1276.8 (M/2+H)⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9.80-9.47 (m, 1H), 8.23-7.91 (m, 3H), 7.83-7.11 (m, 13H), 6.87-6.66 (m, 2H), 6.32-6.11 (m, 2H), 5.85-5.23 (m, 14H), 5.14-5.01 (m, 3H), 4.86-3.99 (m, 19H), 3.85-3.40 (m, 38H), 3.27-2.87 (m, 13H), 2.76-2.55 (m, 3H), 2.33-2.20 (m, 4H), 2.12-1.91 (m, 6H), 1.83-1.72 (m, 4H), 1.59-0.98 (m, 31H), 0.89-0.84 (m, 12H) ppm.

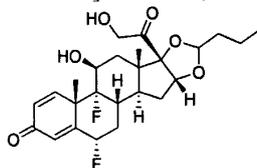
Анал. ВЭЖХ: 100%, время удерживания: 7,76 мин (метод В).

Пример 64.

Синтез полезных нагрузок 1h и 1i, см. фиг. 1B.

Стероидные полезные нагрузки 1h и 1i готовили по схеме 1, начиная с коммерческого флуоцинолона ацетонида P2 (CAS: 67-73-2). Соединение P3, полученное из P2 путем кетального обмена с бутиральдегидом в присутствии хлорной кислоты, было превращено в мезилат P4 с последующей заменой мезилатной группы азидным фрагментом с образованием P5, который затем восстанавливался до амина 1h. В противном случае мезилатный фрагмент в P4 также был заменен 4-аминофенолом с получением анилина 1i.

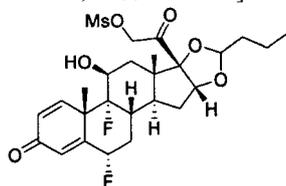
(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-8-(2-гидроксиацетил)-9,13-диметил-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-16-он (P3)



К смеси флуоцинолона ацетонида (P2, 0,90 г, 2,0 ммоль) и силикагеля (18 г) в гептанах (90 мл) добавляли бутиральдегид (0,27 мл, 3,0 ммоль) при 10 °С и суспензию перемешивали при 10-20°С в течение примерно 10 мин. К смеси по каплям добавляли хлорную кислоту (70%, 0,68 мл, 8,3 ммоль) при 0°С. За-

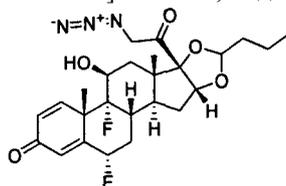
тем реакционную смесь перемешивали при 10-20°C в течение ночи. Большая часть флуоцинолона ацетонида P2 потреблялась в соответствии с ТСХ и ЖХМС. Реакционную смесь разбавляли петролевым эфиром и гасили насыщенным водным раствором Na₂CO₃. Суспензию фильтровали и твердое вещество промывали смесью DCM/метанол (об./об.=1). Объединенный фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали флэш-хроматографией на силикагеле (0-100% этилацетат в петролеинном эфире), получая соединение P3 (0,15 г, 16% выход) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 467.1 (M+H)⁺.

2-[(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-16-оксо-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-8-ил]-2-оксоэтил метансульфонат (P4)



К раствору соединения P3 (0,28 г, 0,65 ммоль) и триэтиламина (0,13 г, 1,3 ммоль) в DCM (3 мл) добавляли метансульфонилхлорид (89 мг, 0,78 ммоль) при 0°C. После перемешивания при 0°C в течение 0,5 ч реакционную смесь разбавляли DCM (20 мл). Смесь промывали водой (20 мл × 2), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле на силикагеле (0-50% этилацетата в петролеинном эфире), получая соединение P4 (0,26 г, выход > 99%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 545 (M+H)⁺.

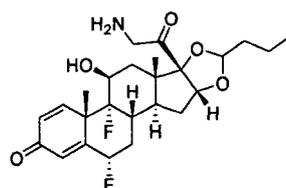
(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-(2-азидоацетил)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-16-он (P5)



Суспензию соединения P4 (1,0 г, 1,8 ммоль) и азид натрия (1,2 г, 18 ммоль) в ацетоне (15 мл) перемешивали при 50°C в течение ночи. Смесь охлаждали до комнатной температуры и выливали в воду (80 мл). Водную смесь экстрагировали этилацетатом (50 мл × 3). Объединенный органический слой промывают рассолом (30 мл), сушат над безводным Na₂SO₄, фильтруют и концентрируют в вакууме, получая неочищенное соединение P5 (0,90 г, выход > 99%) в виде желтого твердого вещества, которое используют на следующей стадии без дальнейшего очищения. ESI масса/заряд: 492 (M+H)⁺.

Полезная нагрузка 1h.

(1S,2S,4R,6R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-(2-аминоацетил)-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-16-он; соль трифторуксусной кислоты (1h)

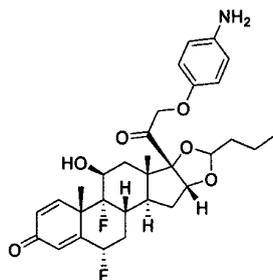


К раствору соединения P5 (0,85 г, 1,7 ммоль) в THF (20 мл) добавляли водный гидрохлорид (1 N, 10 мл). Смесь перемешивали при 28-32°C до тех пор, пока она не становилась прозрачной, к смеси затем добавляли трифенилфосфин (0,68 г, 2,6 ммоль). Полученный желтый прозрачный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Смесь концентрировали в вакууме и остаток очищали флэш-хроматографией с обращенной фазой (0-50% ацетонитрила в водн. TFA (0,05%)), что дает соединение 1h (0,56 г, выход 57%, соль TFA) в виде не совсем белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 466 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD-d₄) δ 7.33 (d, J=9.9 Гц, 1H), 6.40-6.29 (m, 2H), 5.69-5.45 (m, 1H), 4.93-4.92 (m, 1H), 4.71 (t, J=4.3 Гц, 1H), 4.35-4.27 (m, 2H), 3.90-3.84 (m, 1H), 2.81-2.54 (m, 1H), 2.42-2.06 (m, 3H), 1.82-1.32 (m, 11H), 1.09-0.87 (m, 6H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, CD₃OD) δ -77.01, -166.24, -166.92, -188.81, -188.83 ppm. Анал. ВЭЖХ: 100%, время удерживания: 6,86 мин (метод А).

Полезная нагрузка 1i.

(1S,2S,4R,8S,9S,11S,12R,13S,19S)-8-[2-(4-аминофенокси)ацетил]-12,19-дифтор-11-гидрокси-9,13-диметил-6-пропил-5,7-диоксапентацикло[10.8.0.0^{2,9}.0^{4,8}.0^{13,18}]икоса-14,17-диен-16-он (1i)

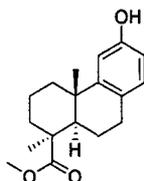


Смесь соединения P4 (93 мг, 0,17 ммоль), 4-аминофенола (37 мг, 0,34 ммоль) и карбоната цезия (0,11 г, 0,34 ммоль) в ацетоне (0,5 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 2 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли H₂O (10 мл). Смесь экстрагировали этилацетатом (10 мл × 3). Объединенный органический слой промывали водой (20 мл) и солевым раствором (20 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ с получением полезной нагрузки 1i (6,0 мг, выход 6,3%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 298 (M/2+H)⁺, 558 (M+H)⁺ (10%).

¹H ЯМР (500 МГц, MeOD-d₄) δ 7.34 (d, J=10.0 Гц, 1H), 6.78-6.71 (m, 4H), 6.37-6.33 (m, 2H), 5.63-5.49 (m, 1H), 5.10-4.99 (m, 1H), 4.77-4.63 (m, 2H), 4.33 (d, J=9.1 Гц, 1H), 2.74-2.57 (m, 1H), 2.39-2.13 (m, 3H), 1.98-1.31 (m, 12H), 1.03-0.93 (m, 6H) ppm. Анал. ВЭЖХ: чистота 97,4%, время удерживания: 7,55 мин (метод В).

Синтез полезной нагрузки 1d, см. фиг. 1С

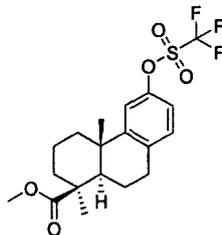
Метил (1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (P7)



К раствору подокарпиновой кислоты (P6, 90 г, 0,33 моль) в метаноле (200 мл) и толуоле (600 мл) добавляли (триметилсилил)дiazометан (2 М в гексане, 200 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Подокарповая кислота была затем полностью израсходована в соответствии с ЖХМС. Летучие вещества удаляли в вакууме и остаток растирали с петролевым эфиром (2 л), получая соединение P7 (91 г, выход 96%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 289 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8.95 (s, 1H), 6.79 (d, J=8.2 Гц, 1H), 6.63 (d, J=2.4 Гц, 1H), 6.48 (dd, J=8.2, 2.4 Гц, 1H), 3.58 (s, 3H), 2.80-2.55 (m, 2H), 2.20-2.02 (m, 3H), 1.96-1.71 (m, 2H), 1.56-1.45 (m, 2H), 1.27 (t, J=13.5 Гц, 1H), 1.21 (s, 3H), 1.09 (td, J=13.5, 4.1 Гц, 1H), 0.91 (s, 3H) ppm.

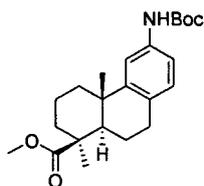
Метил (1S,4aS,10aR)-1,4а-диметил-6-(трифторметансульфонилокси)-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (P8)



К раствору соединения P7 (10 г, 35 ммоль) в метилхлориде (200 мл) добавляли пиридин (3,3 г, 42 ммоль) и DMAP (0,84 г, 6,9 ммоль) в атмосфере азота. Смесь охлаждали до -78°C и добавляли трифлюоридный ангидрид (12 г, 42 ммоль), и полученной смеси давали нагреться до 25°C и перемешивали при 25°C в течение еще 4 ч. Реакционную смесь разбавляли DCM (500 мл), промывали водой (100 мл), водн. гидрохлорида (1н., 150 мл) и рассола (100 мл), сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме, получая неочищенное соединение P8 (14 г, выход сырого продукта 97%) в виде вязкого масла, которое является достаточно чистым для следующей стадии. Неочищенное соединение P8 может быть очищено флэш-хроматографией (0-10% этилацетат в петролевом эфире) с получением чистого продукта в виде вязкого масла. ESI масса/заряд: 421.2 (M+1)⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7.12 (d, J=2.5 Гц, 1H), 7.10 (d, J=8.5 Гц, 1H), 6.97 (dd, J=8.5, 2.5 Гц, 1H), 3.67 (s, J=3.4 Гц, 3H), 2.93 (dd, J=17.2, 4.4 Гц, 1H), 2.85-2.71 (m, 1H), 2.29 (d, J=13.5 Гц, 1H), 2.25-2.14 (m, 2H), 2.03-1.89 (m, 2H), 1.71-1.61 (m, 1H), 1.56-1.48 (m, 1H), 1.40 (td, J=13.4, 4.2 Гц, 1H), 1.30-1.22 (m, 3H), 1.09 (td, J=13.6, 4.2 Гц, 1H), 1.02 (s, 3H) ppm.

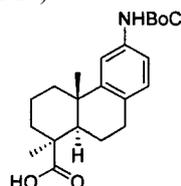
Метил (1S,4aS,10aR)-6-((трет-бутоксикарбонил)амино)-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (P9)



К раствору соединения P8 (14 г, 34 ммоль) и трет-бутилкарбамата (BoCNH_2 , 7,9 г, 68 ммоль) в трет-бутаноле (100 мл) последовательно добавляли карбонат цезия (22 г, 68 ммоль), трис(дибензилиденацетон)дипалладий(0) ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$), 1,8 г, 2,0 ммоль) и X-Phos (1,8 г, 4,0 ммоль) при комнатной температуре. Смесь дегазировали и заполняли аргоном 3 раза, а затем перемешивали при 80°C в атмосфере аргона (баллон) в течение ночи до полного расходования соединения P8, которое контролировали с помощью ТСХ. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли этилацетатом и фильтровали через целит. Твердое вещество промывали этилацетатом 3 раза. Объединенный фильтрат концентрировали в вакууме и остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-6,25% этилацетат в петролейном эфире) с получением соединения P9 (11 г, выход 82%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 410 ($\text{M}+23$)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ 9.07 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.13 (d, $J=8.5$ Гц, 1H), 6.87 (d, $J=8.3$ Гц, 1H), 3.59 (s, 3H), 2.76 (dd, $J=16.4, 4.5$ Гц, 1H), 2.70-2.61 (m, 1H), 2.16-2.05 (m, 3H), 2.00-1.75 (m, 2H), 1.65-1.50 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.31-1.25 (m, 1H), 1.21 (s, 3H), 1.10 (td, $J=13.5, 4.1$ Гц, 1H), 0.92 (s, 3H) ppm.

(1S,4aS,10aR)-6-[[трет-бутоксикарбонил]амино]-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбоновая кислота (P10)



К раствору соединения P9 (4,9 г, 13 ммоль) в DMSO добавляли трет-бутоксид калия (15 г, 0,13 моль) одной порцией при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при 60°C в течение 3 ч в атмосфере аргона до тех пор, пока реакция не была завершена в соответствии с ЖХМС. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь выливают в лед и медленно подкисляют водным раствором гидрохлорида (0,5 М) до pH 5, в течение которого температуре не позволялось превышать 25°C . Осадки собирали фильтрацией, несколько раз промывали водой. Неочищенный продукт дополнительно очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-20% этилацетат в петролейном эфире), получая соединение P10 (4,5 г, выход 93%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 318 ($\text{M}-55$)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ 12.08 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.87 (d, $J=8.3$ Гц, 1H), 2.79-2.68 (m, 1H), 2.65 (d, $J=12.6$ Гц, 1H), 2.17-2.03 (m, 4H), 1.94-1.76 (m, 2H), 1.53 (d, $J=13.7$ Гц, 1H), 1.46 (d, $J=7.4$ Гц, 9H), 1.29-1.14 (m, 5H), 1.04 (s, 3H) ppm.

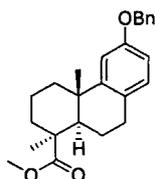
трет-бутил N-[(4bS,8S,8aR)-8-карбамоил-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (P11)



К раствору P10 (4,5 г, 12 ммоль) и NATU (4,9 г, 13 ммоль) в DMF (50 мл) добавляли диизопропилэтиламин (20 мл, 0,12 моль) и смесь перемешивали при 25°C в течение часа. Затем к смеси добавляли хлорид аммония (16 г, 0,30 моль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Полученную смесь разбавляют этилацетатом, промывают водой и рассолом, сушат над сульфатом натрия и концентрируют в вакууме. Остаток очищали флэш-хроматографией (0-20% этилацетат в петролейном эфире), получая соединение P11 (4,2 г, выход 94%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 373,3 ($\text{M}+1$)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, MeOD-d_4) δ 7.20 (s, 1H), 6.97 (d, $J=7.7$ Гц, 1H), 6.80 (d, $J=8.3$ Гц, 1H), 2.77-2.68 (m, 2H), 2.66-2.55 (m, 1H), 2.20 (d, $J=12.9$ Гц, 1H), 2.13 (dd, $J=13.2, 5.3$ Гц, 1H), 2.08 (d, $J=14.0$ Гц, 1H), 2.03-1.86 (m, 2H), 1.54 (d, $J=11.1$ Гц, 1H), 1.40 (s, 9H), 1.26 (t, $J=26.7$ Гц, 1H), 1.18 (s, 3H), 1.14-1.03 (m, 4H) ppm.

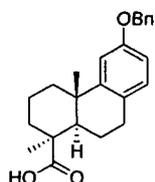
Метил (1S,4aS,10aR)-6-(бензилокси)-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (P13)



Смесь соединения P7 (12 г, 40 ммоль) и карбоната цезия (14 г, 44 ммоль) в DMF (100 мл) перемешивали при 20-25°C в течение 15 мин. К смеси добавляли бензилбромид (7,1 мл, 60 ммоль) при комнатной температуре. После перемешивания при комнатной температуре в течение 4 ч полученную смесь выливают в холодную воду и экстрагируют этилацетатом. Объединенный органический раствор промывали водой и рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме. Сырой продукт очищают флэш-хроматографией (0-10% этилацетат в петролейном эфире), получая указанное в заголовке соединение P13 (13 г, выход 89%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 379 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, MeOD-d₄) δ 7.60-7.20 (m, 5H), 7.00-6.82 (m, 2H), 6.73 (d, J=7.1 Гц, 1H), 5.03 (s, 2H), 3.66 (s, 3H), 2.95-2.58 (m, 2H), 2.36-2.10 (m, 3H), 2.10-1.85 (m, 2H), 1.70-1.48 (m, 2H), 1.44-1.21 (m, 4H), 1.15 (t, J=17.2 Гц, 1H), 1.01 (s, 3H) ppm.

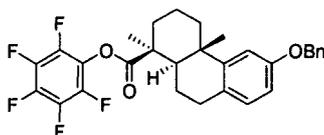
(1S,4aS,10aR)-6-(бензилокси)-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбоновая кислота (P14)



Смесь соединения P13 (11 г, 29 ммоль) и трет-бутоксид калия (33 г, 0,29 моль) в DMSO (0,19 л) перемешивали при 100°C в течение часа до полного удаления метильной группы, что контролировали с помощью ЖХМС и ТСХ. После охлаждения до 25°C смесь гасили водным гидрохлоридом (1N) и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический раствор промывали рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-24% этилацетат в петролейном эфире), получая соединение P14 (7,5 г, выход 71%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 365 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, MeOD-d₄) δ 7.42 (d, J=7.4 Гц, 2H), 7.36 (t, J=7.5 Гц, 2H), 7.30 (t, J=7.3 Гц, 1H), 6.92 (d, J=8.4 Гц, 1H), 6.87 (d, J=2.5 Гц, 1H), 6.72 (dd, J=8.4, 2.5 Гц, 1H), 5.02 (s, 2H), 2.82 (dd, J=16.3, 4.4 Гц, 1H), 2.77-2.65 (m, 1H), 2.24 (d, J=13.2 Гц, 2H), 2.19 (dd, J=13.8, 6.0 Гц, 1H), 2.11-1.96 (m, 2H), 1.64-1.56 (m, 1H), 1.53 (d, J=11.0 Гц, 1H), 1.35 (td, J=13.3, 3.7 Гц, 1H), 1.30 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.11-1.05 (m, 1H) ppm.

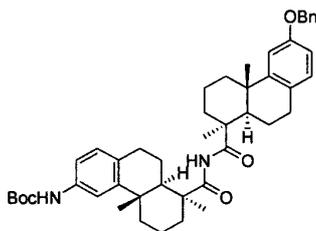
Пентафторфенил (1S,4aS,10aR)-6-(бензилокси)-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-карбоксилат (P15)



К раствору P14 (9,6 г, 26 ммоль) в DMF (100 мл) добавляли DIPEA (14 мл, 79 ммоль) и перфторфенил 2,2,2-трифторацетат (15 г, 53 ммоль). Эту смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, что контролировали с помощью ЖХМС. Затем реакционную смесь разбавляли эфиром (200 мл) и промывали водой (300 мл) и соевым раствором (200 мл). Органический раствор сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме. Остаток очищали флэш-хроматографией (0-10% этилацетат в петролейном эфире), получая соединение P15 (12 г, выход 88%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 531 (M+H)⁺.

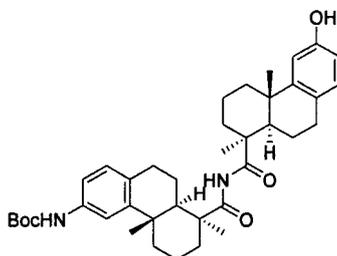
¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 7.43 (d, J=7.1 Гц, 2H), 7.38 (t, J=7.4 Гц, 2H), 7.31 (t, J=7.2 Гц, 1H), 6.93 (dd, J=10.2, 5.5 Гц, 2H), 6.76 (dd, J=8.4, 2.5 Гц, 1H), 5.05 (s, 2H), 2.81 (dd, J=16.3, 4.5 Гц, 1H), 2.77-2.68 (m, 1H), 2.28-2.19 (m, 2H), 2.18 (dd, J=13.4, 5.6 Гц, 1H), 2.00-1.83 (m, 2H), 1.74 (d, J=11.8 Гц, 1H), 1.65 (d, J=14.1 Гц, 1H), 1.47 (s, 3H), 1.38-1.27 (m, 2H), 1.08 (s, 3H) ppm.

трет-бутил N-[(4bS,8S,8aR)-8-({(1S,4aS,10aR)-6-(бензилокси)-1,4а-диметил-1,2,3,4,4а,9,10,10а-октагидрофенантрен-1-ил}формамидо)карбонил]-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8а,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (P16)



К раствору соединения P11 (2,3 г, 6,2 ммоль) в THF (20 мл) по каплям добавляли n-BuLi (2,5 М в гексане, 5,5 мл, 14 ммоль) при -78°C. Реакционную смесь перемешивали при этой температуре в течение 1 ч. К смеси добавляли раствор P15 (3,0 г, 5,6 ммоль) в THF (20 мл), и полученную смесь затем перемешивали при 10-20°C в течение ночи до тех пор, пока не израсходовалось соединение P15, что контролировали с помощью ЖХМС. Реакцию гасили насыщ. водн. хлоридом аммония и экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический раствор промывали водой и рассолом, сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме. Остаток очищали флэш-хроматографией (0-30% этилацетат в петролейном эфире), получая соединение P16 (1,59 г, выход 51%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 719 (M+1)⁺.

трет-бутил N-[(4bS,8S,8aR)-8-({[(1S,4aS,10aR)-6-гидрокси-1,4a-диметил-1,2,3,4,4a,9,10,10a-октагидрофенантрен-1-ил]формамидо}карбонил)-4b,8-диметил-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-3-ил]карбамат (P17)

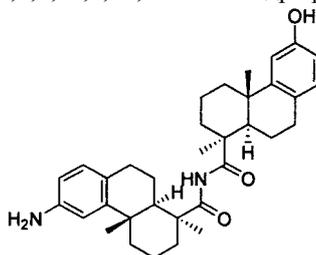


К раствору P16 (2,0 г, 2,78 ммоль) в этилацетате (40 мл) добавляли влажный палладий на угле (10% Pd, 0,9 г) в атмосфере азота. Смесь дегазировали и наполняли водородом и перемешивали при комнатной температуре под водородным баллоном в течение ночи до полного расходования P16, что контролировали с помощью ЖХМС. Смесь фильтровали через целит и фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (0-55% этилацетат в петролейном эфире), получая P17 (1,06 г, выход 61%) в виде белого твердого вещества. ESI масса/заряд: 629 (M+H)⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 9.10 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.15 (d, J=7.5 Гц, 1H), 6.90 (d, J=8.4 Гц, 1H), 6.81 (d, J=8.3 Гц, 1H), 6.63 (d, J=2.3 Гц, 1H), 6.50 (dd, J=8.2, 2.4 Гц, 1H), 2.84 (td, J=16.3, 3.8 Гц, 2H), 2.77-2.64 (m, 2H), 2.30-2.22 (m, 2H), 2.14 (t, J=10.9 Гц, 4H), 2.00-1.80 (m, 4H), 1.65-1.54 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.34-1.28 (m, 2H), 1.27 (d, J=2.5 Hz, 6H), 1.15-1.08 (m, 2H), 0.99 (s, 6H) ppm.

Полезная нагрузка 1d.

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



К раствору соединения P17 (0,17 г, 0,27 ммоль) в DCM (10 мл) по каплям добавляли TFA (3 мл) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение часа до удаления Boc в соответствии с ЖХМС. Летучих компоненты удаляли в вакууме и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (метод В), получая 1d (0,10 г, выход 70%) в виде белого твердого вещества.

ESI масса/заряд: 529.3 (M+1)⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8.14 (s, 1H), 6.92 (d, J=8.3 Гц, 1H), 6.86 (d, J=8.1 Гц, 1H), 6.73 (d, J=2.5 Гц, 1H), 6.65-6.57 (m, 2H), 6.50 (dd, J=8.1, 2.3 Гц, 1H), 4.75 (s, 1H), 3.49 (s, 1H), 2.99-2.85 (m, 2H), 2.79 (tt, J=11.6, 5.8 Гц, 2H), 2.34-2.14 (m, 6H), 2.15-1.95 (m, 4H), 1.74-1.51 (m, 5H), 1.46-1.34 (m, 2H), 1.30 (s, 6H), 1.21-1.06 (m, 8H) ppm.

¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8.99 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 6.81 (d, J=8.0 Гц, 1H), 6.68 (d, J=8.0 Гц, 1H), 6.63 (d, J=2.5 Гц, 1H), 6.50 (dd, J=8.0, 2.5 Гц, 1H), 6.48 (d, J=2.5 Гц, 1H), 6.34 (dd, J=8.0, 2.5 Гц, 1H), 4.69 (s, 2H), 2.86-2.60 (m, 4H), 2.28-2.10 (m, 6H), 1.94-1.75 (m, 4H), 1.65-1.53 (m, 4H), 1.35-1.20 (m, 8H), 1.20-1.06

(m, 2H), 0.98 (s, 6H) ppm.

^{13}C ЯМР (100 МГц, DMSO- d_6) δ 174.03, 173.92, 155.34, 148.39, 147.63, 146.43, 129.56, 129.09, 124.60, 121.65, 113.23, 112.58, 111.81, 110.77, 52.32, 52.09, 45.56, 45.52, 39.20, 39.36, 38.23, 38.17, 37.18, 37.12, 31.08, 31.00, 27.65, 27.64, 23.08, 23.03, 21.43, 21.27, 19.64, 19.61 ppm.

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

Оптическое вращение (α): +2,53° (1,7 г/100 мл THF, 25°C).

Пример 65.

В этом примере описан анализ некоторых полезных нагрузок компоновщика.

Полезные нагрузки линкера оценивали в нескольких физико-химических анализах и ферментных анализах перед конъюгацией с антителами для сравнения полезных нагрузок линкера с циклодекстриновым фрагментом с полезными нагрузками линкера без циклодекстринового фрагмента.

В следующем тесте анализируется растворимость линкера-полезных нагрузок с циклодекстриновым фрагментом и линкера-полезных нагрузок без циклодекстринового фрагмента.

Испытуемые соединения растворяли в DMSO для построения стандартной кривой, используя метод А или В ЖХ-МС. Испытуемый образец растворяли в воде и обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин, а затем центрифугировали. Верхний прозрачный раствор анализировали, используя тот же метод А или В, и растворимость рассчитывали на основе его площади пика. Показанный на фиг. 12 - результат растворимости Ex49. Соответствующая полезная нагрузка линкера (Ex47) имела растворимость в воде ниже определяемых уровней.

См. фиг. 12. Растворимость соединения примера 49.

| Соединение Примера 49 растворы | X: Концентрация (мг/мл) | Концентрация (мМ) | Y: Площадь на ЖХМС |
|--------------------------------------|-------------------------------|----------------------|--------------------------|
| A | 0.100 | 0.040 | 288.06 |
| B | 0.050 | 0.020 | 131.96 |
| C | 0.025 | 0.0099 | 66.15 |
| D | 0.010 | 0.0040 | 25.73 |
| Sat. | 0.048 | 0.019 | 132.96 |

Подробные процедуры испытаний были следующими:

1. 0,5 мг испытуемого соединения растворяли в 0,5 мл DMSO.

Раствор DMSO (1 мг/мл, 0,5 мл, 0,5 мг) разбавляли водой (4,5 мл), получая раствор А (0,1 мг/мл, 5 мл, 0,5 мг).

0,5 мл раствора А (0,1 мг/мл, 0,5 мл, 0,05 мг) разбавляли водой (0,5 мл), получая раствор В (0,05 мг/мл, 2 мл, 0,05 мг).

0,5 мл раствора А (0,1 мг/мл, 0,5 мл, 0,05 мг) разбавляли водой (1,5 мл), получая раствор С (0,025 мг/мл, 2 мл, 0,05 мг).

0,5 мл раствора А (0,1 мг/мл, 0,5 мл, 0,05 мг) разбавляли водой (4,5 мл), получая раствор D (0,01 мг/мл, 5 мл, 0,05 мг).

0,5 мл раствора D (0,01 мг/мл, 0,5 мл, 5 мкг) разбавляли водой (4,5 мл) с получением раствора E (1 мкг/мл, 5 мл, 0,5 мкг)

2. 0,05 мг соединения суспендировали в воде (1 мл) и обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин. После центрифугирования вышеуказанный прозрачный раствор собирали для получения насыщенного раствора образца.

3. Все стандартные растворы А, В, С, D, E и раствор образца были проанализированы методом ЖХМС (с использованием того же метода и того же объема впрыска) для получения площадей пиков.

4. Рассчитывали стандартную кривую по данным AD (X = концентрация, Y = площади пиков).

5. Для получения концентрации насыщенного раствора образца расчеты проводили в соответствии с функциями, полученными выше.

Пример 66.

Скорость расщепления катепсином В линкера-полезных нагрузок с и без циклодекстрина.

Далее следует процедура анализа катепсина В, и результаты испытаний приведены в табл. 8.

Шаг 1: Приготовление буфера катепсина В: 0,1 М NaOAc/0,01 М DTT (pH 5,0).

Растворить 8,3 г/л NaOAc, 1,54 г/л DTT в деионизированной воде. Отрегулируйте pH до 5,0 с помощью HCl/гидроксида натрия.

Шаг 2: Тест скорости расщепления.

1. Приготовьте 25 мкМ испытуемого образца: в пробирку объемом 2 мл добавили 0,5 мг испытуемого образца с последующим добавлением 0,2 мл DMSO. Раствор добавляли по каплям в 0,8 мл 0,1 М NaOAc/0,01 М буфера DTT. Полученные смеси обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин для получения прозрачных и бесцветных растворов. Значение pH раствора было около 5 в соответствии с тест-полоской pH.

2. Буфер для предварительного нагрева: 0,1 М NaOAc/0,01 М DTT (pH 5,0)

3. Растворы модельных смесей для испытуемых соединений: 25 мкМ Растворы модельных смесей

для испытуемых соединений: добавьте 2 мкл 5 мМ маточного раствора в 398 мкл 0,1 М NaOAc/0,01 М буфера DTT (pH 5,0).

4. Подготовьте 0,47 мкг/мкл катепсина В в 50 мМ NaOAc/1 мМ ЭДТА (pH 5,0). Положите на лёд.

5. Без образцов СА074: добавьте 4 мкл 0,47 мкг/мкл катепсина В в 196 мкл 25 мМ растворов модельных смесей (со стадии 2), инкубируйте пробирки при 37°C.

6. С образцами СА074: добавьте 4 мкл 0,47 мкг/мкл катепсина В с 4 мкл 10 мМ ингибитора (СА074) в 196 мкл 25 мМ растворов модельных смесей (со стадии 2), инкубируйте пробирки.

7. После гашения встряхните планшет и центрифугируйте пробирки при 14000 об/мин.

8. Перенесите 50 мкл супернатанта из каждой лунки в 96-луночный планшет для образцов, содержащий 50 мкл сверхчистой воды (Millipore, ZMQS50F01) для анализа ЖХ/МС.

Стадия 3: Испытательные эталонные соединения.

9. Буфер для предварительного нагревания: 100 мМ Na/K-фосфат, pH 6,0, 1,33 мМ EDTA и 2 мМ DTT.

10. Приготовьте 0,024 мкг/мкл катепсина В: добавьте 1 мкл 0,47 мкг/мкл исходного раствора катепсина В в 19 мкл буфера для анализа (со стадии 11).

11. Добавьте 2 мкл 0,024 мкг/мкл катепсина В (с этапа 12) в непрозрачный 96-луночный планшет.

12. Добавьте 96 мкл буфера для анализа к каждому образцу.

13. Добавьте 2 мкл 10 мМ субстрата Z-RR-MNA (конечная концентрация 200 мМ).

14. Для отрицательного контроля (с ингибитором) добавьте 2 мкл 10 мМ ингибитора (СА074): медленно считайте образцы в кинетическом режиме при возбуждении 340 нм/излучение 425 нм (считывайте планшет каждые 30 секунд в течение 3 мин).

Шаг 4: Стабильность катепсина В в инкубационных образцах.

15. Возьмите 5 мкл образцов для инкубации в 93 мкл буфера для анализа (с этапа 11), а затем добавьте 2 мкл 10 мМ субстрата (Z-RR-MNA).

16. Инкубируйте образцы при 37°C в течение 2 мин.

17. Считать образцы при возбуждении 340 нм/излучении 425 нм.

Как правило, большинство конъюгатов с сРAB-фрагментом могут расщепляться с помощью сарВ со скоростью расщепления >50%.

Как правило, введение циклодекстрина в линкеры увеличивает скорость расщепления катепсином В, например, с 14% (пример 47) до 62% (пример 48).

Другие образцы были протестированы и сведены в табл. 8. Как правило, большинство тестируемых соединений имеют время удерживания (ВУ) при ВЭЖХ в диапазоне от 6 до 7 мин. Если ВУ > 7 мин, сLogP больше 5 и их растворимость в воде была плохой.

Таблица 8

Растворимость и скорость расщепления сарВ линкера-полезных нагрузок с циклодекстрином

| Соединение | Полезная нагрузка | сLogP | сарВ | ВЭЖХ * | Водн. Растворимость |
|------------|-------------------|--------------|-------|----------------------|---------------------|
| | | | (%) | ВУ (мин) | (мг/мл) |
| Ех36 | ММАЕ | +++++ | %%% | 8.25 (В) | <0.1 |
| Ех37 | | ++ | - | 7.22 (В) | 0.25 |
| Ех39 | | ++ | - | 7.19 (А) | - |
| Ех40 | | ++ | - | 5.88 (А) | 0.33 |
| Ех38 | | + | - | 5.78 (А) | 0.5 |
| Ех41 | | ++ | %%% | 7.29 (В) | 0.14 |
| Ех42 | | ++ | %%% | 7.33 (В) | >1 |
| Ех43 | | ++ | %% | 5.79 (В) | 0.5 |
| Ех44 | | ++ | %% | 5.66 (В) | >1 |
| Ех45 | | 1с на ФИГ. 1 | +++++ | % | 8.55 (В) |
| Ех46 | 1b на ФИГ.1 | ++ | - | 6.62(А); 6.67 (В) | - |
| Ех47 | 1с на ФИГ. 1 | ++ | % | 6.61(А); 6.73 (В) | <0.1 |

| | | | | | |
|------|-------------|-------------|-----|----------------------|----------|
| Ex48 | | +++++ | % | 9.21 (B) | <0.1** |
| Ex49 | 1d на ФИГ.1 | +++ | %%% | 6.45(A); 6.55 (B) | 0.05 |
| Ex50 | | +++ | % | 6.68 (B) | - |
| Ex51 | | +++ | | 6.33 (B) | 0.18 |
| Ex52 | | 1e на ФИГ.1 | +++ | | 6.62 (B) |
| Ex53 | 1d на ФИГ.1 | +++ | %% | 6.42 (B) | 0.33 |
| Ex54 | 1d на ФИГ.1 | +++ | | 6.37 (B) | 0.3 |
| Ex55 | 1f на ФИГ.1 | +++ | | 6.33(A); 6.44 (B) | |
| Ex56 | 1g на ФИГ.1 | +++ | | 6.11(A); 6.21 (B) | <0.1 |
| Ex57 | 1d на ФИГ.1 | ++ | | 7.54 (B) | - |
| Ex58 | 1h на ФИГ.1 | ++++ | % | 7.40 (B) | <0.02 |
| Ex59 | | ++ | % | 6.23 (B) | 0.026 |
| Ex60 | | ++ | % | 7.37, 7.41 (B) | - |
| Ex61 | 1i на ФИГ.1 | +++++ | % | 7.99 (B) | 0.01 |
| Ex62 | | ++ | % | 7.94, 8.02 (B) | 0.02 |
| Ex63 | | ++ | % | 7.76 (B) | - |

* А и В: см. методы ВЭЖХ А и В, соответственно, в общей процедуре.

** : Водная растворимость в других растворителях

Для примера 44 соединение: 0,06 мг/мл в 20% DMSO в воде; 0,07 мг/мл в 30% DMSO в воде.

Для примера 46 соединение: 0,10 мг/мл в 10% DMSO/H₂O.

