

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393514** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.03.14

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
A61K 31/454 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.06.02

(54) **КОНЬЮГАТЫ НЕОДЕГРАДЕР-АНТИ-CD33 АНТИТЕЛО**

(31) **63/202,272; 63/282,588**

(32) **2021.06.03; 2021.11.23**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2022/055168**

(87) **WO 2022/254377 2022.12.08**

(71) Заявитель:
**ОРУМ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(KR); БРИСТОЛ-МАЙЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:

**Фишкин Натан, Парк Питер Ю., Бай
Чэнь (US)**

(74) Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Гизатулина
Е.М., Угрюмов В.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.
(RU)**

(57) В изобретении обеспечены неодеградеры (neoDegradars), конъюгированные с анти-CD33 антителами. Также обеспечены композиции, содержащие данные конъюгаты. Соединения и композиции применимы для лечения заболевания или состояния, например рака, у субъекта, нуждающегося в этом.

A1

202393514

202393514

A1

КОНЪЮГАТЫ НЕОДЕГРАДЕР-АНТИ-CD33 АНТИТЕЛО

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0001] Содержание представленного в электронном виде перечня последовательностей в текстовом файле ASCII (Название (Name): 4547_017PC02_Список последовательностей (Seqlisting)_ST25; Размер (Size): 42,724 байт; и Дата создания (Date of Creation): 31 мая 2022 г.), поданного вместе с заявкой, включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] В настоящем раскрытии обеспечены конъюгаты неодеградера (neoDegradер), в которых неодеградер конъюгирован с анти-CD33 антителом или его антигенсвязывающей частью. Также обеспечены композиции, содержащие данные конъюгаты. Конъюгаты и композиции применимы для лечения онкологического заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Деградация белков была обоснована в качестве терапевтической стратегии эффективностью иммуномодулирующих имидных препаратов. Данные соединения обладают способностью связываться с цереблонеом (CRBN) и способствовать рекрутированию и убиквитинированию белков-субстратов, опосредованному CRL4^{CRBN} E3-убиквитинлигазой. Считается, что иммуномодулирующие имиды действуют как "молекулярные клеи", заполняя участок связывания и придавая ему гидрофобные свойства, что перепрограммирует белковые взаимодействия между лигазой и нео-субстратами.

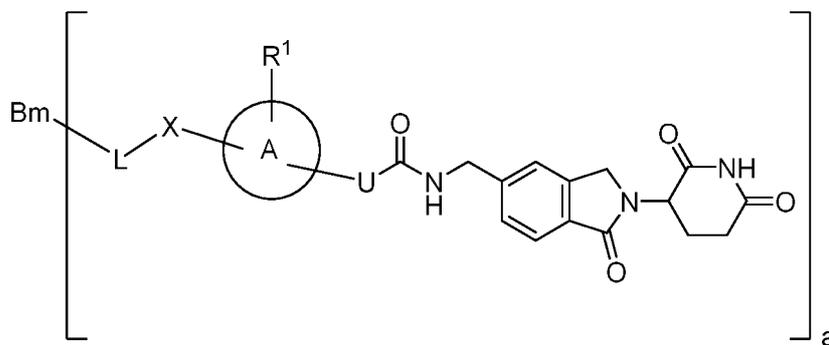
[0004] Несмотря на большой интерес к данным соединениям как к новым средствам лечения онкологических заболеваний, их применение до сих пор ограничивалось только гематологическими злокачественными новообразованиями, такими как множественная миелома и миелодиспластический синдром (МДС). Расширение библиотеки соединений, функция которых заключается в разрушении других онкопротеинов, многие из которых считались "неподдающимися лекарственным препаратам" ("undruggable"), является

активной областью разработки лекарственных средств. Таким образом, существует постоянная потребность в новых соединениях, способных воздействовать на такие альтернативные онкопротеины и лечить широкий спектр онкологических заболеваний.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Было показано, что лечение пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) низкомолекулярными GSPT1-деградерами приводит к клиническим ответам, но связано с серьезными нежелательными явлениями (НЯ). Пациенты с ОМЛ часто имеют высокий уровень CD33 на раковых клетках, что подтверждается клиническим одобрением нацеленного на CD33 ADC (конъюгата антитело-лекарственное средство (antibody-drug conjugate)), милотарга (Mylotarg), для лечения ОМЛ. В основе настоящего изобретения лежит открытие того, что объединение молекулы GSPT1-деградирующей полезной нагрузки, с антителом, нацеленным на CD33, может повысить как клиническую эффективность, так и переносимость GSPT1-деградера.

[0006] В первом аспекте настоящее раскрытие обеспечивает конъюгат формулы (I):



(I),

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

[0007] а представляет собой целое число от 1 до 10;

[0008] А представляет собой фенил или C₄-C₁₀циклоалкильное кольцо;

[0009] U выбран из NH и CF₂;

[0010] R¹ независимо выбран из водорода и галогена;

[0011] X выбран из -NR²-, =C(CH₃)-, -Q-(CH)_{2n}- и -Q(CH)_{2m}Q'(CH)_{2n}-; где

[0012] Q и Q' независимо друг от друга представляют собой O, S или N(R)²_v;

[0013] v равно 1 или 2;

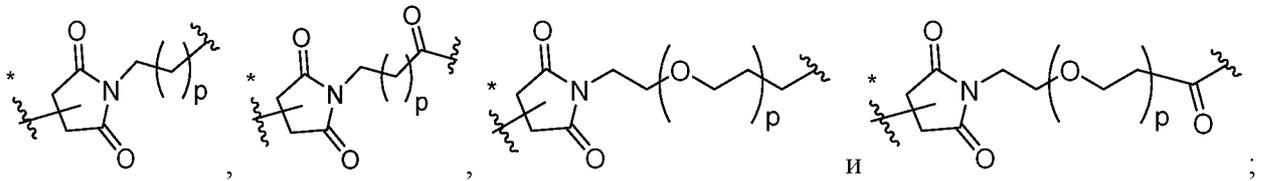
[0014] каждый R² независимо представляет собой водород или C₁-C₆алкил;

- [0015] n представляет собой целое число от 1 до 6; и
- [0016] m представляет собой целое число от 2 до 6;
- [0017] при этом левая часть каждой группы присоединена к L и правая часть присоединена к A; при условии, что когда X представляет собой NH или $-Q-(CH)_2n-$, R^1 представляет собой галоген;
- [0018] L представляет собой расщепляемый линкер или нерасщепляемый линкер; и
- [0019] V_m представляет собой анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающую часть.
- [0020] В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает определяющую комплементарность область (CDR) 1 переменной области тяжелой цепи (VH) (VH-CDR1), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, CDR1 переменной области легкой цепи (VL) (VL-CDR1), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает VH, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, и VL, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:8. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает константную область, при этом константная область отличается по меньшей мере одной аминокислотой от гемтузумаба. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть представляет собой антитело IgG1 или его антигенсвязывающую часть. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает аланин в аминокислотном положении 297, соответствующем константной области. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 10.
- [0021] В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает VH-CDR1, включающую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 19, VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, VL-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, и VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает VH, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, и VL, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть представляет собой антитело IgG1 или его антигенсвязывающую часть. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 26.

[0022] В некоторых аспектах a представляет собой целое число от 2 до 8.

[0023] В некоторых аспектах L представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых аспектах L выбран из группы, состоящей из



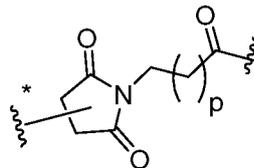
где:

[0024] p представляет собой целое число от 1 до 10;

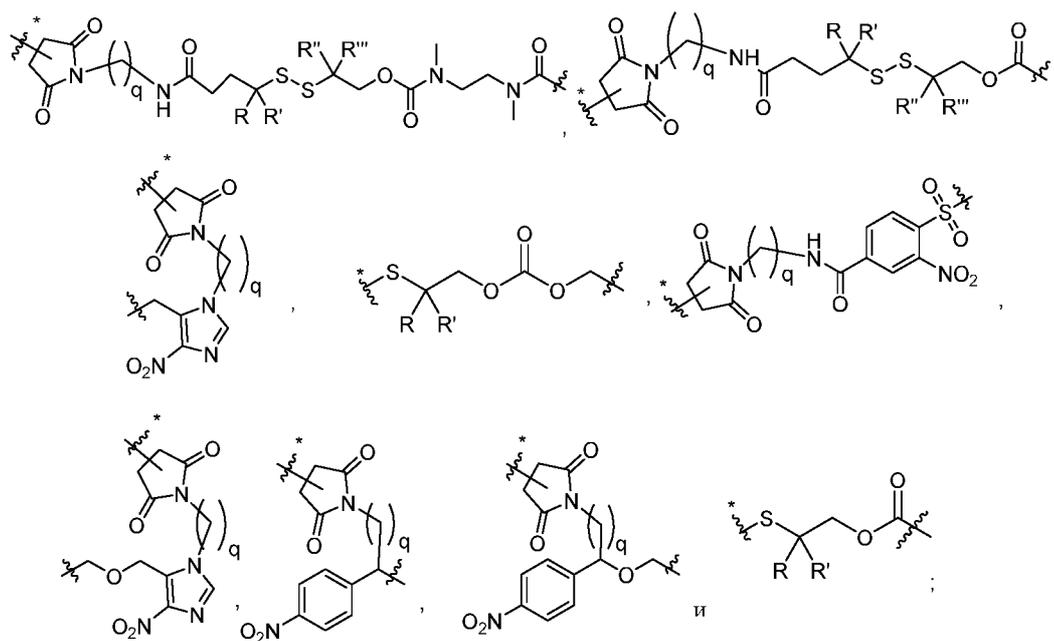
[0025] z представляет собой точку прикрепления к X ; и

[0026] $*$ представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

[0027] В некоторых аспектах L представляет собой

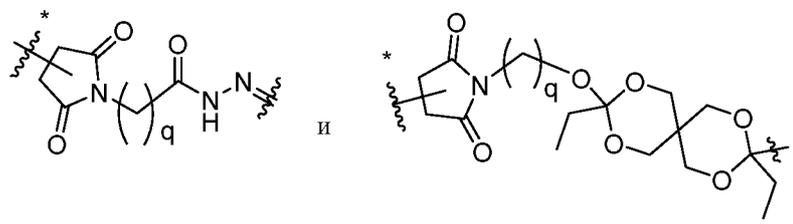


[0028] В некоторых аспектах p равно 5.



где:

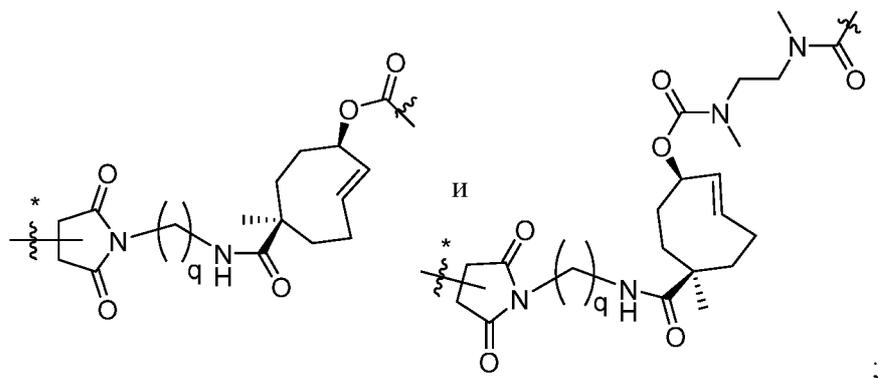
- [0040] q представляет собой целое число от 2 до 10;
- [0041] R, R', R'' и R''' независимо выбраны из водорода, C_1 - C_6 алкокси C_1 - C_6 алкила, $(C_1-C_6)_2NC_1$ - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, или две геминальные группы R , вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, могут образовывать циклобутильное или циклопропильное кольцо;
- [0042] \sim представляет собой точку прикрепления к X ; и
- [0043] \sim^* представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.
- [0044] В некоторых аспектах L представляет собой расщепляемый кислотой линкер. В некоторых аспектах L выбран из группы, состоящей из



- [0045] где:
- [0046] q представляет собой целое число от 2 до 10;
- [0047] \sim представляет собой точку прикрепления к X ; и

[0048]  представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

[0049] В некоторых аспектах L представляет собой линкер типа “клик-высвобождение” ("click-to-release"). В некоторых аспектах L выбран из



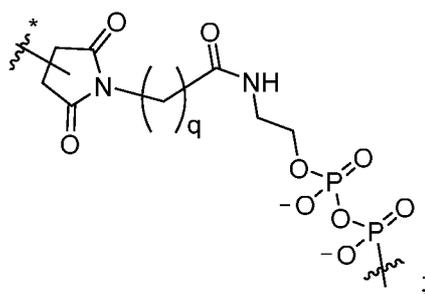
где:

[0050] q представляет собой целое число от 2 до 10;

[0051]  представляет собой точку прикрепления к X; и

[0052]  представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

[0053] В некоторых аспектах L представляет собой расщепляемый пирофосфатазой линкер. В некоторых аспектах L представляет собой



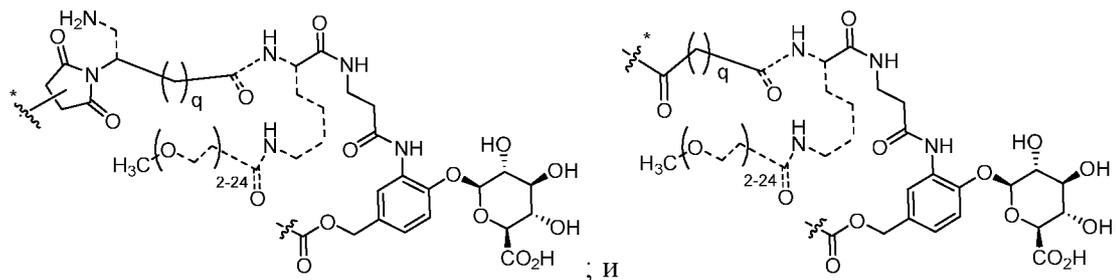
где:

[0054] q представляет собой целое число от 2 до 10;

[0055]  представляет собой точку прикрепления к X; и

[0056]  представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

[0057] В некоторых аспектах L представляет собой расщепляемый бета-глюкуронидазой линкер. В некоторых аспектах L выбран из



где:

[0058] q представляет собой целое число от 2 до 10;

[0059] ---- отсутствует или представляет собой связь;

[0060] ---^* представляет собой точку прикрепления к X; и

[0061] ---^* представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

[0062] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает конъюгат формулы

(I), где:

[0063] A представляет собой фенил;

[0064] U представляет собой NH;

[0065] R^1 представляет собой галоген; и

[0066] X представляет собой $-N(R^2)_v(CH_2)_mO(CH_2)_n-$; где:

[0067] v равно 1;

[0068] m и n равны 2; и

[0069] R^2 представляет собой метил.

[0070] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает конъюгат формулы

(I), где:

[0071] A представляет собой фенил;

[0072] U представляет собой NH;

[0073] R^1 представляет собой галоген; и

[0074] X представляет собой $-N(R^2)_v(CH_2)_mO(CH_2)_n-$; где:

[0075] v равно 2;

[0076] m и n равны 2; и

[0077] каждый R^2 представляет собой метил.

[0078] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает конъюгат формулы

(I), где:

- [0079] A представляет собой фенил;
- [0080] U представляет собой NH;
- [0081] R¹ представляет собой галоген; и
- [0082] X представляет собой -O(CH)_{2n}-; где:
- [0083] n равно 2.
- [0084] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает конъюгат формулы (I), где:
- [0085] A представляет собой фенил;
- [0086] U представляет собой NH;
- [0087] R¹ представляет собой галоген; и
- [0088] X представляет собой -S(CH)_{2n}-; где:
- [0089] n равно 2.
- [0090] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает конъюгат формулы (I), где:
- [0091] A представляет собой фенил;
- [0092] U представляет собой NH;
- [0093] R¹ представляет собой водород; и
- [0094] X представляет собой --NR²-; где:
- [0095] R² представляет собой метил.
- [0096] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает конъюгат формулы (I), где:
- [0097] A представляет собой фенил;
- [0098] U представляет собой NH;
- [0099] R¹ представляет собой галоген; и
- [0100] X представляет собой --NR²-; где:
- [0101] R² представляет собой водород.
- [0102] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает конъюгат формулы (I), где:
- [0103] A представляет собой фенил;
- [0104] U представляет собой NH;
- [0105] R¹ представляет собой водород; и
- [0106] X представляет собой -C(CH₃)=.

[0107] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает конъюгат формулы (I), где:

[0108] А представляет собой C₄-C₁₀циклоалкильное кольцо;

[0109] U представляет собой NH;

[0110] R¹ представляет собой водород; и

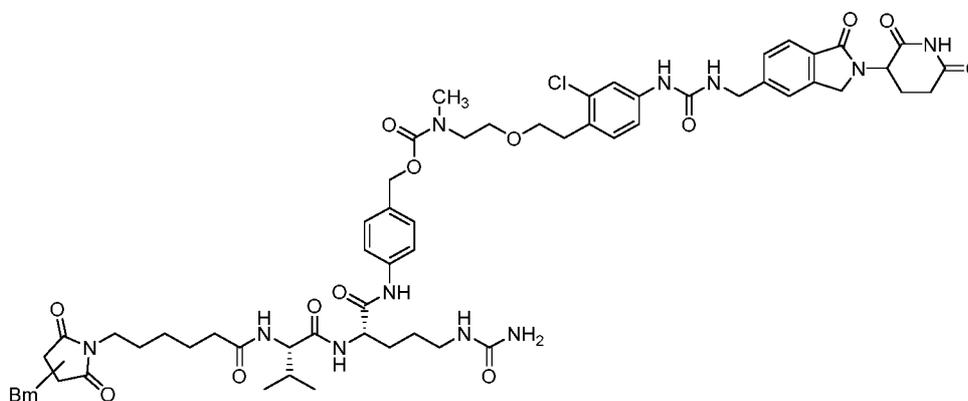
[0111] X представляет собой -N(R²)(CH₂)_mO(CH₂)_n-; где:

[0112] n равно 1;

[0113] m равно 2; и

[0114] R² представляет собой метил.

[0115] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает конъюгат формулы (V):

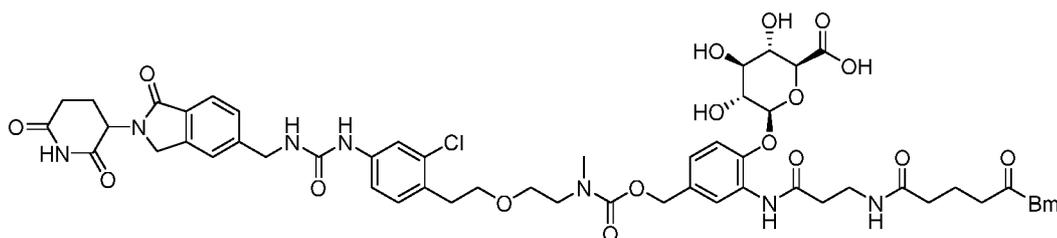


(V);

или его фармацевтически приемлемую соль, где Bm представляет собой анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающую часть. Анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть может включать, например, (i) VH-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, (ii) VH, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:4, и VL, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:8, (iii) тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 10, (iv) VH-CDR1,

включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, VL-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, и VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, (v) VH, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, и VL, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, или (vi) тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 26.

[0116] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает конъюгат формулы (VI):

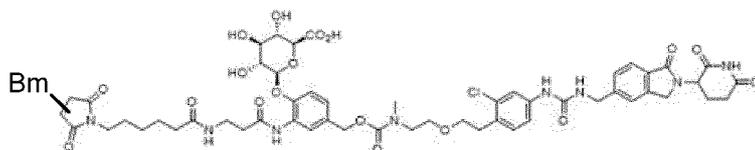


(VI);

или его фармацевтически приемлемую соль, где Bm представляет собой анти-CD33 или его антигенсвязывающую часть. Анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть может включать, например, (i) VH-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, (ii) VH, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и VL, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, (iii) тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 10, (iv) VH-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, VH-

CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, VL-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, и VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, (v) VH, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, и VL, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, или (vi) тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 26.

[0117] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает конъюгат формулы (VI):



(VII);

или его фармацевтически приемлемую соль, где Bm представляет собой анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающую часть. Анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть может включать, например, (i) VH-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, (ii) VH, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и VL, включающую аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, (iii) тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 10, (iv) VH-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, VL-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, и VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, (v) VH, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, и VL, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, или (vi) тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 26.

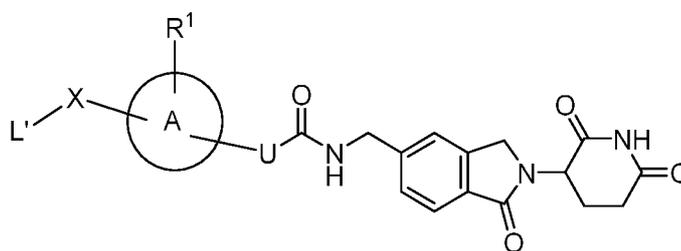
[0118] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую конъюгат или соединение, обеспеченное в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемую соль, и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

[0119] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ лечения онкологического заболевания или миелодиспластического синдрома у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтически приемлемого количества описанного выше конъюгата или описанной выше композиции или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых аспектах онкологическое заболевание представляет собой гемобластоз/злокачественное заболевание крови. В некоторых аспектах онкологическое заболевание представляет собой множественную миелому, лейкоз, злокачественную лимфому, болезнь Ходжкина или хроническое миелопролиферативное заболевание. В некоторых аспектах онкологическое заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз или лимфому. В некоторых аспектах онкологическое заболевание представляет собой острый миелоидный лейкоз. В некоторых аспектах онкологическое заболевание устойчиво или рефрактерно по отношению к милотаргу.

[0120] В некоторых аспектах способ дополнительно включает введение субъекту фармацевтически приемлемого количества дополнительного средства до, после или одновременно с конъюгатом или его фармацевтически приемлемой солью. В некоторых

аспектах дополнительное средство представляет собой цитотоксическое средство или модификатор иммунного ответа. В некоторых аспектах модификатор иммунного ответа представляет собой ингибитор контрольных точек. В некоторых аспектах ингибитор контрольных точек включает ингибитор PD-1, ингибитор PD-L1, ингибитор CTLA-4, ингибитор TIM3 и/или ингибитор LAG-3.

[0121] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает способ получения конъюгата формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, причем способ включает реакцию взаимодействия анти-CD33 антитела или его антигенсвязывающей части с соединением формулы (I-1):



(I-1),

[0122] или его фармацевтически приемлемой солью, где:

[0123] а представляет собой целое число от 1 до 10;

[0124] А представляет собой фенил или C₄-C₁₀циклоалкильное кольцо;

[0125] R¹ независимо выбран из водорода и галогена;

[0126] U выбран из NH и CF₂;

[0127] X выбран из -N(R²)_v-, =C(CH₃)-, -Q-(CH₂)_n- и -Q(CH₂)_mQ'(CH₂)_n-; где

[0128] v равно 1 или 2;

[0129] Q и Q' независимо друг от друга представляют собой O, S или NR²;

[0130] каждый R² независимо представляет собой водород или C₁-C₆алкил;

[0131] n представляет собой целое число от 1 до 6; и

[0132] m представляет собой целое число от 2 до 6;

[0133] при этом левая часть каждой группы присоединена к L' и правая часть присоединена к А;

[0134] при условии, что когда X представляет собой NH или -Q-(CH₂)_{2n}-, R¹ представляет собой галоген;

[0135] L' представляет собой предшественник расщепляемого или нерасщепляемого линкера, конъюгирующий с анти-CD33 антителом или его антигенсвязывающей частью. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает VH-

CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 4, и переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 8. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает константную область, при этом константная область отличается по меньшей мере одной аминокислотой от гемтузумаба. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть представляет собой антитело IgG1 или его антигенсвязывающую часть. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает аланин в аминокислотном положении 297, соответствующем константной области соответствующей константной области. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 10. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает VH-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, VL-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, и VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает VH, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, и VL, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть представляет собой антитело IgG1 или его антигенсвязывающую часть. В некоторых аспектах анти-CD33

антитело включает тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 26.

[0136] В некоторых аспектах способ дополнительно включает восстановление анти-CD33 антитела или его антигенсвязывающей части перед реакцией взаимодействия с соединением формулы (I-1).

[0137] В некоторых аспектах L' представляет собой целое число от 2 до 8. В некоторых аспектах L' представляет собой предшественник нерасщепляемого линкера, предшественник расщепляемого линкера, предшественник биоразлагаемого линкера, предшественник расщепляемого кислотой линкера, предшественник расщепляемого пирофосфатазой линкера, предшественник расщепляемого бета-глюкоронидазой линкера или любую их комбинацию.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0138] На фигуре 1 представлена *in vivo* активность репрезентативных конъюгатов неодеградеров против опухолей MV411 (CD33+). По оси X показан день после введения препарата. По оси Y показан объем опухоли (мм³) после введения носителя, 3 мг/кг CD33AB-соединения (Ia), 2,83 мг/кг CD33AB-соединения (Ie), 2,99 мг/кг CD33AB-соединения (Ih), 0,1 мг/кг милотарга, 50 мг/кг венетоклакса и 5 мг/кг СС-90009.

[0139] На фигуре 2 представлена *in vitro* активность huMy9-6 (AB1)-соединения (Ia) в отношении CD-33-позитивных и CD33-негативных злокачественных новообразований.

[0140] На фигуре 3 представлена *in vivo* активность конъюгатов на основе AB1 против опухолей MV4-11 (CD33+). По оси X показан день после введения препарата. По оси Y показан объем опухоли (мм³) после введения носителя, AB1-соединения (Ia), AB1-соединения (Ii), AB1-соединения (Id), AB1-соединения (Ij), AB1-соединения (Ie), AB1-соединения (Ik), милотарга, гемтузумаба-соединения I(a) и СС-90009.

[0141] На фигуре 4 представлена стабильность конъюгатов гемтузумаба и CD33AB.

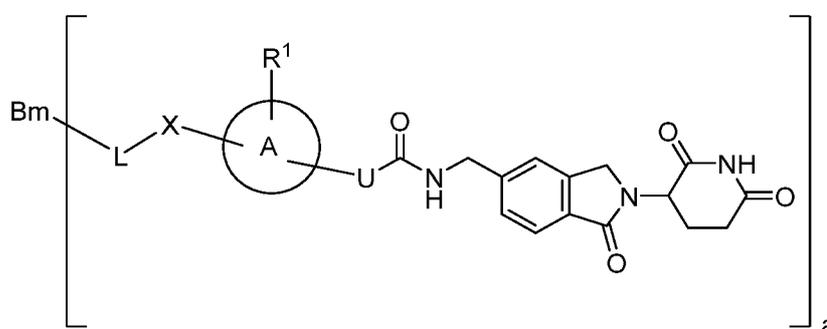
[0142] На фигуре 5 представлена *in vivo* активность конъюгатов на основе гемтузумаба против опухолей MV4-11 (CD33+). По оси X показан день после введения препарата. По оси Y показан объем опухоли (мм³) после введения носителя, 3 мг/кг гемтузумаба - соединения (Ia), 5 мг/кг гемтузумаба - соединения (Ia), 3 мг/кг CD33AB-соединения (Ia) 5 мг/кг CD33AB-соединения (Ia), 3 мг/кг гемтузумаба IgG1 LALA-

соединения (Ia), 5 мг/кг гемтузумаба IgG1 LALA-соединения (Ia), 5 мг/кг гемтузумаба-соединения (Ie), 25 мг/кг венетоклакса и 50 мг/кг венетоклакса.

[0143] На фигуре 6A и 6B показана *in vitro* активность конъюгата АВ1-соединение (Ia) против нечувствительных к милотаргу клеток ОМЛ (ОМЛ-193 (фигура 6A) и Kasumi-6 (фигура 6B)). По оси X показана концентрация и по оси Y показана процентная жизнеспособность клеточной линии после обработки.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0144] Настоящее раскрытие относится к конъюгату формулы (I):



(I),

или его фармацевтически приемлемой соли, где:

a представляет собой целое число от 1 до 10;

A представляет собой фенил или C₄-C₁₀циклоалкильное кольцо;

R¹ независимо выбран из водорода и галогена;

U выбран из NH и CF₂;

X выбран из -N(R²)_v-, =C(CH₃)-, -Q-(CH₂)_n- и -Q(CH₂)_mQ'(CH₂)_n-; где

Q и Q' независимо друг от друга представляют собой O, S или N(R)²_v;

v равно 1 или 2;

каждый R² независимо представляет собой водород или C₁-C₆алкил;

n представляет собой целое число от 1 до 6;

m представляет собой целое число от 2 до 6;

при этом левая часть каждой группы присоединена к L и правая часть присоединена к A;

при условии, что когда X представляет собой NH или -Q-(CH)_{2n}-, R¹ представляет собой галоген;

L представляет собой расщепляемый линкер или нерасщепляемый линкер; и

Vm представляет собой анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающую часть, например, анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть VH-CDR1, включающая аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающая аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающая аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, CDR1 вариабельной области легкой цепи (VL), включающая аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, VL-CDR2, включающая аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и VL-CDR3, включающая аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть, включающая VH, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и VL, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; или анти-CD33 антитело, включающее тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 10.

[0145] Настоящее раскрытие также обеспечивает соединение, описанное выше, которое слито с анти-CD33 антителом или его антигенсвязывающей частью, композицию, включающую соединение или конъюгат, или способ применения или получения соединения или конъюгата.

I. Определения.

[0146] Для лучшего понимания настоящего описания сначала даются определения некоторых терминов. Дополнительные определения приведены в подробном описании.

[0147] Следует иметь в виду, что используемые в настоящем документе термины в единственном числе охватывают и множественное число; например, "нуклеотидная последовательность" означает одну или несколько нуклеотидных последовательностей. По существу, термины "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо. Кроме того, следует отметить, что пункты формулы изобретения могут быть сформулированы так, чтобы исключить любой необязательный элемент. По существу, данное утверждение предназначено служить в качестве предшествующей основы для применения такой исключающей терминологии, как "исключительно", "только" и тому подобное, в связи с перечислением элементов формулы изобретения или с применением "отрицательного" ограничения.

[0148] Кроме того, термин "и/или" при использовании в данном документе следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без другого. Таким образом, термин "и/или", используемый в данном документе во фразе, такой как "А и/или В", предназначен для включения "А и В", "А или В", "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогичным образом, термин "и/или", используемый во фразе, такой как "А, В и/или С", предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

[0149] Понятно, что везде, где аспекты описаны в данном документе с помощью термина "включающий", также предусмотрены аналогичные аспекты, описанные в терминах "состоящий из" и/или "состоящий по существу из".

[0150] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее раскрытие. Например, the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, предоставляют специалистам общий словарь многих терминов, используемых в данном раскрытии.

[0151] Единицы измерения, префиксы и символы обозначены в их форме, принятой согласно Международной системе единиц (Système International de Unites (SI)). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Когда диапазон значений указан, следует понимать, что каждое промежуточное целочисленное значение и каждая его доля между перечисленными верхним и нижним пределами данного диапазона также конкретно раскрыты вместе с каждым поддиапазоном между такими значениями. Верхний и нижний пределы любого диапазона могут быть независимо включены в диапазон или исключены из него, и каждый диапазон, в который включены любое, либо оба, либо ни одно из предельных значений, также входит в объем изобретения. Таким образом, указанные в настоящем документе диапазоны понимаются как сокращение для всех значений внутри диапазона, включая указанные конечные точки. Например, диапазон от 1 до 10 означает, что он включает любое число, комбинацию чисел или поддиапазон из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

[0152] Когда значение явно указано, следует понимать, что значения, которые приблизительно равны количеству или величине, что и указанное значение, также входят в объем изобретения. При раскрытии комбинации каждая субкомбинация элементов данной комбинации также специально раскрыта и входит в объем изобретения. И наоборот, когда разные элементы или группы элементов раскрыты индивидуально, их комбинации также раскрыты. Когда любой элемент изобретения раскрывается как имеющий множество альтернатив, также раскрываются примеры данного изобретения, в которых каждая альтернатива исключается отдельно или в любой комбинации с другими альтернативами; более чем один элемент изобретения может иметь такие исключения, и тем самым раскрыты все комбинации элементов, имеющих такие исключения.

[0153] Термин "DAR", используемый в настоящем документе, означает соотношение лекарственный препарат-антитело в конъюгате, которое представляет собой среднее число комплексов неодеградер-линкер, связанных с каждым антителом. В некоторых аспектах DAR описываемых в настоящем документе конъюгатов составляет от 1 до 10. В некоторых аспектах DAR описываемых в настоящем документе конъюгатов составляет от 1 до 8. В некоторых аспектах DAR описываемых в настоящем документе конъюгатов составляет 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9 или 10.

[0154] Термин "антитело", используемый в настоящем документе, также относится к полноразмерной молекуле иммуноглобулина или иммунологически активной части полноразмерной молекулы иммуноглобулина, т. е. к молекуле, содержащей антигенсвязывающий участок, который иммуноспецифически связывает антиген интересующей мишени или ее части, включая, но не ограничиваясь этим, раковые клетки или клетки, которые продуцируют аутоиммунные антитела, связанные с аутоиммунным заболеванием. Иммуноглобулин, раскрытый в настоящем документе, может быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса иммуноглобулиновой молекулы. Иммуноглобулины могут быть получены из любого вида. Однако в одном из аспектов иммуноглобулин имеет человеческое, мышинное или кроличье происхождение.

[0155] Термин "однодоменное антитело", также известно как нанотело, представляет собой фрагмент антитела, состоящий из одного мономерного переменного домена антитела с молекулярной массой от около 12 кДа до около 15 кДа. Однодоменные антитела могут быть основаны на переменных доменах тяжелых цепей или легких цепей. Примеры однодоменных антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты $V_{\text{H}}\text{H}$ и фрагменты V_{NAR} .

[0156] "Фрагменты антител" включают часть интактного антитела, как правило, его антигенсвязывающую или переменную область. Примерами фрагментов антител являются фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела; фрагменты, полученные с помощью библиотеки экспрессии Fab, антиидиотипические (анти-Id) антитела, CDR (определяющая комплементарность область) и эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеперечисленных антител, которые иммуноспецифически связываются с антигенами раковых клеток, вирусными или микробными антигенами, одноцепочечные молекулы антител; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0157] "Интактное антитело" представляет собой антитело, которое включает антигенсвязывающую переменную область, а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Константные домены могут представлять собой константные домены нативных последовательностей (например, константные домены нативной последовательности человека) или вариант их аминокислотной последовательности.

[0158] Термин "моноклональное антитело", как используется в настоящем документе, относится к антителу, получаемому из популяции по существу гомогенных антител, то есть отдельные антитела, образующие популяцию, идентичны, если не учитывать возможные природные мутации, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью, будучи направленными против единственного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые содержат различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к специфичности, преимущество моноклональных антител состоит в том, что они могут быть синтезированы так, чтобы они не содержали примесей других антител.

Модификатор "моноклональный" указывает на характеристику антитела, которое было получено из по существу однородной популяции антител, и не должен быть истолкован как требующий продукции антитела любым конкретным способом. Например, моноклональные антитела для применения в соответствии с настоящим изобретением могут быть изготовлены с помощью гибридного способа, или могут быть изготовлены способами с использованием рекомбинантной ДНК. "Моноклональные антитела" могут также быть выделены из фаговых библиотек антител.

[0159] Моноклональные антитела в настоящем документе конкретно включают "химерные" антитела, в которых участок тяжелой и/или легкой цепи является идентичным или гомологичным соответствующим последовательностям в антителах, полученных из определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, в то время как оставшаяся часть цепи(ей) является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность. Интересующие химерные антитела в настоящем документе включают "приматизированные" антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности переменного домена, полученные от примата, не относящегося к человеку (например, низшие узконосые обезьяны, высшие обезьяны и т. д.), и последовательности человеческой константной области.

[0160] Для получения моноклональных антител (MAb) использовали различные способы. В гибридной технологии, которая относится к клонированной клеточной линии, продуцирующей антитело одного типа, используют клетки различных видов, включая мышей (мышинные), хомячков, крыс и людей. В другом способе получения антитела используют генную инженерию, включая технологию рекомбинантных ДНК. Например, антитела, полученные такой технологией, включают, помимо прочего, химерные антитела и гуманизированные антитела. Химерное антитело объединяет области, кодируемые ДНК из более чем одного вида. Например, химерное антитело может происходить от переменной области мышинного антитела и константной области человеческого антитела. Гуманизированное антитело происходит преимущественно от человека, даже если оно содержит области, не-человеческого антитела. Подобно химерному антителу, гуманизированное антитело может содержать полностью человеческую константную область. Однако, в отличие от химерного антитела, переменная область может частично

происходить от человеческого антитела. Синтетические части гуманизированного антитела, не являющиеся человеческими, часто происходят от CDR мышиных антител. В любом случае, данные области играют решающую роль в распознавании специфического антигена и в его связывании в данным антителом. Хотя мышиные антитела могут быть использованы в диагностике и непродолжительных курсах терапии, их введение человеку в течение длительного периода времени приводит к увеличению риска развития у человека нежелательного иммуногенного ответа. Таким ответом является выработка человеческого антимышиного антитела (Human Anti-Mouse Antibody (НАМА)), которое продуцируется в том случае, когда иммунная система человека распознает мышиное антитело как чужеродное и атакует его. НАМА-ответ может вызывать токсический шок или даже приводить к смерти.

[0161] Химерные и гуманизированные антитела позволяют снижать вероятность НАМА-ответа путем минимизации не-человеческих частей введенных антител. Кроме того, химерные и гуманизированные антитела могут иметь дополнительное преимущество, заключающееся в активации вторичных иммунных ответов человека, таких как антитело-зависимая клеточная цитотоксичность.

[0162] Интактное антитело может обладать одной или несколькими "эффекторными функциями", которые означают биологические активности, приписываемые Fc-области (Fc-область нативной последовательности или Fc-область варианта аминокислотной последовательности) антитела. Примерами эффекторных функций антител являются связывание C1q; комплемент-зависимая цитотоксичность; связывание Fc-рецепторов; антитело-зависимая клеточно-опосредуемая цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; снижение регуляции рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток; BCR) и т. д.

[0163] Интактные антитела, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей, могут быть отнесены к различным "классам". Существует пять главных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из данных классов могут быть дополнительно разделены на "подклассы" (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам антител, называются соответственно альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации иммуноглобулинов различных классов хорошо известны.

[0164] Термин "около" используется в данном документе для обозначения примерно, приблизительно, приближенно или в области. Когда термин "около" используется в сочетании с числовым диапазоном, он изменяет данный диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных числовых значений. В общем, термин "около" может изменять числовое значение выше и ниже указанного значения с отклонением, например, на 10 процентов, в большую или меньшую сторону (выше или ниже).

[0165] Термины "введение", "вводить" и их грамматические варианты относятся к введению композиции, такой как EV (например, экзосома) по настоящему раскрытию, в организм субъекта фармацевтически приемлемым путем. Введение композиции, такой как EV (например, экзосома) по настоящему раскрытию, субъекту осуществляется любым подходящим путем, включая внутритуморальное, пероральное, легочное, интраназальное, парентеральное (внутривенно, внутриартериально, внутримышечно, внутрибрюшинно или подкожно), ректальное, интралимфатическое, интратекальное, периокулярное или местное введение. Введение включает самостоятельное введение и введение другим лицом. Подходящий путь введения позволяет композиции или средству выполнять свою целевую функцию. Например, если подходящим путем введения является внутривенный путь, то композицию вводят путем введения композиции или средства в вену субъекта.

[0166] Используемый в настоящем документе термин "антитело" относится к иммуноглобулину, либо природному, либо полученному частично или полностью синтетическим путём, и его фрагментам. Данный термин также охватывает любой белок, имеющий домен связывания, гомологичный домену связывания иммуноглобулина. "Антитело" дополнительно включает полипептид, включающий каркасную область из гена иммуноглобулина или его фрагменты, который специфически связывает и распознает антиген. Термин "антитело" включает целые антитела, поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, их фрагменты и дополнительно включает одноцепочечные антитела, гуманизированные антитела, мышинные антитела, химерные, мышино-человеческие, мышино-приматные, приматно-человеческие моноклональные антитела, антиидиотипические антитела, фрагменты антител, такие как, например, фрагменты scFv, (scFv)₂, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab1)₂, Fv, dAb и Fd, диатела и связанные с антителами полипептиды. Антитело включает биспецифические антитела и мультиспецифические антитела, при условии что они проявляют желаемую биологическую активность или функцию. В некоторых аспектах настоящего раскрытия биологически активная молекула

представляет собой антитело или молекулу, включающую его антигенсвязывающий фрагмент.

[0167] Термины "конъюгат антитело-лекарство" и "ADC" используются взаимозаменяемо и означают антитело, связанное, например, ковалентно, с терапевтическим средством (иногда называемым в настоящем документе средством, лекарством или активным фармацевтическим ингредиентом) или средствами. В некоторых аспектах настоящего раскрытия биологически активная молекула представляет собой конъюгат антитело-лекарство.

[0168] В данном документе термин "приблизительно" применительно к одному или нескольким интересующим значениям относится к значению, которое аналогично заявленному эталонному значению. В некоторых аспектах термин "приблизительно" относится к диапазону значений, которые находятся в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в обоих направлениях (больше или меньше) от указанного эталонного значения, если не указано иное или не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышает 100% от возможного значения).

[0169] "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток замещается аминокислотным остатком с аналогичной боковой цепью. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков с аналогичными боковыми цепями, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспаргиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, если аминокислота в полипептиде замещается другой аминокислотой из того же семейства боковых цепей, то такая замена считается консервативной. В другом аспекте цепочка аминокислот может быть замещена структурно аналогичной цепочкой, отличающейся порядком и/или составом представителей одного семейства боковых цепей.

[0170] При использовании в настоящем документе, термин "консервативный" относится к нуклеотидным или аминокислотным остаткам полинуклеотидной последовательности или полипептидной последовательности, соответственно, которые

представляют собой остатки, которые являются неизменными в одном и том же положении двух или более сравниваемых последовательностей. Нуклеотиды или аминокислоты, которые являются относительно консервативными, представляют собой нуклеотиды и аминокислоты, которые являются консервативными среди более родственных последовательностей, чем нуклеотиды или аминокислоты, встречающиеся где-либо в последовательностях.

[0171] В некоторых аспектах две или более последовательностей называют "полностью консервативными", если они на 100% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательностей называют "высококонсервативными", если они по меньшей мере на около 70% идентичны, по меньшей мере на около 80% идентичны, по меньшей мере на около 90% идентичны или по меньшей мере на около 95% идентичны друг другу. В некоторых аспектах две или более последовательностей называют "консервативными", если они по меньшей мере на около 30% идентичны, по меньшей мере на около 40% идентичны, по меньшей мере на около 50% идентичны, по меньшей мере на около 60% идентичны, по меньшей мере на около 70% идентичны, по меньшей мере на около 80% идентичны, по меньшей мере на около 90% идентичны или по меньшей мере на около 95% идентичны друг другу. Консервативность последовательности может применяться в отношении всей длины последовательности полинуклеотида или полипептида, или она может применяться к ее части, области или характерному признаку.

[0172] При использовании в настоящем документе термины "связывание" и "конъюгирование" используются как взаимозаменяемые и означают ковалентное или нековалентное присоединение двух или более соединений, включающих неодеградер и анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающую часть. В некоторых аспектах связывание или конъюгирование может включать линкер.

[0173] Термин "вариант аминокислотной последовательности" относится к полипептидам, имеющим аминокислотные последовательности, которые в некоторой степени отличаются от нативной последовательности полипептида. Обычно варианты аминокислотных последовательностей будут обладать по меньшей мере приблизительно 70%-ной идентичностью по меньшей мере с одним рецептор-связывающим доменом нативного антитела или по меньшей мере с одним лиганд-связывающим доменом нативного рецептора и, как правило, они будут по меньшей мере приблизительно на 80%, более типично, по меньшей мере приблизительно на 90% гомологичны по последовательности с

такими рецептор- или лиганд-связывающими доменами. Варианты аминокислотных последовательностей содержат замены, делеции и/или вставки в определенных положениях в аминокислотной последовательности нативной аминокислотной последовательности. Аминокислоты обозначаются условными названиями, однобуквенными и трехбуквенными кодами.

[0174] "Идентичность последовательности" определяется как процент остатков в варианте аминокислотной последовательности, которые являются идентичными после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности. Способы и компьютерные программы для выравнивания хорошо известны в данной области техники. Одной из таких компьютерных программ является "Align 2", разработанная компанией Genentech, Inc. и поданная вместе с пользовательской документацией в Бюро по авторским правам США (United States Copyright Office), Вашингтон, округ Колумбия, 20559, 10 декабря 1991 года.

[0175] "Комплемент-зависимая цитотоксичность" или "CDC" (от англ. complement dependent cytotoxicity) относится к способности молекулы инициировать активацию комплемента и лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом), образующей комплекс с распознаваемым антигеном. Для оценки активации комплемента может быть осуществлен анализ CDC.

[0176] Термин "вариабельный" относится к тому факту, что некоторые сегменты вариабельных доменов в значительной степени различаются по последовательности среди антител и опосредуют связывание антигена и определяют специфичность каждого конкретного антитела по отношению к его конкретному антигену. Однако вариабельность неравномерно распределена на протяжении вариабельных доменов. Напротив, она сконцентрирована в трех сегментах, называемых гипервариабельными областями, в вариабельных доменах как легкой, так и тяжелой цепи. Более высококонсервативные части вариабельных доменов называются каркасными участками (от англ. framework regions (FR)). Каждый из вариабельных доменов нативных тяжелых и легких цепей включает четыре FR участка, в основном принимающие конфигурацию бета-слоев, соединенных тремя гипервариабельными участками, которые образуют петли, связывающие, и в некоторых случаях образующие часть бета-слоистой структуры. Гипервариабельные

участки удерживаются вместе в непосредственной близости друг от друга FR участками и, совместно с гипервариабельными областями другой цепи, вносят вклад в образование антигенсвязывающего сайта антител. Константные домены непосредственно не вовлечены в связывание антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в зависимой от антител клеточной токсичности (от англ. antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC)).

[0177] Термин "гипервариабельная область", при использовании в настоящем документе, относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область, как правило, содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области" или "CDR" (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Kabat et al supra) и/или остатки из "гипервариабельной петли" (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи). "Каркасные" или "FR" остатки представляют собой остатки вариабельного домена, отличные от остатков гипервариабельной области, определенной в данном описании.

[0178] В результате переваривания антител папаином образуется два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых "Fab"-фрагментами, каждый из которых имеет антигенсвязывающий сайт, и оставшийся "Fc"-фрагмент, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. В результате обработки пепсином получается $F(ab')_2$ -фрагмент, имеющий два антигенсвязывающих сайта и по-прежнему способный к перекрестному связыванию с антигеном.

[0179] "Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит весь антигенраспознающий и антигенсвязывающий сайт. Данная область состоит из димера вариабельного домена одной тяжелой цепи и одной легкой цепи, находящихся в плотной нековалентной ассоциации. Именно в такой конфигурации три гипервариабельные области каждого вариабельного домена взаимодействуют с установлением антигенсвязывающего сайта на поверхности димера V_H-V_L . Совместно шесть гипервариабельных областей придают антигенсвязывающую специфичность антителу. Однако даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три гипервариабельных области, специфичных

к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем целый сайт связывания.

[0180] Fab-фрагмент также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (СН1) тяжелой цепи. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов тем, что у них добавлено несколько остатков на карбоксильном конце СН1-домена тяжелой цепи, включая один или более чем один цистеин из шарнирной области антитела. Fab'-SH в данном описании представляет собой обозначение для Fab', в котором остаток(ки) цистеина константных доменов несет(ут) свободную тиоловую группу. F(ab')₂-фрагменты антител изначально получают в виде пар Fab'-фрагментов, которые содержат между собой шарнирные цистеины. Кроме этого известны другие способы химического сочетания фрагментов антител.

[0181] "Легкие цепи" антител из любого вида позвоночных могут быть отнесены к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов.

[0182] "Одноцепочечные Fv" или "scFv" фрагменты антител включают VH- и VL-домены антитела, причем данные домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Полипептид Fv может дополнительно включать полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv образовать желаемую структуру для связывания антигена.

[0183] Термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими участками, которые включают переменную область тяжелой цепи (VH), соединенную с переменной областью легкой цепи (VL) в одной и той же полипептидной цепи (VH-VL). В результате использования линкера, являющегося слишком коротким для того, чтобы сделать возможным спаривание двух областей одной и той же цепи, области вынуждены спариваться с комплементарными областями другой цепи и образовывать два антигенсвязывающих участка.

[0184] "Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено из компонента его природного окружения. Загрязняющими компонентами его природного окружения являются материалы, которые будут мешать диагностическим или терапевтическим применениям данного антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В некоторых аспектах антитело будет очищено (1) до более чем 95% по массе

антитела, что определяют способом Лоури, и наиболее предпочтительно более чем 99% по массе, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием газофазного белкового секвенатора или (3) до гомогенности по оценке ДСН-ПААГ электрофореза в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях, используя окрашивание Кумасси синим или, предпочтительно, окрашивание серебром. Выделенное антитело включает антитело, полученные *in situ* внутри рекомбинантных клеток, поскольку по меньшей мере один компонент из полипептидного природного окружения будет отсутствовать. В то же время, выделенный полипептид обычно будет получен с использованием по меньшей мере одной стадии очистки.

[0185] "Рак" относится к обширной группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей, которые вторгаются в соседние ткани и могут также метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровотоки. Под "раком" в настоящем документе понимается первичный, метастатический и рецидивирующий виды раковых заболеваний.

[0186] При использовании в настоящем документе термин "иммунный ответ" означает биологическую реакцию организма позвоночного животного на чужеродные агенты, которая защищает организм от данных агентов и вызываемых ими заболеваний. Иммунный ответ опосредован действием клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцита, В-лимфоцита, естественной клетки-киллера (NK), макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила) и растворимых макромолекул, вырабатываемых любой из данных клеток или печенью (включая антитела, цитокины и комплемент), что приводит к избирательному нацеливанию, связыванию, повреждению, уничтожению и/или удалению из организма позвоночного вторгающихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, злокачественных или других аномальных клеток, или, в случае аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека. Иммунный ответ включает, например, активацию или ингибирование Т-клетки, например эффекторной Т-клетки или Th-клетки, такой как CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетка, или ингибирование Treg-клетки. В настоящем документе термины "Т-клетка" и "Т-лимфоциты" взаимозаменяемы и относятся к любым лимфоцитам, вырабатываемым или перерабатываемым вилочковой железой. В некоторых аспектах Т-клетка представляет

собой CD4+ T-клетку. В некоторых аспектах T-клетка представляет собой CD8+ T-клетку. В некоторых аспектах T-клетка представляет собой NKT-клетку.

[0187] В контексте настоящего описания "субъект" включает любое человеческое или не относящееся к человеку животное. Термин "не относящееся к человеку животное" включает, но без ограничения, позвоночных, таких как не относящиеся к человеку приматы, овцы, собаки и грызуны, такие как мыши, крысы и морские свинки. В некоторых аспектах субъектом является человек. Термины "субъект" и "пациент" в данном документе используются как взаимозаменяемые.

