

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035625**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.07.17

(21) Номер заявки
201890898

(22) Дата подачи заявки
2016.11.03

(51) Int. Cl. **C07D 413/14** (2006.01)
C07D 413/06 (2006.01)
A61K 31/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) НОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И КОНЪЮГАТЫ КРИПТОФИЦИНА, ИХ ПОЛУЧЕНИЕ И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **15306751.7**

(32) **2015.11.05**

(33) **EP**

(43) **2018.10.31**

(86) **PCT/EP2016/076603**

(87) **WO 2017/076998 2017.05.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САНОФИ (FR)

(72) Изобретатель:
**Биго Антони, Бушар Эрве, Брэн
Мари-Присцилл, Клер Франсуа, Чжан
Цзидун (FR)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) KOTOKU N. ET AL.: "Synthesis of 15,20-triamide analogue with polar substituent on the phenyl ring of arenastatin A, an extremely potent cytotoxic spongean depsipeptide", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, vol. 14, no. 22, 15 November 2006 (2006-11-15), pages 7446-7457, XP027992176, ISSN: 0968-0896 [retrieved on 2006-11-15] tables 2, 3 the whole document compound 27

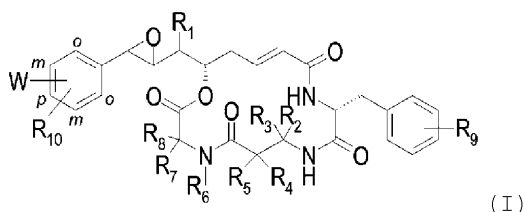
US-A1-2002128185

WO-A1-2011001052

VISHAL A. VERMA ET AL.: "The cryptophycins as potent payloads for antibody drug conjugates", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 25, no. 4, 1 February 2015 (2015-02-01), pages 864-868, XP055212909, ISSN: 0960-894X, DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.12.070 the whole document

MCCOMBS JESSICA R. ET AL.: "Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry", THE AAPS JOURNAL, SPRINGER US, BOSTON, vol. 17, no. 2, 22 January 2015 (2015-01-22), pages 339-351, XP035473697, DOI: 10.1208/S12248-014-9710-8 the whole document

(57) Изобретение относится к соединениям криптофицина формулы (I)

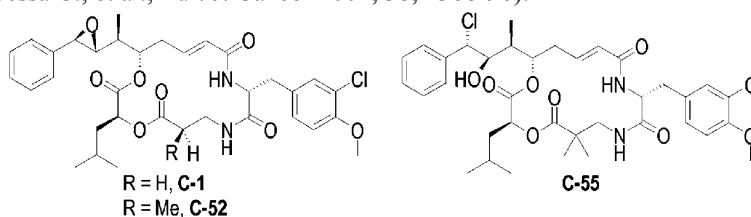


Изобретение также относится к полезным нагрузкам криптофицина, к конъюгатам криптофицина, к композициям, содержащим их, и к их терапевтическому применению, в частности, в качестве противоопухолевых средств. Изобретение также относится к способу получения данных конъюгатов.

B1**035625****035625****B1**

Изобретение относится к новым соединениям криптофицина, новым полезным нагрузкам криптофицина, новым конъюгатам криптофицина, композициям, содержащим их, и их терапевтическому применению, в частности, в качестве противоопухолевых средств. Изобретение также относится к способу получения данных конъюгатов.

Криптофицины представляют собой вторичные метаболиты, принадлежащие к классу депсипептидных макроциклов, продуцируемых цианобактериями рода *Nostoc*. Первый представитель данного класса молекул, криптофицин-1 (C-1), был выделен в 1990 г. из цианобактерии *Nostoc sp* (ATCC 53789; см. Eißler S., et al., *Synthesis* 2006, 22, 3747-3789). В начале 1990-х гг. было обнаружено, что криптофицины C-1 и C-52, которые характеризуются эпоксидной функцией, обладают противоопухолевой активностью *in vitro* и *in vivo*. Хлоргидрины данных C-8 и C-55 были значительно более активными, но не могли быть получены в виде стабильных растворов (Bionpally R.R., et al., *Cancer Chemother Pharmacol* 2003, 52, 25-33). Их более высокая активность коррелировалась с их предполагаемой способностью генерировать соответствующие эпоксиды в клетках. При отсутствии в то время метода адекватной стабилизации хлоргидрина криптофицин C-52 (LY355703) вошел в клинические испытания, продуцировал минимально эффективную противоопухолевую активность в двух фазах II исследований рака легкого с 30-40% устойчивым заболеванием, и, таким образом, исследования были прекращены (Edelman M.J., et al., *Lung Cancer* 2003, 39, 197-99 и Sessa C., et al., *Eur. J. Cancer* 2002, 38, 2388-96).



Учитывая их высокую эффективность и общий механизм действия с майтанзиноидами и ауристатинами, две цитотоксические молекулы, утвержденные в клинике для конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), данную серию рассматривали как потенциальное тубулиновое связующее вещество для ADC. Поэтому конъюгаты в серии криптофицинов были разработаны, исходя из получения производных в пара-бензильном положении макроцикла (Al-Awar R.S., et al., *J. Med. Chem* 2003, 46, 2985-3007).

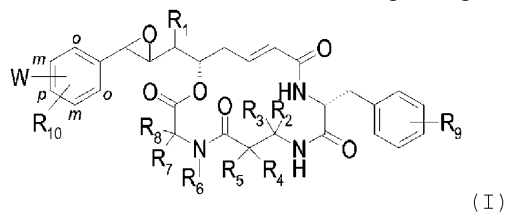
В WO 2011/001052 описаны конъюгаты криптофицина антитело-лекарственное средство, в которых цитотоксический фрагмент связан с антителом через пара-бензильное положение с использованием различных видов линкеров. Они могут быть расщепляемыми, дисульфидными, или протеазачувствительными, или нерасщепляемыми.

Дальнейшая оптимизация конъюгатов криптофицина антитело-лекарственное средство, описанных в WO 2011/001052, приводила к эффективным конъюгатам криптофицина, которые проявляли перспективную противоопухолевую активность, но являлись неустойчивыми в плазме мышей, в то время как были стабильными в плазме негрызунов. Следовательно, существовала потребность в конъюгатах криптофицина, обладающих улучшенными свойствами стабильности.

Целью данного изобретения является предложение новых макроциклов криптофицина, которые после конъюгирования с антителом являются стабильными в плазме мышей, и новых конъюгатов криптофицина, состоящих из данных стабильных макроциклов.

Сущность изобретения

В этом отношении изобретение относится к соединениям криптофицина формулы (I)



в которой

- R_1 представляет собой (C_1-C_6) алкильную группу;
- R_2 представляет собой атом водорода или (C_1-C_6) алкильную группу;
- R_3 представляет собой атом водорода;
- или, альтернативно, R_2 и R_3 образуют вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, (C_3-C_6) циклоалкильную группу;
- R_4 представляет собой (C_1-C_6) алкильную группу или группу (C_1-C_6) алкил-ОН;
- R_5 представляют собой (C_1-C_6) алкильную группу;
- R_6 представляет собой атом водорода;
- R_7 представляет собой (C_1-C_6) алкильную группу;

R_8 представляет собой атом водорода;

R₉ представляет собой один или два заместителя фенильного ядра, выбранных независимо друг от друга из атома водорода, (C₁-C₄)алкокси или атома галогена;

R_{10} представляет собой четыре заместителя фенильного ядра, выбранных из атома водорода;

W представляет собой

(C₁-C₆)алкил-NH(R₁₁), более конкретно (CH₂)_nNHR₁₁;

(C₁-C₆)алкил-ОН, более конкретно (CH₂)_nОН; или

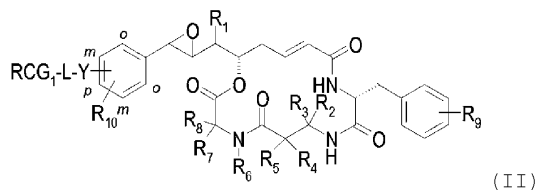
(C₁-C₆)алкил-N₃;

W располагается в орто- (о), мета- (м) или пара- (п) положении фенильного ядра;

R_{11} представляет собой атом водорода;

n представляет собой целое число от 1 до 6.

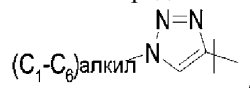
Изобретение дополнительно относится к полезным нагрузкам криптофицина формулы (II)



в которой

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} представляют собой, как определено в формуле (I);

Y представляет собой (C₁-C₆)алкил-NR₁₁ или (C₁-C₆)алкил-O; или альтернативно Y представляет собой C(=O)O или C(=O)NH; или альтернативно Y представляет собой (C₁-C₆)алкилтриазольную группу



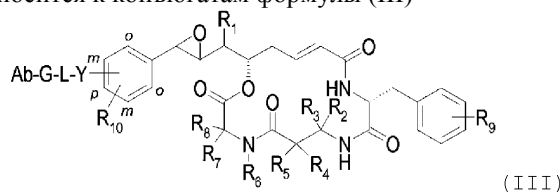
Y располагается в орто- (о), мета- (м) или пара- (п) положении фенильного ядра;

R_{11} представляет собой атом водорода;

L представляет собой линкер;

RCG1 представляет собой реакционноспособную химическую группу, присутствующую на конце линкера, причем RCG1 является реакционноспособной по отношению к реакционноспособной химической группе, присутствующей на антителе.

Изобретение также относится к конъюгатам формулы (III)



в которой

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} представляют собой, как определено в формуле (I);

Y и L представляют собой, как определено в формуле (II);

G представляет собой продукт взаимодействия между RCG1, реакционноспособной химической группой, присутствующей на конце линкера, и RCG2, ортогональной реакционноспособной химической группой, присутствующей на антителе (Ab);

Ab представляет собой антитело.

Каждый заместитель от R_1 до R_{11} может также принимать одну из пространственных конфигураций (например, R или S или, альтернативно, Z или E), как описано в примерах.

Соединения формулы (I), (II) и (III) могут содержать один или более асимметрических атомов углерода. Поэтому они могут существовать в форме энантиомеров или диастереомеров. Данные энантиомеры и диастереомеры, а также их смеси, включая рацемические смеси, являются частью изобретения.

Соединения формулы (I), включая проиллюстрированные соединения, могут существовать в форме основно- или кислотно-аддитивных солей, в частности фармацевтически приемлемых кислот.

Определения.

В контексте настоящего изобретения определенные термины имеют следующие определения.

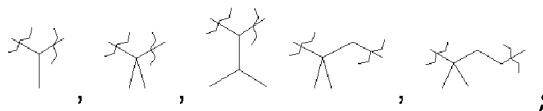
Алкенильная группа - углеводородная группа, полученная удалением одного атома водорода из алкена. Алкенильная группа может быть линейной или разветвленной. Примеры, которые могут быть упомянуты, включают этенил ($-\text{CH}=\text{CH}_2$, также называемый винил) и пропенил ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$, также называемый аллил).

Алкоксигруппа - -О-алкильная группа, в которой алкильная группа представляет собой, как определено ниже.

Алкильная группа - линейная или разветвленная насыщенная алифатическая углеводородная груп-

па, полученная удалением атома водорода из алкана. Примеры, которые могут быть упомянуты, включают метильную, этильную, пропильную, изопропильную, бутильную, изобутильную, трет-бутильную, пентильную, неопентильную, 2,2-диметилпропильную и гексильную группы.

Алкиленовая группа - насыщенная двухвалентная группа эмпирической формулы $-C_nH_{2n}-$, полученная удалением двух атомов водорода из алкана. Алкиленовая группа может быть линейной или разветвленной. Примеры, которые могут быть упомянуты, включают метилен (CH_2-), этилен ($-CH_2CH_2-$), пропилен ($-CH_2CH_2CH_2-$), бутилен ($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$) и гексилан ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$) или следующие разветвленные группы



предпочтительно алкиленовая группа имеет формулу $-(CH_2)_n-$, n представляет собой целое число; в диапазоны значений включены предельные значения (например, диапазон типа " n в диапазоне от 1 до 6" или "от 1 до 6" включает предельные значения 1 и 6).

Антитело - антитело с аффинностью к биологической мишени, более определенно моноклональное антитело. Функция антитела состоит в том, чтобы направлять биологически активное соединение в виде цитотоксического соединения в направлении биологической мишени. Антитело может быть моноклональным, поликлональным или мультиспецифическим; оно также может быть фрагментом антитела; оно может также представлять собой мышиное, химерное, гуманизированное или человеческое антитело. "Антитело" может быть природным или стандартным антителом, в котором две тяжелые цепи связаны друг с другом дисульфидными связями и каждая тяжелая цепь связана с легкой цепью дисульфидной связью (также называемое "полноразмерным антителом"). Термины "стандартное (или полноразмерное) антитело" относятся как к антителу, содержащему сигнальный пептид (или пропептид, если он есть), так и к зрелой форме, полученной при секреции и протеолитическом процессинге цепи(ей). Существует два типа легкой цепи: λ и κ . Существует пять основных классов тяжелой цепи (или изоформ), которые определяют функциональную активность молекулы антитела: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Каждая цепь содержит различные последовательности доменов. Легкая цепь включает два домена или области, переменный домен (VL) и константный домен (CL). Тяжелая цепь включает четыре домена, переменный домен (VH) и три константных домена (CH1, CH2 и CH3, вместе называемые CH). Переменные области как легкой (VL), так и тяжелой (VH) цепи определяют распознавание связывания и специфичность к антигену. Константные домены легкой (CL) и тяжелой (VH) цепи придают важные биологические свойства, такие как ассоциация цепей антител, секреция, трансплацентарная подвижность, связывание с компонентом и связывание с Fc-рецепторами (FcR). Fv-фрагмент представляет собой N-концевую часть Fab-фрагмента иммуноглобулина и состоит из переменных частей одной легкой цепи и одной тяжелой цепи. Специфичность антитела заключается в структурной комплементарности между сайтом объединения антител и антигенной детерминантой. Сайты связывания антител составлены из остатков, происходящих в основном из гипервариабельных или определяющих комплементарность областей (CDR). Иногда остатки из негипервариабельных или каркасных областей (FR) влияют на общую структуру домена и, следовательно, сайта связывания. Определяющие комплементарность области или CDRs относятся к аминокислотным последовательностям, которые вместе определяют аффинность связывания и специфичность природной Fv-области сайта связывания нативного иммуноглобулина. Легкая и тяжелая цепи иммуноглобулина, каждая, имеет три CDRs, обозначенные CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L и CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H соответственно. Таким образом, стандартный антигенсвязывающий участок антитела включает шесть CDRs, содержащих набор CDR из каждой из V-области тяжелой и легкой цепи.

Используемый в настоящем описании термин "антитело" обозначает как стандартные (полноразмерные) антитела, так и их фрагменты, также как однодоменные антитела и их фрагменты, в частности переменные тяжелые цепи однодоменных антител. Фрагменты (стандартных) антител обычно содержат часть интактного антитела, в частности антигенсвязывающую область или переменную область интактного антитела, и сохраняют биологическую функцию стандартного антитела. Примеры таких фрагментов включают Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fab' , dsFv, $(dsFv)_2$, scFv, $sc(Fv)_2$ и диатела.

Функция антитела состоит в том, чтобы направлять биологически активное соединение в виде цитотоксического соединения в направлении биологической мишени.

Арильная группа - циклическая ароматическая группа, содержащая от 5 до 10 атомов углерода. Примеры арильных групп включают фенил, толил, ксиллил, нафтил.

Биологическая мишень - антиген (или группа антигенов), предпочтительно расположенный на поверхности раковых клеток или стромальных клеток, связанных с данной опухолью; данные антигены могут быть, например, рецептором фактора роста, онкогенным продуктом или продуктом мутантного гена "подавителя опухоли", связанной с ангиогенезом молекулой или молекулой адгезии.

Конъюгат - антитело-лекарственное средство или ADC, т.е. антитело, к которому ковалентно присоединено через линкер, по меньшей мере одна молекула цитотоксического соединения.