+ ≤ -6 cLogP

-6 < ++ ≤ -3 cLogP

-3 < +++ ≤ 1 cLogP

1 < ++++ ≤ 5 cLogP

5 < +++++ ≤ 9.5 cLogP

% ≤ 50 CapB (%)

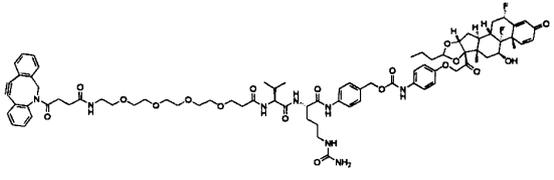
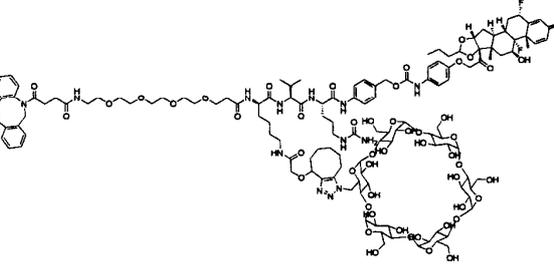
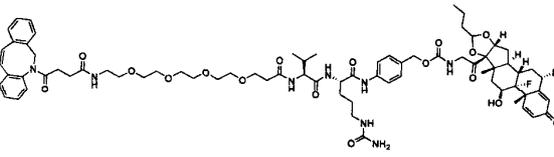
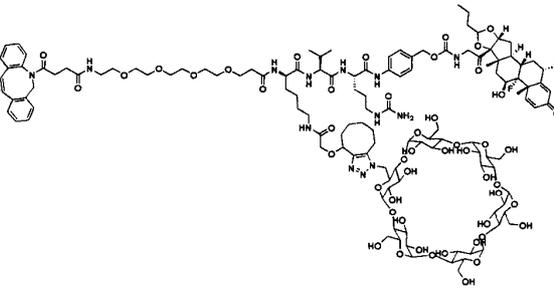
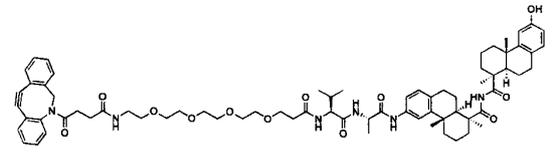
50 < %% ≤ 60 CapB (%)

60 < %%% ≤ 70 CapB (%)

70 < %%%% ≤ 80 CapB (%)

80 < %%%%%

Таблица 8А
Сравнение растворимости и скорости расщепления СарВ линкеров-полезных
нагрузок с циклодекстрином и без циклодекстрина

| Линкер-полезная нагрузка | Структуры | Линкер | полезная нагрузка | Растворимость | Стабильность | сарВ |
|--------------------------|---|---|-------------------|-----------------|--------------|-----------|
| Ex61 |  | DIBAC -suc- PEG4- vcPAB | 1i | 0.01 мг/мл | Y | < 5% |
| Ex62 |  | DIBAC -suc- PEG4- dLys(C OT- CD)- vcPAB | 1i | 0.02 мг/мл | Y | 12.8 % |
| E58 |  | DIBAC -suc- PEG4- vcPAB | 1h | < 0.02 мг/мл | Y | 20.8 % |
| Ex59 |  | DIBAC -suc- PEG4- dLys(C OT- CD)- vcPAB | 1h | 0.026 мг/мл | Y | 29% |
| Ex48 |  | DIBAC -suc- PEG4- VA | 1d | < 0.1 мг/мл | Y | 13.6 % |

| | | | | | | |
|------|--|--|----|----------------|---|--------------|
| Ex49 | | DIBAC -suc- PEG4- dLys(C OT- CD)- VA | 1d | 0.05 мг/мл | Y | 38.5 %[1] |
| Ex57 | | DIBAC -suc- PEG4- dLys(C γCD)- VA | 1d | 0.075 мг/мл | Y | 8.3% |

Пример 67.

Стабильность линкер-полезных нагрузок по сравнению с циклодекстрином и без него при различных pH-буферах

Образцы для испытаний растворяли в 0,5 мг/мл 20% DMSO + 80% PBS-буферов при pH 5,0, 7,4 или 8,0. Буферы готовили следующим образом:

1. 0,05 М фосфат натрия и 0,07 М NaCl-буфер, pH 7,4:

Растворяют 14,505 г/л $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1,483 г/л $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 4,095 г/л NaCl в деионизированной воде. Отрегулируйте pH до 7,40 с помощью фосфорной кислоты/гидроксида натрия.

2. PBS с 0,5% БСА:

Растворить 0,5 г БСА в 100 мл буфера 1.

Результаты показали, что DIBAC-гидрофильные линкеры-полезные нагрузки достаточно стабильны при pH 6-8, > 95% оставалось во время тестирования. Повышенная гидрофильность линкера приводит к увеличению водной стабильности линкера-полезных нагрузок с течением времени.

Пример 68.

Связывание ADC.

Связывание полезной нагрузки малеимид-линкер с антителом (фиг. 13) и полезной нагрузки DIBAC-линкер с азидо-функционализированным антителом посредством реакции щелчка [3+2] (фиг. 14) было показано на фиг. 13 и 14 соответственно.

Общая процедура E для неспецифического малеимид-линкер-полезная нагрузка, связанного с антителом

В этом примере демонстрируется метод конъюгирования линкер-полезной нагрузки нелоспецифически с антителом или антигенсвязывающим фрагментом посредством реакции Михаэля или образования тиол-малеимидной связи. Этот пример относится к соединениям, изображенным на фиг. 13. Конъюгирование через антитело-цистеины проводили в два этапа, используя способы, аналогичные способам получения Adcetris®-подобных ADC (см. Mol. Pharm. 2015, 12(6), 1863-71). Моноклональное антитело (mAb) (10 мг/мл в 50 mM HEPES, 150 mM NaCl) при pH 7-8 восстанавливали с помощью 1 mM дитиотреитола (0,006 мг на мг антитела) или TCEP (2,5 молярных эквивалента антитела) при 37°C в течение 30 мин. После гель-фильтрации (G - 25, pH 4,5, ацетат натрия) соединение примера 38 в концентрации 1-10 мг/мл в DMSO добавляли к восстановленному антителу и реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение 3-14 ч. Полученную смесь очищали гель-фильтрационной хроматографией для получения чистого конъюгата. Значения DAR (УФ) определяли с использованием измеренных значений поглощения ADC и коэффициентов экстинкции антитела и соединения Примера 38. Результаты конъюгации обобщены в следующей табл. 9.

Конъюгация с помощью реакции Михаэля, представленная Ab-Ex.38. См. фиг. 13

Таблица 9
Пример конъюгации с помощью реакции Михаэля

| | Название ADC | ADC Анти- PRLR Ab | DAR |
|------------|---|--|-----|
| Прим.61-1 | Ab-SC-PEG ₄ -VC-PAB-MMAE | L17 | 3 |
| Прим. 62-2 | Ab-SC-N ⁵ -(α -CD-DIBACT-Suc)D-Lys-VC-PAB-MMAE | L18 | 1.5 |
| Прим. 62-4 | Ab-SC-PEG ₄ -N ⁵ -(α -CD-COT)D-Lys-VC-PABC-MMAE | L34 | 2.0 |
| Прим. 62-5 | Ab-SC-PEG ₄ -N-(α -CD-DIBACT-Suc)D-Lys-VC-PABC-MMAE | L37 | 1.5 |
| | | Контроль изотипа (Контроль ADC) | |
| Прим.62-1 | Ab-SC-PEG ₄ -VC-PAB-MMAE | L93 | 2.9 |
| Прим. 62-2 | Ab-SC-N ⁵ -(α -CD-DIBACT-Suc)D-Lys-VC-PAB-MMAE | L126 | 2.9 |
| Прим. 62-4 | Ab-SC-PEG ₄ -N ⁵ -(α -CD-COT)D-Lys-VC-PABC-MMAE | L120 | 3.2 |
| Прим. 62-5 | Ab-SC-PEG ₄ -N-(α -CD-DIBACT-Suc)D-Lys-VC-PABC-MMAE | L129 | 1.0 |

Пример 69.

Общая процедура F для сайт-специфической конъюгации алкин-линкер-полезная нагрузка, связанного с антителом.

Этот пример демонстрирует метод сайт-специфической конъюгации, как правило, для линкера-полезной нагрузки с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Этот пример относится к соединениям, изображенным на фиг. 14.

В этом примере сайт-специфические конъюгаты были получены в два этапа. Первым этапом является ферментативное присоединение на основе микробной трансглутаминазы (MTG) небольшой молекулы, такой как азид-PEG₃-амин (выше), к антителу, имеющему метку Q-tag (ссылки на Qtag) (в дальнейшем конъюгация "на основе MTG"). На втором этапе использовалось присоединение полезной нагрузки линкер к азидофункционализованному антителу с помощью циклоприсоединения [2+3], например, 1,3-диполярное циклоприсоединение между азидами и циклооктинами (так называемая клик-химия без меди). См. Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. PNAS 2007, 104 (43), 16793-7. Показанное на фиг. 14 соединение представляет собой пример соединения линкер-полезная нагрузка, имеющего фрагмент DIBAC, конъюгированный с азидофункционализованным антителом посредством [2+3] циклоприсоединения. Этот процесс обеспечил сайт-специфические и стехиометрические конъюгаты с выделенным выходом около 50-80%.

Схема 10. Конъюгация ADC с помощью клик-реакции [2+3], представленной Ab-E_x49, теперь на фиг. 14.

Шаг 1: Приготовление азидофункционального антитела.

Агликозилированное человеческое антитело IgG (IgG1, IgG4 и т.д.) или человеческий изотип IgG1 с мутацией N297Q в PBS (pH 6,5-8,0) смешивали с ≥ 200 мольными эквивалентами азидо-dPEG₃-амина (М.м. = 218,26 г/моль). Полученный раствор смешивали с MTG (ЕС 2.3.2.13 от Zedira, Дармштадт, Германия или Modernist Pantry [L # 210115A] - ACTIVA TI содержит мальтодекстрин из Ajinomoto, Япония) (25 ед./мл; 5 Ед. MTG на мг антитела) в результате чего конечная концентрация антитела составляла 0,5-5 мг/мл, после чего раствор инкубировали при 37°C в течение 4-24 ч при осторожном встряхивании. Реакцию контролировали с помощью ESI-MS (тандемной масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением). По завершении реакции избыток амина и MTG удаляли с помощью колоночной хроматографии на SEC или белке А для получения азидофункционального антитела. Этот продукт характеризовали SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) (фиг. 15) и ESI-MS (фиг. 16). Азидо-dPEG₃-амин добавляли к двум сайтам антитела, что приводило к увеличению на 204 Да для конъюгата 2DAR антитело-PEG₃-азид.

В конкретном эксперименте N-концевое антитело метки Q-tag (24 мг) в 7 мл не содержащего калия буфера PBS (pH 7,3) инкубировали с > 200 молярным эквивалентом азидо-PEG₃-амина (М.м. 218,26) в присутствии MTG (0,350 мл, 35 Ед., mTGase, Zedira, Дармштадт, Германия). Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение ночи при осторожном перемешивании. Избыток азидо-PEG₃-амина и mTGase удаляли методом эксклюзионной хроматографии (SEC, Superdex 200 PG, GE Healthcare).

Шаг 2: Получение сайт-специфических конъюгатов лекарственного средства с антителом с использованием клик-химических реакций.

Конъюгаты сайт-специфических антител с человеческим IgG (IgG1, IgG4 и т.д.) в табл. 10 были получены с помощью клик-реакции [2+3] между азидо-функционализованными антителами и алкинсодержащим соединением линкер-полезная нагрузка. Подробная процедура сопряжения приведена ниже. Конъюгат сайт-специфических антител с линкером-полезной нагрузкой (LP) готовили инкубацией mAb-PEG₃-N₃ (1-3 мг/мл) в водной среде (например, PBS, PBS, содержащий 5% глицерина, HBS) с ≥ 6 моляр-

ными эквивалентами LP, растворенного в подходящем органическом растворителе, таком как DMSO, DMF или DMA (т.е. реакционная смесь содержит 5-20% органического растворителя, об./об.) при температуре от 24°C до 37°C в течение более 6 ч. Ход реакции контролировали с помощью ESI-MS, и отсутствие mAb-PEG₃-N₃ указывало на завершение конъюгации. Избыточное количество LP и органического растворителя удаляли с помощью SEC путем элюирования с помощью PBS или хроматографии на колонке с белком А с помощью элюирования кислотным буфером с последующей нейтрализацией трисом (pH 8,0).

В конкретном примере азидо-функционализированное антитело (1 мг) в 0,800 мл PBSg (PBS, 5% глицерин, pH 7,4) обрабатывали шестью молярными эквивалентами DIBAC-PEG₄-D-Lys (COT- α -CD)-VC-PAVC-полезная нагрузка (конц. 10 мг/мл в DMSO) в течение 6-12 ч при комнатной температуре и избыточную полезную нагрузку линкера (LP) удаляли с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC, Superdex 200 HR, GE Healthcare).

Конечный продукт концентрировали ультрацентрифугированием и характеризовали УФ, SEC, SDS-PAGE и ESI-MS.

В табл. 10 показан список нецитотоксических конъюгатов стероидных антител (pcADC) из соответствующих LP, их молекулярных масс обнаженных антител, азидо-функционализированных антител, LP и pcADC, а также значений ESI-DAR. В таблице Ab относится к антителу, Ab-N₃ относится к азидо-функционализированному антителу, а pcADC относится к конъюгату нецитотоксического антитела с лекарственным средством.

Таблица 10

Список сайт-специфических конъюгатов с CD-содержащими линкером-полезной нагрузкой

| LP | | Ab, Ab-N ₃ или Ab-стероидные конъюгаты | | |
|----------------------------------|----------------|---|---------------|-----|
| EX | MC масса/заряд | Наименование | М.м. (Да) | DAR |
| | | Анти-PRLR Ab | 144588 | - |
| PEG ₃ -N ₃ | 218.26 | Анти-PRLR Ab -HN-PEG ₃ -N ₃ | 145389 | 4 |
| Ex36 | 1656.9 | Анти-PRLR Ab -Ex36 | 152564 | 3.9 |
| Ex48 | 2773.1 | Анти-PRLR Ab -Ex48 | 156508 | 3.9 |
| Ex41 | 2946.4 | Анти-PRLR Ab -Ex41 | 157185 | 4 |
| Ex42 | 2837.2 | Анти-PRLR Ab -Ex42 | 156744 | 3.9 |
| Ex43 | 3195.5 | Анти-PRLR Ab -Ex43 | 158194 | 3.9 |
| Ex44 | 3082.6 | Анти-PRLR Ab -Ex44 | 157753 | 3.9 |
| | | Анти-Her2 Ab | 145137 | |
| PEG ₃ -азидо | 218.26 | Анти-Her2 Ab-HN-PEG ₃ -N ₃ | 145939 | 4 |
| Ex36 | 1656.94 | Анти-Her2 Ab-Ex36 | 152566 | 4 |
| Ex41 | 2948.3 | Анти-Her2 Ab-Ex41 | 157746 | 4 |
| Ex42 | 2837.2 | Анти-Her2 Ab-Ex42 | 157302 | 4 |
| Ex43 | 3195.5 | Анти-Her2 Ab-Ex43 | 158714 | 4 |
| Ex44 | 3082.6 | Анти-Her2 Ab-Ex44 | 157340 | 3.9 |

| LP | | Ab, Ab-N ₃ или Ab-стероидные конъюгаты | | |
|-------------------------|----------------|---|-----------|-----|
| EX | MC масса/заряд | Наименование | М.м. (Да) | DAR |
| | | Анти-PRLR Ab | 144588 | |
| PEG ₃ -азидо | 218 | Анти-PRLR Ab -M404 | 145389 | 4 |
| Ex45 | 1225.6 | Анти-PRLR Ab -Ex45 | 150311 | 3.9 |
| Ex46 | 2515.1 | Анти-PRLR Ab -Ex46 | 155460 | 3.9 |
| Ex47 | 2515.1 | Анти-PRLR Ab -Ex47 | 155486 | 3.9 |
| | | Контроль изотипа Ab | 145441 | |
| PEG ₃ -азидо | | Контроль изотипа Ab-HN-PEG ₃ -N ₃ | 146235 | 4 |
| Ex45 | 1225.6 | Контроль изотипа Ab-Ex47 | 151156 | 3.9 |
| Ex46 | 2515.1 | Контроль изотипа Ab-Ex46 | 156332 | 3.9 |
| Ex48 | 2515.1 | Контроль изотипа Ab-Ex48 | 156316 | 3.9 |

| | | | | |
|-------------------------|--------|--|--------|-----|
| | | Анти-PRLR Ab | 144588 | |
| PEG ₃ -азидо | 218.26 | Анти-PRLR Ab-HN-PEG ₃ -N ₃ | 145389 | |
| Ex49 | 2523.8 | Анти-PRLR Ab-Ex49 | 155484 | 4 |
| Ex50 | 3048.3 | Анти-PRLR Ab-Ex50 | 157589 | 4 |
| Ex51 | 2658.3 | Анти-PRLR Ab-Ex51 | 156052 | 4 |
| Ex52 | 2937.4 | Анти-PRLR Ab-Ex52 | 157169 | 4 |
| Ex53 | 2769.3 | Анти-PRLR Ab-Ex53 | 156474 | 4 |
| | | Isotype control Ab | 145441 | |
| PEG ₃ -азидо | 218.26 | Контроль изотипа Ab -HN-PEG ₃ -N ₃ | 146235 | |
| Ex54 | 2816.1 | Контроль изотипа Ab-Ex54 | 157514 | 3.9 |
| Ex55 | 2846.1 | Контроль изотипа Ab-Ex55 | 157636 | 4 |
| | | Анти-Her2 Ab | 145137 | |
| PEG ₃ -азидо | 218.26 | Анти-Her2 Ab-HN-PEG ₃ -N ₃ | 145939 | |
| Ex49 | 2523.8 | Анти-Her2 Ab-Ex49 | 156047 | 4 |
| 50 | 3048.3 | Анти-Her2 Ab-Ex50 | 158153 | 4 |
| Ex51 | 2658.3 | Анти-Her2 Ab-Ex51 | 156602 | 4 |
| Ex52 | 2937.4 | Анти-Her2 Ab-Ex52 | 157715 | 4 |
| Ex53 | 2769.3 | Анти-Her2 Ab-Ex53 | 157040 | 4 |
| Ex54 | 2816.1 | Анти-Her2 Ab-Ex54 | 157212 | 3.9 |
| Ex55 | 2846.1 | Анти-Her2 Ab-Ex55 | 157340 | 3.9 |

Пример 70.

Общая процедура G для характеристики антител и конъюгатов антитело-лекарственное средство

Очищенные конъюгаты анализировали с помощью SEC, SDS-PAGE и ESI-MS. Конъюгат анти-Her2-LP в табл. 10 был получен из антитела против Her2 посредством клик-реакций азидо-функционализированного антитела (анти-Her2-PEG₃-N₃) с LP в табл. 10. ADC были охарактеризованы с помощью SEC (фиг. 15), ESI-MS и SEC (фиг. 16).

Характеристика ADC методом SDS-PAGE.

В одном методе условия SDS-PAGE включали невосстановленные и восстановленные образцы (2-4 мкг) вместе с предварительно окрашенной белковой лестницей BenchMark (Invitrogen, кат. № 10748-010; партия № 1671922), загруженной на линию в (1,0 мм × 10 лунок) Novex 4-20% трис-глициновый гель и работали при 180 В, 300 мА, в течение 80 мин. Аналитический образец готовили с использованием SDX-буфера Novex Трис-Глицин (2X) (Invitrogen, кат. № LC2676), а восстанавливающий образец готовили с использованием буфера SDS для образцов (2X), содержащего 10% 2-мекаптоэтанол.

На фиг. 15 показан репрезентативный гель, указывающий на небольшое смещение молекулярных масс антител и ADC на SDS-PAGE, проводимых в восстанавливающих условиях. Сдвиги массы на легкой цепи не наблюдались. Однако массы тяжелых цепей ADC были увеличены по сравнению с массой голого антитела. Не было обнаружено выявляемого сшитого материала и не было обнаружено агрегации.

Фиг. 15 ДСН-ПААГ-электрофорез (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) окрашенного Кумасси геля антител анти-Her2, анти-Her2-PEG₃-N₃ и анти-Her2-Ex49. На фиг. 15 дорожки помечены в соответствии со следующей легендой:

| Дорожка | Образец |
|---|---|
| 1 | Стандарты (Bench Mark 10 мкл) |
| 2 | Анти Her2 mAb |
| 3 | Анти Her2 mAb-NH-PEG ₃ -N ₃ |
| 4 | Анти Her2 mAb-Ex49 |
| 7 | Анти Her2 mAb (восстановленный) |
| 8 | Анти Her2 mAb-NH-PEG ₃ -N ₃ (восстановленный) |
| 9 | Анти Her2 mAb-Ex50 (восстановленный) |
| ~ 2 мкг невосстановленного/восстановленного образца/дорожки. Novex 4-20% трис-глициновый гель; 1,0 мм × 10 лунок; 180 В, 300 мА, 80 мин. BenchMark предварительно окрашенная белковая лестница, Invitrogen, кат. № 10748-010; партия № 1671922. | |

Характеристика ADC с помощью LC-ESI-MS (жидкостной хроматографии - ионизацией электро-спреем - масс-спектрометрии).

Измерение интактных масс для образцов psADC методом LC-ESI-MS было выполнено для опреде-

ления профилей распределения лекарственного вещества и расчета среднего DAR. Каждый тестируемый образец (20-50 нг, 5 мкл) загружали в колонку Acquity UPLC Protein ВЕН С4 (10 кПа, 300 Å, 1,7 мкм, 75 мкм × 100 мм; кат. № 186003810). После обессоливания в течение 3 мин белок элюировали и масс-спектры получали с помощью масс-спектрометра Waters Synapt G2-Si.

Масс-спектры с деконволюцией показали преобладающий пик для агликозилированного антитела против Her2 с молекулярной массой 145126,0 Да и преобладающий пик для азидо-функционализированного антитела против Her2 с молекулярной массой 145932,0 Да, что указывает на увеличение на 806 Да по сравнению с его агликозилированное родительское антитело (т.е., соответствующее 4 конъюгациям amino-PEG₃-азида с каждым агликозилированным антителом). Кроме того, преобладающий пик для конъюгата анти-Her2-LP имел молекулярную массу 152166,0 Да, что указывает на увеличение на 6234 Да по сравнению с его конъюгированными агликозилированными родительскими антителами (т.е. соответствует 4 конъюгациям LP (MW=1558,5 Да) для каждого агликозилированного антитела). Как показано в табл. 3, большинство ADC для конкретного участка в этом документе имеют 4DAR.

Пример 71.

Этот пример показывает характеристику ADC методом SEC.

Аналитические эксперименты SEC проводили с использованием прибора Waters 600 на колонке Superdex 200 (1,0 × 30 см) при скорости потока 0,80 мл/мин с использованием PBS pH 7,4 и контролировали при $\lambda = 280$ нм с использованием PDA Waters 2998. Аналитический образец состоял из 200 мкл PBS (pH 7,4) с 30-100 мкл тестируемого образца. Препаративную очистку SEC выполняли с использованием инструмента АКТА от GE Healthcare на колонке Superdex 200 PG (2,6 × 60 см) при скорости потока 2 мл/мин, элюируя PBS pH 7,4, и контролировали при $\lambda = 280$ нм. Результаты SEC на фиг. 16 показывают типичные времена удерживания для мономерного mAb и его конъюгатов, и не было выявлено агрегации или деградации.

Фиг. 16. SEC для анти-Her2 Ab, анти-Her2-PEG₃-N₃ и анти-Her2-E_x49.

Пример 72.

В этом примере показана биологическая активность цитотоксических ADC с линкерами циклодекстрина и без них (фиг. 17).

Для оценки сопоставимости ADC с CD и без CD, содержащих цитотоксические полезные нагрузки, в анализе цитотоксичности использовали клетки SKBR3. Клетки SKBR3 обычно использовали для оценки активности ADC aHer2. ADP aPRLR был использован в качестве контрольного ADC mAb в анализе цитотоксичности SKBR3. Для анализа цитотоксичность *in vitro* ADC против Her2 или ADC PRLR оценивали с использованием набора для анализа CellTiter-Glo (Promega, Cat # G7573), в котором количество присутствующего АТФ используют для определения количества жизнеспособных клеток в культуре. Для анализа клетки SKBR3 высевали при 6000 клеток/лунку в 96-луночных планшетах Nunclon white в полной питательной среде и выращивали в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. Для кривых жизнеспособности клеток к клеткам добавляли серийно разведенные 1:4 ADC или MMAE со свободной нагрузкой в концентрациях, начиная с 100 нМ, включая контроль без обработки, и затем инкубировали в течение 5 дней. После 5-дневной инкубации клетки инкубировали при комнатной температуре с 100 мкл реагентов CellTiter-Glo в течение 5 мин. Относительные световые единицы (RLU) определяли на планшет-ридере Victor (PerkinElmer). Значения IC₅₀ определяли из четырехпараметрического логистического уравнения по кривой отклика из 10 точек (GraphPad Prism). Все кривые и значения EC₅₀ были скорректированы для эквивалентов полезной нагрузки. Все IC₅₀ выражены в концентрации нМ, и процент погибших клеток (% уничтожения) сообщается для самой высокой протестированной концентрации.

Как показано в табл. 11 и на фиг. 17, ADC анти-Her2 Ab, содержащие CD (E_x38, E_x40, E_x41, E_x48, E_x42, E_x39), имеют такую же эффективность и действенность в уничтожении клеток SKBR3, как ADC анти-Her2 Ab, которые не содержат CD (Анти-Her2 Ab-E_x36). Оба набора ADC анти-HER2 показали более 90% уничтожения клеток при самой высокой протестированной концентрации. В этом анализе неконъюгированные антитела не продемонстрировали никакого эффекта. ADC контроля изотипа, независимо от того, содержат ли они CD или нет, не демонстрируют никакого эффекта в этом анализе.

Таблица 11

Цитотоксичность ADC с или без линкеров циклодекстрина в клетках SKBR3

| Проверенная молекула | % уничтоженных клеток | EC ₅₀ (нМ) | Проверенная молекула | % уничтоженных клеток | EC ₅₀ (нМ) |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Анти-Her2 Ab-Ex36 | ≥90 | 0,06 | Анти-PRLR Ab -Ex36 | <10 | Н/П |
| Анти-Her2 Ab-Ex38 | ≥90 | 0,10 | Анти-PRLR Ab -Ex38 | <10 | Н/П |
| Анти-Her2 Ab-Ex41 | ≥90 | 0,10 | Анти-PRLR Ab -Ex41 | <10 | Н/П |
| Анти-Her2 Ab-Ex43 | ≥90 | 0,08 | Анти-PRLR Ab -Ex43 | <10 | Н/П |
| Анти-Her2 Ab-Ex42 | ≥90 | 0,11 | Анти-PRLR Ab -Ex42 | ≤20 | Н/П |
| Анти-Her2 Ab-Ex44 | ≥90 | 0,11 | Анти-PRLR Ab -Ex44 | <10 | Н/П |
| MMAE | ≥90 | 0,19 | MMAE | ≥90 | 0,19 |
| Анти-Her2 Ab | ≤20 | 0,42 | Анти-PRLR Ab | <10 | Н/П |

Н/П = неприменимо.

Биологическая активность стероидных ADC с и без линкеров циклодекстрина показана на фиг. 18.

Чтобы проверить сравнимость ADC с CD и без CD, содержащих полезные нагрузки стероидов, их активность в клетках 293/PRLR/GRE-Luc изучали при 72-часовой инкубации. Для этого анализа 20000 клеток высевали в 96-луночные планшеты в среду, содержащую DMEM, дополненную 10% FBS и пенициллин/стрептомицин (полная среда), и выращивали в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. Для кривых зависимости доза свободного лекарственного средства или ADC к клеткам добавляли серийно разведенные реагенты в диапазоне от 100 нМ до 5,1 пМ и инкубировали в течение 72 ч при 37°C. Активность люциферазы определяли добавлением реагента One-Glo™ (Promega, Cat # E6130) и относительные световые единицы (RLU) измеряли на люцинометре Victor (Perkin Elmer). Значения EC₅₀ определяли из четырехпараметрического логистического уравнения по кривой отклика из 10 точек с помощью GraphPad Prism. Доставка стероидов приведет к активации репортера Luc в клетках 293/PRLR/GRE-Luc. Полная активация в этом анализе определяется между 90 и 100% от максимальной активации, измеренной с помощью свободной полезной нагрузки. Частичная активация в этом анализе определяется как активация, которая составляет от 10% до 90% от максимальной активации, измеренной со свободной полезной нагрузкой. Минимальная активация в этом анализе определяется как менее чем 10% от максимальной активации, измеренной со свободной полезной нагрузкой.

Как показано в табл. 12 и на фиг. 18, ADC анти-PRLR Ab, содержащие CD (анти-PRLR Ab-Ex46, анти-PRLR Ab-Ex47), имеют сходную эффективность и действенность в активации репортера GRE-Luc в клетках 293/PRLR/GRE-Luc, как и ADC анти-PRLR Ab, которые не содержат CD (Анти-PRLR Ab-Ex45). В этом анализе ADC контроля изотипа, независимо от того, содержат ли они CD или нет, а также неконъюгированное антитело, не продемонстрировали каких-либо существенных эффектов в этом анализе.

Таблица 12

GR активация стероидных ADC с или без линкеров циклодекстрина в клетках 293/PRLR/GRE-LUC

| Проверенная молекула | Максимальная активация | EC ₅₀ (нМ) | Проверенная молекула | Максимальная активация | EC ₅₀ (нМ) |
|---|------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------|
| Анти-PRLR Ab-Ex46 | Частичная | 8,6 | Контроль изотипа Ab-Ex46 | Минимальная | Н/П |
| Анти-PRLR Ab-Ex45 | Частичная | 9,5 | Контроль изотипа Ab-Ex45 | Минимальная | Н/П |
| Свободная полезная нагрузка (соединение 1с) | Полная | 8,4 | Анти-PRLR Ab | Минимальная | Н/П |

Н/П = неприменимо.

Биологическая активность ADC-агонистов LXR с линкерами циклодекстрина и без них. См. фиг. 19.

Для проверки совместимости ADC с CD и без CD, содержащих агонисты LXR, анти-HER2 Ab ADC с CD и без CD тестировали на их способность активировать LXR в биоанализе THP1/LXR-Luc/Her2. В этом анализе либо клетки THP1/LXR-Luc, либо клетки THP1/LXR-Luc/Her2 высевали на белые 96-луночные планшеты при 30000 клеток/луночку в среде, содержащей RPMI, дополненную 10% FBS и пенициллином/стрептомицином (полная среда). Впоследствии к клеткам добавляли 3-кратные серийные разведения конъюгатов антитело-лекарственное средство, неконъюгированные антитела или свободные полезные нагрузки в конечной концентрации в диапазоне от 100 нМ до 0,01 нМ. После 48-часовой инку-

бации активность люциферазы определяли после добавления реагента One-Glo™ (Promega, E6130) в каждую лунку с клетками. Относительные световые единицы (RLU) измеряли на люцинометре Victor (PerkinElmer), а значения EC₅₀ определяли с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по кривой отклика на дозу из 10 точек (GraphPad Prism). Значения EC₅₀ для агонистов LXR для изобретения и контрольных соединений показаны в табл. 13. Значения EC₅₀ для псADC и соответствующих агонистов LXR показаны в табл. 13. Полная активация в этом анализе определяется между 95 и до 100% от максимальной активации, измеренной с помощью свободной полезной нагрузки 1d. Частичная активация в этом анализе определяется как составляющая от 10% до 94,9% от максимальной активации, измеренной со свободной полезной нагрузкой 1d. Минимальная активация в этом анализе определяется как менее чем 10% от максимальной активации, измеренной со свободной полезной нагрузкой 1d.

Как показано в табл. 13 и на фиг. 19, анти-Her2 Ab ADC, содержащий CD и высвобождающий полезную нагрузку 1d (анти-Her2 Ab-Eх49), обладает сходной эффективностью и эффективностью в активации LXR в клетках THP1/Her2/LXR-Luc, как ADC анти-Her2 Ab, который не содержит CD, который освобождает полезную нагрузку 1d (анти-Her2 Ab-Eх48) Другой анти-Her2 Ab ADC, содержащий CD, который освобождает полезную нагрузку 1f, также демонстрирует полную активацию по сравнению со свободной полезной нагрузкой 1d. В этом анализе неконъюгированное антитело не продемонстрировало никакого эффекта. ADC контроля изотипа, независимо от того, содержат ли они CD или нет, не показали значительного эффекта при большинстве протестированных концентраций. Некоторые изотипические контроли показали некоторую частичную активацию при самой высокой протестированной концентрации.

Таблица 13
Активация в анализе THP1/LXR-LUC/HER2 агонистами LXR и NCADC

| | Проверенная молекула | Максимальная активация | EC ₅₀ (нМ) |
|---|---------------------------------|------------------------|-----------------------|
| 1d производные псADC и свободная полезная нагрузка | | | |
| | 1d, полезная нагрузка Eх48 и 49 | Полная активация | 2,8 |
| | Анти Her2 Ab-Eх48 | Полная активация | 0,8 |
| | Контроль изотипа Ab-Eх48 | Частичная активация | Н/П |
| | Анти Her2 Ab-Eх49 | Полная активация | 0,7 |
| | Контроль изотипа Ab-Eх49 | Минимальная активация | Н/П |
| 1f производные псADC и свободная полезная нагрузка | | | |
| | 1f, полезная нагрузка Eх55 | Полная активация | 0,7 |
| | Анти-Her2 Ab-Eх55 | Полная активация | 0,5 |
| | Контроль изотипа Ab-Eх55 | Частичная активация | Н/П |
| | Анти-Her2 Ab | Минимальная активация | Н/П |

Н/П = неприменимо.

См. также J. Am. Chem. Soc., 2012, 134(46), 19108-19117; Org. Biomol. Chem., 2009, 7(8), 1680-1688 и US 2015/284416 A1; Angew. Chem. Int. Ed., 2011, 50(47), 11117-11120; J. Am. Chem. Soc, 2012, 134 (46), 18886-18888; Synthesis (Германия), 2014 г. 46 (5), 669-677.

Пример 73.

Чтобы определить влияние на эффективность расщепления на полезную нагрузку стероида или агониста LXR, когда в линкер был добавлен циклодекстриновый фрагмент, был выполнен анализ расщепления катепсином В. Для анализа исходный раствор линкер-полезная нагрузка (10 мМ линкер-полезная нагрузка в DMSO) добавляли в раствор 100 мМ NaOAc, 10 мМ дитиотреитола при pH 5, чтобы получить раствор субстрата 50 мкМ. Катепсин В печени человека (Athens Research & Technology, кат. № 16-12-030102) в 50 мМ NaOAc, 1 мМ ЭДТА, при pH 5, добавляли к раствору субстрата. Катепсин В и раствор субстрата смешивали с и без 10 мМ ингибитора катепсина В (CA074; APE Bio, кат. № A1926) и инкубировали при 37°C в течение 4 ч. После 4-часовой инкубации добавляли уксусную кислоту и затем ацетонитрил, чтобы остановить реакцию. Затем погашенные образцы подвергали центрифугированию при 14000 об/мин. Аликвоты полученных супернатантов затем разбавляли равным объемом воды и анализировали методом ЖХ/МС для определения количества высвобождаемой полезной нагрузки. Стабильность и активность катепсина В подтверждали инкубацией с 200 мкМ флуорогенного субстрата для катепсина В (Santa Cruz Biotechnology, кат. № 207975) (флуоресценция при возбуждении 340 нм/ испускание 425 нм).

Как показано в табл. 14, полезная нагрузка агонистического линкера LXR без циклодекстрина имела 13,6% свободного высвобождения полезной нагрузки при обработке катепсином В в течение 4 ч, тогда как полезная нагрузка агонистического линкера LXR с циклодекстрином имела 38,5% свободного высвобождения полезной нагрузки при обработке катепсином В в течение 4 ч. Полезная нагрузка стероид-

ного линкера без циклодекстрина составляла от 7,5 до 17,2% от высвобождения свободной полезной нагрузки при обработке катепсином В в течение 4 ч, тогда как полезная нагрузка стероидного линкера с циклодекстрином составляла 28,9% от свободной нагрузки полезной нагрузки при обработке катепсином В в течение 4 ч.

Таблица 14

Количество полезной нагрузки, высвобождаемой из линкер-полезных нагрузок с циклодекстриновым фрагментом и без него, в анализе с катепсином В

| Полезная нагрузка | Тип полезной нагрузки | Линкер-полезная нагрузка (LP) | Модификация линкера | Процент полезной нагрузки, высвобождаемый в течение 4 часов |
|-------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------------|---|
| 1d | Агонист LXR | Ex 48 | Без циклодекстрина | 13,6 % |
| | | Ex 49 | Циклодекстрин | 38,5% |
| 1h | Стероид | Ex 58 | Без циклодекстрина | 7,5 - 17,2% |
| | | Ex 59 | Циклодекстрин | 28,9 % |

Пример 74.

Для определения влияния добавления линкера циклодекстрина на активность нецитотоксических ADC агониста LXR антитела против MSR1-антитела был разработан *in vitro* анализ на основе LXR-чувствительной репортерной люциферазы. Для создания линии клеток для анализа в клетки THP1 трансдуцировали LXR-регулируемый репортерный ген люциферазы [Signal Lenti LXR Reporter (luc) kit (Qiagen, кат. № CLS-001L)] и клетки отбирали в течение двух недель в пуромидине. Lentivirus экспрессирует ген люциферазы светлячка под контролем минимального промотора CMV и tandemных повторов элемента транскрипционного ответа LXR. Полученная клеточная линия упоминается как клетки THP1/LXR-Luc.

Для анализа клетки THP1/LXR-Luc высевали на 96-луночные планшеты при 40000 клеток/лунку в среде, содержащей RPMI, дополненную 10% FBS и пенициллин/стрептомицин, и затем дифференцировали с помощью 200 нМ форболмиристацетата в течение 3 дней. После 3-дневной дифференциации к клеткам добавляли трехкратные серийные разведения конъюгатов лекарственных препаратов антител в свежей среде в конечной концентрации в диапазоне от 100 нМ до 0,01 нМ. Последняя лунка в планшете служила в качестве холостого контроля, содержащего только носитель. Через сорок восемь часов активность люциферазы определяли после добавления реагента One-Glo™ (Promega, кат. № E6130) в каждую лунку. Относительные световые единицы (RLU) измеряли на люцинометре Victor (PerkinElmer), а значения EC₅₀ определяли с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по кривой отклика на дозу из 10 точек (GraphPad Prism). Значение EC₅₀ для каждой протестированной молекулы показано в табл. 15. Отношение сигнал/шум (S/N) определяли путем расчета RLU стандарта один на RLU стандарта восемь для каждого из антител против MSR1.