[0188] Термин "терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная дозировка" относится к количеству средства (например, неодеградера или конъюгата неодеградера, раскрытого в настоящем описании), которое обеспечивает желаемый биологический, терапевтический и/или профилактический результат. Данный результат может представлять собой уменьшение, облегчение, временное облегчение, ослабление, задержку и/или ослабление одного или нескольких признаков, симптомов или причин заболевания, или любое другое желаемое изменение биологической системы. Применительно к солидным опухолям эффективное количество включает количество, достаточное для уменьшения размеров опухоли и/или снижения скорости ее роста (например, для подавления роста опухоли) или для предотвращения или задержки другой нежелательной клеточной пролиферации. В некоторых аспектах эффективное количество представляет собой количество, достаточное для задержки развития опухоли. В некоторых аспектах эффективное количество представляет собой количество, достаточное для предотвращения или задержки рецидива опухоли. Эффективное количество может быть введено в один или несколько приемов. Эффективное количество композиции может, например, (i) уменьшить количество злокачественных клеток; (ii) уменьшить размер опухоли; (iii) подавить, замедлить, в некоторой степени замедлить и остановить инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; (iv) подавить (т. е. в некоторой степени замедлить и остановить метастазирование опухоли); (v) подавить рост опухоли; (vi) предотвратить или задержать возникновение и/или рецидив опухоли; и/или (vii) в некоторой степени облегчить один или несколько симптомов, связанных с раком.

[0189] В некоторых аспектах "терапевтически эффективное количество" представляет собой количество неодеградера или конъюгата неодеградера, которое, как клинически доказано, влияет на значительное снижение заболеваемости раком или на

замедление прогрессирования (регрессии) рака, такого как солидная опухоль на поздней стадии. Способность терапевтического средства способствовать регрессии заболевания может быть оценена различными способами, известными специалисту, например, на людях в ходе клинических испытаний, в животных модельных системах, предсказывающих эффективность на людях, или путем оценки активности средства в анализах *in vitro*.

[0190] При использовании в настоящем документе термин "стандарт лечения" означает способ лечения, который признается медицинскими экспертами в качестве надлежащего лечения определенного типа заболевания и широко используется специалистами в области здравоохранения. Данный термин может применяться как взаимозаменяемый с любым из следующих терминов: "передовая практика", "стандартная медицинская помощь" и "стандартная терапия".

[0191] В качестве примера, "противораковое средство" способствует регрессии рака у субъекта или предотвращает дальнейший рост опухоли. В некоторых аспектах терапевтически эффективное количество лекарственного препарата способствует регрессии рака вплоть до его устранения.

[0192] Термины "эффективный" и "эффективность" применительно к лечению включают в себя как фармакологическую эффективность, так и физиологическую безопасность. Под фармакологической эффективностью понимается способность препарата способствовать регрессии рака у пациента. Под физиологической безопасностью понимается уровень токсичности или других неблагоприятных физиологических эффектов на клеточном, органном и/или организменном уровне (побочные эффекты), возникающих в результате применения лекарственного препарата.

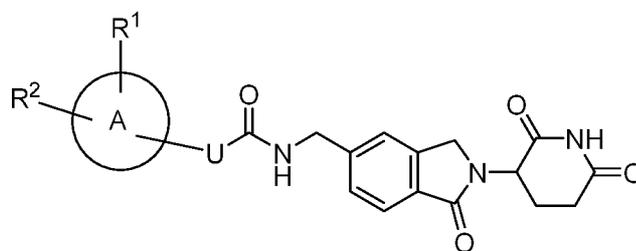
[0193] Используемый в данном документе термин "ингибитор иммунных контрольных точек" относится к молекулам, которые полностью или частично снижают, ингибируют, препятствуют или модулируют один или более белков контрольных точек. Белки контрольных точек регулируют активацию или функцию Т-клеток. Известны многочисленные белки контрольных точек, такие как CTLA-4 и его лиганды CD80 и CD86; и PD-1 с его лигандами PD-L1 и PD-L2. Pardoll, D.M., *Nat Rev Cancer* 12(4):252-64 (2012). Данные белки отвечают за ко-стимулирующие или ингибирующие взаимодействия Т-клеточных ответов. Белки иммунных контрольных точек, по-видимому, регулируют и поддерживают аутоотолерантность, а также продолжительность и амплитуду

физиологических иммунных реакций. Ингибиторы иммунных контрольных точек включают антитела или происходят из антител.

[0194] Термины "лечить" или "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или предупредительным мерам, целью которых является предотвратить или замедлить (уменьшить) нежелательное физиологическое изменение или расстройство, такое как развитие или распространение рака. В рамках настоящего раскрытия полезные или желаемые клинические результаты включают, но не ограничены перечисленными: купирование симптомов, сокращение продолжительности заболевания, стабилизирование (т. е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, приостановку или замедление прогрессирования заболевания, снижение выраженности или временное облегчение болезненного состояния, и ремиссию (частичную либо полную), либо детектируемые, либо недетектируемые. "Лечение" может также означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствие данного лечения. К нуждающимся в лечении относятся те, кто уже страдает данным заболеванием или расстройством, а также те, кто склонен к такому состоянию или расстройству, или те, у которых состояние или расстройство необходимо предотвратить.

II. "Неодеградеры"

[0195] В настоящем раскрытии обеспечены неодеградеры формулы (II):



(II);

или его фармацевтически приемлемые соли, где:

[0196] A представляет собой фенил или C₄-C₁₀циклоалкильное кольцо;

[0197] U выбран из NH и CF₂;

[0198] R¹ независимо выбран из водорода и галогена;

[0199] R² выбран из -C(O)R³, -N(R⁴)₂, -(CH₂)_nOH, -(CH₂)_nSH, -(CH₂)_nN(R⁴)₂, -(CH₂)_nQ'(CH₂)_mOH, -(CH₂)_nQ'(CH₂)_mSH и -(CH₂)_{2n}Q'(CH₂)_{2m}N(R⁴)₂; где

[0200] R³ представляет собой водород или C₁-C₆алкил;

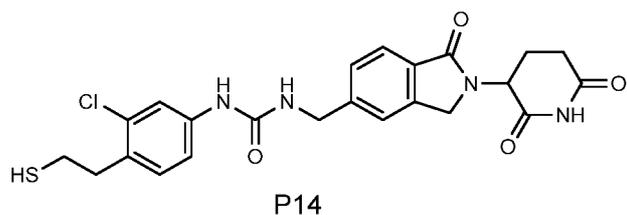
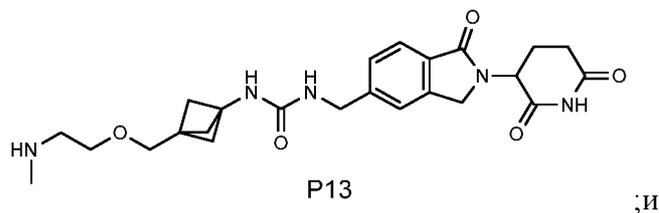
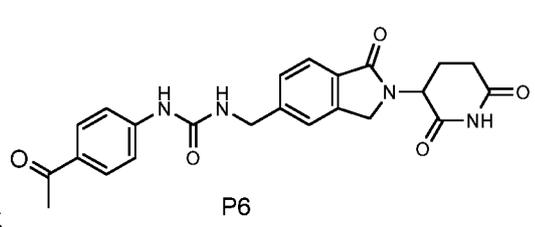
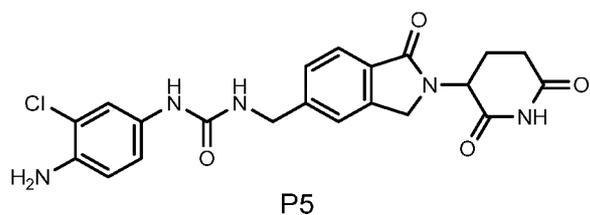
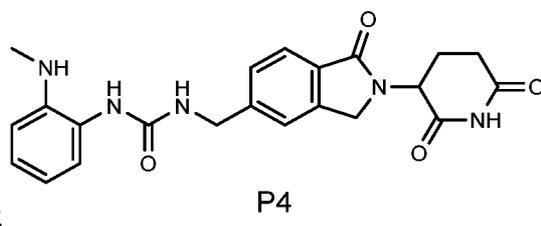
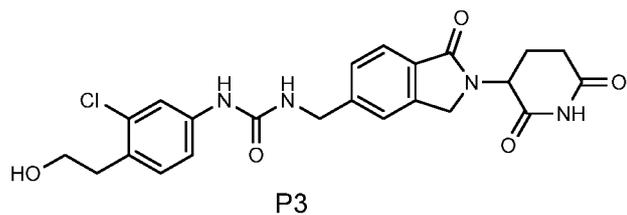
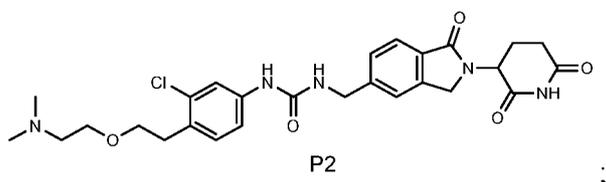
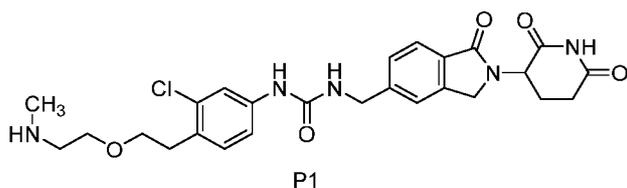
[0201] каждый R⁴ независимо представляет собой водород или C₁-C₆алкил;

- [0202] Q' представляет собой O, S или NR⁴;
- [0203] n равно от 1 до 6; и
- [0204] m равно от 2 до 5;
- [0205] при условии, что когда R² представляет собой NH₂, -(CH)NH_{2n2} или -(CH)_{2n}OH, то R¹ представляет собой галоген.
- [0206] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает соединения формулы (II) или их фармацевтически приемлемые соли, где:
- [0207] A представляет собой фенильное кольцо или C₄-C₁₀циклоалкильное кольцо;
- [0208] U представляет собой NH;
- [0209] R¹ выбран из водорода и галогена;
- [0210] R² выбран из -(CH₂)_nQ'(CH₂)_mN(R⁴)₂, -(CH₂)_nOH, -(CH₂)_nSH, -N(R⁴)₂ и -C(O)R³; где:
- [0211] m равно 2;
- [0212] n равно 2;
- [0213] Q' представляет собой -O-;
- [0214] R³ представляет собой метил; и
- [0215] каждый R⁴ независимо выбран из водорода и метила;
- при условии, что когда R² представляет собой NH₂ или-(CH)_{2n} OH, то R¹ представляет собой гало.
- [0216] Термин "C₁-C₆алкокси", как он используется в настоящем документе, относится к C₁-C₆алкильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через атом кислорода.
- [0217] Используемый в настоящем документе термин термин "C₁-C₆алкоксиC₁-C₆алкил" относится к C₁-C₆алкильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через C₁-C₆алкильную группу.
- [0218] Используемый в настоящем документе термин "C₁-C₆алкил" относится к группе, полученной из насыщенного углеводорода с прямой или разветвленной цепью, содержащего от одного до шести атомов углерода.
- [0219] Используемый в настоящем документе термин "C₄-C₁₀циклоалкил" означает насыщенную моноциклическую углеводородную кольцевую систему, содержащую от четырех до десяти атомов углерода и ноль гетероатомов. Репрезентативные примеры циклоалкильных групп включают, но не ограничиваются ими, циклобутил, циклопентил и

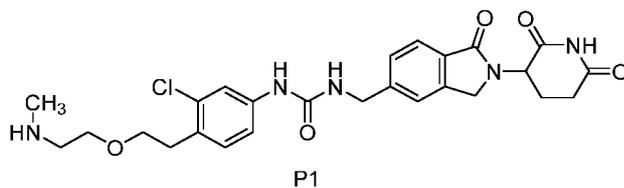
циклогексил. Циклоалкильные группы, содержащие от семи до десяти атомов, могут представлять собой моноциклические или слитые, спироциклические или мостиковые бициклические структуры.

[0220] Используемый в настоящем документе термин "галоген" относится к F, Cl, Br или I.

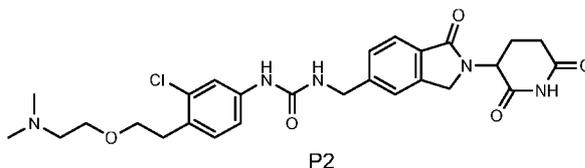
[0221] В некоторых аспектах неодаградер формулы (II) представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из:



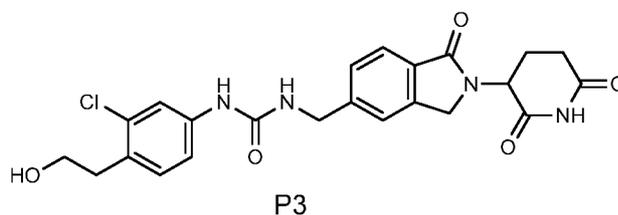
[0222] В некоторых аспектах неodeградер формулы (II) представляет собой



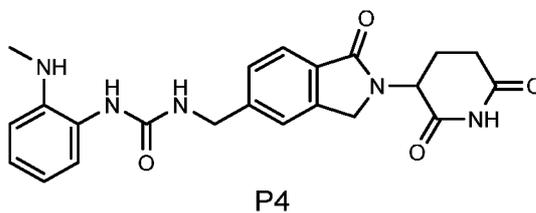
[0223] В некоторых аспектах неodeградер формулы (II) представляет собой



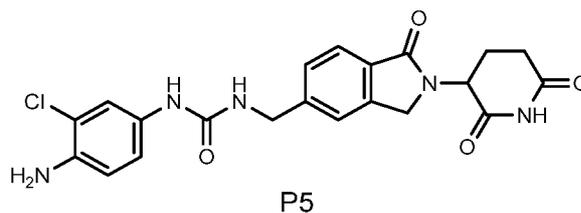
[0224] В некоторых аспектах неodeградер формулы (II) представляет собой



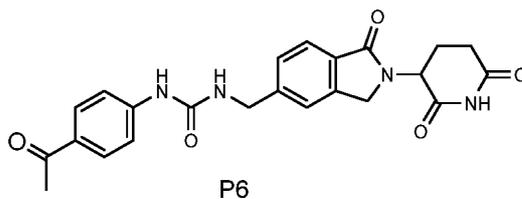
[0225] В некоторых аспектах неodeградер формулы (II) представляет собой



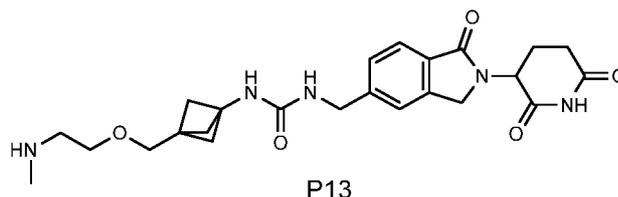
[0226] В некоторых аспектах неodeградер формулы (II) представляет собой



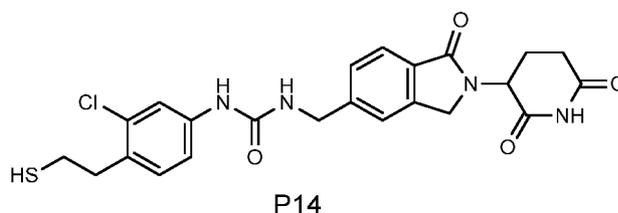
[0227] В некоторых аспектах неodeградер формулы (II) представляет собой



[0228] В некоторых аспектах неodeградер формулы (II) представляет собой



[0229] В некоторых аспектах неодеградер формулы (II) представляет собой



[0230] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает неодеградеры формулы (II) или их фармацевтически приемлемые соли, где А представляет собой фенил; U представляет собой NH; R¹ представляет собой галоген; R² представляет собой -(CH)_{2n}Q'(CH)_{2m}N(R)⁴₂, при этом m и n равны 2, Q' представляет собой O один из R⁴ представляет собой водород и другой представляет собой метил.

[0231] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает неодеградеры формулы (II), где А представляет собой фенил; U представляет собой NH; R¹ представляет собой галоген; и R² представляет собой -(CH)_{2n} Q'(CH)_{2m} N(R)⁴₂, при этом m и n равны 2, Q' представляет собой O, и каждый R⁴ представляет собой метил.

[0232] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает неодеградеры формулы (II), где А представляет собой фенил; U представляет собой NH; R¹ представляет собой галоген; и R² представляет собой -(CH)_{2n}OH, при этом n равно 2.

[0233] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает неодеградеры формулы (II), где А представляет собой фенил; U представляет собой NH; R¹ представляет собой галоген; и R² представляет собой -(CH)_{2n}SH, при этом n равно 2.

[0234] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает неодеградеры формулы (II), где А представляет собой фенил; U представляет собой NH; R¹ представляет собой водород; и R² представляет собой -N(R)⁴₂, при этом один из R⁴ представляет собой водород и другой представляет собой метил.

[0235] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает неодеградеры формулы (II), где А представляет собой фенил; U представляет собой NH; R¹ представляет собой галоген; и R² - -N(R)⁴₂, при этом каждый R⁴ представляет собой водород. В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает неодеградеры формулы (II), где А

представляет собой фенил; R^1 представляет собой водород; и R^2 представляет собой $-C(O)R^3$, при этом R^3 представляет собой метил.

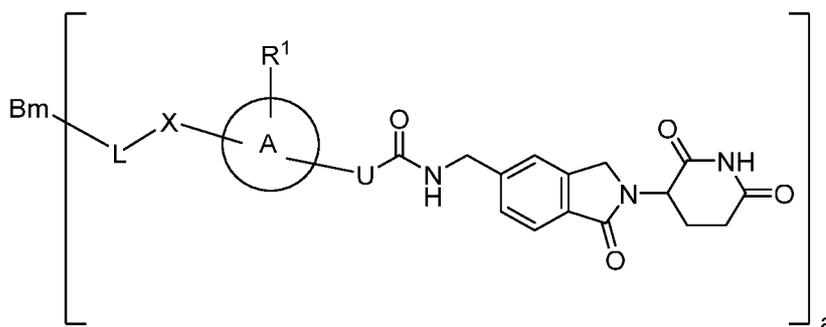
[0236] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает неодеградеры формулы (II), где A представляет собой C_4 - C_{10} циклоалкильное кольцо; U представляет собой NH; R^1 представляет собой водород; R^2 представляет собой $-(CH)_mQ'(CH)_nN(R)^4_2$, при этом m и n равны 2, Q' представляет собой O, один из R^4 представляет собой водород и другой представляет собой метил.

[0237] В некоторых аспектах неодеградер представляет собой молекулу, образующую тройной комплекс с E3 убиквитин-лигазой, которая способна нацеливаться на белок для деградации.

III. Конъюгаты неодеградеров

[0238] Настоящее раскрытие обеспечивает конъюгаты одного или нескольких неодеградеров, раскрытых в настоящем документе, и анти-CD33 антитела или его антигенсвязывающей части, раскрытого в настоящем документе. Данные конъюгаты могут разрушать белки путем связывания с цереблонином (CRBN), способствуя рекрутированию и убиквитинированию белков-субстратов, опосредованному $CRL4^{CRBN}$ E3 убиквитин-лигазой. Данные средства действуют как "молекулярные клеи", заполняя поверхность связывания как гидрофобный участок, что перепрограммирует белковые взаимодействия между лигазой и нео-субстратами.

[0239] В некоторых аспектах настоящее раскрытие обеспечивает соединение формулы (I),



(I),

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

[0240] а представляет собой целое число от 1 до 10;

[0241] А представляет собой фенил или C_4 - C_{10} циклоалкильное кольцо;

- [0242] R^1 выбран из водорода и галогена;
- [0243] U выбран из NH и CF_2 ;
- [0244] X выбран из $-NR^2-$, $=C(CH_3)-$, $-Q-(CH)_{2n}-$ и $-Q(CH)_{2m}Q'(CH)_{2n}-$; где
- [0245] Q и Q' независимо друг от друга представляют собой O, S или NR^2 ;
- [0246] R^2 представляет собой водород или C- C_{16} алкил;
- [0247] n представляет собой целое число от 1 до 6;
- [0248] m представляет собой целое число от 2 до 6;
- [0249] при этом левая часть каждой группы присоединена к L и правая часть присоединена к A;
- [0250] при условии, что когда X представляет собой NH или $-Q-(CH)_{2n}-$, R^1 представляет собой галоген;
- [0251] L представляет собой расщепляемый линкер или нерасщепляемый линкер; и
- [0252] V_m представляет собой анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающую часть, как раскрыто в настоящем описании.
- [0253] В некоторых аспектах U представляет собой NH.
- [0254] В некоторых аспектах описанный в настоящем документе конъюгат неодеградера обладает *in vitro* антипролиферативной активностью против линии опухолевых клеток. В некоторых аспектах конъюгат неодеградера, включающий неодеградер и анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающую часть, как раскрыто в настоящем описании, обладает *in vitro* антипролиферативной активностью по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95% или по меньшей мере на около 100% выше, чем только неодеградер или только анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть, как раскрыто в настоящем описании. В некоторых аспектах конъюгат неодеградера, включающий неодеградер и анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающую часть, как раскрыто в настоящем описании, обладает *in vitro* антипролиферативной активностью по меньшей мере приблизительно в 2 раза, по меньшей мере приблизительно в 3 раза, по меньшей мере приблизительно в 4 раза, по меньшей мере приблизительно в 5 раз, по меньшей мере приблизительно в 6 раз, по меньшей мере приблизительно в 7 раз, по меньшей мере приблизительно в 8 раз, по меньшей мере приблизительно в 9 раз, по меньшей мере приблизительно в 10 раз выше, чем

только неодеградер или только анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть, как раскрыто в настоящем описании.

[0255] В некоторых аспектах описанные в настоящем документе конъюгаты неодеградеров обладают *in vitro* антипролиферативной активностью против клеточной линии лимфомы Дауди (Daudi), например, более высокой антипролиферативной активностью против клеточной линии лимфомы Дауди, по сравнению только с неодеградером или только с анти-CD33 антителом или его антигенсвязывающей частью. В некоторых аспектах описанные в настоящем документе конъюгаты неодеградеров обладают *in vitro* антипролиферативной активностью против клеточной линии острого миелоидного лейкоза HL-60, например, более высокой антипролиферативной активностью против клеточной линии острого миелоидного лейкоза HL-60, по сравнению только с неодеградером или только с анти-CD33 антителом или его антигенсвязывающей частью. В некоторых аспектах описанные в настоящем документе конъюгаты неодеградеров обладают *in vitro* антипролиферативной активностью против неходжкинской лимфомы Рамоса (Ramos), например, более высокой антипролиферативной активностью против клеточной линии неходжкинской лимфомы Рамоса, по сравнению только с неодеградером или только с анти-CD33 антителом или его антигенсвязывающей частью. В некоторых аспектах описанные в настоящем документе конъюгаты неодеградеров способны сохранять свою антипролиферативную активность в присутствии сыворотки крови человека. Описанные в настоящем документе конъюгаты неодеградеров могут применяться для лечения онкогенных заболеваний.

[0256] В некоторых аспектах конъюгат антитело-неодеградер (antibody neoDegradер conjugate (AnDC)) представляет собой конъюгат одного или нескольких неодеградеров, раскрытых в настоящем документе, и анти-CD33 антитела или его антигенсвязывающей части, раскрытых в настоящем документе.

III.A. Линкер

[0257] Неодеградер по настоящему изобретению может быть связан с анти-CD33 антителом или его антигенсвязывающей частью через линкер. Используемый в настоящем документе термин "линкер" относится к любому химическому соединению, способному соединять анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающую часть (Bm) с группой X в соединениях формулы (I).

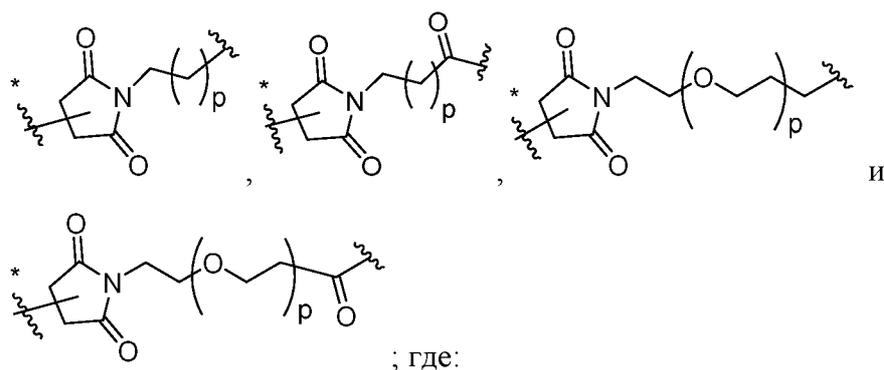
[0258] В некоторых аспектах линкер может содержать гетеробифункциональную группу. В настоящем раскрытии термин "гетеробифункциональная группа" относится к химическому фрагменту, который соединяет линкер, частью которого он является, с анти-CD33 антителом или его антигенсвязывающей частью. Гетеробифункциональные группы характеризуются наличием различных реакционноспособных групп на обоих концах химического фрагмента. Присоединение к "Vm" может быть осуществлено путем химической или ферментативной конъюгации или их комбинации. Химическая конъюгация включает контролируемую реакцию взаимодействия доступных аминокислотных остатков на поверхности анти-CD33 антитела или его антигенсвязывающей части с реагирующей группой (reaction handle) на гетеробифункциональной группе. Примеры химической конъюгации включают, но не ограничиваясь ими, амидную связь с лизином, связывание с цистеином и связывание через неприродную аминокислоту, введенную с помощью генной инженерии, где остатки неприродных аминокислот с желаемой реагирующей группой устанавливаются на "Vm". При ферментативной конъюгации фермент опосредует соединение линкера с доступным аминокислотным остатком анти-CD33 антитела или его антигенсвязывающей части. Примеры ферментативной конъюгации включают, но не ограничиваются ими, транспептидацию с использованием сортазы, транспептидацию с использованием микробной трансклутаминазы и N-гликановую инженерию. Химическая конъюгация и ферментативная конъюгация могут также использоваться последовательно. Например, ферментативная конъюгация может применяться для установки уникальных реакционноспособных фрагментов на "Vm" для последующего использования в химической конъюгации.

[0259] В некоторых аспектах гетеробифункциональная группа выбрана из:

расщепляемом линкере, в течение промежутка времени от нескольких часов до нескольких дней после обработки любым из описанных выше средств. В некоторых аспектах линкер не подвержен расщеплению, индуцированному кислотой, фотоиндуцированному расщеплению, биоредуктивному расщеплению, ферментативному расщеплению и тому подобному в условиях, при которых неодеградер и/или анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть могут оставаться активными. Катаболиты ADC, образующиеся из нерасщепляемых линкеров, содержат остаток аминокислоты антитела. Такие катаболиты могут проявлять уникальные и неожиданные свойства в клетках-мишенях, к которым они доставляются.

[0261] Специалист в данной области техники легко отличит нерасщепляемые линкеры от расщепляемых.

[0262] Примеры нерасщепляемых линкеров включают, но не ограничиваются ими, SMCC (сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат) линкеры, сукцинимид-тиоэфирные линкеры и такие линкеры, как:

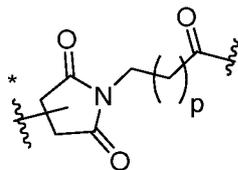


[0263] p представляет собой целое число от 1 до 10;

[0264] представляет собой точку прикрепления к X; и

[0265] представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

[0266] В некоторых аспектах линкер представляет собой:



В некоторых аспектах p равно 5.

[0267] В некоторых аспектах линкер может быть расщепляемым. В некоторых аспектах линкер может быть подвержен расщеплению, индуцированному кислотой, фотоиндуцированному расщеплению, биоредуктивному расщеплению, ферментативному расщеплению и тому подобному, в условиях, при которых неодеградер и/или анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть могут оставаться активными.

[0268] В некоторых аспектах расщепляемый линкер может быть расщеплен ферментативно. В некоторых аспектах расщепляемый линкер может быть расщеплен протеазой, пептидазой, эстеразой, бета-глюкуронидазой, гликозидазой, фосфодиэстеразой, фосфатазой, пирофосфатазой или липазой.

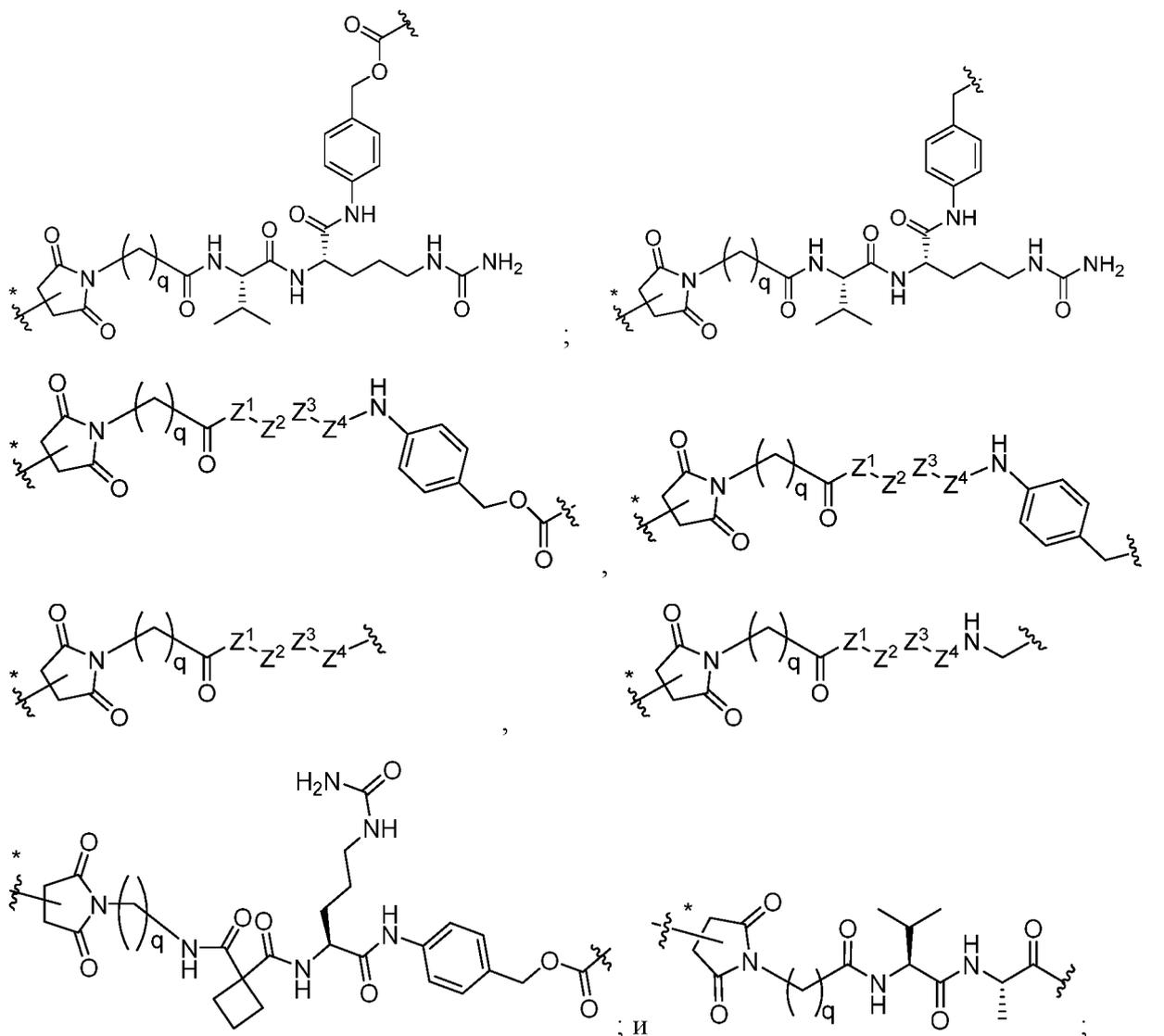
[0269] В некоторых аспектах расщепляемый линкер может быть расщеплен протеазой. Примеры протеаз включают, но не ограничиваются ими, катепсин В, тетрапептид VAGP и тому подобное.

[0270] В некоторых аспектах расщепляемый линкер содержит пептид. В некоторых аспектах пептид является сайтом расщепления линкера, что облегчает высвобождение лекарственного препарата при воздействии внутриклеточных протеаз, например лизосомальных ферментов. Пептиды могут быть разработаны и оптимизированы для ферментативного расщепления конкретным ферментом, например, опухоль-ассоциированной протеазой, катепсином В, С и D или протеазой плазмин. Примеры пептидов с двумя аминокислотами включают, но не ограничиваются ими, аланин-аланин (ala-ala), валин-аланин (val-ala), валин-цитруллин (vc или val-cit), аланин-фенилаланин (af или ala-phe); фенилаланин-лизин (fk или phe-lys); фенилаланин-гомолизин (phe-homolys); N-метил-валин-цитруллин (Me-val-cit). Примеры пептидов, содержащих три аминокислоты, включают, но не ограничиваются ими, глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit), аспаргиновую кислоту-валин-цитруллин (asp-val-cit), аланин-аланин-аспарагин (ala-ala-asn), аланин-фенилаланин-лизин (ala-phe-lys), глицин-глицин-фенилаланин (gly-gly-phe), глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly). Примеры пептидов с четырьмя аминокислотами включают, но не ограничиваются ими, глицин-глицин-валин-цитруллин (gly-gly-val-cit) и глицин-глицин-фенилаланин-глицин (gly-gly-phe-gly). Приведенные выше комбинации аминокислот могут присутствовать и в обратном порядке (т. е. cit-val).

[0271] Пептиды по настоящему изобретению могут включать L- или D-изомеры аминокислотных остатков. Термин "аминокислота природного происхождения" относится к Ala, Asp, Asx, Cit, Cys, Glu, Phe, Glx, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser,

Thr, Val, Trp и Tyr. "D-" обозначает аминокислоту, имеющую конфигурацию "D" (правовращающую), в отличие от конфигурации встречающихся в природе ("L-") аминокислот. Описанные в настоящем документе аминокислоты могут быть приобретены коммерческим путем (Sigma Chemical Co., Advanced Chemtech) или синтезированы с использованием известных в данной области техники способов.

[0272] В некоторых аспектах линкер ("L") представляет собой расщепляемый протеазой линкер, выбранный из



где:

[0273] q представляет собой целое число от 2 до 10;

[0274] Z^1 , Z^2 , Z^3 и Z^4 независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой природный аминокислотный остаток в L- или D-конфигурации, при условии, что по меньшей мере два из Z^1 , Z^2 , Z^3 и Z^4 являются аминокислотными остатками;

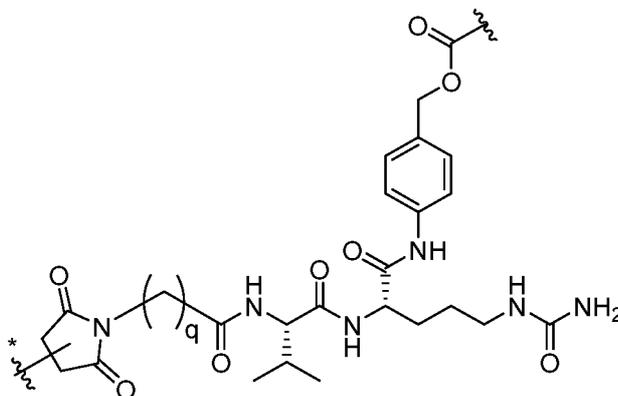
[0275]  представляет собой точку прикрепления к X; и

[0276]  представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

[0277] В некоторых аспектах Z^1 , Z^2 , Z^3 и Z^4 независимо отсутствуют или выбраны из группы, состоящей из L-валина, D-валина, L-цитруллина, D-цитруллина, L-аланина, D-аланина, L-глутамина, D-глутамина, L-глутаминовой кислоты, D-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты, D-аспарагиновой кислоты, L-аспарагина, D-аспарагина, L-фенилаланина, D-фенилаланина, L-лизина, D-лизина и глицина; при условии, что по меньшей мере два из Z^1 , Z^2 , Z^3 и Z^4 являются аминокислотными остатками.

[0278] В некоторых аспектах Z^1 отсутствует или представляет собой глицин; Z^2 отсутствует или выбран из L-глутамина, D-глутамина, L-глутаминовой кислоты, D-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты, D-аспарагиновой кислоты, L-аланина, D-аланина и глицина; Z^3 выбран из L-валина, D-валина, L-аланина, D-аланина, L-фенилаланина, D-фенилаланина и глицина; и Z^4 выбран из L-аланина, D-аланина, L-цитруллина, D-цитруллина, L-аспарагина, D-аспарагина, L-лизина, D-лизина, L-фенилаланина, D-фенилаланина и глицина.

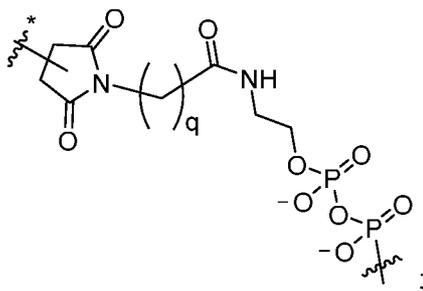
[0279] В некоторых аспектах L представляет собой



[0280] В некоторых аспектах q равно 5.

[0281] В некоторых аспектах L представляет собой расщепляемый пирофосфатазой линкер.

[0282] В некоторых аспектах L представляет собой расщепляемый пирофосфатазой линкер, который представляет собой:



где:

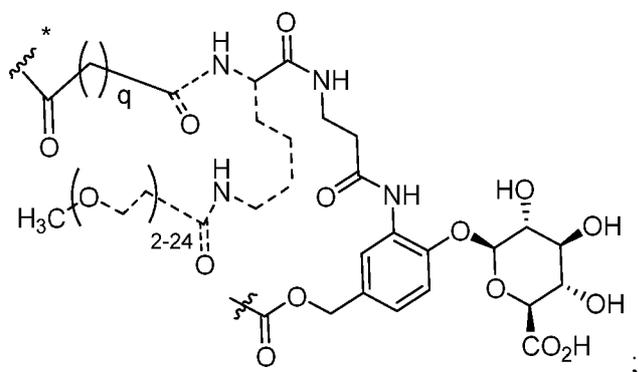
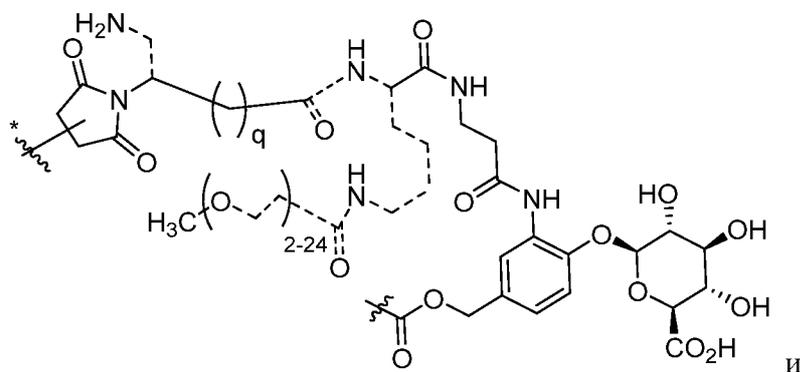
[0283] q представляет собой целое число от 2 до 10;

[0284] \sim представляет собой точку прикрепления к X; и

[0285] \sim^* представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

[0286] В некоторых аспектах L представляет собой расщепляемый бета-глюкононидазой линкер.

[0287] В некоторых аспектах L представляет собой расщепляемый бета-глюкононидазой линкер, выбранный из:



где:

[0288] q представляет собой целое число от 2 до 10;

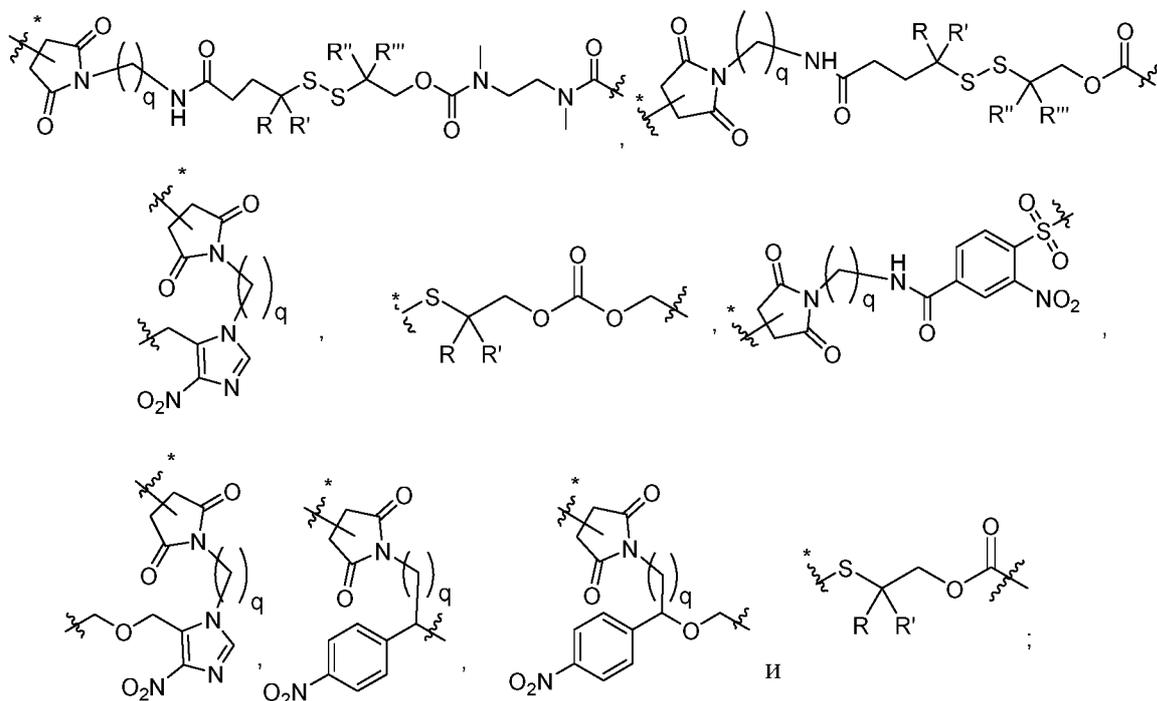
[0289] ---- отсутствует или представляет собой связь;

[0290]  представляет собой точку прикрепления к X; и

[0291]  представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

[0292] В некоторых аспектах линкер является биоразлагаемым. Биоразлагаемые линкеры используют разницу восстановительных потенциалов внутриклеточного компартмента и плазмы крови. Содержание восстановленного глутатиона в цитоплазме опухолевых клеток в 1000 раз выше, чем в цитоплазме нормальных клеток, и опухолевые клетки также содержат ферменты, которые могут способствовать восстановительным реакциям в клеточных компартментах. Линкеры сохраняют целостность конъюгатов во время их циркуляции в круге кровообращения и избирательно расщепляются под действием высокой внутриклеточной концентрации глутатиона, высвобождая активные лекарственные препараты в опухолевых очагах из нетоксичных пролекарств.

[0293] В некоторых аспектах L представляет собой биоразлагаемый линкер, выбранный из:



где:

[0294] q представляет собой целое число от 2 до 10;

[0295] R, R', R'' и R''' независимо выбраны из водорода, C₁-C₆алкокси C₁-C₆алкила, (C₁-C₆)₂NC₁-C₆алкила и C₁-C₆алкила, или две геминальные группы R, вместе с атомом

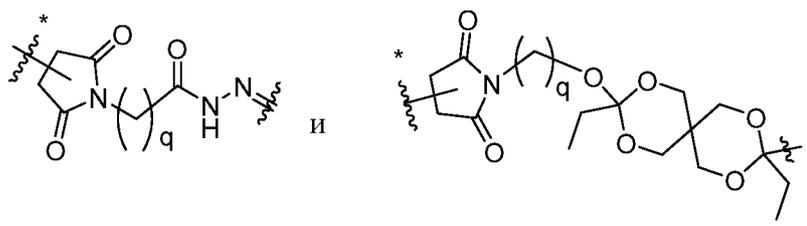
углерода, к которому они присоединены, могут образовывать циклобутильное или циклопропильное кольцо;

[0296]  представляет собой точку прикрепления к X; и

[0297] * представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

[0298] В некоторых аспектах линкер является кислоторасщепляемым. Расщепляемые кислотой линкеры специально разработаны таким образом, чтобы оставаться стабильными при нейтральном pH кровообращения, но подвергаются гидролизу и высвобождают цитотоксический препарат в кислой среде клеточных компартментов.

[0299] В некоторых аспектах L представляет собой расщепляемый кислотой линкер, выбранный из



где:

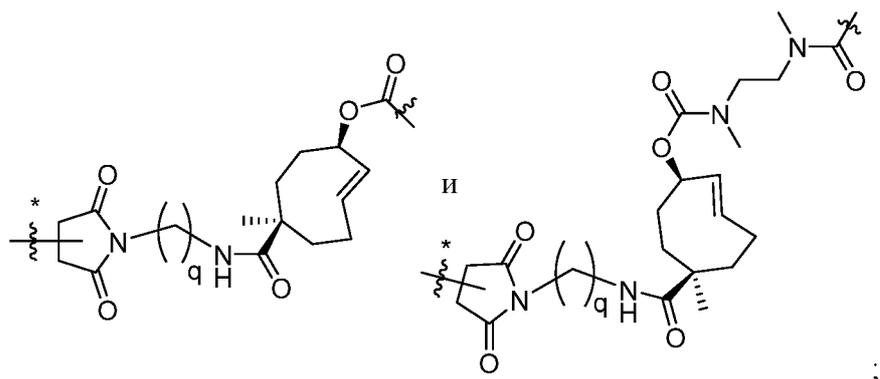
[0300] q представляет собой целое число от 2 до 10;

[0301]  представляет собой точку прикрепления к X; и

[0302] * представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

[0303] В некоторых аспектах L представляет собой линкер, вызывающий высвобождение по механизму "клик-высвобождения" ("click-to-release"), где высвобождение неогидролизатора химически инициируется тетразином или родственными соединениями.

[0304] В некоторых аспектах L представляет собой линкер, выбранный из



где:

[0305] q представляет собой целое число от 2 до 10;

[0306] X представляет собой точку прикрепления к X ; и

[0307] Y представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

III.B. Антитело Anti-CD33

[0308] Настоящее изобретение обеспечивает неодеградируемые, конъюгированные с анти-CD33 антителом или его антигенсвязывающей частью.

[0309] CD33 представляет собой трансмембранный рецептор, экспрессирующийся как на миелоидных, так и на лимфоидных клетках. Он связывает сиаловую кислоту и, таким образом, является членом семейства лектинов иммуноглобулинового типа, связывающих сиаловую кислоту (the sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin (SIGLEC)). CD33 играет роль посредника при взаимодействии клеток с клетками и в поддержании иммунных клеток в состоянии покоя. При связывании иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM)) в CD33, присутствующий на цитозольной части белка, фосфорилируется и служит местом стыковки для белков, содержащих домен гомологии Src 2 (SH2), таких как SHP-фосфатазы. Это может привести к каскаду реакций, ингибирующему фагоцитоз в клетке. Структурно внеклеточная часть CD33 содержит два иммуноглобулиновых домена и внутриклеточная часть содержит ITIM. Синонимы CD33 включают, но не ограничиваясь ими, связывающий сиаловую кислоту Ig-подобный лектин 3, SIGLEC3, SIGLEC-3, gp67 и p67.

[0310] Каноническая аминокислотная последовательность для CD33 человека и известных изоформ приведена в таблице 1 (UniProtKB - P20138; SEQ ID NOs: 13-18).

Таблица 1. Аминокислотные последовательности CD33 человека

Каноническая CD33	MPLLLLLLPLWAGALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLPCTFFHPI PYYDKNSPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVQEEETQGRFRLLDGDSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPIIFSWLSAAPTSLGPRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVYPQNPTTGIFFPGDGSQKQETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSSCSGAAPTVMDEELHYASLNFGHMNPSKDTSTEYSEVRTQ (SEQ ID NO: 13)
CD33 человеческая изоформа 2	MPLLLLLLWADLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPIIFSWLSAAPTSLGPRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVYPQNPTTGIFFPGDGSQKQETRAVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSSCSGAAPTVMDEELHYASLNFGHMNPSKDTSTEYSEVRTQ (SEQ ID NO: 14)
CD33 человеческая изоформа 3	MPLLLLLLPLWAGALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLPCTFFHPI PYYDKNSPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVQEEETQGRFRLLDGDSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPIIFSWLSAAPTSLGPRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVYPQNPTTGIFFPGDGSQKQETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPVR (SEQ ID NO: 15)
CD33 человеческая изоформа X1	MDLGEAATRARPAVISPGVNSCAQKSTSEWKDFRHGVRMSQMALKEALEAASSDMPLLLLLPLWAGALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLPCTFFHPI PYYDKNSPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVQEEETQGRFRLLDGDSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPIIFSWLSAAPTSLGPRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVYPQNPTTGIFFPGDGSQKQETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSSCSGAAPTVMDEELHYASLNFGHMNPSKDTSTEYSEVRTQ (SEQ ID NO: 16)
CD33 человеческая изоформа X2	MDLGEAATRARPAVISPGVNSCAQKSTSEWKDFRHGVRMSQMALKEALEAASSDMPLLLLLPLWAGALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLPCTFFHPI PYYDKNSPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVQEEETQGRFRLLDGDSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPIIFSWLSAAPTSLGPRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVYKQETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSSCSGAAPTVMDEELHYASLNFGHMNPSKDTSTEYSEVRTQ (SEQ ID NO: 17)
CD33 человеческая изоформа X4	MDLGEAATRARPAVISPGVNSCAQKSTSEWKDFRHGVRMSQMALKEALEAASSDMPLLLLLWADLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPIIFSWLSAAPTSLGPRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVYPQNPTTGIFFPGDGSQKQETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSSCSGAAPTVMDEELHYASLNFGHMNPSKDTSTEYSEVRTQ (SEQ ID NO: 18)

[0311] CD33 экспрессируется приблизительно в 90% случаев острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и продемонстрировал свою полезность в качестве мишени для терапевтических антител. О высокой экспрессии CD33 в бластах ОМЛ стало известно приблизительно три десятилетия назад. CD33 был обнаружен на бластах 85-90% пациентов с ОМЛ, а также на нормальных миелоидных предшественниках и миелоцитах. CD33 имеется только у гемопоэтических клеток, но отсутствует на поверхности нормальных гемопоэтических стволовых клеток, что делает его идеальной мишенью для терапии ОМЛ.

[0312] Анти-CD33 антитела для конъюгатов по настоящему изобретению способны специфически связываться с CD33. В некоторых аспектах анти-CD33 антитела, описанные в настоящем документе, связываются с CD33 человека с высокой аффинностью, например, с K_D , равной 10^{-6} М или менее, 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М или менее, 10^{-10}

М или менее, 10^{-11} М или менее, 10^{-12} М или менее, от 10^{-12} М до 10^{-7} М, от 10^{-11} М до 10^{-7} М, от 10^{-10} М до 10^{-7} М или от 10^{-9} М до 10^{-7} М.

[0313] В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает тяжелую и легкую цепи, где тяжелая цепь включает переменную область тяжелой цепи (VH) и легкая цепь включает переменную область легкой цепи (VL); при этом VH включает определяющую комплементарность область (CDR) 1 (VH-CDR1), VH-CDR2 и VH-CDR3, и VL включает VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3; при этом VH-CDR3 включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает VH-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает VL-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с

аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7. В некоторых аспектах CDR включают последовательности, представленные в таблице 2 ниже.

Таблица 2. Последовательности CDR CD33AB и гемтузумаба и последовательности варибельной области

VH-CDR1 (SEQ ID NO: 1)	DSNIH
VH-CDR2 (SEQ ID NO: 2)	YIYPYNGGTDYNQKFKN
VH-CDR3 (SEQ ID NO: 3)	GNPWLAY
VH (SEQ ID NO: 4)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWI GYIYPYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDFAFY CVNGNPWLAYWGQGLTVSS
VL-CDR1 (SEQ ID NO: 5)	RASESLDNYGIRFLT
VL-CDR2 (SEQ ID NO: 6)	AASNQGS
VL-CDR3 (SEQ ID NO: 7)	QQTKEVPWS
VL (SEQ ID NO: 8)	DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESLDNYGIRFLTWVQKPKGKAPK LLMYAASNQGSVPSRFSGSGTEFTLTISLQPDFAFYQQTKEVP WSFGQGTKVEVK

[0314] В некоторых аспектах варибельная область тяжелой цепи анти-CD33 антитела включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4. В некоторых аспектах варибельная область легкой цепи анти-CD33 антитела включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8.