Циклоалкильная группа - циклическая алкильная группа, содержащая от 3 до 6 атомов углерода,

участвующих в циклической структуре. Примеры, которые могут быть упомянуты, включают циклопропильную, циклобутильную, цикlopентильную и циклогексильную группы.

DAR (соотношение лекарственного средства и антитела) - среднее количество цитотоксических молекул, присоединенных через линкер к антителу.

Галоген - любой из четырех элементов: фтор, хлор, бром и йод.

Гетероарильная группа - арильная группа, содержащая от 2 до 10 атомов углерода и от 1 до 5 гетероатомов, таких как азот, кислород или сера, включенных в кольцо и связанных с атомами углерода, образующими кольцо. Примеры гетероарильных групп включают пиридил, пиримидил, тиенил, имидазол, триазол, индолил, имидазопиридил, пиразол.

Гетероциклоалкильная группа - циклоалкильная группа, содержащая от 2 до 8 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, таких как азот, кислород или сера, включенных в кольцо и связанных с атомами углерода, образующими кольцо. Примеры включают азиридины, пирролидины, пиперидины, пиперазины, морфолины, тиоморфолины, тетрагидрофураны, тетрагидротиафураны, тетрагидропираны, азетидины, оксетаны и пираны.

Линкер - группа атомов или одинарная связь, которая может ковалентно присоединить цитотоксическое соединение к антителу для образования конъюгата.

Фрагмент - более простые молекулы, которые обеспечивают полный синтез соединений криптофицина.

Полезная нагрузка - цитотоксическое соединение, к которому ковалентно присоединен линкер.

Реакционноспособная химическая группа - группа атомов, способная содействовать или подвергаться химической реакции.

Сокращения.

ADC - конъюгат антитело-лекарственное средство;

AcOH - уксусная кислота;

AIBN - азобисизобутиронитрил;

ALK - (C_1-C_{12}) алкиленовая группа, более конкретно (C_1-C_6) алкилен, более конкретно формы $-(CH_2)_n-$, причем n представляет собой целое число от 1 до 12 и предпочтительно от 1 до 6;

водн. - водный;

Ar - аргон;

AUC - площадь под кривой;

BEMP - 2-трет-бутилимино-2-диэтиламино-1,3-диметилпергидро-1,3,2-диазафосфорин;

BF₃ - трифторид бора;

Boc₂O - ди-трет-бутилдикарбонат;

BuLi - бутиллитий;

ЦАН - церий аммоний нитрат;

Cbz - карбоксибензил;

CHCl₃ - хлороформ;

CH₃CN - ацетонитрил;

CH₃I - метилиодид;

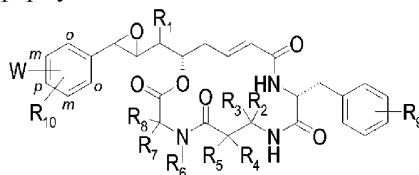
CO₂ - диоксид углерода;

CL - клиренс;

m-CPBA - m-хлорпербензойная кислота;

CR - полный ответ;

крипто обозначает единицу формулы



крипто, в частности, обозначает одно из соединений криптофицина D₁-D₁₉, описанных ниже, или соединение криптофицина примера; D₁ относится к ADC с DAR 1, D₂ к ADC с DAR 2 и т.д.;

д - день;

DAR - соотношение лекарственного средства и антитела;

DBU - 8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен;

ДЦК - N,N'-дициклогексилкарбодиимид;

ДХЭ - дихлорэтан;

ДХМ - дихлорметан;

DDQ - 2,3-дихлор-5,6-дициано-1,4-бензохинон;

ДИК - N,N'-диизопропилкарбодиимид;

DIAD - диизопропилазодикарбоксилат;

DIEA - N,N-диизопропилэтиламин;
 ДМА - диметилацетамид;
 ДМАП - 4-(диметиламино)пиридин;
 ДМЭ - диметоксиэтан;
 DMEM - модифицированная по способу Дульбекко среда Игла;
 DMEM/F12 - модифицированная по способу Дульбекко среда Игла с питательной смесью F-12;
 ДМФ - диметилформамид;
 ДМСО - диметилсульфоксид;
 DPBS - фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко;
 ДФФА - дифенилфосфоразид $(\text{PhO})_2\text{P}(=\text{O})\text{N}_3$;
 ДСК - N,N'-дисукцинимидилкарбонат;
 ЭДА - этилендиамин;
 ЭДК - 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимид;
 ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота;
 EEDQ - N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин;
 ELSD - испарительный детектор светорассеяния;
 экв. - эквивалент;
 ES - электрораспыление;
 EtOAc - этилацетат;
 Et₂O - диэтиловый эфир;
 EtOH - этанол;
 Пр. - пример;
 ФБС - фетальная бычья сыворотка;
 Fmoc - 9-флуоренилметоксикарбонил;
 FmocOSu - N-(9-флуоренилметоксикарбонилокси)сукцинимид;
 GI - электроиндуктивная группа;
 катализатор Граббса I - бензилиден-бис(трициклогексилфосфин)дихлорутений;
 катализатор Граббса II - (1,3-бис(2,4,6-триметилфенил)-2-имидазолидинилиден)дихлор(фенилметил)ен(трициклогексилфосфин)рутений;
 ч - час;
 H₂O - вода;
 Гал - галоген;
 NATU - 1-[бис(диметиламино)метил]ен-1-Н-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиний-3-оксида гексафторфосфат;
 HCl - хлористоводородная кислота;
 NEPES - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота;
 НС - хроматография гидрофобного взаимодействия;
 NOAt - 1-гидрокси-7-азабензотриазол;
 NOBt - 1-гидроксибензотриазол;
 ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография;
 МСВР - масс-спектрометрия высокого разрешения;
 IC₅₀ - средняя ингибирующая концентрация;
 т.е. - означает, что есть;
 ИЕС - ионообменная хроматография;
 iPrOH - 2-пропанол;
 iPr₂O - диизопропиловый эфир;
 в/в - внутривенный;
 K₂CO₃ - карбонат калия;
 LDA - диизопропиламид лития;
 LiOH: гидроксид лития;
 незнач. - незначительно;
 MeOH - метанол;
 MeТГФ - 2-метилтетрагидрофуран;
 MgSO₄ - сульфат магния;
 Мин - минута;
 MNBA - 2-метил-6-нитробензойный ангидрид;
 МТБЭ - метил-трет-бутиловый эфир;
 МПД - максимальная переносимая доза;
 NaH - гидрид натрия;
 NaHSO₄ - бисульфат натрия;
 Na₂S₂O₃ - тиосульфат натрия;
 NaCl - хлорид натрия;

NaHCO_3 - гидрокарбонат натрия;
 NaHSO_3 - бисульфит натрия;
 NaHSO_4 - гидросульфат натрия;
 NaOH - гидроксид натрия;
 NH_4Cl - хлорид аммония;
 NHS - N-гидроксисукцинимид;
 NMP - 1-метил-2-пирролидон;
 ЯМР - ядерный магнитный резонанс;
 $\text{P}_2\text{-Et}$ - 1-этил-2,2,4,4,4-пентакис (диметиламино)-2λ5,4λ5-катенади (фосфазен);
 ФСБ - фосфатно-солевой буфер;
 ПЭГ - полиэтиленгликоль;
 ФК - фармакокинетика;
 ПМБ - параметоксibenзил;
 PNGase F - пептид-N-гликозидаза F;
 PPh_3 - трифенилфосфин;
 м.д. - миллионная доля;
 PR - частичный ответ;
 QS - достаточное количество, означает количество, которое необходимо;
 Q-ToF - квадрупольный времяпролетный;
 колич. - количественный выход;
 RCG - реакционноспособная химическая группа;
 КТ - комнатная температура;
 насыщ. - насыщенный;
 п.к. - подкожно;
 SCID - тяжелый комбинированный иммунодефицит;
 SEC - эксклюзионная хроматография;
 TBAF - тетрабутиламмония фторид;
 tBuOK - трет-бутоксид калия;
 TCEP - трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид;
 ТЭА - триэтиламин;
 TEMPO - (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил;
 ТФУК - трифторуксусная кислота;
 TFS - выживший без опухоли;
 ТГФ - тетрагидрофуран;
 ТГП - тетрагидропиран;
 TSCX - тонкослойная хроматография;
 $t_{1/2}$ - период полувыведения;
 t_R - время удерживания;
 п-TsOH - паратолуолсульфо́кислота;
 СВЭЖХ - сверхэффективная жидкостная хроматография;
 УФ - ультрафиолетовый;
 V_{ss} - кажущийся объем распределения в стабильном состоянии.

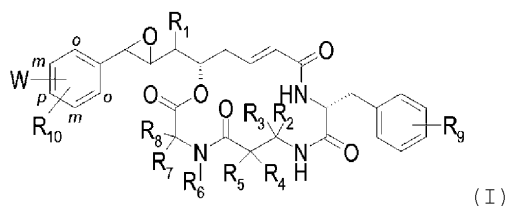
Описание фигур

Фиг. 1 - масс-спектр высокого разрешения пр. 3;
 фиг. 2 - масс-спектр высокого разрешения пр. 7;
 фиг. 3 - масс-спектр высокого разрешения пр. 10;
 фиг. 4 - масс-спектр высокого разрешения пр. 14;
 фиг. 5 - масс-спектр высокого разрешения пр. 20;
 фиг. 6 - масс-спектр высокого разрешения пр. 23;
 фиг. 7 - эффективность *in vivo* пр. 3 в отношении ксенотрансплантата MDA-MB-231 у мышей SCID;
 фиг. 8 - эффективность *in vivo* пр. 7 в отношении ксенотрансплантата MDA-MB-231 у мышей SCID;
 фиг. 9 - эффективность *in vivo* пр. 10 в отношении ксенотрансплантата MDA-MB-231 у мышей SCID;
 фиг. 10 - эффективность *in vivo* пр. 14 в отношении ксенотрансплантата MDA-MB-231 у мышей SCID;
 фиг. 11 - эффективность *in vivo* пр. 20 в отношении ксенотрансплантата MDA-MB-231 у мышей SCID;
 фиг. 12 - эффективность *in vivo* пр. 23 в отношении ксенотрансплантата MDA-MB-231 у мышей SCID;
 фиг. 13 - ФК-профиль *in vivo* ADC1 после однократного в/в введения у мышей SCID;
 фиг. 14 - ФК-профиль *in vivo* ADC1 после однократного в/в введения у негрызунов;
 фиг. 15 - ФК-профиль *in vivo* пр. 3 после однократного в/в введения у мышей SCID;

- фиг. 16 - ФК-профиль *in vivo* пр. 7 после однократного в/в введения у мышей SCID;
 фиг. 17 - спектр МСВР дегликозилированного ADC1 через 96 ч после однократного в/в введения у мышей SCID;
 фиг. 18 - спектр МСВР легкой цепи ADC2 через 96 ч после однократного в/в введения у мышей SCID;
 фиг. 19 - спектр МСВР дегликозилированного ADC1 через 6 д. после однократного в/в введения у негрызунов;
 фиг. 20 - спектр МСВР пр. 3 через 96 ч после однократного в/в введения у мышей SCID;
 фиг. 21 - спектр МСВР пр. 7 через 96 ч после однократного в/в введения у мышей SCID;
 фиг. 22 - спектр МСВР пр. 10 через 96 ч после однократного в/в введения у мышей SCID;
 фиг. 23 - спектр МСВР пр. 14 через 96 ч после однократного в/в введения у мышей SCID;
 фиг. 24 - спектр МСВР пр. 20 через 96 ч после однократного в/в введения у мышей SCID;
 фиг. 25 - спектр МСВР пр. 23 через 96 ч после однократного в/в введения у мышей SCID.

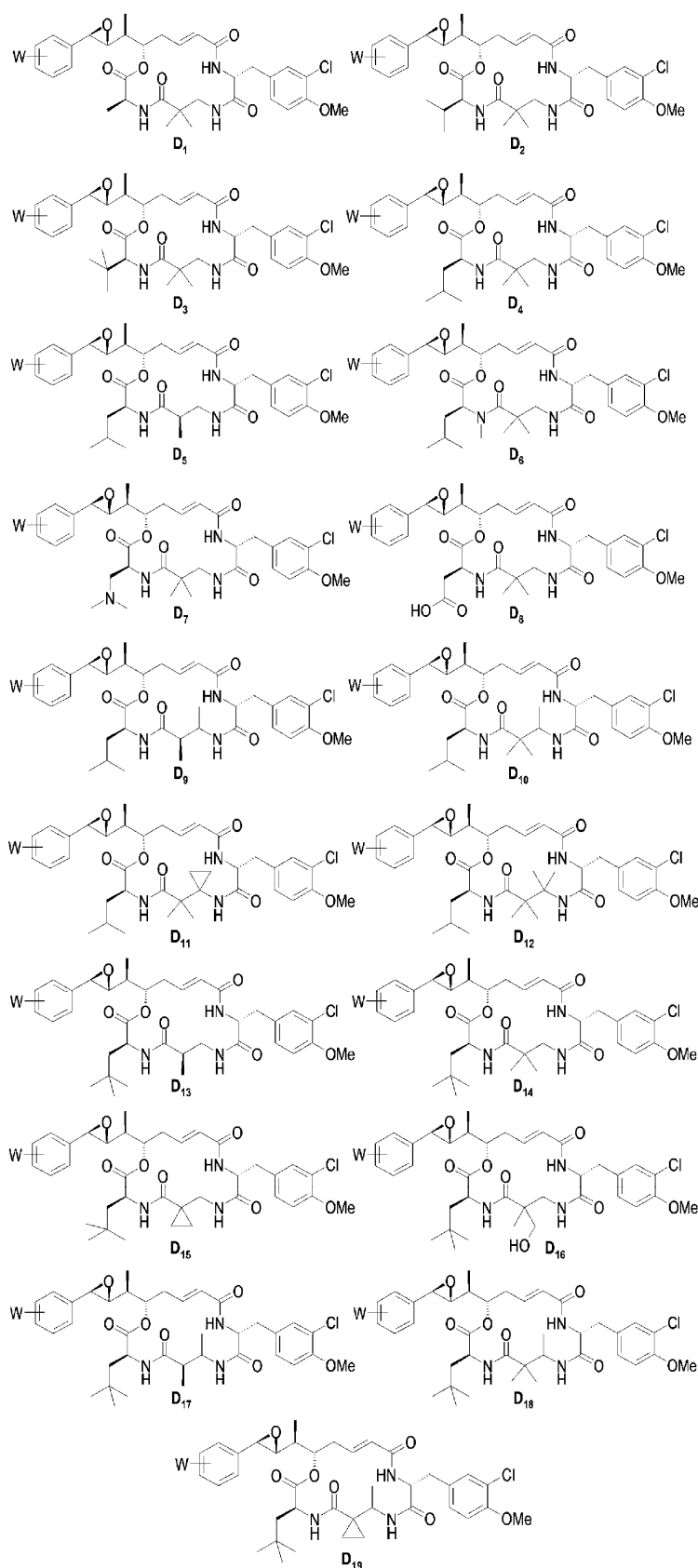
Подробное описание изобретения

Изобретение относится к соединениям криптофицина формулы (I)



в которой

- R_1 представляет собой (C_1-C_6) алкильную группу;
 R_2 представляет собой атом водорода или (C_1-C_6) алкильную группу;
 R_3 представляет собой атом водорода;
 или, альтернативно, R_2 и R_3 образуют вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, (C_3-C_6) циклоалкильную группу;
 R_4 представляет собой или (C_1-C_6) алкильную группу, или группу (C_1-C_6) алкил-ОН;
 R_5 представляет собой (C_1-C_6) алкильную группу;
 R_6 представляет собой атом водорода;
 R_7 представляет собой (C_1-C_6) алкильную группу;
 R_8 представляет собой атом водорода;
 R_9 представляет собой один или два заместителя фенильного ядра, выбранных независимо друг от друга из атома водорода, (C_1-C_4) алкокси или атома галогена;
 R_{10} представляет собой четыре заместителя фенильного ядра, выбранных из атома водорода;
 W представляет собой
 (C_1-C_6) алкил- $NH(R_{11})$, более конкретно $(CH_2)_nNHR_{11}$;
 (C_1-C_6) алкил-ОН, более конкретно $(CH_2)_nOH$ или
 (C_1-C_6) алкил- N_3 ;
 W располагается в орто- (o), мета- (m) или пара- (p) положении фенильного ядра;
 R_{11} представляет собой атом водорода;
 n представляет собой целое число от 1 до 6.
 Соединение криптофицина может представлять собой одно из следующих D_1-D_{19} :



в котором

W и R₁₂ представляют собой, как определено в формуле (I);

или соединение криптофицина может являться эквивалентной единицей, описанной в одном из примеров.