Как показано в табл. 15, H1H21234N-N297Q, конъюгированный с полезной нагрузкой агонистического линкера LXR без циклодекстрина (H1H21234N-N297Q-Ex 48), продемонстрировал стимуляцию клеток THP1/LXR-Luc со значением EC₅₀ 1,77 нМ и значением S/N, равным 16. H1H21234N-N297Q, конъюгированный с полезной нагрузкой агонистического линкера LXR, со стимулированием циклодекстрином (H1H21234N-N297Q-Ex49) клеток THP1/LXR-Luc со значением EC₅₀ 1,99 нМ и значением S/N, равным 17.

Таблица 15

Активность NCADC-агонистов АВ-LXR против MSR1 в анализе на основе клеток THP1/LXR-LUC

| Полезная нагрузка | Тип полезной нагрузки | Линкер-полезная нагрузка (LP) | ncADC | 48-часовой EC ₅₀ (M) | S/N |
|-------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------------|-----|
| 1d | Агонист LXR | Ex 48 | H1H21234N-N297Q-Ex 48 | 1.77E-09 | 16 |
| | | Ex 49 | H1H21234N-N297Q-Ex 49 | 1.99E-09 | 17 |

Пример 75.

Чтобы определить, был ли какой-либо эффект от добавления линкера циклодекстрина к активности нецитотоксических ADC стероидных антител против MSR1, был проведен анализ высвобождения IL-1β, опосредованный липополисахаридом (LPS) *in vitro*. Для анализа клетки THP1 высевали на 96-луночные планшеты при 40000 клеток/лунку в среде, содержащей RPMI, дополненную 10% FBS и пенициллин/стрептомицин, далее дифференцировали с помощью 200 нМ форболмиристацетата (ФМА) в течение

3 дней. После 3-дневной дифференциации к клеткам добавляли трехкратные серийные разведения конъюгатов лекарственных препаратов антител в свежей среде в конечной концентрации в диапазоне от 100 нМ до 0,01 нМ. Последняя лунка была оставлена как холостой контроль, содержащий только носитель. Спустя семьдесят два часа клетки обрабатывали 5 мкг/мл LPS (InVivoGen, кат. № tlrl-eklps) в течение 5 ч. Затем клеточную среду собирали и измеряли IL-1 с использованием набора V-PLEX Proinflammatory Panel 1 (провоспалительный набор 1) для людей (Meso Scale Diagnostics, кат. № 15049D-2) в соответствии с инструкциями производителя. Впоследствии планшет считывался на планшетном ридере MSD (Meso Scale Discovery). Значения IC₅₀ определяли из четырехпараметрического логистического уравнения по кривой отклика из 10 точек (GraphPad Prism). Все значения IC₅₀ выражены в молярной (M) концентрации.

Как показано в табл. 16, H1H21234N-N297Q, конъюгированный с полезной нагрузкой стероидного линкера без циклодекстрина (H1H21234N-N297Q-Ex58), продемонстрировал ингибирование опосредованного LPS высвобождения IL-1 β из клеток THP1 со значением IC₅₀ 1,73 нМ и снижением высвобождаемого IL-1 β до 97,2 пг/мл. H1H21234N-N297Q, конъюгированный с полезной нагрузкой стероидного линкера без циклодекстрина (H1H21234N-N297Q-EX 59), продемонстрировал аналогичное ингибирование опосредованного LPS высвобождения IL-1 β из клеток THP1 со значением IC₅₀ 1,33 нМ и снижением высвобождения IL-1 β до 126,46 пг/мл. Неконъюгированное антитело демонстрировало ингибирование опосредованного LPS высвобождения IL-1 β из клеток THP1 со значением IC₅₀ 22,9 нМ и снижением высвобождения IL-1 β до 343,7 пг/мл, что указывает на недостаточную эффективность по сравнению с конъюгированными антителами.

Таблица 16
Активность анти-MSR1 Ab-стероидных psadc в отношении индуцированного lps высвобождения IL-1 β из клеток THP1

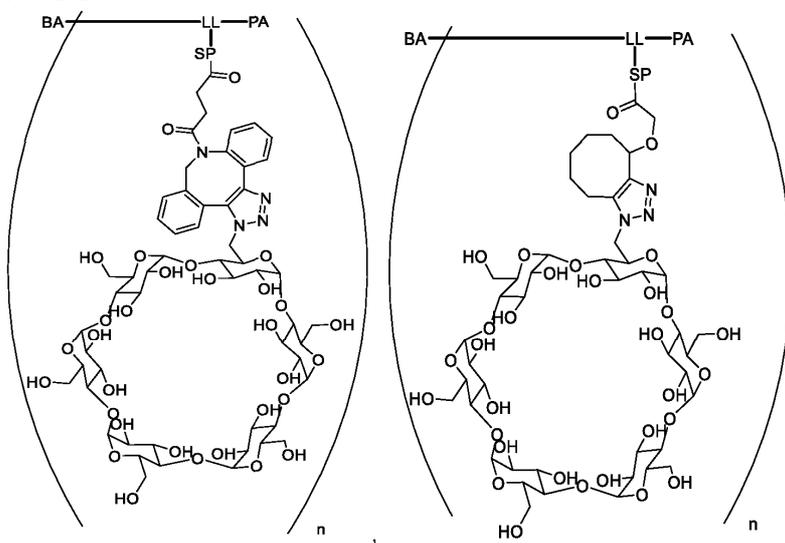
| Полезная нагрузка | Тип полезной нагрузки | Линкер-полезная нагрузка (LP) | psADC | 72-часовой IC ₅₀ (M) | IL1бета, высвобождаемый при максимальной концентрации (пг/мл) |
|-------------------|-----------------------|-------------------------------|--|---------------------------------|---|
| 1h | Стероид | Ex 58 | H1H21234N-N297Q-Ex 58 | 1.73E-09 | 97,24 |
| | | Ex 59 | H1H21234N-N297Q-Ex 59 | 1.33E-09 | 126,46 |
| н/п | н/п | н/п | H1H21234N-N297Q (неконъюгированное Ab) | 2.29E-08 | 343,7 |

Варианты осуществления и примеры, описанные выше, предназначены только для иллюстрации и не являются ограничивающими. Специалисты в данной области техники узнают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретных соединений, материалы и процедуры. Все такие эквиваленты входят в объем настоящего изобретения и предусмотрены прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

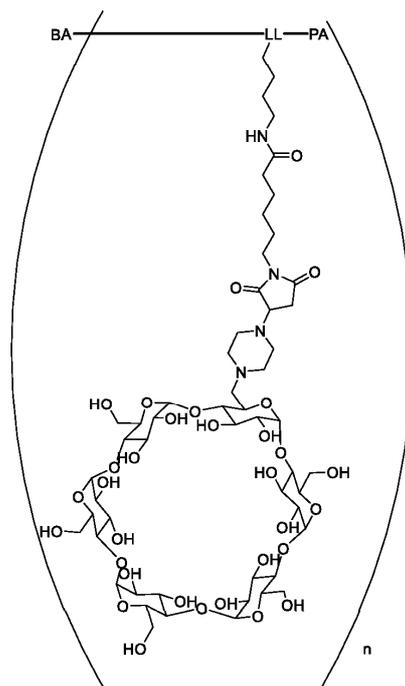
1. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль,
где соединение

(i) соответствует формуле (Ib1), (Ib2) или (Ic1)



(Ib1)

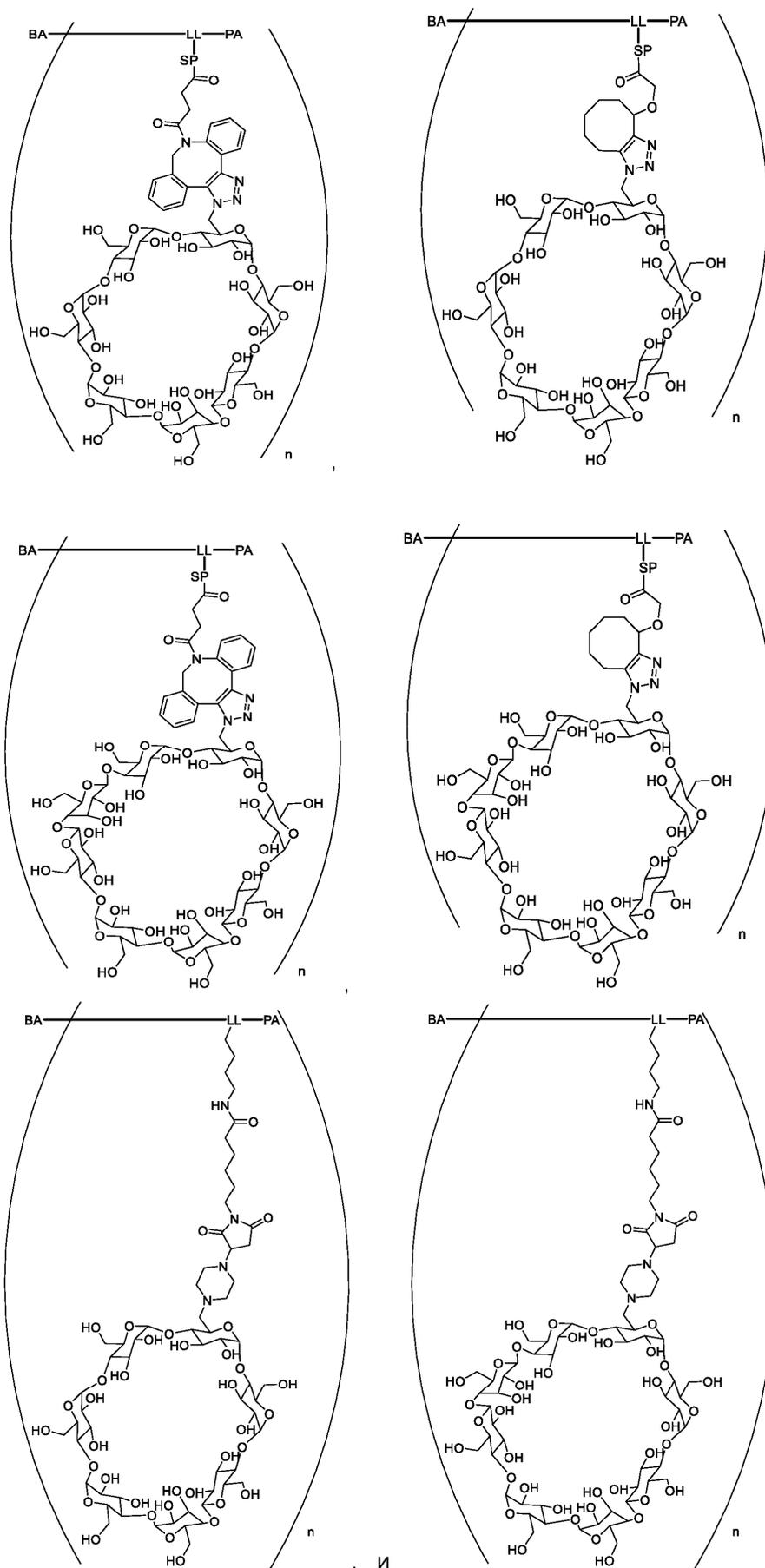
(Ib2)



(Ic1);

или

(ii) соответствует формуле, выбранной из:



где BA представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;
LL представляет собой трехвалентный линкер, содержащий аминокислотный остаток;

SP независимо в каждом случае либо отсутствует, либо является остатком спейсерной группы, выбранной из C₁₋₆алкилена, -NH-, -C(O)-, -(CH₂-CH₂-O)_e, -NH-CH₂-CH₂-(-O-CH₂-CH₂)_e-C(O)-, -C(O)-(CH₂)_u-C(O)-, -C(O)-NH-(CH₂)_v- и их комбинации;

нижний индекс n представляет собой целое число от 1 до 30;

e представляет собой целое число от 0 до 4;

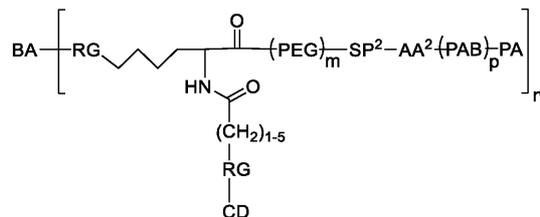
u представляет собой целое число от 1 до 8;

v представляет собой целое число от 1 до 8; и

PA представляет собой полезную нагрузку; или

его региоизомер; или

(iii) соответствует формуле (Ie):



(Ie)

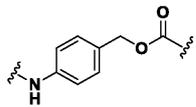
где BA представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

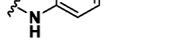
RG независимо в каждом случае представляет собой остаток реакционноспособной группы, включающей сукцинимид, триазол или конденсированный триазол;

SP² независимо в каждом случае отсутствует или является остатком спейсерной группы, выбранным из C₁₋₆алкилена, -NH-, -C(O)-, -(CH₂-CH₂-O)_e, -NH-CH₂-CH₂-(-O-CH₂-CH₂)_e-C(O)-, -C(O)-(CH₂)_u-C(O)-, -C(O)-NH-(CH₂)_v- и их комбинации;

AA² представляет собой дипептидный остаток;

PEG представляет собой полиэтиленгликолевый остаток;



PAB представляет собой , где  указывает атом, через который PAB связан со смежными группами в формуле;

CD представляет собой циклодекстриновый остаток;

n представляет собой целое число от 1 до 30;

m представляет собой целое число от 0 до 5;

r равен 0 или 1;

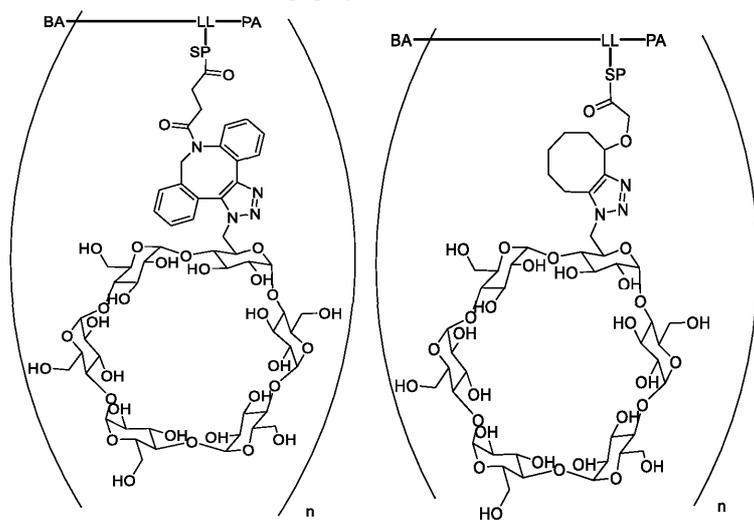
e представляет собой целое число от 0 до 4;

u представляет собой целое число от 1 до 8;

v представляет собой целое число от 1 до 8; и

PA представляет собой полезную нагрузку.

2. Соединение по п.1 в соответствии с формулой (Ib1) или (Ib2):

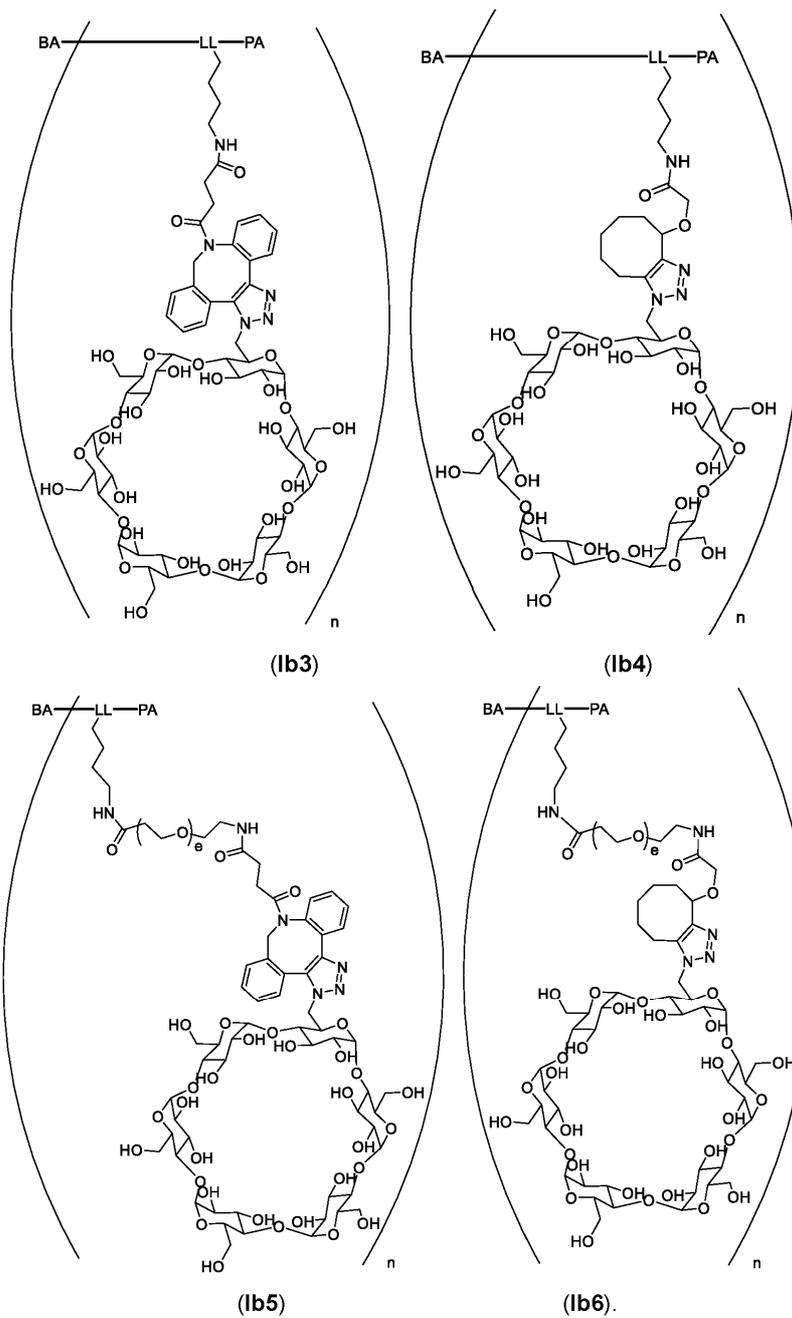


(Ib1)

(Ib2)

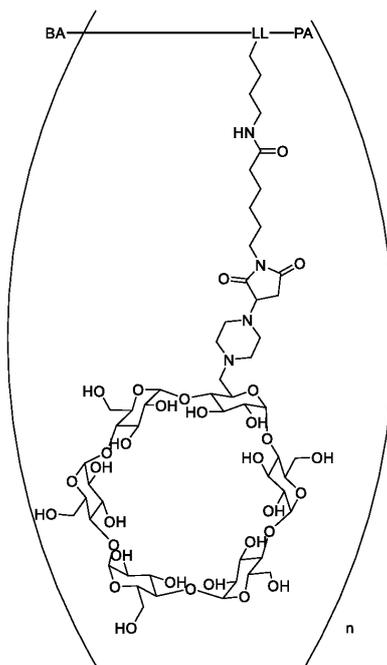
или его региоизомер.

3. Соединение по п.1 или 2 в соответствии с формулой (Ib3), (Ib4), (Ib5) или (Ib6)



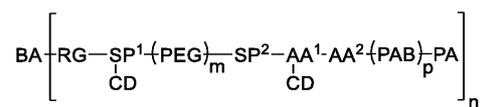
или их региоизомер.

4. Соединение по п.1 в соответствии с формулой (Ic1):



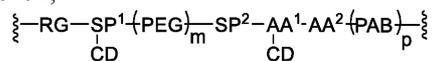
(Ic1).

5. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение соответствует формуле (Id):

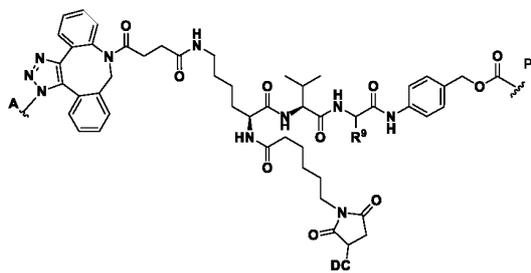
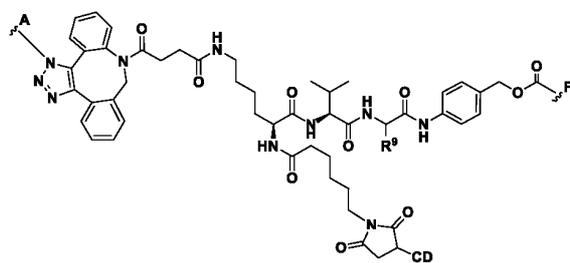
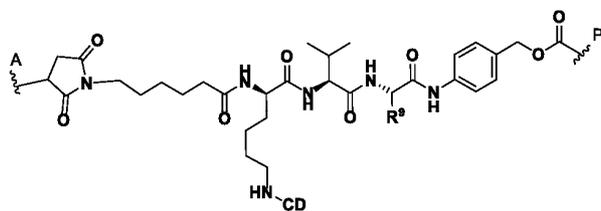
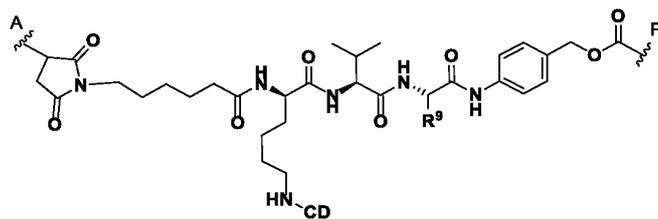


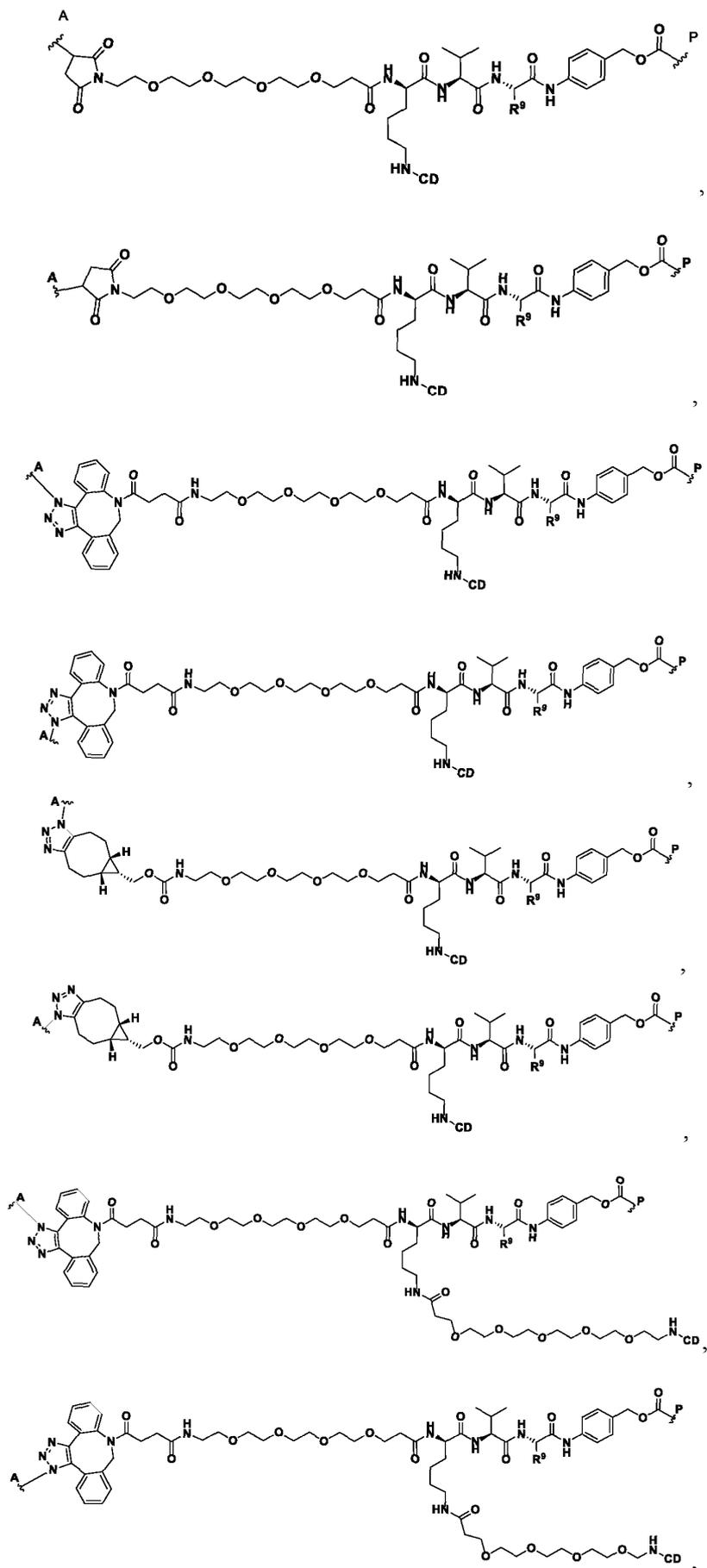
(Id)

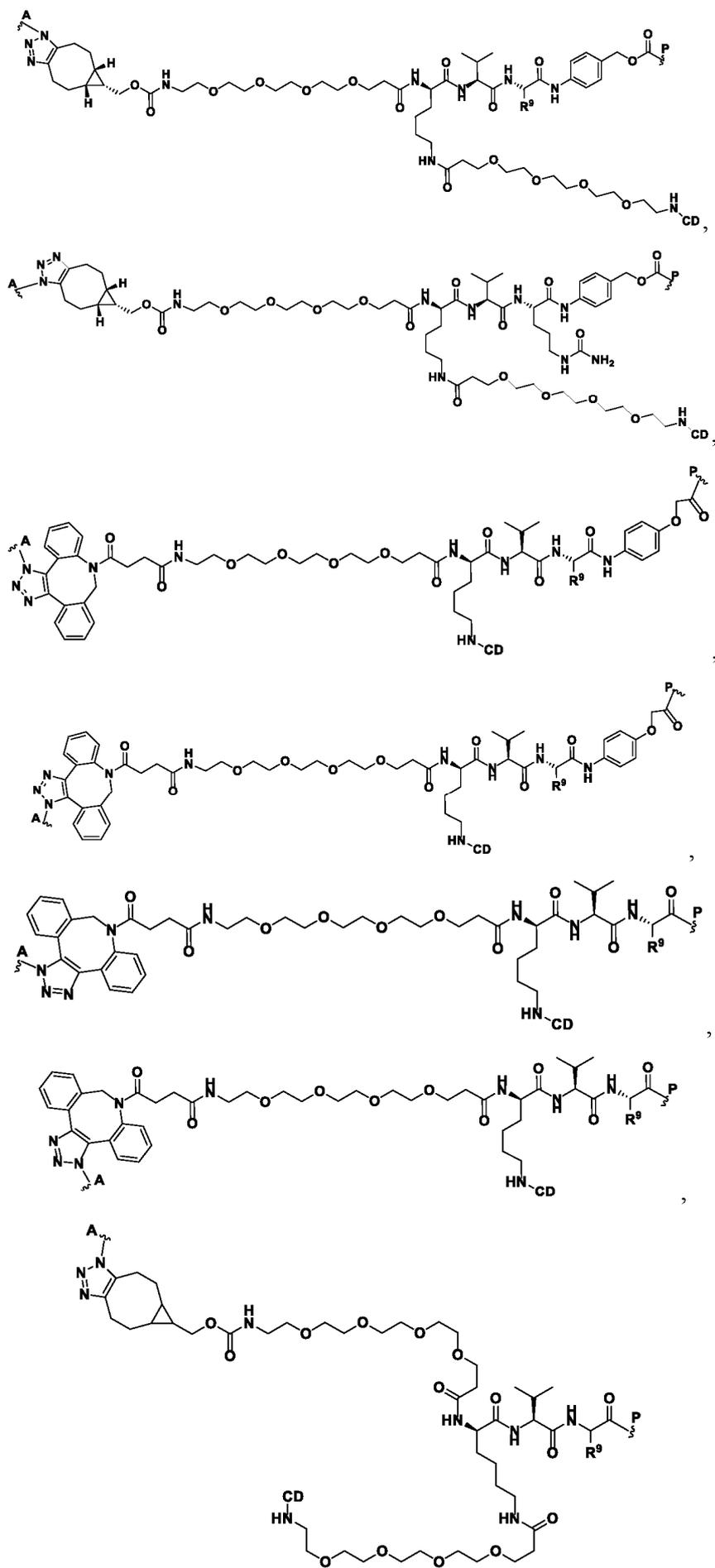
где BA представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;
PA является полезной нагрузкой; и

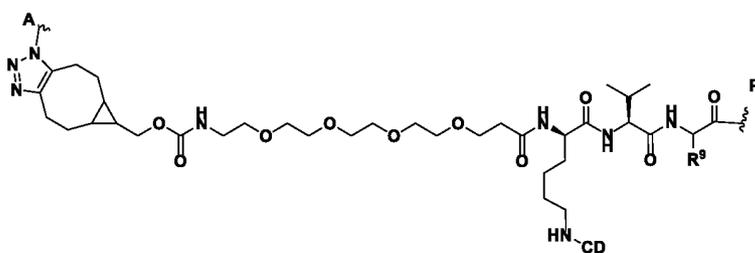
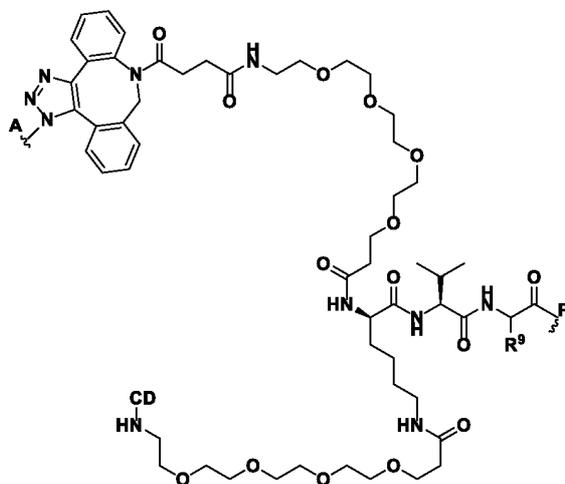
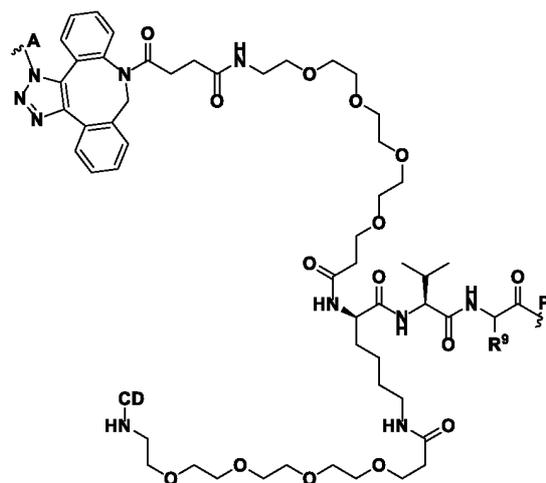
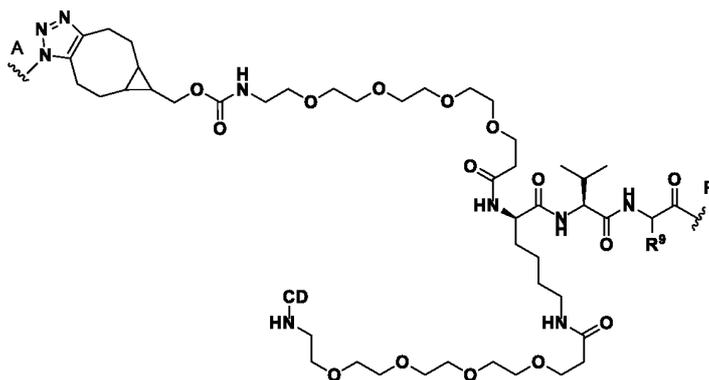


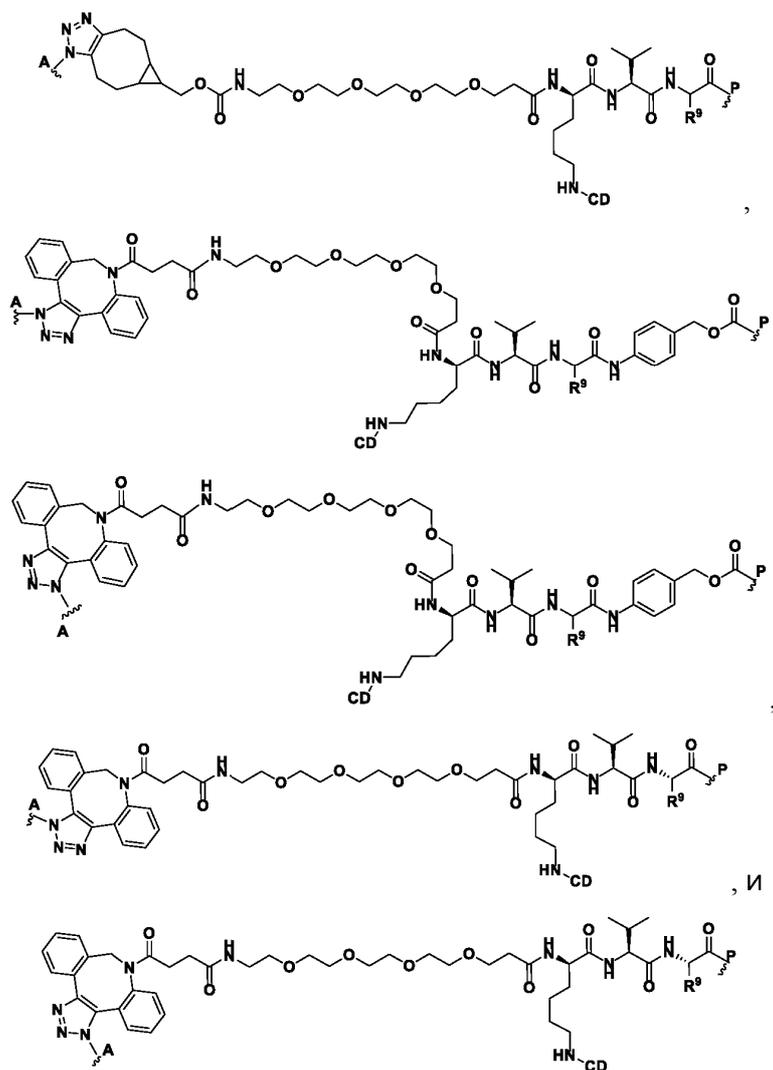
выбирается из группы, состоящей из









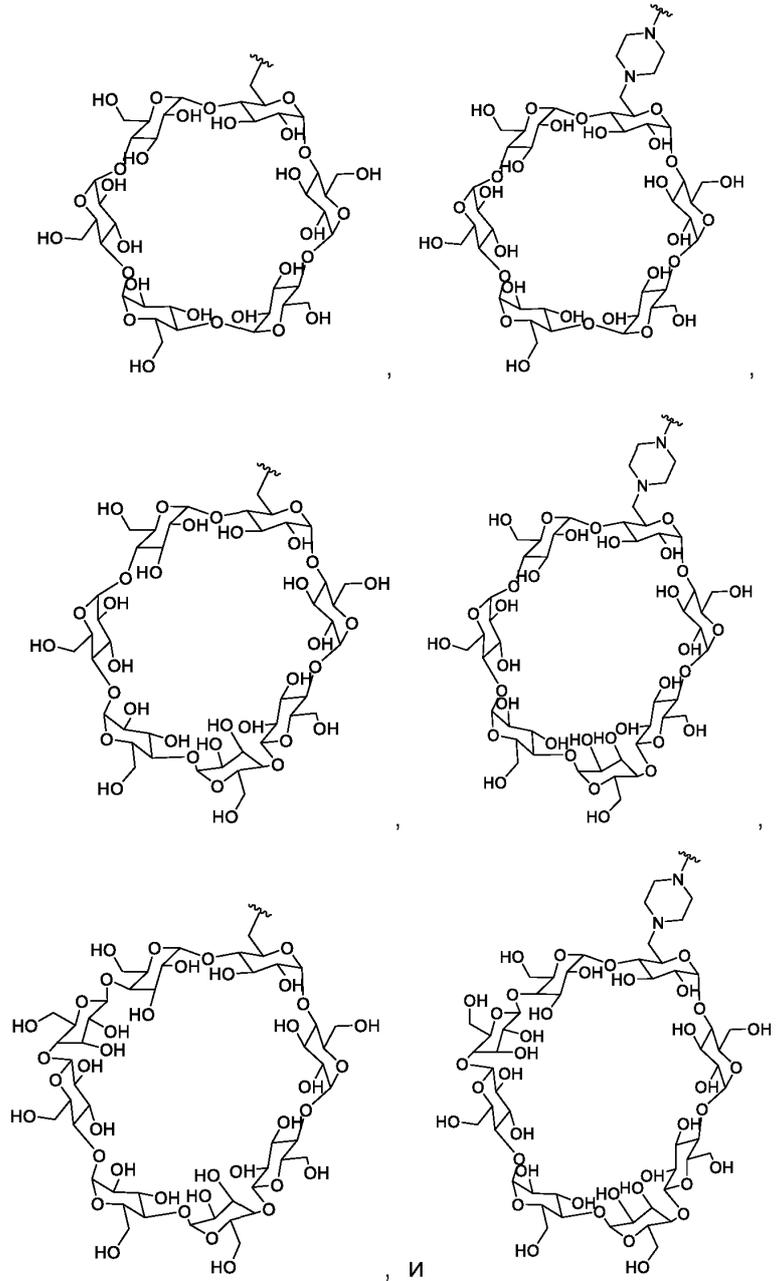


или фармацевтически приемлемая соль, или их региоизомер,

где каждый  представляет собой связь с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом;

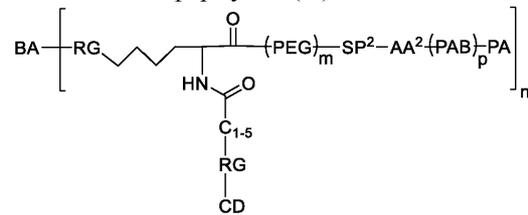
каждый  представляет собой связь с полезной нагрузкой;

CD представляет собой циклодекстриновый остаток, выбираемый из



где  указывает атом, через который циклодекстрин связан со смежными группами в формуле; и R^9 представляет собой $-\text{CH}_3$ или $-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$.