[0315] В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, и вариабельную область легкой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8.

[0316] В некоторых аспектах тяжелая цепь анти-CD33 антитела включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности анти-CD33 антитела.

<p>Тяжелая цепь CD33AB (SEQ ID NO: 9)</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIY PYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDFAFYICVNGNPWL AYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>Легкая цепь CD33AB (SEQ ID NO: 10)</p>	<p>DIQLTQSPSTLSASVGDRTITCRASESLDNYGIRFLTWFFQQKPGKAPKLLMY AASNQGSVPSRFSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYCQTKVEPWSFGQGTKVE VKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC</p>

<p>Тяжелая цепь гемтузумаба (SEQ ID NO: 11)</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQSLEWIGYIY PYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWL AYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK</p>
<p>Легкая цепь гемтузумаба SEQ ID NO: 12)</p>	<p>DIQLTQSPSTLSASVGDRTITCRASELDNYGIRFLTWVQKPGKAPKLLMY AASNQGSQVPSRFSGSGTEFTLTISLQPDFAFYCQTKVEPWSFGQGTKVE VKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC</p>

[0317] В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 9 и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10.

[0318] В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 11 и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12.

[0319] В некоторых аспектах анти-CD33 антитело раскрыто в патентах США №№ 5,585,089, 5,693,762, каждый из которых в явном виде включен в настоящий документ посредством ссылки.

[0320] В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает тяжелую и легкую цепи, где тяжелая цепь включает вариабельную область тяжелой цепи (VH) и легкая цепь включает вариабельную область легкой цепи (VL); при этом VH включает определяющую комплементарность область (CDR) 1 (VH-CDR1), VH-CDR2 и VH-CDR3, и VL включает VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3; при этом VH-CDR3 включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 21. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 20. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает VH-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 19. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает VL-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 23. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере

мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24. В некоторых аспектах CDR включают последовательности, представленные в таблице 4 ниже.

Таблица 4. CDR-последовательности и последовательности переменных областей huMy9-6 и AB1

VH-CDR1 (SEQ ID NO: 19)	SYIYH
VH-CDR2 (SEQ ID NO: 20)	VIYPGNDDISYNQKFQG
VH-CDR3 (SEQ ID NO: 21)	EVRLRYFDV
VH (SEQ ID NO: 27)	QVQLQQPGAEEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGGLEWV GVIYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYC AREVRLRYFDVWGGQTTVTVSS
VL-CDR1 (SEQ ID NO: 22)	KSSQSVFFSSSQKNYLA
VL-CDR2 (SEQ ID NO: 23)	WASTRES
VL-CDR3 (SEQ ID NO: 24)	HQYLSSRT
VL (SEQ ID NO: 28)	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQS PRLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLS SRFTGQGTKLEIK

[0321] В некоторых аспектах переменная область тяжелой цепи анти-CD33 антитела включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27. В некоторых аспектах переменная область легкой цепи анти-CD33 антитела включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28.

[0322] В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28.

[0323] В некоторых аспектах тяжелая цепь анти-CD33 антитела включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 25. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с последовательностью 26.

Таблица 5. Аминокислотные последовательности анти-CD33 антитела huMy9-6-IgG4-S228P ("AB1").

Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 25)	QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKQTPGQGLEWVGV YPGNDDISYNQKFQGKATLTADKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLR YFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
Легкая цепь	EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRLLI YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGT

(SEQ ID NO: 26)	KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
--------------------	--

[0324] В некоторых аспектах анти-CD33 антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 25 и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 26. Термин "CD33AB" включает тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 25, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 26.

[0325] Анти-CD33 антитела включают аналоги и производные, которые модифицированы, т. е. ковалентно присоединены к молекуле любого типа, при условии, что такое ковалентное присоединение позволяет антителу сохранять иммуноспецифичность связывания антигена. Например, но не ограничиваясь этим, производные и аналоги антител включают те производные и аналоги антител, которые были дополнительно модифицированы, например, путем гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связывания с клеточной единицей антитела или другим белком и т. д. Любая из многочисленных химических модификаций может быть осуществлена известными способами, включая, в частности, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, форматирование, метаболический синтез в присутствии туникамицина и т. д. Кроме того, аналог или производное может содержать одну или несколько не природных аминокислот.

[0326] Анти-CD33 антитела в конъюгатах неодеградеров могут включать антитела, имеющие модификации (например, замены, делеции или добавления) в аминокислотных остатках, которые взаимодействуют с Fc-рецепторами. В частности, антитела включают антитела, имеющие модификации в аминокислотных остатках, которые идентифицированы как участвующие во взаимодействии между анти-Fc доменом и FcRn рецептором. Антитела,

иммуноспецифичные к антигену раковой клетки, могут быть получены коммерческим путем, например, от компании Genentech (Сан-Франциско, Калифорния) или получены любым способом, известным специалистам в данной области техники, например, с помощью химического синтеза или способов с использованием рекомбинантной экспрессии. Нуклеотидная последовательность, кодирующая антитела, иммуноспецифичные к антигену раковой клетки, может быть получена, например, из базы данных GenBank или подобной ей базы данных, из литературных публикаций или путем обычного клонирования и секвенирования.

[0327] В некоторых аспектах антитело конъюгатов неодеградеров может представлять собой моноклональное антитело, например, мышинное моноклональное антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело. В некоторых аспектах антитело может представлять собой фрагмент антитела, например Fab-фрагмент.

IV. Композиции и способы их применения

[0328] Конъюгаты и/или соединения, описанные в настоящем документе, могут быть в виде фармацевтически или фармацевтически приемлемых солей. В некоторых аспектах такие соли получают из неорганических или органических кислот или оснований.

[0329] Примеры подходящих кислотно-аддитивных солей включают ацетат, адипат, альгинат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, цитрат, камфорат, сульфонат камфоры, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, fumarat, лукогептаноат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, оксалат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, пикрат, пивалат, пропионат, сукцинат, тартрат, тиоцианат, тозилат и ундеcanoat.

[0330] Примеры подходящих солей присоединения основания включают соли аммония; соли щелочных металлов, такие как соли натрия и калия; соли щелочноземельных металлов, такие как соли кальция и магния; соли органических оснований, такие как соли дициклогексиламина, *N*-метил-*D*-глюкамина; соли аминокислот, таких как аргинин, лизин и тому подобное

[0331] Например, компания Verge перечисляет следующие коммерческие соли, одобренные Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA): анионы: ацетат, бесилат (бензенсульфонат), бензоат, бикарбонат,

битартрат, бромид, эдетат кальция (этилендиаминтетраацетат), камсилат (камфорсульфонат), карбонат, хлорид, цитрат, дигидрохлорид, эдетат (этилендиаминтетраацетат), эдизилат (1,-2-этандисульфонат), эстолат (лаурилсульфат), эзилат (этансульфонат), фумарат, глюцептат (глюкогептонат), глюконат, глутамат, гликоллиларсанилат (гликолламидофениларсонат), гексилрезорцинат, гидрабамин (*N,N'*-ди(дегидроабиетил)этилендиамин), гидробромид, гидрохлорид, гидроксинафтоат, йодид, изетионат (2-гидроксиэтансульфонат), лактат, лактобионат, малат, малеат, манделат, мезилат (метансульфонат), метилбромид, метилнитрат, метилсульфат, мукат, напсилат (2-нафталинсульфонат), нитрат, памоат (эмбонат), пантотенат, фосфат/дифосфат, полигалактуронат, салицилат, стеарат, субацетат, сукцинат, сульфат, таннат, тартрат, теоклат (8-хлортеофиллинат) и триэтиодид; органические катионы бензатин (*N,N'*-дибензилэтилендиамин), хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, меглюмин (*N*-метилглюкамин) и прокаин; металлические катионы алюминия, кальция, лития, магния, калия, натрия и цинка.

[0332] Верге дополнительно перечисляет следующие соли, не одобренные FDA (за пределами США): анионы: адипат, альгинат, аминсалицилат, ангидрометиленицитрат, ареколин, аспартат, бисульфат, бутилбромид, камфорат, диглюконат, дигидробромид, дисукцинат, глицерофосфат, гемисульфат, гидрофторид, гидроиодид, метиленбис(салицилат), нападизилат (1,-5-нафталиндисульфонат), оксалат, пектинат, персульфат, фенилэтилбарбитурат, пикрат, пропионат, тиоцианат, тозилат и ундеканоат; органические катионы бенетамин (*N*-бензилфенэтиламин), клемизол (1-*p*-хлорбензил-2-пирролилдин-1'-илметилбензимидазол), диэтиламин, пиперазин и трометамин (трис(гидроксиметил)аминометан); металлические катионы бария и висмута.

[0333] Фармацевтические композиции, включающие описанные в настоящем документе конъюгаты неодеградеров, могут также содержать подходящие носители, вспомогательные вещества и наполнители, которые могут отличаться в зависимости от способа введения.

[0334] В некоторых аспектах фармацевтические композиции могут быть представлены в виде подходящей парентеральной лекарственной формы. Такие составы могут быть приготовлены различными способами, известными в данной области техники. Фармацевтические композиции могут вводиться непосредственно в кровоток, в мышцы или непосредственно в орган. Подходящие способы парентерального введения включают

внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, интратекальное, внутрижелудочковое, внутриуретральное, внутристернальное, внутричерепное, внутримышечное и подкожное введение. Подходящие устройства для парентерального введения включают инъекторы с иглой, безыгольные инъекторы и инфузионные техники.

[0335] Парентеральные композиции обычно представляют собой водные растворы, которые могут содержать такие вспомогательные вещества, как соли, углеводы и буферные средства. Однако композиция может быть составлена в виде стерильного неводного раствора или высушенной формы для применения в сочетании с подходящим носителем, таким как стерильная вода, не содержащая апирогенов.

[0336] Приготовление парентеральных композиций в стерильных условиях, например, путем лиофилизации, может быть легко осуществлено с использованием стандартных методик, хорошо известных специалистам в данной области техники.

[0337] Композиции для парентерального введения могут быть составлены с немедленным и/или модифицированным высвобождением. К составам с модифицированным высвобождением относятся составы с отсроченным, устойчивым, импульсным, контролируемым, целевым и программируемым высвобождением. Таким образом, композиции могут быть представлены в виде твердого, полутвердого вещества или тиксотропной жидкости для введения в виде имплантируемого депо, обеспечивающего модифицированное высвобождение активного средства.

[0338] В парентеральные составы могут быть добавлены другие подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, используемые в парентеральных лекарственных формах, такие как консерванты, но не ограничиваясь ими.

[0339] В другом аспекте фармацевтические композиции могут быть составлены в виде подходящих пероральных лекарственных форм, таких как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, суспензии, растворы, эмульсии и тому подобное. Могут присутствовать и другие подходящие носители, такие как дезинтегранты, разбавители, хелатирующие средства, связующие вещества, глиданты, смазывающие вещества, наполнители, сухие вещества, антиадгезивы и тому подобное.

[0340] Пероральные лекарственные формы могут также содержать другие подходящие фармацевтические вспомогательные вещества, такие как подсластители, транспортные/смачивающие средства, красители, ароматизаторы, консерванты, средства, повышающие вязкость/загущающие свойства, и тому подобное.

[0341] Описанные в настоящем документе неодеградеры или конъюгаты неодеградеров могут применяться для лечения различных видов онкологических заболеваний. Некоторые конъюгаты по настоящему изобретению могут превосходить другие лекарственные препараты по эффективности, фармакокинетике (например, всасывание, распределение, метаболизм, выведение), растворимости (например, растворимость в воде), взаимодействию с другими лекарственными средствами (например, ингибирующее действие на ферменты, метаболизирующие лекарственные средства). безопасности (например, острая токсичность, хроническая токсичность, генетическая токсичность, репродуктивная токсичность, кардиотоксичность, канцерогенность, центральная токсичность) и/или стабильности (например, химическая стабильность, устойчивость к ферменту) и могут быть полезны в качестве лекарственного средства.

[0342] Неодеградеры или конъюгаты неодеградеров по настоящему изобретению могут применяться в качестве лекарственных средств, таких как средства для профилактики или лечения заболеваний, например, онкологических заболеваний, например, колоректальных раков (например, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак ануса, семейный колоректальный рак, наследственный неполипозный колоректальный рак, гастроинтестинальная стромальная опухоль), раков легкого (например, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, злокачественная мезотелиома), мезотелиомы, раков поджелудочной железы (например, протоковая карцинома поджелудочной железы, эндокринная опухоль поджелудочной железы), рака глотки, рак гортани, рак пищевода, раков желудка/желудочной железы (например, папиллярная аденокарцинома, муцинозная аденокарцинома, аденосквамозная карцинома), рака двенадцатиперстной кишки, рака тонкого кишечника, раков молочной железы (например, инвазивная протоковая карцинома, неинвазивная протоковая карцинома, воспалительный рак молочной железы), раков яичников (например, эпителиальный рак яичника, экстрагонадальная герминогенная опухоль, герминогенная опухоль яичника, опухоль яичника с низким злокачественным потенциалом), опухоли яичка, раков предстательной железы (например, гормонозависимый рак предстательной железы, негормонозависимый рак предстательной железы, кастрационно-резистентный рак предстательной железы), раков печени (например, гепатоцеллюлярный рак, первичный рак печени, рак внепеченочных желчных протоков), раков щитовидной железы (например, медуллярная карцинома щитовидной железы), раков почек (например, почечно-клеточный рак (например, светлоклеточный почечно-клеточный

рак), переходно-клеточный рак почечной лоханки и мочеточника), раков матки (например, рак шейки матки, рак тела матки, саркома матки), гестационной хориокарциномы, опухолей головного мозга (например, медуллобластома, глиома, астроцитарные опухоли шишковидной железы, пилоцитарная астроцитомы, диффузная астроцитомы, анапластическая астроцитомы, аденома гипофиза), ретинобластомы, раков кожи (например, базалиома, злокачественная меланома), саркомы (например, рабдомиосаркома, лейомиосаркома, саркома мягких тканей, веретенноклеточная саркома), злокачественной опухоли костей, рака мочевого пузыря, гемобластоза/онкологических заболеваний крови (например, множественная миелома, лейкозы (например, острый миелогенный лейкоз), злокачественная лимфома, болезнь Ходжкина, хроническое миелопролиферативное заболевание), рака неизвестного происхождения; ингибитор роста рака; ингибитор метастазирования рака; промотор апоптоза; средство для лечения предраковых состояний (например, миелодиспластических синдромов); и тому подобное

[0343] В некоторых аспектах неодеградеры или конъюгаты неодеградеров по настоящему изобретению могут применяться в качестве лекарственного средства для лечения рака молочной железы, рака желудка, рака яичников, рака матки, рака легких, рака поджелудочной железы, рака печени, лимфомы или онкологических заболеваний крови.

[0344] Кроме того, неодеградер или конъюгаты неодеградеров по настоящему изобретению могут применяться одновременно с немедикаментозной терапией. Точнее, конъюгаты можно сочетать с немедикаментозными способами лечения, такими как (1) хирургия, (2) гипертензивная химиотерапия с использованием ангиотензина II и т. д., (3) генная терапия, (4) термотерапия, (5) криотерапия, (6) лазерное прижигание и (7) радиотерапия.

[0345] Например, при применении неодеградера или конъюгата неодеградера по настоящему изобретению до или после вышеупомянутой операции и т. п. могут быть достигнуты такие эффекты, как предотвращение возникновения резистентности, продление выживаемости без прогрессирования, продление выживаемости без заболевания, подавление метастазирования или рецидива рака, продление жизни и тому подобное.

[0346] Кроме того, можно сочетать лечение неодеградером или конъюгатами неодеградеров по настоящему раскрытию со следующей поддерживающей терапией: (i) назначение антибиотика (например, β -лактаминового типа, например, панспорин и т. п., макролидного типа, например, кларитромицин и т. п.) при осложнении различных

инфекционных заболеваний, (ii) введение высококалорийной трансфузии, аминокислотного препарата или общего витаминного препарата для улучшения питания, (iii) введение морфина для уменьшения боли, (iv) введение фармацевтического препарата для смягчения побочных эффектов, таких как тошнота, рвота, анорексия, диарея, лейкопения, тромбоцитопения, снижение концентрации гемоглобина, выпадение волос, гепатопатия, ренопатия, ЦМВ, лихорадка и тому подобное, и (v) введение фармацевтического препарата для подавления множественной лекарственной устойчивости при раке и тому подобное.

[0347] В некоторых аспектах неодеградер или конъюгат неодеградера по изобретению могут применяться в сочетании со стандартной терапией, например, с одним или несколькими терапевтическими средствами (например, противораковыми средствами и/или иммуномодулирующими средствами). Соответственно, в некоторых аспектах способ лечения опухоли, раскрытый в настоящем документе, включает введение неодеградера или конъюгата неодеградера по изобретению в сочетании с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами. В некоторых аспектах неодеградер или конъюгат неодеградера по изобретению может применяться в сочетании с одним или несколькими противораковыми средствами, таким образом, чтобы воздействовать на несколько элементов иммунного пути. В некоторых аспектах противораковое средство включает ингибитор иммунных контрольных точек (т. е. блокирует передачу сигнала через определенный путь иммунных контрольных точек). Неограничивающие примеры ингибиторов иммунных контрольных точек, которые могут применяться в настоящих способах, включают антагонист CTLA-4 (например, анти-CTLA-4 антитело), антагонист PD-1 (например, анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело), антагонист TIM-3 (например, анти-TIM-3 антитело) или их комбинации. Полный и не ограничивающий перечень комбинированных способов лечения подробно раскрыт в разделе "Комбинированные способы лечения" настоящей заявки.

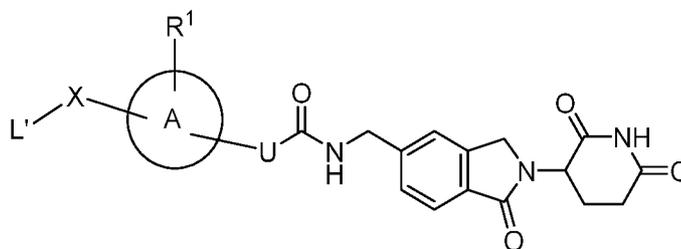
[0348] В некоторых аспектах неодеградер или конъюгат неодеградера по изобретению вводят субъекту до или после введения дополнительного терапевтического средства. В других аспектах неодеградер или конъюгат неодеградера по изобретению вводят субъекту одновременно с дополнительным терапевтическим средством. В некоторых аспектах неодеградер или конъюгат неодеградера по изобретению и дополнительное терапевтическое средство могут вводиться одновременно в виде единой композиции в фармацевтически приемлемом носителе. В других аспектах неодеградер или

конъюгат неодеградера по изобретению и дополнительное терапевтическое средство вводятся одновременно в виде отдельных композиций.

[0349] В некоторых аспектах субъектом, который может быть подвергнут лечению неодеградером или конъюгатом неодеградера по настоящему изобретению, является не являющееся человеком животное, например крыса или мышь. В некоторых аспектах субъектом, который может быть подвергнут лечению, является человек.

V. Способы получения неодеградеров и композиций

[0350] В настоящем раскрытии обеспечен способ получения конъюгатов неодеградеров, включающий реакцию взаимодействия анти-CD33 антитела или его антигенсвязывающей части с соединением формулы (I-1):



(I-1),

или его фармацевтически приемлемой солью, где:

A представляет собой фенил или C₄-C₁₀циклоалкильное кольцо;

R¹ независимо выбран из водорода и галогена;

U выбран из NH и CF₂;

X выбран из -NR²-, =C(CH₃)-, -Q-(CH)_{2n}- и -Q(CH)_{2m}Q'(CH)_{2n}-; где

Q и Q' независимо друг от друга представляют собой O, S или NR²;

R² представляет собой водород или C₁-C₆алкил;

n представляет собой целое число от 1 до 6;

m представляет собой целое число от 2 до 6; и

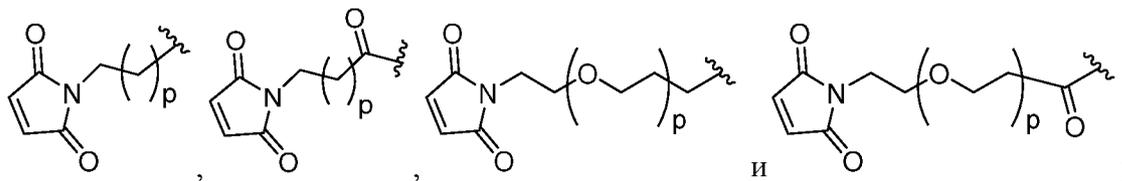
при этом левая часть каждой группы присоединена к L и правая часть присоединена к A;

при условии, что когда X представляет собой NH или -Q-(CH)_{2n}-, R¹ представляет собой галоген;

L' представляет собой предшественник расщепляемого или нерасщепляемого линкера, который конъюгируется с анти-CD33 антителом или его антигенсвязывающей частью.

[0351] Как описано в данном документе, предшественник линкера содержит гетеробифункциональную группу, которая соединяется с анти-CD33 антителом или его антигенсвязывающей частью.

[0352] В некоторых аспектах L' представляет собой предшественник нерасщепляемого линкера. В некоторых аспектах L' выбран из группы, состоящей из

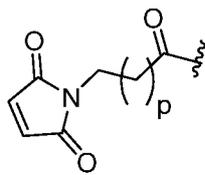


где:

p представляет собой целое число от 1 до 10; и

 представляет собой точку прикрепления к X.

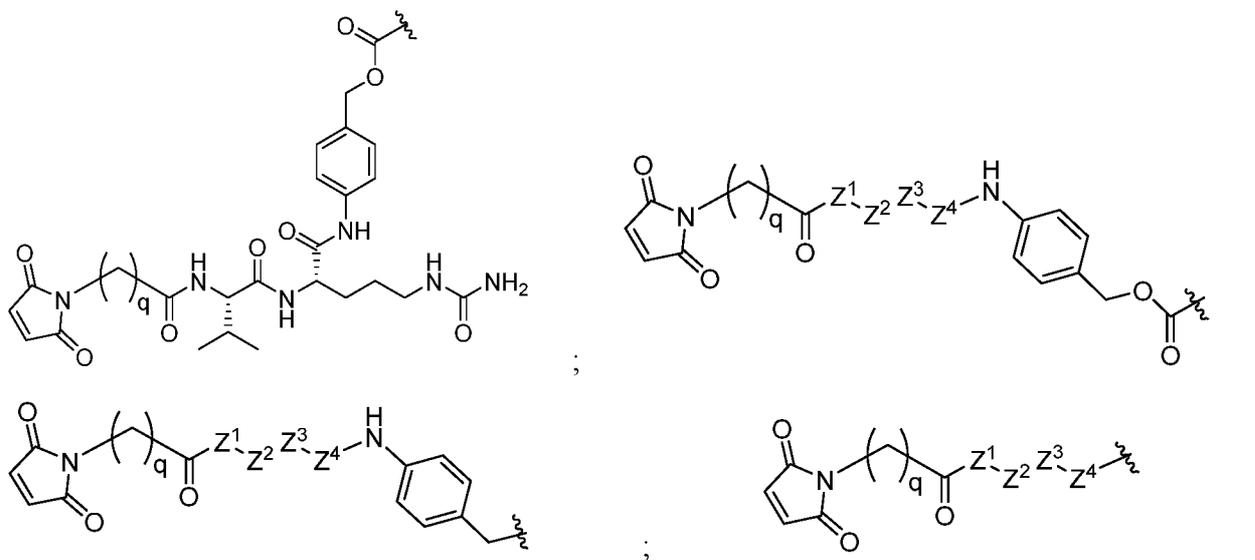
[0353] В некоторых аспектах L' представляет собой

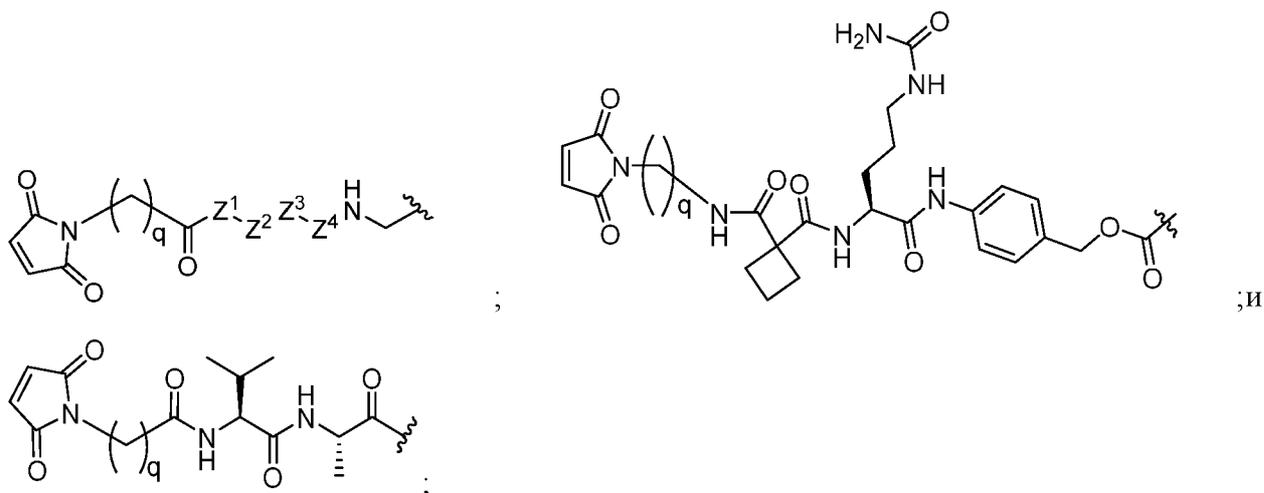


[0354] В некоторых аспектах p равно 5.

[0355] В некоторых аспектах L' представляет собой предшественник расщепляемого линкера.

[0356] В некоторых аспектах предшественник линкера может быть расщеплен протеазой. В некоторых аспектах предшественник линкера выбран из группы, состоящей из





где:

q представляет собой целое число от 2 до 10;

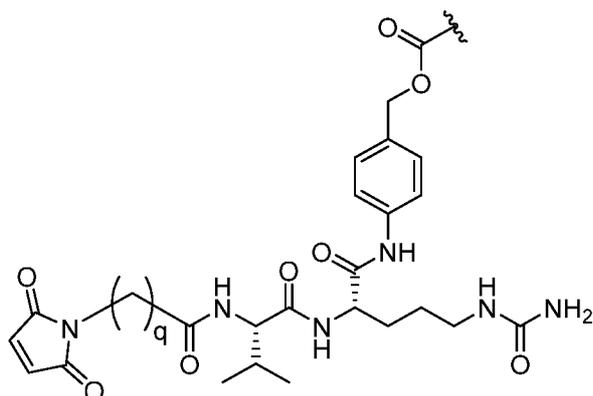
Z^1 , Z^2 , Z^3 и Z^4 независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой природный аминокислотный остаток в L- или D-конфигурации, при условии, что по меньшей мере два из Z^1 , Z^2 , Z^3 и Z^4 являются аминокислотными остатками; и

\sim представляет собой точку прикрепления к X.

[0357] В некоторых аспектах Z^1 , Z^2 , Z^3 и Z^4 независимо друг от друга не выбраны из группы, состоящей из L-валина, D-валина, L-цитруллина, D-цитруллина, L-аланина, D-аланина, L-глутамина, D-глутамина, L-глутаминовой кислоты, D-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты, D-аспарагиновой кислоты, L-аспарагина, D-аспарагина, L-фенилаланина, D-фенилаланина, L-лизина, D-лизина и глицина, при условии, что по меньшей мере два из Z^1 , Z^2 , Z^3 и Z^4 являются аминокислотными остатками.

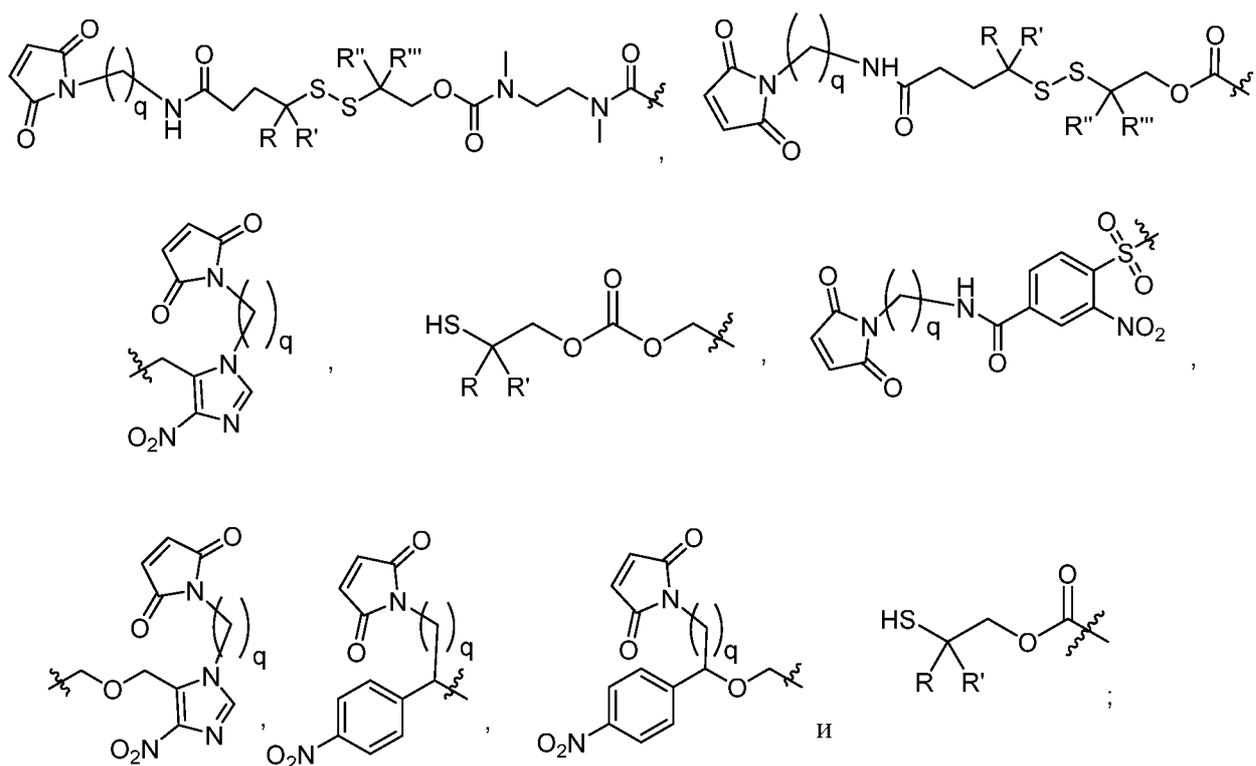
[0358] В некоторых аспектах Z^1 отсутствует или представляет собой глицин; Z^2 отсутствует или выбран из группы, состоящей из L-глутамина, D-глутамина, L-глутаминовой кислоты, D-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты, D-аспарагиновой кислоты, L-аланина, D-аланина и глицина; Z^3 выбран из группы, состоящей из L-валина, D-валина, L-аланина, D-аланина, L-фенилаланина, D-фенилаланина и глицина; и Z^4 выбран из группы, состоящей из L-аланина, D-аланина, L-цитруллина, D-цитруллина, L-аспарагина, D-аспарагина, L-лизина, D-лизина, L-фенилаланина, D-фенилаланина и глицина.

[0359] В некоторых аспектах L' представляет собой



[0360] В некоторых аспектах q равно 5.

[0361] В некоторых аспектах L' представляет собой предшественник биоразлагаемого линкера. В некоторых аспектах предшественник биоразлагаемого линкера выбран из группы, состоящей из



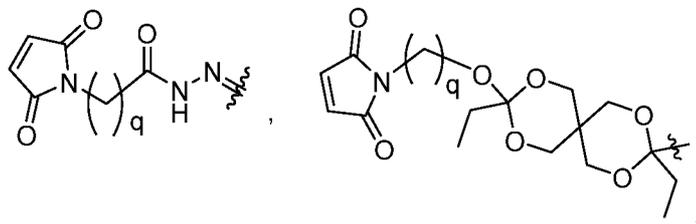
где:

q представляет собой целое число от 2 до 10;

R , R' , R'' и R''' независимо выбраны из водорода, C_1 - C_6 алкокси C_1 - C_6 алкила, $(C_1-C_6)_2NC_1-C_6$ алкила и C_1 - C_6 алкила, или две геминальные группы R , вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, могут образовывать циклобутильное или циклопропильное кольцо; и

 представляет собой точку прикрепления к X.

[0362] В некоторых аспектах L' представляет собой предшественник расщепляемого кислотой линкера. В некоторых аспектах L' выбран из группы, состоящей из

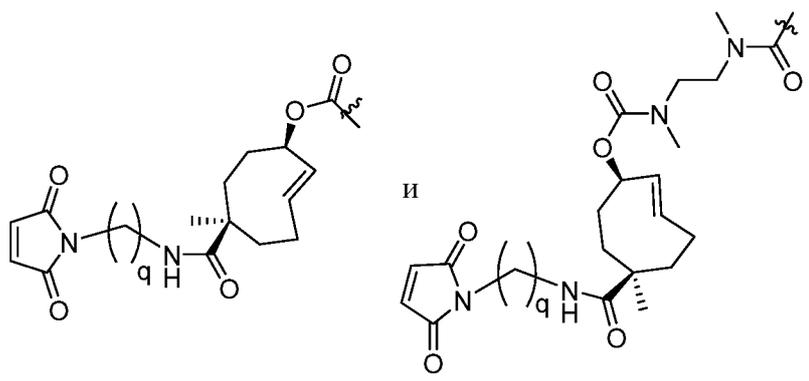


где:

q представляет собой целое число от 2 до 10; и

 представляет собой точку прикрепления к X.

[0363] В некоторых аспектах L' представляет собой предшественник линкера с расщеплением по механизму "клик-высвобождения" ("click-to-release"). В некоторых аспектах L' выбран из

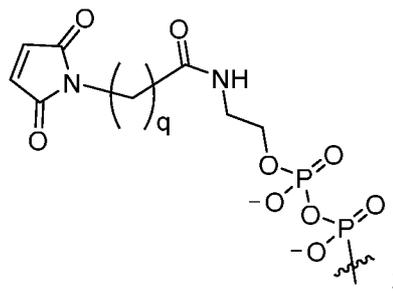


где:

q представляет собой целое число от 2 до 10; и

 представляет собой точку прикрепления к X.

[0364] В некоторых аспектах L' представляет собой предшественник расщепляемого пирофосфатазой линкера. В некоторых аспектах L' представляет собой

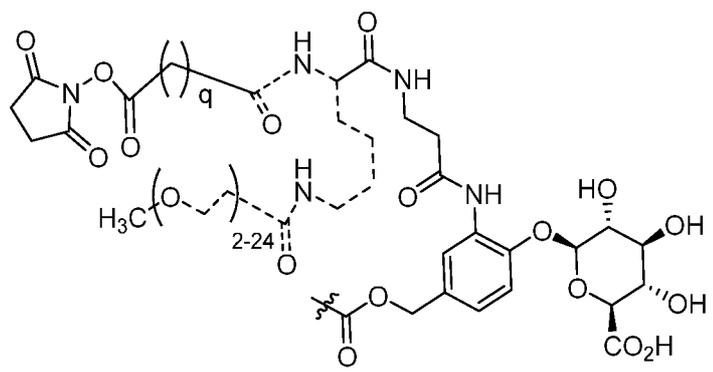
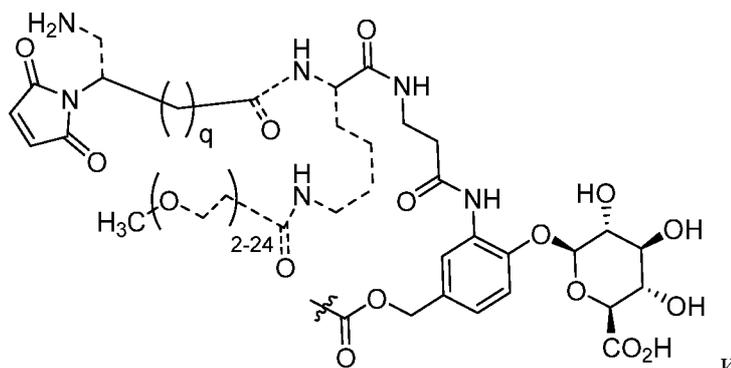


где:

q представляет собой целое число от 2 до 10;

 представляет собой точку прикрепления к X.

[0365] В некоторых аспектах L' представляет собой предшественник расщепляемого бета-глюконидазой линкера. В некоторых аспектах L' выбран из



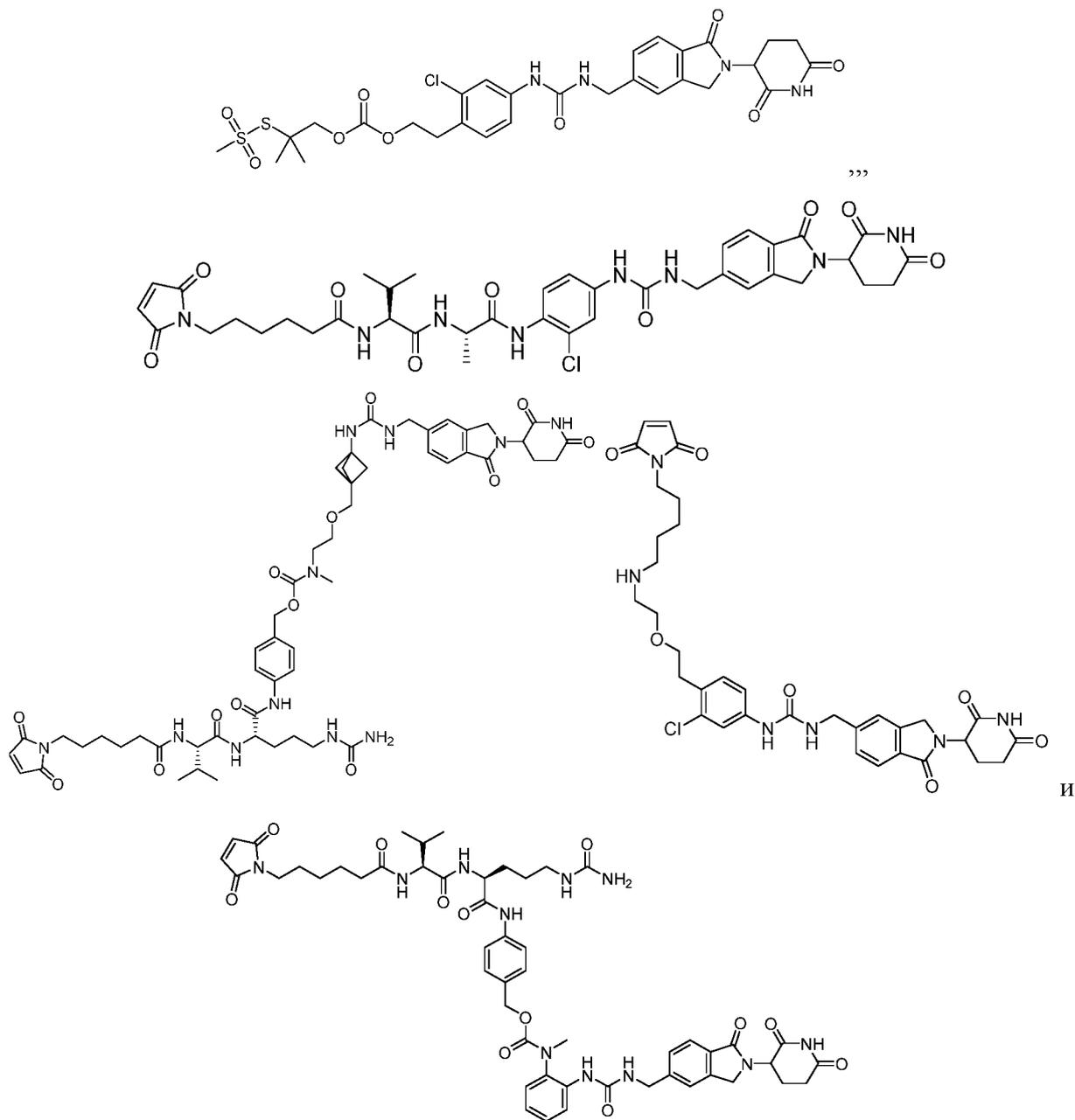
где:

q представляет собой целое число от 2 до 10;

---- отсутствует или представляет собой связь; и

 представляет собой точку прикрепления к X.

[0366] В некоторых аспектах соединение формулы (I-1) выбрано из



[0367] В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть подвергаются предварительной обработке перед реакцией взаимодействия с соединением формулы (I-1). В некоторых аспектах соединение формулы (I-1) вступает в реакцию с анти-CD33 антителом или его антигенсвязывающей частью. В некоторых аспектах анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть могут быть предварительно обработаны для уменьшения межцепочечных дисульфидов перед реакцией взаимодействия с соединением формулы (I-1).

Примеры

Общие способы синтеза и промежуточные соединения

[0368] Соединения по настоящему раскрытию могут быть получены специалистом в данной области техники с учетом настоящего раскрытия и знаний в данной области техники, и/или со ссылкой на приведенные ниже схемы и синтетические примеры. Примерные синтетические маршруты изложены в схемах ниже и в примерах. Следует понимать, что переменные (например, группы "R"), встречающиеся в приведенных ниже схемах и примерах, следует рассматривать независимо от тех, которые встречаются в других местах данной заявки. Специалист в данной области техники легко поймет, как приведенные ниже схемы и примеры иллюстрируют получение описанных в настоящем документе соединений.

[0369] Сокращения, используемые в схемах, в целом соответствуют общепринятым в данной области. Химические сокращения, используемые в спецификации и примерах, определяются следующим образом: "THF" - тетрагидрофуран; "DMF" - N,N-диметилформамид; "Me" - метил; "Bu" - бутил; "FA" - муравьиная кислота; "PE" - петролейный эфир; "MeOH" - метанол; "EtOH" - этанол; "DCM" - дихлорметан; "BOC" или "Boc" "TFA" - трифторуксусная кислота; "DMSO" - диметилсульфоксид; "EtOAc" - этилацетат; "OAc" - ацетат; "dppf" - 1,1'-бис(дифенилфосфино)ферроцен; "dba" - дибензилиденацетон; "CDI" - 1,1'-карбонилдиимидазол; "TBAF" - тетрабутиламмонийфторид; "TBSCl" - трет-бутилдиметилсилилхлорид; "Et₂O" - диэтиловый эфир; "ACN" - ацетонитрил; "ч" - часы; "мин" - минуты; "rt" - комнатная температура или время удерживания (зависит от контекста); "водн." - водный, "насыщ." - насыщенный; "мин" - минуты; "HOBT" - гидрат 1-гидроксибензотриазола; "HATU" - 1-[бис(диметиламино)метилен]-1*H*-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиний 3-оксид гексафторфосфата или *N*-[(диметиламино)-1*H*-1,2,3-триазоло-[4,5-*b*]пиридин-1-илметилен]-*N*-метилметанаминий гексафторфосфат *N*-оксид; "DIEA" и "iPrNEt₂" - диизопропилэтиламин; "Et₃N" и "TEA" - триэтиламин.

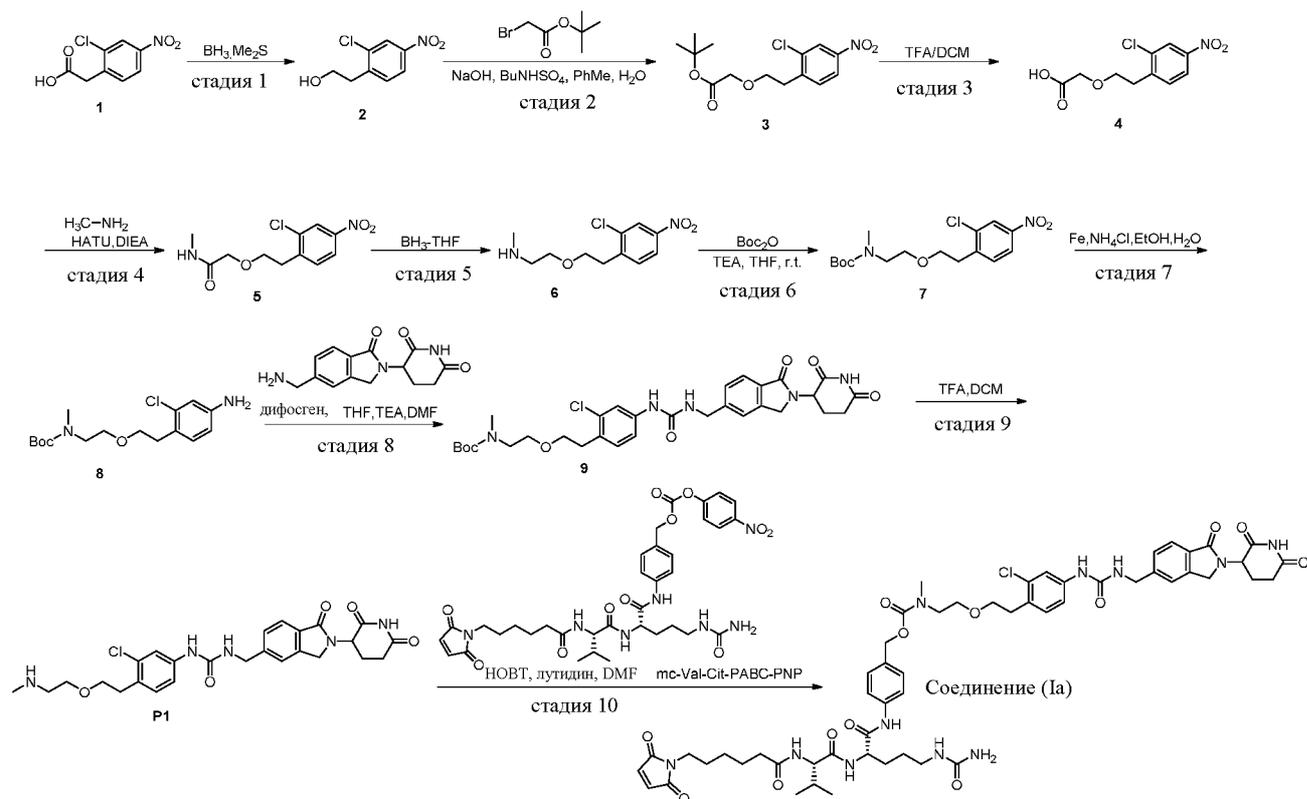
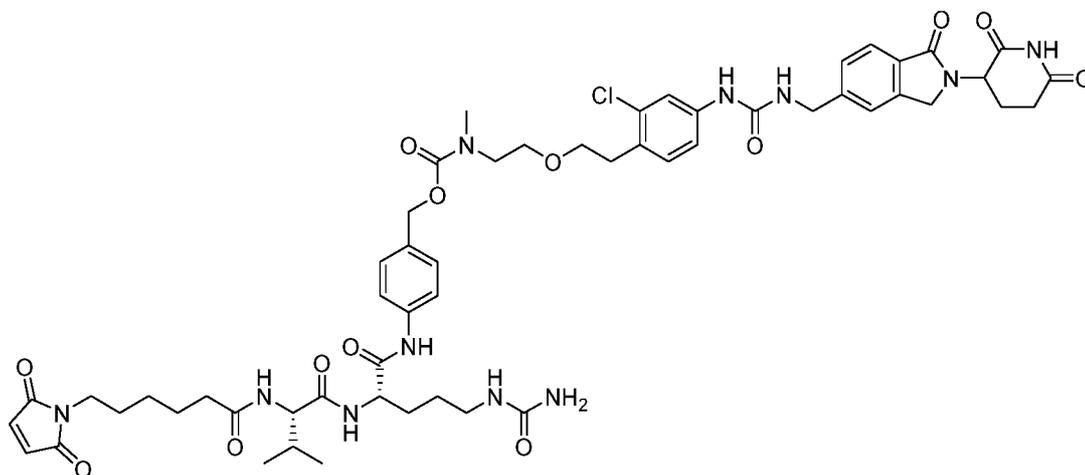
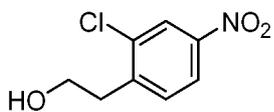


Схема 1. Получение соединения (Ia)

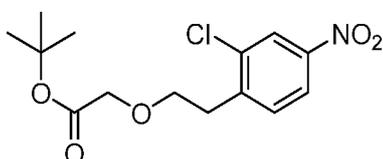


Пример 1: Синтез соединения (Ia)



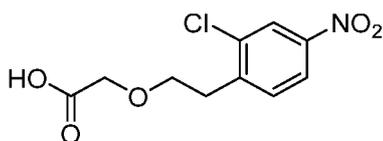
Стадия 1: Синтез соединения 2

[0370] К перемешиваемому раствору 2-хлор-4-нитрофенил)уксусной кислоты (соединение 1, 5,00 г, 23,19 ммоль, 1,00 эквив.) в THF (75,00 мл) при 0 °С в атмосфере азота по каплям добавляли $\text{NH}_3\text{-Me}_2\text{S}$ (10М в THF) (5,80 мл, 58,0 ммоль, 2,50 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч при 70 °С в атмосфере азота. Смесь охлаждали до комнатной температуры. Полученную смесь концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (PE:EtOAc = 1:1) с получением 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанола (3 г, 64%) в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,26 (д, $J = 4,0$ Гц, 1H), 8,10-8,05 (м, 1H), 7,50 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 3,99-3,91 (м, 2H), 3,16-3,09 (м, 2H).



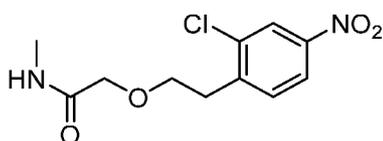
Стадия 2: Синтез соединения 3

[0371] К перемешиваемому раствору 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанола (соединение 2, 5,00 г, 24,800 ммоль, 1,00 эквив) и трет-бутил-2-бромацетата (29,0 мл, 148,28 ммоль, 8,00 эквив) в толуоле (150,00 мл) добавляли $\text{Cu}_4\text{NH}_4\text{SO}_4$ (6,74 г, 19,84 ммоль, 0,80 эквив.). К полученной смеси добавляли NaOH (5 М в H_2O) (500,00 мл) по каплям в течение 40 мин при 0°С. Полученную смесь перемешивали еще 2 ч при 25 °С. Полученную смесь экстрагировали EtOAc (3 x 500 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (400 мл) и сушили над безводным Na_2SO_4 . После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (PE:EtOAc = 4:1) с получением трет-бутил-2-[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]ацетата (8 г, 65%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,23 (д, $J = 4,0$ Гц, 1H), 8,10-8,04 (м, 1H), 7,60 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 4,09 (с, 2H), 3,83-3,80 (м, 2H), 3,17-3,14 (м, 2H), 1,45 (с, 9H).



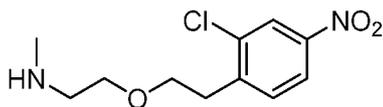
Стадия 3: Синтез соединения 4

[0372] К перемешиваемому раствору трет-бутил-2-[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]ацетата (соединение 3, 8,00 г, 16,14 ммоль, 1,00 эквив., 63,7%) в DCM (80,00 мл) при комнатной температуре по каплям добавляли TFA (16,00 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Полученную смесь разбавляли водой (500 мл). Смесь экстрагировали EtOAc (3 x 500 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (200 мл), сушили над безводным Na₂SO₄. После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении. В результате была получена [2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]уксусная кислота (6,5 г, неочищенная) в виде желтого масла. ЖХМС (ESI): 517 (2M-H)-.