Среди соединений формулы (I), которые являются объектом изобретения, первая группа соединений состоит из соединений, для которых R₁ представляет собой (C₁-C₆)алкил, в частности метильную

группу.

Среди соединений формулы (I), которые являются объектом изобретения, вторая группа соединений состоит из соединений, для которых каждый из R_2 и R_3 представляет собой атом водорода.

Среди соединений формулы (I), которые являются объектом изобретения, третья группа соединений состоит из соединений, для которых один из R_2 и R_3 представляет собой (C_1-C_6) алкил, в частности метильную группу, и другой представляет собой атом водорода.

Среди соединений формулы (I), которые являются объектом изобретения, четвертая группа соединений состоит из соединений, для которых R_2 и R_3 образуют вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, (C_3-C_6) циклоалкильную группу, в частности циклопропильную группу.

Среди соединений формулы (I), которые являются объектом изобретения, пятая группа соединений состоит из соединений, для которых каждый из R_4 и R_5 представляет собой (C_1-C_6) алкил, в частности метильную группу.

Среди соединений формулы (I), которые являются объектом изобретения, восьмая группа соединений состоит из соединений, для которых R_9 представляет собой два заместителя, выбранных из метоксигруппы и атома хлора. Более конкретно, фенильное ядро содержит два заместителя в положениях 3 и 4 на фенильном ядре. Предпочтительными являются 3-Cl и 4-метокси.

Среди соединений формулы (I), которые являются объектом изобретения, десятая группа соединений состоит из соединений, для которых W располагается в пара-положении фенильного ядра.

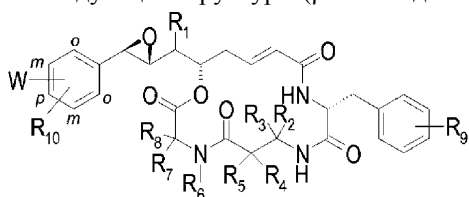
Среди соединений формулы (I), которые являются объектом изобретения, одиннадцатая группа соединений состоит из соединений, для которых W выбран из (C_1-C_6) алкил- NHR_{11} , в частности (C_1-C_3) алкил- NHR_{11} , в частности группы CH_2-NH_2 , (C_1-C_6) алкил-OH, в частности (C_1-C_3) алкил-OH, в частности группы CH_2-OH .

Среди соединений формулы (I), которые являются объектом изобретения, двенадцатая группа соединений состоит из соединений, для которых R_1 представляет собой (C_1-C_6) алкил, в частности метильную группу, каждый из R_2 и R_3 представляет собой атом водорода, R_6 представляет собой атом водорода, R_9 представляет собой два заместителя, выбранных из метоксигруппы и атома хлора, более конкретно фенильное ядро содержит два заместителя в положениях 3 и 4 на фенильном ядре, предпочтительными являются 3-Cl и 4-метокси, и R_{10} представляет собой атом водорода.

Среди соединений формулы (I), которые являются объектом изобретения, тринадцатая группа соединений состоит из соединений, для которых R_1 представляет собой (C_1-C_6) алкил, в частности метильную группу, R_2 и R_3 представляет собой (C_1-C_6) алкил, в частности метильную группу, и другой представляет собой атом водорода, R_6 представляет собой атом водорода, R_9 представляет собой два заместителя, выбранных из метоксигруппы и атома хлора, более конкретно фенильное ядро содержит два заместителя в положениях 3 и 4 на фенильном ядре, предпочтительными являются 3-Cl и 4-метокси, и R_{10} представляет собой атом водорода.

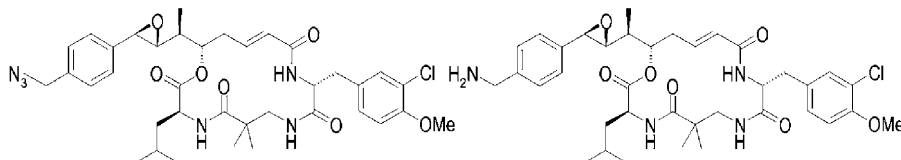
Альтернативно, W выбран из $(CH_2)_nNHR_{11}$ и $(CH_2)_nOH$, в которой n представляет собой целое число от 1 до 6.

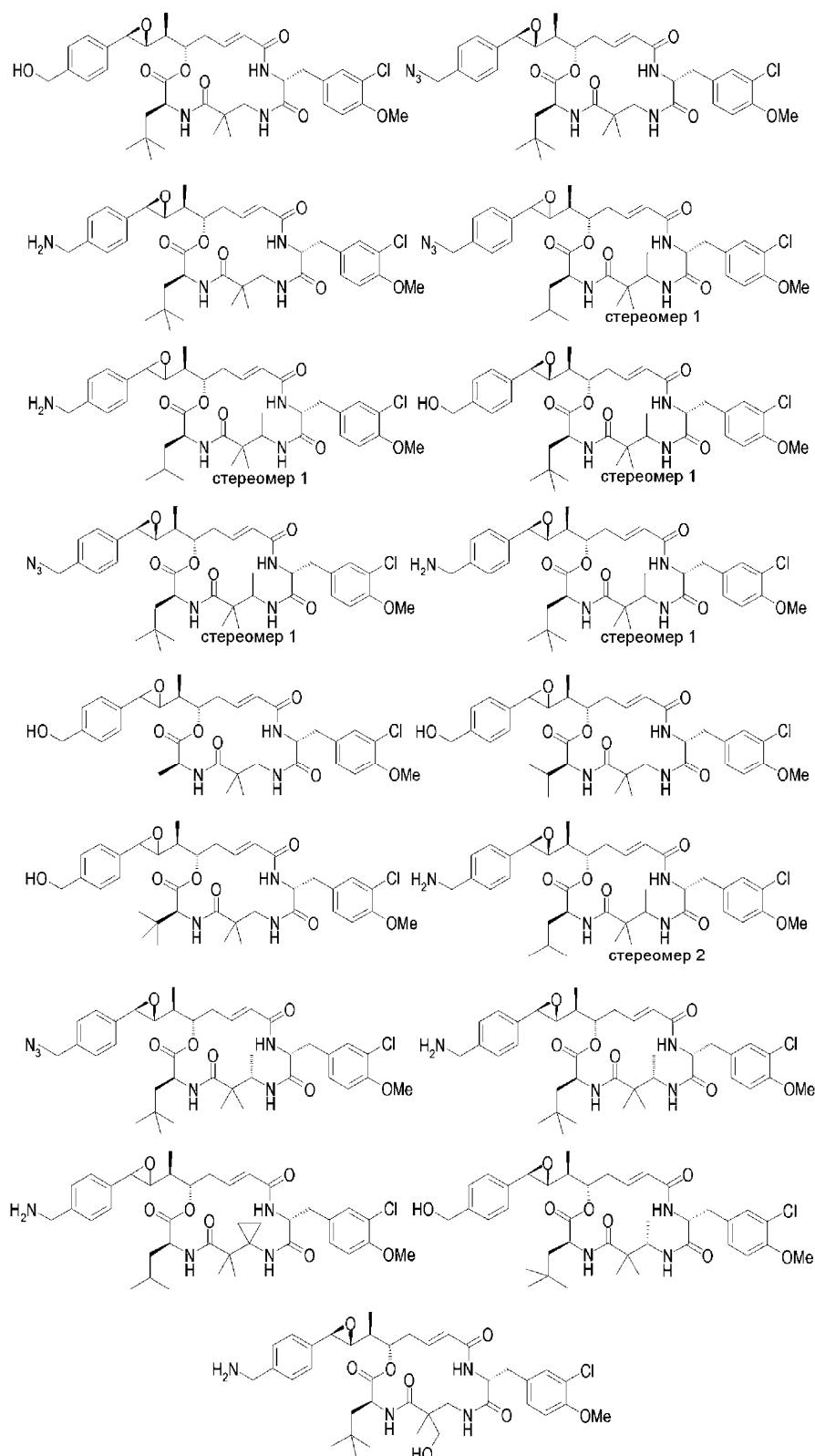
Среди соединений формулы (I), которые являются объектом изобретения, четырнадцатая группа соединений состоит из соединений следующей структуры (β -эпоксидная конфигурация):



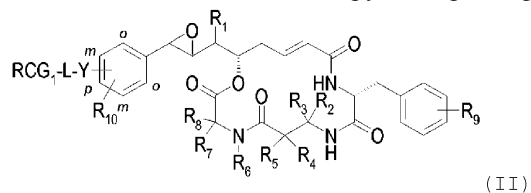
Все данные подгруппы, взятые отдельно или в комбинации, являются частью изобретения.

Среди соединений формулы (I), которые являются объектом изобретения, можно упомянуть, в частности, следующие соединения:





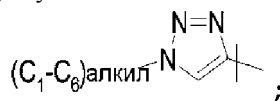
Изобретение дополнительно относится к полезным нагрузкам криптофизина формулы (II)



в которой

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} представляют собой, как определено в формуле (I);

Y представляет собой (C_1-C_6) алкил- NR_{11} или (C_1-C_6) алкил- O ;
или, альтернативно, Y представляет собой $C(=O)O$ или $C(=O)NH$; или, альтернативно, Y представляет собой (C_1-C_6) алкилтриазольную группу



Y располагается в орто- (о), мета- (м) или пара- (п) положении фенильного ядра;

R_{11} представляет собой атом водорода;

L представляет собой линкер;

RCG1 представляет собой реакционноспособную химическую группу, присутствующую на конце линкера, причем RCG1 является реакционноспособной по отношению к реакционноспособной химической группе, присутствующей на антителе.

Среди соединений формулы (II), которые являются объектом изобретения, первая группа соединений состоит из соединений, для которых R_1 представляет собой (C_1-C_6) алкил, в частности метильную группу.

Среди соединений формулы (II), которые являются объектом изобретения, вторая группа соединений состоит из соединений, для которых каждый из R_2 и R_3 представляет собой атом водорода.

Среди соединений формулы (II), которые являются объектом изобретения, третья группа соединений состоит из соединений, для которых один из R_2 и R_3 представляет собой (C_1-C_6) алкильную группу, в частности метильную группу, и другой представляет собой атом водорода.

Среди соединений формулы (II), которые являются объектом изобретения, четвертая группа соединений состоит из соединений, для которых R_2 и R_3 образуют вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, (C_3-C_6) циклоалкильную группу, в частности циклопропильную группу.

Среди соединений формулы (II), которые являются объектом изобретения, пятая группа соединений состоит из соединений, для которых каждый из R_4 и R_5 представляет собой (C_1-C_6) алкильную группу, в частности метильную группу.

Среди соединений формулы (II), которые являются объектом изобретения, восьмая группа соединений состоит из соединений, для которых R_9 представляет собой два заместителя, выбранных из метоксигруппы и атома хлора. Более конкретно, фенильное ядро содержит два заместителя в положениях 3 и 4 на фенильном ядре. Предпочтительными являются 3-Cl и 4-метокси.

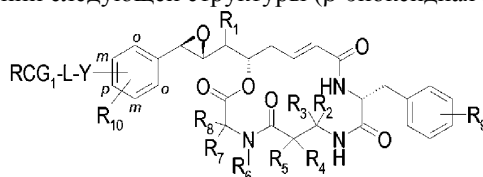
Среди соединений формулы (II), которые являются объектом изобретения, десятая группа соединений состоит из соединений, для которых Y располагается в пара-положении фенильного ядра.

Среди соединений формулы (II), которые являются объектом изобретения, одиннадцатая группа соединений состоит из соединений, для которых Y представляет собой (C_1-C_6) алкил- NR_{11} , в частности (C_1-C_3) алкил- NR_{11} , более конкретно CH_2-NH .

Среди соединений формулы (II), которые являются объектом изобретения, двенадцатая группа соединений состоит из соединений, для которых R_1 представляет собой (C_1-C_6) алкил, в частности метильную группу, каждый из R_2 и R_3 представляет собой атом водорода, R_6 представляет собой атом водорода, R_9 представляет собой два заместителя, выбранных из метоксигруппы и атома хлора, более конкретно фенильное ядро содержит два заместителя в положениях 3 и 4 на фенильном ядре, предпочтительными являются 3-Cl и 4-метокси, и R_{10} представляет собой атом водорода.

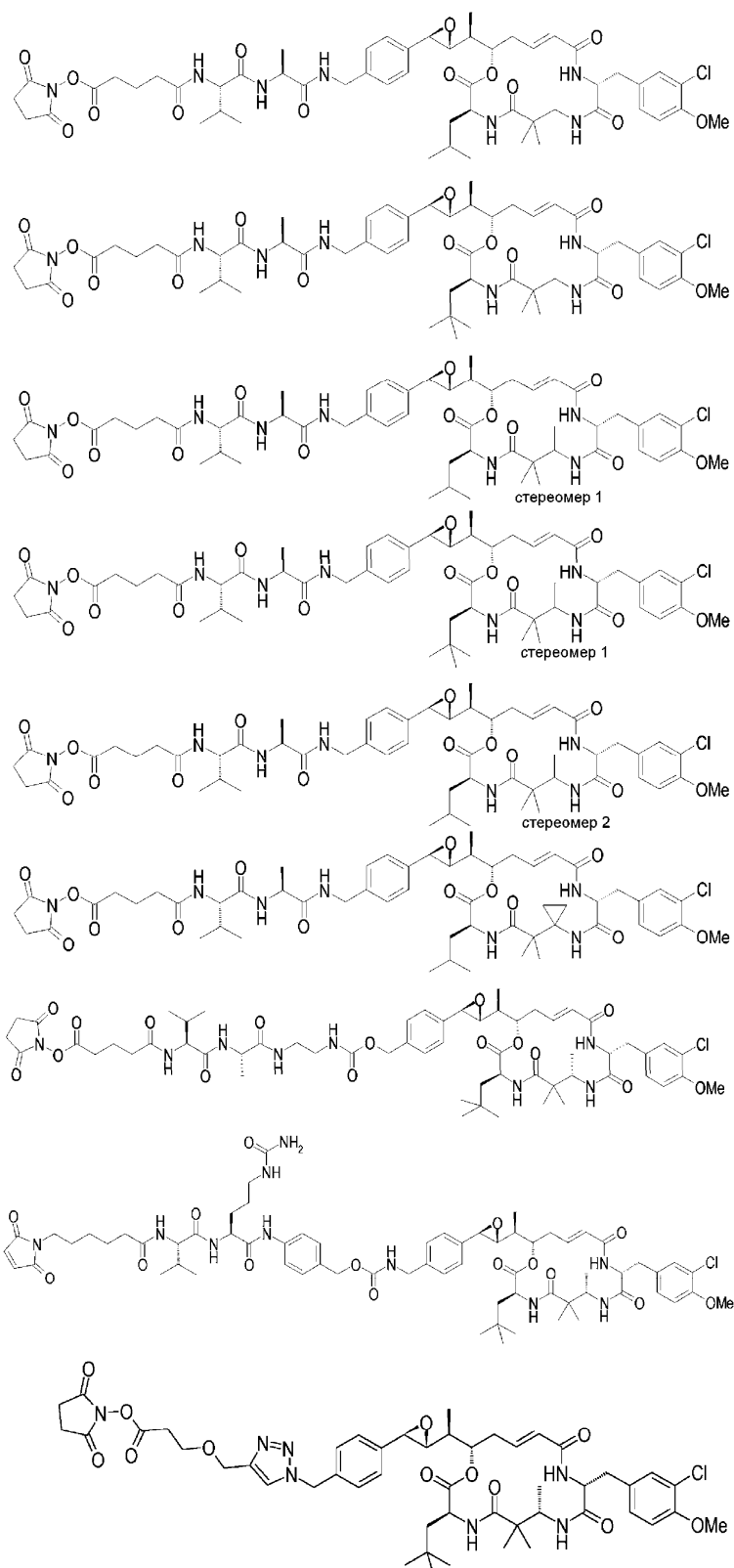
Среди соединений формулы (II), которые являются объектом изобретения, тринадцатая группа соединений состоит из соединений, для которых R_1 представляет собой (C_1-C_6) алкил, в частности метильную группу, R_2 и R_3 представляет собой (C_1-C_6) алкил, в частности метильную группу, и другой представляет собой атом водорода, R_6 представляет собой атом водорода, R_9 представляет собой два заместителя, выбранных из метоксигруппы и атома хлора, более конкретно фенильное ядро содержит два заместителя в положениях 3 и 4 на фенильном ядре, предпочтительными являются 3-Cl и 4-метокси, и R_{10} представляет собой атом водорода.