6. Соединение по п.1 в соответствии с формулой (Ie):

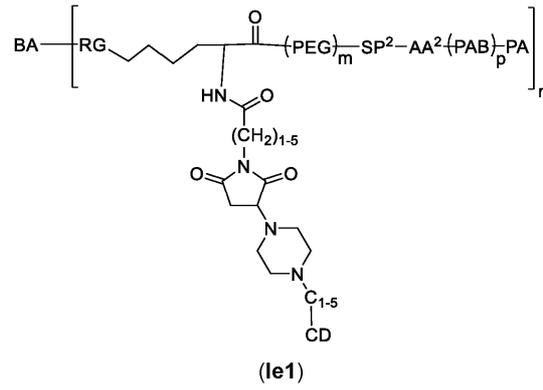


(Ie)

или его региоизомер.

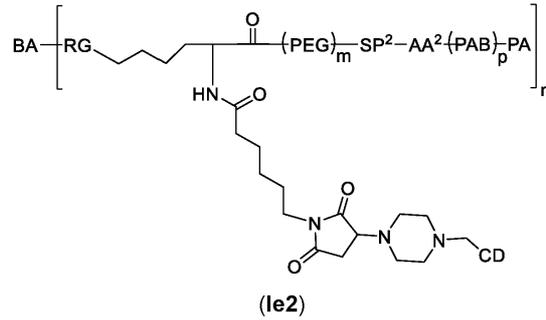
7. Соединение по п.6 в соответствии с формулой (Ie1):

046545



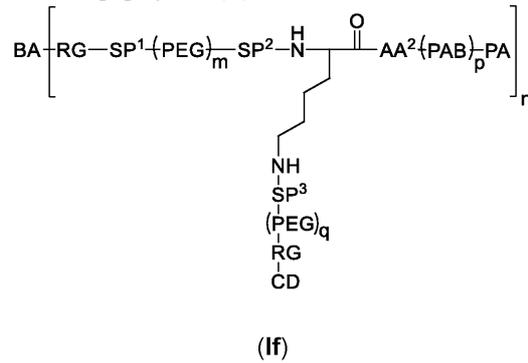
или его региоизомер.

8. Соединение по п.7 в соответствии с формулой (Ie2):

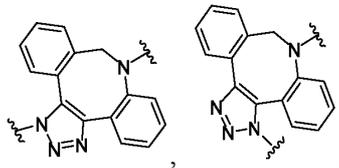


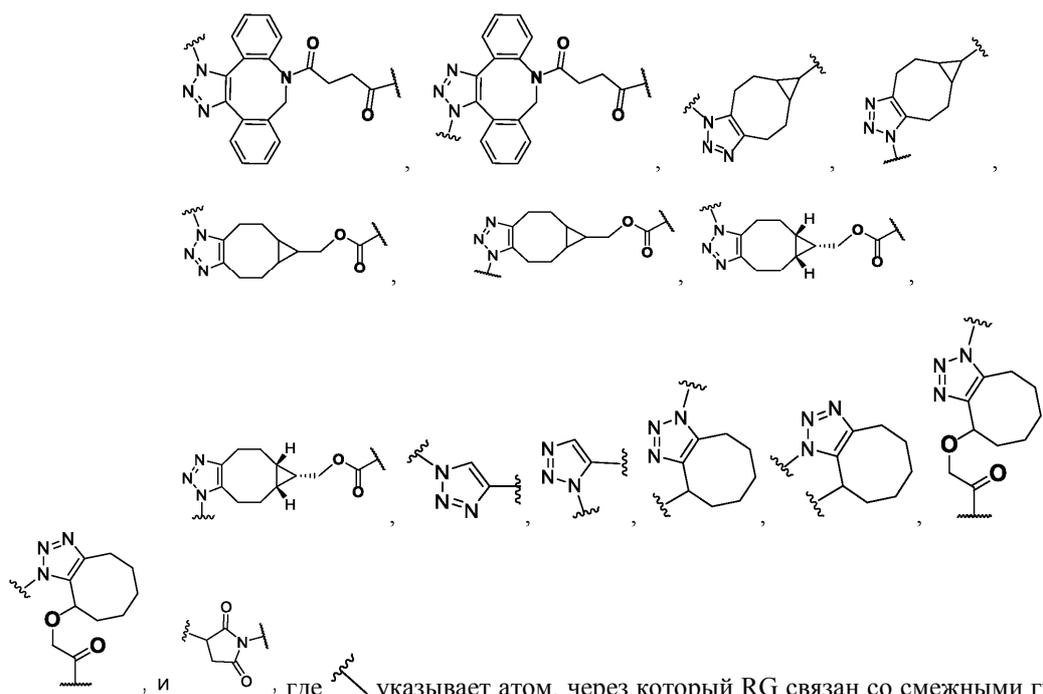
или его региоизомер.

9. Соединение в соответствии с формулой (If):



где ВА представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;
RG независимо в каждом случае представляет собой остаток реакционноспособного линкера, вы-
бранный из

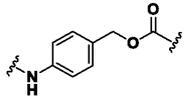




SP¹, SP² и SP³ каждый, независимо в каждом случае, отсутствует или является остатком спейсерной группы, выбранной из C₁₋₆алкилена, -NH-, -C(O)-, -(CH₂-CH₂-O)_e, -NH-CH₂-CH₂-(-O-CH₂-CH₂)_e-C(O)-, -C(O)-(CH₂)_u-C(O)-, -C(O)-NH-(CH₂)_v- и их комбинации;

AA² представляет собой дипептидный остаток;

PEG представляет собой полиэтиленгликолевый остаток;

РАВ представляет собой , где  указывает атом, через который РАВ связан со смежными группами в формуле;

CD представляет собой циклодекстриновый остаток;

нижний индекс n представляет собой целое число от 1 до 30, например от 1 до 4;

нижний индекс m представляет собой целое число от 0 до 5;

нижний индекс q представляет собой целое число от 0 до 5;

нижний индекс p равен 0 или 1;

e представляет собой целое число от 0 до 4;

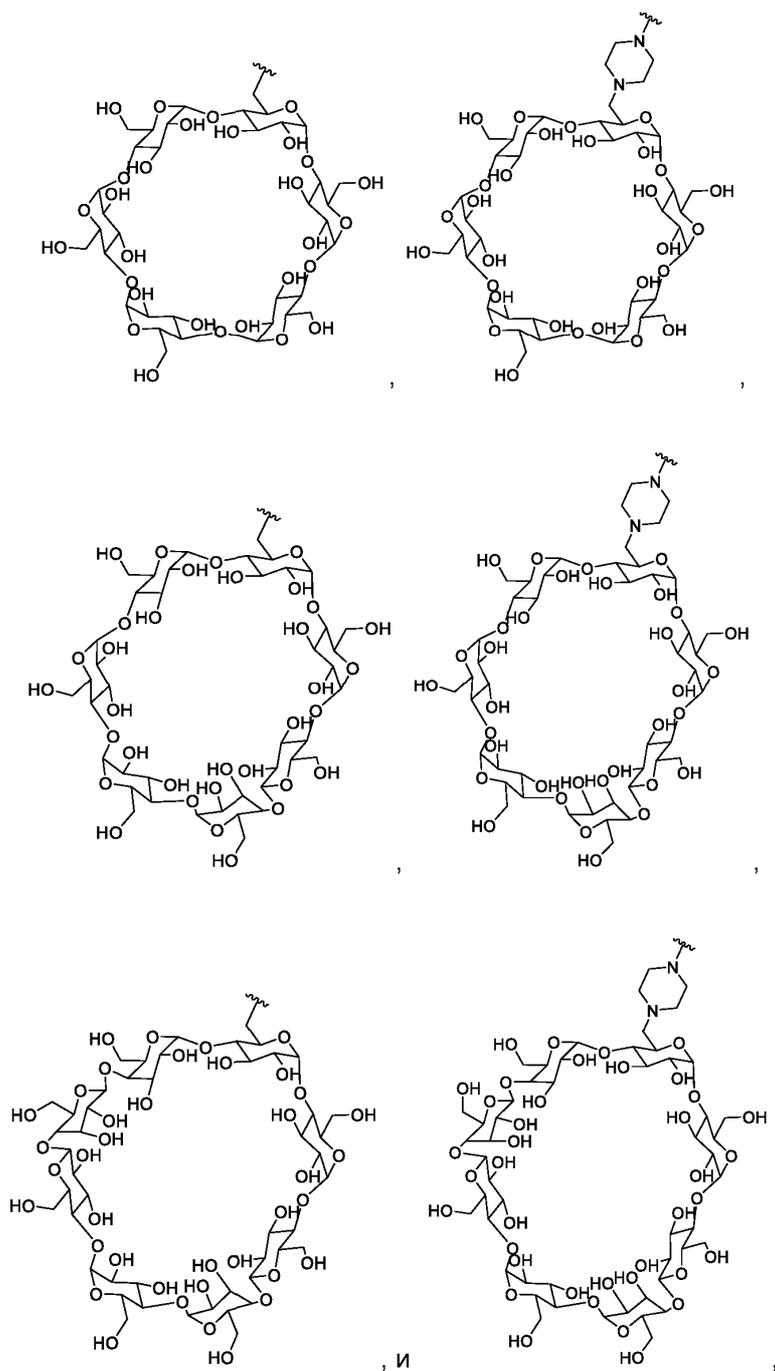
u представляет собой целое число от 1 до 8;

v представляет собой целое число от 1 до 8;

РА представляет собой полезную нагрузку; или его региоизомер.

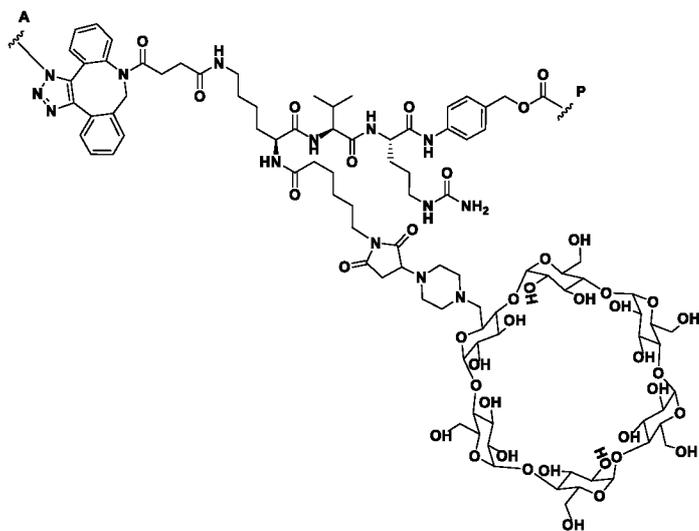
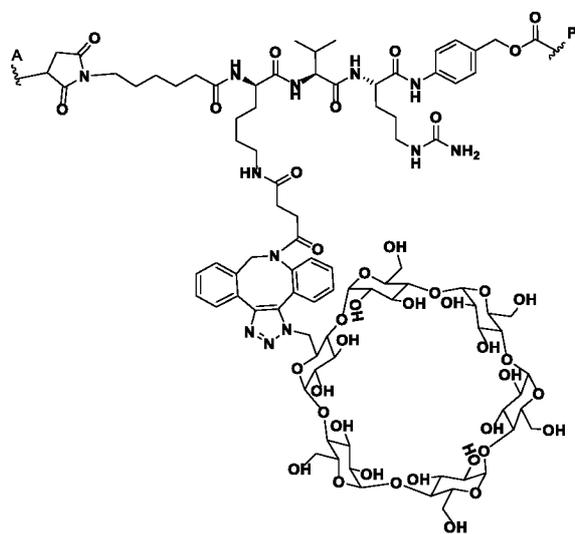
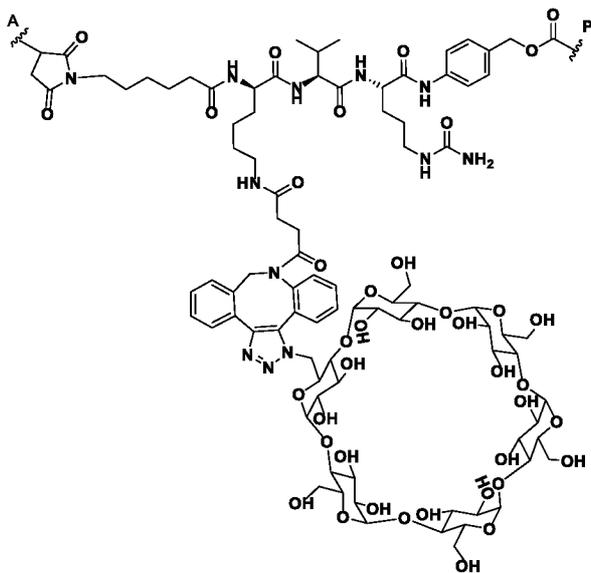
10. Соединение по любому из пп.1 и 6-9, где CD независимо в каждом случае выбран из группы, состоящей из α-циклодекстрина, β-циклодекстрина и γ-циклодекстрина.

11. Соединение по любому из пп.1 и 6-9, где CD независимо в каждом случае выбран из группы, включающей

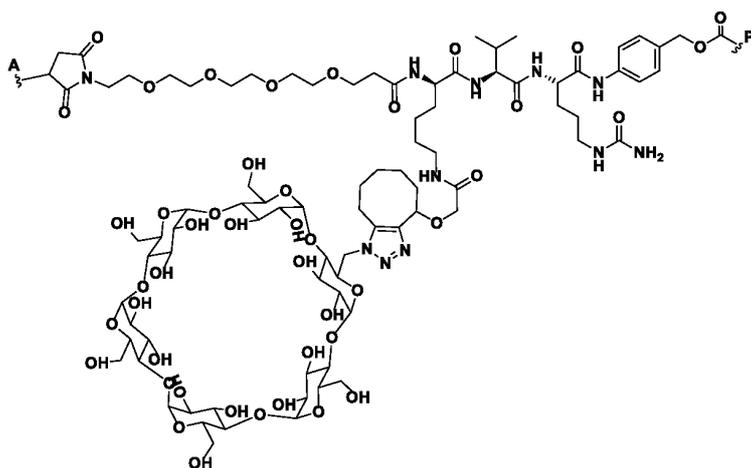
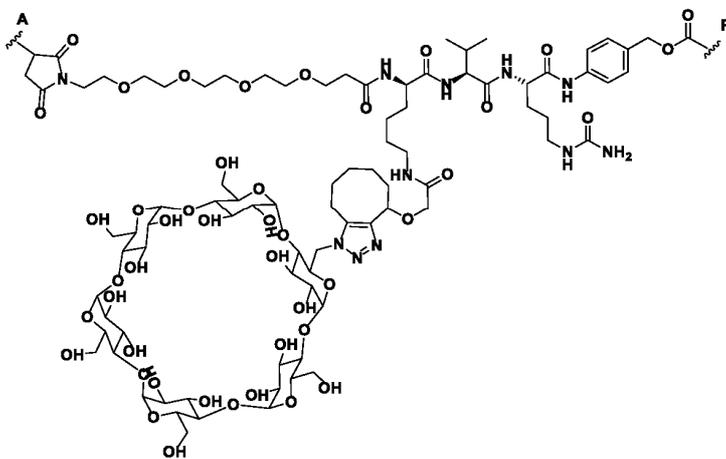
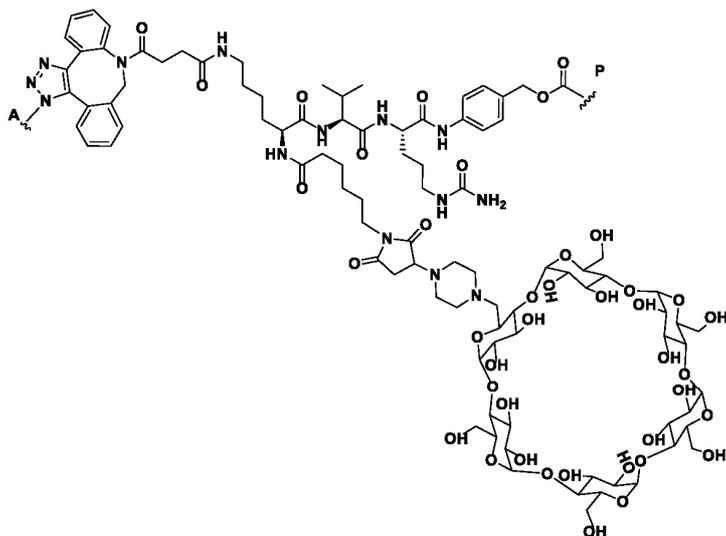


где  обозначает атом, через который CD связан с соседними группами в формуле.
 12. Соединение по п.1, включающее группу, выбранную из группы, состоящей из

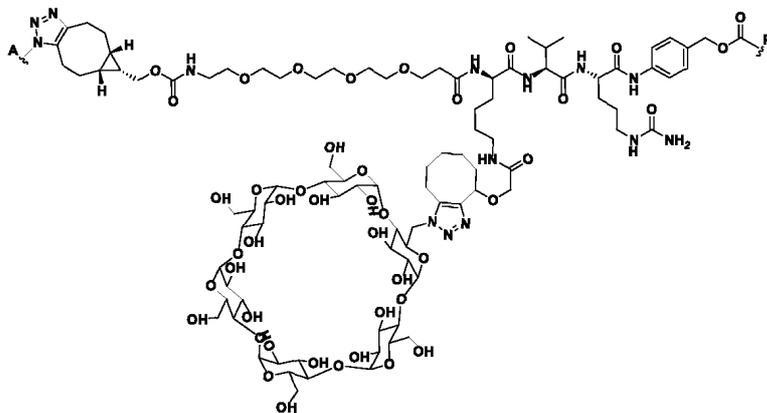
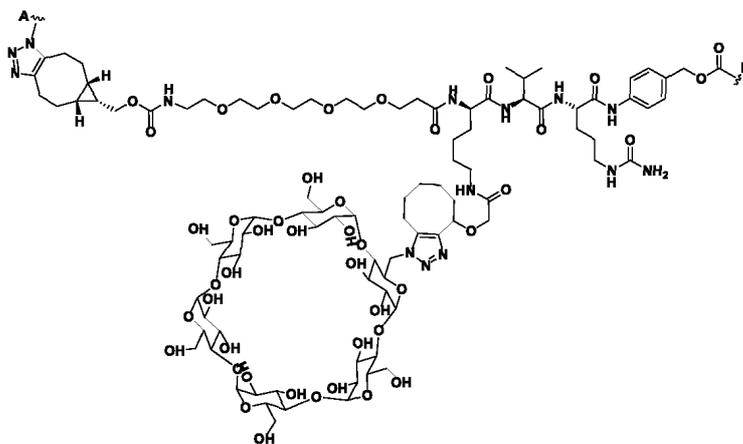
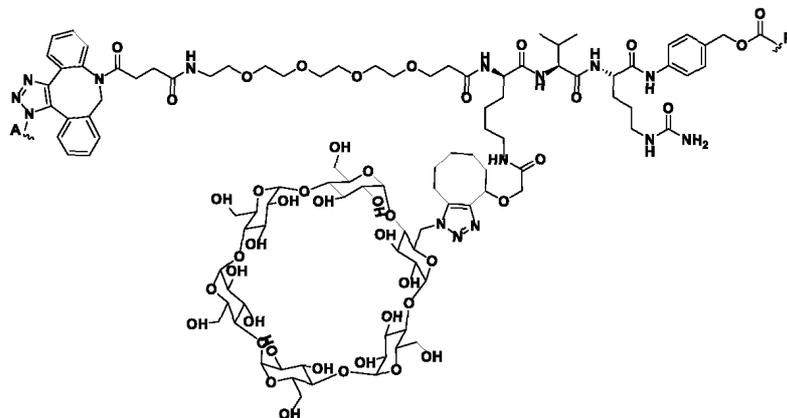
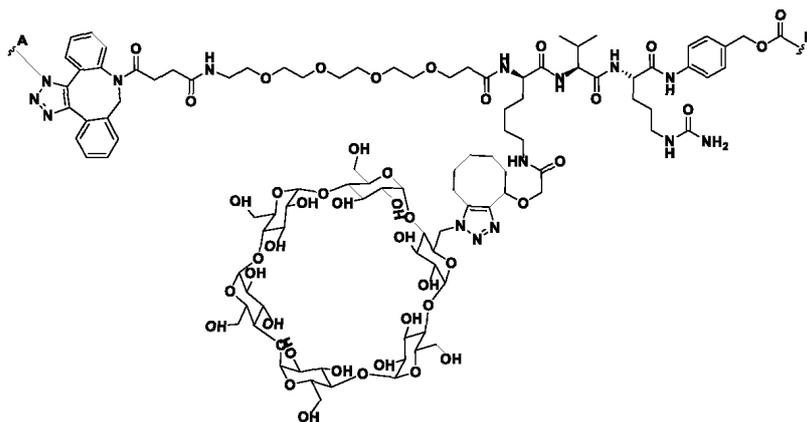
046545

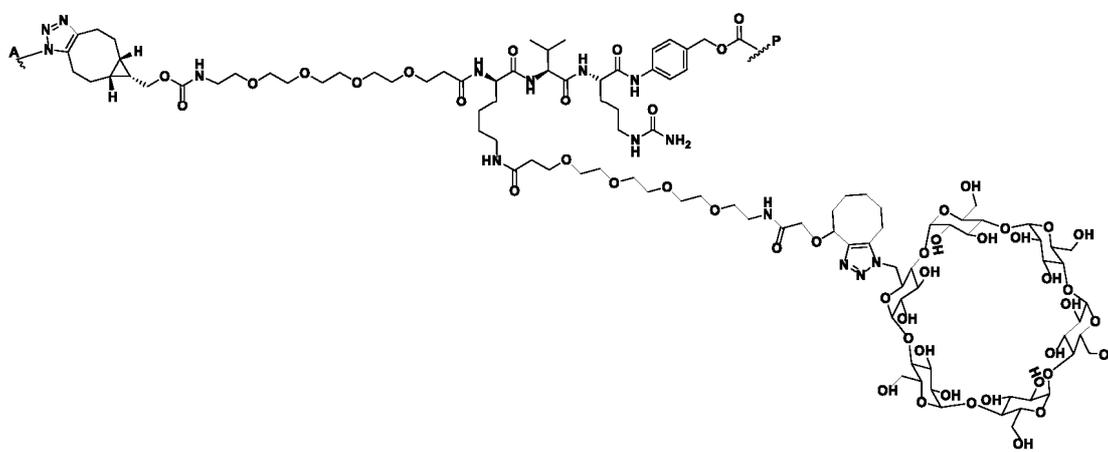
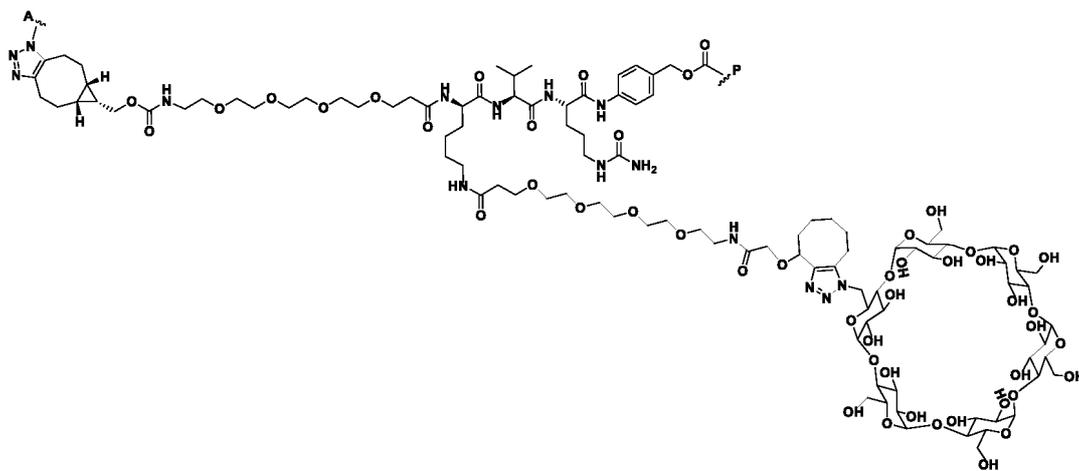
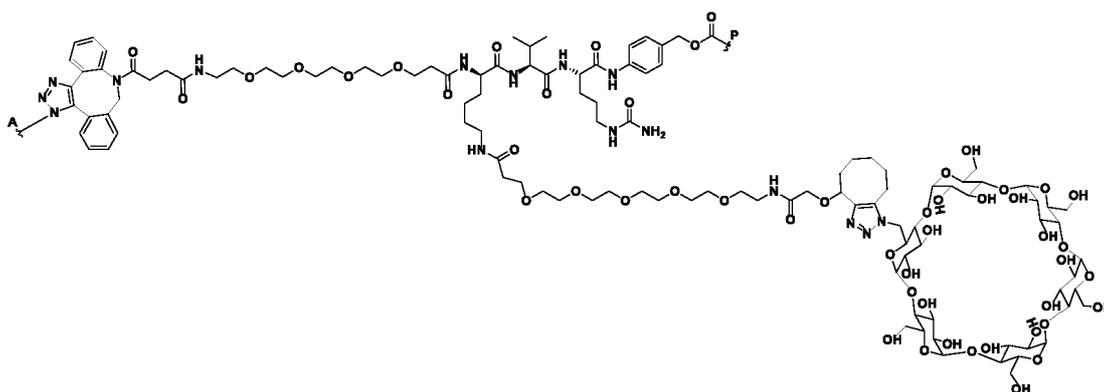
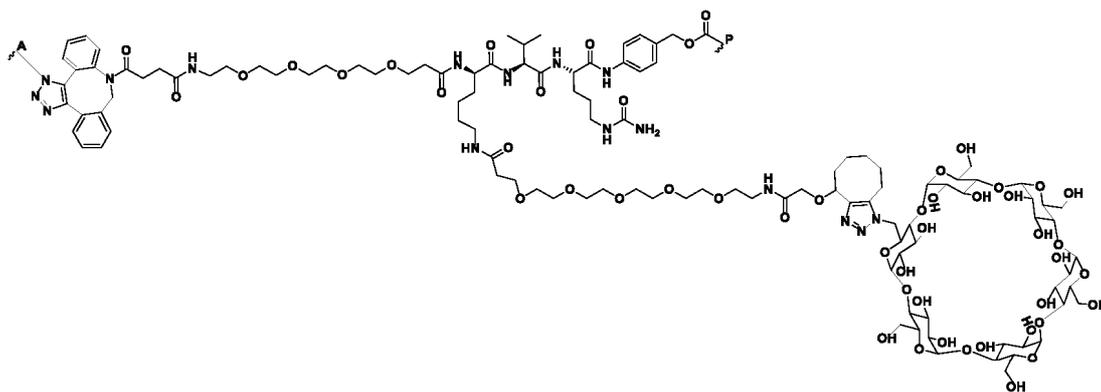


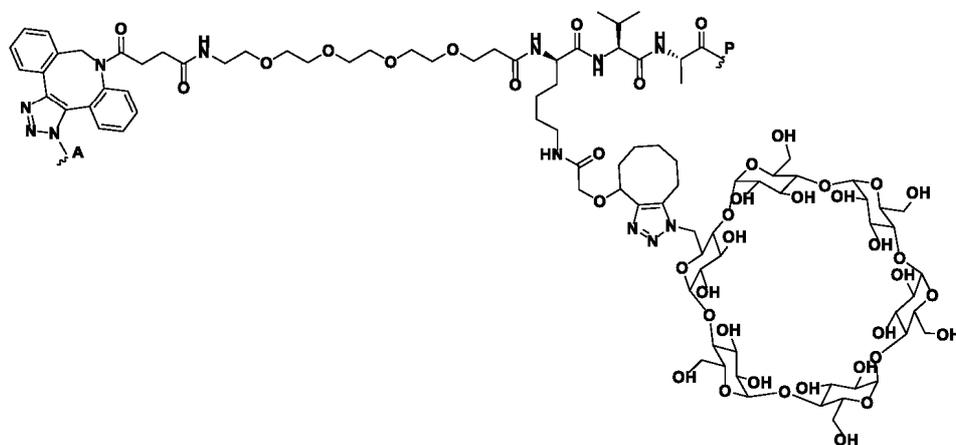
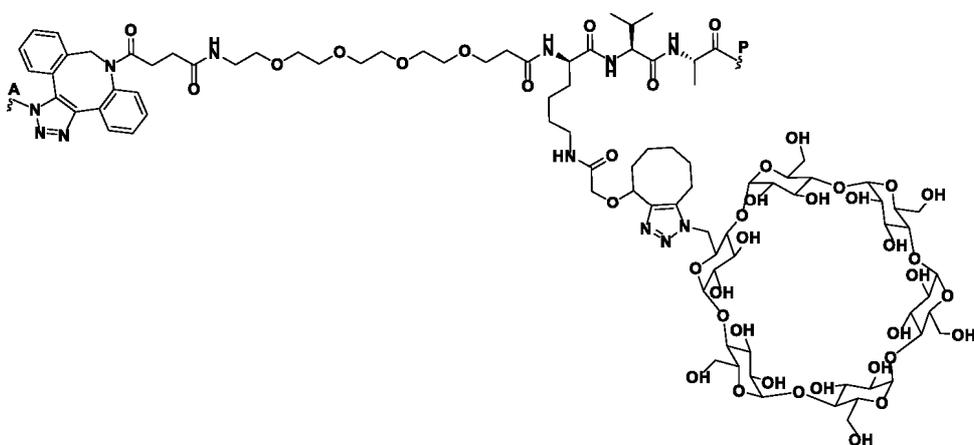
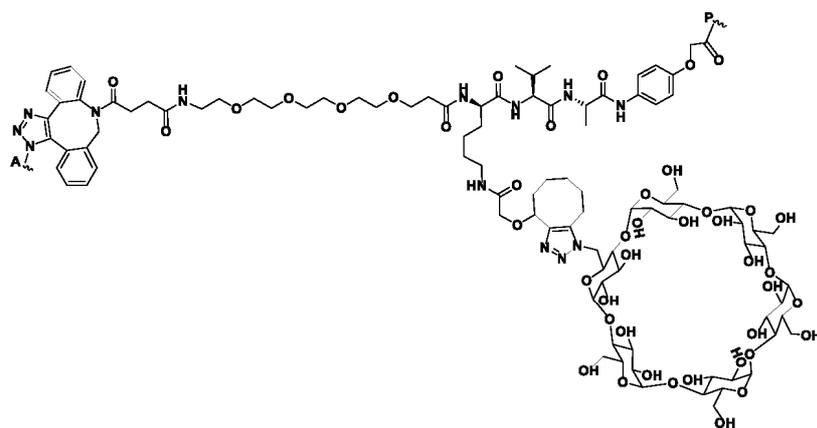
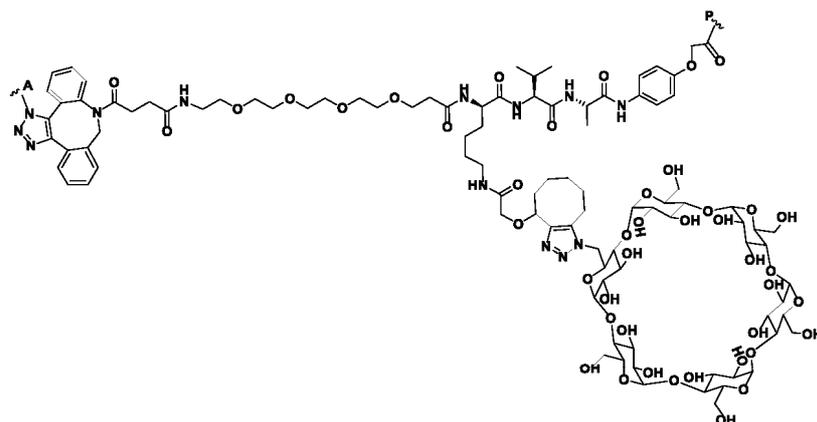
046545

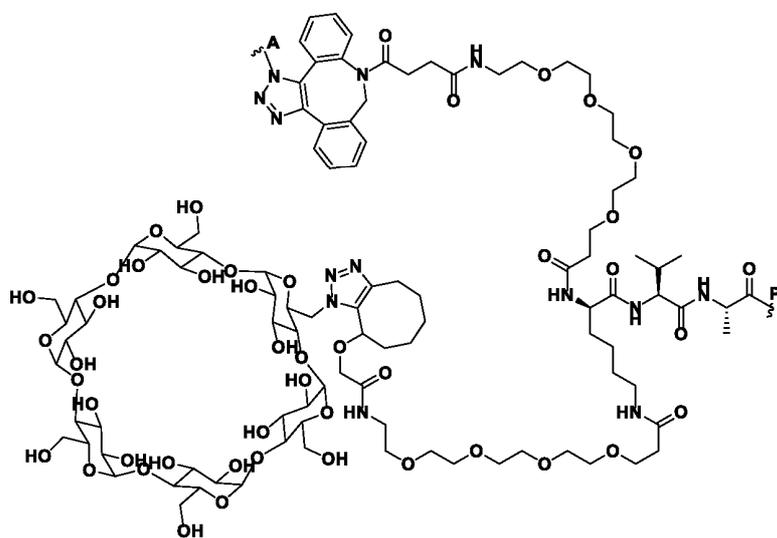
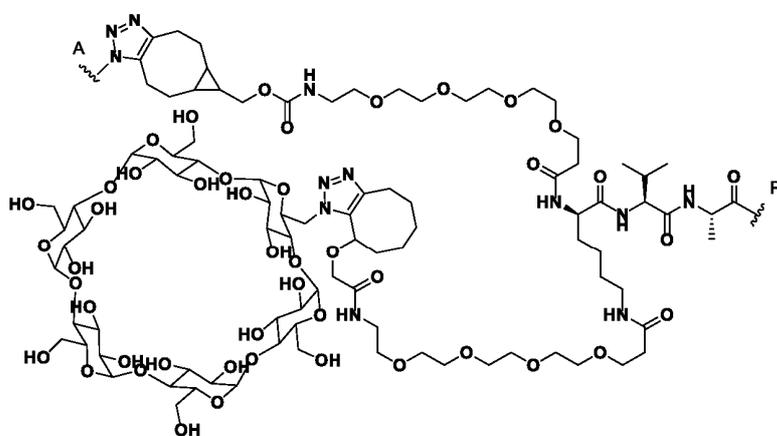
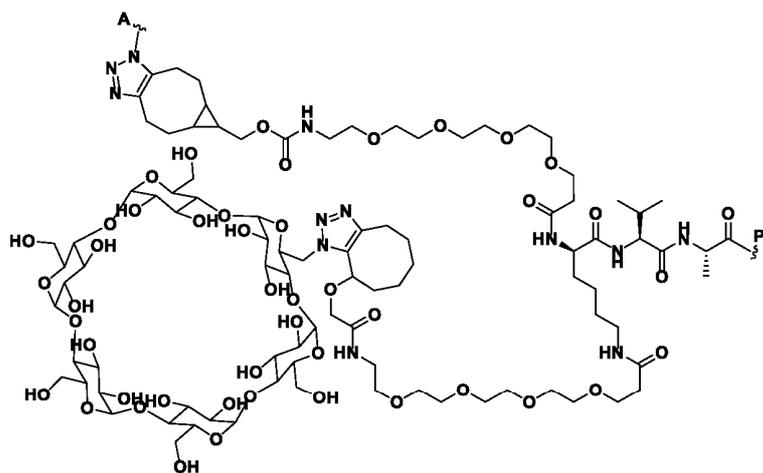