Стадия 4: Синтез соединения 5

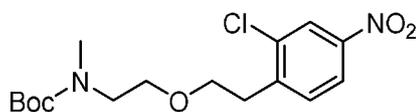
[0373] К перемешиваемому раствору [2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]уксусной кислоты (соединение 4, 6,30 г, 21,84 ммоль, 1,00 эквив., 90%) и NATU (12,46 г, 32,76 ммоль, 1,50 эквив.) в DMF (65,00 мл) при комнатной температуре по каплям добавляли CH₃NH₂·HCl (1,77 г, 26,21 ммоль, 1,20 эквив.) и DIEA (15,20 г, 117,8 ммоль, 4,00 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Полученную смесь разбавляли водой. Полученную смесь экстрагировали EtOAc (2 x 100 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили над безводным Na₂SO₄. После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (DCM:MeOH = 10:1) с получением 2-[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]-N-метилацетамида (10 г, чистота: 50%, выход: 84%) в виде желтого масла. ЖХМС (ESI): 273,28 (M+H)⁺



Стадия 5: Синтез соединения 6

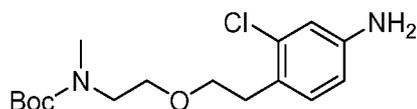
[0374] К перемешиваемому раствору 2-[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]-N-метилацетамида (соединение 5, 3,3 г, 12,10 ммоль, 1,00 эквив.) в THF (35,00 мл) при

комнатной температуре под атмосферой азота по каплям добавляли $\text{NH}_3\text{-THF}$ (1М в THF) (12,10 мл, 12,10 ммоль, 1,00 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч при 70 °С в атмосфере азота. Реакцию гасили MeOH. Остаток подкисляли до pH 6 1N HCl. Полученную смесь экстрагировали EtOAc (20 мл). Водную фазу доводили до pH 8 насыщенным NaHCO_3 (насыщ., водн.). Полученную смесь экстрагировали EtOAc (3 x 100 мл), промывали насыщенным солевым раствором (50 мл) и сушили над безводным Na_2SO_4 . После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении. В результате был получен [2-[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]этил](метил)амин (2,5 г, 80%) в виде желтого масла. ЖХМС (ESI): 259,26 (M+H)⁺



Стадия 6. Синтез соединения 7

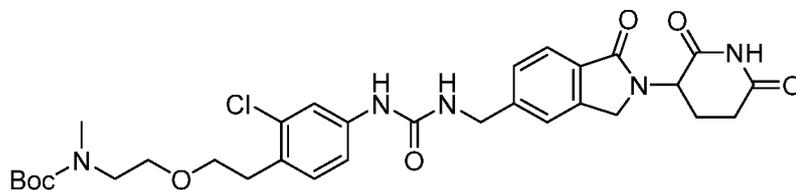
[0375] К перемешиваемому раствору [2-[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]этил](метил)амин (соединение 6, 2,50 г, 9,69 ммоль, 1,00 эквив.) и Boc_2O (2,53 г, 11,6 ммоль, 1,20 эквив.) в THF (40 мл) при 25 °С по каплям добавляли TEA (1,17 г, 11,6 ммоль, 1,20 эквив.). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 2 ч. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (DCM:MeOH = 5:1) с получением трет-бутил N-[2-[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]этил]-N-метилкарбамата (1,70 г, 50%) в виде желтого масла. ЖХМС (ESI): 359,36 (M+H)⁺



Стадия 7: Синтез соединения 8

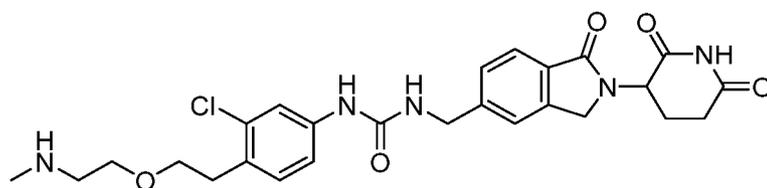
[0376] К перемешиваемому раствору трет-бутил-N-[2-[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]этил]-N-метилкарбамата (соединение 7, 1,70 г, 4,74 ммоль, 1,00 эквив.) и NH_4Cl (750 мг, 14,2 ммоль, 3,00 эквив.) в EtOH (85 мл) и H_2O (17 мл) добавляли Fe (1,3 г, 23,7 ммоль, 5,00 эквив.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 80 °С в течение 2 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры. Полученную смесь отфильтровывали, фильтровальную лепешку промывали EtOH (3 x 50 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (PE :

EtOAc = 4:1) с получением трет-бутил N-[2-[2-(4-амино-2-хлорфенил)этокси]этил]-N-метилкарбамата (900 мг, 58%) в виде желтого масла. ЖХМС (ESI): 329,33 (M+H)⁺



Стадия 8: Синтез соединения 9

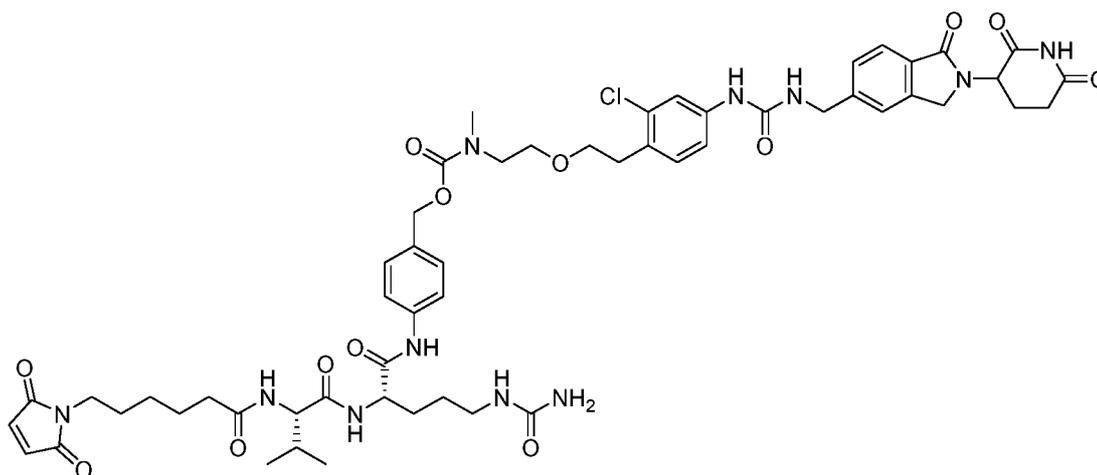
[0377] К перемешиваемому раствору трет-бутил-N-[2-[2-(4-амино-2-хлорфенил)этокси]этил]-N-метилкарбамата (соединение 8, 500 мг, 1,52 ммоль, 1,00 эквив.) в THF (10 мл) при 25 °С по каплям добавляли дифосген (601 мг, 3,04 ммоль, 2,00 эквив.). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч. Полученную смесь концентрировали под вакуумом и повторно растворили в DMF (5 мл). К перемешиваемой смеси 3-[5-(аминометил)-1-оксо-3H-изоиндол-2-ил]пиперидин-2,6-диона (INT1, приготовлен как описано ниже, 499 мг, 1,82 ммоль, 1,20 эквив.) и ТЕА (1,56 г, 15,45 ммоль, 10,00 эквив.) в DMF (20 мл) по каплям при 25 °С добавляли вышеуказанный раствор. Смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч. Полученную смесь разбавляли 40 мл ледяной воды. Полученную смесь экстрагировали EtOAc (3 x 40 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором (5x40 мл) и сушили над безводным Na₂SO₄. После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (DCM: MeOH = 10:1) с получением трет-бутил-(2-(2-хлор-4-(3-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)уреидо)фенэтокси)этил)(метил)карбамата (670 мг, 70%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: (ESI): 628,63 (M+H)⁺



Стадия 9: Синтез неодеградера P1

[0378] К перемешиваемому раствору трет-бутил-N-[2-(2-[2-хлор-4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил)метил)карбамоил)амино]фенил)этокси]этил]-N-метилкарбамата (соединение 9, 670 мг,

1,07 ммоль, 1 экв.) в DCM (10 мл) при 0 °С по каплям добавляли TFA (2,5 мл). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 1 ч. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали способом препаративной ВЭЖХ со следующими условиями: Колонка, SunFire C18 OBD Prep Column, 100 мкм, 19x250 мм; подвижная фаза, вода (0,05% TFA) и ACN (5% фазы В до 60% за 30 мин); детектор, УФ 220 нм. Собранную фракцию лиофилизировали с получением 1-(3-хлор-4-[2-[2-(метиламино)этокси]этил]фенил)-3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]мочевины (500 мг, 89%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ESI): 528,53 (M+H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, метанол-d₄) δ 7,77 (д, J = 8,0 Гц, 1H), 7,57-7,53 (м, 2H), 7,49 (д, J = 8,0 Гц, 1H), 7,21 (д, J = 4,0 Гц, 2H), 5,19-5,1 (м, 1H), 4,55-4,41 (м, 4H), 3,75-3,67 (м, 4H), 3,21-3,15 (м, 2H), 3,03-3,96 (м, 2H), 2,96-2,84 (м, 1H), 2,83-2,73 (м, 2H), 2,69 (с, 3H), 2,55-2,42 (м, 1H), 2,21-2,12 (м, 1H).



Стадия 10: Синтез соединения (1a)

[0379] К перемешиваемой смеси 1-(3-хлор-4-[2-[2-(метиламино)этокси]этил]фенил)-3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]мочевины (неодеградер P1, 200 мг, 0,38 ммоль, 1,00 эквив.) и лутидина (81 мг, 0,76 ммоль, 2,00 эквив.) в DMF (10 мл) добавляли НОВТ (26 мг, 0,19 ммоль, 0,50 эквив.) и [4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил]метил 4-нитрофенилкарбонат (279 мг, 0,38 ммоль, 1,00 эквив.) порциями при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали в течение 12 часов при 40°С в атмосфере азота. После охлаждения до комнатной температуры реакцию гасили водой (30 мл). Полученную смесь экстрагировали DCM (3 x 30 мл).

Объединенные органические слои промывали водой (2 x 30 мл), насыщенным соевым раствором (30 мл), сушили над Na₂SO₄. После фильтрации фильтрат концентрировали досуха в вакууме. Остаток очищали на обращенно-фазовой колонке (C18, подвижная фаза А: 0,1% FA в воде, В: ACN). Собранную фракцию концентрировали досуха в вакууме. Неочищенный продукт (60 мг) очищали способом препаративной ВЭЖХ со следующими условиями (колонка: Xselect CSH OBD Column 30x150 мм 5мкм, n; мобильная фаза А: вода (0,1%FA), мобильная фаза В: ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 33 В до 50 В за 7 мин; 220 нм; RT1: 5,27 мин). Собранную фракцию лиофилизировали с получением [4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил]метил N-[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этокси)этил]-N-метилкарбамата (23.8 мг, 5%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ESI): 1126,11 (M+H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 10,99(с, 1H), 10,00(с, 1H), 8,88(с, 1H), 8,12-8,08(м, 1H), 7,85-7,81(м, 2H), 7,70-7,67(м, 2H), 7,60-7,58(м, 1H), 7,51(с, 1H), 7,47-7,44(м, 1H), 7,28-7,25(м, 2H), 7,18-7,12(м, 2H), 7,00(с, 2H), 6,90(шир. с, 1H), 5,97-5,95(м, 1H), 5,42(с, 2H), 5,12-5,05 (м, 1H), 4,98 (с, 2H), 4,42-4,32 (м, 4H), 4,18-4,15 (м, 1H), 3,56-3,40 (м, 4H), 3,37-3,36 (м, 3H), 3,05-2,90 (м, 3H), 2,89-2,85 (м, 5H), 2,72-2,55 (м, 2H), 2,40-2,33 (м, 2H), 2,25-2,15 (м, 2H), 2,00-1,87 (м, 2H), 1,74-1,57 (м, 2H), 1,50-1,42 (м, 5H), 1,22-1,10 (м, 3H), 0,85-0,80 (м, 6H).

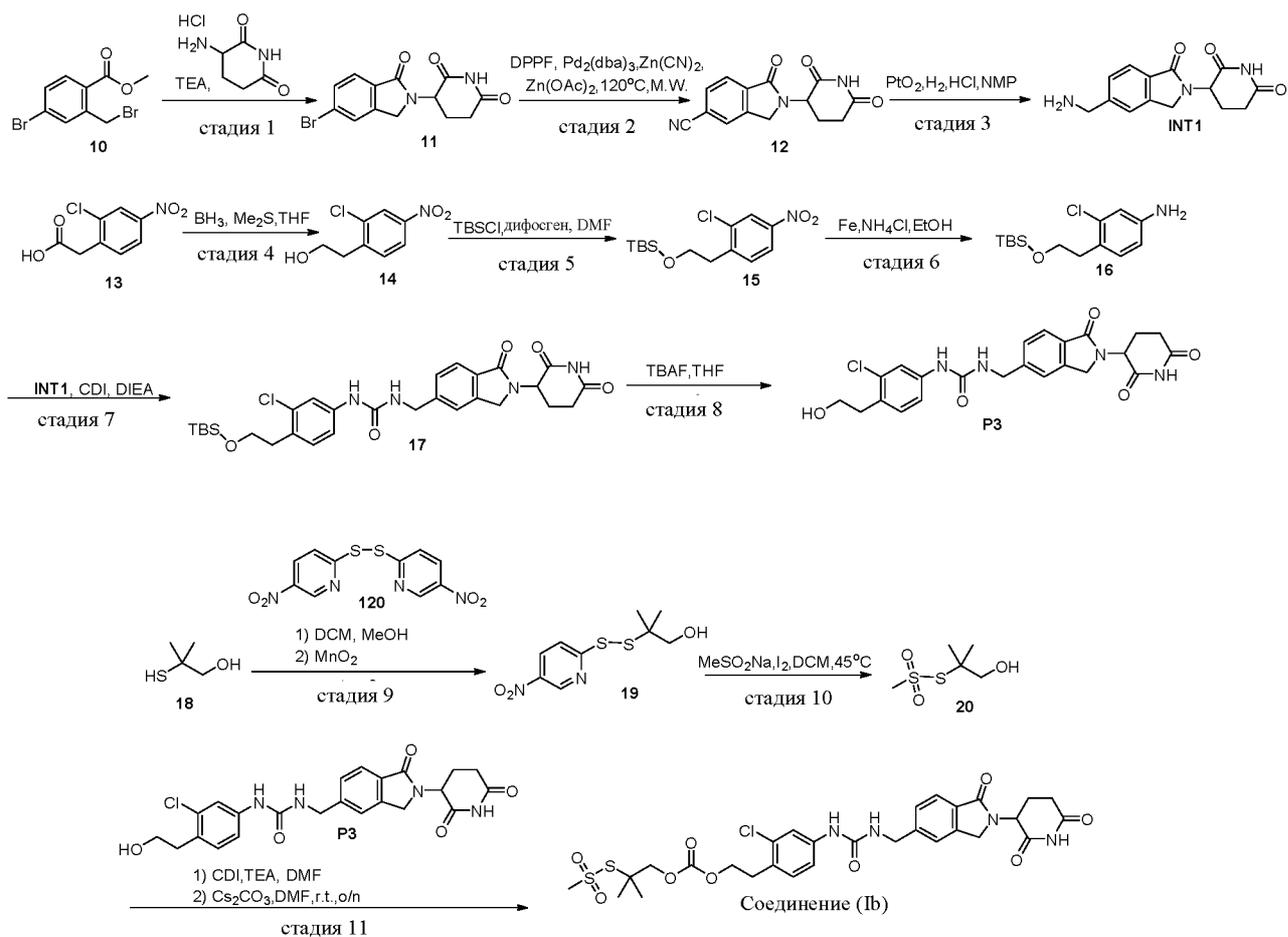
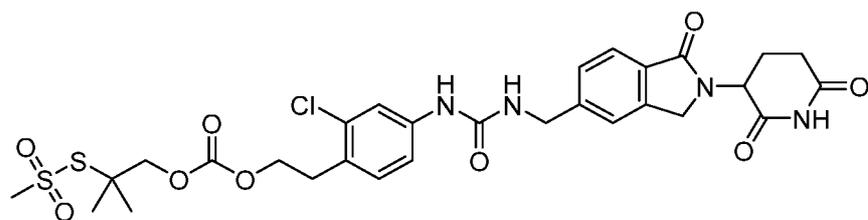
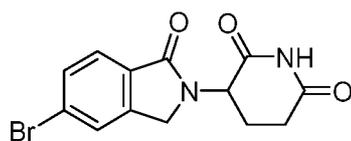


Схема 2: Получение соединения (1b)

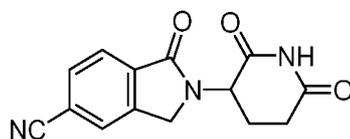


Пример 2: Синтез соединения (1b)



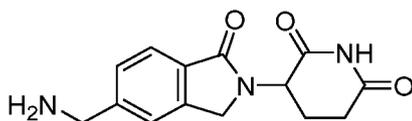
Стадия 1: Синтез соединения 11

[0380] К перемешиваемой смеси метил-4-бром-2-(бромметил)бензоата (соединение 10, 20,0 г, 64,8 ммоль, 1,00 эквив.) и гидрохлорида 3-аминопиперидин-2,6-диона (10,64 г, 83,0 ммоль, 1,28 эквив.) в DMF (80 мл) при 25 °С под атмосферой азота по каплям добавляли TEA (22,4 мл, 162,2 ммоль, 2,50 эквив.). Смесь перемешивали при 25 °С в течение 16 ч. Затем последовательно добавляли H₂O (60 мл), AcOH (23 мл) и Et₂O (60 мл) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25 °С в течение 2 ч. Выпавшее твердое вещество собирали фильтрацией и промывали Et₂O (60 мл). В результате был получен 3-(5-бром-1-оксо-3H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-дион (9,0 г, 42%) в виде светло-голубого твердого вещества. ЖХМС (ESI): 323,32 (M+H)⁺



Стадия 2: Синтез соединения 12

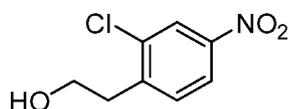
[0381] К перемешиваемой смеси 3-(5-бром-1-оксо-3H-изоиндол-2-ил)пиперидин-2,6-диона (соединение 11, 1,00 г, 3,09 ммоль, 1,00 эквив.) и dppf (51 мг, 0,093 ммоль, 0,03 эквив.) в DMF (8 мл) добавляли Zn(OAc)₂ (170 мг, 0,928 ммоль, 0,30 эквив.), Zn(CN)₂ (545 мг, 4,64 ммоль, 1,50 эквив.) и Pd₂(dba)₃ (28 мг, 0,031 ммоль, 0,01 эквив.) при 25 °С в атмосфере азота. Полученную реакционную смесь облучали микроволновым излучением в течение 2 ч при 120 °С. Смесь охлаждали до комнатной температуры и фильтровали. Фильтровальную лепешку промывали MeOH (3x30 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток подвергали флэш-хроматографии (силикагель, 80 г, DCM: MeOH=10: 1) с получением желаемого продукта 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-карбонитрила (400 мг, 47%) в виде коричневого твердого вещества. ЖХМС (ESI): 270 (M+H)⁺



Стадия 3: Синтез INT1

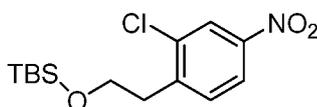
[0382] К перемешиваемой смеси 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-карбонитрила (соединение 12, 3,0 г, 11,14 ммоль, 1,00 эквив.) и HCl (12M) (3,6 мл) в MeOH (25 мл) при 25 °С добавляли PtO₂ (1,25 г, 5,5 ммоль, 0,49 эквив.). Смесь

гидрировали при комнатной температуре в течение 16 ч в атмосфере водорода с использованием водородного баллона. Полученную смесь отфильтровали и промывали фильтровальную лепешку MeOH (2 x 30 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Полученное твердое вещество промывали DCM: MeOH (3:1) (3x30 мл) и сушили. В результате был получен 3-[5-(аминометил)-1-оксо-3H-изоиндол-2-ил]пиперидин-2,6-дион (2,5 г, 80%) в виде серого твердого вещества, ЖХМС (ESI): 274 (M+H)⁺, ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 11,02 (с, 1H), 8,15 (с, 1H), 7,98 (д, J=8,4 Гц, 1H), 7,89(д, J=8,4 Гц, 1H), 5,16-5,11 (м, 1H), 4,52 (д, J=17,2 Гц, 1H), 4,40 (д, J=17,2 Гц, 1H), 2,96-2,90 (м, 1H), 2,60-2,54 (м, 1H), 2,43-2,34 (м, 1H), 2,06-1,96 (м, 1H)



Стадия 4: Синтез соединения 14

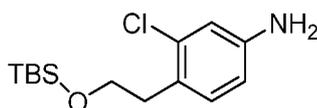
[0383] К перемешиваемому раствору (2-хлор-4-нитрофенил)уксусной кислоты (соединение 13, 5,00 г, 22,50 ммоль, 1,00 экв.) в THF (75 мл) при 0 °С в атмосфере азота по каплям добавляли NH₃-Me₂S (10M в THF) (5,60 мл, 56 ммоль, 2,50 экв.). Смесь перемешивали при 70 °С в течение 2 ч. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Остаток наносили на колонку с силикагелем и элюировали PE / EtOAc (5:1), получая 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанол (4,44 г, 88%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,26 (д, J = 4,0 Гц, 1H), 8,10-8,05 (м, 1H), 7,50 (д, J = 8,0 Гц, 1H), 3,99-3,91 (м, 2H), 3,16-3,09 (м, 2H)



Стадия 5: Синтез соединения 15

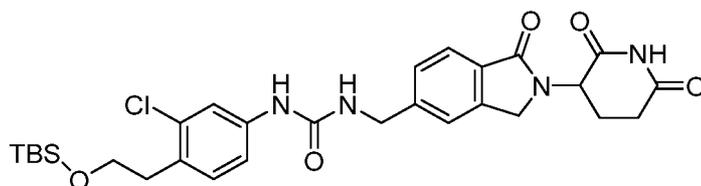
[0384] К перемешиваемой смеси 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанола (соединение 14, 4,44 г, 22,02 ммоль, 1,00 эквив.) и имидазола (4,50 г, 66,06 ммоль, 3,00 эквив.) в DMF (50,00 мл) добавляли TBSCl (6,97 г, 46,25 ммоль, 2,10 эквив.) при 25 °С. Смесь перемешивали при 25 °С в течение 16 ч. Полученную смесь разбавляли водой (100 мл). Полученную смесь экстрагировали с помощью EtOAc (3 x 100 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором (3x100 мл), сушили над безводным Na₂SO₄. После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток

наносили на колонку с силикагелем и элюировали PE/ EtOAc (10:1) с получением трет-бутил[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]диметилсилана (6,6 г, 90%) в виде бесцветного масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,24 (с, 1H), 8,06-8,04 (м, 1H), 7,46 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 3,89-3,86 (м, 2H), 3,06-0,04 (м, 2H), 0,85 (с, 9H), 0,04 (с, 6H),



Стадия 6: Синтез соединения 16

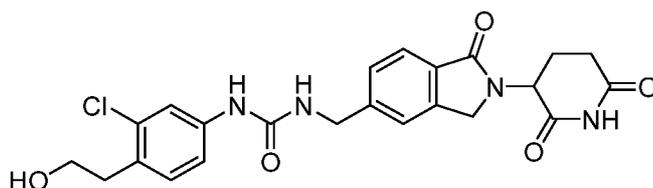
[0385] К смеси трет-бутил[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]диметилсилана (соединение 15, 5,70 г, 18,05 ммоль, 1,00 эквив.) и Fe (10,08 г, 180,45 ммоль, 10,00 эквив.) в EtOH (110 мл) / воде (55 мл) добавляли NH_4Cl (9,65 г, 180,45 ммоль, 10,00 эквив.). Смесь перемешивали при 80 °C в течение 2 ч. Смесь охлаждали до комнатной температуры. Полученную смесь отфильтровывали и осадок промывали EtOH (3x50 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток разбавляли водой (100 мл) и экстрагировали EtOAc (50 мл x3). Объединенный органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и выпаривали досуха в вакууме, получая 4-[2-[(трет-бутилдиметилсилил)окси]этил]-3-хлоранилин (5,2 г, неочищенный) в виде бледно-коричневого масла. ЖХМС (ESI): 286,29 (M+H)⁺



Стадия 7: Синтез соединения 17

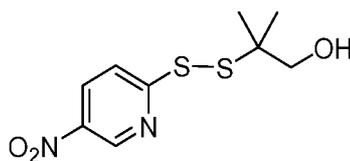
[0386] К раствору 4-[2-[(трет-бутилдиметилсилил)окси]этил]-3-хлоранилина (соединение 16, 200,00 мг, 0,70 ммоль, 1,00 эквив.) и TEA (141 мг, 1,40 ммоль, 2,00 экв.) в DMF (3 мл) добавляли CDI (113 мг, 0,70 ммоль, 1,00 экв.) в DMF (1 мл) по каплям под азотом при 0°C. Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 1 часа. Затем к раствору 3-[5-(аминометил)-1-оксо-3H-изоиндол-2-ил]пиперидин-2,6-диона (INT1, 192 мг, 0,70 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (2 мл) по каплям добавляли указанный раствор и TEA (141 мг, 1,40 ммоль). Аналогичную реакцию повторяли дважды. Полученную смесь перемешивали при 25 °C в течение 1 часа. Реакционную смесь разбавляли водой (20 мл), экстрагировали EtOAc

(20 мл x3). Объединенный органический слой промывали водой, насыщенным соевым раствором, сушили над безводным сульфатом натрия и выпаривали досуха в вакууме. Остаток очищали на колонке с силикагелем (DCM:MeOH=10:1) с получением 1-(4-[2-[(трет-бутилдиметилсилил)окси]этил]-3-хлорфенил)-3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]мочевины (170 мг, 21%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ESI): 585,59 (M+H)⁺



Стадия 8: Синтез неодеградера P3

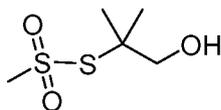
[0387] К раствору 1-(4-[2-[(трет-бутилдиметилсилил)окси]этил]-3-хлорфенил)-3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]мочевины (соединение 17, 170,00 мг, 0,29 ммоль, 1,00 эквив.) в THF (2,00 мл) добавляли TBAF (1 N в THF, 0,58 мл, 0,58 ммоль, 2,00 эквив.) при 0 °С. Полученную смесь перемешивали при 25 °С в течение 8 часов. Реакционную смесь очищали способом препаративной ТСХ (DCM:MeOH=10:1) с получением 147 мг неочищенной 1-(3-хлор-4-(2-гидроксиэтил)фенил)-3-((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолин-5-ил)метил)мочевины в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ESI): 471,47 (M+H)⁺



Стадия 9: Синтез соединения 19

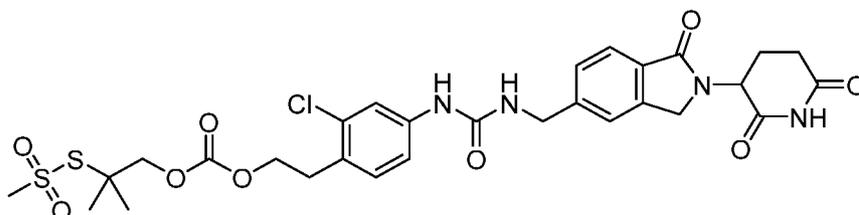
[0388] В смесь растворителя дихлорметана (3,50 мл) и MeOH (3,50 мл) добавляли 2-метил-2-сульфанилпропан-1-ол (соединение 18, 1,4 г, 13,2 ммоль, 1,00 эквив.) и 5-нитро-2-[(5-нитропиридин-2-ил)дисульфанил]пиридин (соединение 120, 2,05 г, 6,67 ммоль, 0,50 эквив.). Полученную смесь перемешивали при 15 °С. Затем порциями добавляли диоксид марганца (2,29 г, 26,2 ммоль, 2 эквив.). Полученную смесь перемешивали при 15 °С в течение 15 мин. ЖХМС-спектроскопия показала, что реакция завершена. Реакционную смесь выпаривали досуха, остаток очищали способом обращенной флэш-хроматографии

при следующих условиях: колонка, силикагель С18; подвижная фаза, АСN в воде (0,1% NH₄НСO₃), градиент от 10% до 100% за 30 мин; детектор, УФ 254 нм. Собранную фракцию концентрировали досуха в вакууме с получением 2-метил-2-[(5-нитропиридин-2-ил)дисульфанил]пропан-1-ола (2,2 г, 58%) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС (ESI): 261 (M+H)⁺.



Стадия 10: Синтез соединения 20

[0389] К раствору 2-метил-2-[(5-нитропиридин-2-ил)дисульфанил]пропан-1-ола (соединение 20, 1,0 г, 3,84 ммоль, 1,00 эквив.) в безводном DCM (30 мл) порциями добавляли MeSO₂Na (1,57 г, 15,4 ммоль, 4,00 эквив.) и йод (1,95 г, 7,68 ммоль, 2,00 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при 45°C в течение 24 ч. Смесь концентрировали, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (TLC: PE:EA=3:1, R_f = 0,60; 0-35% EtOAc в петролейном эфире) с получением 2-(метансульфонилсульфанил)-2-метилпропан-1-ола (80 мг, 10%) в виде желтого масла. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃Cl): δ 3,50 (с, 2H), 3,33 (с, 3H), 2,16 (шир. с, 1H), 1,47 (с, 6H).



Стадия 11: Синтез соединения (1b)

[0390] К раствору 1-[3-хлор-4-(2-гидроксиэтил)фенил]-3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]мочевины (неодеградер P3, 200,00 мг, 0,42 ммоль, 1,00 эквив) и TEA (129 мг, 1,26 ммоль, 3,00 эквив) в DMF (4 мл) добавляли раствор CDI (138 мг, 0,84 ммоль, 2,00 экв.) в DMF (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакционную смесь разбавляли водой (50 мл) и экстрагировали EtOAc (20 млx3). Объединенный органический слой промывали водой (20 мл x 3), насыщенным солевым раствором (20 мл), сушили над сульфатом натрия и выпаривали досуха в вакууме, получая неочищенный продукт (2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил]амино]фенил]этил-

имидазол-1-карбоксилат, 200 мг) в виде бледно-желтого твердого вещества. К раствору неочищенного продукта (100,00 мг, 0,18 ммоль, 1,00 эквив.) и Cs_2CO_3 (115 мг, 0,35 ммоль, 2,00 эквив.) в DMF (8 мл) при комнатной температуре по каплям добавляли 2-(метансульфонилсульфанил)-2-метилпропан-1-ол (соединение 20, 59 мг, 0,32 ммоль, 1,80 эквив.) в DMF (2 мл). Реакционную смесь перемешивали при 15 °C в течение 22 часов. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (50 мл) и охлажденной до льда водой (100 мл). Органический слой отделяли. Водную фазу экстрагировали EtOAc (30 мл x 3). Объединенный органический слой промывали насыщенным солевым раствором (30 мл x 3), сушили над безводным сульфатом натрия и выпаривали досуха в вакууме с получением неочищенного продукта (150 мг) в виде желтого твердого вещества. Неочищенный продукт был очищен способом препаративной ВЭЖХ (колонка: Xselect CSH OBD Column 30x150 мм 5мкм; мобильная фаза А: вода (0,1%FA), мобильная фаза В: ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 38 В до 58 В за 7 мин; 220 нм; RT1: 5,12 мин). Собранную фракцию лиофилизировали с получением 1-[3-хлор-4-[2-([2-(метансульфонилсульфанил)-2-метилпропокси]карбонил)-окси)этил]фенил]-3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]мочевины (15,7 мг, 11%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ESI): 681,68 (M+H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 10,99 (с, 1H), 8,86 (с, 1H), 7,70 (д, *J* = 2,4 Гц, 1H), 7,51 (с, 1H), 7,44 (д, *J* = 8,0 Гц, 1H), 7,24-7,17 (м, 1H), 6,87-6,84 (м, 1H), 5,76 (с, 2H), 5,13-5,11 (м, 1H), 4,42-4,40 (м, 2H), 4,32-4,28 (м, 4H), 3,54 (с, 3H), 3,00-2,87 (м, 3H), 2,62-2,58 (м, 1H), 2,44-2,34 (м, 1H), 2,01-1,95 (м, 1H), 1,45 (с, 6H).

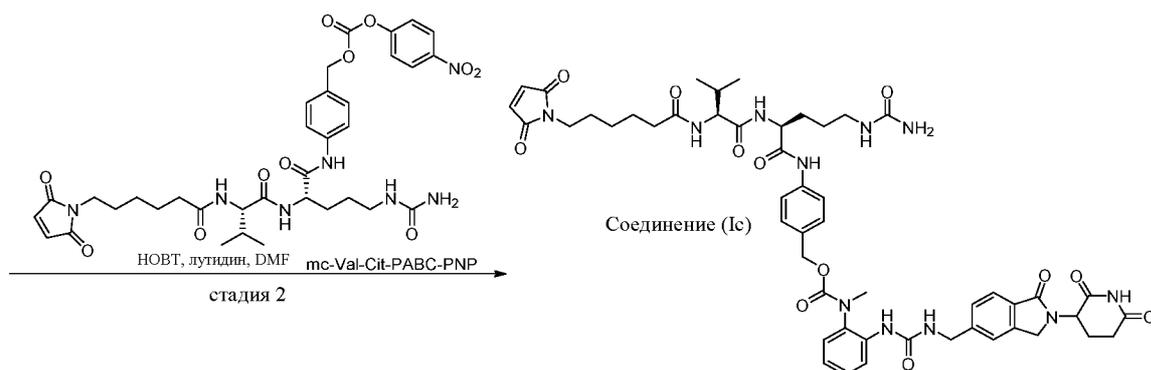
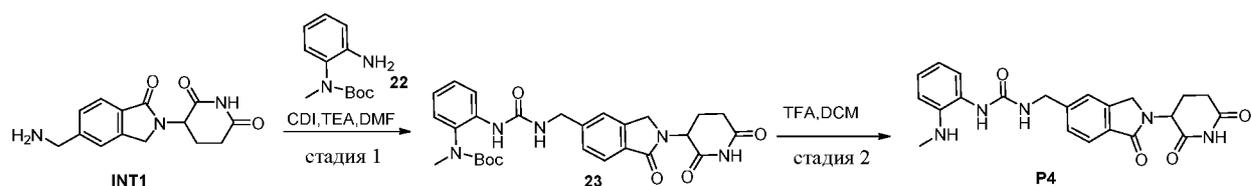
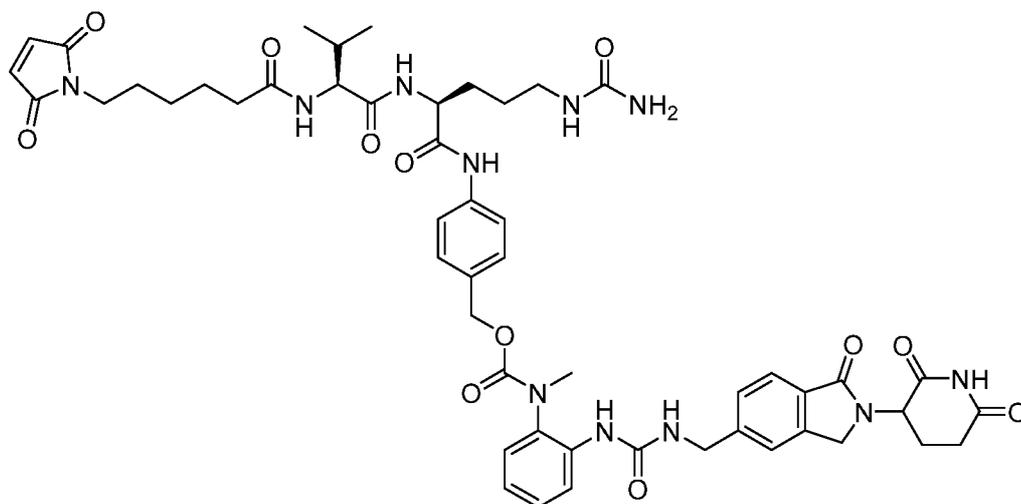
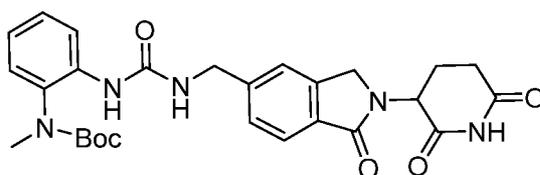


Схема 3: Получение соединения (1c)

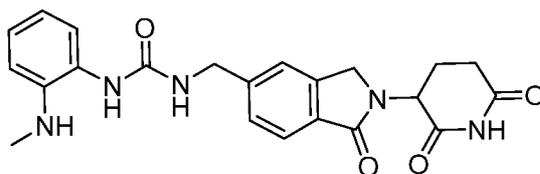


Пример 3: Синтез соединения (1c)



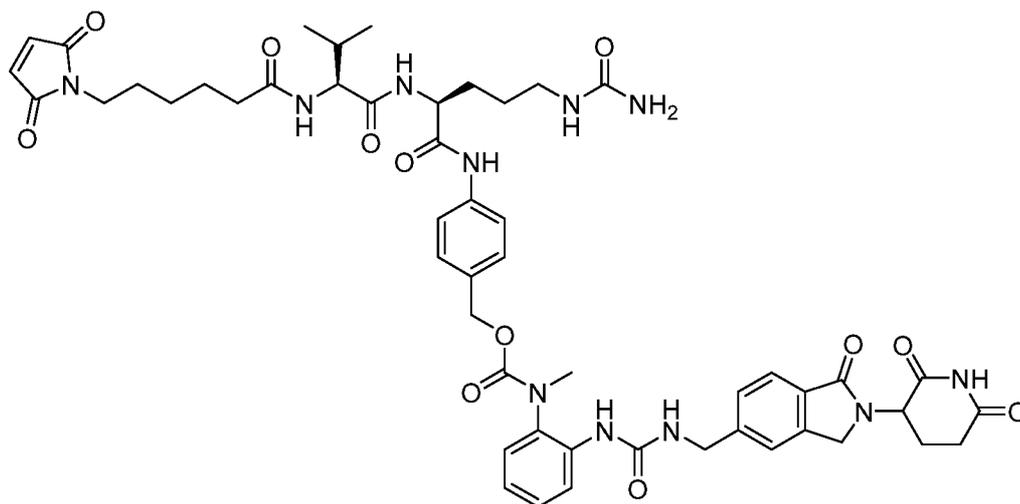
Стадия 1: Синтез соединения 23

[0391] К перемешиваемому раствору трет-бутил (2-аминофенил)(метил)карбамата (соединение 22, 300 мг, 1,35 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (20 мл) при 0°C в атмосфере азота по каплям добавляли CDI (218 мг, 1,35 ммоль, 1,00 эквив.) и TEA (68 мг, 1,35 ммоль, 1,00 эквив.). Смесь перемешивали при 0 °C в течение 2 ч. К полученной смеси порциями добавляли 3-[5-(аминометил)-1-оксо-3H-изоиндол-2-ил]пиперидин-2,6-дион (INT1, 368 мг, 1,35 ммоль, 1,00 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение ночи при 75 °C. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры. Полученную смесь охлаждали водой (30 мл) и экстрагировали DCM (3 x 30 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором (30 мл), сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (DCM/MeOH =10:1) с получением трет-бутил-N-[2-([(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]-N-метилкарбамата (300 мг, 42%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ESI): 522 (M+H)⁺



Стадия 2. Синтез неодеградера P4

[0392] К перемешиваемому раствору трет-бутил-N-[2-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]-N-метилкарбамата (соединение 23, 300 мг, 1,00 эквив.) в DCM (20 мл) при 0 °С добавляли TFA (5 мл). Смесь перемешивали при 0 °С в течение 2 ч. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовым способом со следующими условиями (C18, мобильная фаза А: вода (0,1% FA), мобильная фаза В: ACN; скорость потока: 60 мл/мин). Собранную фракцию концентрировали в вакууме с получением 3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]-1-[2-(метиламино)фенил]мочевины (210 мг, 87%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ESI): 422 (M+H)⁺. ¹H ЯМР (300 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 10,99 (с, 1H), 7,69 (д, J = 7,8 Гц, 1H), 7,60 (с, 1H), 7,53 (с, 1H), 7,45 (д, J = 8,4 Гц, 1H), 7,26-7,24 (м, 1H), 6,99-6,93 (м, 1H), 6,76-6,72 (м, 1H), 6,60-6,55 (м, 2H), 5,14-5,08 (м, 1H), 5,00-4,85 (шир, с, 1H), 4,48-4,28 (м, 4H), 2,92-2,82 (м, 1H), 2,70 (с, 3H), 2,62-2,57 (м, 1H), 2,49-2,41 (м, 1H), 2,02-1,95 (м, 1H).



Стадия 3. Синтез соединения (Ic)

[0393] К перемешиваемой смеси 3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]-1-[2-(метиламино)фенил]мочевины (P4, 150,00 мг, 0,36 ммоль, 1,00 эквив.), 2,6-лутидина (76 мг, 0,71 ммоль, 2,00 эквив.) и НОВТ (96 мг, 0,71 ммоль, 2,00 эквив.)

в DMF (3.00 мл) добавляли [4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил]метил-4-нитрофенилкарбонат (394 мг, 0,53 ммоль, 1,50 эквив.) при комнатной температуре под атмосферой азота. Реакционная смесь была очищена способом обращенной флэш-хроматографии при следующих условиях: колонка, силикагель C18; подвижная фаза, подвижная фаза А: вода (0,1%FA), подвижная фаза В: ACN;) с получением неочищенного продукта (60 мг) в виде белого твердого вещества. Неочищенный продукт (60 мг) был очищен способом препаративной ВЭЖХ со следующими условиями (колонка: Xselect CSH OBD Колонка 30x150 мм 5мкм, п; Мобильная фаза А: вода (0,1% FA), Мобильная фаза В: ACN; Скорость потока: 60 мл/мин; Градиент: от 24 В до 44 В за 7 мин; 220 нм; RT1: 6,33; RT2:). Собранную фракцию лиофилизировали с получением [4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил]метил-N-[2-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил]амино]фенил]-N-метилкарбамата (18,1 мг, 5%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ESI): 1020 (M+H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 10,99 (с, 1H), 9,96 (с, 1H), 8,19-8,06 (м, 3H), 7,79 (д, J = 8,8 Гц, 1H), 7,70 (д, J = 8,0 Гц, 1H), 7,53-7,41 (м, 5H), 7,20-7,05 (м, 4H), 7,00 (с, 2H), 6,95-6,90 (м, 1H), 5,95 (шир. с, 1H), 5,41 (с, 2H), 5,18-4,89 (м, 3H), 4,44-4,20 (м, 5H), 4,19-4,17 (м, 1H), 3,09 (с, 3H), 3,07-2,85 (м, 3H), 2,22-2,02 (м, 2H), 2,00-1,85 (м, 2H), 1,71-1,25 (м, 10H), 1,20-1,12 (м, 3H), 0,84-0,80 (м, 6H)

[0394] На схеме 4 показан способ получения соединения (Id) из неодеградера P1.

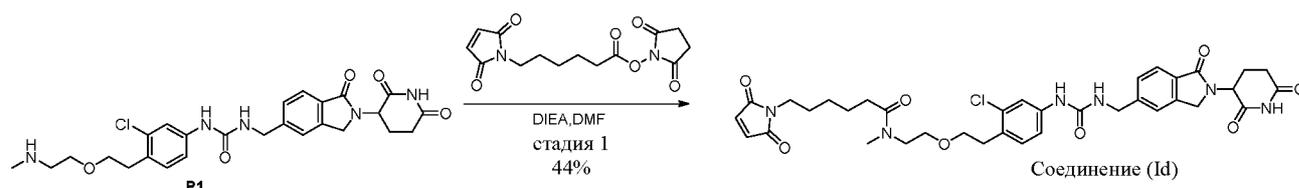


Схема 4. Получение соединения (Id)

Синтез соединения (Id)

[0395] К перемешиваемой смеси 1-(3-хлор-4-[2-[2-(метиламино)этокси]этил]фенил)-3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]мочевины (P1, 40,00 мг, 0,076 ммоль, 1,00 эквив.) и 2,5-диоксопирролидин-1-ил-6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексаноата (25,00 мг, 0,081 ммоль, 1,07 эквив.) в DMF (2,00 мл) добавляли DIEA (20,00 мг, 0,16 ммоль, 2,04 эквив.) по каплям при комнатной температуре.

Полученную смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре в атмосфере азота. Полученную смесь гасили водой (30 мл) и экстрагировали DCM (3 x 30 мл). Объединенные органические слои промывали водой (30 мл), насыщенным соевым раствором (30 мл), сушили над Na₂SO₄. После фильтрации фильтрат концентрировали досуха в вакууме. Остаток очищали с использованием следующих условий: Колонка: SunFire C18 OBD Препарат. колонка, 100 мкм, 19 мм x 250 мм; Мобильная фаза А: вода (0,05% TFA), Мобильная фаза В: ACN; Скорость потока: 25 мл/мин; Градиент: от 25 В до 55 В за 8,5 мин; 220 нм; RT1:8 мин; Собранную фракцию лиофилизировали с получением N-[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]-карбамоил)амино]фенил]этокси)этил]-6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)-N-метилгексанамида (соединение (Id), 24 мг, 43%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС: (ES, м/с): 721,723 (M+H)⁺; ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 10,99 (с, 1H), 8,78 (с, 1H), 7,70-7,66 (м, 2H), 7,51 (с, 1H), 7,41 (д, J = 9,6Гц, 1H), 7,18-7,16 (м, 2H), 7,00 (д, J = 5,6 Гц, 2H), 6,85-6,80 (м, 1H), 5,12-5,05 (м, 1H), 4,42-4,33 (м, 5H), 3,39-3,36 (м, 3H), 2,91-2,76 (м, 7H), 2,68-2,52 (м, 1H), 2,48-2,35 (м, 1H), 2,33-2,20 (м, 3H), 2,05-1,95 (м, 1H), 1,48-1,44 (м, 5H), 1,28-1,12 (м, 3H).

[0396] На схемах 5A и 5B показан способ приготовления комплекса неодагера P1 с альтернативным трипептидным линкером.

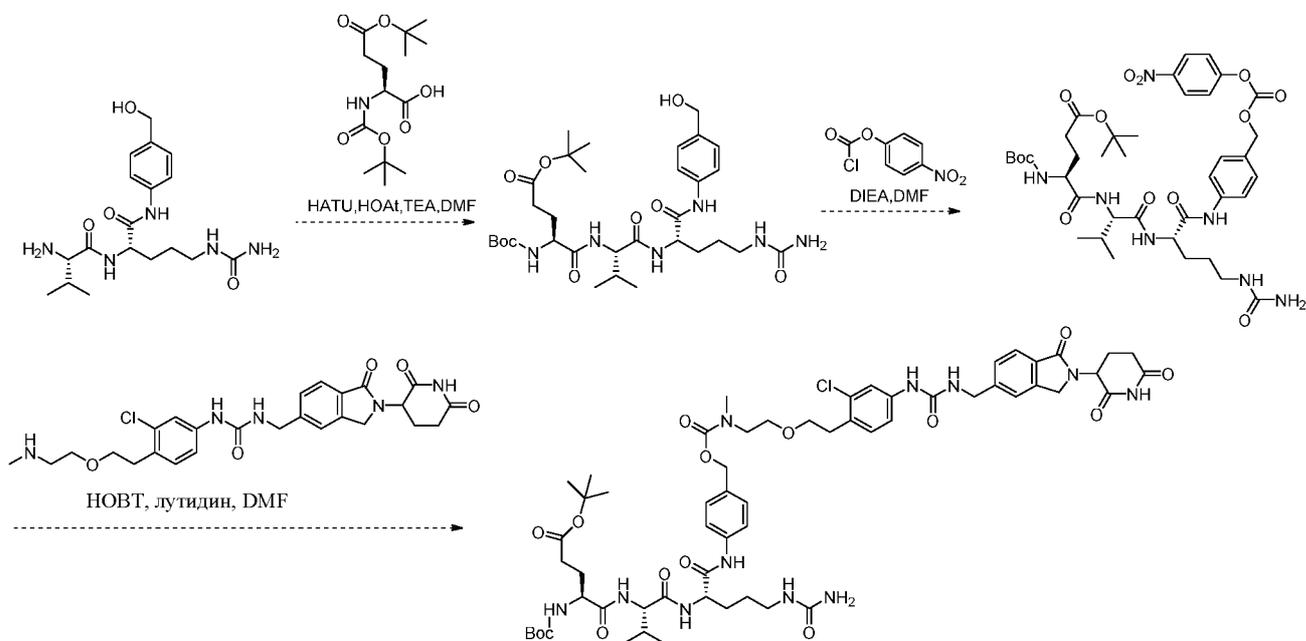


Схема 5A: Синтез комплекса неодагера P1 - трипептидный линкер

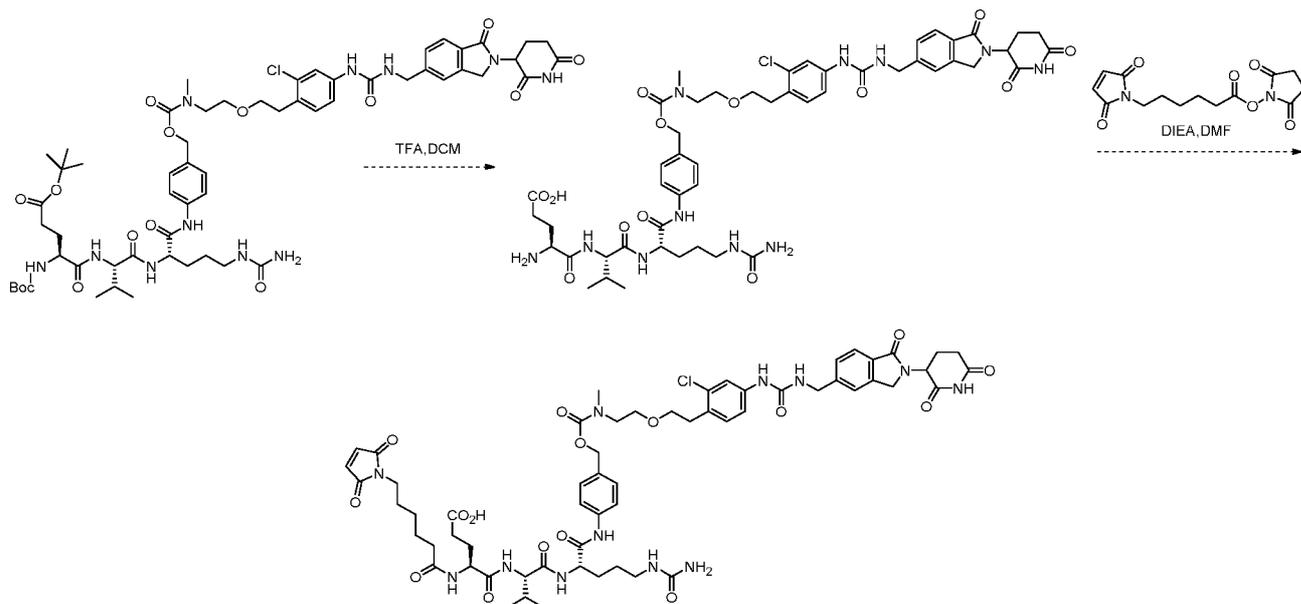


Схема 5В: Синтез комплекса "Неодеградер P1 - трипептидный линкер" (продолжение)

[0397] На схемах 6А и 6В показан способ приготовления комплекса неодеградера P1 с β-глюкуронидным линкером.