Среди соединений формулы (II), которые являются объектом изобретения, четырнадцатая группа соединений состоит из соединений следующей структуры (β -эпоксидная конфигурация):

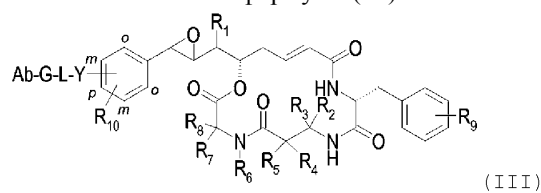


Все данные подгруппы, взятые отдельно или в комбинации, являются частью изобретения.

Среди соединений формулы (II), которые являются объектом изобретения, можно упомянуть, в частности, следующие соединения:



Изобретение также относится к конъюгатам формулы (III)



в которой

R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉ и R₁₀ представляют собой, как определено в формуле (I);

Y и L представляют собой, как определено в формуле (II);

G представляет собой продукт взаимодействия между RCG1, реакционноспособной химической группой, присутствующей на конце линкера, и RCG2, ортогональной реакционноспособной химической группой, присутствующей на антителе (Ab);

Ab представляет собой антитело.

Среди соединений формулы (III), которые являются объектом изобретения, первая группа соединений состоит из соединений, для которых R₁ представляет собой (C₁-C₆)алкил, в частности метильную группу.

Среди соединений формулы (III), которые являются объектом изобретения, вторая группа соединений состоит из соединений, для которых каждый из R₂ и R₃ представляет собой атом водорода.

Среди соединений формулы (III), которые являются объектом изобретения, третья группа соединений состоит из соединений, для которых один из R₂ и R₃ представляет собой (C₁-C₆)алкильную группу, в частности метильную группу, и другой представляет собой атом водорода.

Среди соединений формулы (III), которые являются объектом изобретения, четвертая группа соединений состоит из соединений, для которых R₂ и R₃ образуют вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, (C₃-C₆)циклоалкильную группу, в частности циклопропильную группу.

Среди соединений формулы (III), которые являются объектом изобретения, пятая группа соединений состоит из соединений, для которых каждый из R₄ и R₅ представляет собой (C₁-C₆)алкильную группу, в частности метильную группу.

Среди соединений формулы (III), которые являются объектом изобретения, шестая группа соединений состоит из соединений, для которых R₆ представляет собой атом водорода.

Среди соединений формулы (III), которые являются объектом изобретения, седьмая группа соединений состоит из соединений, для которых R₇ и R₈ независимо друг от друга представляют собой атом водорода или (C₁-C₆)алкильную группу.

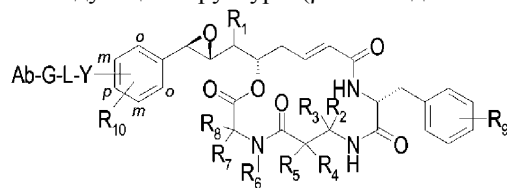
Среди соединений формулы (III), которые являются объектом изобретения, восьмая группа соединений состоит из соединений, для которых R₉ представляет собой два заместителя, выбранных из метоксигруппы и атома хлора. Более конкретно, фенильное ядро содержит два заместителя в положениях 3 и 4 на фенильном ядре. Предпочтительными являются 3-Cl и 4-метокси.

Среди соединений формулы (III), которые являются объектом изобретения, девятая группа соединений состоит из соединений, для которых R₁₀ представляет собой атом водорода.

Среди соединений формулы (III), которые являются объектом изобретения, десятая группа соединений состоит из соединений, для которых Y располагается в пара-положении фенильного ядра.

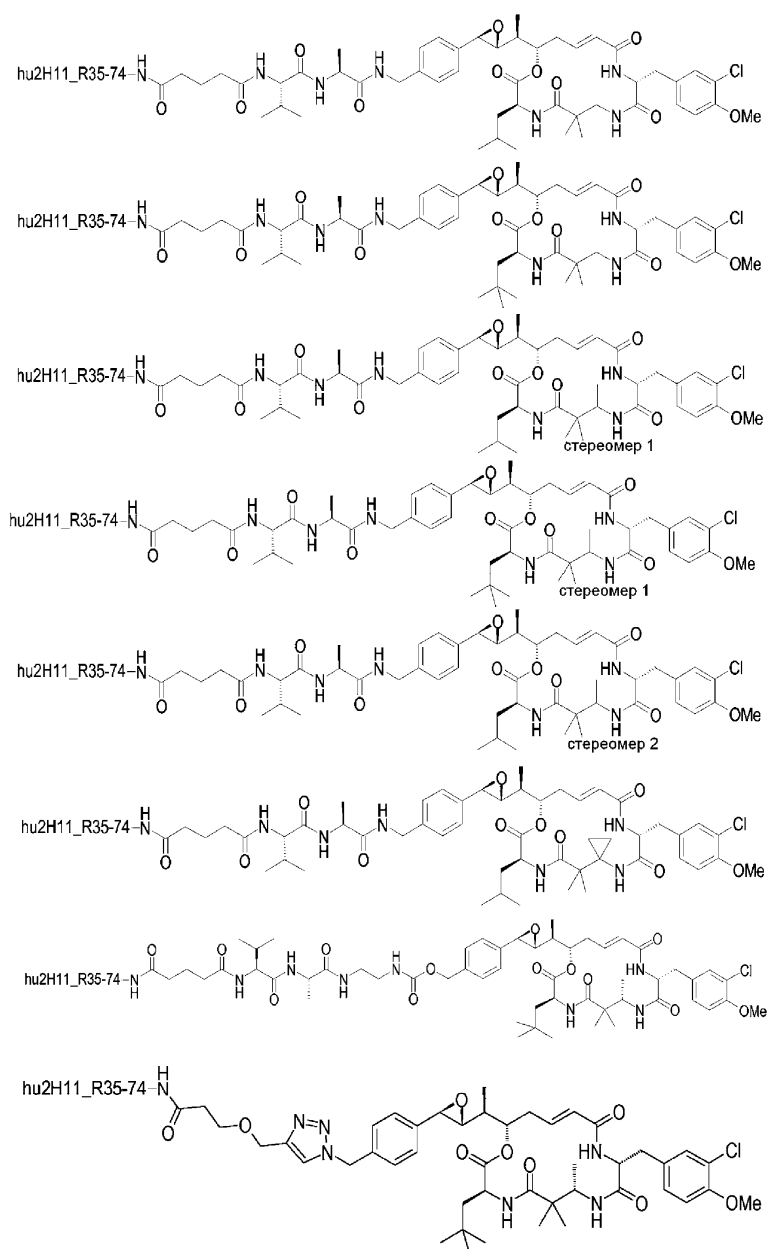
Среди соединений формулы (III), которые являются объектом изобретения, одиннадцатая группа соединений состоит из соединений, для которых Y представляет собой (C₁-C₆)алкил-NR₁₁, в частности (C₁-C₃)алкил-NR₁₁, более конкретно CH₂-NH.

Среди соединений формулы (III), которые являются объектом изобретения, двенадцатая группа соединений состоит из соединений следующей структуры (β-эпоксидная конфигурация):



Все данные подгруппы, взятые отдельно или в комбинации, являются частью изобретения.

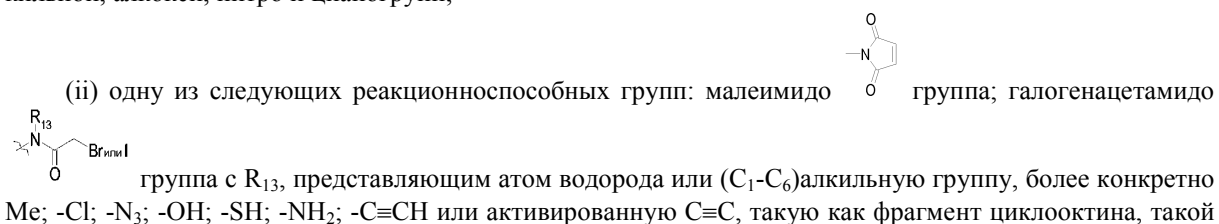
Среди соединений формулы (III), которые являются объектом изобретения, можно упомянуть, в частности, следующие соединения:

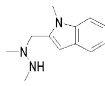


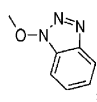
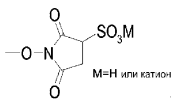
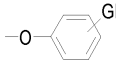
Связывание между полезной нагрузкой криптофизина формулы (II) и антителом для получения конъюгата формулы (III) получают с помощью реакционноспособной химической группы RCG1, присутствующей на полезной нагрузке, которая является реакционноспособной по отношению к реакционноспособной группе RCG2, присутствующей на антителе. Взаимодействие между RCG1 и RCG2 обеспечивает присоединение соединения формулы (II) к антителу путем образования ковалентной связи. В конъюгате формулы (III) части RCG1 и RCG2 могут оставаться образующими связывание между линкером и антителом.

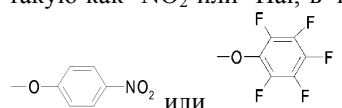
Примеры RCG1, которые могут быть упомянуты, включают:

(i) -C(=O)-Z_aR_a реакционноспособную группу, для которой Z_a представляет собой одинарную связь, O или NH, более конкретно O, и R_a представляет собой атом водорода или (C₁-C₆)алкильную, (C₃-C₇)циклоалкильную, алкенильную, арильную, гетероарильную или (C₃-C₇)гетероциклоалкильную группу. Арильная группа может быть замещена 1-5 группами, выбранными из галогена, в частности F, алкильной, алкокси, нитро и цианогрупп;

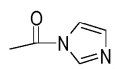


как ; о-алкилгидроксиламин или реакционный субстрат Пикте-Шпенглера, такой как , описанный в Agarwal P., et al., Bioconjugate Chem 2013, 24, 846-851.

Более конкретно, $-Z_aR_a$ может представлять собой $-OH$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH=CH_2$,  (O-NHS) или , или , где катион представляет собой, например, натрий, калий или цезий, или  группу, в которой Gl представляет собой по меньшей мере одну электроиндуктивную группу, такую как $-NO_2$ или $-Hal$, в частности $-F$. Они могут представлять собой, например, следующие группы:



Другим типом $-C(=O)Z_aR_a$ группы является следующая:



Более конкретно, RCG1 может быть выбран из одной из групп, описанных в примерах.

Примеры RCG2, которые могут быть упомянуты, включают (Garnett M.C., et al., Advanced Drug Delivery Reviews 2001, 53, 171-216):

- (i) ϵ -аминогруппы лизинов, находящихся на боковых цепях остатков лизина, которые присутствуют на поверхности антитела;
- (ii) α -аминогруппы N-концевых аминокислот тяжелых и легких цепей антитела;
- (iii) группы сахаридов шарнирной области;
- (iv) тиолы цистеинов, образованные путем восстановления внутрицепочечных дисульфидных связей, или тиолы сконструированных цистеинов;
- (v) амидные группы, находящиеся на боковых цепях некоторых остатков глутамина, которые присутствуют на поверхности антитела;
- (vi) альдегидные группы, введенные с использованием формилглицинообразующего фермента.

В последнее время были рассмотрены другие подходы к конъюгации, например введение цистеинов путем мутации (Junutula J.R., et al., Nature Biotechnology 2008, 26, 925-932), введение неприродных аминокислот, учитывая другие типы химии (Axup J.Y., et al., PNAS 2012, 109, 40, 16101-16106), или конъюгация на гликанах антител (Zhou Q., et al., Bioconjugate Chem. 2014, 25, 510-520). Другой подход для сайт-специфических модификаций антител основывается на ферментативном мечении с использованием, например, бактериальной транскламиназы (Jeger S., et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 9995-9997; Strop P., et al., Chem. Biol. 2013, 20, 161-167) или формилглицинообразующего фермента (Hudak J.E., et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 4161-4165). Для обзора стратегий сайт-специфических конъюгаций см. Agarwal P. and Bertozzi C.R., Bioconjugate Chem 2015, 26, 176-192. Данные технологии конъюгации также могут быть применены к полезным нагрузкам криптофицина, описанным в настоящем изобретении.

Также возможно химическое модифицирование антитела с целью введения новых реакционноспособных химических групп RCG2. Таким образом, специалисту в данной области техники хорошо известно, как модифицировать антитело с помощью модифицирующего агента, вводя, например, активированные дисульфидные, тиольные, малеимидо или галоацетиамидогруппы (см., в частности, WO 2005/077090 стр. 14 и WO 2011/001052). Модификация позволяет улучшить реакцию конъюгации и использовать более широкий спектр групп RCG1.

Более конкретно, в случае, когда RCG1 относится к типу (ii) выше, можно химически модифицировать антитело с использованием подходящего модифицирующего агента или ввести одну или более неприродных аминокислот, чтобы ввести соответствующие функциональные группы RCG2. Например,

когда RCG1 представляет собой N-гидроксисукцинимидиловый эфир, RCG2 представляет собой группу $-NH_2$;

когда RCG1 представляет собой малеимидо или галогенацетиамидо функциональную группу или группу $-Cl$, RCG2 может представлять собой группу $-SH$;

когда RCG1 представляет собой группу $-N_3$, RCG2 может представлять собой группу $-C\equiv CH$ или активированную $C\equiv C$, такую как фрагмент циклооктина;

когда RCG1 представляет собой группу $-OH$ или $-NH_2$, RCG2 может представлять собой карбоновую кислоту или амидную функциональную группу;

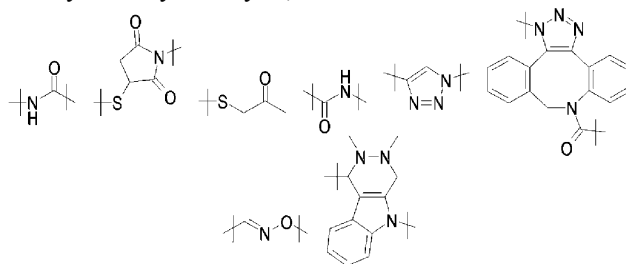
когда RCG1 представляет собой группу $-SH$, RCG2 может представлять собой малеимидо или галоацетиамидо функциональную группу;

когда RCG1 представляет собой функциональную группу $-C\equiv CH$ или активированную $C\equiv N$, RCG2

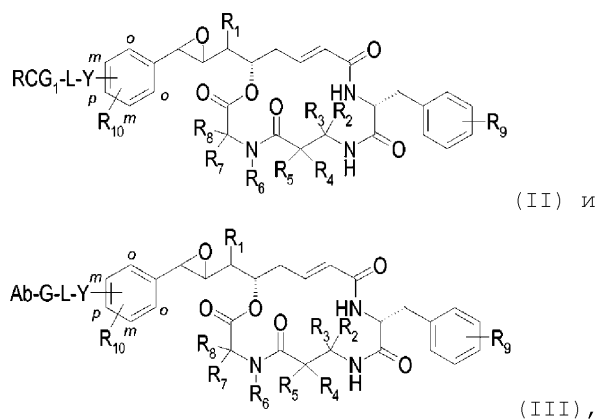
может представлять собой группу $-N_3$;

когда RCG1 представляет собой $-O$ -алкилгидроксиламинную функциональную группу или реакционный субстрат Пикте-Шпенглера, RCG2 может представлять собой альдегидную или кетонную функциональную группу.