046545

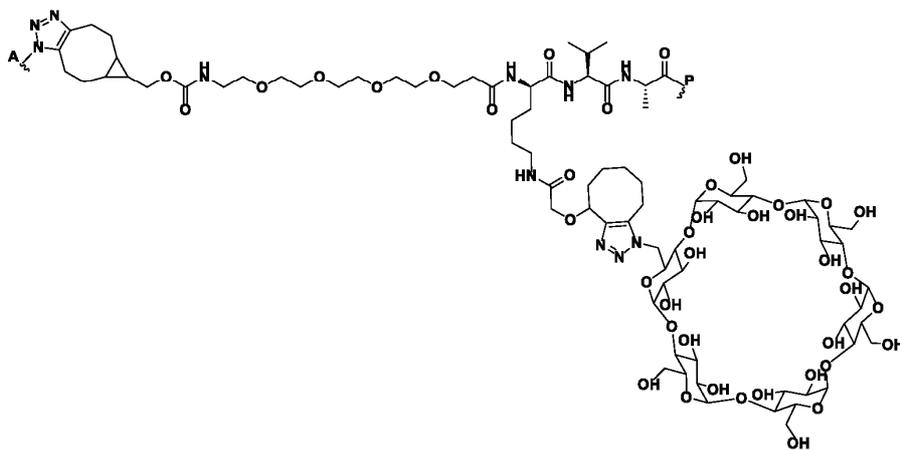
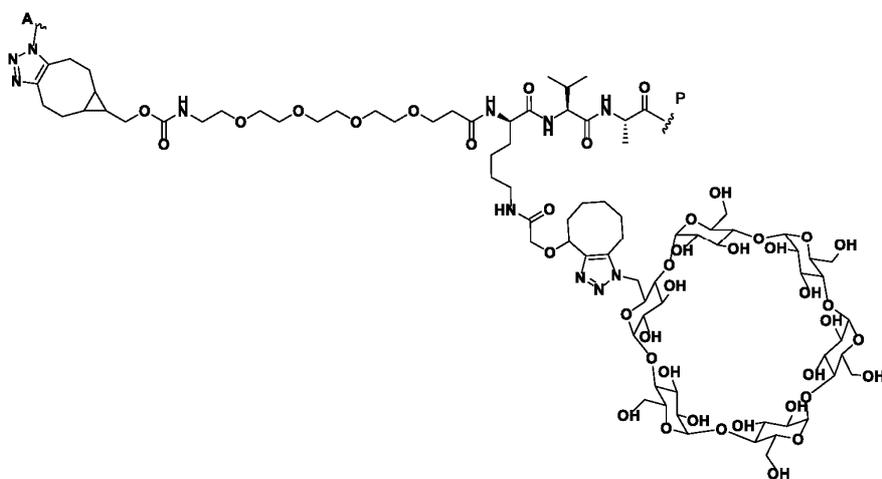
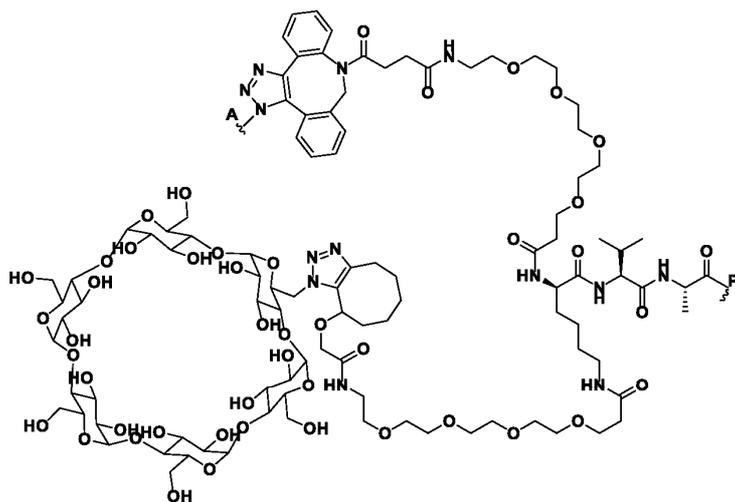


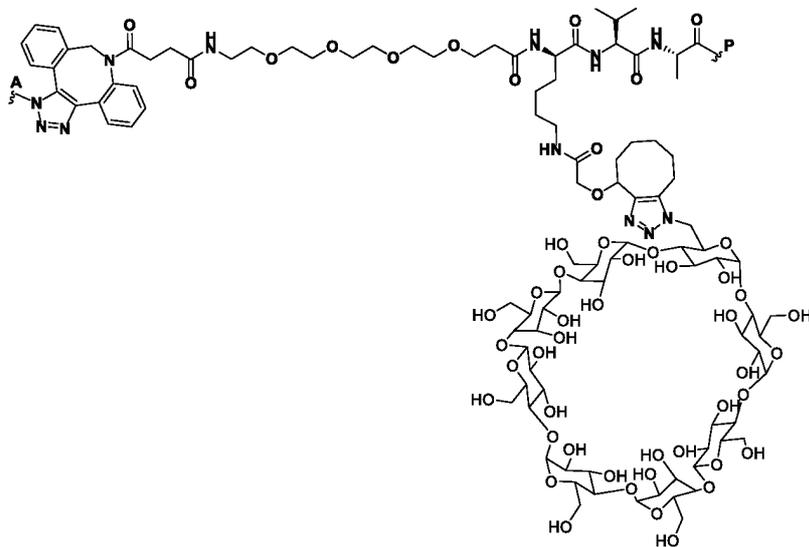
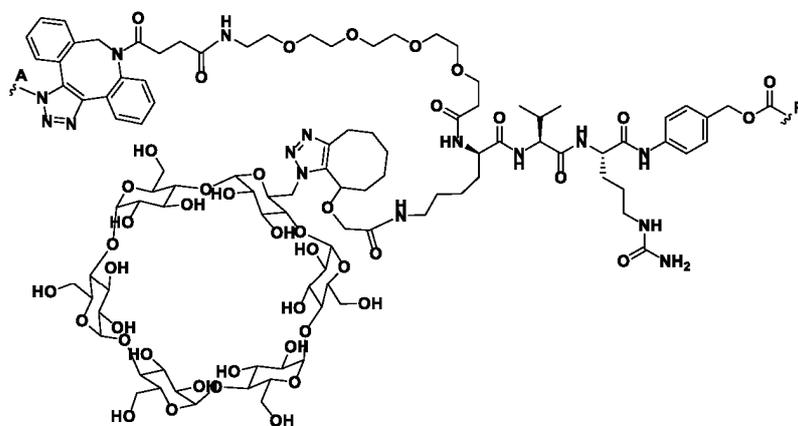
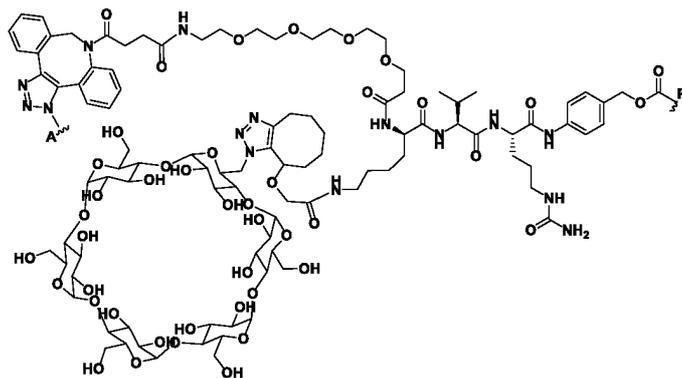


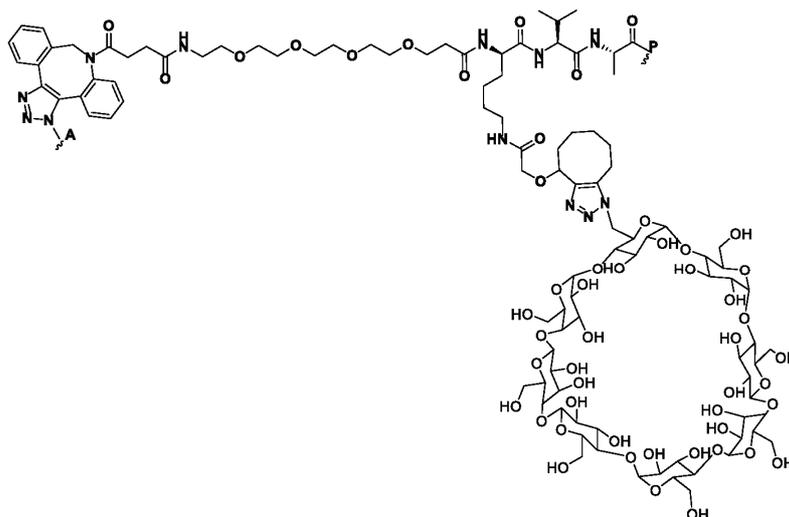




046545







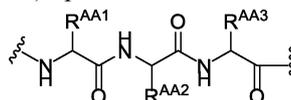
или его фармацевтически приемлемая соль или их региоизомер, где

каждый $\begin{matrix} A \\ | \\ \text{---} \\ | \\ \text{---} \end{matrix}$ представляет собой связь со связующим агентом; и

каждый $\begin{matrix} P \\ | \\ \text{---} \\ | \\ \text{---} \end{matrix}$ является связью с полезной нагрузкой.

13. Соединение по любому из пп.1-4, где

-LL- в соответствии с формулой (LL1) представляет собой:

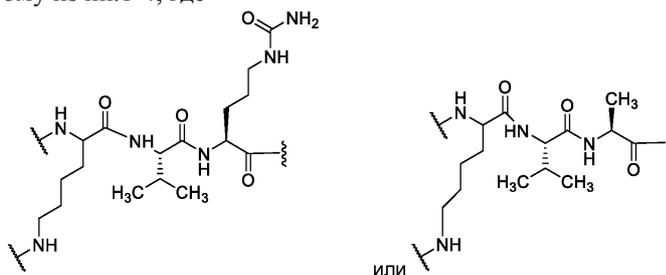


(LL1)

где R^{AA1} , R^{AA2} и R^{AA3} , каждый независимо, представляют собой боковые цепи аминокислот, по меньшей мере, одна из которых связана прямо с -SP-, когда соединение имеет формулу (Ib1) или формулу (Ib2) и $-(CH_2)_4-NH-$, когда соединение имеет формулу (Ic1).

14. Соединение по п.13, где соединение имеет формулу (Ib1) или формулу (Ib2) и R^{AA1} представляет собой боковую цепь лизина, связанную опосредованно с CD и R^{AA2} и R^{AA3} представляют собой боковые цепи валина и цитрулина или валина и аланина соответственно.

15. Соединение по любому из пп.1-4, где



LL представляет собой

или

16. Соединение по любому из пп.1-2, 6-9 и 13-15, где остаток спейсерной группы независимо в каждом случае выбирается из группы, включающей C_{1-6} -алкилен, $-NH-$, $-C(O)-$, $-(CH_2-CH_2-O)_e$, $-NH-CH_2-CH_2-$, $-(O-CH_2-CH_2)_e-C(O)-$ и их комбинации, где нижний индекс e представляет собой целое число от 0 до 4.

17. Соединение по любому из пп.1, 6-9 и 13-16, где любой из нижних индексов m, q или e равен 4.

18. Соединение по любому из пп.1, 6-9 и 13-17, где нижний индекс p равен 1.

19. Соединение по любому из пп.1-9 и 13-18, где нижний индекс n равен 2-4.

20. Соединение по любому из пп.1, 6-9 и 13-19, где нижний индекс m равен 4.

21. Соединение по любому из пп.1-20, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является селективным в отношении антигена, выбранного из группы, состоящей из AXL, BAFFR, BCMA, компонентов списка BCR, BDCA2, BDCA4, BTLA, BTNL2, BTNL3, BTNL8, BTNL9, C10 или f54, CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR9, CCR10, CD11c, CD137, CD138, CD14, CD168, CD177, CD19, CD20, CD209, CD209L, CD22, CD226, CD248, CD25, CD27, CD274, CD276, CD28, CD30, CD300A, CD33, CD37, CD38, CD4, CD40, CD44, CD45, CD46, CD48, CD5, CD52, CD55, CD56, CD59, CD62E, CD68, CD69, CD70, CD74, CD79a, CD79b, CD8, CD80, CD86, CD90.2, CD96, CLEC12A, CLEC12B, CLEC7A, CLEC9A, CR1, CR3, CRTAM, CSF1R, CTLA4, CXCR1/2, CXCR4, CXCR5, DDR1, DDR2, DEC-205, DLL4, DR6, FAP, FcAmR, FCMR, FcR's, Fire, GPCR, HHLA2, HLA класса II, HVEM, ICOSLG, IFNLR1, IL10R1,

IL10R2, IL12R, IL13RA1, IL13RA2, IL15R, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RE, IL20R1, IL20R2, IL21R, IL22R1, IL22RA, IL23R, IL27R, IL29R, IL2Rg, IL31R, IL36R, IL3RA, IL4R, IL6R, IL5R, IL7R, IL9R, интегринов, LAG3, LIFR, MAG/Siglec-4, MMR, MSR1, NCR3LG1, NKG2D, NKp30, NKp46, PDCD1, PROKR1, PVR, PVRIG, PVRL2, PVRL3, RELT, SIGIRR, Siglec-1, Siglec-10, Siglec-5, Siglec-6, Siglec-7, Siglec-8, Siglec-9, SIRPA, SLAMF7, TAC1, компонентов/ассоц. списка TCR, PTCRA, TCRb, CD3z, CD3, TEK, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, TIGIT, TLR2, TLR4, TROY, TSLPR, TYRO, VLDLR, VSIG4 и VTCN1.

22. Соединение по любому из пп.1-21, где ПА представляет полезную нагрузку, выбранную из группы, состоящей из остатков доластатина, ауристатина, мейтанзиноида, растительного алкалоида, таксана, алкалоида барвинка, стероида, модулятора печеночного рецептора X (LXR) и их комбинаций.

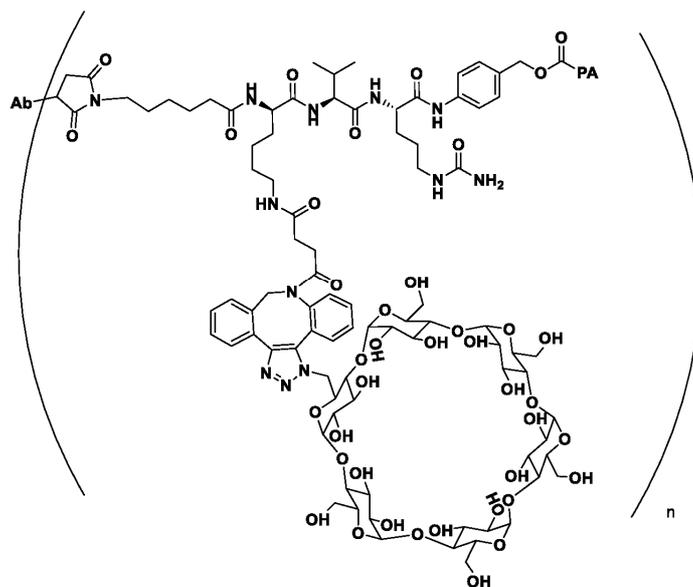
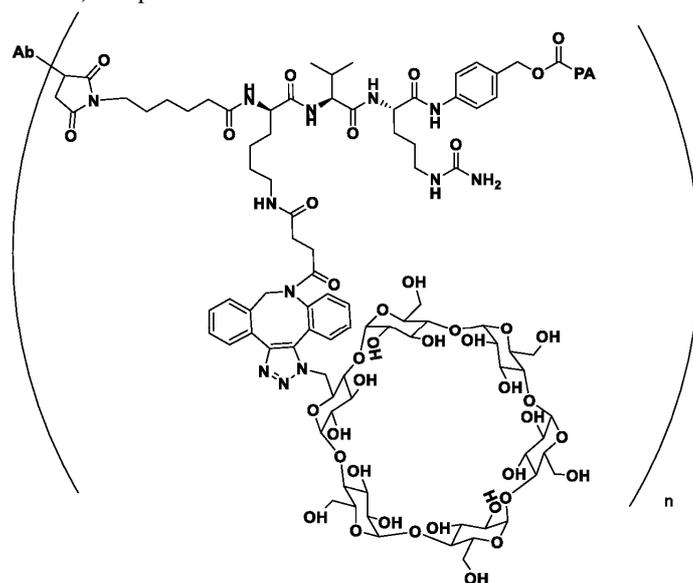
23. Соединение по любому из пп.1-22, где полезной нагрузкой является остаток ауристатина.

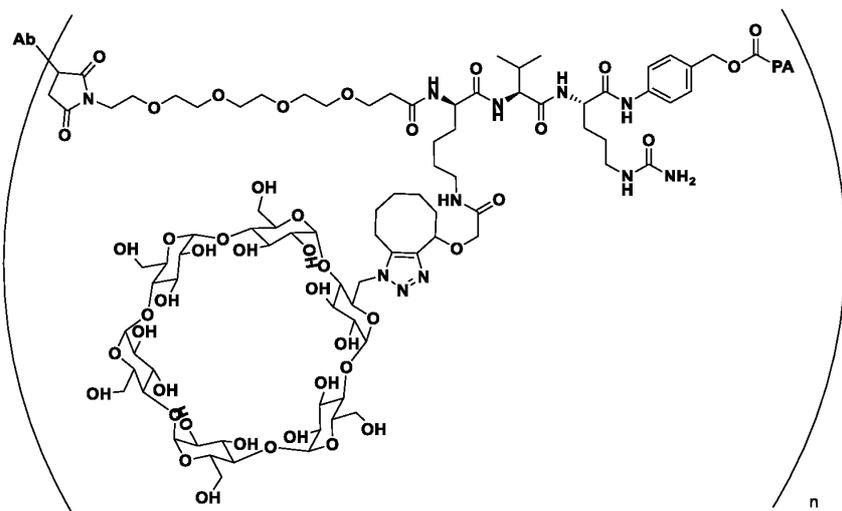
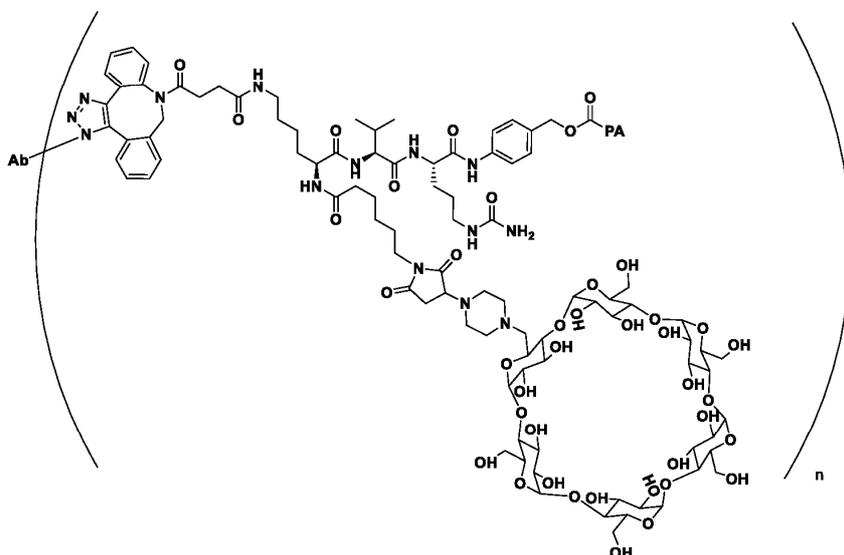
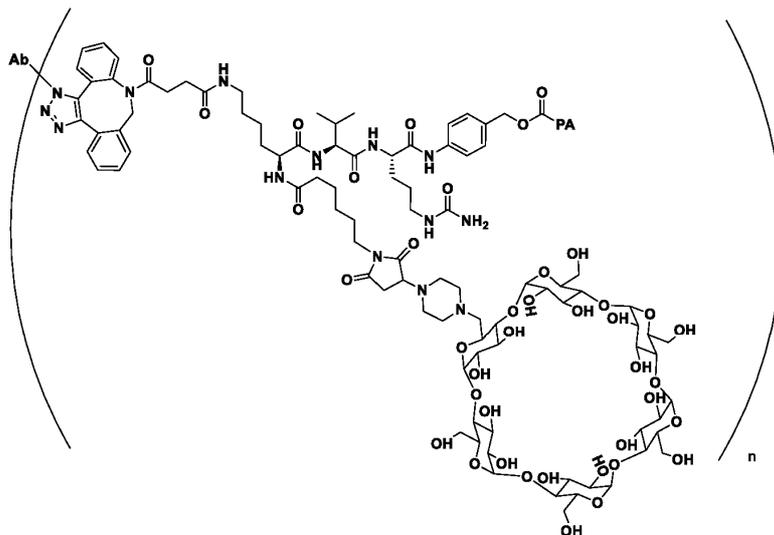
24. Соединение по любому из пп.1-22, где полезной нагрузкой является остаток мейтанзиноида.

25. Соединение по любому из пп.1-22, где полезной нагрузкой является остаток стероида.

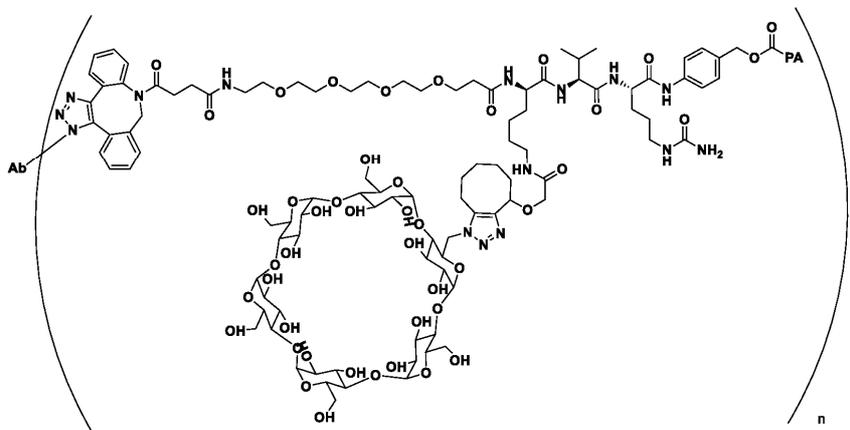
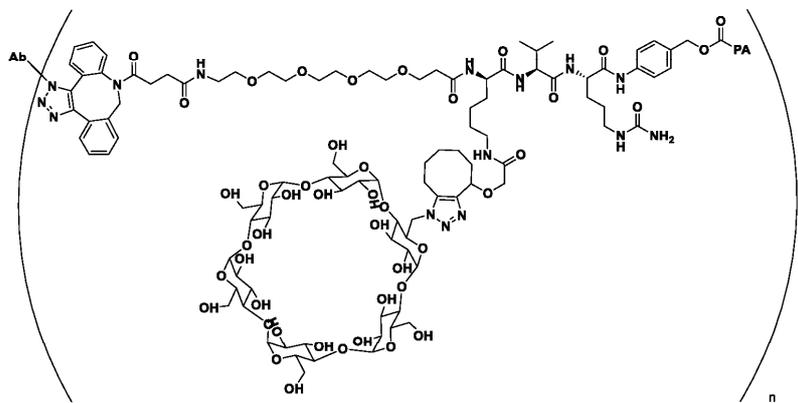
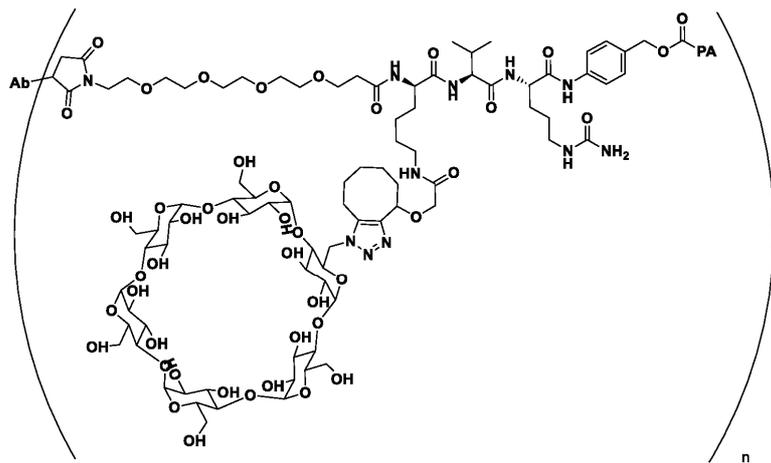
26. Соединение по любому из пп.1-22, где полезной нагрузкой является остаток модулятора LXR.

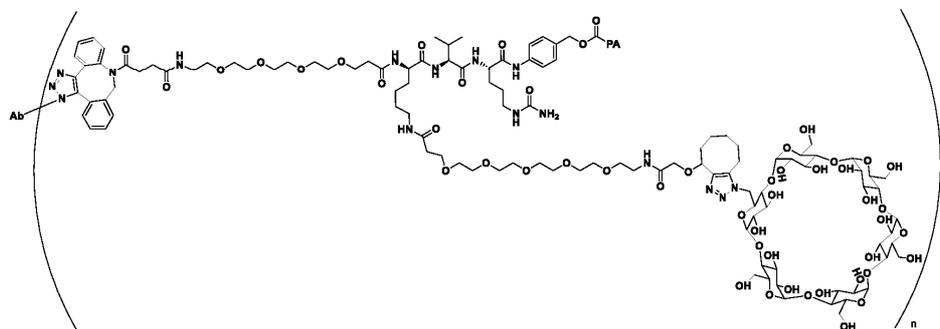
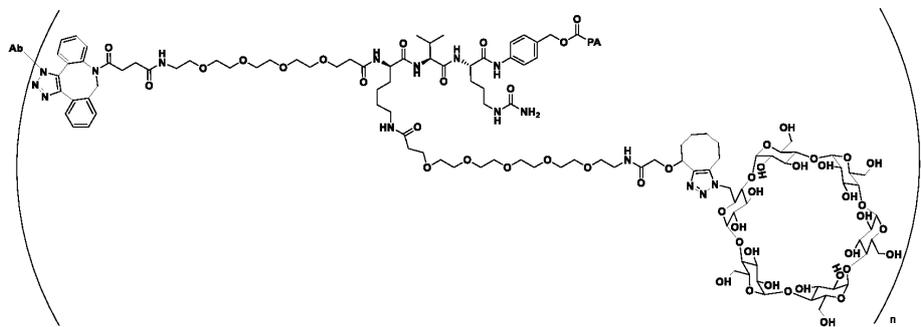
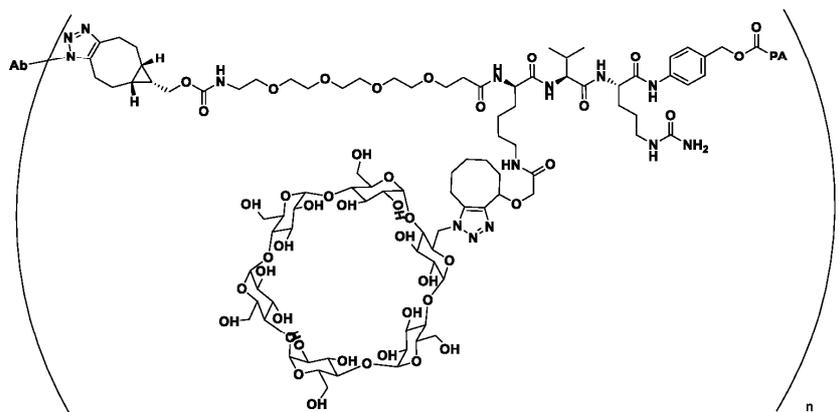
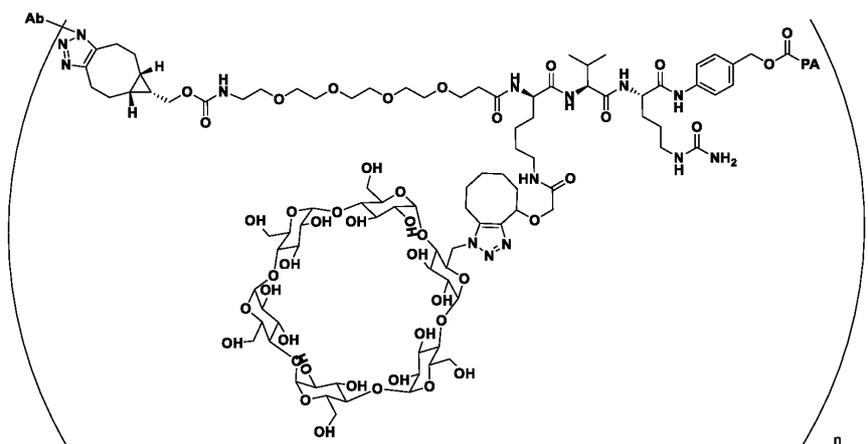
27. Соединение по п.12, выбранное из:

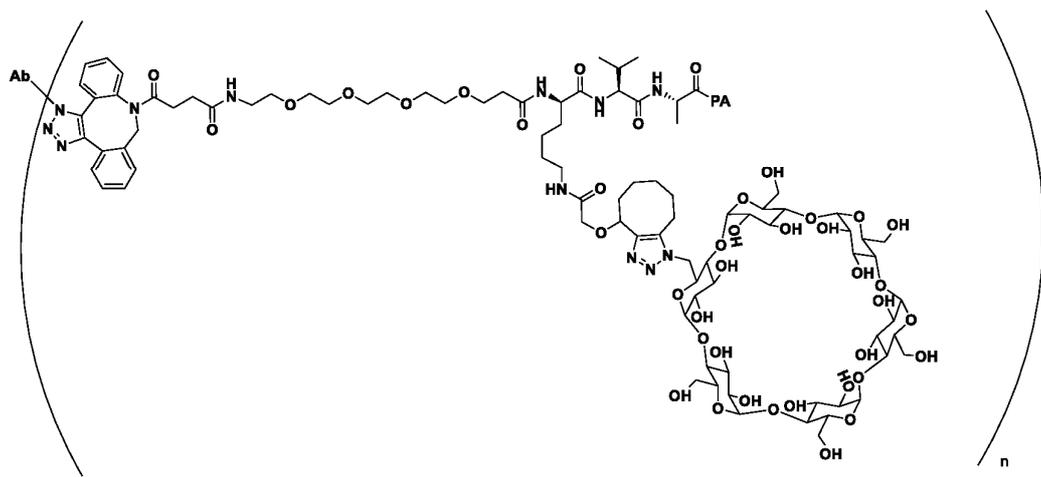
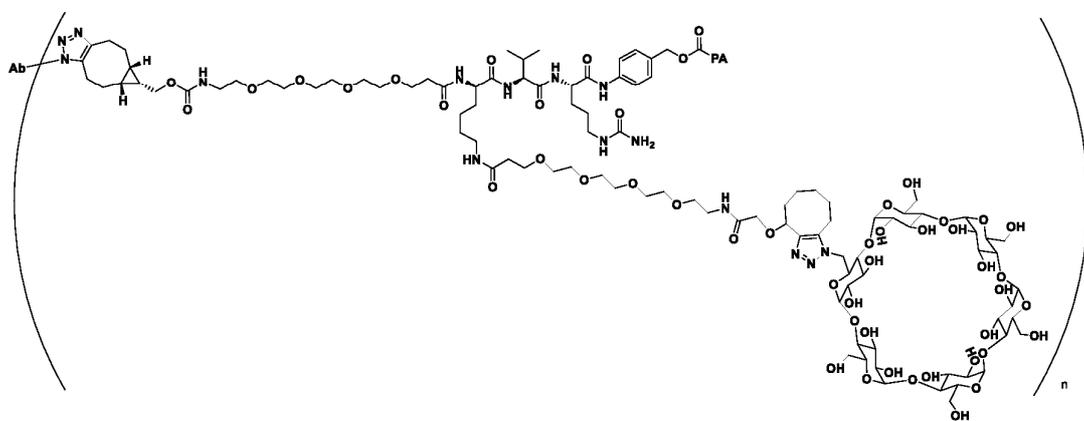
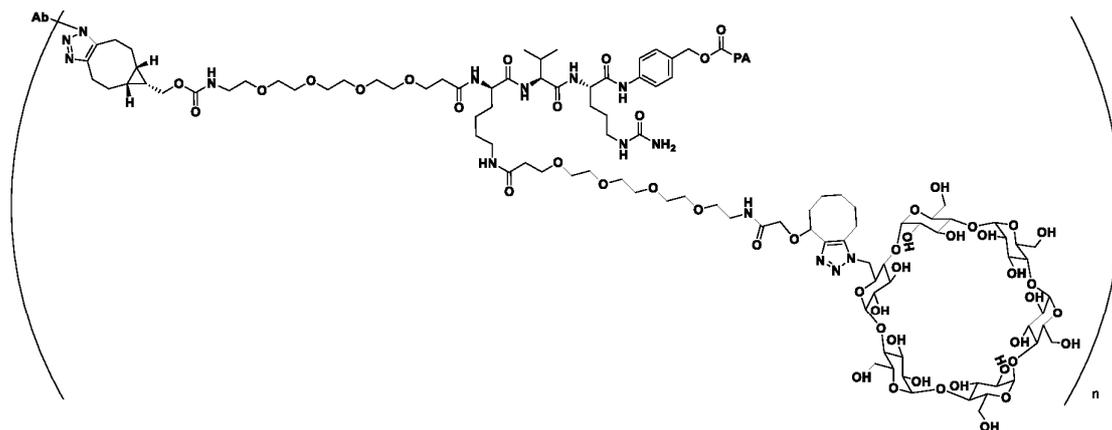


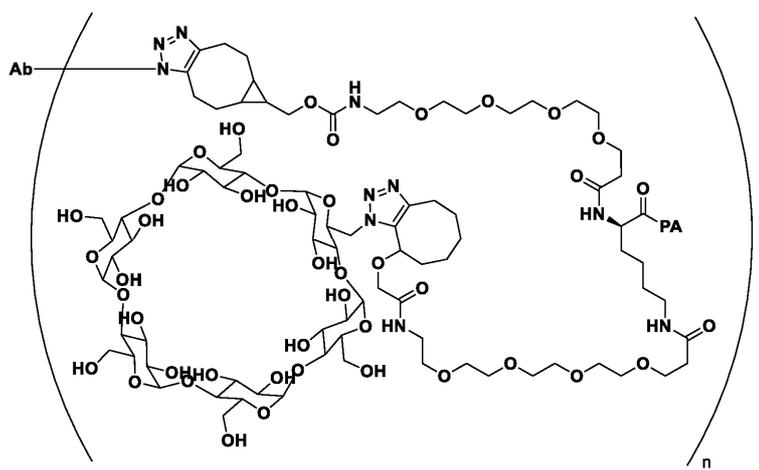
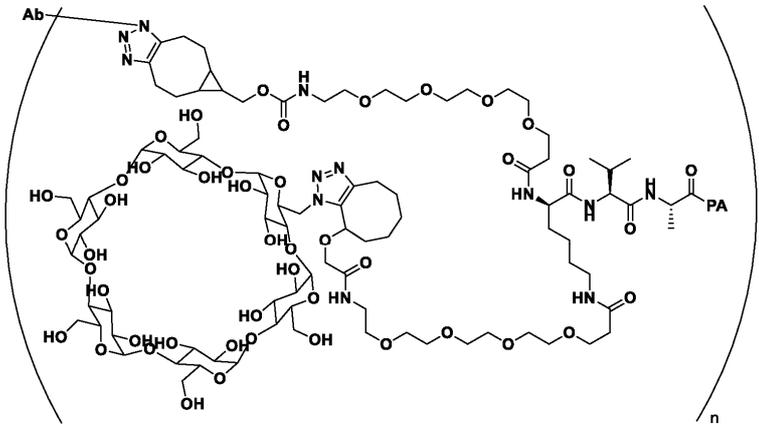
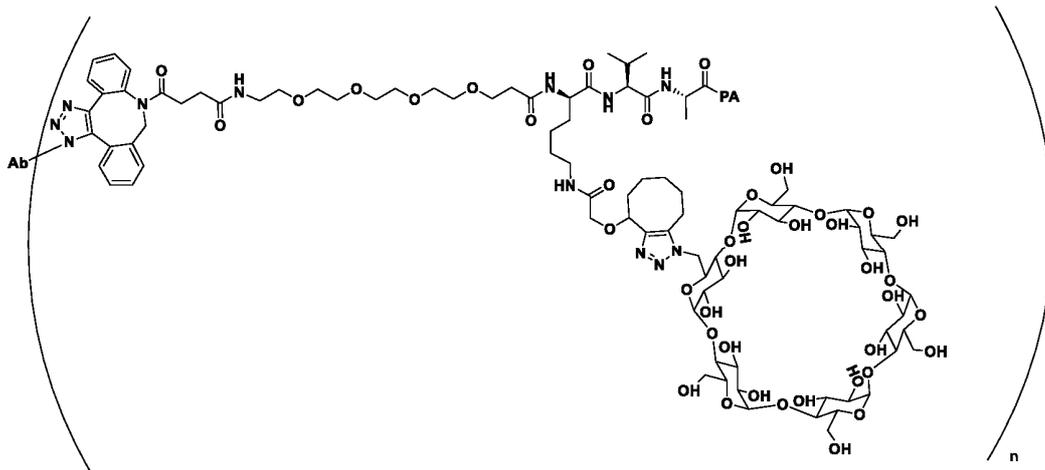