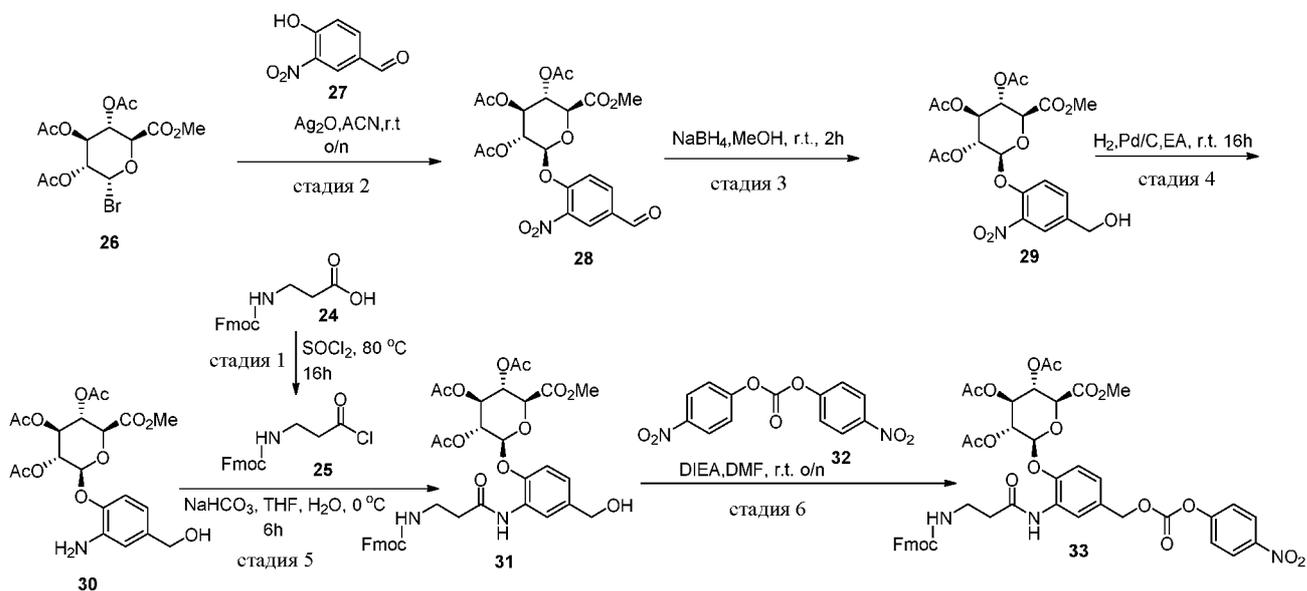


Схема 6А: Синтез комплекса неодеградер P1-β-глюкуронидный линкер

Стадия 1. Синтез соединения 25

[0398] К перемешиваемой смеси 3-[[[9Н-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]-пропановой кислоты (соединение 24, 5,00 г, 16,06 ммоль, 1,00 эквив.) в SOCl₂ (25 мл) при

комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали 16 ч при 80 °С. Желаемый продукт был обнаружен способом ЖХМС (производное с MeOH MS=326). ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь концентрировали в вакууме с получением 9Н-флуорен-9-илметил N-(3-хлор-3-оксопропил)карбамата (соединение 25, 7,5 г, неочищенное) в виде желтого масла. Неочищенный продукт был использован в следующей стадии непосредственно без дополнительной очистки. ¹H-ЯМР-анализ показал, что это желаемый продукт (производное с MeOH). ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 7,81-7,77 (м, 2H), 7,63-7,59 (м, 2H), 7,46-7,40 (м, 2H), 7,40-7,31 (м, 2H), 5,33 (с, 1H), 4,42 (д, J=3,0 Гц, 2H), 4,24 (t, J=6,0 Гц, 1H), 3,74-3,67 (м, 3H), 3,50 (д, J=3,0 Гц, 2H), 2,59 (t, J=6,0 Гц, 2H).

Стадия 2. Синтез соединения 28

[0399] К перемешиваемому раствору 4-формил-2-нитрофенола (соединение 27, 4,21 г, 25,19 ммоль, 1,00 эквив.) и Ag₂O (7,00 г, 30,20 ммоль, 1,20 эквив.) в ACN (100 мл, 190,24 ммоль, 75,00 эквив.) при комнатной температуре под атмосферой N₂ порциями добавляли соединение 26 (10,00 г, 25,17 ммоль, 1,00 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре в атмосфере N₂. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь отфильтровывали, фильтровальную лепешку промывали DCM (50 мл x 3). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя PE/EA (PE:EA=1:2), с получением метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-(4-формил-2-нитрофеноксид)оксан-2-карбоксилата (соединение 28, 10,5 г, 86%) в виде белого твердого вещества. ¹H-ЯМР-анализ показал, что это желаемый продукт. ЖХМС (ES, m/z):484 [M+1]⁺. ¹H-ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 10,00 (с, 1H), 8,34 (с, 1H), 8,13-8,09 (м, 1H), 7,52 (д, J=3,0 Гц, 1H), 5,47-5,29 (м, 4H), 4,37-4,35 (м, 1H), 3,75-3,73 (м, 3H), 2,17-2,06 (м, 9H).

Стадия 3. Синтез соединения 29

[0400] К перемешиваемому раствору метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-(4-формил-2-нитрофеноксид)оксан-2-карбоксилата (соединение 28, 6,00 г, 12,41 ммоль, 1,00 эквив.) в MeOH (50 мл) при RT в атмосфере N₂ порциями добавляли NaBH₄ (0,47 г, 12,42 ммоль, 1,00 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре в атмосфере N₂. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакцию гасили водой при комнатной температуре. Полученную смесь сушили с помощью Na₂SO₄.

Полученную смесь отфильтровывали, фильтровальную лепешку промывали DCM. Полученную смесь концентрировали в вакууме и получили метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[4-(гидроксиметил)-2-нитрофенокси]оксан-2-карбоксилат (соединение 29, 5,5 г, 91%) в виде твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z):486 [M+H]⁺.

Стадия 4. Синтез соединения 30

[0401] К перемешиваемой смеси метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[4-(гидроксиметил)-2-нитрофенокси]оксан-2-карбоксилата (соединение 29, 5,50 г, 11,33 ммоль, 1,00 эквив.) в EA (60 мл) при комнатной температуре порциями добавляли Pd/C (1,10 г, 10%). Полученную смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре в атмосфере N₂. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь отфильтровывали, фильтровальную лепешку промывали DCM и MeOH, фильтрат концентрировали в вакууме с получением метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[2-амино-4-(гидроксиметил)фенокси]оксан-2-карбоксилата (соединение 30, 4,0 г, 77%) в виде твердого вещества. Неочищенный продукт был использован в следующей стадии непосредственно без дополнительной очистки. ЖХМС (ES, m/z):456[M+H]⁺.

Стадия 5. Синтез соединения 31

[0402] К перемешиваемому раствору метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[2-амино-4-(гидроксиметил)фенокси]оксан-2-карбоксилата (соединение 30, 1,00 г, 2,19 ммоль, 1,00 эквив.) и NaHCO₃ (0,20 г, 2,40 ммоль, 1,1 эквив.) в THF (10 мл) добавляли соединение 25 (0,87 г, 2,62 ммоль, 1,20 эквив.) порциями при 0 °C в атмосфере N₂. Полученную смесь перемешивали в течение 6 ч при 0 °C в атмосфере N₂. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакцию гасили водой при комнатной температуре. Полученную смесь экстрагировали DCM. Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя PE/EA (EA=100%), с получением метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[2-(3-[[9H-флуорен-9-илметокси]карбонил]амино]-пропанамидо)-4-(гидроксиметил)фенокси]оксан-2-карбоксилата (соединение 31, 1,1 г, 66%) в виде светло-желтого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z):749 [M+H]⁺.

Стадия 6. Синтез соединения 33

[0403] К перемешиваемой смеси метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[2-(3-[[[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо)-4-(гидроксиметил)фенокси]оксан-2-карбоксилата (соединение 31, 1,50 г, 2,00 ммоль, 1,00 эквив.) и бис(4-нитрофенил)карбоната (соединение 32, 0,68 г, 2,24 ммоль, 1,12 эквив.) в DMF (15 мл) добавляли DIEA (0,52 г, 4,01 ммоль, 2,00 эквив.) порциями при 0 °С под атмосферой N₂. Полученную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре в атмосфере азота. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь очищали способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель С18; подвижная фаза, АСN в воде (0,1% FA), градиент от 10% до 90% за 40 мин; детектор, УФ 254 нм. Собранную фракцию концентрировали досуха в вакууме и получили метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[2-(3-[[[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо)-4-[[[(4-нитрофеноксикарбонил)окси]метил]фенокси]оксан-2-карбоксилат (соединение 33, 1,4 г, 48%) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z):914 [M+H]⁺.

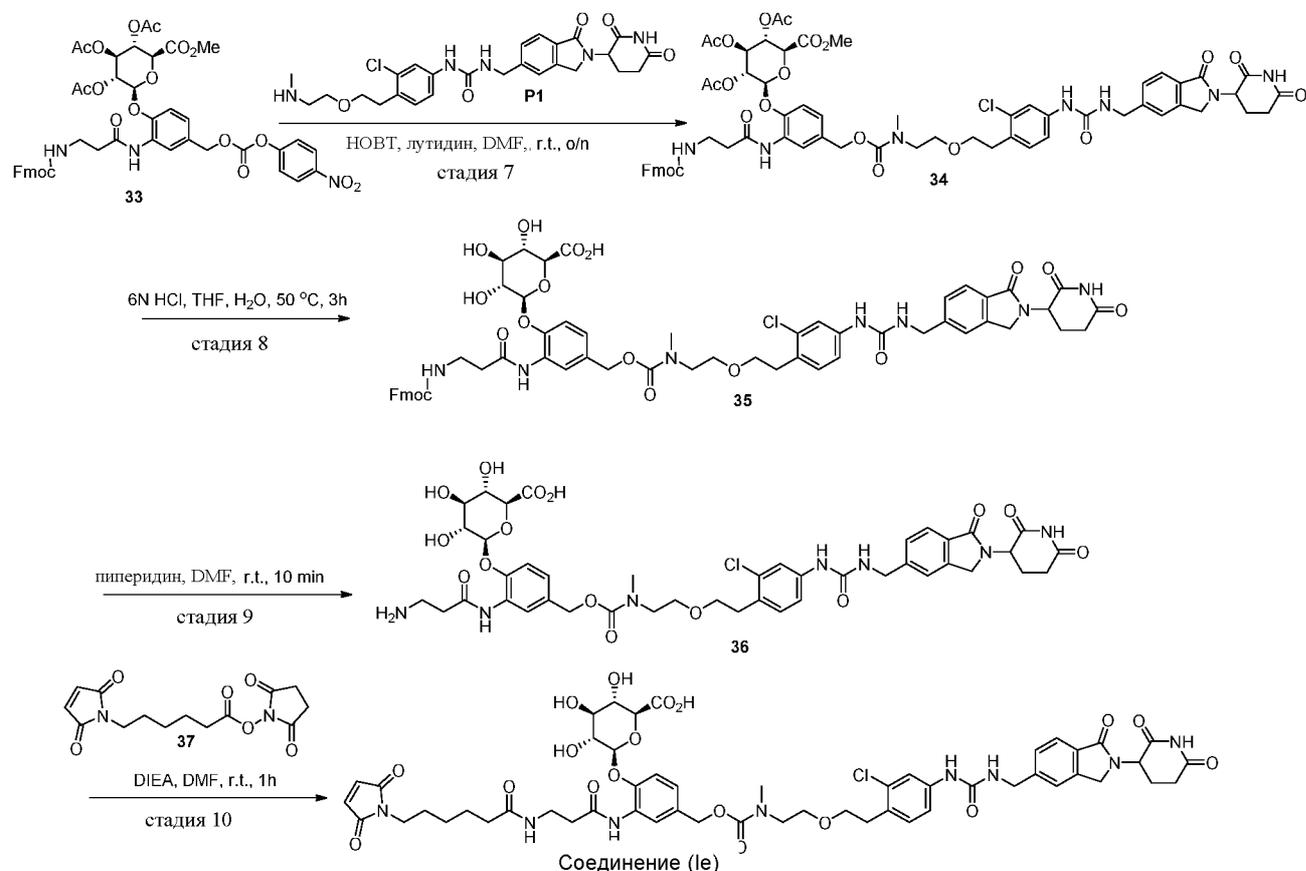


Схема 6В: Синтез комплекса неодеградер P1-β-глюкуронидный линкер

Стадия 7. Синтез соединения 34

[0404] К перемешиваемой смеси метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[2-(3-[[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо)-4-[[4-нитрофеноксикарбонил]окси]метил]фенокси]оксан-2-карбоксилата (соединение 33, 1,00 г, 1,09 ммоль, 1,00 эквив.) и 1-(3-хлор-4-[2-[2-(метиламино)этокси]этил]фенил)-3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]мочевины (неодеградер P1, 0,58 г, 1,09 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (10 мл) добавляли НОВТ (1,18 г, 8,72 ммоль, 8,00 эквив.) и 2,4-диметилпиридин (1,07 г, 8,72 ммоль, 8,00 эквив.) порциями при комнатной температуре под атмосферой N₂. Полученную смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре в атмосфере N₂. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь использовали для дальнейшей очистки. Остаток очищали способом обращенной флэш-хроматографии при следующих условиях: колонка, силикагель С18; подвижная фаза, АСN в воде (0,1% FA), градиент от 10% до 80% за 40 мин; детектор, УФ 254 нм. Собранную фракцию концентрировали в вакууме с получением метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[4-[[[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этокси]этил](метил)карбамоил]окси)метил]-2-(3-[[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо]фенокси]оксан-2-карбоксилата (соединение 34, 800 мг, 56%) в виде твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z):1302[M+H]⁺.

Стадия 8. Синтез соединения 35

[0405] К перемешиваемой смеси метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[4-[[[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этокси]этил](метил)карбамоил]окси)метил]-2-(3-[[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо]фенокси]оксан-2-карбоксилата (соединение 34, 800,00 мг, 0,61 ммоль, 1,00 эквив.) в THF (80 мл) добавляли HCl (6N, 80 мл) порциями при комнатной температуре под атмосферой N₂. Полученную смесь перемешивали в течение 3 ч при температуре 50 °С в атмосфере азота. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Остаток очищали способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель С18; подвижная фаза, АСN в воде (0,1% FA), градиент от 0% до 80% за 40 мин;

детектор, УФ 254 нм. Собранную фракцию лиофилизировали с получением (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[4-[[[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этокси)этил](метил)карбамоил]окси)метил]-2-(3-[[9Н-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо)феноксид]-3,4,5-тригидроксиоксан-2-карбоновой кислоты (соединение 35, 230 мг, 32%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 1162[M+H]⁺.

Стадия 9. Синтез соединения 36

[0406] К перемешиваемому раствору (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[4-[[[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этокси)этил](метил)карбамоил]окси)метил]-2-(3-[[9Н-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо)феноксид]-3,4,5-тригидроксиоксан-2-карбоновой кислоты (соединение 35, 230 мг, 0,2 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (2 мл) добавляли пиперидин (0,4 мл) порциями при комнатной температуре в атмосфере азота. Полученную смесь перемешивали в течение 10 мин при комнатной температуре в атмосфере азота. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь использовали непосредственно для дальнейшей очистки способом препаративной ВЭЖХ со следующими условиями (колонка: XSelect CSH Prep C18 OBD Колонка, 19x250 мм, 5мкм; Мобильная фаза А: вода (0,05% TFA), Мобильная фаза В: ACN; Скорость потока: 25 мл/мин; Градиент: от 20 В до 40 В за 7 мин; 220 нм; RT 1:5,78 мин) с получением (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2-(3-аминопропанамидо)-4-[[[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]-этокси)этил](метил)карбамоил]окси)метил]феноксид]-3,4,5-тригидроксиоксан-2-карбоновой кислоты (соединение 36, 35 мг, 18%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 940[M+H]⁺.

Стадия 10. Синтез соединения (Ie)

[0407] К перемешиваемому раствору (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2-(3-аминопропанамидо)-4-[[[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этокси)этил](метил)карбамоил]окси)метил]феноксид]-3,4,5-тригидроксиоксан-2-карбоновой кислоты (соединение 36, 30 мг, 0,03 ммоль, 1,00

эквив.) в DMF (3 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота порциями добавляли DIEA (13 мг, 0,10 ммоль, 3,00 эквив.) и соединение 37 (30 мг, 0,10 ммоль, 3,00 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре в атмосфере азота. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь очищали способом препаративной ВЭЖХ со следующими условиями (колонка: Xselect CSH OBD Колонка 30 x 150 мм 5мкм, мобильная фаза А:вода (0,1% FA), мобильная фаза В:ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 21 В до 36 В за 10 мин; 220 нм; RT 1:11,15 мин). Собранную фракцию лиофилизировали с получением (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[4-[[[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этокси]этил]-(метил)карбамоил]окси)метил]-2-[3-[6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексанамидо]пропанамидо]фенокси]-3,4,5-тригидроксиоксан-2-карбоновой кислоты (соединение (Ie), 10,5 мг, 28%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z):1133[M+H]⁺. ¹H-ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 10,9 (с, 1H), 9,13 (с, 1H), 8,16 (с, 1H), 7,92-7,68 (м, 4H), 7,52 (с, 1H), 7,44 (д, J=3,0 Гц, 1H), 7,18-6,99 (м, 7H), 5,76 (с, 1H), 5,20-5,10 (м, 2H), 4,98 (шир. с, 2H), 4,76-4,74 (м, 1H), 4,42-4,33 (м, 4H), 3,65 (шир. с, 1H), 3,58-3,54 (м, 5H), 3,35 (д, J=6 Гц, 2H), 2,90-2,83 (м, 7H), 2,57-2,55 (м, 3H), 2,45-2,30 (м, 1H), 2,02-1,98 (м, 4H), 1,48-1,42 (м, 5H), 1,40-1,20 (м, 3H).

[0408] На схеме 7 показан способ получения комплекса неодеградера Р6 с гидразиновым линкером.

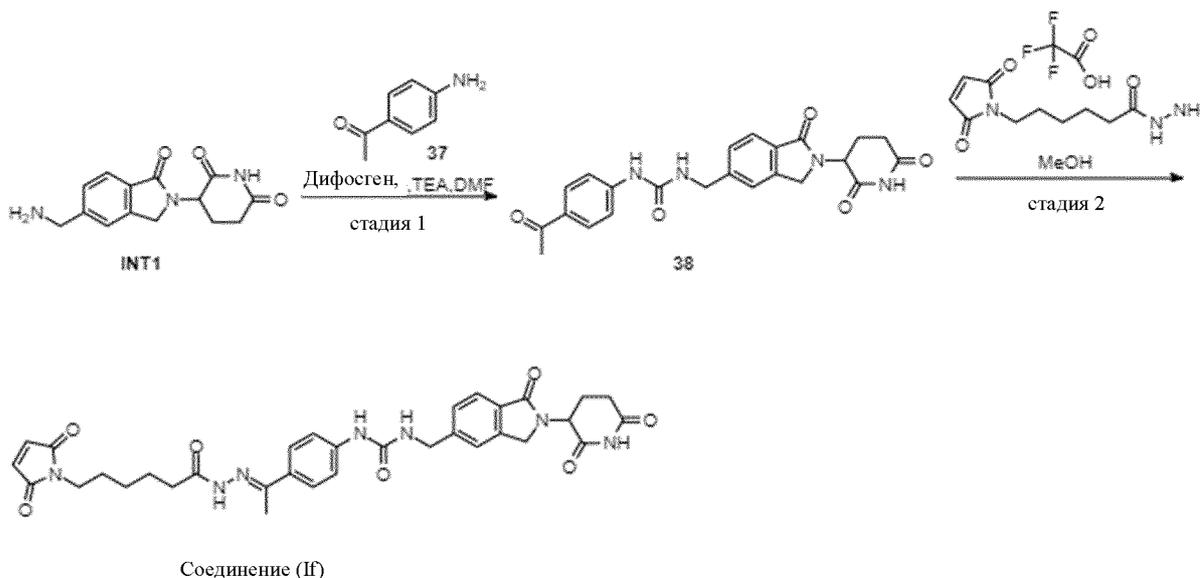


Схема 7. Синтез комплекса неодеградера Р6-гидразиновый линкер

Стадия 1. Синтез соединения 38

[0409] К перемешиваемому раствору 4-аминоацетофенона (соединение 37, 100 мг, 0,73 ммоль, 1,00 эквив.) в THF (2,00 мл) при комнатной температуре по каплям добавляли дифосген (0,40 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 30 мин при 0 °С. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Полученное твердое вещество повторно растворяли в DMF (1,50 мл). К перемешиваемому раствору добавляли 3-[5-(аминометил)-1-оксо-3H-изоиндол-2-ил]пиперидин-2,6-дион (INT1, 200 мг, 0,73 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (3,00 мл) и TEA (0,50 мл) по каплям при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали в течение 1 ч при 0 °С. ЖХМС показала, что реакция завершена. К смеси добавляли воду (5 мл) и экстрагировали CH₂Cl₂ (3x10 мл). Органический слой концентрировали в вакууме. Остаток очищали способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель C18; подвижная фаза, ACN в воде (0,05% TFA), градиент от 10% до 50% за 35 мин; детектор, УФ 254 нм. Собранную фракцию концентрировали досуха с получением 1-(4-ацетилфенил)-3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]мочевины (соединение 38, 80 мг, 25%) в виде светло-желтого твердого вещества. ЖХМС:(ES.m/z):435[M+1]⁺.

Стадия 2. Синтез соединения (If)

[0410] Смесь 1-(4-ацетилфенил)-3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]мочевины (соединение 38, 80,00 мг, 0,18 ммоль, 1,00 эквив.) и 6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексангидразида; трифторуксусную кислоту (75 мг, 1,20 эквив.) в метаноле (5,00 мл) перемешивали в течение ночи при 50°С. Смесь охлаждали до комнатной температуры. ЖХМС показала, что реакция завершена. Выпавшее в осадок твердое вещество было собрано фильтрацией и промыто MeOH (2x5 мл). Неочищенное твердое вещество очищали способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка C18; подвижная фаза, ACN в воде (0,1%FA), градиент от 10% до 50% за 30 мин; детектор, УФ 254 нм. Собранную фракцию экстрагировали DCM (3x5 мл) и концентрировали в вакууме. В результате была получена 3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]-1-[4-[(1E)-1-[[6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексанамидо]имино]этил]фенил]мочевина (соединение (If), 4,4 мг, 3,7%) в виде твердого вещества неопределенного цвета. ЖХМС:(ES.m/z): 642[M+1]⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-

d₆) δ 10,99 (с, 1H), 10,26-10,15 (м, 1H), 8,82 (с, 1H), 7,69-7,62 (м, 3H), 7,52-7,43 (м, 4H), 7,01-6,99 (м, 2H), 5,13-5,09 (м, 1H), 4,42-4,33 (м, 4H), 2,98-2,82 (м, 1H), 2,62-2,58 (м, 2H), 2,20-2,12 (м, 2H), 1,58-1,51 (м, 6H), 1,26-1,09 (м, 6H)

[0411] На схеме 8 показан способ получения комплекса неогдеградера P2 с четвертичным аминовым линкером.

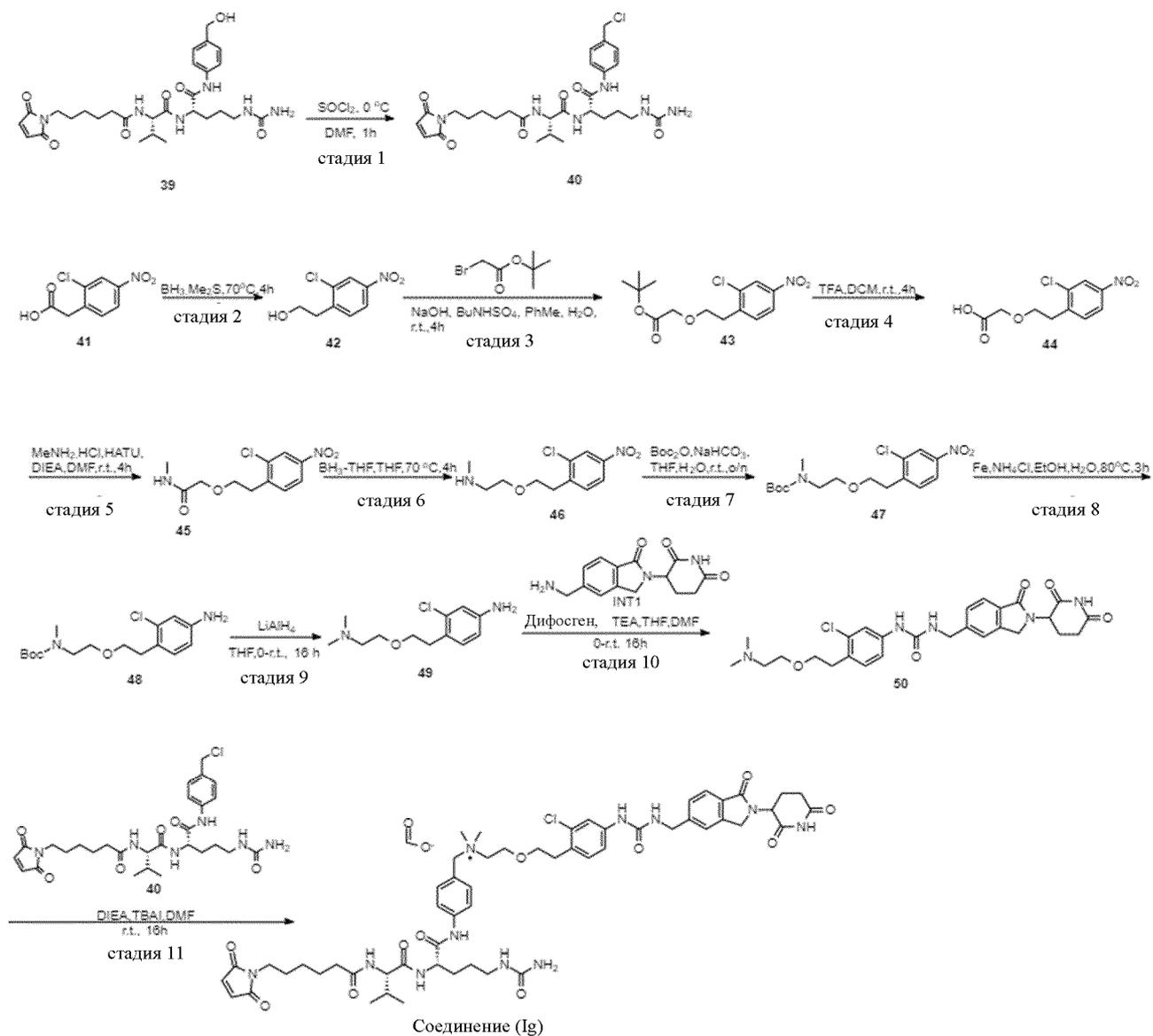


Схема 8. Синтез комплекса неогдеградера P2-четвертичный аминовый линкер

Стадия 1. Синтез соединения 40

[0412] К перемешиваемому раствору N-[(1S)-1-[[[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил]бутил]карбамоил]-2-метилпропил]-6-(2,5-

диоксопиррол-1-ил)гексанамида (соединение 39, 100 мг, 0,100 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (2 мл) добавляли SOCl_2 (20 мг, 0,18 ммоль, 1 эквив.) в DCM (2 мл) по каплям под N_2 при 0°C . Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь разбавляли охлажденной водой со льдом (20 мл), экстрагировали DCM (10 мл*3), объединенный органический слой промывали водой (10 мл), насыщенным солевым раствором (10 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали досуха в вакууме с получением N-[(1S)-1-[[[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[[4-(хлорметил)фенил]-карбамоил]бутил]карбамоил]-2-метилпропил]-6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексанамида (соединение 40, 80 мг, 53%) продукта в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 591,593 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Стадия 2. Синтез соединения 42

[0413] К перемешиваемой смеси (2-хлор-4-нитрофенил)уксусной кислоты (соединение 41, 8,60 г, 39,9 ммоль, 1,00 эквив.) в THF (130 мл) при 0°C по каплям добавляли $\text{NH}_3\text{-Me}_2\text{S}$ (10,00 мл, 105,4 ммоль, 2,64 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение 4 ч при 70°C в атмосфере азота. TLC (PE:EA=1:2) показала, что реакция завершена. Смесь охлаждали до комнатной температуры. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя PE/EtOAc (1:1), с получением 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанола (соединение 42, 7,7 г, 96%) в виде желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,27 (д, $J = 4,0$ Гц, 1H), 8,11-8,07 (м, 1H), 7,53 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 3,99 (т, $J = 8,0$ Гц, 2H), 3,15 (т, $J = 8,0$ Гц, 2H).

Стадия 3. Синтез соединения 43

[0414] К перемешиваемой смеси 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанола (соединение 42, 7,70 г, 38,2 ммоль, 1,00 эквив.) и трет-бутил-2-бromoацетата (57,74 г, 296,0 ммоль, 7,75 эквив.) в толуоле (70 мл) добавляли Cu_4NHSO_4 (10,37 г, 30,6 ммоль, 0,80 эквив.) порциями при 0°C . К полученной смеси добавляли NaOH (15,00 г, 375,0 ммоль, 9,82 эквив.) в H_2O (90 мл) по каплям в течение 30 ч при 0°C . Полученную смесь перемешивали еще 4 ч при комнатной температуре. Полученную смесь экстрагировали EtOAc (3 x 200 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором (200 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 . После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле,

элюируя PE/EtOAc (5:1), с получением трет-бутил-2-[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]ацетата (соединение 43, 12,2 г, 91%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 8,20 (д, $J = 4,0$ Гц, 1H), 8,07-8,03 (м, 1H), 7,61 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H), 4,11 (с, 2H), 3,83 (т, $J = 8,1$ Гц, 2H), 3,16 (т, $J = 8,1$ Гц, 2H), 1,45 (с, 9H).

Стадия 4. Синтез соединения 44

[0415] К перемешиваемой смеси трет-бутил-2-[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]ацетата (соединение 43, 12,20 г, 38,6 ммоль, 1,00 эквив.) в DCM (120 мл) добавляли TFA (20 мл) по каплям при 0 °С. Полученную смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь концентрировали при пониженном давлении. В результате была получена [2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]уксусная кислота (соединение 44, 8,4 г, 83%) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС: (ES, м/с): 517 (2M-H) ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 12,64 (с, 1H), 8,20 (д, $J = 4,0$ Гц, 1H), 8,11-8,08 (м, 1H), 7,72 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 4,06 (с, 2H), 3,74 (т, $J = 8,0$ Гц, 2H), 3,06 (т, $J = 8,0$ Гц, 2H).

Стадия 5. Синтез соединения 45

[0416] К перемешиваемой смеси [2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]уксусной кислоты (соединение 44, 8,40 г, 32,35 ммоль, 1,00 эквив.) и NATU (19,19 г, 50,47 ммоль, 1,56 эквив.) в DMF (80 мл) добавляли $\text{CH}_3\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ (2,69 г, 39,79 ммоль, 1,23 эквив.) и DIEA (17,31 г, 133,93 ммоль, 4,14 эквив.) при 0 °С в атмосфере азота. Полученную смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре в атмосфере азота. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакцию гасили водой/льдом. Полученную смесь экстрагировали DCM (3 x 50 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (50 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 . После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (DCM: MeOH = 10:1), и получили 2-[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]-N-метилацетамид (соединение 45, 7,2 г, 81%) в виде желтого масла. ЖХМС: (ES, м/с): 273,275 (M+H)⁺

Стадия 6. Синтез соединения 46

[0417] К перемешиваемой смеси 2-[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]-N-метилацетамида (соединение 45, 7,20 г, 26,40 ммоль, 1,00 эквив.) в THF (70 мл) при комнатной температуре по каплям добавляли NH_3 -THF (10М в THF, 52,0 мл, 520,0 ммоль, 20 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение 4 ч при температуре 70 °С. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь охлаждали до комнатной температуры. Реакцию гасили с помощью MeOH. Остаток подкисляли до pH 6 1N HCl. Полученную смесь экстрагировали EtOAc (20 мл). Водную фазу доводили до pH 8 насыщенным NaHCO_3 (насыщ., экв.). Полученную смесь экстрагировали EtOAc (3 x 100 мл), промывали насыщенным соевым раствором (50 мл) и сушили над безводным Na_2SO_4 . После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (DCM: MeOH = 8:1), и получили [2-[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]этил](метил)амин (соединение 46, 5,4 г, 79%) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС: (ES, м/с): 259,261 (M+H); ^{13}C ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 8,26 (д, $J = 4,0$ Гц, 1H), 8,15-8,12 (м, 1H), 7,73 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 3,72 (т, $J = 8,0$ Гц, 2H), 3,61 (т, $J = 8,0$ Гц, 2H), 3,10 (т, $J = 8,0$ Гц, 2H), 2,87 (т, $J = 8,0$ Гц, 2H), 2,40 (с, 3H).

Стадия 7. Синтез соединения 47

[0418] К перемешиваемой смеси [2-[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]этил](метил)амин (соединение 46, 4,00 г, 15,46 ммоль, 1,00 эквив.) и Woc_2O (3,80 г, 17,41 ммоль, 1,13 эквив.) в THF (20,00 мл) при комнатной температуре по каплям добавляли NaHCO_3 (4,00 г, 47,61 ммоль, 3,08 эквив.) в H_2O (20,00 мл). Полученную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь экстрагировали EtOAc (3 x 20 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (20 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 . После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (DCM: MeOH = 12:1), получая трет-бутил-N-[2-[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]этил]-N-метилкарбамат (соединение 47, 4,8 г, 77%) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС: (ES, м/с): 359,361 (M+H); ^{13}C ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 8,24 (д, $J = 4,0$ Гц, 1H), 8,13-8,10 (м, 1H), 7,67 (д, $J = 8,0$ Гц, 1H), 4,05-4,00 (м, 1H), 3,69 (т, $J = 8,0$ Гц, 2H), 3,50 (т, $J = 8,0$ Гц, 2H), 3,28 (т, $J = 8,0$ Гц, 2H), 3,07 (т, $J = 8,0$ Гц, 2H), 2,75 (с, 3H), 1,36 (с, 9H).

Стадия 8. Синтез соединения 48

[0419] К перемешиваемой смеси трет-бутил-N-[2-[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]этил]-N-метилкарбамата (соединение 47, 5,60 г, 15,6 ммоль, 1,00 эквив.) в EtOH (112,00 мл) добавляли NH₄Cl (2,50 г, 46,74 ммоль, 2,99 эквив.) в H₂O (12,00 мл) и Fe (4,40 г, 78,79 ммоль, 5,05 эквив.) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали в течение 3 ч при 80 °С. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь охлаждали до комнатной температуры. Полученную смесь концентрировали при пониженном давлении. Полученную смесь экстрагировали DCM (3 x 30 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором (30 мл), сушили над безводным Na₂SO₄. После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (DCM: MeOH = 10:1), и получили трет-бутил-N-[2-[2-(4-амино-2-хлорфенил)этокси]этил]-N-метилкарбамат (соединение 48, 4,2 г, 81%) в виде желтого масла. ЖХМС: (ES, m/z): 329,331 (M+H)⁺; ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 6,96 (д, J = 8,0 Гц, 1H), 6,59 (д, J = 4,0 Гц, 1H), 6,46-6,43 (м, 1H), 5,18 (шир. с, 2H), 3,50-3,45 (м, 4H), 3,29-3,26 (м, 2H), 2,75-2,71 (м, 5H), 1,38 (с, 9H).

Стадия 9. Синтез соединения 49

[0420] К раствору трет-бутил-N-[2-[2-(4-амино-2-хлорфенил)этокси]этил]-N-метилкарбамата (соединение 48, 100 мг, 0,30 ммоль, 1,00 эквив.) в THF (3 мл) при 0 °С в атмосфере азота добавляли LiAlH₄ (92 мг, 2,43 ммоль, 8,00 эквив.) в THF (2 мл). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Все пять реакций проводились параллельно. ЖХМС показала, что реакция завершена. Затем реакционную смесь гасили 1N NaOH (10 мл), фильтровали, концентрировали досуха в вакууме и остаток очищали способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель C18; подвижная фаза, ACN в воде (0,1%FA), градиент от 0% до 60% за 30 мин; детектор, УФ 254 нм. Собранную фракцию концентрировали досуха с получением 3-хлор-4-[2-[2-(диметиламино)этокси]этил]анилина, 49 (180 мг, 44%) в виде желтого масла. ЖХМС (ES, m/z): 243,245 [M+H]⁺

Стадия 10. Синтез соединения 50

[0421] К раствору 3-хлор-4-[2-[2-(диметиламино)этокси]этил]анилина (соединение 49, 140 мг, 0,58 ммоль, 1,00 эквив.) в THF (9 мл) при 0 °С в атмосфере азота добавляли дифосген (137 мг, 0,69 ммоль, 1,20 эквив.). Полученную смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 часа. Затем реакционный раствор концентрировали досуха в вакууме. Остаток повторно растворили в DMF (2 мл) и добавляли в раствор 3-[5-(аминометил)-1-оксо-3Н-изоиндол-2-ил]пиперидин-2,6-диона (158 мг, 0,58 ммоль, 1,00 эквив.) и TEA (117 мг, 1,15 ммоль, 2,00 эквив.) в DMF (4 мл) по каплям под атмосферой азота. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь разбавляли метанолом и очищали полученный раствор способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель С18; подвижная фаза, ACN в воде (0,1%FA), градиент от 0% до 50% за 30 мин; детектор, УФ 254 нм, с получением 100 мг продукта в виде бесцветного твердого вещества. Неочищенный продукт был очищен способом препаративной ВЭЖХ со следующими условиями: колонка: XBridge Shield RP18 OBD Колонка, 19x250 мм, 10мкм; мобильная фаза А: вода (0,1%FA), мобильная фаза В: ACN; скорость потока: 25 мл/мин; градиент: от 14% до 32% за 7 мин; 220 нм; RT1: 5,25 мин. Собранную фракцию лиофилизировали с получением 1-(3-хлор-4-[2-[2-(диметиламино)этокси]этил]фенил)-3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]мочевины (соединение 50, 60 мг, 18%) в виде бесцветного твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 542,544 [M+H]⁺

Стадия 11. Синтез соединения (Ig)

[0422] К раствору N-[(1S)-1-[[[(1S)-4-(карбамоиламино)-1-[[4-(хлорметил)фенил]-карбамоил]бутил]карбамоил]-2-метилпропил]-6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексанамида (соединение 40, 66 мг, 0,11 ммоль, 1,00 эквив.), 1-(3-хлор-4-[2-[2-(диметиламино)этокси]этил]фенил)-3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]мочевины (соединение 50, 60 мг, 0,11 ммоль, 1,00 экв.) и DIEA (29 мг, 0,22 ммоль, 2,00 экв.) в DMF (1 мл) при комнатной температуре на воздухе добавляли TBAI (4 мг, 0,01 ммоль, 0,10 экв.) (1 мл) и DIEA (29 мг, 0,22 ммоль, 2,00 экв.). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Результаты ЖХМС показали, что реакция завершена. Полученную смесь очищали обращенно-фазовой колоночной хроматографией при следующих условиях: колонка, силикагель С18; подвижная фаза, ACN в воде (0,05%TFA), градиент от 5% до 45% за 40 мин; детектор, УФ

254 нм, с получением 90 мг неочищенного продукта в виде желтого масла. Затем неочищенный продукт был повторно очищен по следующей схеме: Колонка: Xselect CSH OBD Колонка 30*150 мм 5мкм, п; Мобильная фаза А: вода (0,1%FA), Мобильная фаза В: ACN; Скорость потока: 60 мл/мин; Градиент: от 15 В до 35 В за 7 мин; 220 нм; RT1:6,00 мин с получением ([4-[(2S)-5-(карбамоиламино)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил]метил)[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил]амино]фенил]этокси)этил]диметилазаниума, соединения (Ig) (19 мг, 14,8%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 1096 [M-FA]⁺, 549 [1/2(M-FA)]; ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃ OD) δ 8,48 (с, 1H), 7,77-7,72 (м, 3H), 7,55 - 7,47 (м, 3H), 7,37-7,35 (д, J = 8,4 Гц, 2H), 7,18 - 7,14 (м, 2H), 6,77 (с, 2H), 5,17-5,13 (q, J = 8,4 Гц, 1H), 4,51-4,46 (м, 5H), 4,35 (с, 2H), 4,12 (д, J = 8,0 Гц, 1H), 3,90 (с, 2H), 3,79 (т, J = 5,6 Гц, 2H), 3,45 (т, J = 7,2 Гц, 4H), 3,22-3,15 (м, 1H), 3,11-3,05 (м, 1H), 3,00 (т, J = 6,0 Гц, 2H), 2,92 (с, 6H), 2,89-2,84 (м, 1H), 2,81-2,73 (м, 1H), 2,54-2,43 (м, 1H), 2,27 (т, J = 7,2 Гц, 2H), 2,21 - 2,12 (м, 1H), 2,10 - 2,02 (м, 1H), 1,95 - 1,82 (м, 1H), 1,78-1,69 (м, 1H), 1,64-1,59 (м, 7H), 1,32-1,25 (м, 2H), 0,98-0,96 (м, 6H).

[0423] На схемах 9А и 9В показан способ приготовления комплекса неодеградера Р13 с пептидсодержащим линкером.

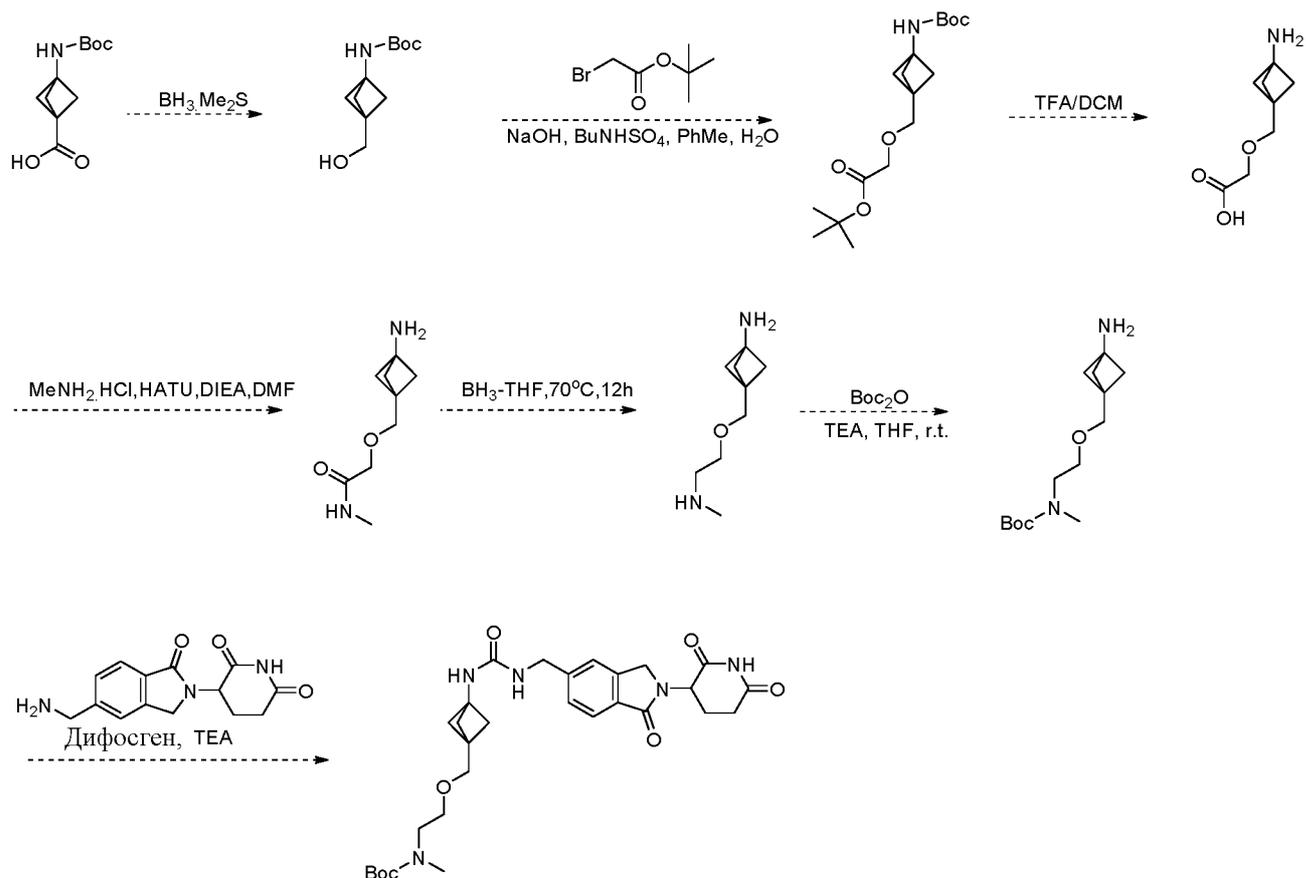


Схема 9А: Синтез комплекса недеградер P13-пептидный линкер

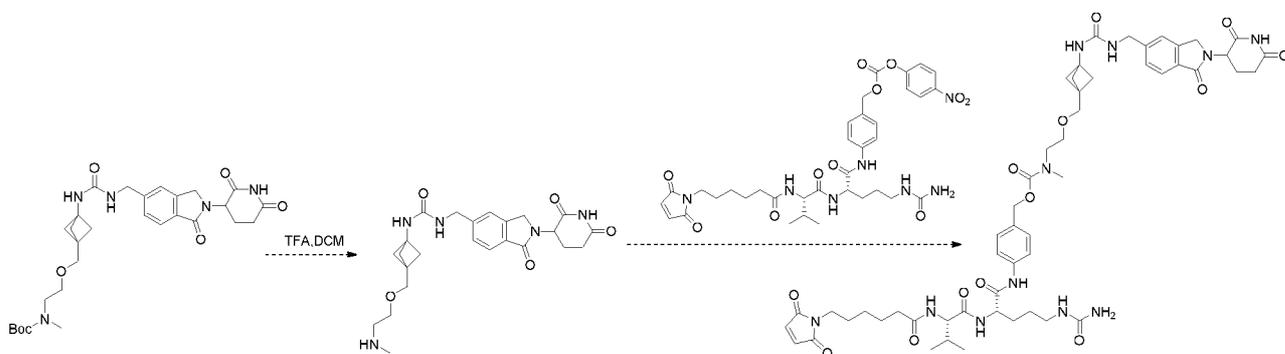


Схема 9В: Синтез комплекса недеградер P13-пептидный линкер

[0424]

На схеме 10 показан синтез соединений формулы (Ih).

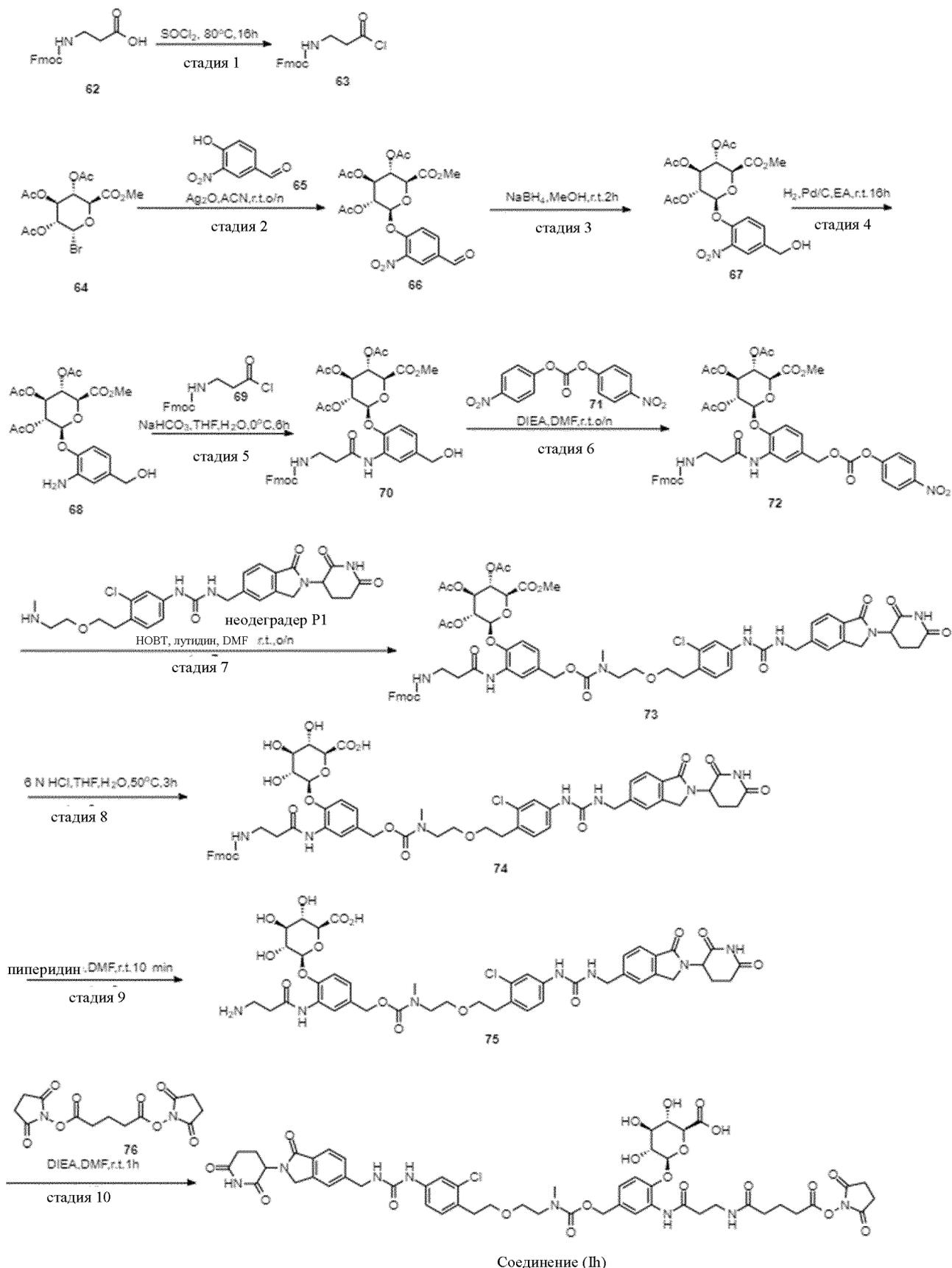


Схема 10: Синтез комплекса неодеградер P1-β-глюкуронидный линкер (соединение (Ih))

Стадия 1. Синтез соединения 63

[0425] К перемешиваемой смеси 3-[[9Н-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропановой кислоты (соединение 62, 5,00 г, 16,06 ммоль, 1,00 эквив.) при комнатной температуре добавляли SOCl_2 (25 мл). Полученную смесь перемешивали 16 ч при 80 °С. Желаемый продукт был обнаружен способом ЖХМС (производное с MeOH MS=326). ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь концентрировали в вакууме с получением 9Н-флуорен-9-илметил N-(3-хлор-3-оксипропил)карбамата (соединение 63, 7,5 г, неочищенное) в виде желтого масла. Неочищенный продукт был использован непосредственно на следующей стадии без дополнительной очистки. ^1H -ЯМР-анализ показал, что это желаемый продукт (производное с MeOH). ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 7,81-7,77 (м, 2H), 7,63-7,59 (м, 2H), 7,46-7,40 (м, 2H), 7,40-7,31 (м, 2H), 5,33 (с, 1H), 4,42 (д, $J=3,0$ Гц, 2H), 4,24 (т, $J=6,0$ Гц, 1H), 3,74-3,67 (м, 3H), 3,50 (д, $J=3,0$ Гц, 2H), 2,59 (т, $J=6,0$ Гц, 2H).

Стадия 2. Синтез соединения 66

[0426] К перемешиваемому раствору 4-формил-2-нитрофенола (соединение 65, 4,21 г, 25,19 ммоль, 1,00 эквив.) и Ag_2O (7,00 г, 30,20 ммоль, 1,20 эквив.) в ACN (100 мл, 190,24 ммоль, 75,00 эквив.) при комнатной температуре в атмосфере N_2 порциями добавляли метил(2S,3S,4S,5R,6R)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-бромоексан-2-карбоксилат (соединение 64, 10,00 г, 25,17 ммоль, 1,00 экв.). Полученную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре в атмосфере N_2 . ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь отфильтровывали, фильтровальную лепешку промывали DCM (50 мл x 3). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя PE/EA (PE:EA=1:2), с получением метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-(4-формил-2-нитрофеноксид)оксан-2-карбоксилата (соединение 66, 10,5 г, 86%) в виде белого твердого вещества. ^1H -ЯМР-анализ показал, что это желаемый продукт. ЖХМС (ES, m/z):484 $[\text{M}+1]^+$. ^1H -ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 10,00 (с, 1H), 8,34 (с, 1H), 8,13-8,09 (м, 1H), 7,52 (д, $J=3,0$ Гц, 1H), 5,47-5,29 (м, 4H), 4,37-4,35 (м, 1H), 3,75-3,73 (м, 3H), 2,17-2,06 (м, 9H).