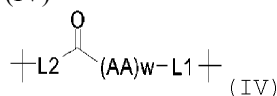
Примеры G, которые могут быть упомянуты, включают



Изобретение относится к полезным нагрузкам криптофицина формулы (II) и конъюгатам формулы (III)



в которой линкер L имеет формулу (IV)



в которой

L1 представляет собой

одинарную связь или группу NR_{16} (гетеро)арил- $CR_{15}R_{14}-O-C(=O)$, если $Y = (C_1-C_6)$ алкил- $N(R_{11})$;
группу $NR_{18}-(C_2-C_6)$ алкил- $NR_{17}-C(=O)$ или группу NR_{16} (гетеро)арил- $CR_{15}R_{14}-O-C(=O)NR_{18}-(C_2-C_6)$ алкил- $NR_{17}-C(=O)$, если $Y = (C_1-C_6)$ алкил- $O-$ или (C_1-C_6) алкил- S ;
группу NR_{16} (гетеро)арил- $CR_{15}R_{14}$, если $Y = C(=O)O$, $C(=O)NH$, (C_1-C_6) алкил- $C(=O)O$ или (C_1-C_6) алкил- $C(=O)NH$;

R_{11} , R_{14} , R_{15} , R_{16} , R_{17} и R_{18} представляют собой независимо друг от друга H или (C_1-C_6) алкильную группу;

$(AA)_w$ представляет собой последовательность w аминокислот AA, связанных вместе через пептидные связи;

w представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 12, предпочтительно от 1 до 6 и более конкретно 2 или 3;

L2 представляет собой одинарную связь, или (C_1-C_6) алкильную группу, или группу (C_1-C_6) алкил- $(OCH_2CH_2)_i$, или (C_1-C_6) алкил- $(OCH_2CH_2)_i-O(C_1-C_6)$ алкильную группу, или $(CH_2CH_2O)_i(C_1-C_6)$ алкильную группу, или $CH(SO_3H)-(C_1-C_6)$ алкильную группу, или группу (C_1-C_6) алкил- $CH(SO_3H)$, или (C_1-C_6) алкил-циклогексильную группу, или $NR_{19}-(C_1-C_6)$ алкильную группу, или $NR_{20}-(CH_2CH_2O)_i(C_1-C_6)$ алкильную группу, или NR_{21} -арильную группу, или NR_{21} -гетероарильную группу, или (C_1-C_6) алкил- $NR_{22}C(=O)-(C_1-C_6)$ алкильную группу, или группу (C_1-C_6) алкил- $NR_{22}C(=O)-(C_1-C_6)$ алкил- $(OCH_2CH_2)_i$. Более конкретно, L2 представляет собой (C_1-C_6) алкильную группу, или группу (C_1-C_6) алкил- $(OCH_2CH_2)_i$, или $CH(SO_3H)-(C_1-C_6)$ алкильную группу;

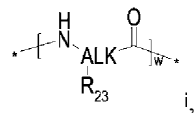
R_{19} , R_{20} , R_{21} и R_{22} представляют собой независимо друг от друга H или (C_1-C_6) алкильную группу;

i представляет собой целое число от 1 до 50 и предпочтительно от 1 до 10 (i может принимать все значения от 1 до 50).

AA обозначает природную или не природную аминокислоту конфигурации D или L, более определенно выбранную из аланина (Ala), β -аланина, γ -аминомасляной кислоты, 2-амино-2-циклогексилуксусной кислоты, 2-амино-2-фенилуксусной кислоты, аргинина (Arg), аспарагина (Asn), аспарагиновой кислоты (Asp), цитруллина (Cit), цистеина (Cys), α,α -диметил- γ -аминомасляной кислоты,

β,β -диметил- γ -аминомасляной кислоты, глутамина (Gln), глутаминовой кислоты (Glu), глицина (Gly), гистидина (His), изолейцина (Ile), лейцина (Leu), лизина (Lys), ϵ -ацетиллизина (AcLys), метионина (Met) орнитина (Orn), фенилаланина (Phe), пролина (Pro), серина (Ser), треонина (Thr), триптофана (Trp), тирозина (Tyr), валина (Val). Более конкретно, АА выбирают из аланина (Ala), цитруллина (Cit), глутамина (Gln), глицина (Gly), ϵ -ацетиллизина (AcLys), валина (Val).

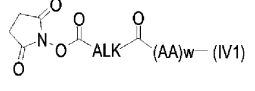
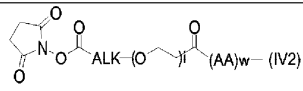
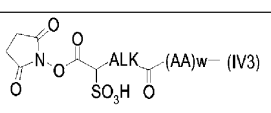
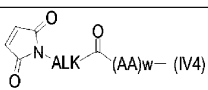
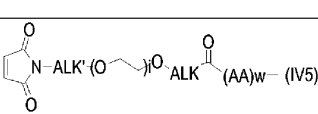
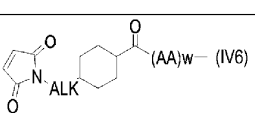
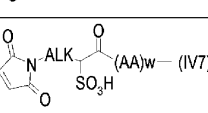
Последовательность $(AA)_w$ имеет формулу

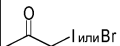
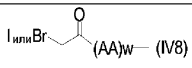
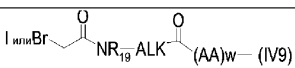
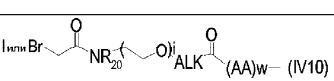
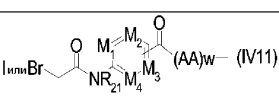
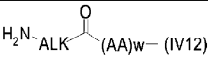
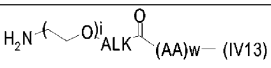
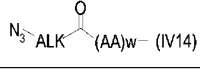
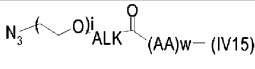
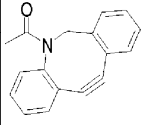
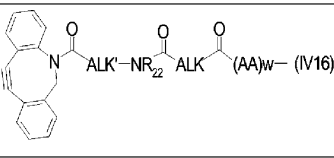
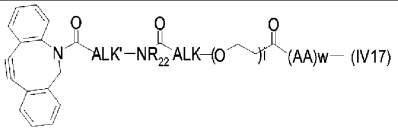


в которой R_{23} представляет собой боковую цепь одной из аминокислот, описанных выше.

Примеры последовательностей являются следующими: Gly-Gly, Phe-Lys, Val-Lys, Val-AcLys, Val-Cit, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Ala-Lys, Val-Ala, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Ala-Phe, Gly-Gly-Gly, Gly-Ala-Phe, Gly-Val-Cit, Gly-Phe-Leu-Cit, Gly-Phe-Leu-Gly, Ala-Leu-Ala-Leu.

Для $Y = (C_1-C_6)\text{алкил-N}(R_{11})$ и более конкретно CH_2NH RCG1-L может представлять собой одну из следующих (IV1-17):

RCG1	Примеры RCG1-L
	 (IV1)
	 (IV2)
	 (IV3)
	 (IV4)
	 (IV5)
	 (IV6)
	 (IV7)

	 (IV8)
	 (IV9)
	 (IV10)
	 (IV11)
-NH ₂	 (IV12)
	 (IV13)
-N ₃	 (IV14)
	 (IV15)
	 (IV16)
	 (IV17)

в которой

(AA)_w представляет собой последовательность w аминокислот AA, связанных вместе через пептидные связи, как описано выше;

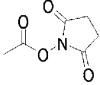
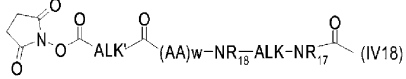
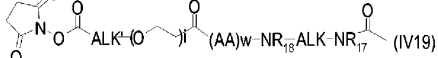
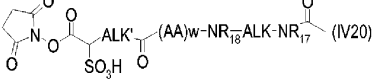
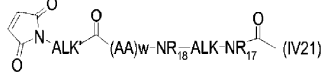
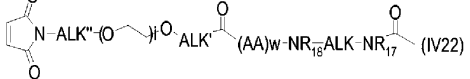
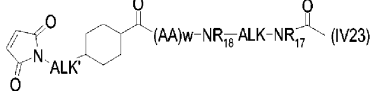
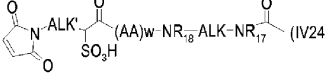
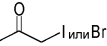
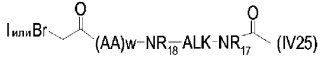
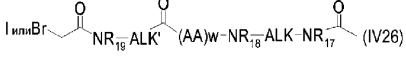
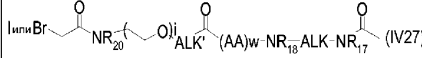
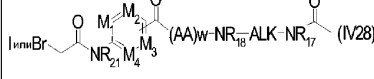
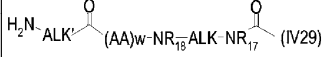
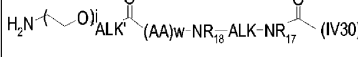
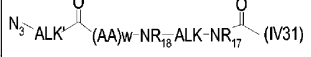
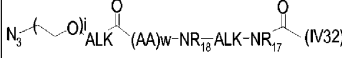
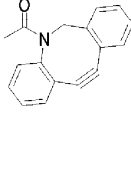
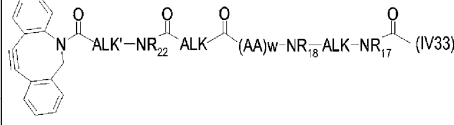
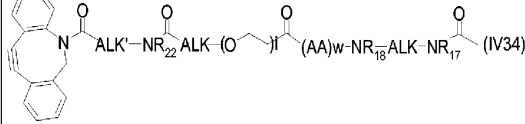
w представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 12, предпочтительно от 1 до 6 и более конкретно 2 или 3;

i представляет собой целое число от 1 до 50 и предпочтительно от 1 до 10 (i может принимать все значения от 1 до 50);

M₁, M₂, M₃ и M₄ выбраны независимо друг от друга из CR₂₄ и N;

R₁₉, R₂₀, R₂₁, R₂₂ и R₂₄ представляют собой независимо друг от друга атом водорода или (C₁-C₆)алкильную группу, более конкретно атом водорода или метильную группу.

Для Y = (C₁-C₆)алкил-O или (C₁-C₆)алкил-S и более конкретно CH₂O или CH₂S RCG1-L может представлять собой одну из следующих (IV18-34):

RCG1	Примеры RCG1-L
	 (IV18)
	 (IV19)
	 (IV20)
	 (IV21)
	 (IV22)
	 (IV23)
	 (IV24)
	 (IV25)
	 (IV26)
	 (IV27)
	 (IV28)
-NH ₂	 (IV29)
	 (IV30)
-N ₃	 (IV31)
	 (IV32)
	 (IV33)
	 (IV34)

в которой

(AA)_w представляет собой последовательность w аминокислот AA, связанных вместе через пептидные связи, как описано выше;

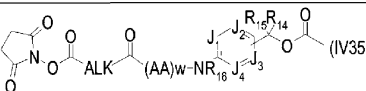
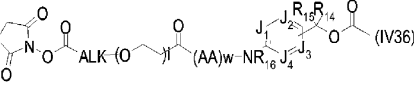
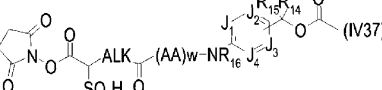
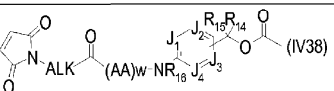
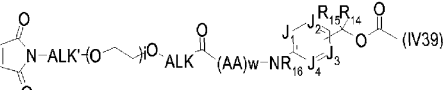
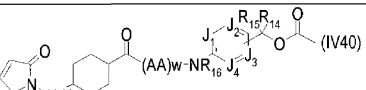
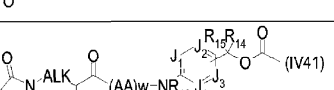
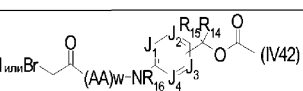
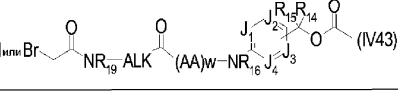
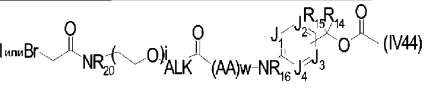
w представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 12, предпочтительно от 1 до 6 и более конкретно 2 или 3;

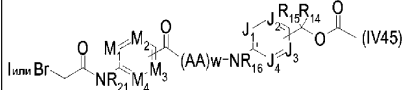
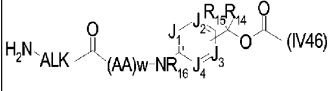
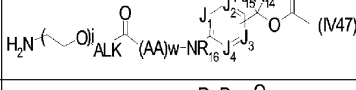
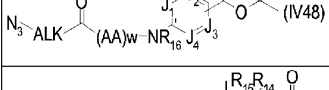
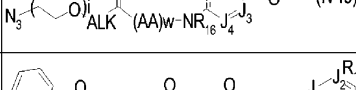
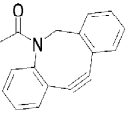
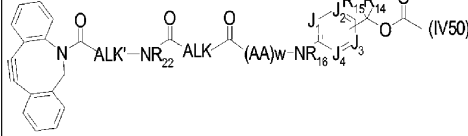
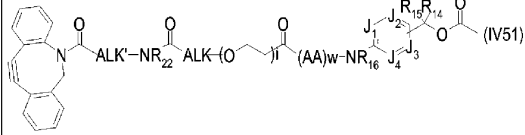
i представляет собой целое число от 1 до 50 и предпочтительно от 1 до 10 (i может принимать все значения от 1 до 50);

M₁, M₂, M₃ и M₄ выбраны независимо друг от друга из CR₂₄ и N;

R_{17} , R_{18} , R_{19} , R_{20} , R_{21} , R_{22} и R_{24} представляют собой независимо друг от друга атом водорода или (C_1 - C_6)алкильную группу, более конкретно атом водорода или метильную группу.