046545

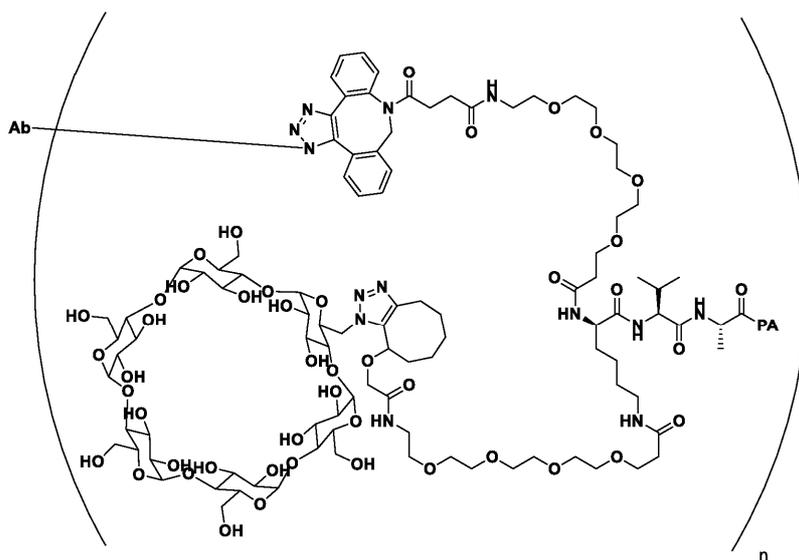
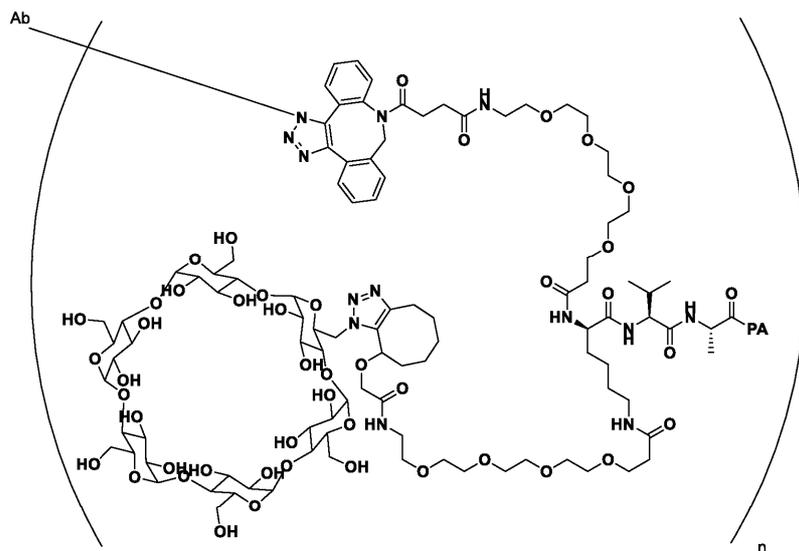


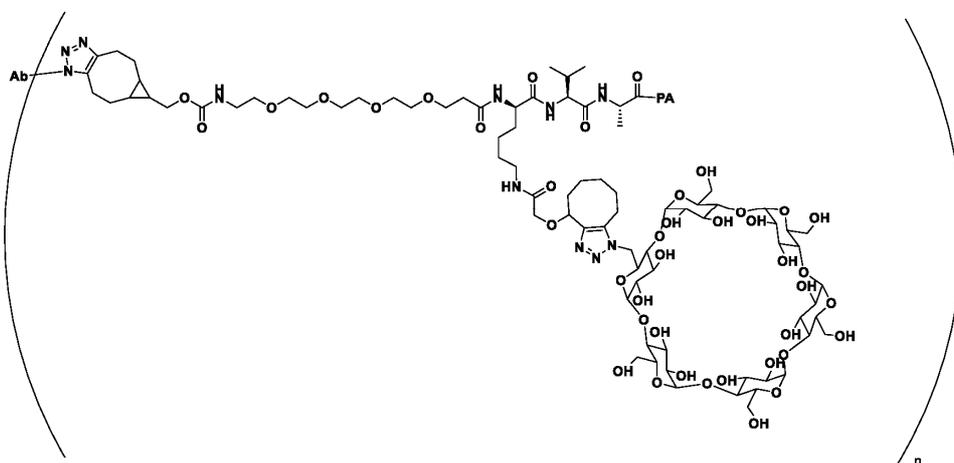
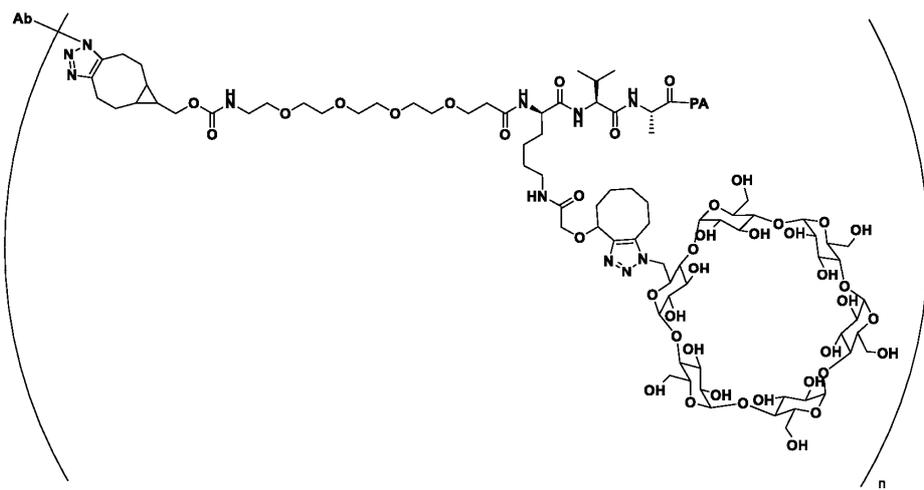






046545





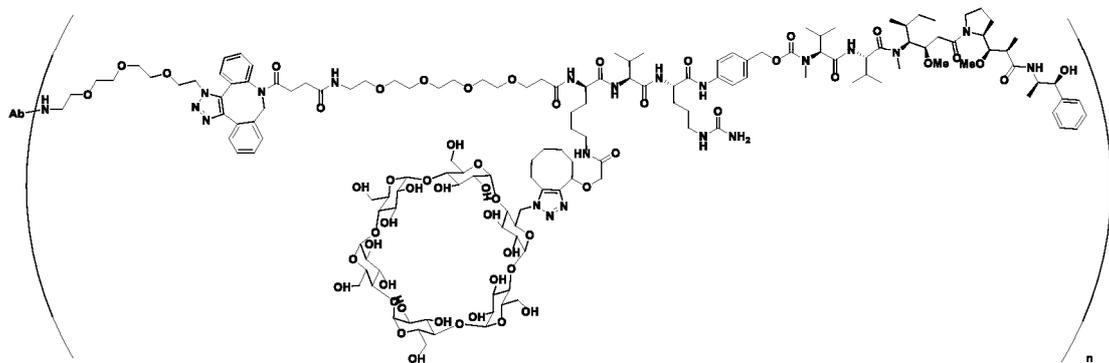
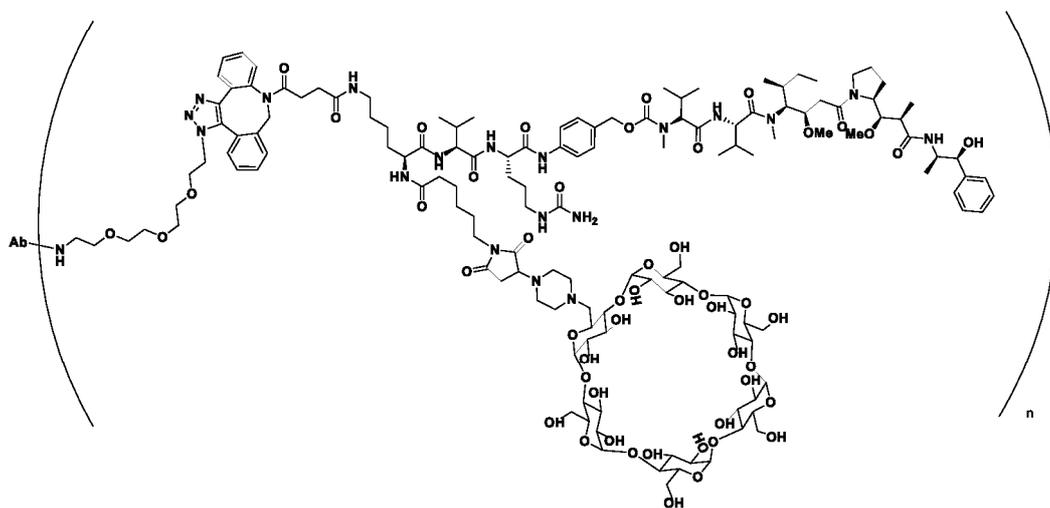
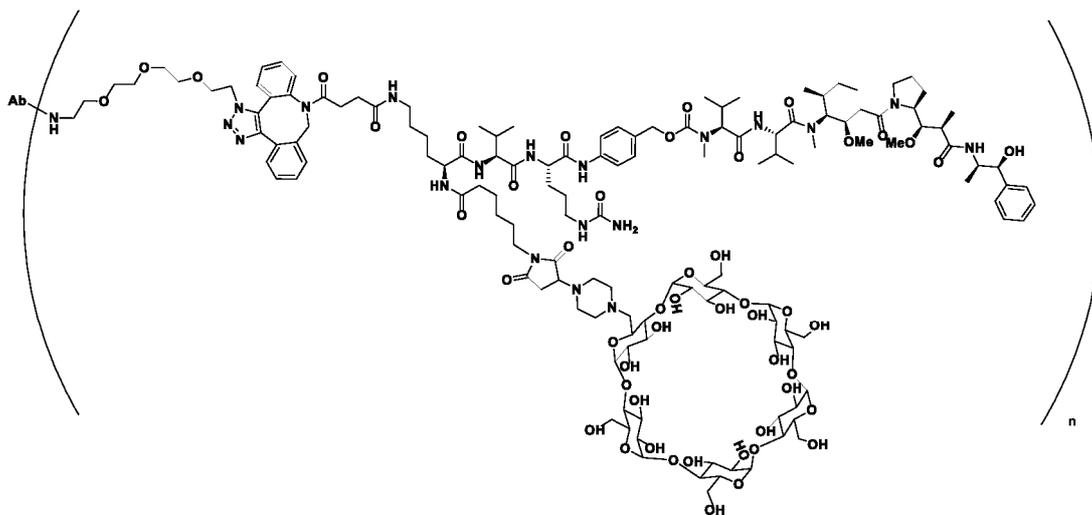
или его региоизомер или фармацевтически приемлемая соль, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

РА представляет собой полезную нагрузку; и

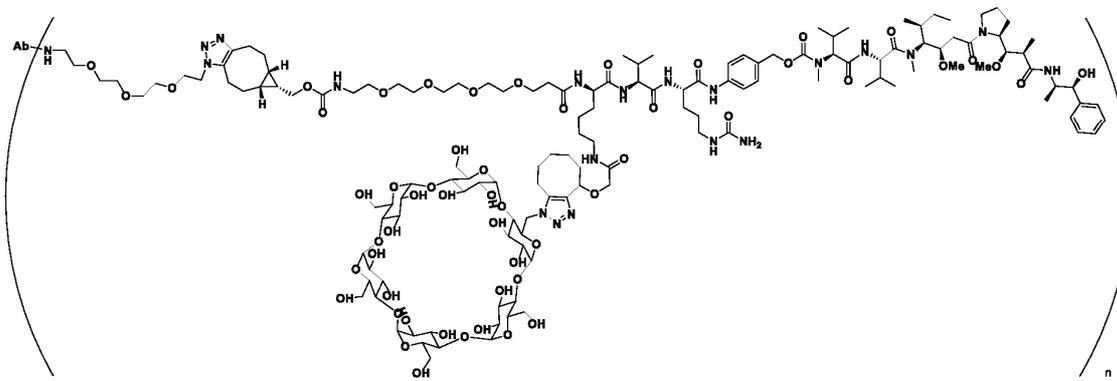
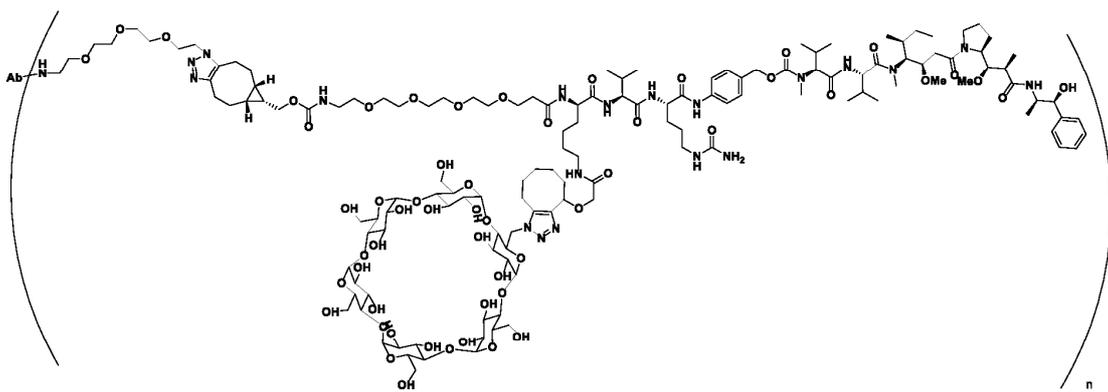
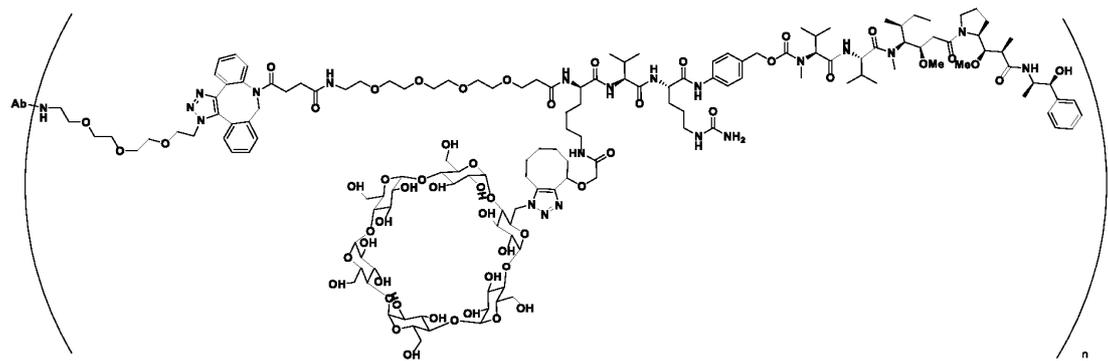
n представляет собой целое число от 1 до 30, например от 1 до 4.

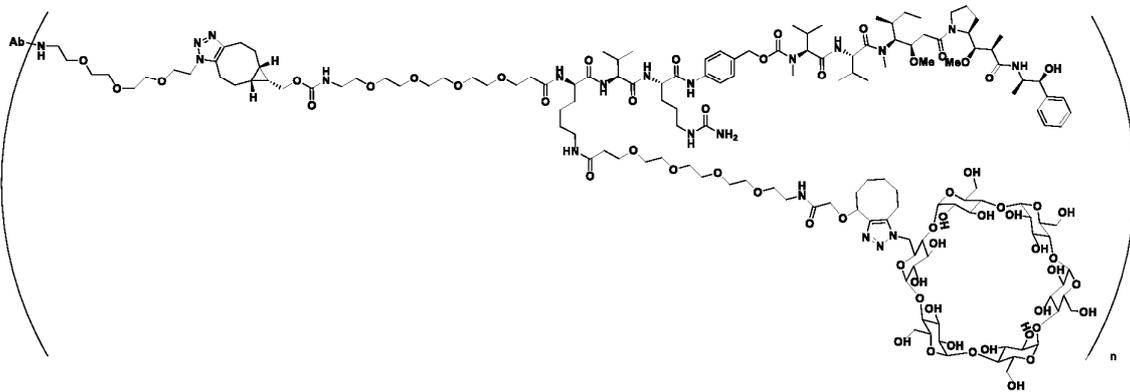
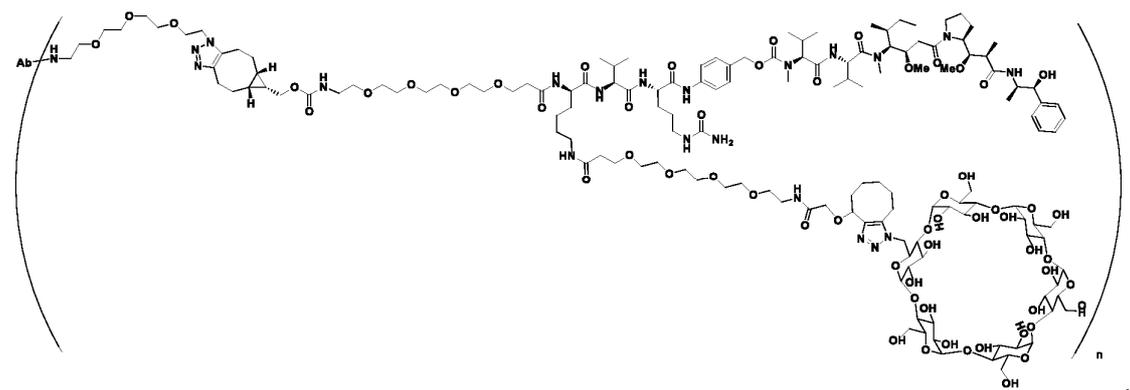
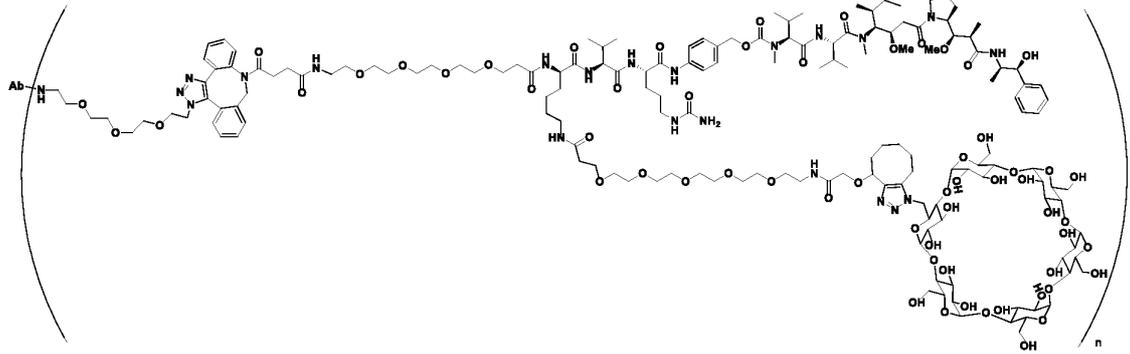
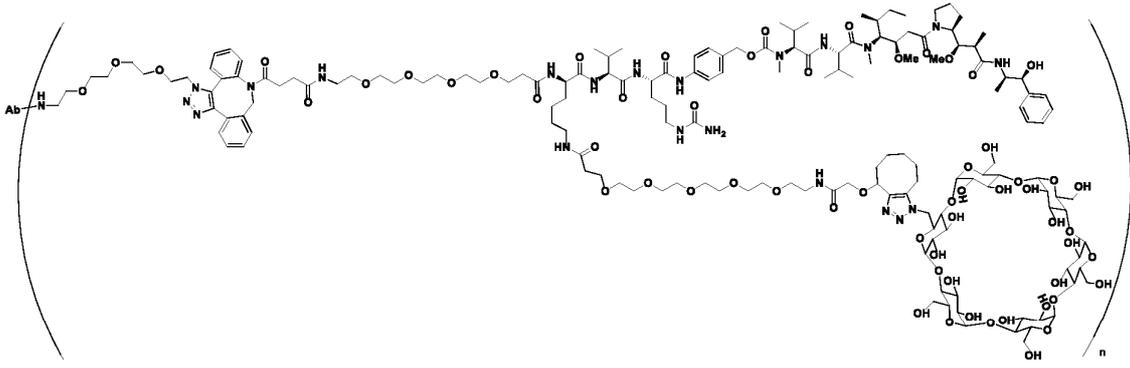
28. Соединение по п.27, выбранное из:

046545



046545





или его региоизомер или фармацевтически приемлемая соль, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

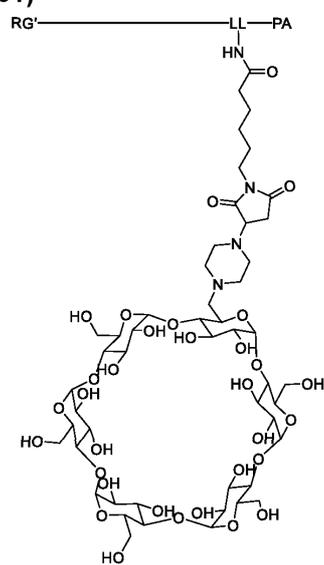
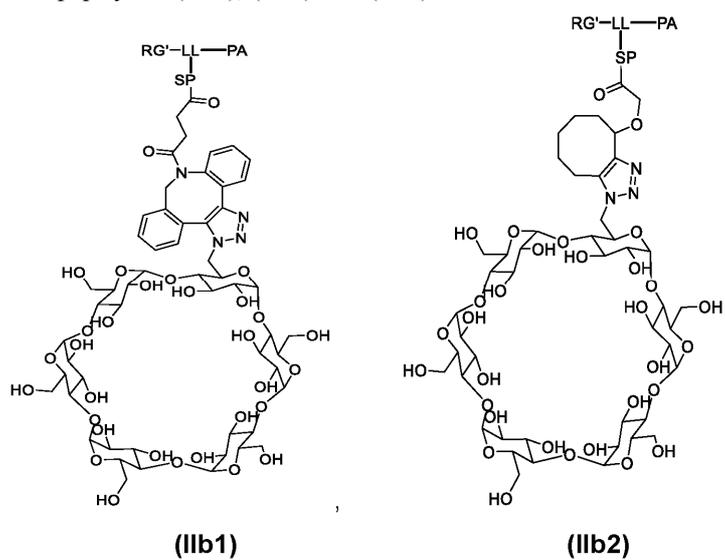
29. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп.1-28 или его региоизомер, или фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый эксципиент.

30. Фармацевтическая композиция, включающая соединение по любому из пп.1-28, где соединение представляет собой смесь региоизомеров относительно триазольного соединения.

31. Способ лечения пролиферативного заболевания, метаболического заболевания, воспаления, или нейродегенеративного заболевания или расстройства у пациента, включающий введение пациенту соединения по любому из пп.1-28 или композиции по пп.29-30.

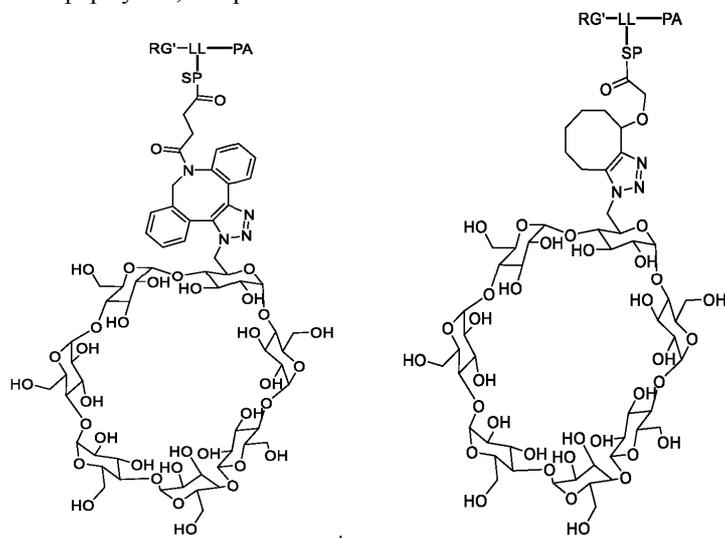
32. Соединение полезная нагрузка-линкер

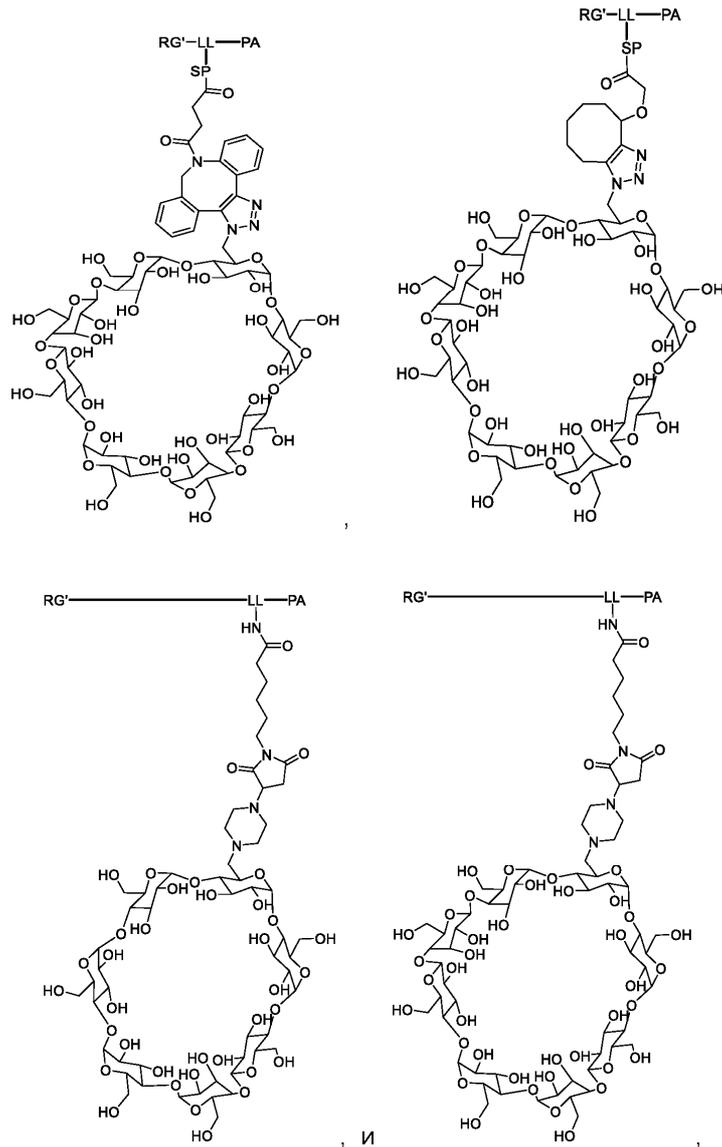
(i) в соответствии с формулой (IIb1), (IIb2) или (IIc1):



(IIc1);

(ii) в соответствии с формулой, выбранной из:





где RG' представляет собой реакционноспособную группу;

LL представляет собой трехвалентный линкер, содержащий аминокислотный остаток;

SP независимо в каждом случае либо отсутствует, либо является остатком спейсерной группы, выбранной из C_{1-6} алкилена, $-NH-$, $-C(O)-$, $-(CH_2-CH_2-O)_e$, $-NH-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_e-C(O)-$, $-C(O)-(CH_2)_u-C(O)-$, $-C(O)-NH-(CH_2)_v-$ и их комбинации;

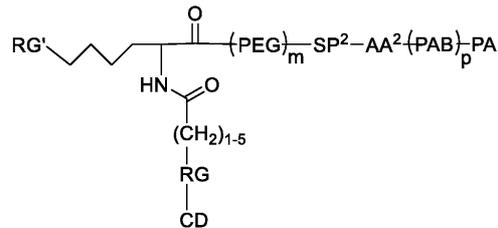
e представляет собой целое число от 0 до 4;

u представляет собой целое число от 1 до 8;

v представляет собой целое число от 1 до 8; и

PA представляет собой полезную нагрузку; или региоизомер, или их смесь; или

(iii) в соответствии с формулой (IIe):

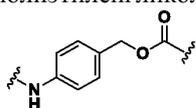


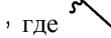
(IIe)

где RG' представляет собой реакционноспособную группу;

SP^2 независимо в каждом случае либо отсутствует, либо является остатком спейсерной группы, выбранным из C_{1-6} алкилена, $-NH-$, $-C(O)-$, $-(CH_2-CH_2-O)_e$, $-NH-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_e-C(O)-$, $-C(O)-(CH_2)_u-C(O)-$, $-C(O)-NH-(CH_2)_v-$ и их комбинации;

AA² представляет собой дипептидный остаток;
 PEG представляет собой полиэтиленгликолевый остаток;



PAB представляет собой  , где  указывает атом, через который PAB связан со смежными группами формулы;

CD независимо в каждом случае представляет собой циклодекстриновый остаток;

m представляет собой целое число от 0 до 5;

r равен 0 или 1;

e представляет собой целое число от 0 до 4;

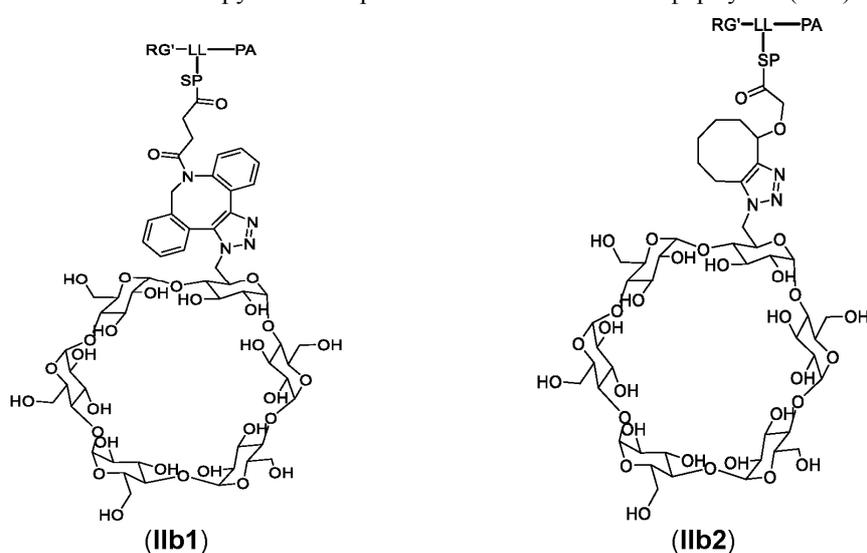
u представляет собой целое число от 1 до 8;

v представляет собой целое число от 1 до 8; и

RG представляет собой остаток реакционноспособной группы, включающей сукцинимид, триазол или конденсированный триазол;

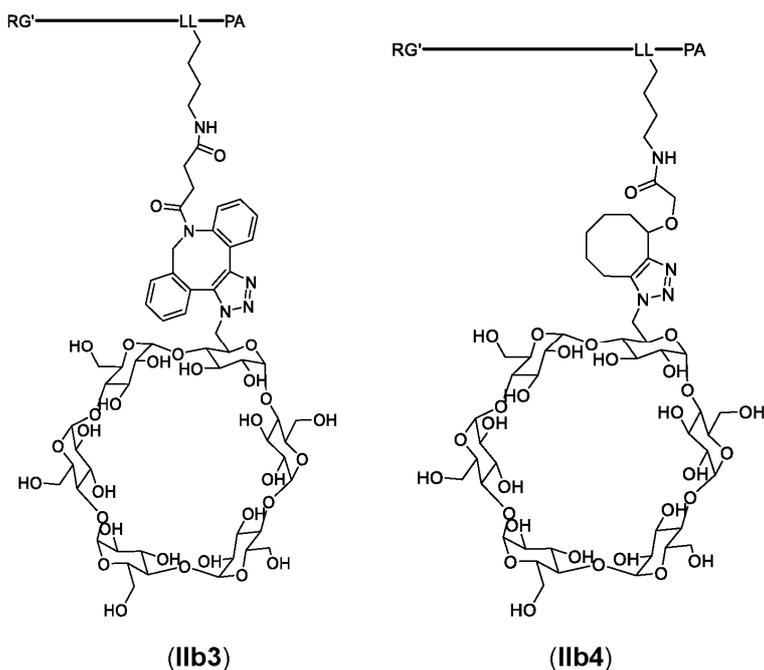
PA представляет собой полезную нагрузку.

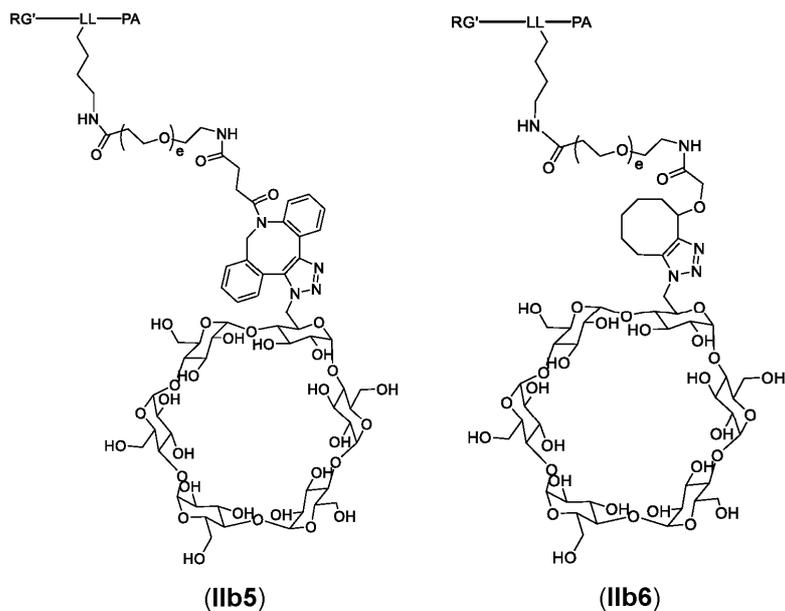
33. Соединение полезная нагрузка-линкер по п.32 в соответствии с формулой (IIb1) или (IIb2):



или их региоизомер.

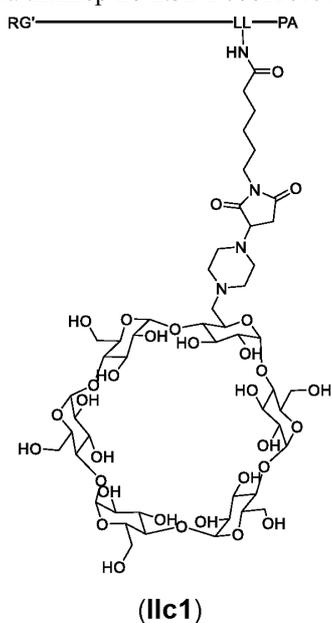
34. Соединение полезная нагрузка-линкер по п.32 в соответствии с формулой (IIb3), (IIb4), (IIb5) или (IIb6):





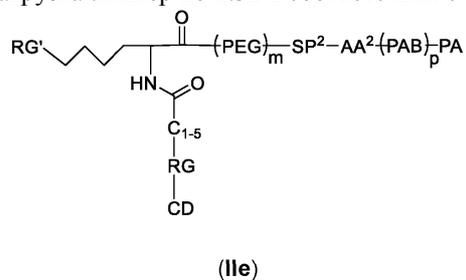
где нижний индекс e представляет собой целое число от 0 до 4;
или их региоизомер.

35. Соединение полезная нагрузка-линкер по п.32 в соответствии с формулой (IIc1):



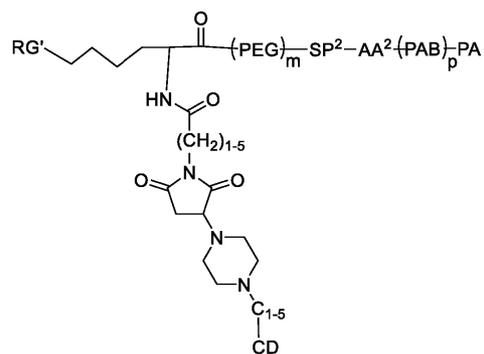
или его региоизомер.

36. Соединение полезная нагрузка-линкер по п.32 в соответствии с формулой (IIe):



или его региоизомер.

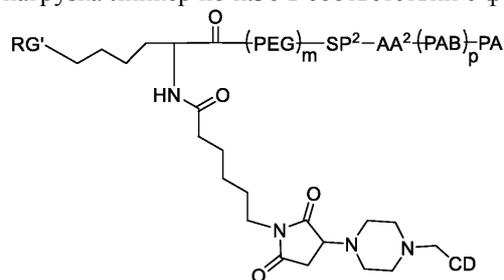
37. Соединение полезная нагрузка-линкер по п.36 в соответствии с формулой (IIe1):



(Ile1)

или его региоизомер.

38. Соединение полезная нагрузка-линкер по п.36 в соответствии с формулой (Ile2):

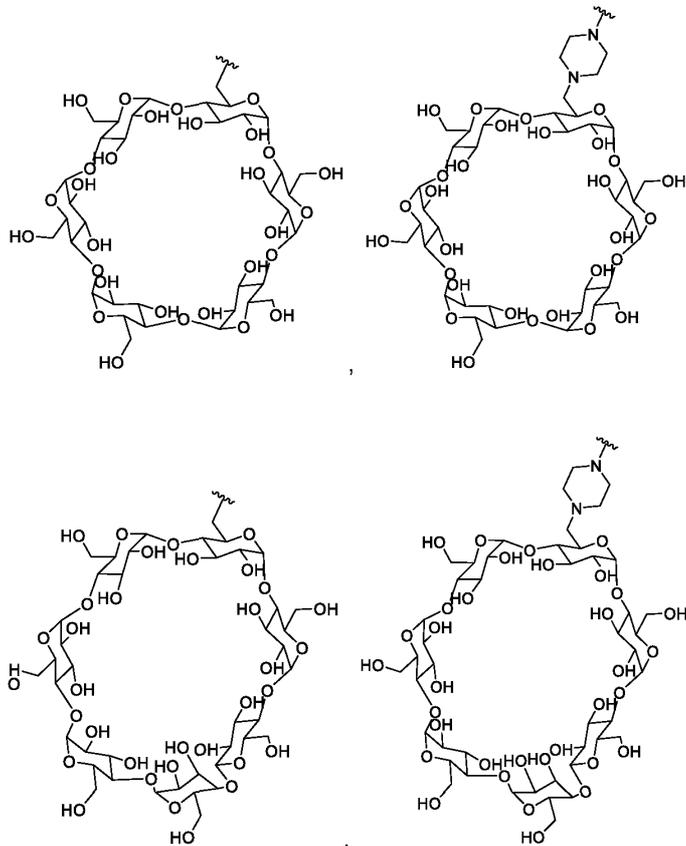


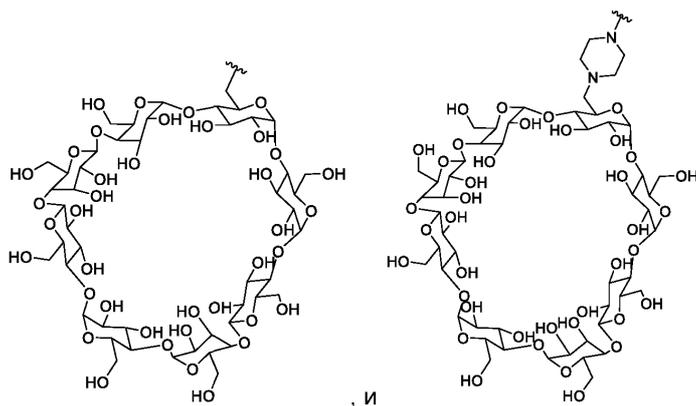
(Ile2)

или его региоизомер.