Стадия 3. Синтез соединения 67

[0427] К перемешиваемому раствору метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-(4-формил-2-нитрофенокси)оксан-2-карбоксилата (соединение 66, 6,00 г, 12,41 ммоль, 1,00 эквив.) в MeOH (50 мл) при комнатной температуре под атмосферой N₂ порциями добавляли NaBH₄ (0,47 г, 12,42 ммоль, 1,00 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре в атмосфере N₂. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакцию гасили водой при комнатной температуре. Полученную смесь высушивали с помощью Na₂SO₄. Полученную смесь отфильтровывали, фильтровальную лепешку промывали DCM. Полученную смесь концентрировали в вакууме с получением метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[4-(гидроксиметил)-2-нитрофенокси]оксан-2-карбоксилата (соединение 67, 5,5 г, 91%) в виде твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z):486 [M+H]⁺.

Стадия 4. Синтез соединения 68

[0428] К перемешиваемой смеси метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[4-(гидроксиметил)-2-нитрофенокси]оксан-2-карбоксилата (соединение 67, 5,50 г, 11,33 ммоль, 1,00 эквив.) в EA (60 мл) при комнатной температуре порциями добавляли Pd/C (1,10 г, 10%). Полученную смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре в атмосфере H₂. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь отфильтровывали, фильтровальную лепешку промывали DCM и MeOH, фильтрат концентрировали в вакууме с получением метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[2-амино-4-(гидроксиметил)фенокси]оксан-2-карбоксилата (соединение 68, 4,0 г, 77%) в виде твердого вещества. Неочищенный продукт был использован в следующей стадии непосредственно без дополнительной очистки. ЖХМС (ES, m/z):456[M+H]⁺.

Стадия 5. Синтез соединения 70

[0429] К перемешиваемому раствору метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[2-амино-4-(гидроксиметил)фенокси]оксан-2-карбоксилата (соединение 68, 1,00 г, 2,19 ммоль, 1,00 эквив.) и NaHCO₃ (0,20 г, 2,40 ммоль, 1,1 эквив.) в THF (10 мл) добавляли 9H-флуорен-9-илметил N-(3-хлор-3-оксопропил)карбамат (соединение 69, 0,87 г, 2,62 ммоль, 1,20 эквив.) порциями при 0° C под атмосферой N₂. Полученную смесь перемешивали в течение 6 ч при 0 °C в атмосфере N₂. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакцию гасили водой при комнатной температуре. Полученную смесь экстрагировали DCM.

Объединенные органические слои концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя PE/EA (EA=100%), с получением метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[2-(3-[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо)-4-(гидроксиметил)фенокси]оксан-2-карбоксилата (соединение 70, 1,1 г, 66%) в виде светло-желтого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 749 [M+H]⁺.

Стадия 6. Синтез соединения 72

[0430] К перемешиваемой смеси метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[2-(3-[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо)-4-(гидроксиметил)фенокси]оксан-2-карбоксилата (соединение 70, 1,50 г, 2,00 ммоль, 1,00 эквив.) и бис(4-нитрофенил)карбоната (соединение 71, 0,68 г, 2,24 ммоль, 1,12 эквив.) в DMF (15 мл) добавляли DIEA (0,52 г, 4,01 ммоль, 2,00 эквив.) порциями при 0 ° C под атмосферой N₂. Полученную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре в атмосфере азота. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь очищали способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель C18; подвижная фаза, ACN в воде (0,1% FA), градиент от 10% до 90% за 40 мин; детектор, УФ 254 нм. Собранную фракцию концентрировали досуха в вакууме и получили метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[2-(3-[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]-амино]пропанамидо)-4-[[4-нитрофеноксикарбонил]окси]метил]фенокси]оксан-2-карбоксилат (соединение 72, 1,4 г, 48%) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 914 [M+H]⁺.

Стадия 7. Синтез соединения 73

[0431] К перемешиваемой смеси метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[2-(3-[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо)-4-[[4-нитрофеноксикарбонил]окси]метил]фенокси]оксан-2-карбоксилата (соединение 72, 1,00 г, 1,09 ммоль, 1,00 эквив.) и 1-(3-хлор-4-[2-[2-(метиламино)этокси]этил]фенил)-3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]мочевины (неодеградер P1, 0,58 г, 1,09 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (10 мл) добавляли НОВТ (1,18 г, 8,72 ммоль, 8,00 эквив.) и 2,4-диметилпиридин (1,07 г, 8,72 ммоль, 8,00 эквив.) порциями при комнатной температуре под атмосферой N₂. Полученную смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной

температуре в атмосфере N₂. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь использовали для дальнейшей очистки. Остаток очищали способом обращенной флэш-хроматографии при следующих условиях: колонка, силикагель С18; подвижная фаза, АСN в воде (0,1% FA), градиент от 10% до 80% за 40 мин; детектор, УФ 254 нм. Собранную фракцию концентрировали в вакууме с получением метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[4-[[[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этокси)этил](метил)карбамоил]окси)метил]-2-(3-[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо)феноксид]оксан-2-карбоксилата (соединение 73 (800 мг, 56%) в виде твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z):1302[M+H]⁺.

Стадия 8. Синтез соединения 74

[0432] К перемешиваемой смеси метил(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-трис(ацетилокси)-6-[4-[[[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этокси)этил](метил)карбамоил]окси)метил]-2-(3-[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо)феноксид]оксан-2-карбоксилата (соединение 73 (800,00 мг, 0,61 ммоль, 1,00 эквив.) в THF (80 мл) добавляли HCl (6N, 80 мл) порциями при комнатной температуре под атмосферой N₂. Полученную смесь перемешивали в течение 3 ч при температуре 50° С в атмосфере азота. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Остаток очищали способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель С18; подвижная фаза, АСN в воде (0,1% FA), градиент 0%-80% за 40 мин; детектор, УФ 254 нм. Собранную фракцию лиофилизировали с получением (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[4-[[[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этокси)этил](метил)карбамоил]окси)метил]-2-(3-[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо)феноксид]-3,4,5-тригидроксиоксан-2-карбоновой кислоты (соединение 74, 230 мг, 32%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z):1162[M+H]⁺.

Стадия 9. Синтез соединения 75

[0433] К перемешиваемому раствору (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[4-[[[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этокси)этил](метил)карбамоил]окси)метил]-2-(3-[[9Н-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо)фенокси]-3,4,5-тригидроксиоксан-2-карбоновой кислоты, 74 (230 мг, 0.2 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (2 мл) добавляли пиперидин (0,4 мл) порциями при комнатной температуре в атмосфере азота. Полученную смесь перемешивали в течение 10 мин при комнатной температуре в атмосфере азота. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь использовали непосредственно для дальнейшей очистки способом препаративной ВЭЖХ со следующими условиями (колонка: XSelect CSH Prep C18 OBD Колонка, 19x250 мм, 5мкм; Мобильная фаза А: вода (0,05%TFA), Мобильная фаза В: ACN; Скорость потока: 25 мл/мин; Градиент: от 20 В до 40 В за 7 мин; 220 нм; RT1:5,78 мин) с получением (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2-(3-аминопропанамидо)-4-[[[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этокси)этил](метил)карбамоил]окси)метил]фенокси]-3,4,5-тригидроксиоксан-2-карбоновой кислоты (соединение 75, 35 мг, 18%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 940[M+H]⁺.

Стадия 10. Синтез соединения (Ih)

[0434] К перемешиваемому раствору (2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2-(3-аминопропанамидо)-4-[[[2-(2-{2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил}этокси)этил](метил)карбамоил]окси)метил]фенокси]-3,4,5-тригидроксиоксан-2-карбоновой кислоты (соединение 75, 110 мг, 0,12 ммоль, 1,00 эквив.) и бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)пентандиоата (соединение 76, 46 мг, 0,14 ммоль, 1,2 эквив.) в DMF (2,0 мл) добавляли DIEA (30 мг, 0,23 ммоль, 2,0 эквив.) порциями при комнатной температуре под атмосферой азота. Полученную смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре в атмосфере азота. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь очищали способом препаративной ВЭЖХ со следующими условиями (колонка: Kinetex EVO prep C18, 30*150, 5мкм; Мобильная фаза А: вода (0,05% TFA), Мобильная фаза В: ACN; Скорость потока: 60 мл/мин; Градиент: от 21% В до 41% В за 7 мин, 41% В; Длина волны: 254 нм; RT1(мин): 5,8. Собранную фракцию лиофилизировали с получением (2S,3S,4S,5R,6S)-6-{4-[[[2-(2-{2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-

ил]метил}карбамоил)амино]фенил}этокси)этил](метил)карбамоил}окси)метил]-2-(3-{5-[(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси]-5-оксопентанамидо}пропанамидо)фенокси}-3,4,5-тригидроксиоксан-2-карбоновой кислоты (соединение (Ih), 48 мг, 34% в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 1151 [M+H]⁺, 1173 [M+Na]⁺. ¹H-ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆): 12,80 (шир, с, 1H), 10,98 (с, 1H), 9,08 (с, 1H), 8,79 (с, 1H), 8,18 (с, 1H), 7,96 (с, 1H), 7,68-7,66 (м, 2H), 7,51 (с, 1H), 7,44 (д, J=8,1 Гц, 1H), 7,25-7,00 (м, 4H), 6,82-6,80 (м, 1H), 5,86 (с, 1H), 5,39-5,30 (м, 2H), 5,14-5,07 (м, 1H), 4,97 (с, 2H), 4,84 (д, J=7,2 Гц, 1H), 4,47-4,27 (м, 4H), 3,90 (д, J=9,6 Гц, 1H), 3,56-3,48 (м, 4H), 3,45-3,36 (м, 6H), 2,95-2,80 (м, 8H), 2,75-2,65 (м, 3H), 2,62-2,55 (м, 2H), 2,49-2,35 (м, 1H), 2,21-2,16 (м, 2H), 2,01-1,95 (м, 1H), 1,85-1,80 (м, 2H).

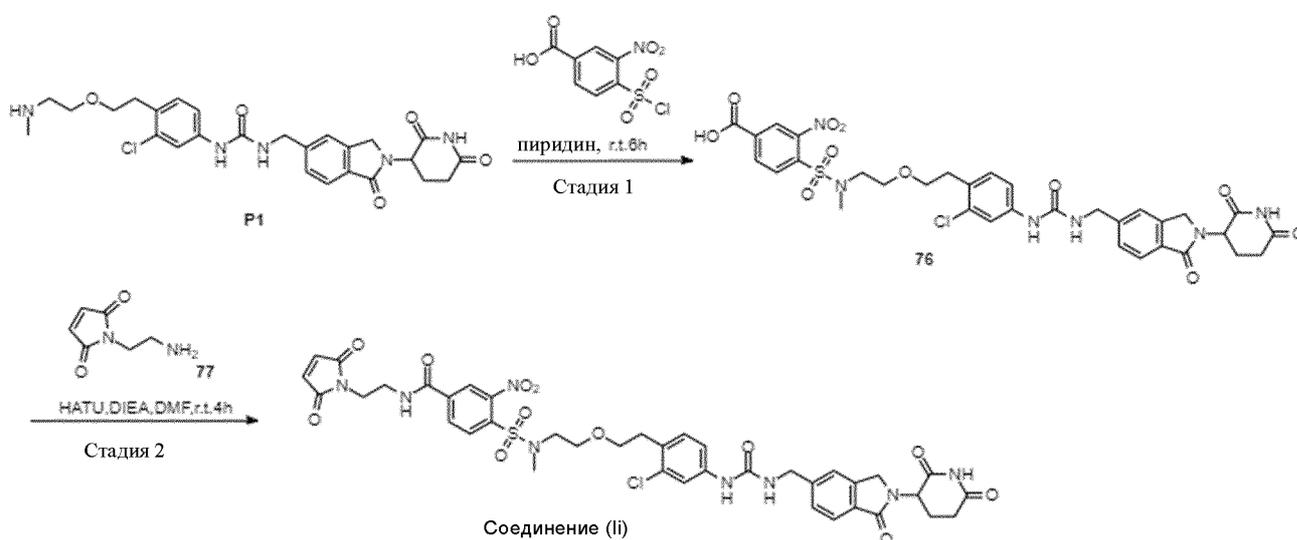


Схема 11: Синтез комплекса неодеградер P1- линкер (соединение (Ii))

Стадия 1. Синтез соединения 76

[0435] К перемешиваемому раствору 1-(3-хлор-4-[2-[2-(метиламино)этокси]этил]фенил)-3-[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]мочевины (соединение P1, 180 мг, 0,34 ммоль, 1,00 экв.) в DMF (8 мл) добавляли ТЕА (104 мг, 1,02 ммоль, 3,0 экв.) и 4-(хлорсульфонил)-3-нитробензойную кислоту (181 мг, 0,68 ммоль, 2,00 экв.) порциями при 0 °С под атмосферой азота. Полученную смесь перемешивали в течение 4 ч при 0 °С в атмосфере азота. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь использовали для дальнейшей очистки. Остаток очищали способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка,

силикагель С18; подвижная фаза, АСН в воде (0,1% FA), градиент от 10% до 60% за 10 мин; детектор, УФ 254 нм. Смесь лиофилизировали с получением 4-[[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этокси]этил](метил)сульфамоил]-3-нитробензойной кислоты, (соединение 76, 70 мг, 27%) в виде светло-желтого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 757 [M+1]⁺.

Стадия 2 Синтез соединения (Ii)

[0436] К перемешиваемой смеси 4-[[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этокси]этил](метил)сульфамоил]-3-нитробензойной кислоты, (соединение 76, 60 мг, 0,08 ммоль, 1,00 экв.) в DMF (6 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота порциями добавляли НАТУ (45 мг, 0,12 ммоль, 1,5 экв.), гидрохлорид 1-(2-аминоэтил)пиррол-2,5-дион (соединение 77, 17 мг, 0,10 ммоль, 1,20 экв.) и DIEA (31 мг, 0,24 ммоль, 3,0 экв.). Полученную смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре в атмосфере азота. ЖХМС показала, что реакция завершена. Остаток очищали способом препаративной ВЭЖХ (колонка: XBridge Prep Phenyl OBD Колонка, 19×150 мм 5мкм 13 нм; мобильная фаза А: вода (0,05% TFA), мобильная фаза В: АСН; скорость потока: 25 мл/мин; градиент: от 25 В до 43 В за 10 мин; 220 нм; RT1: 11,97 мин). Собранную фракцию лиофилизировали с получением 4-[[2-(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этокси]этил](метил)сульфамоил]-N-[2-(2,5-диоксопиррол-1-ил)этил]-3-нитробензамида (соединение (Ii), 27 мг, 36%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 879,881 [M+H]. ¹Н ЯМР (300 МГц, ДМСО-d₆) δ 11,00 (с, 1H), 9,01 (т, $J=6,0$ Гц, 1H), 8,82 (с, 1H), 8,20 (с, 1H), 8,11 (с, 2H), 7,71-7,67 (м, 2H), 7,52 (с, 1H), 7,44 (д, $J=3,0$ Гц, 1H), 7,21-7,12 (м, 2H), 7,02 (с, 2H), 6,84 (т, $J=6,0$ Гц, 1H), 5,14-5,08 (м, 1H), 4,48-4,28 (м, 4H), 3,62-3,50 (м, 6H), 3,40-3,28 (м, 2H), 2,95-2,85 (м, 4H), 2,80-2,73 (м, 2H), 2,65-2,60 (с, 1H), 2,41-2,27 (м, 1H), 2,05-1,95 (м, 1H).

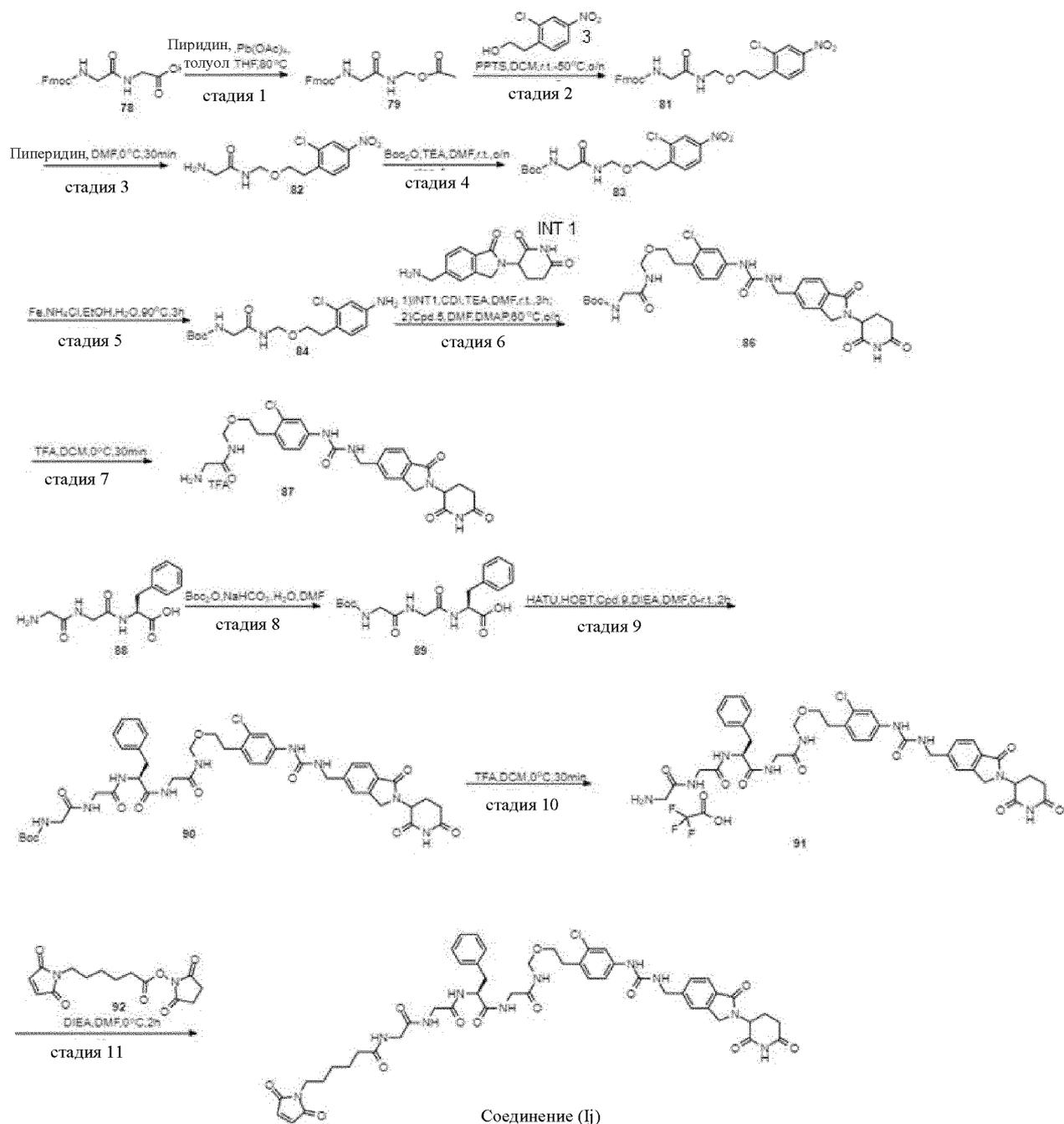


Схема 12: Синтез комплекса неodeградер P1- GGFG линкер (соединение (1j))

Стадия 1. Синтез соединения 79

[0437] К перемешиваемой смеси (2-[[9Н-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]-ацетамидо)уксусной кислоты (соединение 78, 10,00 г, 28,22 ммоль, 1,00 эквив.) и Pb(OAc)₄

(15,02 г, 33,86 ммоль, 1,20 эквив.) в THF (300 мл) и толуоле (100 мл) по каплям при комнатной температуре в атмосфере азота добавляли пиридин (2,59 г, 32,74 ммоль, 1,16 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение ночи при 80 °С в атмосфере азота. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь охлаждали до комнатной температуры. Полученную смесь отфильтровывали и осадок промывали этилацетатом (20 мл). Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток растворяли в этилацетате (20 мл), промывали водой, насыщенным соевым раствором, сушили над безводным Na₂SO₄. После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя PE/EtOAc (1:4), и получили (2-[[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]ацетидамидо)метилацетат (соединение 79, 6,5 г, 56%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ESI, ms): 391[M+Na]⁺. ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 7,80 (д, J=7,5 Гц, 2H), 7,62 (д, J=7,5 Гц, 2H), 7,45 (т, J=7,5 Гц, 2H), 7,36 (д, J=7,5 Гц, 2H), 7,18 (шир, с, 1H), 5,48 (шир, с, 1H), 5,28 (д, J=7,2 Гц, 2H), 4,48 (д, J=6,6 Гц, 2H), 4,26 (т, J=6,6 Гц, 1H), 3,93 (д, 5,4 Гц, 2H), 2,08(с, 3H).

Стадия 2. Синтез соединения 81

[0438] К перемешиваемой смеси (2-[[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]ацетидамидо)метилацетата, 79 (2,00 г, 5,43 ммоль, 1,00 эквив.) и 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанола (соединение 3, 3,20 г, 15,85 ммоль, 2,92 эквив.) в DCM (40 мл) добавляли PPTS (400 мг, 1,59 ммоль, 0,29 эквив.) по каплям при 0°С в атмосфере азота. Полученную смесь перемешивали в течение ночи при 45°С в атмосфере азота. 40% желаемого продукта было обнаружено способом ЖХМС. Смесь охлаждали до комнатной температуры. Реакцию гасили водой/ льдом. Полученную смесь экстрагировали EtOEt (3 x 20 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором (30 мл), сушили над безводным Na₂SO₄. После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя PE/EtOAc (1:9), и получили 9H-флуорен-9-илметил-N-[[[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]метил]карбамоил]метил]карбамат (соединение 81, 1,7 г, 55%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ESI, ms): 510,512[M+H]⁺. ¹H ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆): δ 8,58 (т, J=5,1 Гц, 1H), 8,22 (дд, J=12, 2,4 Гц, 1H), 7,89 (д, J=7,5 Гц, 1H), 7,71-7,54 (м, 4H), 7,43-7,29 (м, 4H), 4,56 (д, J=6,9 Гц, 2H), 4,30-4,16 (м, 3H), 3,70-3,61 (м, 4H), 3,04 (т, J=6,3 Гц, 2H).

Стадия 3. Синтез соединения 82

[0439] К перемешиваемой смеси 9Н-флуорен-9-илметил-N-([2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]метил]карбамоил)метил]карбамата (соединение 81, 1,60 г, 3,14 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (5,0 мл) добавляли пиперидин (1,0 мл) порциями при 0°C под атмосферой азота. Полученную смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре в атмосфере азота. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь очищали способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель С18; подвижная фаза, АСN в воде (0,05% TFA), градиент от 0% до 50% за 40 мин; детектор, УФ 254 нм. В результате был получен 2-амино-N-([2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]метил]ацетамид (соединение 82, 750 мг, 76%) в виде желтого масла. ЖХМС (ESI, ms) 288[M+H]⁺, 329[M+H+ACN]⁺

Стадия 4. Синтез соединения 83

[0440] К перемешиваемой смеси 2-амино-N-([2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]-метил]ацетамида (соединение 82, 750 мг, 2,61 ммоль, 1,00 эквив.) и Вos₂O (580 мг, 2,66 ммоль, 1,02 эквив.) в DMF (10,00 мл) добавляли NaHCO₃ (477 мг, 5,68 ммоль, 2,18 эквив.) в H₂O (10,00 мл) по каплям при 0 °C. Полученную смесь перемешивали в течение 3 ч при комнатной температуре. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакцию гасили добавлением воды (20 мл). Полученную смесь экстрагировали EtOEt (3 x 20 мл). Объединенные органические слои промыли насыщенным солевым раствором (20 мл), высушили над безводным Na₂SO₄. После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя PE/EtOAc (1:2), и получили трет-бутил-N-([2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]метил]карбамоил)метил]карбамат (соединение 83, 650 мг, 58%) в виде желтого масла. ЖХМС (ESI, ms), 388[M+H]⁺, 332[M+H-56]⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,21 (д, J=2,4 Гц, 1H), 8,04 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,46 (д, J=8,4 Гц, 1H), 7,05 (шир, с, 1H), 5,25(шир, с, 1H), 4,73(д, J=7,2Гц, 2H), 3,81-3,73(м, 4H), 3,34-3,32(м, 2H), 3,08(т, J=6,8Гц, 2H), 1,42(с, 9H).

Стадия 5. Синтез соединения 84

[0441] К перемешиваемой смеси трет-бутил-N-([2-(2-хлор-4-нитрофенил)этокси]метил)-карбамоил)метил]карбамата (соединение 83, 650 мг, 1,68 ммоль, 1,00 эквив.) и Fe (260 мг, 4,66 ммоль, 2,78 эквив.) в EtOH (9,00 мл) при комнатной температуре по каплям добавляли NH₄Cl (910 мг, 17,01 ммоль, 10,1 эквив.) в H₂O (3,00 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 4 ч при 90 °С. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь охлаждали до комнатной температуры. Полученную смесь концентрировали в вакууме. Полученную смесь экстрагировали EtOAc (3 x 20 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором (20 мл), сушили над безводным Na₂SO₄. После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя PE/EtOAc (1:1), получая трет-бутил-N-([2-(4-амино-2-хлорфенил)этокси]метил)-карбамоил)метил]карбамат (соединение 84, 500 мг, 83%) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС (ESI, ms): 358[M+H]⁺, 380[M+Na]⁺. ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 7,02-6,96 (м, 2H), 6,68 (д, J=2,4 Гц, 1H), 6,52-6,49 (м, 1H), 5,29 (шир, с, 1H), 4,74 (д, J=6,9 Гц, 2H), 3,80-3,78 (м, 2H), 3,69-3,63 (м, 2H), 2,88 (т, J=7,2 Гц, 2H), 1,45 (с, 9H).

Стадия 6. Синтез соединения 86

[0442] К перемешиваемой смеси гидрохлорида 3-[5-(аминометил)-1-оксо-3H-изоиндол-2-ил]пиперидин-2,6-диона (соединение 85, 398 мг, 1,28 ммоль, 0,92 эквив.) и CDI (450 мг, 2,78 ммоль, 1,99 эквив.) в DMF (5,00 мл) при 0°C был добавлен TEA (300 мг, 2,96 ммоль, 2,12 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. К полученной смеси добавляли трет-бутил-N-([2-(4-амино-2-хлорфенил)этокси]метил)-карбамоил)метил]карбамат (соединение 84, 500 мг, 1,40 ммоль, 1,00 эквив.) и DMAP (550 мг, 4,50 ммоль, 3,22 эквив.) порциями. Полученную смесь перемешивали в течение ночи при температуре 60 °С. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь охлаждали до комнатной температуры. Реакционная смесь была очищена способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель С18; подвижная фаза, ACN в воде (0,1% FA), градиент от 0% до 50% за 30 мин; детектор, УФ 254 нм. В результате был получен трет-бутил N-([2-(2-хлор-4-([2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил)-карбамоил)амино]фенил)этокси]метил]карбамоил)метил]карбамат (соединение 86, 550 мг,

60%) в виде светло-коричневого твердого вещества. ЖХМС (ESI, ms): 657[M+H]⁺, 601[M+H-56]⁺, 557[M+H-100]⁺.

Стадия 7. Синтез соединения 87

[0443] К перемешиваемой смеси трет-бутил N-(((2-[2-хлор-4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил)метил]карбамоил)амино]фенил)этокси)метил]карбамоил)метил)-карбамата (соединение 86, 530 мг, 0,80 ммоль, 1,00 эквив.) в DCM (5,00 мл) добавляли TFA (1,00 мл) при 0°C. Полученную смесь перемешивали в течение 30 мин при 0°C. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь концентрировали при пониженном давлении. В результате был получен 2-амино-N-[(2-[2-хлор-4-(((2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил)метил]карбамоил)амино]фенил)этокси)метил]ацетамид; трифторуксусная кислота (соединение 87, (510 мг, чистота: 64%, выход: 60%) в виде твердого вещества светло-белого цвета. ЖХМС (ESI, ms): 557[M+H-TFA]⁺

Стадия 8. Синтез соединения 89

[0444] К перемешиваемой смеси (2S)-2-[2-(2-аминоацетида)ацетида]-3-фенилпропановой кислоты (соединение 88, 2,00 г, 7,16 ммоль, 1,00 эквив.) и NaHCO₃ (1,80 г, 21,41 ммоль, 3,00 эквив.) в H₂O (40,00 мл) добавляли Вос₂O (1,86 г, 8,52 ммоль, 1,20 эквив.) в DMF (40,00 мл) по каплям при 0°C. Полученную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакцию гасили водой при комнатной температуре. Полученную смесь экстрагировали EtOEt (3 x 50 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором (50 мл), сушили над безводным Na₂SO₄. После фильтрации фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель C18; подвижная фаза, вода ACN (0,05% TFA), градиент от 5% до 60% за 30 мин; детектор, УФ 220 нм. В результате была получена (2S)-2-(2-[2-[(трет-бутоксикарбонил)амино]ацетида]ацетида)-3-фенилпропановая кислота (соединение 89, 1,8 г, 60%) в виде белого полутвердого вещества. ЖХМС (ESI,ms): 380[M+H]⁺, 324[M+H-56]⁺. ¹H ЯМР: (300 МГц, DMSO-d₆) δ 8,17 (д, J=8,1Гц, 1H), 7,9 3(т, J=5,7Гц, 1H), 7,31-7,20 (м, 5H), 7,00 (т, J=6,0 Гц, 1H), 4,46-4,39 (м, 1H), 3,78-3,67 (м, 2H), 3,56 (д, J=5,7 Гц, 2H), 3,09-3,02 (м, 1H), 2,92-2,73 (м, 1H), 1,39 (с, 9H).

Стадия 9. Соединение 90

[0445] К перемешиваемой смеси (2S)-2-(2-[2-[(трет-бутоксикарбонил)амино]ацетамидо]-ацетамидо)-3-фенилпропановой кислоты (соединение 89, 340 мг, 0,90 ммоль, 1,00 эквив.) и HATU (340 мг, 0,90 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (5,00 мл) порциями при 0°C был добавлен НОВТ (102 мг, 0,75 ммоль, 0,84 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение 30 мин при 0°C. К вышеуказанной смеси добавляли 2-амино-N-[(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил]амино]фенил]этоксиметил]ацетамид; трифторуксусную кислоту (соединение 87, 511 мг, чистота: 64%, 0,48 ммоль, 0,54 эквив.) и DIEA (340 мг, 2,63 ммоль, 2,94 эквив.) при 0°C. Полученную смесь перемешивали еще 2 ч при комнатной температуре. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь очищали способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель C18; подвижная фаза, ACN в воде (0,1% FA), градиент от 0% до 50% за 30 мин; детектор, УФ 220 нм. Собранную фракцию концентрировали в вакууме. В результате был получен трет-бутил-N-[[[[(1S)-1-[[[2-(2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил]амино]фенил]этоксиметил]карбамоил]метил]карбамоил]-2-фенилэтил]карбамоил]метил]карбамат (соединение 90, 210 мг, 48%) в виде бесцветного твердого вещества. ЖХМС (ESI, ms): 918[M+H]⁺, 818[M+H-100]⁺. ¹H ЯМР: (400 МГц, DMSO-d₆): δ 10,97(с, 1H), 8,79(с, 1H), 8,50(т, J=6,4 Гц, 1H), 8,31(т, J=4,4 Гц, 1H), 8,15(д, J=9,6 Гц, 1H), 7,910(т, J=8,0 Гц, 1H), 7,68-7,64 (м, 2H), 7,49 (с, 1H), 7,43 (д, J=9,6 Гц, 1H), 7,24-7,12 (м, 7H), 7,00-6,95 (м, 1H), 6,84 (т, J=6,4 Гц, 1H), 5,13-5,06(м, 1H), 4,55-4,27(м, 7H), 3,72-3,60(м, 6H), 3,75-3,67(м, 3H), 3,59-3,49(м, 5H), 3,07-3,01 (м, 1H), 2,94-2,73 (м, 4H), 2,62-2,54 (м, 1H), 2,40-2,31 (м, 1H), 2,01-1,94 (м, 1H), 2,00-1,91 (м, 1H), 1,35 (с, 9H)

Стадия 10. Синтез соединения 91

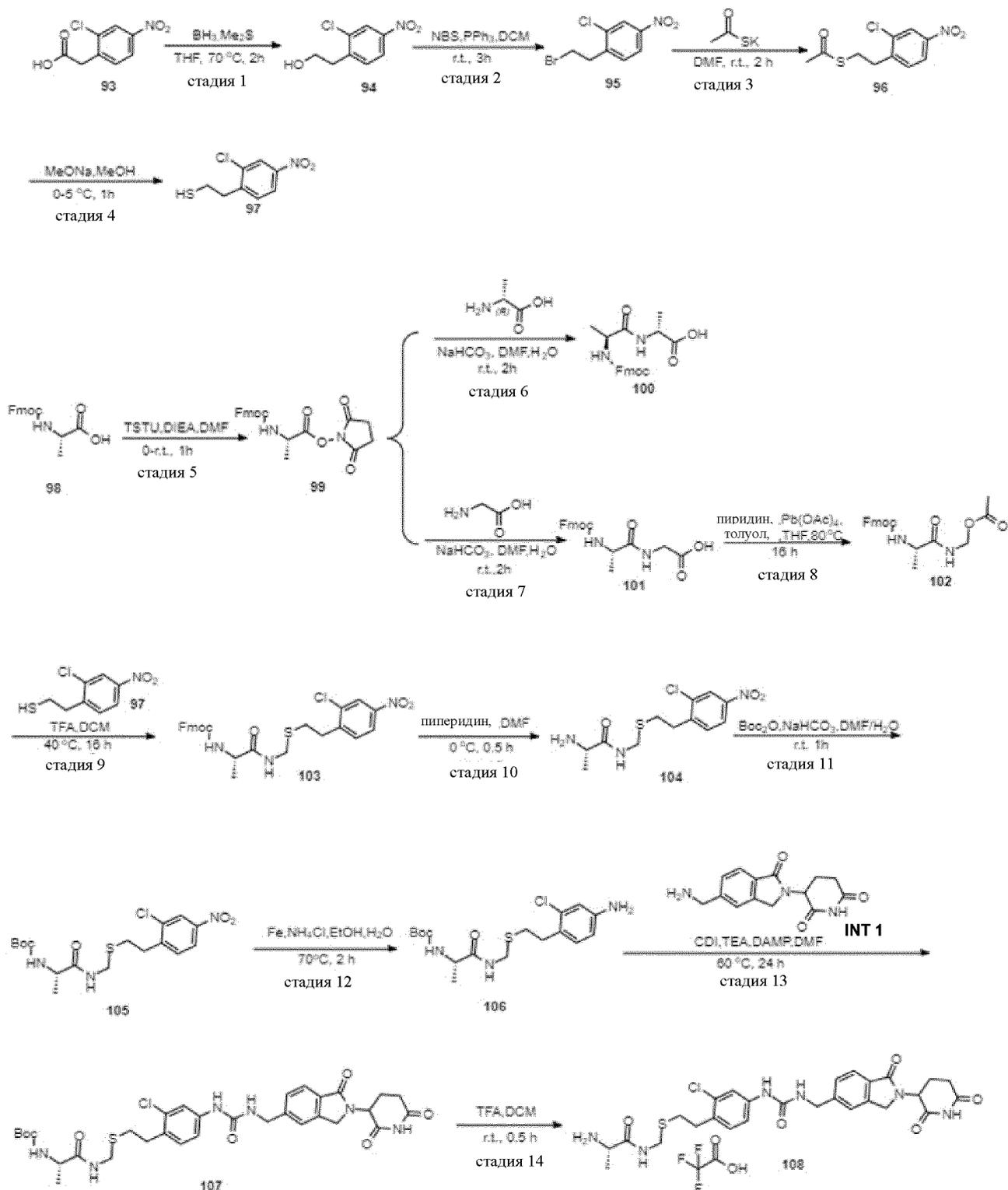
[0446] К перемешиваемой смеси трет-бутил-N-[[[[(1S)-1-[[[2-(2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил]амино]фенил]этоксиметил]карбамоил]метил]карбамоил]-2-фенилэтил]карбамоил]метил]карбамоил]-метил]карбамата (соединение 90, 140 мг, 0,15 ммоль, 1,00 эквив.) в DCM (5,00 мл) добавляли TFA (1,00 мл) по каплям при 0°C. Полученную смесь перемешивали в течение 30 мин при 0°C. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь концентрировали

при пониженном давлении. В результате был получен (2S)-2-[2-(2-аминоацетида)ацетида]-N-([[(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил]амино]фенил]этокси)метил]-карбамоил]метил)-3-фенилпропанамида; трифторуксусная кислота (соединение 91, 140 мг, 79%) в виде бесцветного твердого вещества. ЖХМС (ESI, ms):818[M+H-TFA]⁺.

Стадия 11. Синтез соединения (Ij)

[0447] К перемешиваемой смеси (2S)-2-[2-(2-аминоацетида)ацетида]-N-([[(2-[2-хлор-4-([[(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил]амино]фенил]-этокси)метил]карбамоил]метил)-3-фенилпропанамида; трифторуксусной кислоты (соединение 91, 140 мг, 0,15 ммоль, 1,00 эквив.) и DIEA (70 мг, 0,54 ммоль, 3,61 эквив.) в DMF (2,00 мл) при 0°C порциями добавляли 2,5-диоксопирролидин-1-ил-6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексаноат (соединение 92, 70 мг, 0,23 ммоль, 1,50 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционная смесь была непосредственно очищена по следующей схеме: Колонка: XSelect CSH Prep C18 OBD Колонка, 19x250 мм, 5мкм; Мобильная фаза А: вода (0,1%FA), Мобильная фаза В: ACN; Скорость потока: 25 мл/мин; Градиент: от 25 В до 50 В за 7 мин; 254 нм; RT1: 6,35 мин; Собранная фракция была лиофилизирована с получением неочищенного продукта. Неочищенный продукт был повторно очищен с использованием следующих условий: Колонка: Kinetex EVO C18 Колонка, 30x150,5мкм; Мобильная фаза А: вода (0,05%TFA), Мобильная фаза В: ACN; Скорость потока: 60 мл/мин; Градиент: от 20 В до 40 В за 7 мин, 220 нм; RT1:6,77мин; Собранную фракцию лиофилизировали с получением N-([[(1S)-1-[[[2-(2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил]амино]фенил]этокси)метил]карбамоил]метил]карбамоил]-2-фенилэтил]карбамоил]метил]карбамоил]метил]-6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексанамида (соединение (Ik), 22,8 мг, 14%) в виде бесцветного твердого вещества. ЖХМС (ESI, ms): 1011[M+H]⁺. ¹H ЯМР:(400 МГц, DMSO-d₆): δ 10,95(с, 1H), 8,79(с, 1H), 8,51(т, J=8,4 Гц, 1H), 8,29(т, J=8,0 Гц, 1H), 8,12-8,01(м, 3H), 7,70-7,66(м, 2H), 7,44(с, 1H), 7,42(д, J=8,0 Гц, 1H), 7,23-7,16(м, 7H), 6,99(с, 2H), 6,82(т, J=8,0Гц, 1H), 5,13-5,09(м, 1H), 4,55-4,28 (м, 7H), 3,72-3,60 (м, 6H), 3,55-3,51 (м, 2H), 3,36-3,34 (м, 2H), 3,05-3,00 (м, 1H), 2,94-2,72 (м, 4H), 2,62-

2,54 (м, 1H), 2,40-2,32 (м, 1H), 2,12-2,05 (м, 2H), 2,00-1,91 (м, 1H), 1,50-1,38 (м, 4H), 1,19-1,10 (м, 2H)



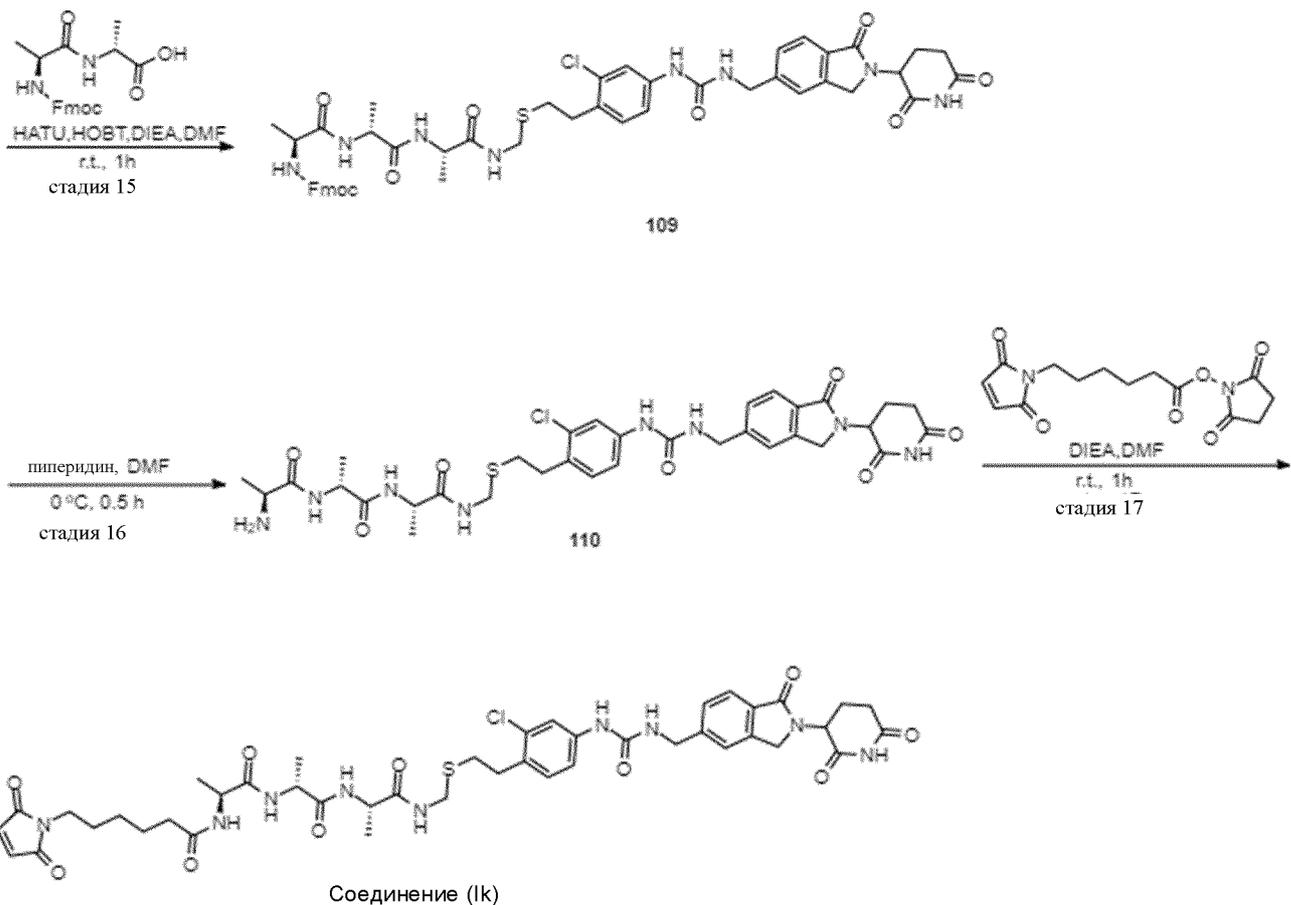


Схема 13: Синтез комплекса неогдеградер P14 – ААА линкер (соединение (Ik))

Стадия 1. Синтез соединения 94

[0448] К перемешиваемому раствору (2-хлор-4-нитрофенил)уксусной кислоты (соединение 93, 24,00 г, 111,32 ммоль, 1,00 эквив.) в THF (240,00 мл) по каплям добавляли $\text{NH}_3\text{-Me}_2\text{S}$ (28,00 мл, 295,23 ммоль, 2,65 эквив.) под атмосферой азота. Полученную смесь перемешивали в течение 2 часов при температуре 70°C в атмосфере азота. TLC (PE: EtOAc = 3:1) показала, что реакция завершена. После охлаждения до комнатной температуры полученную смесь концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя РЭ/ EtOAc (3:1), с получением 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанола (соединение 94, 18,00 г, 80%) в виде светло-желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3) δ 8,27 (с, 1H), 8,10-8,07 (м, 1H), 7,52 (д, $J = 3$ Гц, 1H), 3,96 (т, $J = 6$ Гц, 2H), 3,13 (т, $J = 6$ Гц, 2H).

Стадия 2. Синтез соединения 95

[0449] К перемешиваемому раствору 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанола (соединение 94, 5,00 г, 24,80 ммоль, 1,00 эквив.) в DCM (100,00 мл) добавляли NBS (6,62 г, 1,50 эквив.) и PPh₃ (9,76 г, 37,21 ммоль, 1,50 экв.) порциями при комнатной температуре в атмосфере N₂. Полученную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре под N₂. TLC (PE: EtOAc = 10:1) показала, что реакция завершена. Реакционную смесь концентрировали досуха в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя PE/ EtOAc (4:1), получая 1-(2-бромэтил)-2-хлор-4-нитробензол (соединение 95, 5,10 г, 72%) в виде красного масла. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 8,28 (д, J = 2,4 Гц, 1H), 8,18 (дд, J = 8,4, 2,4 Гц, 1H), 7,73 (д, J = 8,4 Гц, 1H), 3,79 4(т, J = 6,8 Гц, 2H), 3,38 (т, J = 6,8 Гц, 2H).

Стадия 3. Синтез соединения 96

[0450] К раствору 1-(2-бромэтил)-2-хлор-4-нитробензола (соединение 95, 5,00 г, 18,90 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (50,00 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота добавляли тиоацетат калия (2,16 г, 18,90 ммоль, 1,00 эквив.). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. TLC (PE: EtOAc = 10:1) показала, что реакция завершена. Реакционную смесь разбавляли водой (600,00 мл) и экстрагировали EtOAc (2000 мл x 3). Объединенный органический слой промывали водой (200,00 мл), насыщенным солевым раствором (200,00 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали досуха в вакууме, получая 1-[[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]этенон (соединение 96, 4,50 г, 85%) в виде красного масла. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,24 (д, J = 2,4 Гц, 1H), 8,07 (дд, J = 8,4, 2,4 Гц, 1H), 7,45 (д, J = 8,4 Гц, 1H), 3,20 - 3,05 (м, 4H), 2,34 (с, 3H).

Стадия 4. Синтез соединения 97

[0451] К перемешиваемому раствору 1-[[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]этенона (соединение 96, 2,00 г, 7,70 ммоль, 1,00 эквив.) в MeOH (300,00 мл) добавляли MeONa (6,93 мл, 37,33 ммоль, 5,00 экв., 30% в MeOH) при 0 °C в атмосфере N₂. Полученную смесь перемешивали при 0° C под N₂ в течение 1 ч. TLC (PE: EtOAc =10:1) показала, что реакция завершена. Реакцию гасили AcOH до значения pH 3-4. Полученную смесь концентрировали досуха в вакууме. Остаток разбавляли DCM (50,00

мл) и фильтровали. Фильтрат очищали способом препаративной TLC (PE: EtOAc = 10:1) с получением 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанэтиола (соединение 97, 1,35 г, 72%) в виде светло-желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,26 (д, $J = 2,4$ Гц, 1H), 8,09 (дд, $J = 8,4, 2,4$ Гц, 1H), 7,45 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 3,14 (т, $J = 8,0$ Гц, 2H), 2,85 (дт, $J = 8,0, 7,2$ Гц, 2H), 1,43 (т, $J = 7,2$ Гц, 1H).

Стадия 5. Синтез соединения 99

[0452] К перемешиваемому раствору (2S)-2-[[$(9\text{H-флуорен-9-илметокси})$ карбонил]амино]пропановой кислоты (соединение 98, 20,00 г, 64,24 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (200,00 мл) при комнатной температуре в атмосфере воздуха добавляли TSTU (25,18 г, 83,52 ммоль, 1,30 эквив.) и DIEA (16,60 г, 128,48 ммоль, 2,00 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь разбавляли водой (200,00 мл), экстрагировали EtOAc (100,00 мл x 3). Объединенный органический слой промывали водой (100,00 мл), насыщенным соевым раствором (100,00 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали досуха в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (PE: EtOAc = 1:2), получая 2,5-диоксопирролидин-1-ил (2S)-2-[[$(9\text{H-флуорен-9-илметокси})$ карбонил]амино]пропаноат (соединение 99, 25,00 г, 83%) т в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 431 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Стадия 6. Синтез соединения 100

[0453] К раствору D-аланина (1,09 г, 0,012 ммоль, 1,00 эквив.) и NaHCO_3 (3,09 г, 0,04 ммоль, 3,00 эквив.) в воде (50,00 мл) добавляли раствор 2,5-диоксопирролидин-1-ил (2S)-2-[[$(9\text{H-флуорен-9-илметокси})$ карбонил]амино]пропаноата (соединение 99, 5,00 г, 12,24 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь доводили до значения pH 2-3 с помощью 2 N HCl. Полученную смесь экстрагировали EtOAc (100,00 мл x 3), объединенный органический слой промывали насыщенным соевым раствором (100,00 мл x 3), сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали досуха в вакууме с получением (2R)-2-[(2S)-2-[[$(9\text{H-флуорен-9-илметокси})$ карбонил]-амино]пропанамидо]пропановой кислоты (соединение 100, 4,00 г, 71%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 383 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Стадия 7. Синтез соединения 101

[0454] К раствору глицина (3,68 г, 48,97 ммоль, 1,00 эквив.) и NaHCO_3 (12,34 г, 146,89 ммоль, 3,00 эквив.) в воде (200,00 мл) добавляли раствор 2,5-диоксопирролидин-1-ил (2S)-2-[[[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропаноата (соединение 99, 20,00 г, 48,97 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь доводили до значения pH 2-3 с помощью 2 N HCl. Полученную смесь экстрагировали EtOAc (500,00 мл \times 3), объединенный органический слой промывали насыщенным соевым раствором (500,00 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали досуха в вакууме с получением [(2S)-2-[[[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо]уксусной кислоты (соединение 101, 15,00 г, 71%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 369 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Стадия 8. Синтез соединения 102

[0455] Раствор [(2S)-2-[[[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо]уксусной кислоты (соединение 101, 5,00 г, 13,57 ммоль, 1,00 эквив.), $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ (7,22 г, 16,28 ммоль, 1,20 эквив.) и пиридина (1,29 г, 16,31 ммоль, 1,20 эквив.) в THF (300,00 мл)/толуоле (100,00 мл) под N_2 перемешивали при 80° C в течение 16 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь отфильтровали. Осадок промывали THF (100,00 мл). Объединенный органический слой концентрировали досуха в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (PE: EtOAc=1:2), с получением [(2S)-2-[[[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо]метилацетата (соединение 102, 2,50 г, 45%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 405 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. ^1H ЯМР (400 МГц, хлороформ- d) δ 7,77 (т, $J = 7,6$ Гц, 2H), 7,58 (д, $J = 7,6$ Гц, 2H), 7,43 - 7,37 (м, 2H), 7,36 - 7,29 (м, 2H), 7,10 (с, 1H), 5,24 (д, $J = 7,6$ Гц, 2H), 4,51 - 4,35 (м, 2H), 4,23-4,09 (м, 2H), 2,04 (с, 3H), 1,39 (д, $J = 6,8$ Гц, 3H).