Для $Y = (C_1-C_6)$ алкил- $N(R_{11})$ и более конкретно CH_2NH RCG1-L также может представлять собой одну из следующих (IV35-51):

RCG1	Примеры RCG1-L
	 (IV35)
	 (IV36)
	 (IV37)
	 (IV38)
	 (IV39)
	 (IV40)
	 (IV41)
	 (IV42)
	 (IV43)
	 (IV44)

	
-NH12	
	
-N3	
	
	
	

в которой

(AA)_w представляет собой последовательность w аминокислот AA, связанных вместе через пептидные связи, как описано выше;

w представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 12, предпочтительно от 1 до 6 и более конкретно 2 или 3;

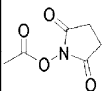
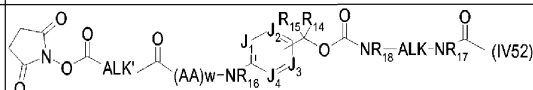
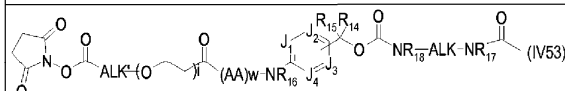
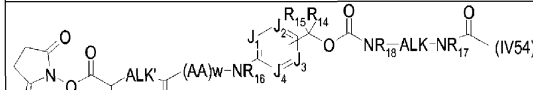
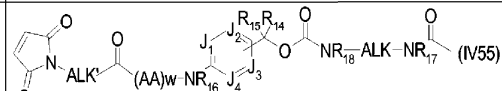
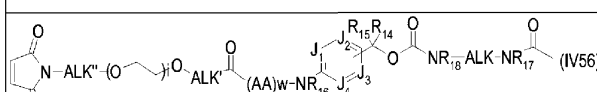
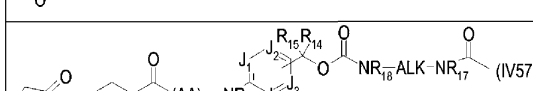
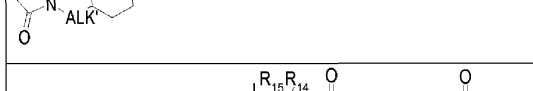
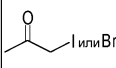
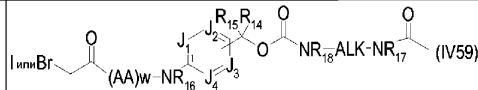
i представляет собой целое число от 1 до 50 и предпочтительно от 1 до 10 (i может принимать все значения от 1 до 50);

J₁, J₂, J₃ и J₄ выбраны независимо друг от друга из CR₂₄ и N;

M₁, M₂, M₃ и M₄ выбраны независимо друг от друга из CR₂₄ и N;

R₁₄, R₁₅, R₁₆, R₁₉, R₂₀, R₂₁, R₂₂ и R₂₄ представляют собой независимо друг от друга атом водорода или (C₁-C₆)алкильную группу, более конкретно атом водорода или метильную группу.

Для Y = (C₁-C₆)алкил-O или (C₁-C₆)алкил-S и более конкретно CH₂O или CH₂S RCG1-L также может представлять собой одну из следующих (IV52-68):

RCG1	Примеры RCG1-L
	 (IV52)
	 (IV53)
	 (IV54)
	 (IV55)
	 (IV56)
	 (IV57)
	 (IV58)
	 (IV59)

	 (IV60)
	 (IV61)
	 (IV62)
-NH2	 (IV63)
	 (IV64)
-N3	 (IV65)
	 (IV66)
	 (IV67)
	 (IV68)

в которой

(AA)_w представляет собой последовательность w аминокислот AA, связанных вместе через пептидные связи, как описано выше;

w представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 12, предпочтительно от 1 до 6 и более конкретно 2 или 3;

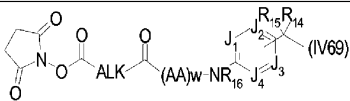
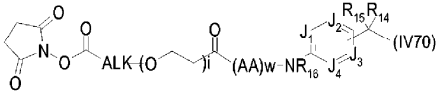
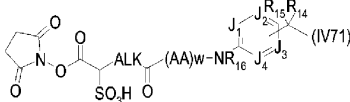
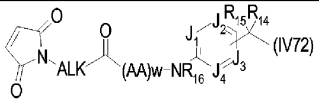
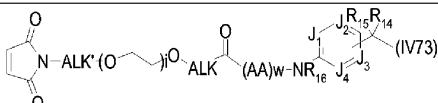
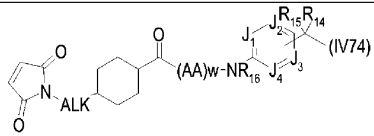
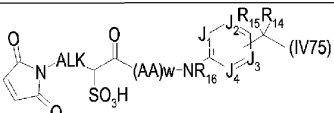
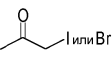
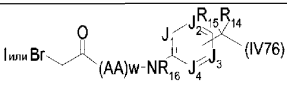
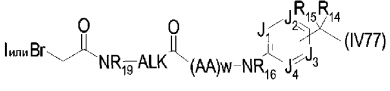
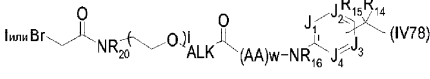
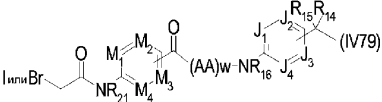
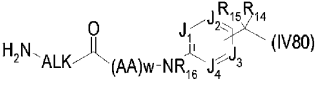
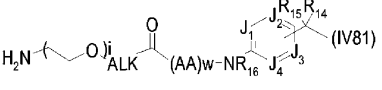
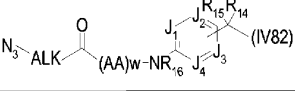
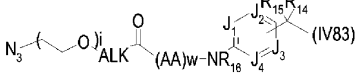
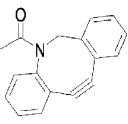
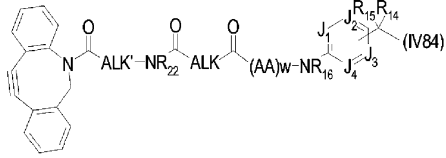
i представляет собой целое число от 1 до 50 и предпочтительно от 1 до 10 (i может принимать все значения от 1 до 50);

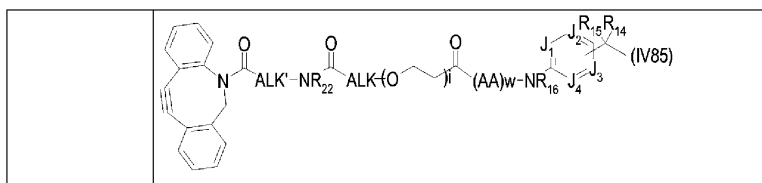
J₁, J₂, J₃ и J₄ выбраны независимо друг от друга из CR₂₄ и N;

M₁, M₂, M₃ и M₄ выбраны независимо друг от друга из CR₂₄ и N;

R₁₄, R₁₅, R₁₆, R₁₇, R₁₈, R₁₉, R₂₀, R₂₁, R₂₂ и R₂₄ представляют собой независимо друг от друга атом водорода или (C₁-C₆)алкильную группу, более конкретно атом водорода или метильную группу.

Для Y = C(=O)O, C(=O)NH, (C₁-C₆)алкил-C(=O)O или (C₁-C₆)алкил-C(=O)NH и более конкретно C(=O)O или CH₂-C(=O)O RCG1-L может представлять собой одну из следующих (IV69-85):

RCG1	Примеры RCG1-L
	 (IV69)
	 (IV70)
	 (IV71)
	 (IV72)
	 (IV73)
	 (IV74)
	 (IV75)
	 (IV76)
	 (IV77)
	 (IV78)
	 (IV79)
-NH ₂	 (IV80)
	 (IV81)
-N ₃	 (IV82)
	 (IV83)
	 (IV84)



в которой

(AA)_w представляет собой последовательность w аминокислот AA, связанных вместе через пептидные связи, как описано выше;

w представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 12, предпочтительно от 1 до 6 и более конкретно 2 или 3;

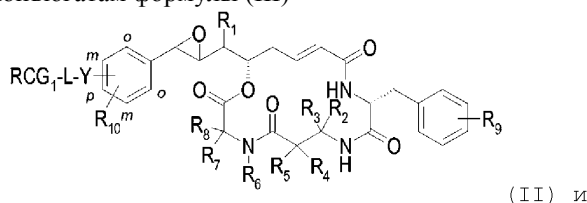
i представляет собой целое число от 1 до 50 и предпочтительно от 1 до 10 (i может принимать все значения от 1 до 50);

J₁, J₂, J₃ и J₄ выбраны независимо друг от друга из CR₂₄ и N;

M₁, M₂, M₃ и M₄ выбраны независимо друг от друга из CR₂₄ и N;

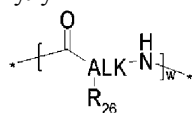
R₁₄, R₁₅, R₁₆, R₁₉, R₂₀, R₂₁, R₂₂ и R₂₄ представляют собой независимо друг от друга атом водорода или (C₁-C₆)алкильную группу, более конкретно атом водорода или метильную группу.

Для Y = C(=O) или (C₁-C₆)алкил-C(=O) изобретение также относится к полезным нагрузкам криптофицина формулы (II) и конъюгатам формулы (III)



(Gln), глицина (Gly), ε-ацетиллизина (AcLys), валина (Val).

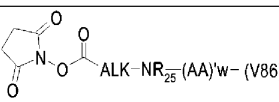
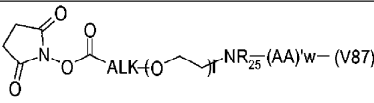
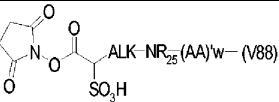
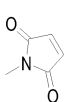
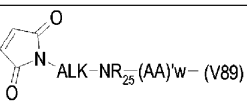
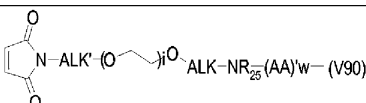
Последовательность (AA)'_w имеет формулу

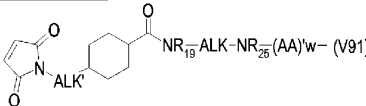
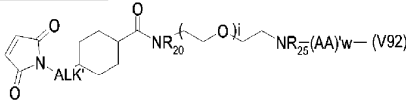
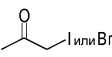
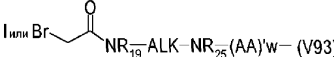
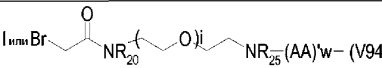
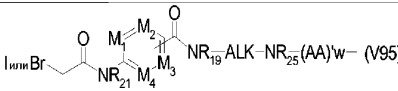
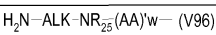
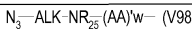
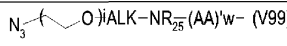
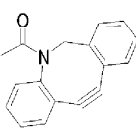
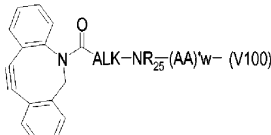
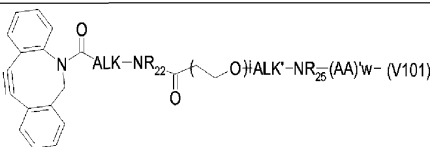


в которой R₂₆ представляет собой боковую цепь одной из аминокислот, описанных выше.

Примеры последовательностей являются следующими: Gly-Gly, Lys-Phe, Lys-Val, AcLys-Val, Cit-Val, Lys-Phe-Phe, Lys-Phe-DPhe, Lys-Phe-Gly, Lys-Ala, Ala-Val, Cit-Phe, Cit-Leu, Cit-Ile, Cit-Trp, Ala-Phe, Phe-Ala, Gly-Gly-Gly, Phe-Ala-Gly, Cit-Val-Gly, Cit-Leu-Phe-Gly, Gly-Leu-Phe-Gly, Leu-Ala-Leu-Ala.

Для Y = C(=O) или (C₁-C₆)алкил-C(=O) и более конкретно C(=O) или CH₂-C(=O) RCG1-L может представлять собой одну из следующих (V86-101):

RCG1	Примеры RCG1-L
	 (V86)
	 (V87)
	 (V88)
	 (V89)
	 (V90)

	
	
	
	
	
-NH ₂	
	
-N ₃	
	
	
	

в которой

(AA)_w представляет собой последовательность w аминокислот AA, связанных вместе через пептидные связи, как описано выше;

w представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 12, предпочтительно от 1 до 6 и более конкретно 2 или 3;

i представляет собой целое число от 1 до 50 и предпочтительно от 1 до 10 (i может принимать все значения от 1 до 50);

M₁, M₂, M₃ и M₄ выбраны независимо друг от друга из CR₂₄ и N;

R₁₉, R₂₀, R₂₁, R₂₂, R₂₄ и R₂₅ представляют собой независимо друг от друга атом водорода или (C₁-C₆)алкильную группу, более конкретно атом водорода или метильную группу.

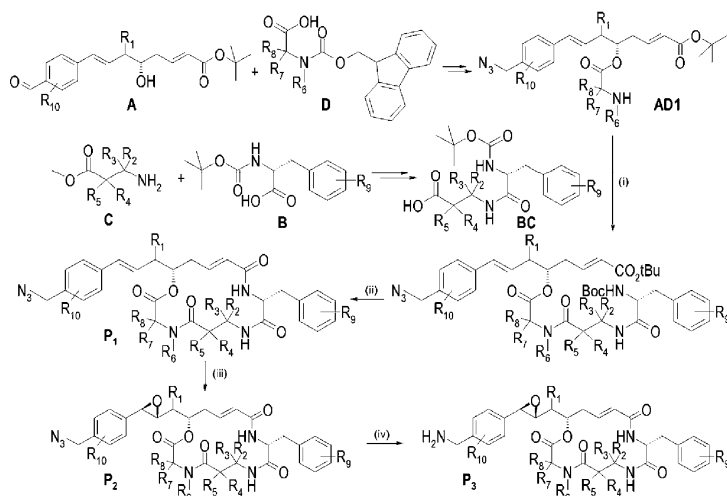
Линкер L также может быть выбран из проиллюстрированных соединений.

В соответствии с изобретением соединения общей формулы (I), (II) и (III) могут быть получены с помощью следующих способов.

Способ получения соединений криптофицина.

Общий путь А для получения соединений формулы (I) в случае, когда $W=CH_2N_3$ или CH_2NH_2

Схема 1



Фрагменты А, В, С и D позволяют получать соединения криптофицина от P₁ до P₃ с помощью стадий, подробно описанных ниже.

Стадия (i): образование пептидной связи между фрагментами AD1 и BC в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, HOAt и HATU.

Стадия (ii): снятие защиты в кислотных условиях с использованием, например, ТФУК и макроциклизация в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, HOAt и HATU.

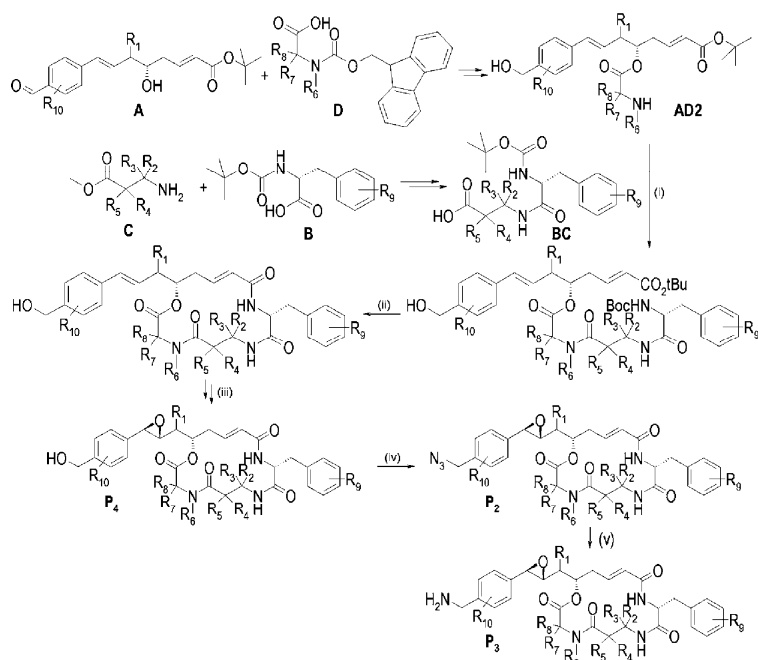
Стадия (iii): окисление олефина с образованием эпоксида с использованием, например, м-МСВА.

Стадия (v): восстановление азидогруппы с использованием, например, ТСЕР.