39. Соединение полезная нагрузка-линкер по любому из пп.36-38, где CD в каждом случае независимо выбран из группы, состоящей из α -циклодекстрина, β -циклодекстрина и γ -циклодекстрина.

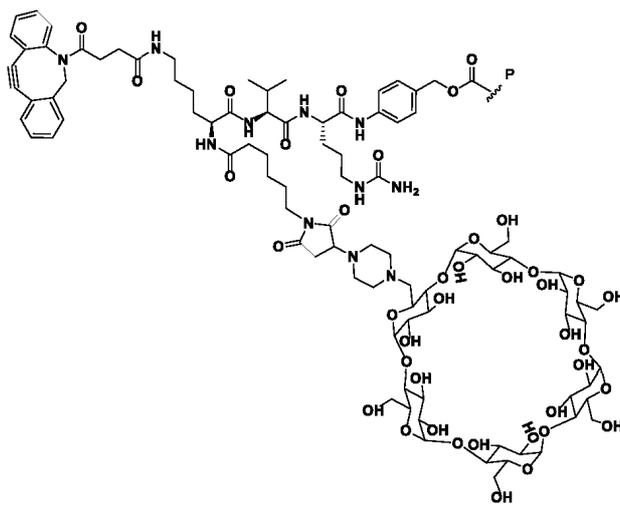
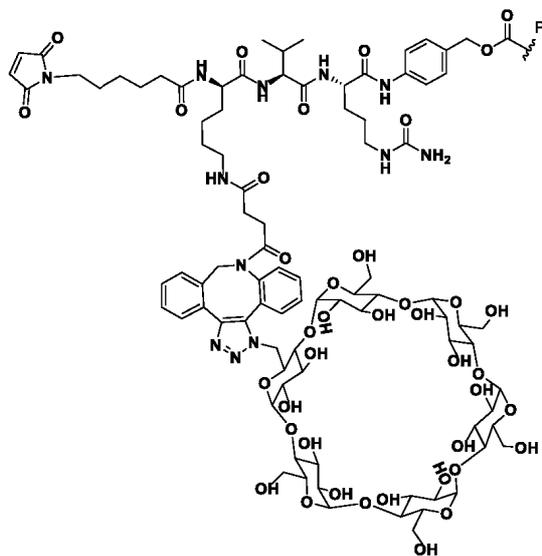
40. Соединение полезная нагрузка-линкер по любому из пп.36-38, где CD в каждом случае независимо выбран из группы, включающей



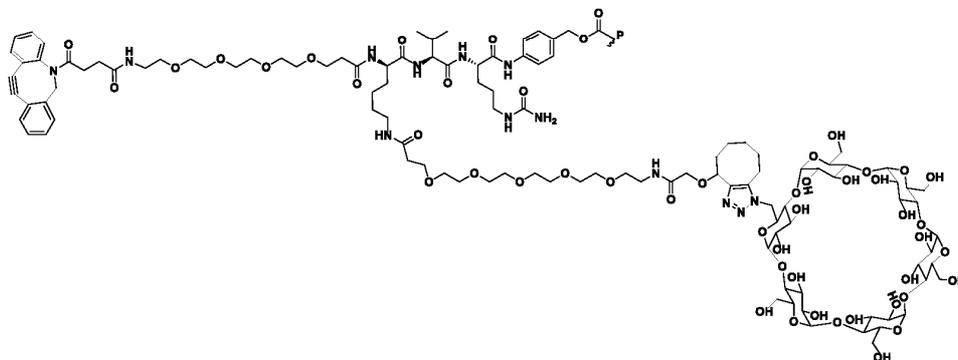
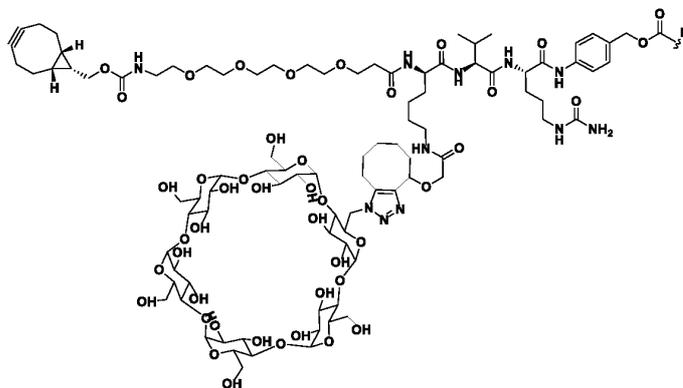
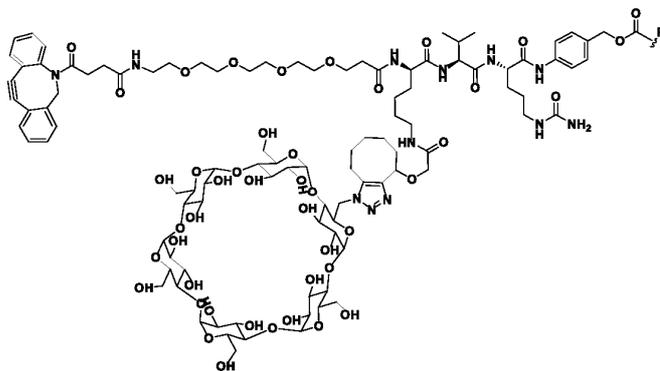
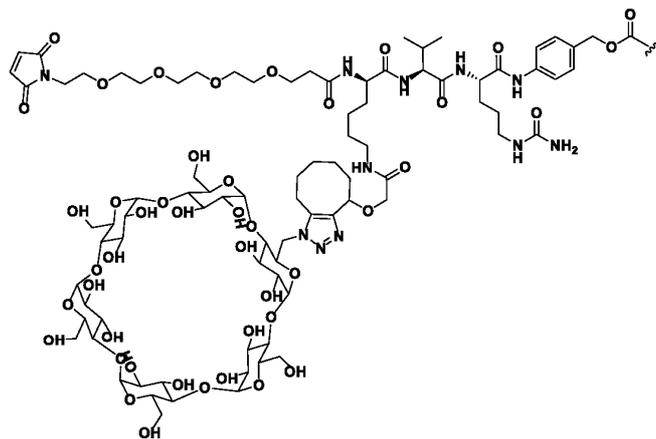


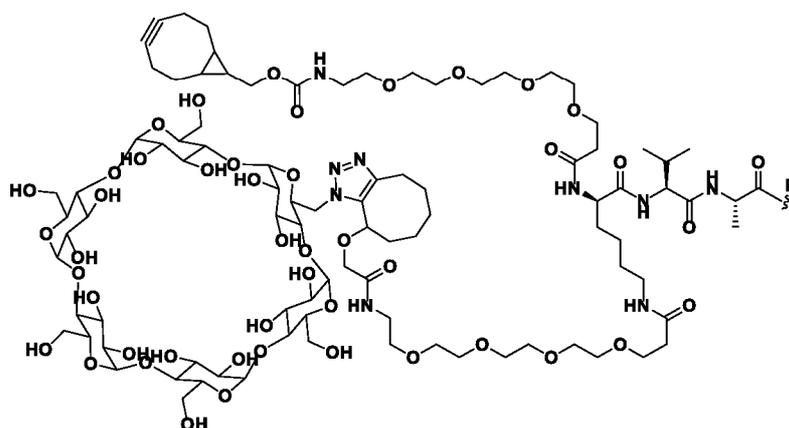
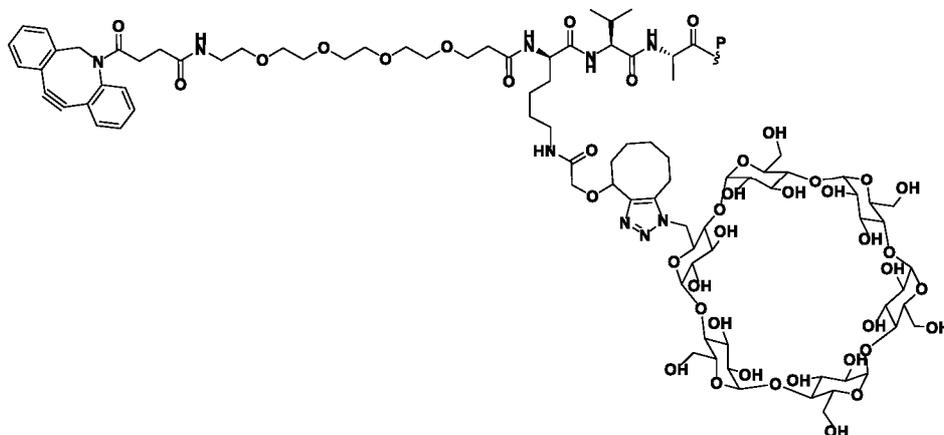
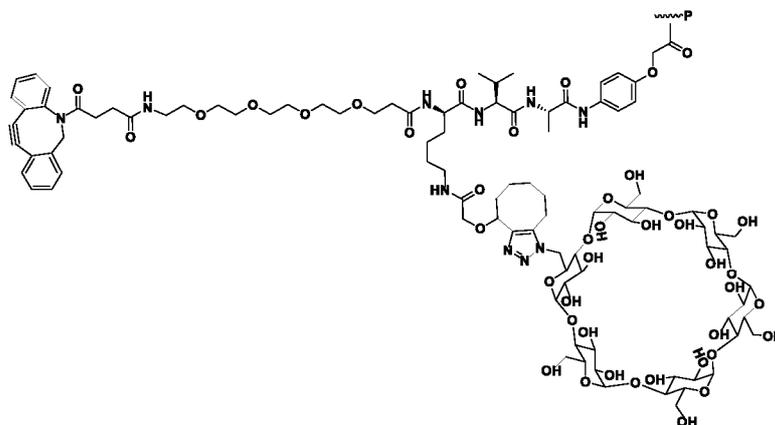
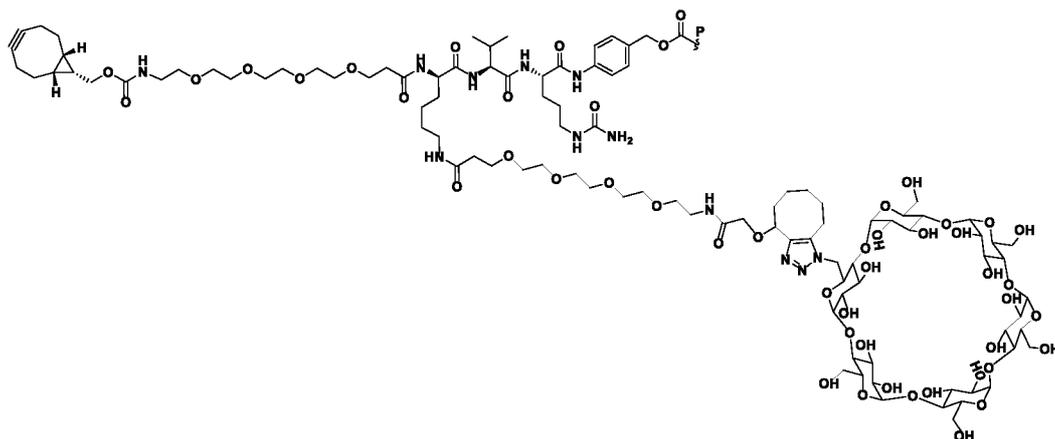
где  обозначает атом, через который CD связан со смежными группами в формуле.

41. Соединение полезная нагрузка-линкер по п.32, содержащее группу, выбранную из группы, включающей

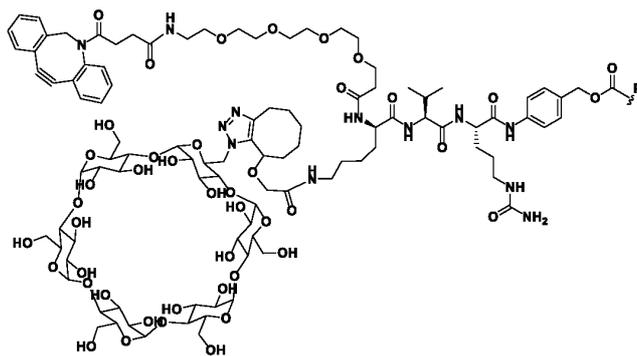
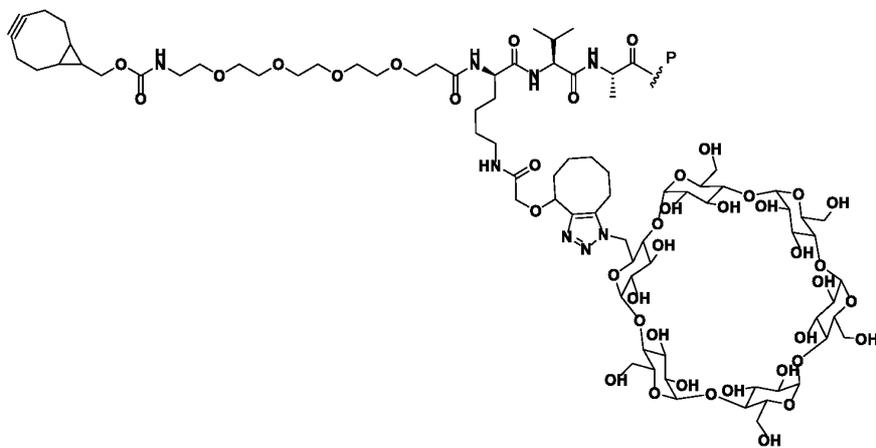
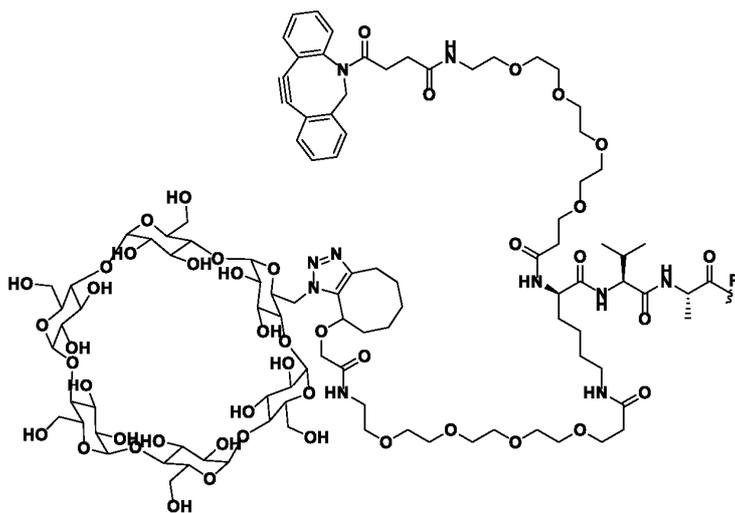


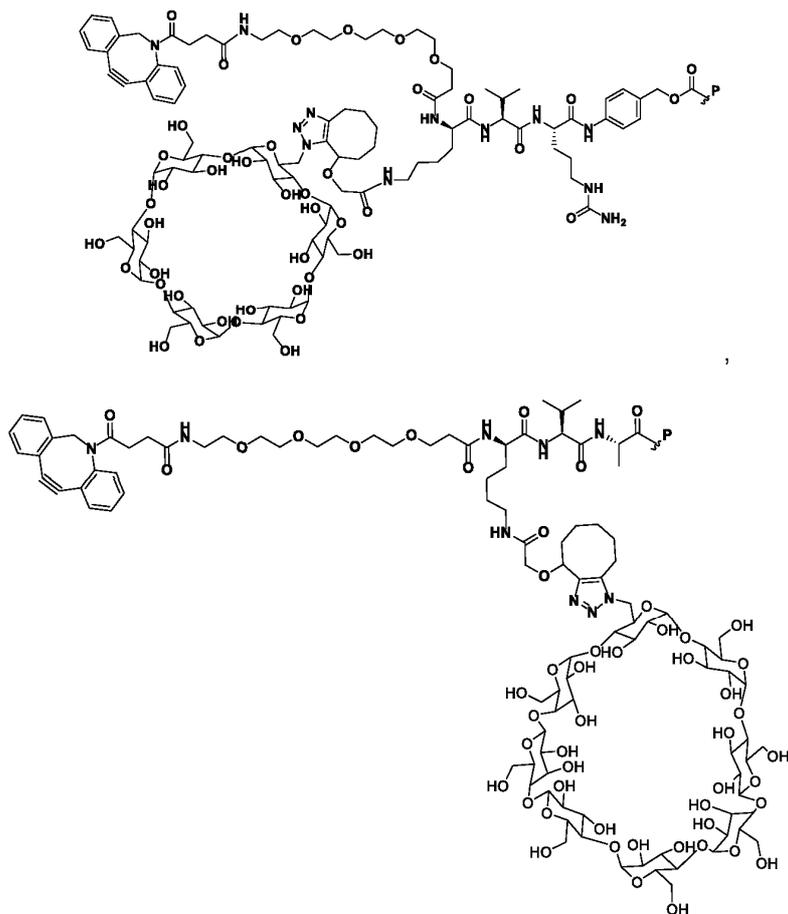
046545





046545

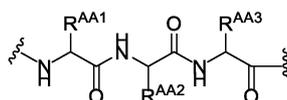




или его фармацевтически приемлемая соль, или региоизомер, или смесь их региоизомеров, где

каждый $\frac{P}{e}$ является связью с полезной нагрузкой.

42. Соединение полезная нагрузка-линкер по любому из пп.32-35, где -LL- соответствует формуле:

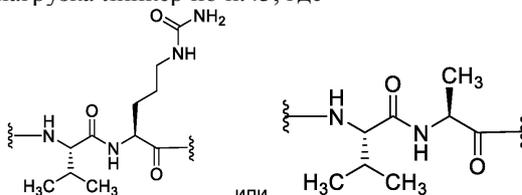


(BL^{AA1})

где R^{AA1}, R^{AA2} и R^{AA3}, каждый независимо, представляют собой боковые цепи аминокислот, по меньшей мере, одна из которых связана прямо с -SP-, когда соединение имеет формулу (IIb1) или формулу (IIb2) и -NHC(O)-, в случае, когда соединение имеет формулу (IIc1).

43. Соединение полезная нагрузка-линкер по п.42, где соединение имеет формулу (IIb1) или формулу (IIb2), R^{AA1} представляет собой боковую цепь лизина, связанную опосредованно с CD, и R^{AA2} и R^{AA3} представляют собой боковые цепи валина и цитруллина или валина и аланина соответственно.

44. Соединение полезная нагрузка-линкер по п.43, где



-AA²- представляет собой

или

45. Соединение полезная нагрузка-линкер по любому из пп.32-33, 36-38 и 42-44, в котором остаток спейсерной группы независимо в каждом случае выбирают из группы, состоящей из C₁₋₆алкилена, -NH-, -C(O)-, -(CH₂-CH₂-O)_e, -NH-CH₂-CH₂-(O-CH₂-CH₂)_e-C(O)- и их комбинации, где нижний индекс e представляет собой целое число от 0 до 4.

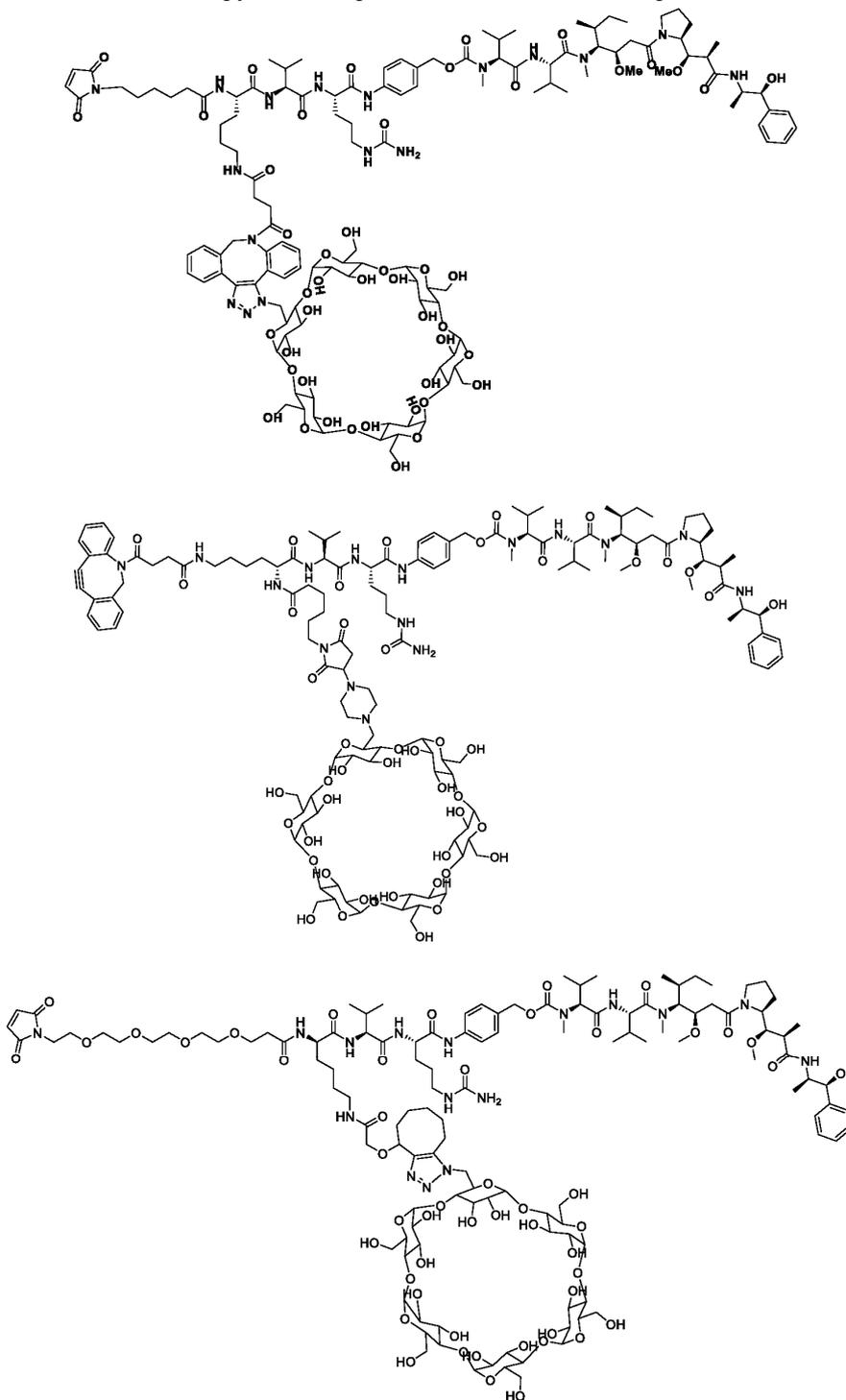
46. Соединение полезная нагрузка-линкер по любому из пп.32, 36-38 и 42-45, где нижний индекс m равен 4.

47. Соединение полезная нагрузка-линкер по любому из пп.32, 36-38 и 42-46, где нижний индекс p

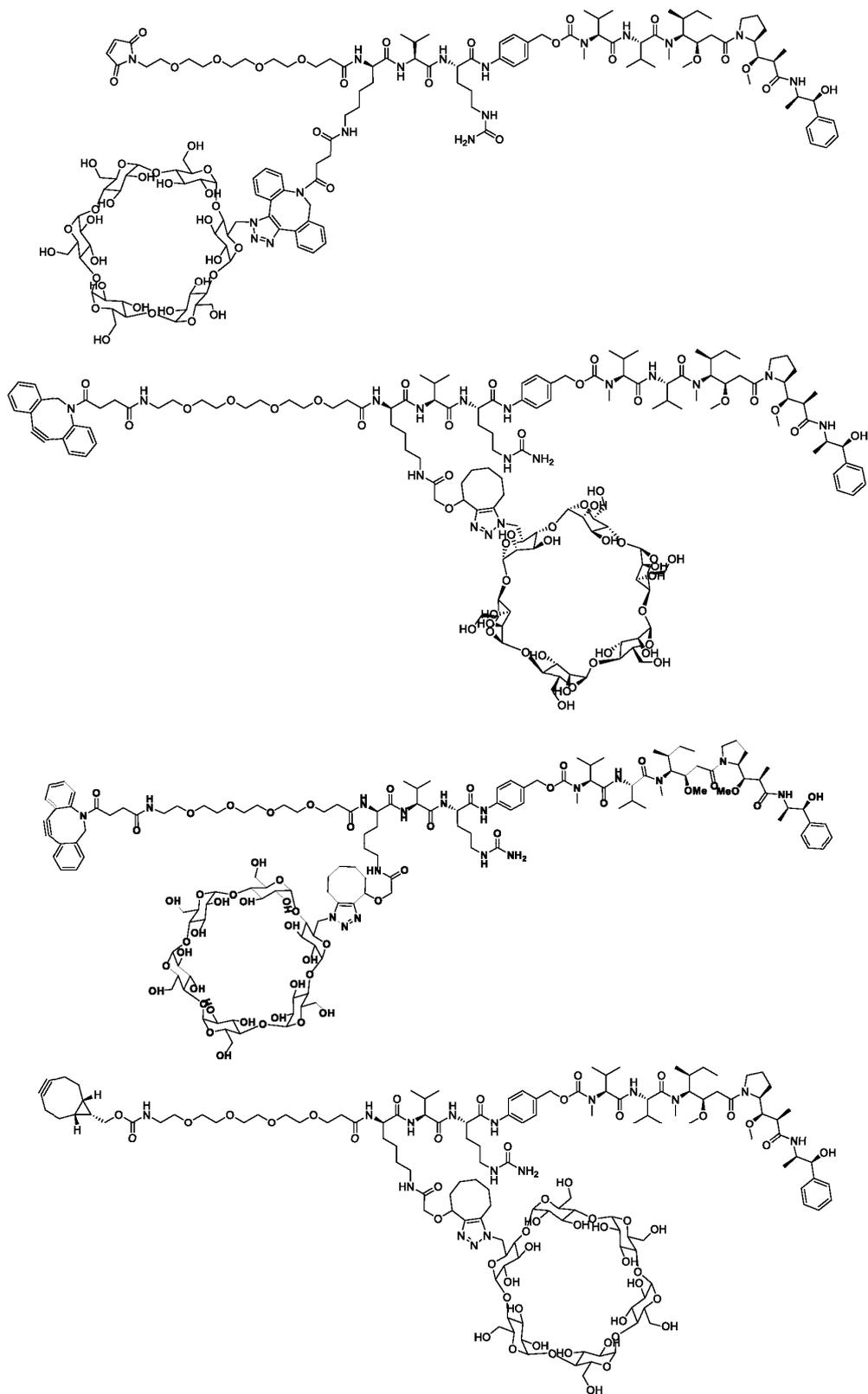
равен 1.

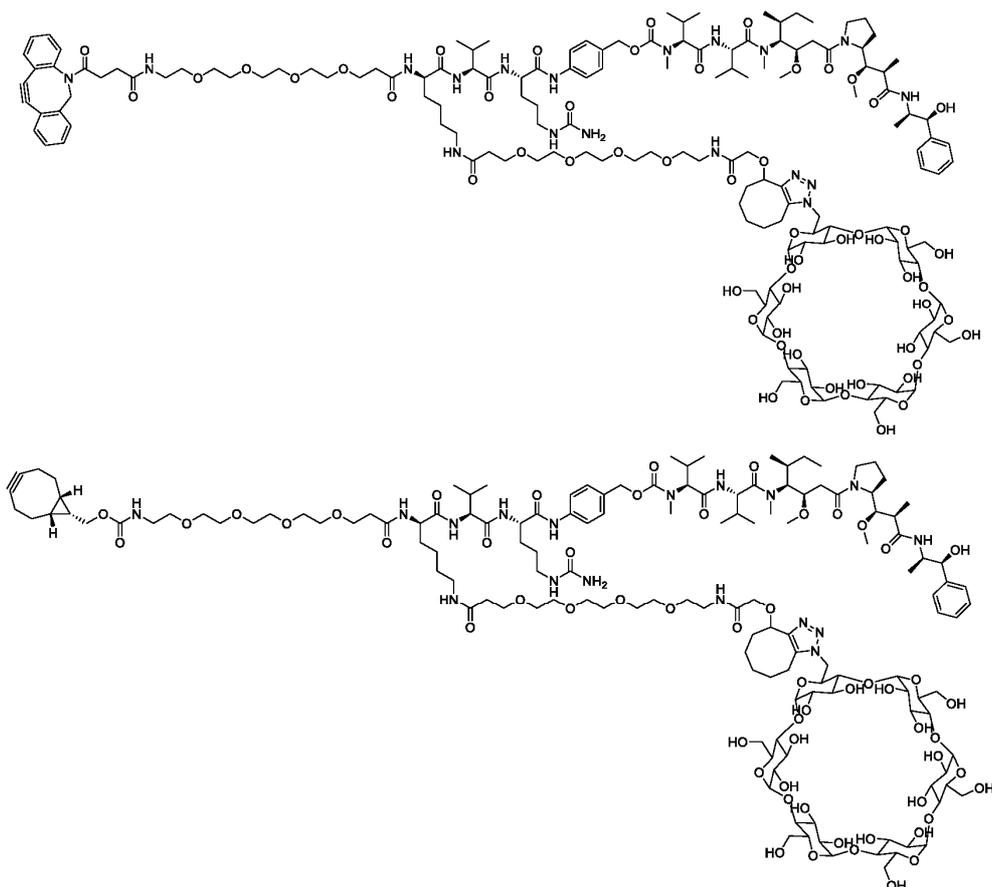
48. Соединение полезная нагрузка-линкер по любому из пп.32-47, где РА представляет собой полезную нагрузку, выбранную из группы, состоящей из остатков доластатина, ауристатина, майтанзиноида, растительного алкалоида, таксана и алкалоида барвинка.

49. Соединение полезная нагрузка-линкер по п.41, где соединение представляет собой:



046545





или его региоизомер, или смесь его региоизомеров.

50. Способ получения соединения по п.1, включающий стадию контактирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с соединением по любому из пп.32-49 в условиях, подходящих для образования связи между антителом или его антиген-связывающим фрагментом и соединением.

51. Конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий соединение полезная нагрузка-линкер по любому из пп.32-49, связанное с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, где линкер из соединения полезная нагрузка-линкер связан с одиночным остатком глутамина, лизина, или цистеина антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через RG' группу.

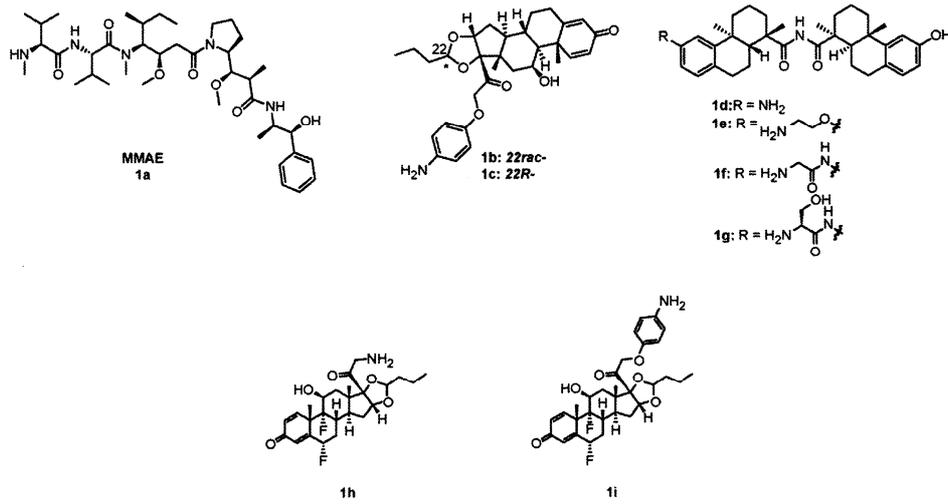
52. Конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий соединение полезная нагрузка-линкер по любому из пп.32-49, связанное с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через RG' группу, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой глутаминил-модифицированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

53. Способ лечения пролиферативного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного лечебного количества соединения по любому из пп.1-28 или фармацевтической композиции по пп.29-30.

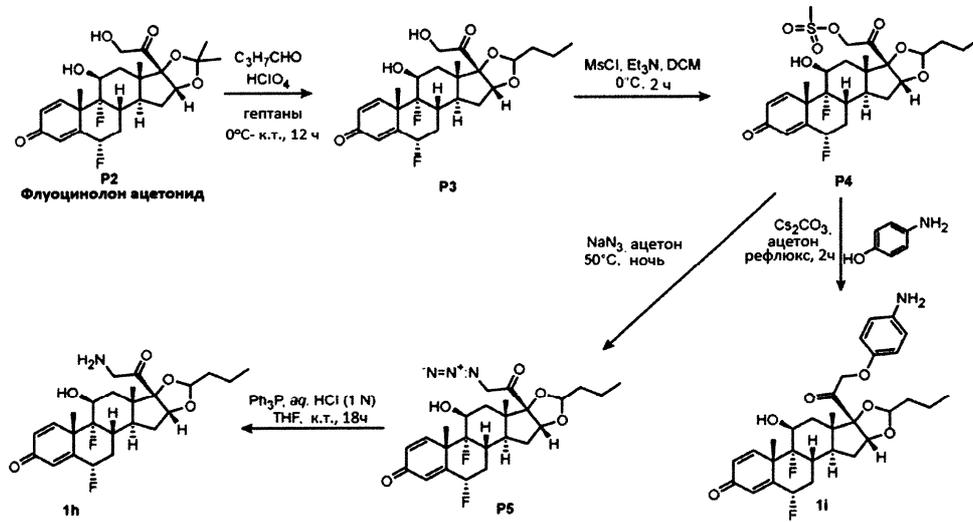
54. Способ лечения метаболического заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного лечебного количества соединения по любому из пп.1-28 или фармацевтической композиции по пп.29-30.

55. Способ лечения воспаления у субъекта, включающий введение субъекту эффективного лечебного количества соединения по любому из пп.1-28 или фармацевтической композиции по пп.29-30.

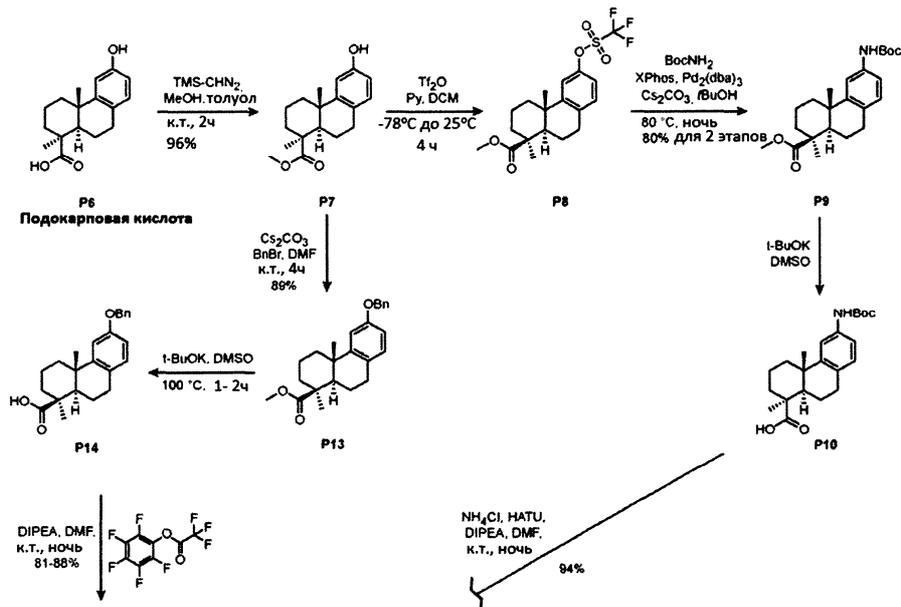
56. Способ лечения нейродегенеративного заболевания у субъекта, включающий введение субъекту эффективного лечебного количества соединения по любому из пп.1-28 или фармацевтической композиции по пп.29-30.