Стадия 9. Синтез соединения 103

[0456] К перемешиваемому раствору [(2S)-2-[[[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]-пропанамидо]метилацетата (соединение 102, 2,25 г, 5,88

ммоль, 1,00 эквив.) и 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанэтиола (соединение 97, 1,28 г, 5,88 ммоль, 1,00 эквив.) в DCM (120 мл) добавляли TFA (0,27 мл, 2,37 ммоль, 0,62 эквив.) под N₂ при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь концентрировали досуха в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (PE: EtOAc=1:4), с получением 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-([(2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил)сульфанил]метил)карбамоил]этил]карбамата (соединение 103, 3,10 г, 90%) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 540 [M+H]⁺

Стадия 10. Синтез соединения 104

[0457] К раствору 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-([(2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил)сульфанил]метил)карбамоил]этил]карбамата (соединение 103, 3,10 г, 5,74 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (155,00 мл) добавляли пиперидин (31,00 мл) при 0 °С под N₂. Полученную смесь перемешивали при 0 °С в течение 0,5 ч под N₂. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь разбавляли водой (600,00 мл). Полученную смесь экстрагировали EtOAc (200,00 млx3). Объединенный органический слой промывали насыщенным солевым раствором (200,00 мл), высушивали над безводным Na₂SO₄ и сконцентрировали досуха в вакууме с получением 3,00 г неочищенного продукта. Неочищенный продукт был повторно очищен колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (DCM: MeOH =3: 1) с получением (2S)-2-амино-N-([(2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил)сульфанил]метил]пропенамида, 104 (1,50 г, 78%) в виде желтого масла. ЖХМС (ES, m/z): 318 [M+H]⁺.

Стадия 11. Синтез соединения 105

[0458] К раствору (2S)-2-амино-N-([(2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил)сульфанил]метил]-пропенамида (соединение 104, 1,50 г, 4,72 ммоль, 1,00 экв.) в DMF (75,00 мл) добавляли раствор NaHCO₃ (0,59 г, 7,08 ммоль, 1,50 эквив.) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь разбавляли водой (500,00 мл), экстрагировали EtOAc (200,00 млx3). Объединенный органический слой промывали насыщенным солевым раствором (200,00 мл x 3), сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали досуха в вакууме с получением трет-бутил-N-[(1S)-1-([(2-(2-хлор-4-

нитрофенил)этил]сульфанил]метил]карбамоил]этил]карбамата (соединение 105, (1,82 г, 83) в виде красного масла. ЖХМС (ES, m/z): 418 [M+H]⁺, 318 [M+H-100]⁺

Стадия 12. Синтез соединения 106

[0459] Суспензию трет-бутил-N-[(1S)-1-([2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил)-метил]карбамоил]этил]карбамата (соединение 105, 1,82 г, 4,36 ммоль, 1,00 эквив.), железного порошка (2,43 г, 0,04 ммоль, 10,00 эквив.) и NH₄Cl (2,33 г, 0,04 ммоль, 10,00 эквив.) в EtOH (100,00 мл)/H₂O (50,00 мл) перемешивали при 70° С в течение 2 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь отфильтровали. Фильтрат концентрировали досуха в вакууме. Остаток растворяли в DCM (50,00 мл) и фильтровали. Фильтрат концентрировали досуха, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (DCM: MeOH = 13: 1), получая трет-бутил-N-[(1S)-1-([2-(4-амино-2-хлорфенил)этил]сульфанил)метил]карбамоил]этил]-карбамат (соединение 106, 1,20 г, 68%) в виде желтого масла. ЖХМС (ES, m/z): 388 [M+H]⁺

Стадия 13. Соединение 107

[0460] К перемешиваемому раствору 3-[5-(аминометил)-1-оксо-3H-изоиндол-2-ил]пиперидин-2,6-диона (INT 1, 352 мг, 1,29 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (5,00 мл) при 0° С добавляли CDI (209,00 мг, 1,29 ммоль, 1 эквив.) и TEA (260 мг, 2,58 ммоль, 2 эквив.). Полученную смесь перемешивали при 0° С в течение 2 ч. Затем добавляли трет-бутил-N-[(1S)-1-([2-(4-амино-2-хлорфенил)этил]сульфанил)-метил]-карбамоил]этил]карбамат (соединение 106, 500,00 мг, 1,29 ммоль, 1,00 эквив.) и DMAP (472 мг, 3,87 ммоль, 3,00 эквив.). Полученную смесь перемешивали при 60° С в течение 24 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. После охлаждения до комнатной температуры реакционная смесь была очищена способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель C18; подвижная фаза, ACN в воде (0,1%FA), градиент от 0% до 60% за 30 мин; детектор, УФ 254 нм, с получением трет-бутил-N-[(1S)-1-([2-[2-хлор-4-([2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этил]сульфанил]метил]карбамоил]этил]карбамата (соединение 107, 450,00 мг, 48%) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 687 [M+H]⁺

Стадия 14. Соединение 108

[0461] К перемешиваемому раствору трет-бутил-N-[(1S)-1-([(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил]амино]фенил]этил)сульфанил]-метил]карбамоил)этил]карбамата (соединение 107, 440.00 мг, 0,64 ммоль, 1,00 эквив.) в DCM (22,00 мл) добавляли TFA (2,20 мл) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 0,5 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь концентрировали досуха в вакууме с получением (2S)-2-амино-N-[(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил]амино]фенил]этил)сульфанил]-метил]пропанамида; трифторуксусной кислоты (соединение 108, 400,00 мг, неочищенное) в виде красного масла. Остаток использовали для следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХМС (ES, *m/z*): 587 [M+H-TFA]⁺

Стадия 15. Синтез соединения 109

[0462] Раствор (2R)-2-[(2S)-2-[[[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]-амино]пропанамидо]пропановой кислоты (218 мг, 0,57 ммоль, 1,00 эквив.), НОВТ (77 мг, 0,57 ммоль, 1,00 эквив.) и НАТУ (216 мг, 0,01 ммоль, 1,00 эквив.) перемешивали при комнатной температуре на воздухе в течение 1 часа, затем (2S)-2-амино-N-[(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил]амино]фенил]этил)сульфанил]метил]пропанамида; трифторуксусная кислота (соединение 108, 400 мг, 0,57 ммоль, 1,00 эквив.) и DIEA (663 мг, 5,14 ммоль, 9,00 эквив.) добавляли при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционная смесь была очищена способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель C18; подвижная фаза, ACN в воде (0.05%TFA), градиент от 0% до 50% за 30 мин; детектор, УФ 254 нм для получения 9H-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1R)-1-[(1S)-1-[(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил]амино]фенил]этил)сульфанил]метил]карбамоил)этил]карбамоил)этил]

]карбамата (соединение 109, 480.00 мг, 75%) в виде зеленого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 951 [M+H]⁺

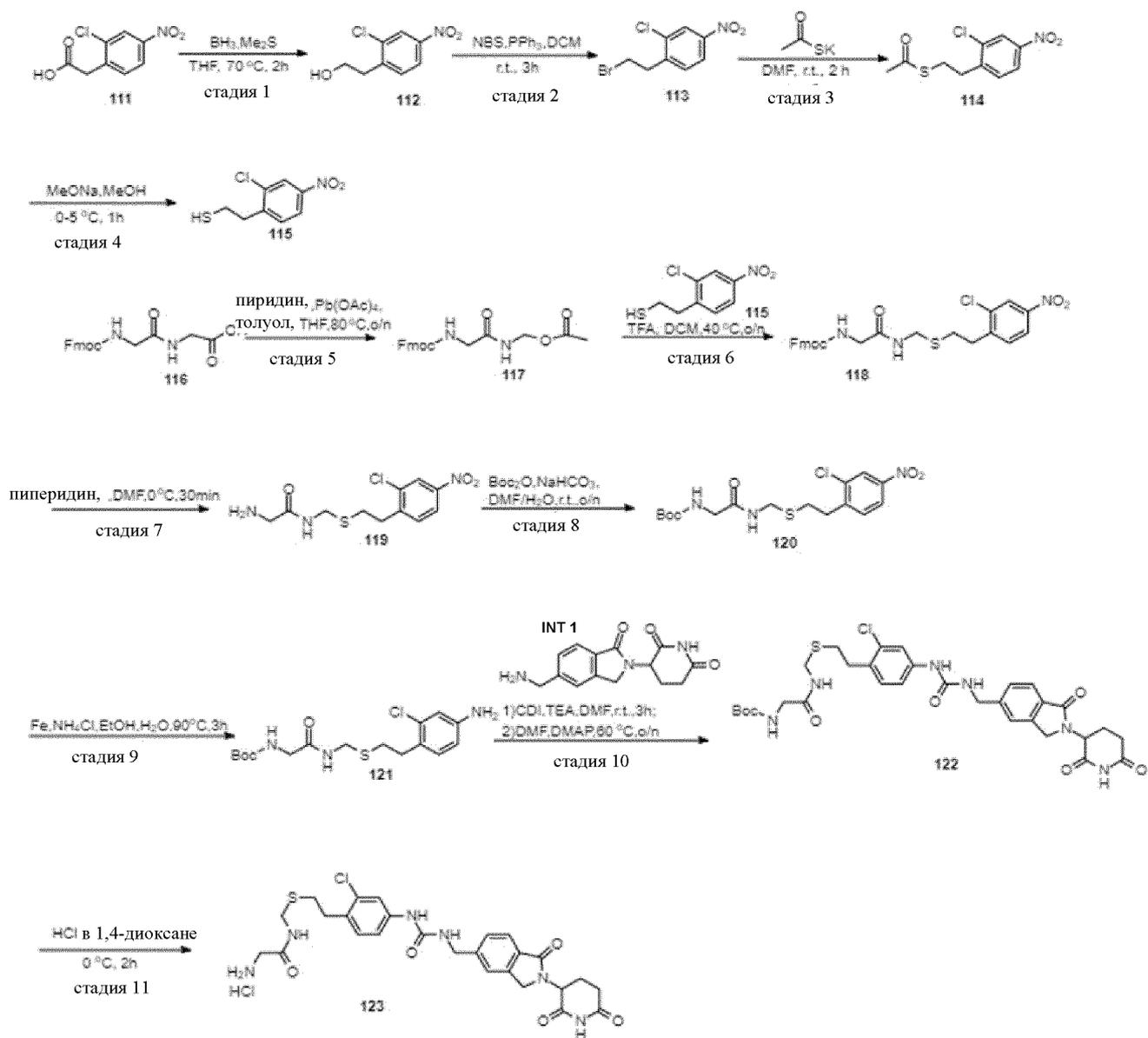
Стадия 16. Соединение 110

[0463] К раствору 9Н-флуорен-9-илметил N-[(1S)-1-[[[(1R)-1-[[[(1S)-1-[(2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]-этил]сульфанил]метил]карбамоил)этил]карбамоил)этил]карбамата (соединение 109, 110,00 мг) в DMF (5,00 мл) добавляли пиперидин (1,00 мл) при 0° С. Полученную смесь перемешивали при 0° С в течение 0,5 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционная смесь была очищена способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель С18; подвижная фаза, АСН в воде (0,05%TFA), градиент от 0% до 60% за 40 мин; детектор, УФ 254 нм, что позволило получить (2S)-2-[(2R)-2-[(2S)-2-аминопропанамидо]пропанамидо]-N-[[[2-(2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]-фенил]этил]сульфанил]метил]пропенамид (соединение 110, 80,00 мг, 60%) в виде красного твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 729 [M+H]⁺. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 9,00 (шир. с, 1Н), 8,53 (шир. с, 1Н), 8,24 (д, J = 7,6 Гц, 1Н), 8,10 (шир. с, 1Н), 7,69 - 7,62 (м, 2Н), 7,49 (с, 1Н), 7,42 (д, J = 8,0 Гц, 1Н), 7,26-7,13 (м, 3Н), 7,00 (шир. с, 1Н), 5,11-5,06 (м, 1Н), 4,45-4,36 (м, 3Н), 4,35-4,13 (м, 6Н), 2,90-2,83 (м, 3Н), 2,73-2,71 (м, 2Н), 2,05-1,90 (м, 1Н), 1,70-1,53 (м, 4Н), 1,22-1,17 (м, 6Н), 1,14-1,05 (м, 3Н).

Стадия 17. Синтез соединения (Ik)

[0464] К раствору (2S)-2-[(2R)-2-[(2S)-2-аминопропанамидо]пропанамидо]-N-[[[2-(2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3Н-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этил]сульфанил]метил]пропенамида (соединение 110, 63,00 мг, 0,09 ммоль, 1,00 экв) и 2,5-диоксопирролидин-1-ил-6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексаноата (26 мг, 0,09 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (1,50 мл, 19,38 ммоль, 224,36 эквив.) при комнатной температуре на воздухе добавляли DIEA (22,33 мг, 0,17 ммоль, 2,00 эквив.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь очищали способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: Колонка: Kinetex EVO C18 Колонка, 30x150,5μм; Мобильная фаза А:хатер (0,05%TFA),

Мобильная фаза В:ACN; Скорость потока: 60 мл/мин; Градиент: от 23 В до 43 В за 7 мин, 254 нм; RT1:6,58). Собранную фракцию лиофилизировали с получением N-[(1S)-1-[[[(1R)-1-[[[(1S)-1-((2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этил]сульфанил]метил]карбамоил)этил]карбамоил]этил]карбамоил]этил]-6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексанамида (соединение (Iк), 16,10 мг, 20%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 922, 924 $[M+H]^+$. 1H ЯМР (400 МГц, DMSO- d_6) δ 11,00 (с, 1H), 8,80 (с, 1H), 8,44-8,41 (м, 1H), 8,15 (д, J=7,2Гц, 1H), 8,03-8,00 (м, 2H), 7,7-7,65 (м, 2H), 7,51 (с, 1H), 7,44 (д, J=8,0Гц, 1H), 7,22-7,14 (м, 2H), 6,98 (с, 2H), 6,83-6,81 (м, 1H), 5,13-5,08 (м, 1H), 4,48-4,40 (м, 3H), 4,29-4,17 (м, 6H), 2,96-2,85 (м, 3H), 2,75-2,70 (м, 2H), 2,67-2,57 (м, 1H), 2,40-2,33 (м, 1H), 2,09-1,98 (м, 3H), 1,52-1,45 (м, 5H), 1,26-1,16 (м, 12H).



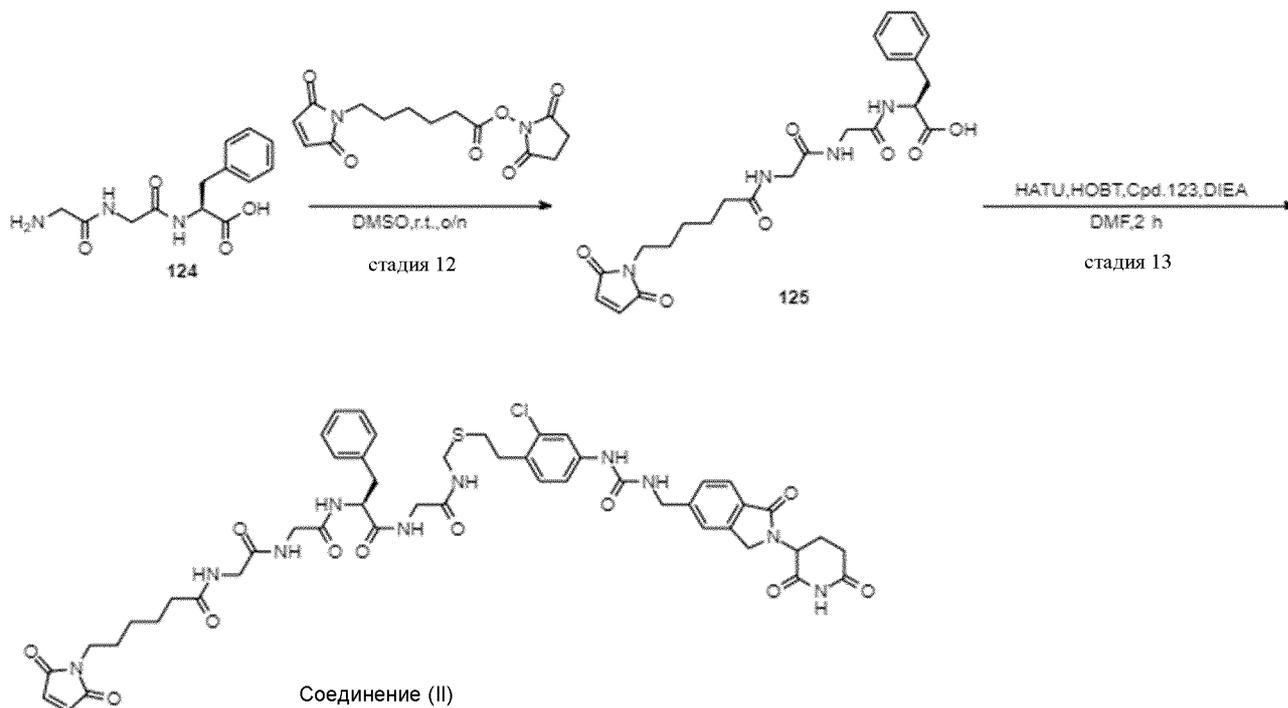


Схема 14: Синтез комплекса неодеградер P14 - GGFG линкер (соединение (II))

Стадия 1. Синтез соединения 112

[0465] К перемешиваемому раствору (2-хлор-4-нитрофенил)уксусной кислоты (соединение 111, 5,00 г, 23,19 ммоль, 1,00 эквив.) в THF (50 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота порциями добавляли $\text{NH}_3\text{-Me}_2\text{S}$ (5,50 мл, 57,99 ммоль, 2,50 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч при 70° С в атмосфере азота. TLC (PE: EtOAc = 3:1) показала, что реакция завершена. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя PE/EtOAc (2:1), с получением 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанола (соединение 112, 4,8 г, 92%) в виде светло-желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 8,27 (д, $J = 2,4$ Гц, 1H), 8,10 (дд, $J = 8,4, 2,4$ Гц, 1H), 7,46 (с, 1H), 3,20 -3,09 (м, 4H).

Стадия 2. Синтез соединения 113

[0466] К перемешиваемому раствору 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанола (соединение 112, 4,80 г, 23,81 ммоль, 1,00 экв.) в DCM (100 мл) при комнатной температуре в атмосфере воздуха порциями добавляли NBS (6,36 г, 35,71 ммоль, 1,50 экв.) и PPh_3 (9,37 г, 35,72 ммоль, 1,50 экв.). Полученную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре в атмосфере воздуха. TLC (PE: EtOAc = 10:1) показала, что реакция завершена. Реакционную

смесь концентрировали досуха в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя PE/EtOAc (4:1), с получением 1-(2-бромэтил)-2-хлор-4-нитробензола (соединение 113, 3,9 г, 57%) в виде красного масла. ^1H -ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 8,29 (д, J = 2,4 Гц, 1H), 8,13 (дд, J = 8,4, 2,4 Гц, 1H), 7,50 (д, J = 8,4 Гц, 1H), 3,67 (т, J = 7,2 Гц, 2H), 3,42 (т, J = 7,2 Гц, 2H).

Стадия 3. Синтез соединения 114

[0467] К раствору 1-(2-бромэтил)-2-хлор-4-нитробензола (соединение 113, 3,90 г, 14,75 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (39 мл) при комнатной температуре добавляли тиацетат калия (1,68 г, 14,75 ммоль, 1,00 эквив.). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. TLC ((PE: EtOAc = 10:1) показала, что реакция завершена. Реакционную смесь разбавляли водой (600 мл). Полученную смесь экстрагировали EA (200 мл*3). Объединенный органический слой промывали водой (200 мл), насыщенным соевым раствором (200 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали досуха в вакууме с получением 1-[[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]этенона (соединение 114, 3,7 г, 85%) в виде красного масла. ^1H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 8,27 (д, J = 2,4 Гц, 1H), 8,10 (дд, J = 8,4, 2,4 Гц, 1H), 7,46 (с, 1H), 3,21 -3,02 (м, 4H), 2,37 (с, 3H).

Стадия 4. Синтез соединения 115

[0468] К перемешиваемому раствору 1-[[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]этенона (соединение 114, 4,00 г, 15,40 ммоль, 1,00 эквив.) в MeOH (600 мл) добавляли MeONa (14,31 мл, 77,00 ммоль, 5,00 эквив., 30%) при 0° С в атмосфере N₂ в течение 1 ч. Реакционную смесь перемешивали при 0° С в течение 1 ч. TLC показала (PE:EA=10:1), что реакция завершена. Реакцию гасили AcOH. Полученную смесь концентрировали досуха в вакууме. Остаток разбавляли DCM (100 мл) и фильтровали. Фильтрат очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (PE: EtOAc =10:1), получая 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанэтиол (соединение 115, 3 г, 80%) в виде желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, хлороформ-d) δ 8,28 (д, J = 2,4 Гц, 1H), 8,11 (дд, J = 8,4, 2,4 Гц, 1H), 7,48 (д, J = 8,4 Гц, 1H), 3,17 (т, J = 7,2 Гц, 2H), 2,87 (дт, J = 8,0, 7,2 Гц, 2H), 1,46 (т, J = 8,0 Гц, 1H).

Стадия 5. Синтез соединения 117

[0469] К перемешиваемой смеси (2-[[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]-ацетамидо)уксусной кислоты (соединение 116, 10 г, 28,22 ммоль, 1,00 эквив.) и Pb(OAc)₄ (15 г, 33,86 ммоль, 1,20 эквив.) в THF (300 мл) и толуоле (100 мл) по каплям при комнатной температуре в атмосфере азота добавляли пиридин (2,59 г, 32,74 ммоль, 1,16 экв.). Полученную смесь перемешивали в течение ночи при 80°C в атмосфере азота. ЖХМС показала, что реакция завершена. Смесь охлаждали до комнатной температуры. Полученную смесь отфильтровывали, фильтровальную лепешку промывали EA (20 мл). Фильтрат концентрировали под вакуумом. Остаток растворяли в EA (20 мл). Полученную смесь промывали водой, насыщенным солевым раствором, сушили над безводным Na₂SO₄. После фильтрации фильтрат концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя PE/EtOAc (1:4), с получением (2-[[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]ацетамидо)метилацетата (соединение 117, 6,5 г, 56%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃) δ 7,80 (д, J=7,5 Гц, 2H), 7,62 (д, J=7,5 Гц, 2H), 7,45 (т, d=7,5 Гц, 2H), 7,36 (d, d=7,5 Гц, 2H), 7,18 (шир, с, 1H), 5,48 (шир, с, 1H), 5,28 (д, J=7,2 Гц, 2H), 4,48 (д, J=6,6 Гц, 2H), 4,26 (т, J=6,6 Гц, 1H), 3,93 (д, 5,4 Гц, 2H), 2,08 (с, 3H). ЖХМС (ESI, мс): 391[M+Na]⁺

Стадия 6. Синтез соединения 118

[0470] К раствору (2-[[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]ацетамидо)метилацетата (соединение 117, 3,00 г, 8,14 ммоль, 1,00 эквив.) и 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанэтиола (соединение 115, 1,77 г, 8,13 ммоль, 1,00 эквив.) в DCM (300 мл) при комнатной температуре добавляли TFA (0,56 г, 4,91 ммоль, 0,60 эквив.). Полученную смесь перемешивали при 60 ° C в течение 16 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь концентрировали досуха в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (PE: EtOAc =2:3), получая 9H-флуорен-9-илметил N-[[[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]метил]карбамоил]-метил]карбамат (соединение 118, 3,7 г, 67%) в виде твердого вещества грязно-белого цвета. ЖХМС (ES, m/z): 526,528 [M+H]⁺

Стадия 7. Синтез соединения 119

[0471] К раствору 9H-флуорен-9-илметил-N-[[[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]метил]карбамоил]метил]карбамата (соединение 118, 3,70 г,

7,03 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (40 мл) добавляли пиперидин (8 мл) при 0° С. Полученную смесь перемешивали при 0° С в течение 0,5 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь разбавляли водой (400 мл), экстрагировали EA (200 млх 3). Объединенный органический слой промывали водой (200 мл), насыщенным соевым раствором (200 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали досуха в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (DCM: MeOH =10:1), получая 2-амино-N-([[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]-метил]ацетамид (соединение 119, 1,01 г, 40%) в виде желтого масла. ЖХМС (ES, m/z): 304,306 [M+H]⁺

Стадия 8. Синтез соединения 120

[0472] К раствору 2-амино-N-([[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]-метил]-ацетамида (соединение 119, 1,00 г, 3,29 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (50 мл) при комнатной температуре добавляли раствор NaHCO₃ (0,33 г, 3,92 ммоль, 1,20 эквив.) в воде (10 мл), Вос2О (0,72 г, 3,30 ммоль, 1,00 экв.). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь разбавляли водой (500 мл), экстрагировали EtOAc (200 млх3). Объединенный органический слой промывали насыщенным соевым раствором (200 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали досуха в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (PE: EtOAc =1:3), с получением трет-бутил-N-[[[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]-метил]карбамоил]метил]карбамата (соединение 120, 810 мг, 54%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 404,406 [M+H]⁺, 304,306 [M+H-100]⁺

Стадия 9. Синтез соединения 121

[0473] К раствору трет-бутил-N-[[[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]-метил]карбамоил]метил]карбамата (соединение 120, 800,00 мг, 1,98 ммоль, 1,00 эквив.) в EtOH(40) при комнатной температуре добавляли порошок железа (1106 мг, 19,81 ммоль, 10,00 эквив.) и раствор NH₄Cl (1059 мг, 19,81 ммоль, 10,00 эквив.) в воде (10 мл). Полученную смесь перемешивали при 70° С в течение 2 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь отфильтровали. Фильтрат концентрировали досуха в вакууме. Остаток растворяли в DCM (50,00 мл) и фильтровали. Фильтрат очищали

колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (DCM: MeOH = 13: 1), получая трет-бутил-N-[[[2-(4-амино-2-хлорфенил)этил]сульфанил]метил]-карбамоил]метил]карбамат (соединение 121, 610 мг, 74%) в виде желтого масла. ЖХМС (ES, m/z): 374,376 [M+H]⁺, 374,376 [M+H-100]⁺

Стадия 10. Синтез соединения 122

[0474] К раствору 3-[5-(аминометил)-1-оксо-3H-изоиндол-2-ил]пиперидин-2,6-диона (INT 1, 219 мг, 0,80 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (10 мл) добавляли CDI (130 мг, 0,80 ммоль, 1,00 эквив.) и TEA (81 мг, 0,80 ммоль, 1,00 эквив.) при 0° С на воздухе. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем добавляли трет-бутил-N-[[[2-(4-амино-2-хлорфенил)этил]сульфанил]-метил]карбамоил]метил]карбамат (соединение 121, 300 мг, 0,80 ммоль, 1,00 эквив.) и DMAP (294 мг, 2,41 ммоль, 3,00 эквив.) при комнатной температуре на воздухе. Полученную смесь перемешивали при 60° С в течение 48 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь очищали способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель С18; подвижная фаза, ACN в воде (0,05%TFA), градиент от 0% до 60% за 30 мин; детектор, УФ 254 нм, с получением трет-бутил-N-[[[2-(2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]-карбамоил)амино]фенил]этил]сульфанил]метил]карбамоил]метил]карбамата (соединение 122, 270 мг, 49%) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 673,675 [M+H]⁺, 573,575 [M+H-100]⁺

Стадия 11. Синтез соединения-123

[0475] К раствору трет-бутил-N-[[[2-(2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этил]сульфанил]метил]карбамоил]метил]-карбамата (соединение 122, 250 мг, 0.37 ммоль) в 1,4-диоксане (12 мл) добавляли HCl (4N в 1,4-диоксане, 6 мл) при 0° С под N₂. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь концентрировали досуха в вакууме с получением 2-амино-N-[[[2-(2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этил]сульфанил]метил]ацетамида (соединение 123, 260

мг, неочищенное) в виде коричневого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 573,575 [M+H-NCI].⁺

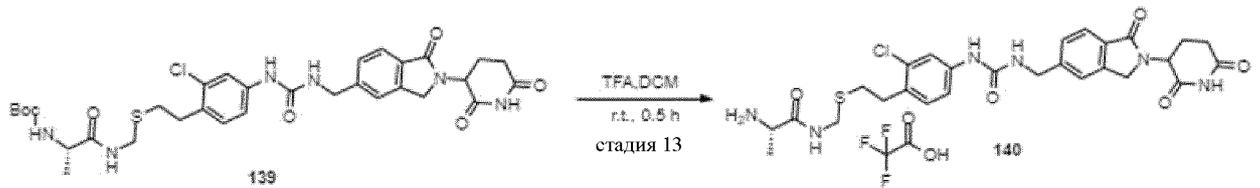
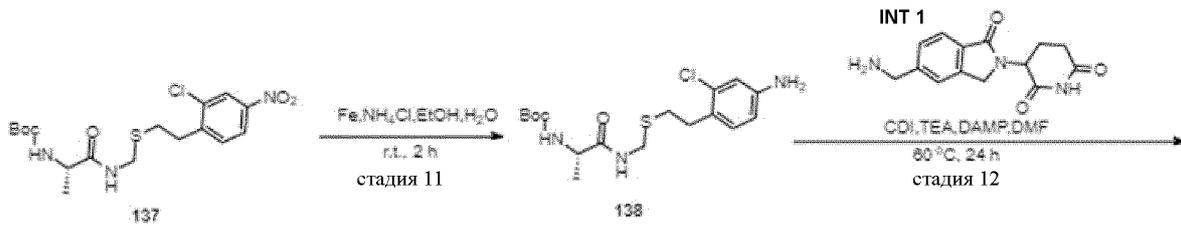
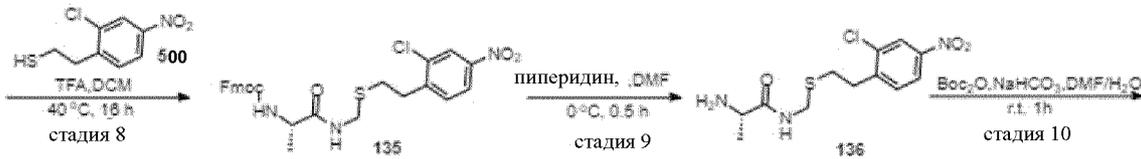
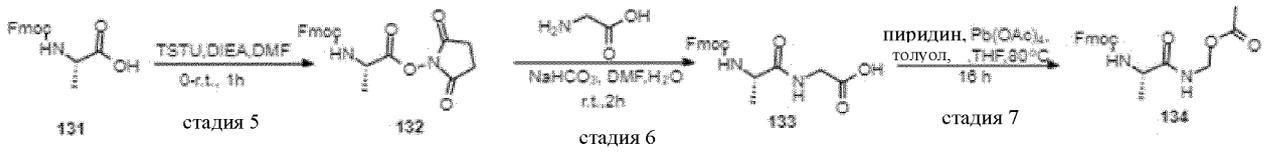
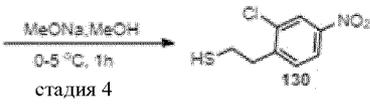
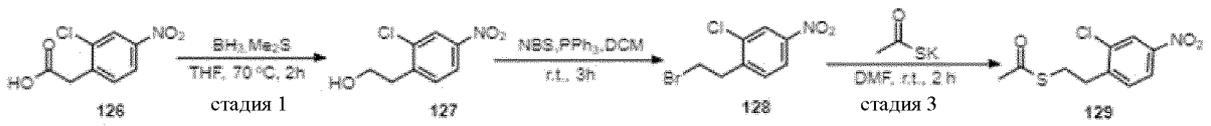
Стадия 12. Синтез соединения-125

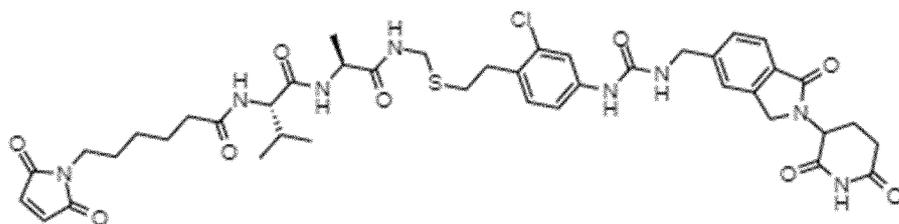
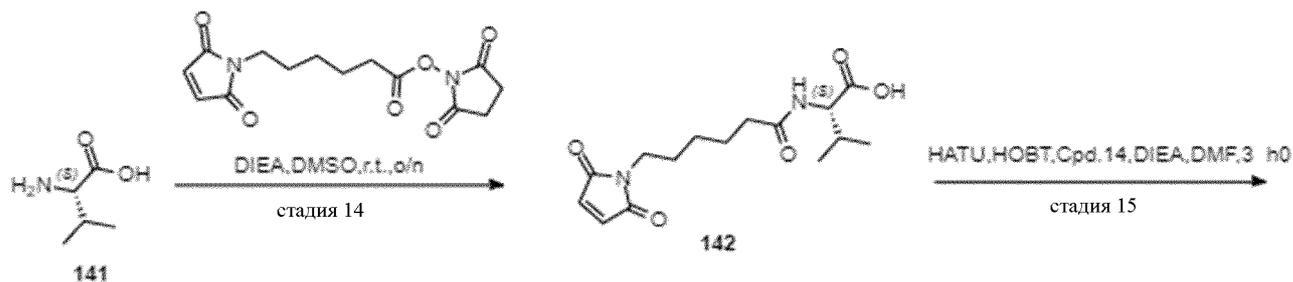
[0476] Раствор (2S)-2-[2-(2-аминоацетида)ацетида]-3-фенилпропановой кислоты (соединение 124, 500 мг, 1,79 ммоль, 1,00 эквив.) и 2,5-диоксопирролидин-1-ил-6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексаноата (552 мг, 1,79 ммоль, 1,00 эквив.) в ДМСО (5,00 мл) перемешивали при комнатной температуре на воздухе в течение 16 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционная смесь была очищена способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель C18; подвижная фаза, ACN в воде (0,1%FA), градиент от 0% до 60% за 30 мин; детектор, УФ 220 нм с получением (2S)-2-(2-[2-[6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексанамида]ацетида]ацетида)-3-фенилпропановой кислоты (соединение 125, 760 мг, 83%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 473 [M+H]⁺

Стадия 13. Синтез соединения (II)

[0477] К раствору (2S)-2-(2-[2-[6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексанамида]ацетида]ацетида)-3-фенилпропановой кислоты (соединение 125, 175 мг, 0,37 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (5,00 мл) при комнатной температуре на воздухе добавляли НАТУ (141 мг, 0,37 ммоль, 1,00 эквив.) и НОВТ (50 мг, 0,37 ммоль, 1,00 эквив.). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем добавляли 2-амино-N-[[2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]-карбамоил]амино]фенил]этил]сульфанил]метил]ацетамид (соединение 123, 250 мг, 0,37 ммоль, 1,00 экв., 85%) и DIEA (240 мг, 1,85 ммоль, 5,00 экв.). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционная смесь была очищена по следующей схеме: Колонка: XSelect CSH Prep C18 OBD Колонка, 19*250 мм, 5мкм; Мобильная фаза А: вода (0,05%FA), Мобильная фаза В: ACN; Скорость потока: 25 мл/мин; Градиент: от 30 В до 60 В за 7 мин, 254 нм; RT1: 6,67 мин. с получением 75 мг неочищенного продукта. Неочищенный продукт был повторно очищен способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: Колонка: XBridge Shield RP18 OBD Колонка, 19*250 мм, 10мкм; Мобильная фаза А: вода (0,1%FA), Мобильная фаза В: ACN; Скорость потока: 25 мл/мин; Градиент: от 25 В до 44 В за 10 мин;

254 нм; RT:10,52 мин. Собранная фракция была лиофилизирована с получением соединения (II) (41,6 мг, 10%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 10,99 (с, 1H), 8,79 (с, 1H), 8,38 (т, J=6,0 Гц, 1H), 8,31 (т, J=6,0 Гц, 1H), 8,12 (д, J=8,4 Гц, 1H), 8,06 (т, J=5,6 Гц, 1H), 8,01 (т, J=6,0 Гц, 1H), 7,70-7,66 (м, 2H), 7,51 (с, 1H), 7,44 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,25-7,21 (м, 5H), 7,19-7,14 (м, 2H), 6,99 (с, 2H), 6,82 (т, J=6,0 Гц, 1H), 5,13-5,08 (м, 1H), 4,47-4,40 (м, 4H), 4,33-4,29 (м, 3H), 3,76-3,70 (м, 3H), 3,67-3,55 (м, 3H), 3,38-3,36 (м, 2H), 3,06-3,02 (м, 1H), 2,91-2,86 (м, 3H), 2,82-2,70 (м, 3H), 2,62-2,57 (м, 1H), 2,50-2,45 (м, 1H), 2,10 (м, 2H), 2,05-1,95 (м, 1H), 1,50-1,44 (м, 4H), 1,20-1,16 (м, 2H). ЖХМС (ES, m/z): 1027, 1029 [M+H] $^+$





Соединение (1m)

Схема 15: Синтез комплекса неосажаемых Р14 - ААА линкер (соединение (1m))

Стадия 1. Синтез соединения 127

[0478] К перемешиваемому раствору (2-хлор-4-нитрофенил)уксусной кислоты (соединение 126, 24,00 г, 111,32 ммоль, 1,00 эквив.) в THF (240,00 мл) по каплям добавляли $\text{NH}_3\text{-Me}_2\text{S}$ (28,00 мл, 295,23 ммоль, 2,65 эквив.) под атмосферой азота. Полученную смесь перемешивали в течение 2 часов при температуре 70°C в атмосфере азота. TLC (PE: EtOAc = 3:1) показала, что реакция завершена. После охлаждения до комнатной температуры полученную смесь концентрировали в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя PE/ EtOAc (3:1), и получили 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанол (соединение 127, 18,00 г, 80%) в виде светло-желтого твердого вещества. ^1H ЯМР (300 МГц, CD_3Cl) δ 8,27 (с, 1H), 8,10-8,07 (м, 1H), 7,52 (д, $J = 3$ Гц, 1H), 3,96 (т, $J = 6$ Гц, 2H), 3,13 (т, $J = 6$ Гц, 2H).

Стадия 2. Синтез соединения 128

[0479] К перемешиваемому раствору 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанола (соединение 127, 5,00 г, 24,80 ммоль, 1,00 эквив.) в DCM (100,00 мл) добавляли NBS (6,62 г, 1,50 эквив.) и PPh_3 (9,76 г, 37,21 ммоль, 1,50 экв.) порциями при комнатной температуре в атмосфере N_2 . Полученную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре под N_2 .

TLC (PE: EtOAc = 10:1) показала, что реакция завершена. Реакционную смесь концентрировали досуха в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя PE/ EtOAc (4:1), получая 1-(2-бромэтил)-2-хлор-4-нитробензол (соединение 128, 5,10 г, 72,31%) в виде красного масла. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6) δ 8,28 (д, $J = 2,4$ Гц, 1H), 8,18 (дд, $J = 8,4, 2,4$ Гц, 1H), 7,73 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 3,79 (т, $J = 7,2$ Гц, 2H), 3,38 (т, $J = 7,2$ Гц, 2H).

Стадия 3. Синтез соединения 129

[0480] К раствору 1-(2-бромэтил)-2-хлор-4-нитробензола (соединение 128, 5,00 г, 18,90 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (50,00 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота добавляли тиоацетат калия (2,16 г, 18,91 ммоль, 1,00 эквив.). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. TLC (PE: EtOAc = 10:1) показала, что реакция завершена. Реакционную смесь разбавляли водой (600,00 мл). Полученную смесь экстрагировали EtOAc (200,00 мл*3). Объединенный органический слой промывали водой (200,00 мл), насыщенным солевым раствором (200,00 мл*3), сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали досуха в вакууме, получая 1-[[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]этенон (соединение 129, 4,50 г, 85%) в виде красного масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,24 (д, $J = 2,4$ Гц, 1H), 8,07 (дд, $J = 8,4, 2,4$ Гц, 1H), 7,45 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 3,20 - 3,05 (м, 4H), 2,34 (с, 3H).

Стадия 4. Синтез соединения 130

[0481] К перемешиваемому раствору 1-[[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]этенона (соединение 129, 2,00 г, 7,70 ммоль, 1,00 эквив.) в MeOH (300,00 мл) добавляли MeONa (6,93 мл, 37,33 ммоль, 5,00 эквив., 30%) при 0 °C в атмосфере N_2 . Полученную смесь перемешивали при 0° C под N_2 в течение 1 ч. TLC (PE: EtOAc =10:1) показала, что реакция завершена. Реакцию гасили AcOH до значения pH 3-4. Полученную смесь концентрировали досуха в вакууме. Остаток разбавляли DCM (50,00 мл) и фильтровали. Фильтрат очищали способом препаративной TLC (PE: EtOAc = 10:1) с получением 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанэтиола (соединение 130, 1,35 г, 72%) в виде светло-желтого масла. ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,26 (д, $J = 2,4$ Гц, 1H), 8,09 (дд, $J = 8,4, 2,4$ Гц, 1H), 7,45 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 3,14 (дд, $J = 8,0, 6,8$ Гц, 2H), 2,85 (дт, $J = 8,0, 7,2$ Гц, 2H), 1,43 (т, $J = 8,0$ Гц, 1H).

Стадия 5. Синтез соединения 132

[0482] К перемешиваемому раствору (2S)-2-[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропановой кислоты (соединение 131, 20,00 г, 64,24 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (200,00 мл) при комнатной температуре в атмосфере воздуха добавляли TSTU (25,18 г, 83,52 ммоль, 1,30 эквив.) и DIEA (16,60 г, 128,48 ммоль, 2,00 эквив.). Полученную смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь разбавляли водой (200,00 мл), полученную смесь экстрагировали EtOAc (100,00 мл*3). Объединенный органический слой промывали водой (100,00 мл), насыщенным солевым раствором (100,00 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали досуха в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (PE: EtOAc =1:2), с получением 2,5-диоксопирролидин-1-ил-(2S)-2-[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропаноата (соединение 132, 25,00 г, 83%) г в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, *m/z*): 431[M+Na]⁺

Стадия 6. Синтез соединения 133

[0483] К раствору глицина (3,68 г, 48,97 ммоль, 1,00 эквив.) и NaHCO₃ (12,34 г, 146,89 ммоль, 3,00 эквив.) в воде (200,00 мл) добавляли раствор 2,5-диоксопирролидин-1-ил-(2S)-2-[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропаноата (соединение 132, 20,00 г, 48,97 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (200,00 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь довели до значения pH 2-3 с помощью 2 N HCl. Полученную смесь экстрагировали EtOAc (500,00 мл*3), объединенный органический слой промывали насыщенным солевым раствором (500,00 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали досуха в вакууме с получением [(2S)-2-[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо]уксусной кислоты (соединение 133, 15,00 г, 71%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, *m/z*): 369 [M+H]⁺

Стадия 7. Синтез соединения 134

[0484] Раствор [(2S)-2-[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]-пропанамидо]уксусной кислоты (соединение 133, 5,00 г, 13,57 ммоль, 1,00 эквив.), Pb(OAc)₄

(7,22 г, 16,28 ммоль, 1,20 эквив.) и пиридина (1,29 г, 16,31 ммоль, 1,20 эквив.) в THF (300,00 мл)/толуоле (100,00 мл) под N₂ перемешивали при 80° С в течение 16 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь отфильтровали. Осадок промывали THF (100,00 мл). Объединенный органический слой концентрировали досуха в вакууме. Остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (PE: ETOAC=1:2), с получением [(2S)-2-[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]пропанамидо]метилацетата (соединение 134, 2,50 г, 45%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, *m/z*): 405 [M+Na]⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, хлороформ-*d*) δ 7,77-7,73 (м, 2H), 7,58 (д, *J* = 7,6 Гц, 2H), 7,43-7,37 (м, 2H), 7,36-7,29 (м, 2H), 7,10 (с, 1H), 5,24 (д, *J* = 7,6 Гц, 2H), 4,51 - 4,35 (м, 2H), 4,22 (т, *J* = 6,8 Гц, 2H), 2,04 (с, 3H), 1,39 (д, *J* = 6,8 Гц, 3H).

Стадия 8. Синтез соединения 135

[0485] К перемешиваемому раствору [(2S)-2-[[[9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино]-пропанамидо]метилацетата (соединение 134, 2,25 г, 5,88 ммоль, 1,00 эквив.) и 2-(2-хлор-4-нитрофенил)этанэтиола (соединение 500, 1,28 г, 5,88 ммоль, 1,00 эквив.) в DCM (120 мл) добавляли TFA (0,27 мл, 2,376 ммоль, 0,62 эквив.) под N₂ при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали при 40° С в течение 16 часов. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь концентрировали досуха в вакууме с получением 9H-флуорен-9-илметил-N-[(1S)-1-[[[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]метил]карбамоил]этил]карбамата (соединение 135, 3,10 г, 90%) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС (ES, *m/z*): 540,542 [M+H]⁺.

Стадия 9. Синтез соединения 136

[0486] К раствору 9H-флуорен-9-илметил-N-[(1S)-1-[[[2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]метил]карбамоил]этил]карбамата (соединение 135, 3,10 г, 5,74 ммоль, 1,00 экв.) в DMF (155,00 мл) добавляли пиперидин (31,00 мл) при 0° С под N₂. Полученную смесь перемешивали при 0° С в течение 0,5 ч под N₂. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь разбавляли водой (600,00 мл). Полученную смесь экстрагировали EA (200,00 мл x 3). Объединенный органический слой промывали насыщенным соевым раствором (200,00 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали досуха в вакууме с получением 3,00 г неочищенного продукта.

Неочищенный продукт был повторно очищен колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (DCM: MeOH = 3: 1), с получением (2S)-2-амино-N-([2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]метил]пропенамида (соединение 136, 1,50 г, 78%) в виде желтого масла. ЖХМС (ES, m/z): 318,320 [M+H]⁺.

Стадия 10. Синтез соединения 137

[0487] К раствору (2S)-2-амино-N-([2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]метил]пропенамида (соединение 136, 1,50 г, 4,72 ммоль, 1,00 экв.) в DMF (75,00 мл) добавляли раствор NaHCO₃ (0,59 г, 7,08 ммоль, 1,50 эквив.) в H₂O (10,00 мл) и Boc₂O (1,03 г, 4,72 ммоль, 1,00 эквив.) при комнатной температуре на воздухе. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь разбавляли водой (500,00 мл), экстрагировали EtOAc (200,00 мл x 3). Объединенный органический слой промывали насыщенным соевым раствором (200,00 мл*3), сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали досуха в вакууме с получением трет-бутил-N-[(1S)-1-([2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]метил]-карбамоил]этил]карбамата (соединение 137, 1,82 г, 83%) в виде красного масла. ЖХМС (ES, m/z): 418,420 [M+H]⁺, 318,320 [M+H-100]⁺

Стадия 11. Синтез соединения 138

[0488] Суспензию трет-бутил-N-[(1S)-1-([2-(2-хлор-4-нитрофенил)этил]сульфанил]метил]карбамоил]этил]карбамата (соединение 137, 1,82 г, 4,36 ммоль, 1,00 эквив.), железного порошка (2,43 г, 0,04 ммоль, 10,00 эквив.) и NH₄Cl (2,33 г, 0,04 ммоль, 10,00 эквив.) в EtOH (100,00 мл)/H₂O (50,00 мл) перемешивали при 70° C в течение 2 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь отфильтровали. Фильтрат концентрировали досуха в вакууме. Остаток растворяли в DCM (50,00 мл) и фильтровали. Фильтрат очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя (DCM: MeOH = 13: 1), с получением трет-бутил-N-[(1S)-1-([2-(4-амино-2-хлорфенил)этил]сульфанил]метил]карбамоил]этил]карбамата (соединение 138, 1,20 г, 68%) в виде желтого масла. ЖХМС (ES, m/z): 388,390 [M+H]⁺, 288,290 [M+H-100]⁺

Стадия 12. Синтез соединения 139

[0489] К перемешиваемому раствору 3-[5-(аминометил)-1-оксо-3H-изоиндол-2-ил]пиперидин-2,6-диона (INT 1, 352 мг, 1,29 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (5,00 мл) при 0° С добавляли CDI (209,00 мг, 1,29 ммоль, 1 эквив.) и TEA (260 мг, 2,58 ммоль, 2 эквив.). Полученную смесь перемешивали при 0° С в течение 2 ч. Затем добавляли трет-бутил-N-[(1S)-1-([[(2-(4-амино-2-хлорфенил)этил]сульфанил]-метил]карбамоил]-этил]карбамат (соединение 138, 500,00 мг, 1,29 ммоль, 1,00 эквив.) и DMAP (472 мг, 3,87 ммоль, 3,00 эквив.). Полученную смесь перемешивали при 60° С в течение 24 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. После охлаждения до комнатной температуры реакционная смесь была очищена способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель С18; подвижная фаза, АСN в воде (0,1%FA), градиент от 0% до 60% за 30 мин; детектор, УФ 254 нм, с получением трет-бутил-N-[(1S)-1-([[(2-[2-хлор-4-([[(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этил]сульфанил]метил]карбамоил]этил]карбамата, (соединение 139, 450,00 мг, 48%) в виде желтого твердого вещества. ЖХМС (ES, *m/z*): 687,689 [M+H]⁺, 587,589 [M+H-100]⁺

Стадия 13. Синтез соединения 140

[0490] К перемешиваемому раствору трет-бутил-N-[(1S)-1-([[(2-[2-хлор-4-([[(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этил]сульфанил]-метил]карбамоил]этил]карбамата (соединение 139, 440,00 мг, 0,64 ммоль, 1,00 эквив.) в DCM (22,00 мл) добавляли TFA (2,20 мл) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 0,5 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционную смесь концентрировали досуха в вакууме с получением (2S)-2-амино-N-[[[2-[2-хлор-4-([[(2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этил]сульфанил]метил]пропанамида; трифторуксусной кислоты (соединение 140, 400,00 мг) в виде красного масла. ЖХМС (ES, *m/z*): 578,589 [M+H-TFA]⁺

Стадия 14. Синтез соединения 142

[0491] К суспензии L-валина (соединение 141, 0,50 г, 4,27 ммоль, 1,00 эквив.) в ДМСО (10 мл) добавляли 2,5-диоксопирролидин-1-ил-6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексаноат

(1,32 г, 4,28 ммоль, 1,00 эквив.) и DIEA (1103 мг, 8,54 ммоль, 2,00 эквив.). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Реакционная смесь была очищена способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: колонка, силикагель C18; подвижная фаза, ACN в воде (0,1%FA), градиент от 0% до 60% за 30 мин; детектор, УФ 220 нм с получением (2S)-2-[6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутановой кислоты (соединение 142, 1,2 г, 72%) в виде коричневого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 311 [M+H]⁺

Стадия 15. Синтез соединения (Im)

[0492] Раствор (2S)-2-[6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексанамидо]-3-метилбутановой кислоты (соединение 142, 59 мг, 0,19 ммоль, 1,00 эквив.), НОВТ (26 мг, 0,19 ммоль, 1,00 эквив.) и НАТУ (72 мг, 0,19 ммоль, 1,00 эквив.) в DMF (2 мл) перемешивали при комнатной температуре на воздухе в течение 1 часа. Затем (2S)-2-амино-N-[[2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]фенил]этил)сульфанил]метил]пропанамид трифторуксусной кислоты (соединение 140, 200 мг, 0,19 ммоль, 1,00 эквив., 66,70%) и DIEA (197 мг, 1,52 ммоль, 8,00 эквив.) добавляли при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. ЖХМС показала, что реакция завершена. Полученную смесь очищали способом обращенной флэш-хроматографии со следующими условиями: Колонка: YMC-Actus Triart C18, 30 мм X 150 мм, 5мкм; мобильная фаза А: вода (0,1%FA), мобильная фаза В: ACN; скорость потока: 60 мл/мин; градиент: от 28 В до 45 В за 10 мин, 254 нм; RT1: 9,67 мин. Собранную фракцию лиофилизировали с получением N-[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[2-[2-хлор-4-[[[2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксо-3H-изоиндол-5-ил]метил]карбамоил)амино]-фенил]этил)сульфанил]метил]карбамоил)этил]карбамоил]-2-метилпропил]-6-(2,5-диоксопиррол-1-ил)гексанамида (соединение (Im), 27,8 мг, 16%) в виде белого твердого вещества. ЖХМС (ES, m/z): 879,881 [M+H]⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 10,99 (с, 1H), 8,80 (с, 1H), 8,47 (т, J=6,0Гц, 1H), 8,03 (д, J=7,2 Гц, 1H), 7,78 (д, J=8,8 Гц, 1H), 7,70-7,66 (м, 2H), 7,51 (с, 1H), 7,44 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,21-7,14 (м, 2 H), 6,99 (с, 2H), 6,82 (т, J=6,0 Гц, 1H), 5,13-5,10 (м, 1 H), 4,47-4,40 (м, 3H), 4,33-4,29 (м, 3H), 4,24 (т, J=7,2 Гц, 1H), 4,14 (т, J=6,8 Гц, 1H), 3,38-3,36 (м, 1H), 2,97-2,90 (м, 1H), 2,86 (т, J=7,6 Гц, 2H), 2,73-2,67 (м, 2H), 2,62-2,57 (м,

1H), 2,40-2,35 (м, 1H), 2,20-2,05 (м, 2H), 2,02-1,96 (м, 1H), 1,95-1,88 (м, 1H), 1,48-1,46 (м, 4H), 1,23-1,16 (м, 6H), 0,83-0,78 (м, 6H).