Фрагменты А и В получали в соответствии с синтезом, описанным ниже. Фрагменты С, защищенные в виде метиловых эфиров, являются коммерчески доступными для R₄=H, R₅=Me(R), R₂=R₃=H (номер CAS [92535-26-7]); R₄=H, R₅=Me(S), R₂=R₃=H (номер CAS [118138-56-0]); R₄=R₅=Me, R₂=R₃=H (номер CAS [25307-82-8]); R₂=H, R₃=Me(R), R₄=H, R₅=Me(R) (номер CAS [86544-92-5]); R₂=H, R₃=Me(S), R₄=H, R₅=Me(R) (номер CAS [86544-93-6]); R₂=H, R₃=Me(R), R₄=R₅=Me (номер CAS [1315052-25-5]); R₂=H, R₃=Me(S), R₄=R₅=Me (номер CAS [1315050-96-4]); R₂=H, R₃=iPr(R), R₄=R₅=Me (номер CAS [1314999-06-8]); R₂=H, R₃=iPr(S), R₄=R₅=Me (номер CAS [1315054-33-1]); R₂=R₃=R₄=R₅=Me (номер CAS [90886-53-6]); R₄ и R₅ образуют вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, циклопропильную группу (номер CAS [914226-26-9]). Они также могут быть получены, как описано в примерах. Коммерчески недоступные фрагменты С получали, как описано в примерах. Все фрагменты D являются коммерчески доступными: L-Fmoc-Ala-OH (номер CAS [35661-39-3]); L-Fmoc-Val-OH (номер CAS [68858-20-8]); L-Fmoc-трет-Leu-OH (номер CAS [132684-60-7]); L-Fmoc-Leu-OH (номер CAS [35661-60-0]); L-Fmoc-NMe-Leu-OH (номер CAS [103478-62-2]); L-Fmoc-3-диметиламино-Ala-OH (номер CAS [587880-86-2]); L-Fmoc-(Оаллил)Asp-OH (номер CAS [146982-24-3]); L-Fmoc-4-метил-Leu-OH (номер CAS [139551-74-9]). Структурные элементы AD1 и BC получали в соответствии с синтезом, описанным ниже.

Общий путь В для получения соединений формулы (I) в случае, когда $W=CH_2OH$, или CH_2N_3 , или CH_2NH_2 .

Схема 2



Фрагменты А, В, С и D позволяют получать соединения криптофицина от P₂ до P₄ с помощью стадий, подробно описанных ниже.

Стадия (i): образование пептидной связи между фрагментами AD1 и BC в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, HOAt и HATU.

Стадия (ii): снятие защиты в кислотных условиях с использованием, например, ТФУК, макроциклизация в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, HOAt и HATU и гидролиз ацетата при pH 6-7 с использованием, например, NaOH в смеси воды и AcOEt.

Стадия (iii): защита бензильного спирта в виде силилового эфира с использованием, например, хлортриизопропилсилана в присутствии основания, такого как, например, имидазол; окисление олефина с образованием эпоксида с использованием, например, m-CPBA; снятие защиты силилового эфира с использованием, например, раствора TBAF.

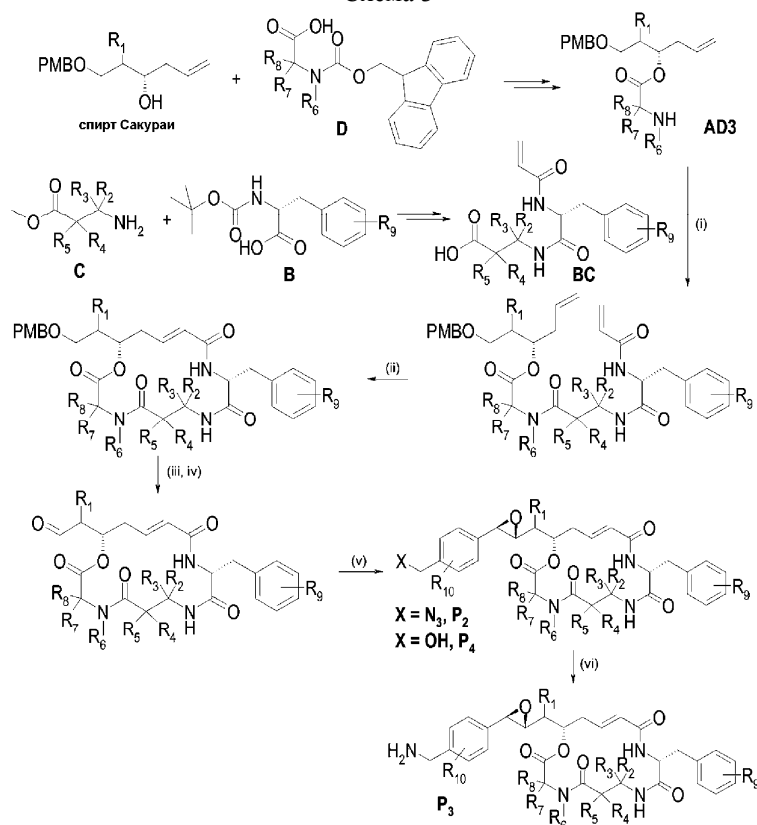
Стадия (iv): азидирование в присутствии ДФФА и основания, такого как, например, DBU.

Стадия (v): восстановление азидогруппы с использованием, например, ТСЕР.

Фрагменты А и В получали в соответствии с синтезом, описанным ниже. Фрагменты С были или коммерчески доступны, как описано в предыдущем разделе, или получены, как описано в примерах. Все фрагменты D являются коммерчески доступными, как описано в предыдущем разделе. Структурные элементы AD2 и BC получали в соответствии с синтезом, описанным ниже.

Общий путь С для получения соединений формулы (I) в случае, когда $W=CH_2OH$, или CH_2N_3 , или CH_2NH_2 .

Схема 3



Спирт Сакураи и фрагменты В, С и D позволяют получать соединения криптофицина от P₂ до P₄ с помощью стадий, подробно описанных ниже.

Стадия (i): образование пептидной связи между фрагментами AD3 и альтернативным BC в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, HOAt и HATU.

Стадия (ii): макроциклизация посредством реакции метатезиса с замыканием цикла в присутствии катализатора, такого как, например, катализатор Граббса I.

Стадия (iii): снятие защиты с п-метоксibenзильного эфира в кислотных условиях, таких как, например, 10% ТФУК.

Стадия (iv): окисление спирта с использованием окислителя, такого как, например, ТЕМПО в присутствии гипохлорита натрия.

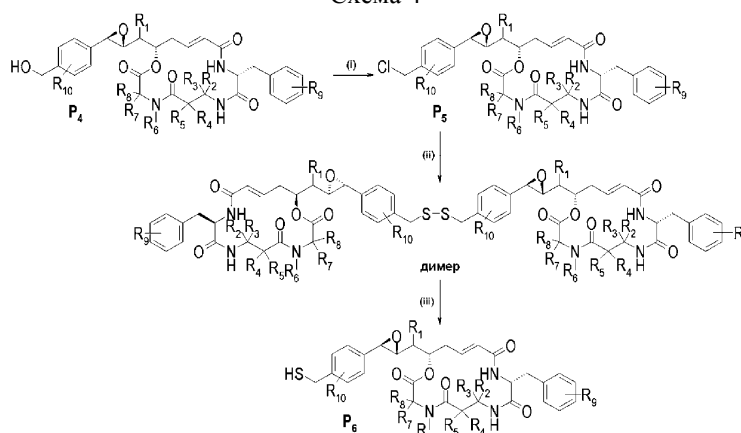
Стадия (v): введение эпоксида путем асимметрической реакции Кори-Чайковского с использованием соответственно замещенного полученного на основе изотиоцинеола хирального сульфония в присутствии основания, такого как, например, фосфазеновое основание P₂-Et.

Стадия (vi): восстановление азидогруппы с использованием, например, ТСЕР.

Спирт Сакураи и фрагмент В получали в соответствии с синтезом, описанным ниже. Фрагменты С были или коммерчески доступны, как описано в предыдущем разделе, или получены, как описано в примерах. Все фрагменты D являются коммерчески доступными, как описано в предыдущем разделе. Структурные элементы AD3 и альтернативный BC получали в соответствии с синтезом, описанным ниже.

Получение соединений формулы (I) в случае, когда $W=CH_2SH$.

Схема 4



P_4 позволяет получать другие соединения криптофицина P_5 и P_6 с помощью стадий, подробно описанных ниже.

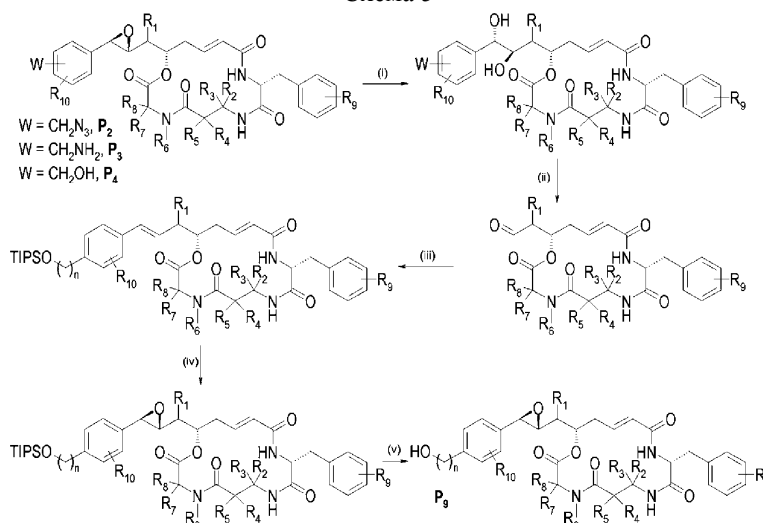
Стадия (i): введение группы хлора с использованием метансульфонилхлорида в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (ii): функционализация с использованием тетрабутиламмония триметилсилилтиолат, полученного *in situ* из TBAF и гексаметилдисилатана в соответствии с Hu J., et al., J. Org. Chem. 1999, 64, 4959-496, в ходе данной реакции обычно образуется промежуточный димер, изображенный на схеме 3.

Стадия (iii): восстановление димера с использованием фосфина, такого как, например, TCEP.

Схемы 1, 2, 3 и 4 описывают случаи $n=1$, но могут также применяться для получения соединений формулы (I) в случае, когда $n>1$, исходя из P_2 , P_3 или P_4 с помощью стадий, подробно описанных ниже и представленных на схеме 2 WO 2011/001052.

Схема 5



Стадия (i): открытие эпоксидного кольца в кислой среде с получением диольной функциональной группы; например, может быть использована концентрированная хлорная кислота.

Стадия (ii): окислительное расщепление диола с использованием, например, периодата натрия.

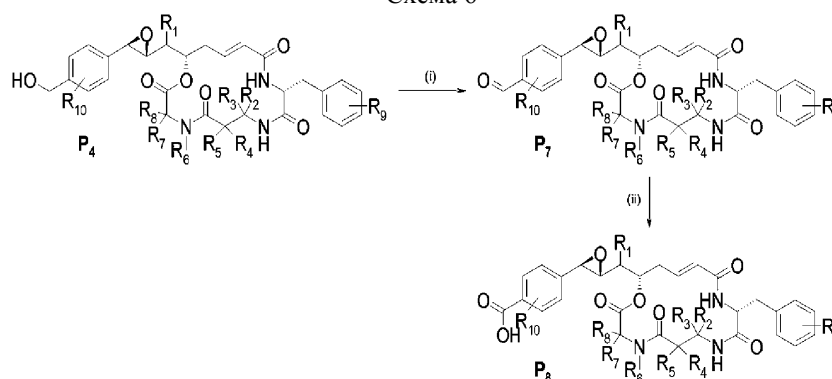
Стадия (iii): реакция Виттига с использованием подходящего галогенида фосфония, например, бромида и сильного основания, например, BuLi.

Стадия (iv): окисление олефина с образованием эпоксида с использованием, например, м-CPBA.

Стадия (v): снятие защиты силилового эфира с использованием, например, раствора TBAF.

Получение соединений формулы (I) в случае, когда $W=CO_2H$.

Схема 6



P_4 позволяет получать другие соединения криптофицина P_7 и P_8 с помощью стадий, подробно описанных ниже.

Стадия (i): окисление с использованием реагента Десса-Мартина.

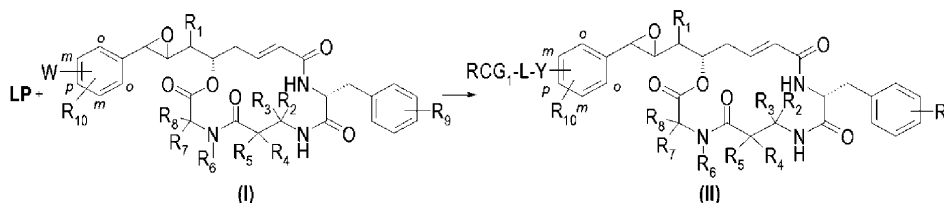
Стадия (ii): окисление по Пиннику в присутствии 2-метил-2-бутена (Pinnick H.W., Tetrahedron 1981, 37, 2091-2096).

Схема 6 описывает случай $n=0$, но может также применяться для получения соединений формулы (I) в случае, когда $W=(CH_2)_nCO_2H$, исходя из аналога P_4 , несущего группу $(CH_2)_{n+1}OH$. Схемы 1, 2, 3, 4, 5 и 6 приведены для линкера в пара-положении, но могут одинаково применяться для орто- или мета-положений. Аналогично, они даны для соединения криптофицина, но могут также применяться для получения других соединений формулы (I), в частности D_1-D_{19} .

Способ получения нагрузок криптофицина.

Соединения формулы (II) могут быть получены в соответствии со схемой 7, исходя из соединения криптофицина формулы (I) и прекурсора линкера (LP).

Схема 7



W представляет собой

(C_1-C_6) алкил- $NH(R_{11})$, более конкретно $(CH_2)_nNHR_{11}$;

(C_1-C_6) алкил- OH , более конкретно $(CH_2)_nOH$;

(C_1-C_6) алкил- SH , более конкретно $(CH_2)_nSH$;

CO_2H ;

(C_1-C_6) алкил- CO_2H , более конкретно $(CH_2)_nCO_2H$; или

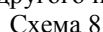
(C_1-C_6) алкил- N_3 ,

в которой R_{11} представляет собой атом водорода или (C_1-C_6) алкильную группу, более конкретно метильную группу.

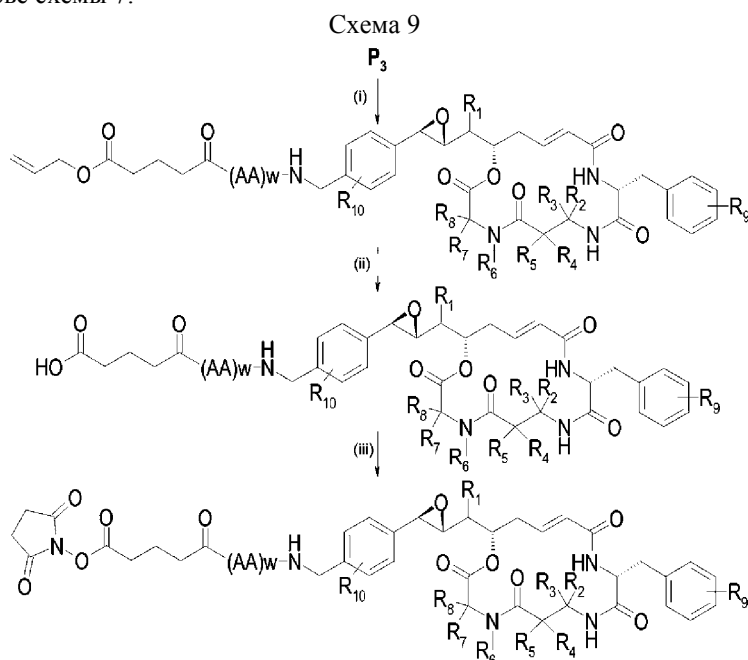
Прекурсор линкера LP имеет функциональную группу введения прекурсора линкера L в соединение криптофицина после реакции между группой W и химической функциональной группой, присутствующей на LP.