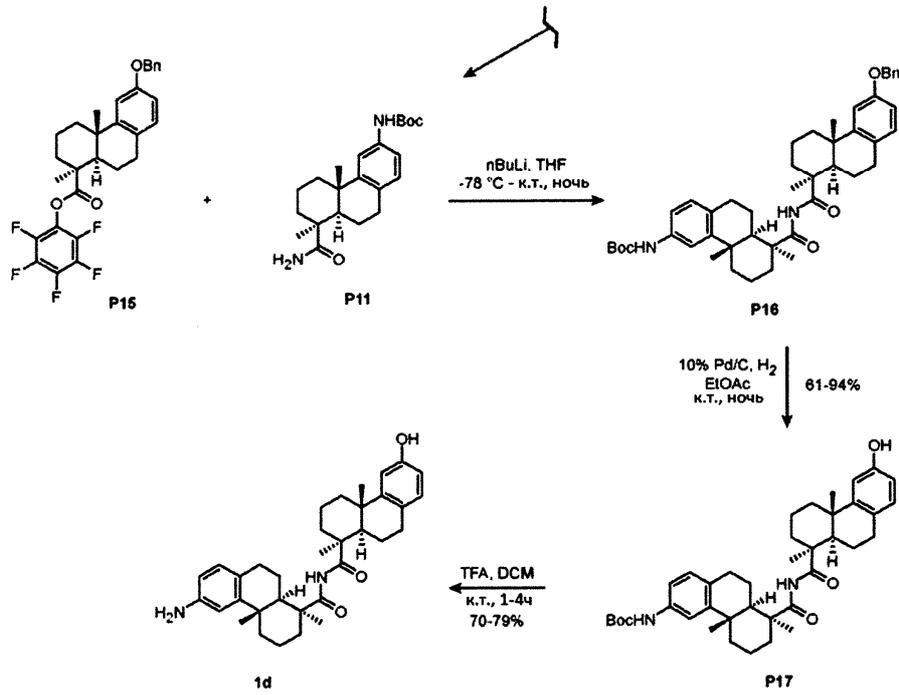


Фиг. 1А

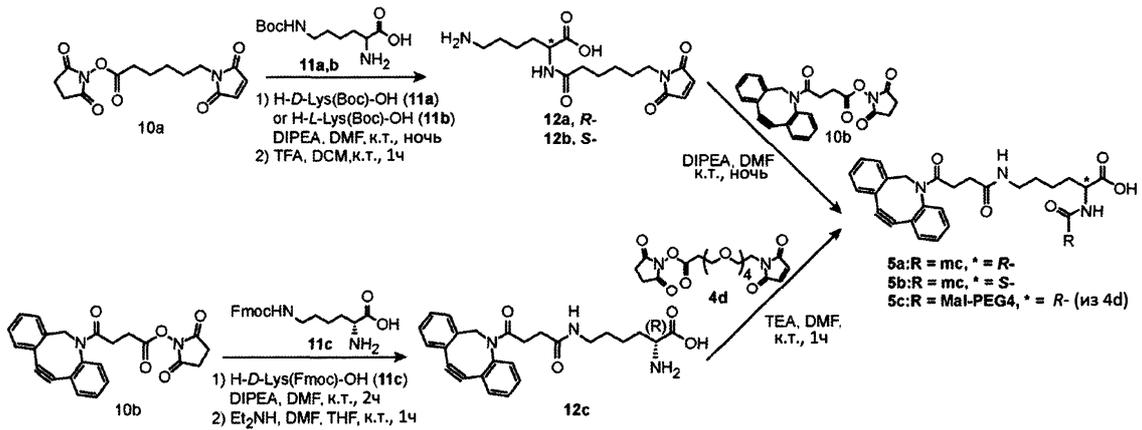


Фиг. 1В

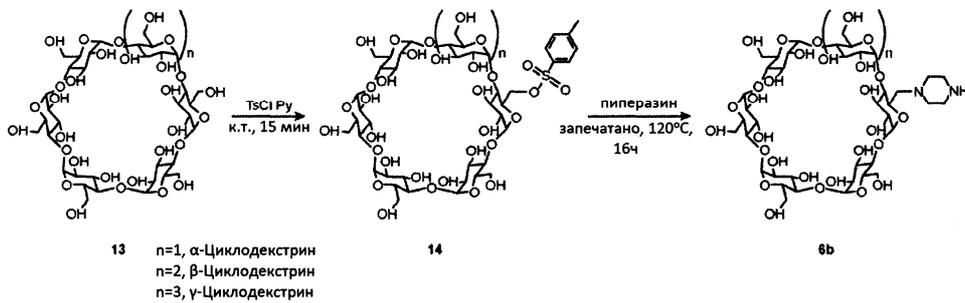




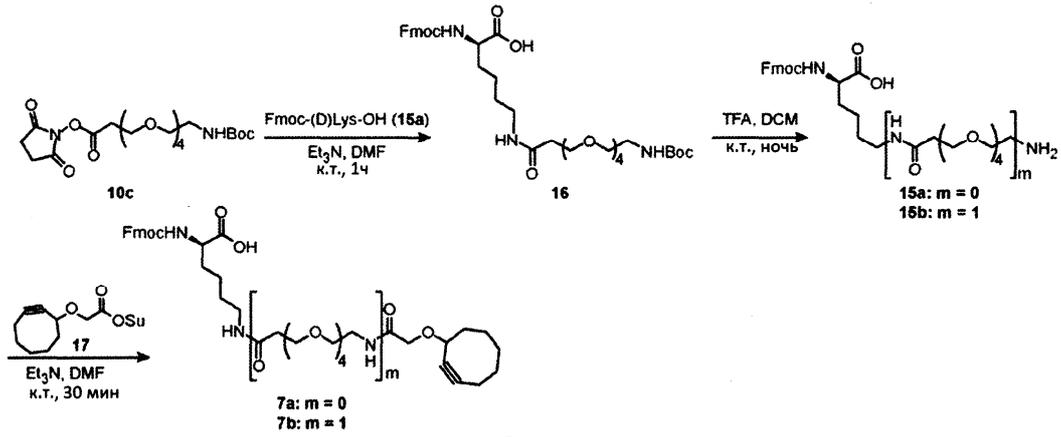
Фиг. 1С



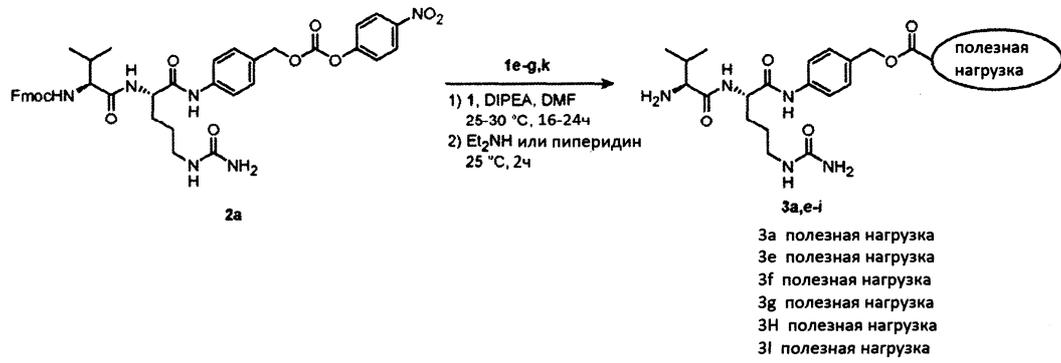
Фиг. 2



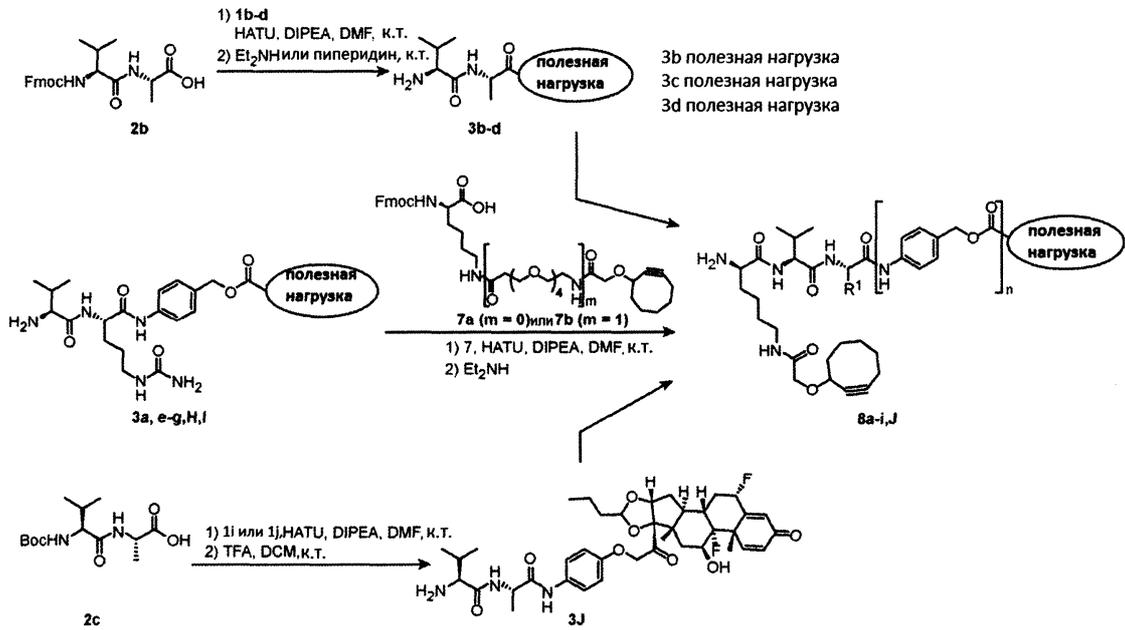
Фиг. 3



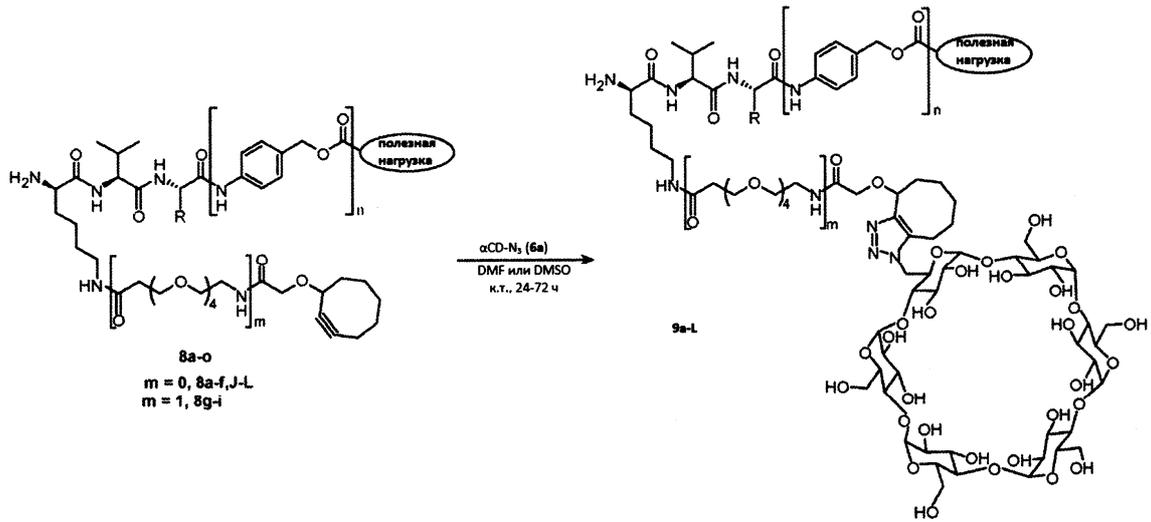
Фиг. 4



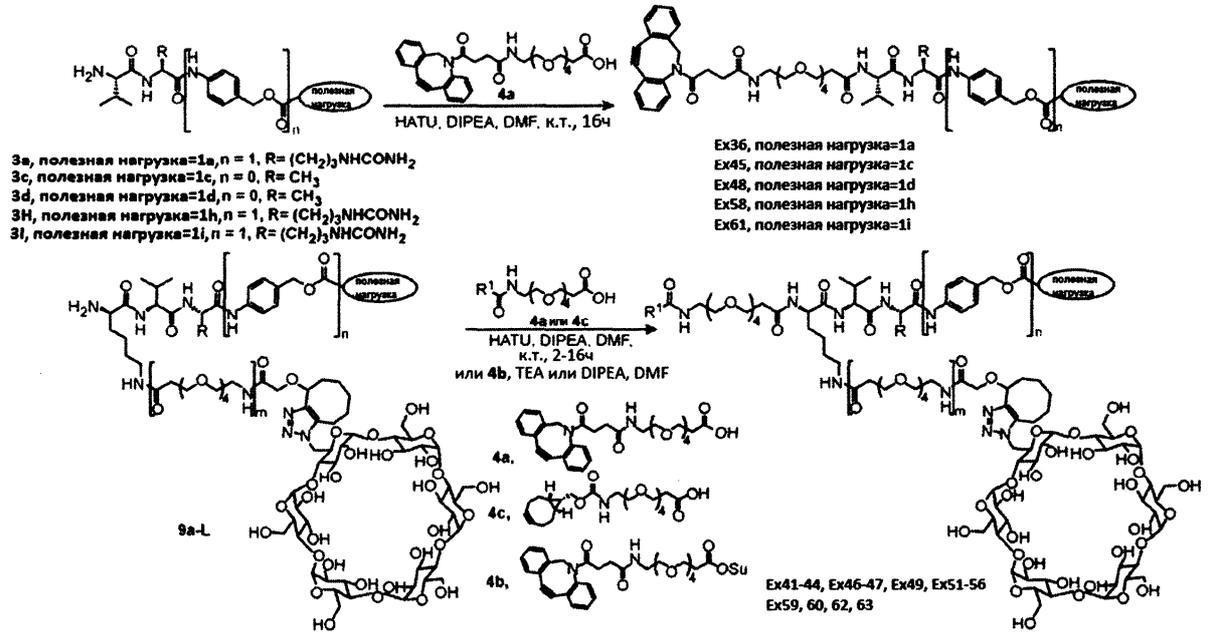
Фиг. 5



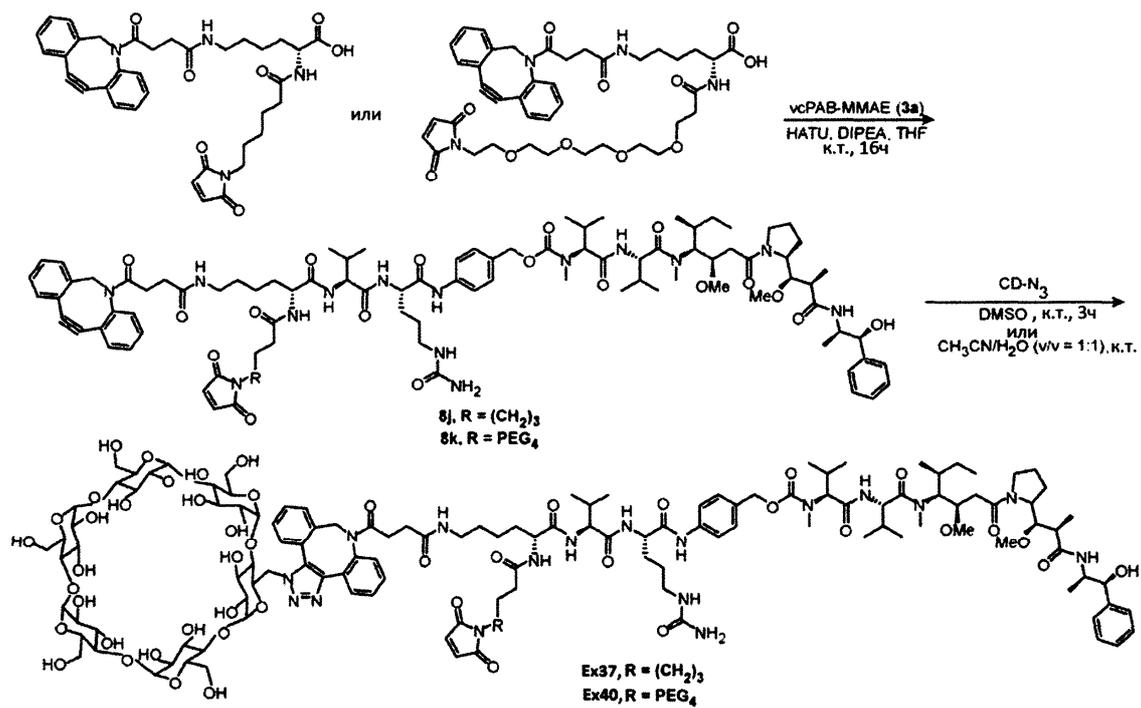
Фиг. 6



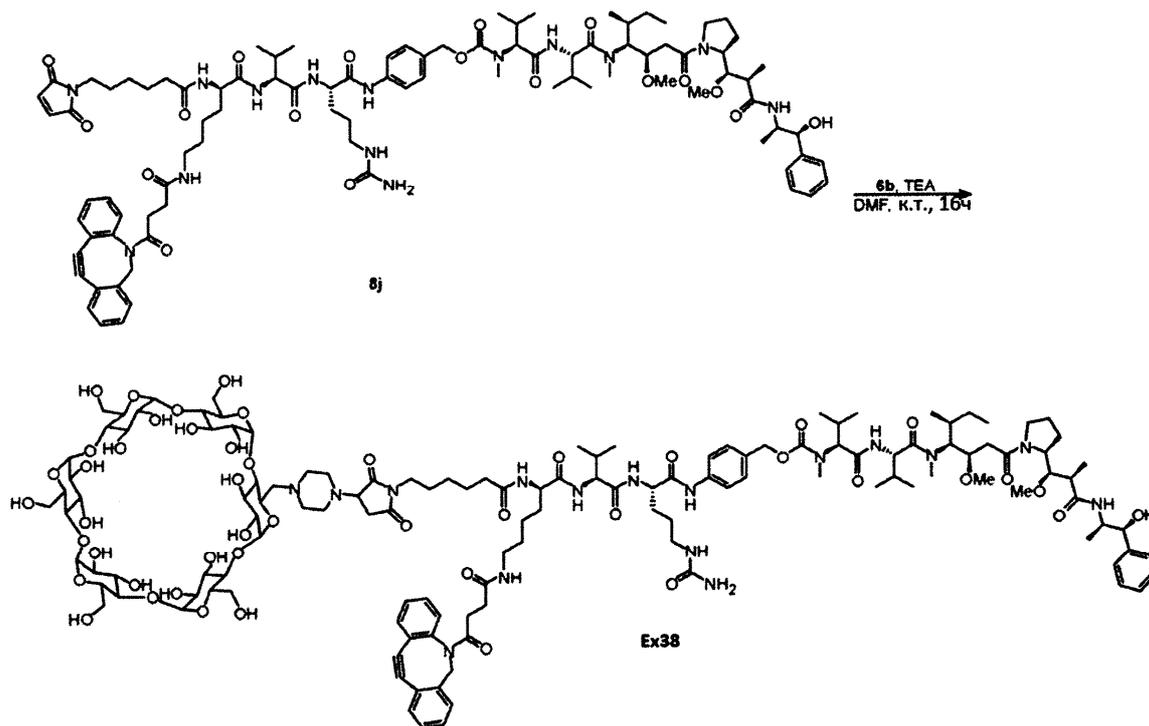
Фиг. 7



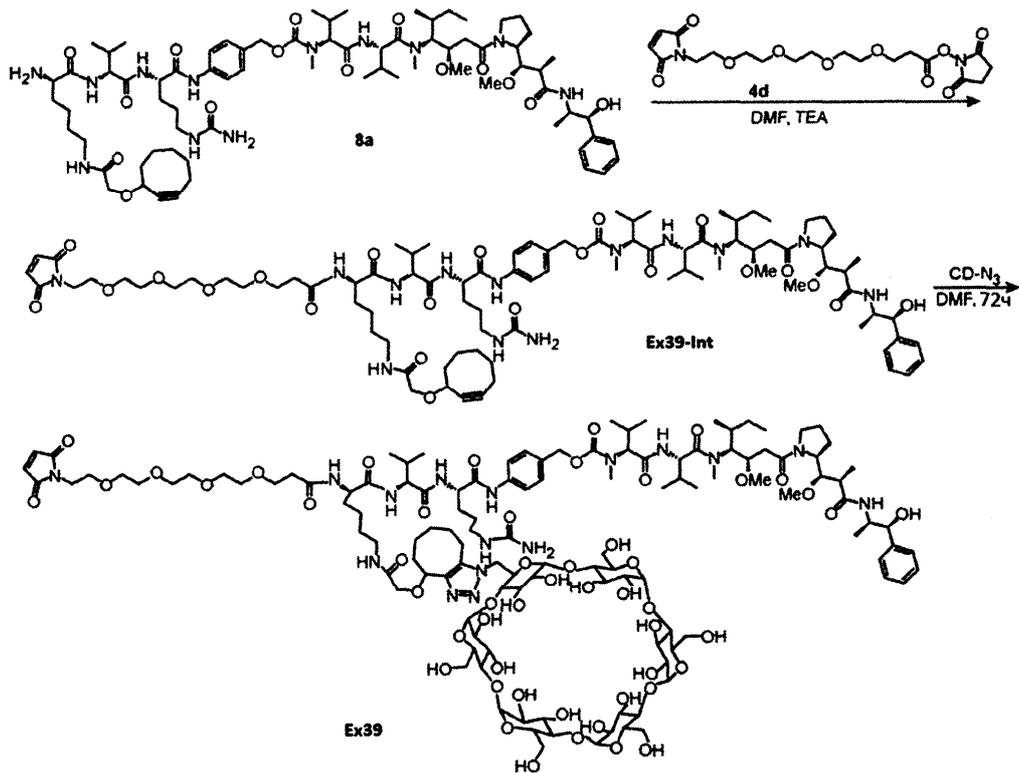
Фиг. 8



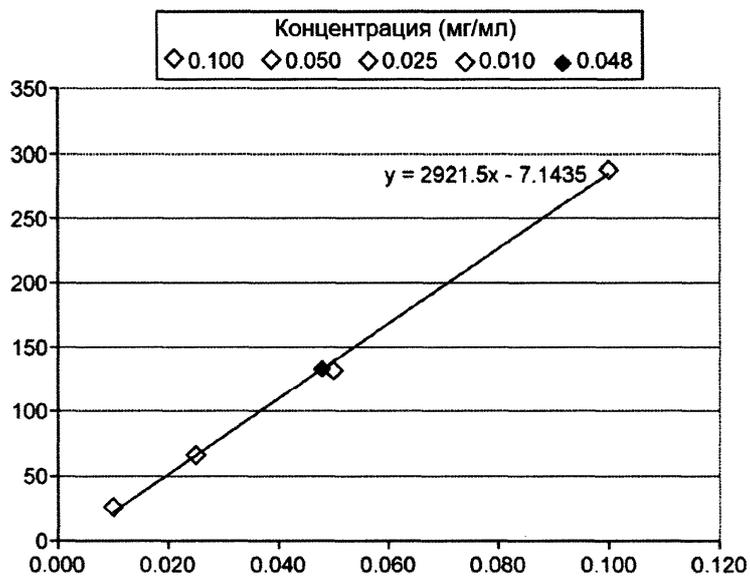
Фиг. 9



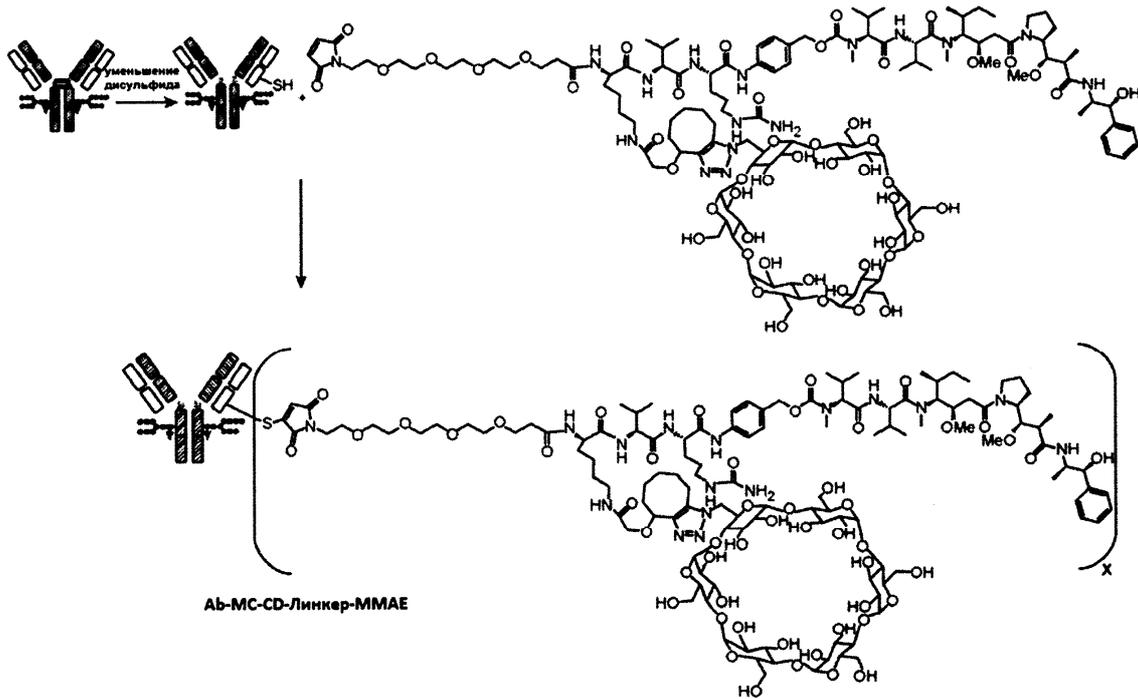
Фиг. 10



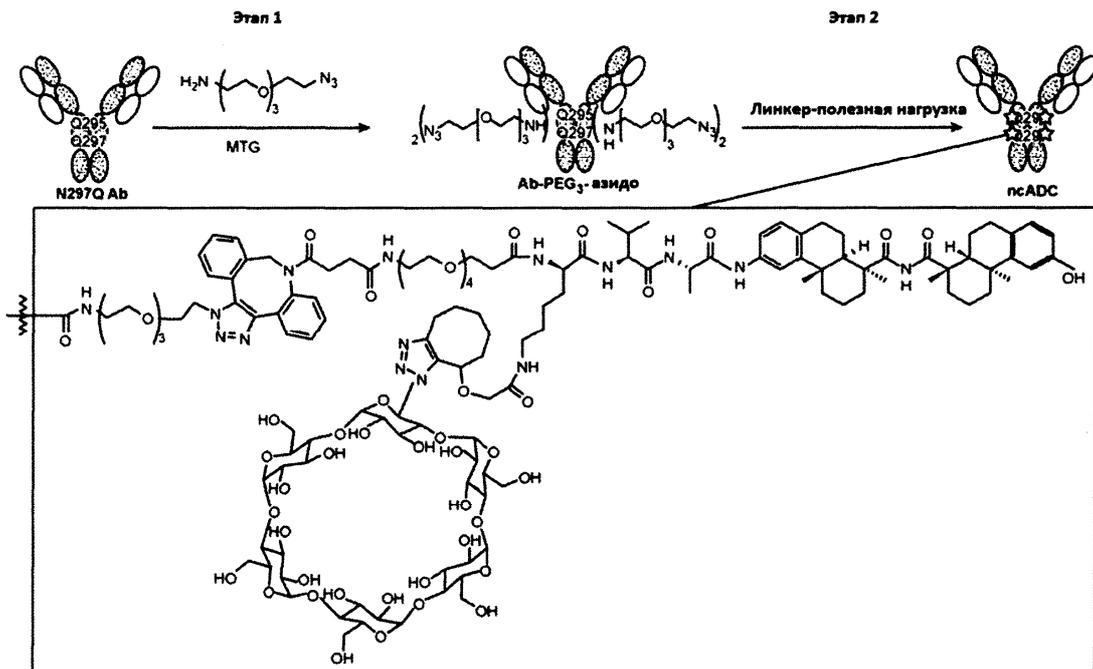
Фиг. 11



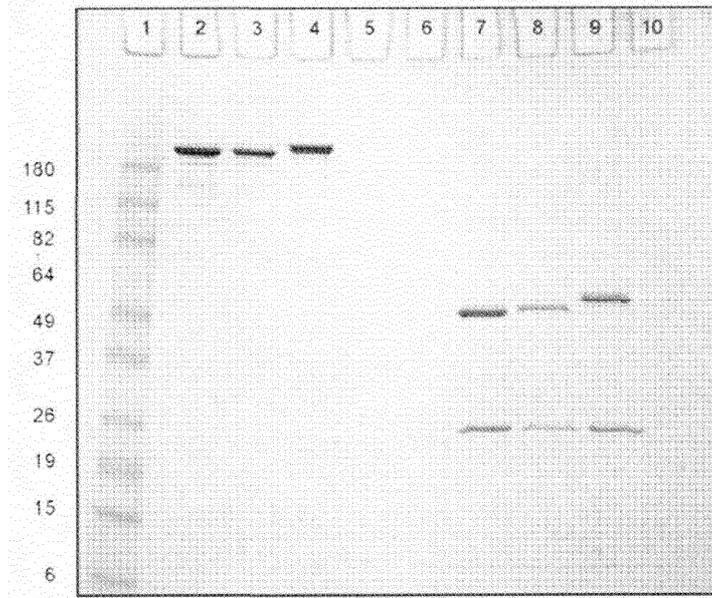
Фиг. 12



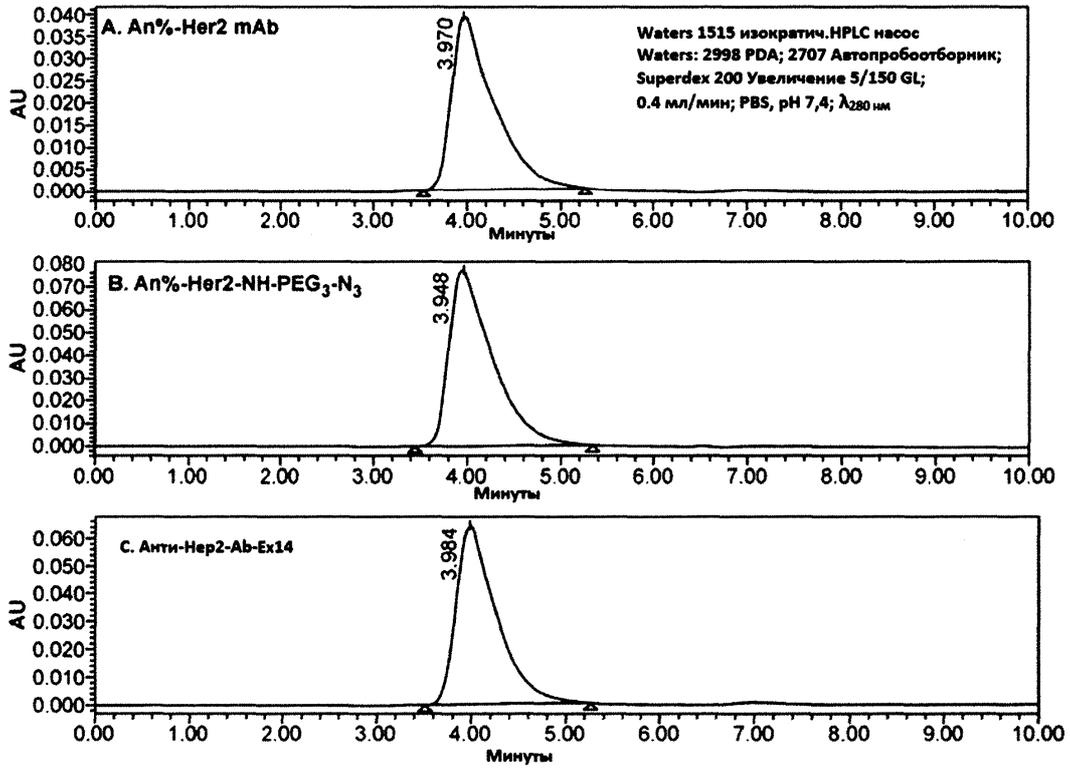
Фиг. 13



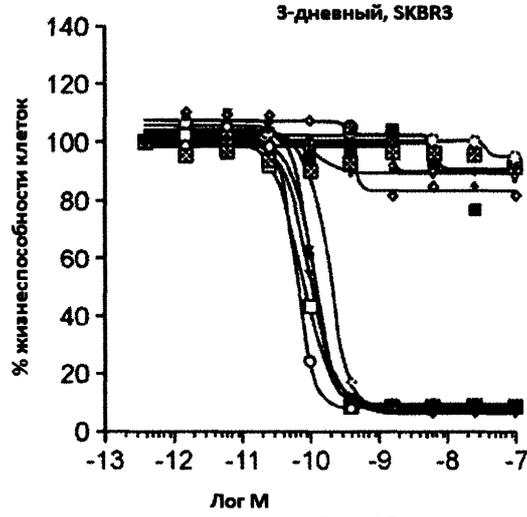
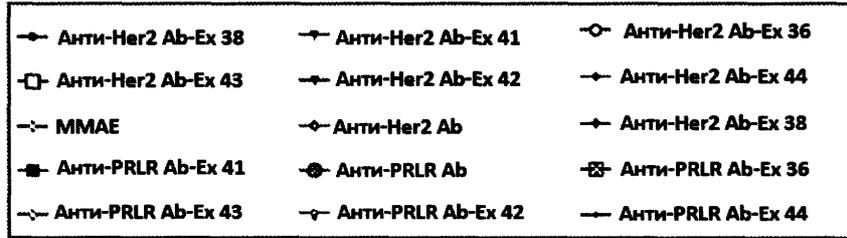
Фиг. 14



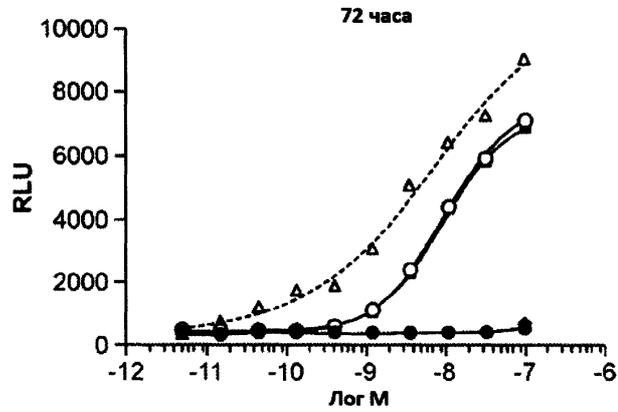
Фиг. 15



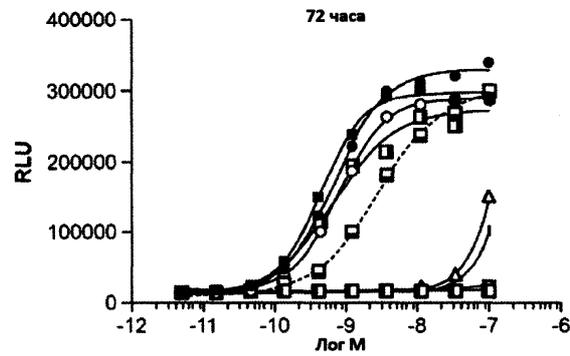
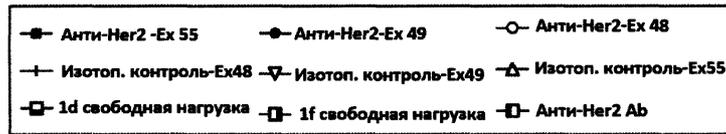
Фиг. 16



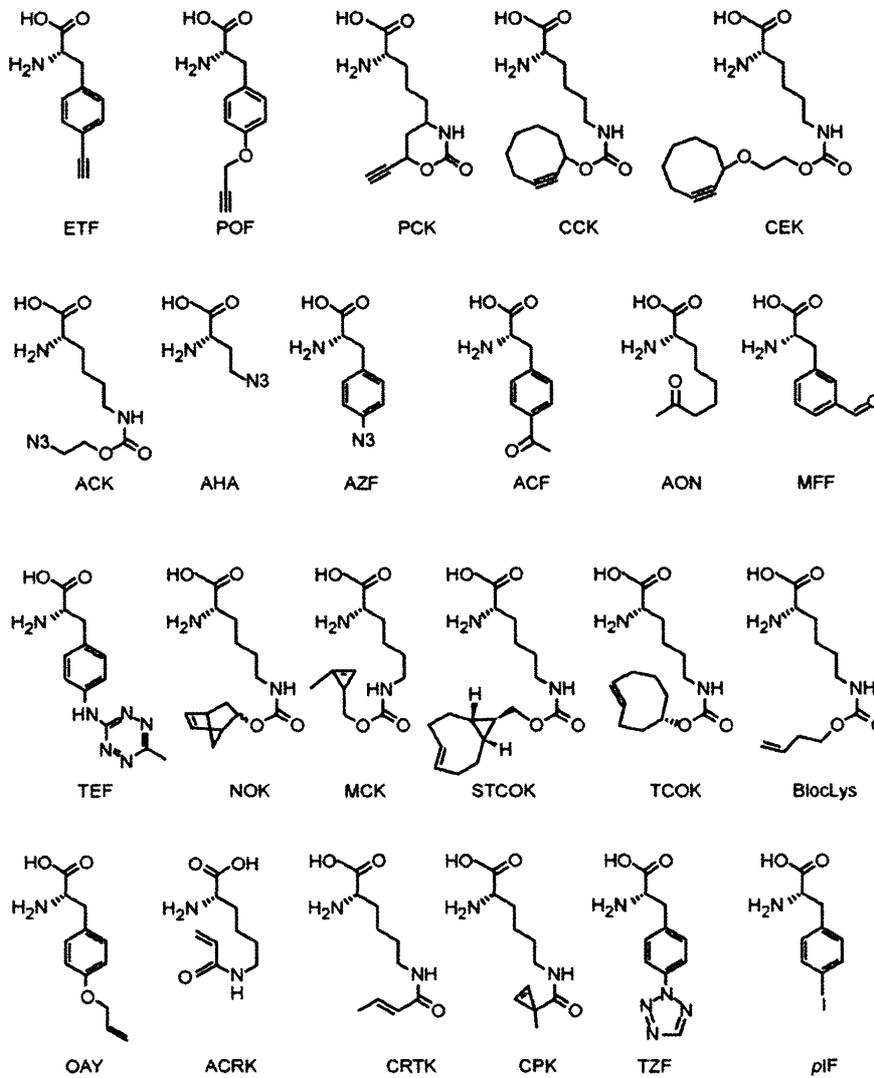
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2