Пример 4: Приготовление и характеристика конъюгатов неодеградера

[0493] Раствор антитела обрабатывали 30 эквивалентами трис-(2-карбоксиил)фосфина (ТСЕР) и инкубировали при 37 °С в течение 1 часа для восстановления межцепочечных дисульфидных связей. Восстановленное антитело очищали в 50 мМ буфере EPPS, 5 мМ ЭДТА pH 7,0 с помощью колонок illustra NAP (GE Healthcare).

[0494] Конъюгацию проводили путем обработки раствора восстановленного анти-CD33 антитела, включающего тяжелую цепь SEQ ID NO: 9 и легкую цепь SEQ ID NO: 10 ("CD33AB") в количестве 2-5 мг/мл в 50 мМ EPPS, 5 мМ EDTA pH 7,0 12 эквивалентами линкера-неодеградера, добавленного в виде исходного раствора в *N,N*-диметилацетамиде (DMA) так, чтобы конечная концентрация DMA составляла 15% (об/об.). Полученную реакционную смесь оставляли на ночь при 4 °С. Полученный конъюгат неодеградера очищали в 20 мМ сукцинате, 8% сахарозе, 0,01% Tween-20 при pH 5,5 с помощью колонок illustra NAP (GE Healthcare) и концентрировали на центрифужных концентраторах Amicon Ultra с отсечением молекулярной массы 50 кД (Millipore).

[0495] Концентрацию и содержание мономера определяли способом эксклюзионной хроматографии на колонке TSKGel 3000SWXL 7,8 x 300 мМ с частицами размером 5 мкм (Tosoh Bioscience), элюируя изократически подвижной фазой с 400 мМ перхлоратом натрия, 50 мМ фосфатом натрия, 5% (об/об.) изопропанолом при концентрации 0,5 мг/мл в течение 30 мин. Количественное определение конъюгатов неодеградера проводили по стандартным кривым антител, детектируя при 214 нм.

[0496] Соотношение лекарственного препарата и антитела (Drug to antibody ratio (DAR)) определяли способом хроматографии гидрофобного взаимодействия с использованием колонки TSKgel Butyl-NPR размером 4,6 x 35 мм с частицами 2,5 мкм. Мобильная фаза А представляла собой 1,5 М сульфат аммония, 25 мМ фосфат натрия pH 7,0. Мобильная фаза В представляла собой 25 мМ фосфат натрия pH 7,0, 25% (об/об.) изопропанол. Аналиты элюировались линейным градиентом 0-100% В за 12 мин. при скорости потока 0,6 мл/мин. Детектирование проводилось при длине волны 214 нм.

[0497] Свободный линкер-полезную нагрузку определяли способом хроматографии в смешанном режиме на колонке HISEP 4,6 x 250 мм с частицами 2,5 мкм (Supelco). Мобильная фаза А представляла собой 100 мМ ацетат аммония. Мобильная фаза В представляла собой 100% ацетонитрил. Аналиты элюировались градиентом 25-40% В за 25 мин, затем 40-100% В за 2 мин при скорости потока 0,7 мл/мин. Температура колонки составляла 35 °С. Количественное определение свободного линкера-полезной нагрузки проводили по кривой внешнего стандарта, детектируя при 254 нм.

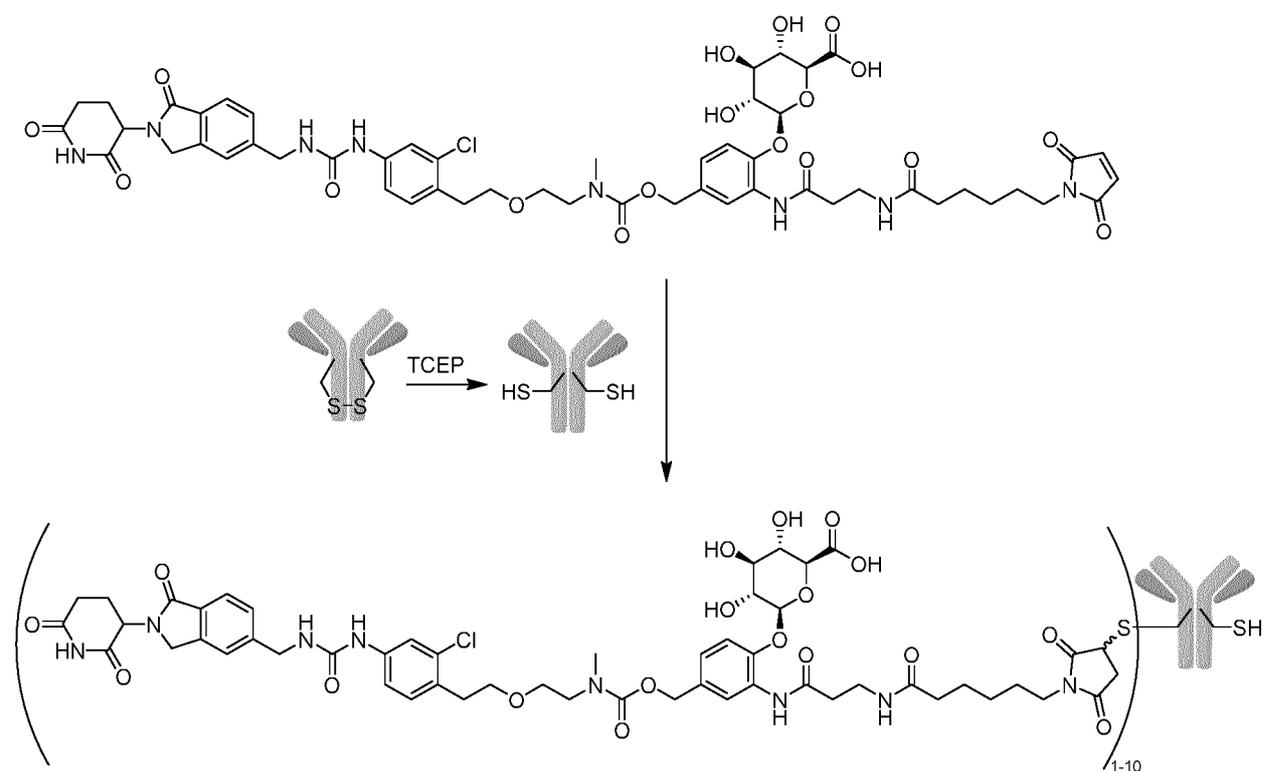


Схема 16: Получение конъюгата анти-CD33 антитело-соединение (1e)

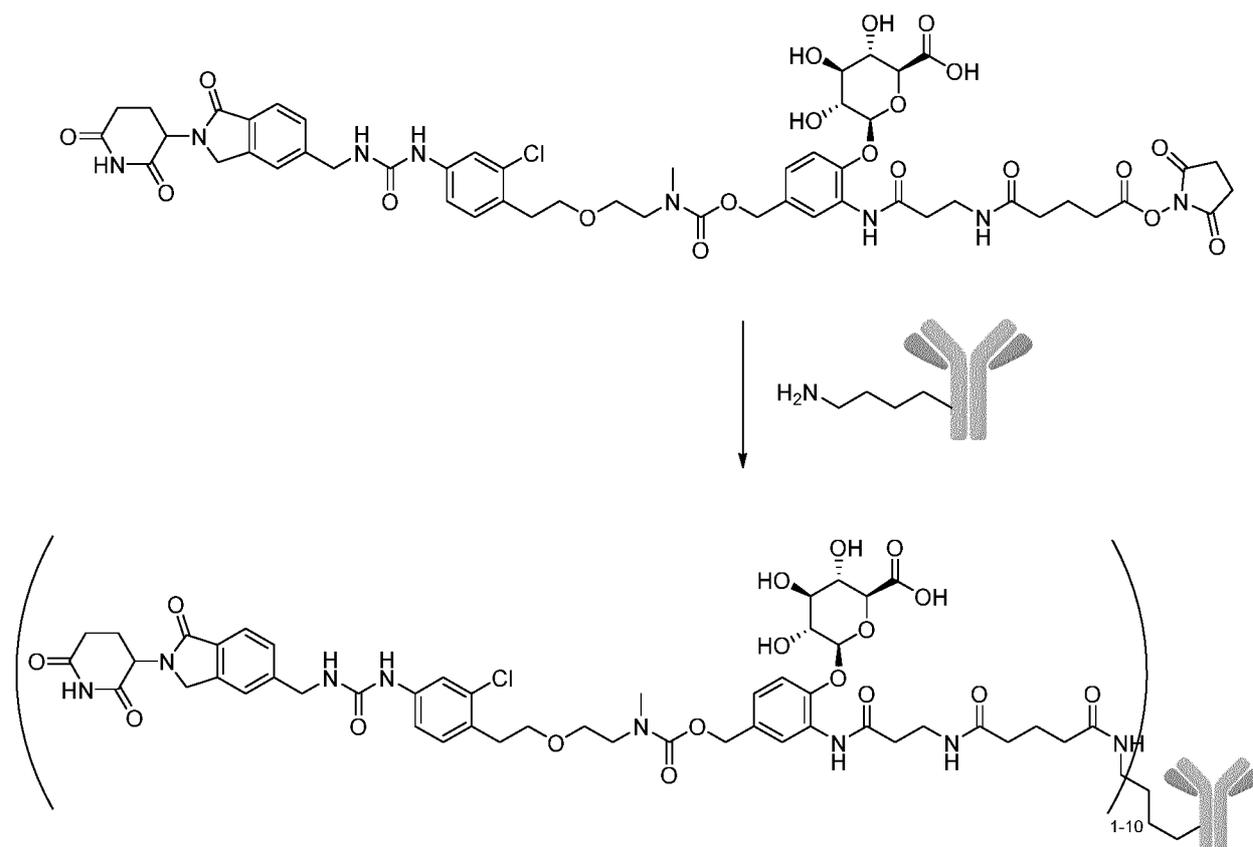


Схема 17: Получение конъюгата анти-CD33 антитело-соединение (Ih)

[0498] Аналогичным образом можно приготовить и другие конъюгаты, используя соответствующие антитела.

Пример 5: Лечение острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) с помощью конъюгата анти-CD33 антитело-неодеградер

[0499] Соединения анти-CD33 антитело (CD33AB)-неодеградер тестировали на атимичных мышах nude (CrI:NU(NCr)-Foxn1^{nu}, Charles River). 1×10^7 клеток острого моноцитарного лейкоза человека MV411 (ATCC[®] CRL-5991[™]) в 50%-ном матрикеле вводили подкожно в бок мышей (0,1 мл/мышь). Мышам вводили конъюгаты анти-CD33 антитело-неодеградер, ненацеленные конъюгаты неодеградеров и носитель, когда опухоли достигали среднего размера 100-150 мм³.

[0500] Исходные растворы CD33AB-соединения (Ia), CD33AB-соединения (Ie) и CD33AB-соединения (Ih) разбавляли носителем для получения 0,3, 0,283 и 0,299 мг/мл дозируемых растворов, что обеспечивало 3, 2,83 и 2,99 мг/кг в объеме дозирования 10 мл/кг (0,2 мл на 20 г мыши) в соответствии с массой тела каждого животного. Такая стратегия дозирования обеспечивала доставку одинакового количества полезной нагрузки в каждую

группу испытуемых. Милотарг разводили в 0,9% растворе хлорида натрия до концентрации 0,01 мг/мл, что обеспечивало 3 мг/кг в объеме дозирования 10 мл/кг (0,2 мл на 20 г мыши). Венотоклакс был приготовлен в растворителе, состоящем из 60% PG, 30% PEG400, 10% этанола, ультразвуковым способом в виде суспензии 5 мг/мл, что обеспечивало 50 мг/кг при введении в объеме 10 мл/кг. СС-90009 центрифугировали для сбора порошка на дне, затем добавляли N-метил-2-пирролидинон (NMP), PEG400 и физиологический раствор и поочередно хорошо перемешивали для получения дозируемого раствора 0,5 мг/мл в 5% NMP, 45% PEG400 и 50% физиологического раствора, что обеспечивало доставку 5 мг/кг при введении в объеме 10 мл/кг.

[0501] Мыши были разделены на 7 групп лечения (N=9/группа) следующим образом: 1) носитель; 2) CD33AB-соединение (Ia) (3 мг/кг, iv, 1 раз в сутки); 3) CD33AB-соединение (Ie) (2,83 мг/кг, iv, 1 раз в сутки); 4) CD33AB-соединение (Ih) (2,99 мг/кг, iv, 1 раз в сутки); 5) Милотарг (0,1 мг/кг, iv, 1 раз в сутки); 6) Венотоклакс (50 мг/кг, po, qd x 21); 7) СС-90009 (5 мг/кг, ip, bid x 10). Испытуемые препараты для групп 1-5 вводились внутривенно (iv) в разовой дозе (1 раз в сутки (qd x 1)) в объеме, рассчитанном на массу тела (0,200 мл/20 г мыши). Венотоклакс вводили перорально (po) и СС-90009 вводили внутрибрюшинно (ip) в дозировке 10 мл/кг (0,2 мл на 20-граммовую мышь), рассчитанной на массу тела каждого животного.

[0502] Опухоли измеряли штангенциркулем дважды в неделю, и каждое животное подвергалось эвтаназии, когда его опухоль достигала конечного объема (2000 мм³) или в последний день исследования (45-й день), в зависимости от того, что наступало раньше. MTV(n) определялась как медиана объема опухоли на последний день исследования у числа оставшихся животных (n), опухоли которых не достигли объема конечной точки.

[0503] Как показано на фигуре 1, все конъюгаты с неодеградером обеспечивали замедление роста опухоли с течением времени по сравнению с носителем.

Пример 6: *Активность конъюгата AB1 - соединение (Ia) в отношении моделей лейкемии человека*

[0504] Цитотоксичность *in vitro* определяли с использованием панели CD33-положительных линий клеток острого миелоидного лейкоза и панели CD33-отрицательных клеток, не относящихся к ОМЛ. Клетки в заданной концентрации помещали в 96-луночные планшеты, и после ночной инкубации при 37°C/5CO₂ к ним добавляли серийные разведения

каждого испытуемого вещества (ТА). Клетки инкубировали с испытуемыми веществами в течение 72 часов и определяли жизнеспособность с помощью реагента CellTiter-Glo® (Promega). Значения люминесценции были нормализованы для каждой клеточной линии, и IC50 рассчитывались с помощью программы Prizm.

[0505] Результаты показали, что полученное из hmkmu9-6 антитело АВ1, конъюгированное с соединением Ia ("АВ--соединение (Ia)"), демонстрирует сопоставимую общую эффективность *in vitro* по сравнению с СС-885 (известным GSPT-деградером) или препаратом милотарг на CD33-положительных клетках ОМЛ, и в некоторых случаях и превосходящую эффективность. (См. фигуру 2.) Кроме того, в соответствии с гипотезой о целевой CD33-опосредованной доставке полезной нагрузки GSPT1-деградера, АВ1-соединение (Ia) было неактивным в моделях CD33-отрицательных клеток.

Пример 7: *Лечение острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) с помощью конъюгатов антитело-неодеградер*

[0506] Клетки острого миелоцитарного лейкоза человека MV4-11 (1×10^6 клеток в 0,1 мл) подкожно инокулировали в правый бок самок атимичных мышей nude. Мышей лечили испытываемым веществом путем внутривенной инъекции в боковую хвостовую вену, внутривенной инъекции, перорально через зонд или их комбинациями, начиная с момента, когда опухоли достигали размера 150 мм^3 . Размер опухоли и массу тела мыши измеряли два раза в неделю.

[0507] В соответствии с наблюдениями *in vitro*, *in vivo* лечение CD33-положительной опухоли модели ОМЛ (MV4-11) несколькими конъюгатами на основе АВ1, высвобождающими неодеградер Р1, привело к регрессиям опухоли, причем наиболее устойчивый эффект наблюдался у конъюгата, содержащего бета-глюкуронидный триггер высвобождения и конъюгацию нативными цистеиновыми связями. (См. фигуру 3.)

Пример 8: *Стабильность конъюгатов CD33АВ-соединение (Ia) и гемтузумаб-соединение (Ia)*

[0508] Анализы стабильности конъюгатов анти-CD33-соединение (Ia) (~8 DAR) проводились в течение 40 дней с использованием форматов гемтузумаб, IgG1, CD33АВ и IgG1 L234A/L235A "LALA" Ab в концентрации 2,5 мг/мл в 20 мМ сукцинате, 8% сахарозе, 0,01% Tween-20 pH 5,5 и анализировались способом эксклюзионной хроматографии (SEC).

При 4°C ни для одного из конъюгатов не наблюдалось существенного изменения концентрации или мономера. (Фигура 4.) Напротив, при 37°C нативный гемтузумаб-соединение (Ia), а также конъюгаты соединения (Ia) на основе IgG1 и IgG1 LALA демонстрировали значительную агрегацию в течение 39 дней (увеличение на 15-28% с 20 по 39 день). Однако CD33AB-соединение (Ia) (на основе IgG1 N297A) сохраняет мономерное состояние выше 88% в течение 39 дней при 37°C (фигура 4). Сохранение высокого уровня мономера, как в CD33AB-соединении (Ia), в течение нескольких дней является желательным свойством для ADC, поскольку агрегация в кровотоке может привести к быстрому клиренсу и повышению токсичности, сужая терапевтический индекс. Кроме того, по данным нативного SEC-MS анализа, нативный гемтузумаб-соединение (Ia) демонстрирует гораздо более высокий уровень содержания неконъюгированного антитела, чем конъюгат, полученный на основе CD33AB и содержащий те же молярные эквиваленты полезной нагрузки-линкера. Как правило, низкий уровень содержания неконъюгированного антитела в ADC, как в случае CD33AB-соединения (Ia), является желательным признаком качества. Кроме того, для восстановления гемтузумаба требовалось большее количество TCEP, чем для CD33AB (4,5 против 2,5 молярных эквивалентов). Использование меньшего количества восстановителя, подобно тому как в случае CD33AB-соединения (Ia), для производства ADC желательно для снижения себестоимости продукции и упрощения процесса очистки.

Пример 9: *Активность конъюгатов анти-CD33-неодеградер в отношении моделей лейкозов человека*

[0509] Клетки острого миелоцитарного лейкоза человека MV4-11 (1×10^6 клеток в 0,1 мл) подкожно инокулировали в правый бок самок атимичных мышей nude. Мышей лечили испытываемым препаратом путем внутривенной инъекции в боковую хвостовую вену, внутрибрюшинной инъекции, перорально через зонд или их комбинациями, начиная с момента, когда опухоли достигали размера 150 мм³. Размер опухоли и массу тела мыши измеряли два раза в неделю.

[0510] В соответствии с наблюдениями *in vitro*, лечение *in vivo* CD33-положительной опухоли модели ОМЛ (MV4-11) различными конъюгатами на основе CD33, высвобождающими неодеградер P1, привело к регрессиям опухоли, причем наиболее

стабильный конъюгат (CD33AB-соединение (Ia)) продемонстрировал высокую противоопухолевую эффективность. (фигура 5.)

Пример 10: *Активность конъюгатов анти-CD33-неодеградеров в отношении клеточных линий, нечувствительных к милотаргу*

[0511] Цитотоксичность испытуемых препаратов (ТА) определяли на группе CD33-положительных линий клеток острого миелоидного лейкоза, которые, как известно, нечувствительны к милотаргу (ОМЛ-193 и Kasumi-6). Клетки в заданной концентрации высевались в 96-луночные планшеты, и после ночной инкубации при 37°C/5CO₂ к ним добавлялись серийные разведения каждого испытуемого вещества (ТА). Клетки инкубировали с испытуемыми веществами в течение 72 часов, и жизнеспособность определяли с помощью реагента CellTiter-Glo® (Promega). Значения люминесценции были нормализованы для каждой клеточной линии, и IC50 рассчитывались с помощью программы Prizm.

[0512] Как показано на фигурах 6А и 6В, конъюгат анти-CD33-неодеградер обладал хорошей активностью против обеих клеточных линий.

[0513] Следует понимать, что для толкования формулы изобретения следует использовать раздел "Подробное описание", но не разделы "Сущность изобретения" и "Реферат". В разделах "Сущность изобретения" и "Реферат" могут быть изложены один или несколько, но не все служащие примерами аспекты настоящего раскрытия, предусмотренные изобретателем(ями), и, таким образом, они не предназначены для ограничения настоящего раскрытия и прилагаемой формулы изобретения каким-либо образом.

[0514] Настоящее изобретение было описано выше с помощью функциональных структурных блоков, иллюстрирующих реализацию заданных функций и взаимосвязей между ними. Для удобства описания границы данных структурных функциональных блоков были определены в данном документе произвольно. Можно определить и другие границы, если указанные функции и взаимосвязи будут выполняться надлежащим образом.

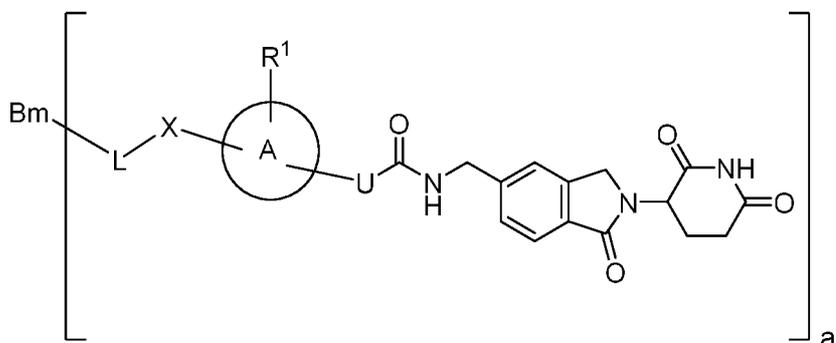
[0515] Вышеприведенное описание конкретных аспектов настолько полно раскрывает общий характер раскрытия, что другие могут, применяя знания в данной области техники, легко модифицировать и/или адаптировать для различных применений

такие конкретные аспекты, без излишних экспериментов, не отступая от общей концепции настоящего раскрытия. Поэтому предполагается, что такие адаптации и модификации находятся в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых аспектов, основанных на представленных в настоящем документе инструкциях и рекомендациях. Следует понимать, что фразеология или терминология, приведенная в настоящем документе, предназначена для описания, но не для ограничения, и терминология или фразеология настоящей спецификации должна интерпретироваться квалифицированным специалистом в свете учений и указаний.

[0516] Широта и объем настоящего раскрытия не должны ограничиваться ни одним из описанных выше служащих примерами аспектов, но должны определяться только в соответствии со следующими пунктами формулы изобретения и их эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

1. Конъюгат формулы (I):



(I),

или его фармацевтически приемлемая соль, где:

a представляет собой целое число от 1 до 10;

A представляет собой фенил или C₄-C₁₀циклоалкильное кольцо;

U выбран из NH и CF₂;

R¹ независимо выбран из водорода и галогена;

X выбран из -NR²-, =C(CH₃)-, -Q-(CH)_{2n}- и -Q(CH)_{2m}Q'(CH)_{2n}-, где

Q и Q' независимо друг от друга представляют собой O, S или N(R)²_v;

v равно 1 или 2;

каждый R² независимо представляет собой водород или C₁-C₆алкил;

n представляет собой целое число от 1 до 6; и

m представляет собой целое число от 2 до 6;

при этом левая часть каждой группы присоединена к L и правая часть присоединена к A; при условии, что когда X представляет собой NH или -Q-(CH)_{2n}-, R¹ представляет собой галоген;

L представляет собой расщепляемый линкер или нерасщепляемый линкер; и

Bm представляет собой анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающую часть, включающую определяющую комплементарность область (CDR) 1 переменной области тяжелой цепи (VH) (VH-CDR1), включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, CDR1 переменной области легкой цепи (VL) (VL-CDR1), включающую аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

2. Конъюгат по п. 1, в котором анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает VH, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и VL, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

3. Конъюгат по п. 1 или 2, в котором анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает константную область, при этом константная область отличается по меньшей мере одной аминокислотой от гемтузумаба.

4. Конъюгат по любому из пп. 1-3, в котором анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть представляет собой антитело IgG1 или его антигенсвязывающую часть.

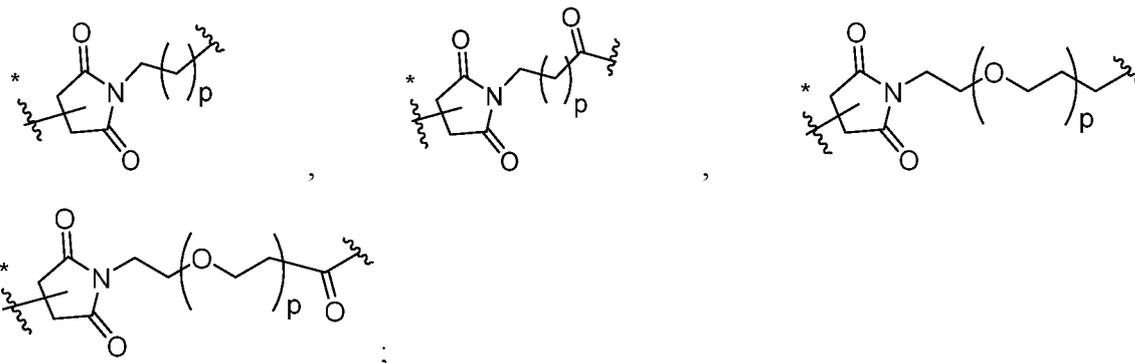
5. Конъюгат по любому из пп. 1-4, в котором анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает аланин в аминокислотном положении 297, соответствующем константной области.

6. Конъюгат по любому из пп. 1-5, в котором анти-CD33 антитело включает тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 10.

7. Конъюгат по любому из пп. 1-6 или его фармацевтически приемлемая соль, где *a* представляет собой целое число от 2 до 8.

8. Конъюгат по любому из пп. 1-7 или его фармацевтически приемлемая соль, где *L* представляет собой нерасщепляемый линкер.

9. Конъюгат формулы 8 или его фармацевтически приемлемая соль, где *L* выбран из группы, состоящей из



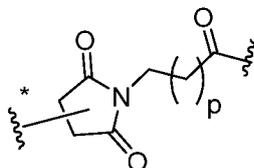
где:

p представляет собой целое число от 1 до 10;

представляет собой точку прикрепления к X; и

представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

10. Конъюгат формулы 9 или его фармацевтически приемлемая соль, где L представляет собой

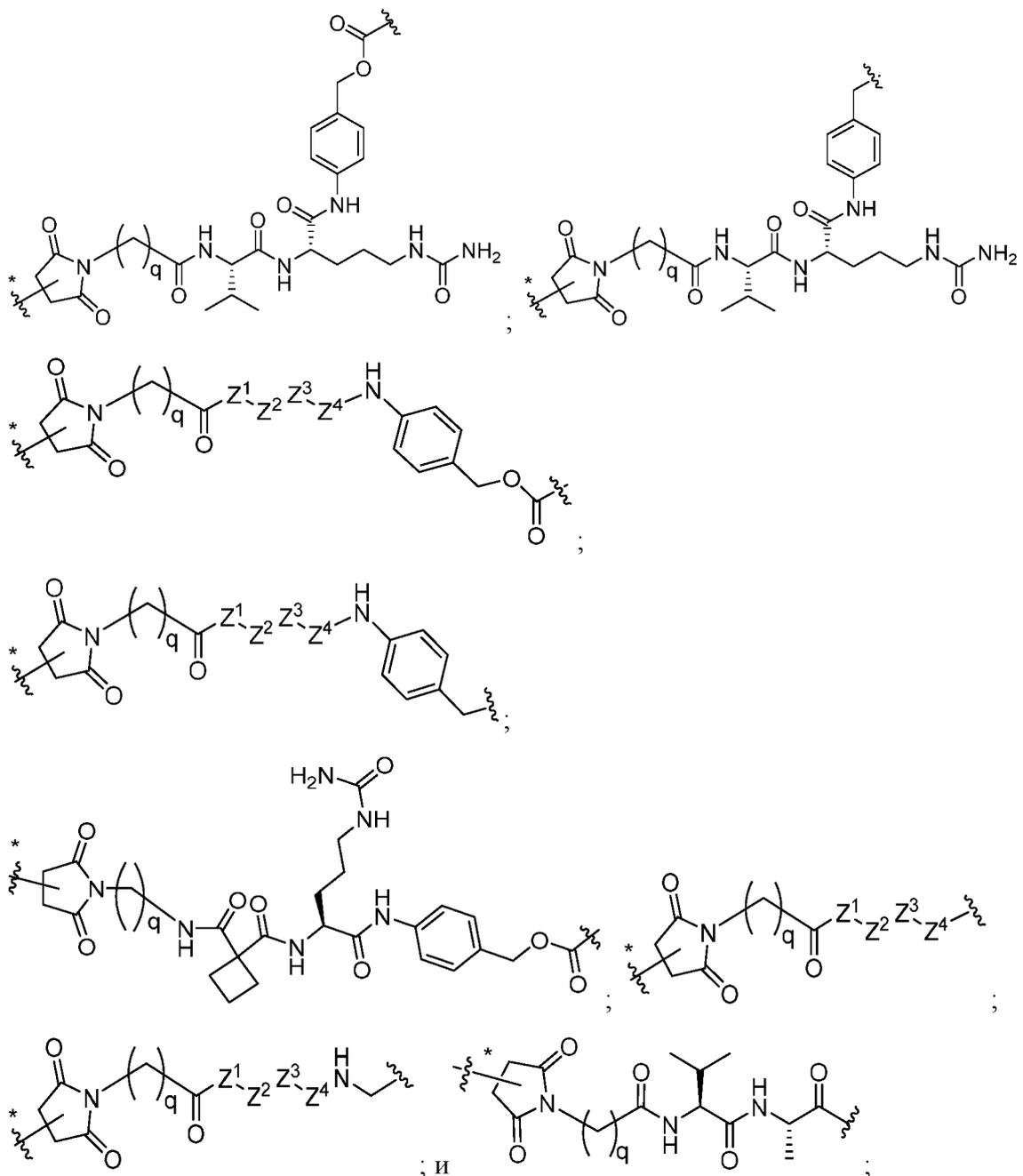


11. Конъюгат по п. 9 или 10, или его фармацевтически приемлемая соль, где p равно 5.

12. Конъюгат по любому из пп. 1-7 или его фармацевтически приемлемая соль, где L представляет собой расщепляемый линкер.

13. Конъюгат по п. 12 или его фармацевтически приемлемая соль, где расщепляемый линкер расщепляется протеазой.

14. Конъюгат по п. 12 или 13 или его фармацевтически приемлемая соль, где L выбран из группы, состоящей из



где:

q представляет собой целое число от 2 до 10;

Z^1 , Z^2 , Z^3 и Z^4 независимо друг от друга отсутствуют или представляют собой природный аминокислотный остаток в L- или D-конфигурации, при условии, что по меньшей мере два из Z^1 , Z^2 , Z^3 и Z^4 являются аминокислотными остатками;

\sim представляет собой точку прикрепления к X; и

\sim^* представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

15. Конъюгат по п. 14 или его фармацевтически приемлемая соль, где Z^1 , Z^2 , Z^3 и Z^4 независимо отсутствуют или выбраны из группы, состоящей из L-валина, D-валина, L-цитруллина, D-цитруллина, L-аланина, D-аланина, L-глутамина, D-глутамина, L-глутаминовой кислоты, D-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты, D-аспарагиновой кислоты, L-аспарагина, D-аспарагина, L-фенилаланина, D-фенилаланина, L-лизина, D-лизина и глицина; при условии, что по меньшей мере два из Z^1 , Z^2 , Z^3 и Z^4 являются аминокислотными остатками.

16. Конъюгат по пункту 15 или его фармацевтически приемлемая соль, где:

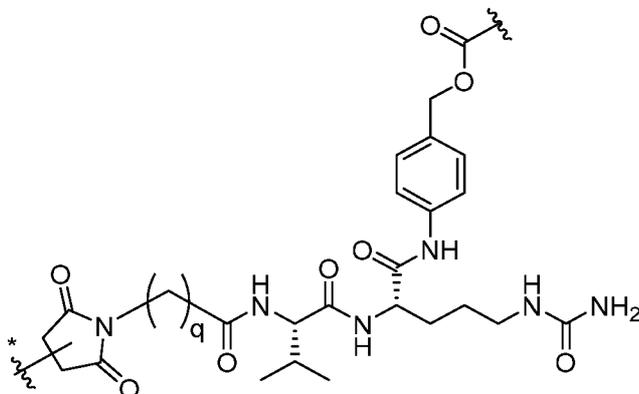
Z^1 отсутствует или представляет собой глицин;

Z^2 отсутствует или выбран из группы, состоящей из L-глутамина, D-глутамина, L-глутаминовой кислоты, D-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты, D-аспарагиновой кислоты, L-аланина, D-аланина и глицина;

Z^3 выбран из группы, состоящей из L-валина, D-валина, L-аланина, D-аланина, L-фенилаланина, D-фенилаланина и глицина; и

Z^4 выбран из группы, состоящей из L-аланина, D-аланина, L-цитруллина, D-цитруллина, L-аспарагина, D-аспарагина, L-лизина, D-лизина, L-фенилаланина, D-фенилаланина и глицина.

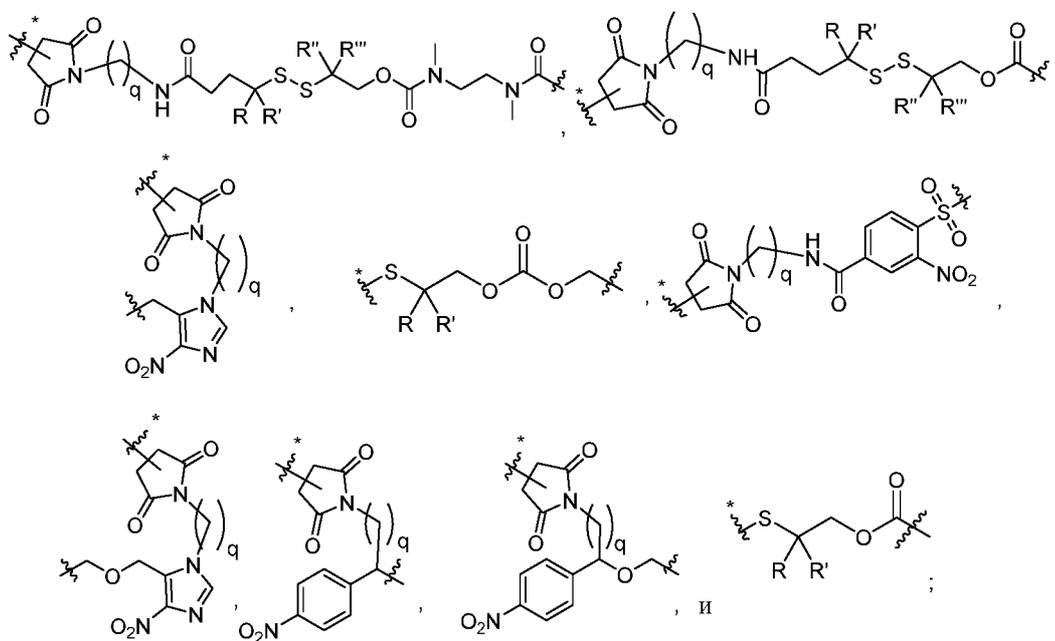
17. Конъюгат по п. 14 или его фармацевтически приемлемая соль, где L представляет собой



18. Конъюгат по п. 17 или его фармацевтически приемлемая соль, где q равно 5.

19. Конъюгат по п. 12 или его фармацевтически приемлемая соль, где L представляет собой биоразлагаемый линкер.

20. Конъюгат по п. 12 или 19, где L выбран из группы, состоящей из



где:

q представляет собой целое число от 2 до 10;

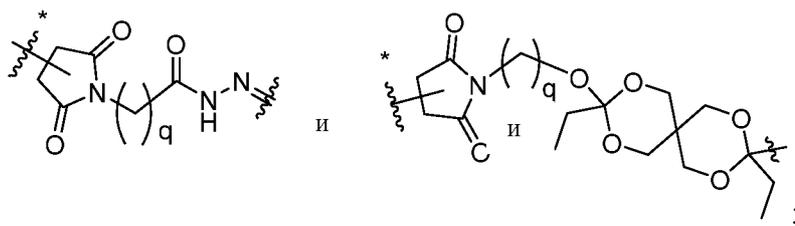
R, R', R'' и R''' независимо выбраны из водорода, C₁-C₆алкоксиC₁-C₆алкила, (C₁-C₆)₂NC₁-C₆алкила и C₁-C₆алкила, или две геминальные группы R, вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, могут образовывать циклобутильное или циклопропильное кольцо;

~ представляет собой точку прикрепления к X; и

* представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

21. Конъюгат по п. 12 или его фармацевтически приемлемая соль, где L представляет собой расщепляемый кислотой линкер.

22. Конъюгат формулы 12 или 21 или его фармацевтически приемлемая соль, где L выбран из группы, состоящей из



где:

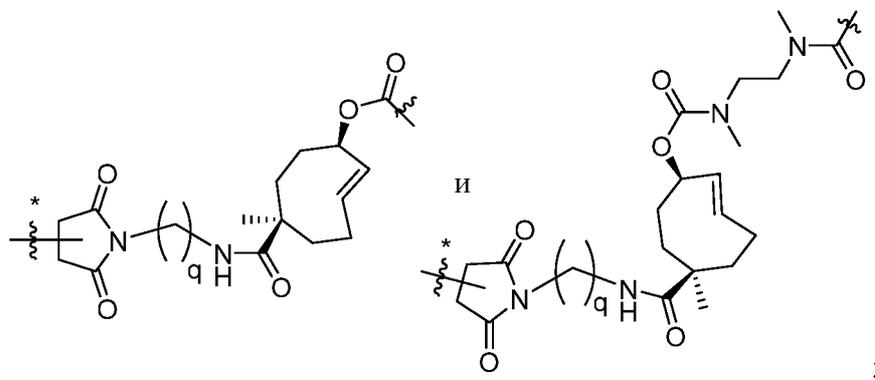
q представляет собой целое число от 2 до 10;

~* представляет собой точку прикрепления к X; и

~* представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

23. Конъюгат по п. 12 или его фармацевтически приемлемая соль, где L представляет собой линкер типа "клик-высвобождение" ("click-to-release").

24. Конъюгат формулы 12 или 23, или его фармацевтически приемлемая соль, где L выбран из



где:

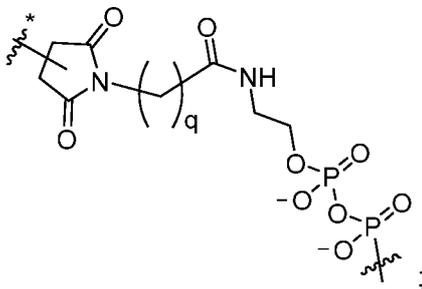
q представляет собой целое число от 2 до 10;

~* представляет собой точку прикрепления к X; и

~* представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

25. Конъюгат по п. 12 или его фармацевтически приемлемая соль, где L представляет собой расщепляемый пирофосфатазой линкер.

26. Конъюгат по п. 25 или его фармацевтически приемлемая соль, где L представляет собой



где:

q представляет собой целое число от 2 до 10;

 представляет собой точку прикрепления к X; и

 представляет собой точку прикрепления к анти-CD33 антителу или его антигенсвязывающей части.

27. Конъюгат по п. 12 или его фармацевтически приемлемая соль, где L представляет собой расщепляемый бета-глюкуронидазой линкер.

28. Конъюгат формулы 12 или 27, или его фармацевтически приемлемая соль, где L выбран из

U представляет собой NH;

R¹ представляет собой галоген; и

X представляет собой -N(R²)_v(CH₂)_mO(CH₂)_n-; где:

v равно 2;

m и n равны 2; и

каждый из R² представляет собой метил.

31. Конъюгат по любому из пп. 1-28, где:

A представляет собой фенил;

U представляет собой NH;

R¹ представляет собой галоген; и

X представляет собой -O(CH₂)_{2n}-; где:

n равно 2.

32. Конъюгат по любому из пп. 1-28, где:

A представляет собой фенил;

U представляет собой NH;

R¹ представляет собой галоген; и

X представляет собой -S(CH₂)_{2n}-; где:

n равно 2.

33. Конъюгат по любому из пп. 1-28, где:

A представляет собой фенил;

U представляет собой NH;

R¹ представляет собой водород; и

X представляет собой --NR²-; где:

R² представляет собой метил.

34. Конъюгат по любому из пп. 1-28, где:

A представляет собой фенил;

U представляет собой NH;

R¹ представляет собой галоген; и

X представляет собой --NR²-; где:

R² представляет собой водород.

35. Конъюгат по любому из пп. 1-28, где:

A представляет собой фенил;

U представляет собой NH;

R¹ представляет собой водород; и

X представляет собой -C(CH₃)=.

36. Конъюгат по любому из пп. 1-28, где:

A представляет собой C₄-C₁₀циклоалкильное кольцо;

U представляет собой NH;

R¹ представляет собой водород; и

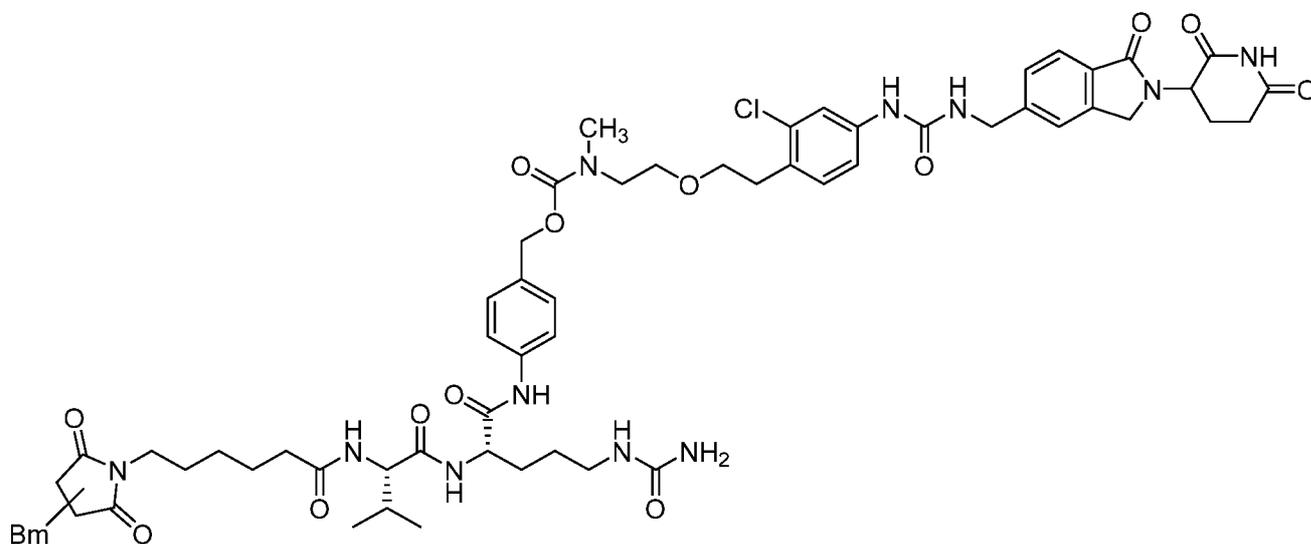
X представляет собой -N(R²)(CH₂)_mO(CH₂)_n-; где:

n равно 1;

m равно 2; и

R² представляет собой метил.

37. Конъюгат формулы (V):

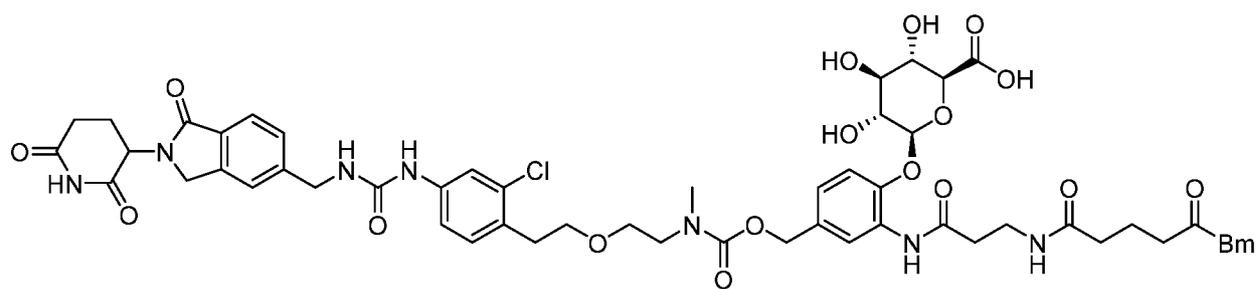


(V);

или его фармацевтически приемлемая соль, где Vm представляет собой анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающую часть, включающую VH-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:

3, VL-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

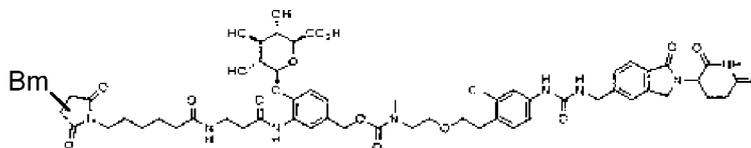
38. Конъюгат формулы (VI):



(VI);

или его фармацевтически приемлемая соль, где Bm представляет собой анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающую часть, включающую VH-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

39. Конъюгат формулы (VII):



(VII);

или его фармацевтически приемлемая соль, где Bm представляет собой анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающую часть, включающую VH-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, VL-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

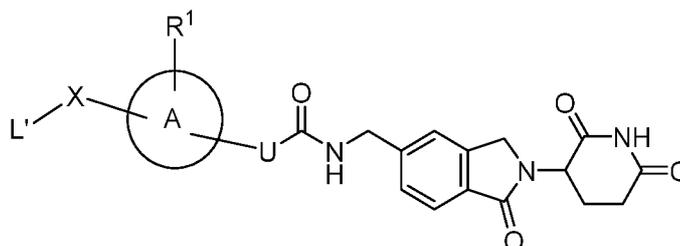
40. Конъюгат по любому из пп. 37-39 или его фармацевтически приемлемая соль, где анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает (i) VH, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и VL, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, или (ii) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

41. Фармацевтическая композиция, включающая конъюгат или соединение по любому из пп. 1-40, или его фармацевтически приемлемую соль, и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

42. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтически приемлемого количества конъюгата или композиции по любому из пп. 1-41 или его фармацевтически приемлемой соли.
43. Способ по п. 42, где рак представляет собой гемобластоз/злокачественное заболевание крови.
44. Способ по п. 42, где рак представляет собой множественную миелому, лейкоз, злокачественную лимфому, болезнь Ходжкина или хроническое миелопролиферативное заболевание.
45. Способ по п. 42, где рак представляет собой острый миелоидный лейкоз или лимфому.
46. Способ по п. 42, где рак представляет собой острый миелоидный лейкоз.
47. Способ по любому из пп. 42-46, где рак устойчив или рефрактерен к милотаргу.
48. Способ лечения миелодиспластического синдрома у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтически приемлемого количества конъюгата или композиции по любому из пп. 1-41 или его фармацевтически приемлемой соли.
49. Способ по любому из пп. 42-48, дополнительно включающий введение субъекту фармацевтически приемлемого количества дополнительного средства до, после или одновременно с конъюгатом по любому из пп. 1-40 или его фармацевтически приемлемой солью.
50. Способ по п. 49, где дополнительным средством является цитотоксическое средство или модификатор иммунного ответа.
51. Способ по п. 50, где модификатор иммунного ответа представляет собой ингибитор контрольных точек.

52. Способ по п. 51, где ингибитор контрольных точек включает ингибитор PD-1, ингибитор PD-L1, ингибитор CTLA-4, ингибитор TIM3 и/или ингибитор LAG-3.

53. Способ получения конъюгата по п. 1 или его фармацевтически приемлемой соли, включающий реакцию взаимодействия анти-CD33 антитела или его антигенсвязывающей части с соединением формулы (I-1):



(I-1),

или его фармацевтически приемлемой солью, где:

a представляет собой целое число от 1 до 10;

A представляет собой фенил или C₄-C₁₀циклоалкильное кольцо;

R¹ независимо выбран из водорода и галогена;

U выбран из NH и CF₂;

X выбран из -N(R²)_v-, =C(CH₃)-, -Q-(CH₂)_n- и -Q(CH₂)_mQ'(CH₂)_n-; где

v равно 1 или 2;

Q и Q' независимо друг от друга представляют собой O, S или NR²;

каждый R² независимо представляет собой водород или C₁-C₆алкил;

n представляет собой целое число от 1 до 6; и

m представляет собой целое число от 2 до 6;

при этом левая часть каждой группы присоединена к L' и правая часть присоединена к A;

при условии, что когда X представляет собой NH или -Q-(CH₂)_{2n}-, R¹ представляет собой галоген;

L' представляет собой предшественник расщепляемого или нерасщепляемого линкера, который конъюгируется с анти-CD33 антителом или его антигенсвязывающей частью, при этом анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает VH-CDR1, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, VH-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, VH-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, CDR1 варибельной области легкой цепи (VL), включающую аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, VL-CDR2, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и VL-CDR3, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

54. Способ по п. 53, где анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает VH, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, и VL, включающую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

55. Способ по п. 53 или 54, где анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает константную область, причем константная область отличается по меньшей мере одной аминокислотой от гемтузумаба.

56. Способ по любому из пп. 53-55, где анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть представляет собой антитело IgG1 или его антигенсвязывающую часть.

57. Способ по любому из пп. 53-56, где анти-CD33 антитело или его антигенсвязывающая часть включает аланин в аминокислотном положении 297, соответствующем константной области.

58. Способ по любому из пп. 53 или 57, где анти-CD33 антитело включает тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 10.

59. Способ по любому из пп. 53-58, дополнительно включающий восстановление анти-CD33 антитела или его антигенсвязывающей части перед реакцией взаимодействия с соединением формулы (I-1).

60. Способ по любому из пп. 53-59, где a представляет собой целое число от 2 до 8.

61. Способ по любому из пп. 53-60, где L' представляет собой предшественник нерасщепляемого линкера, предшественник расщепляемого линкера, предшественник

биоразлагаемого линкера, предшественник расщепляемого кислотой линкера, предшественник расщепляемого пирофосфатазой линкера, предшественник расщепляемого бета-глюконидазой линкера или любую их комбинацию.