В схеме 7 может потребоваться несколько стадий и/или реакций для получения полезной нагрузки криптофицина (II), исходя из соединения криптофицина (I). Например, в случае, когда $Z_aR_a = -O-NHS$, линкер L, для которого $Z_aR_a = -O$ -аллил, может быть введен с использованием соответствующего прекурсора линкера с последующим снятием защитной группы со сложноэфирной функциональной группы и введением $-O-NHS$. Снятие защитной группы может быть выполнено с помощью обработки палладиевым катализатором, например $Pd(PPh_3)_4$, в присутствии акцепторного амина, например морфолина; активация может быть проведена с помощью ДСК в присутствии основания, такого как, например, DIEA или с NHS, в присутствии связывающего агента, такого как, например, ДЦК. Данное превращение группы Z_aR_a в другую группу Z_aR_a (например, $-O$ -аллил $\rightarrow O-NHS$) может быть применено для получения других групп Z_aR_a , в частности, описанных ранее.

Схема 7' аналогичным образом иллюстрирует получение соединения криптофицина, содержащего линкер, несущий, соответственно, малеимидо, галогенацетиамидо, amino или азидогруппу (L^* представляет собой фрагмент линкера такой, что $L = -L^*$ -малеимидо, или $L = -L^*$ -галогенацетиамидо, или $L = -L^*$ - NH_2 -, или $L = -L^*$ - N_3).



Получение соединений формулы (II) в случае, когда $W=(CH_2)_2NH_2$ и $L=(IV1)$ с $n=1$, $R_{15}=H$ и $ALK=(CH_2)_3$ на основе схемы 7.

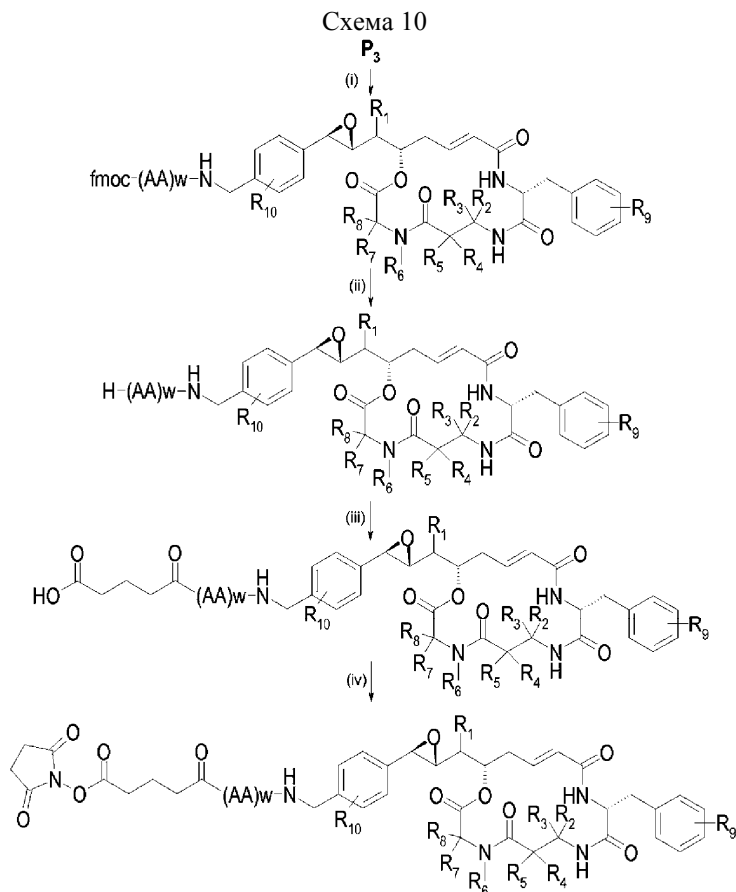


Стадия (i): образование пептидной связи в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, EDC и HOBT, и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (ii): снятие защитной группы с аллилового эфира в присутствии катализатора, такого как, например, тетраис(трифенилфосфин)палладий.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира с помощью обработки ДСК в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Получение соединений формулы (II) в случае, когда $W=(CH_2)_nNH_2$ и $L=(IV1)$ с $n=1$, $R_{11}=H$ и $ALK=(CH_2)_3$ на основе схемы 8.



Стадия (i): образование пептидной связи в присутствии связывающих реагентов, таких как, напри-

мер, EDC и HOBT, и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (ii): снятие защитной группы Fmoc с амина в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

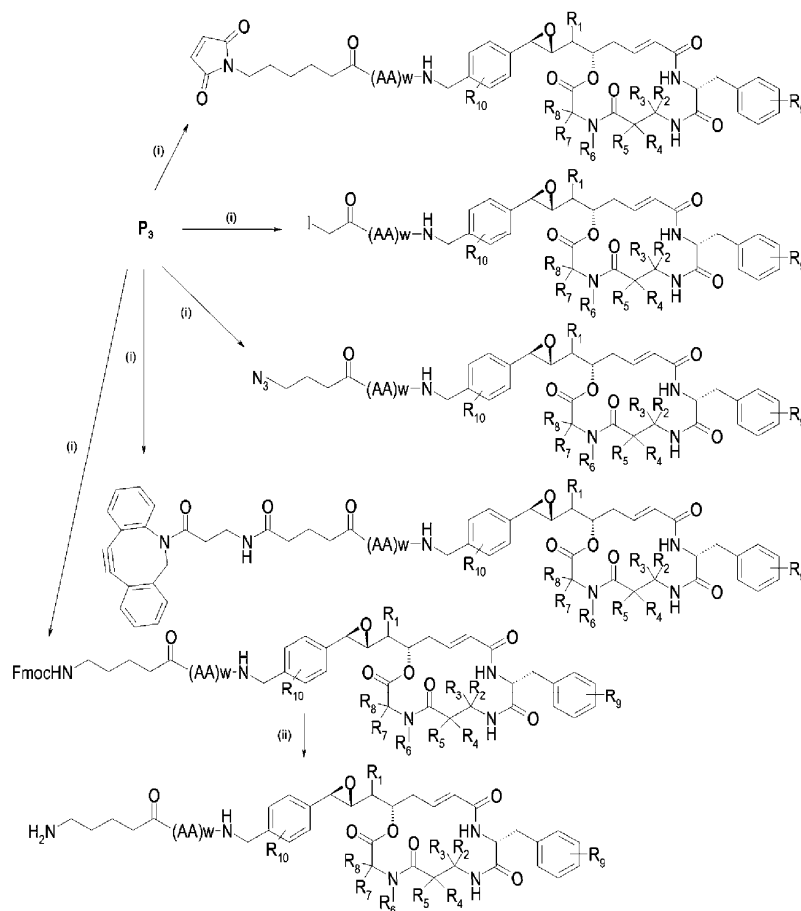
Стадия (iii): связывание с глутаровым ангидридом.

Стадия (iv): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира с помощью обработки ДСК в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Схемы 9 и 10 описывают случай L(IV1) с $n=1$, $R_{11}=H$ и $ALK=(CH_2)_3$, но они могут также применяться к другим линкерам L с $RCG1=C(=O)ONHS$, а именно к случаю L(IV1) с $n \neq 1$, и/или $R_{11} \neq H$, и/или $ALK \neq (CH_2)_3$ и случаям L(IV2) и L(IV3). Они предоставлены для линкера в пара-положении, но могут одинаково применяться для орто- или мета-положений. Аналогичным образом, они приведены для соединения криптофицина, но могут также применяться для получения других соединений формулы (I), в частности D₁-D₁₉.

Получение соединений формулы (II) в случае, когда $W=(CH_2)_nNH_2$ с $n=1$, $R_{11}=H$ и $RCG1=$ малеимино, галогенацетино, NH_2 , N_3 или циклооктин, а именно линкеров L(IV4)-L(IV17).

Схема 11



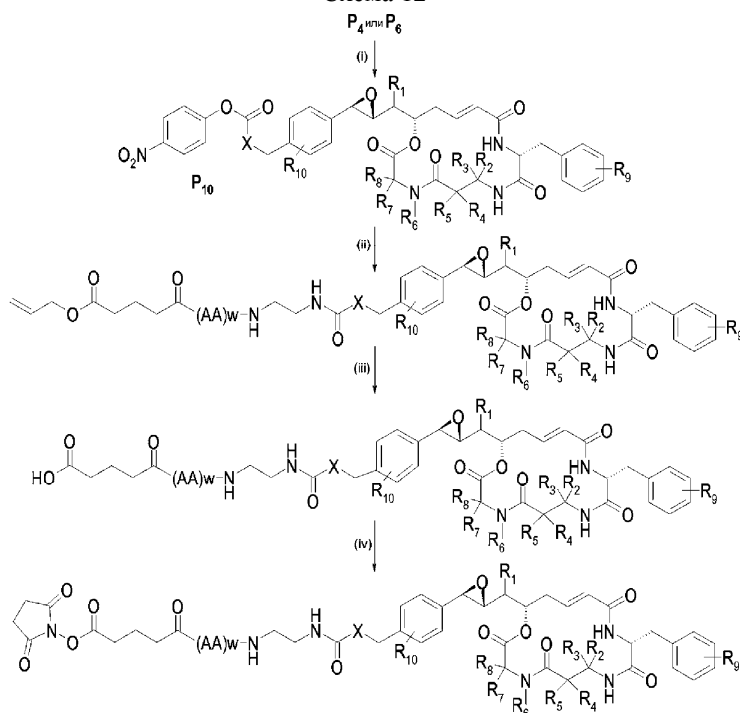
Стадия (i): образование пептидной связи в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, EDC и HOBT и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (ii): снятие защитной группы Fmoc с амина в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Схема 11 описывает случаи L(IV4) с $n=1$, $R_{11}=H$ и $ALK=(CH_2)_5$, L(IV8) с $n=1$ и $R_{11}=H$, L(IV12) с $n=1$, $R_{11}=H$ и $ALK=(CH_2)_4$, L(IV14) с $n=1$, $R_{11}=H$ и $ALK=(CH_2)_3$ и L(IV16) с $n=1$, $R_{11}=H$, $ALK=(CH_2)_3$ и $ALK'=(CH_2)_2$, но она может также применяться к другим линкерам L(IV4)-L(IV17) с $RCG1=$ малеимино, иодацетино, NH_2 , N_3 или циклооктин. Она приведена для реакционноспособной группы иодацетино, но может одинаково применяться для реакционноспособной группы бромацетино. Она предоставлена для линкера в пара-положении, но может одинаково применяться для орто- или мета-положений. Аналогичным образом, она приведена для соединения криптофицина, но может также применяться для получения других соединений формулы (I), в частности D₁-D₁₉.

Получение соединений формулы (II) в случае, когда $W=(CH_2)_nX$ с $X=O$ или S и $L=(IV18)$ с $n=1$, R_{17} и $R_{18}=H$ и $ALK=(CH_2)_3$ на основе схемы 7.

Схема 12



Стадия (i): активация бензильного спирта или бензильного тиола в виде п-нитрофенил-(тио)карбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

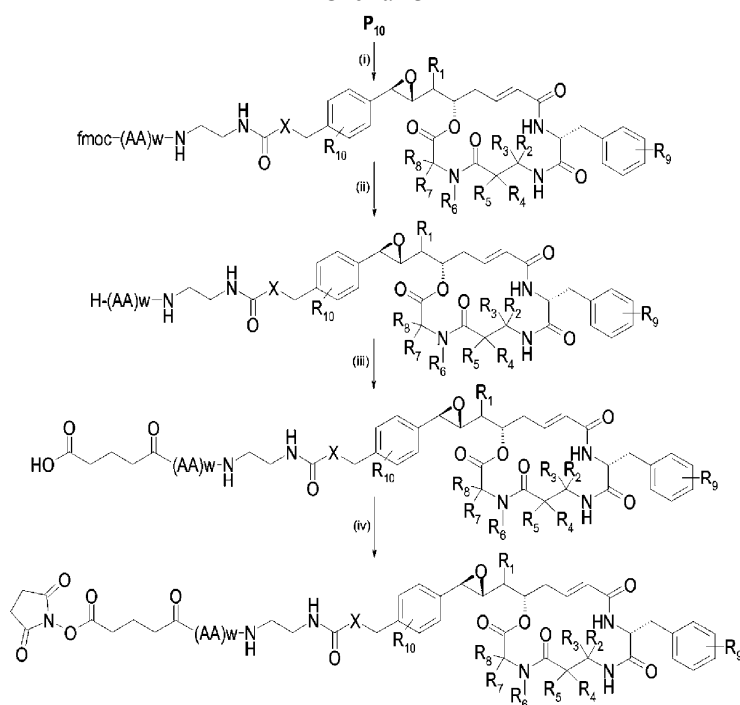
Стадия (ii): образование (тио)карбамата с помощью взаимодействия с амином в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iii): снятие защитной группы с аллилового эфира в присутствии катализатора, такого как, например, тетракис(трифенилфосфин)палладий.

Стадия (iv): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира с помощью обработки ДСК в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Получение соединений формулы (II) в случае, когда $W=(CH_2)_nX$ с $X=O$ или S и $L=(IV18)$ с $n=1$, R_{17} и $R_{18}=H$ и $ALK=(CH_2)_3$ на основе схемы 8.

Схема 13



Стадия (i): образование (тио)карбамата с помощью взаимодействия с амином в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (ii): снятие защитной группы Fmoc с амина в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

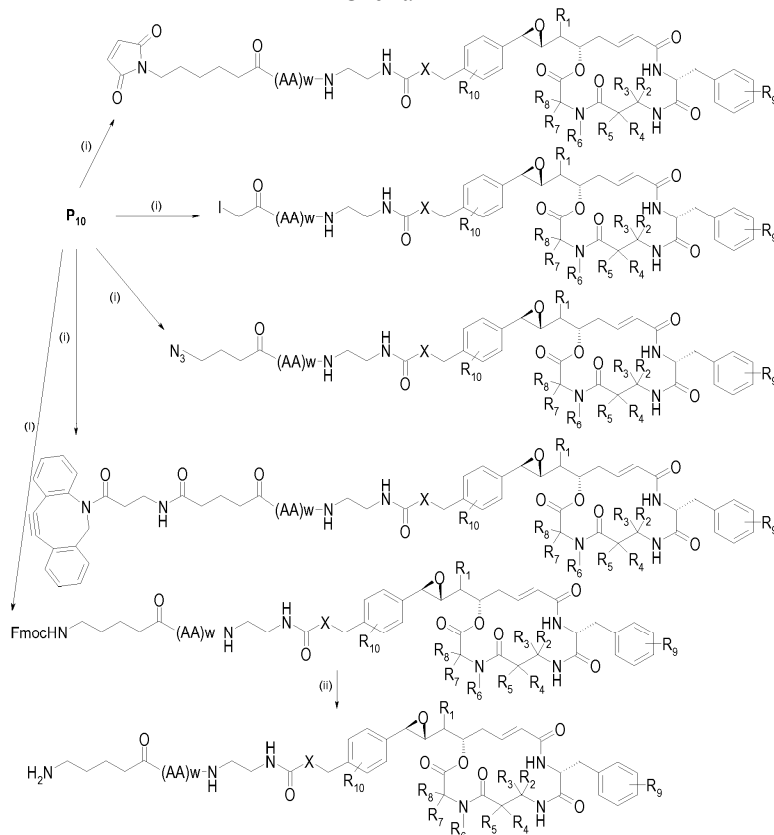
Стадия (iii): связывание с глутаровым ангидридом.

Стадия (iv): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира с помощью обработки ДСК в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Схемы 12 и 13 описывают случай L(IV18) с $n=1$, R_{17} и $R_{18}=H$ и $ALK=(CH_2)_3$, но они могут также применяться к другим линкерам L с $RCG1=C(=O)ONHS$, а именно к случаю L(IV18) с $n \neq 1$, и/или R_{17} , $R_{18} \neq H$, и/или $ALK \neq (CH_2)_3$ и случаям L(IV19) и L(IV20). Они предоставлены для линкера в пара-положении, но могут одинаково применяться для орто- или мета-положений. Аналогичным образом, они приведены для соединения криптофицина, но могут также применяться для получения других соединений формулы (I), в частности D₁-D₁₉.

Получение соединений формулы (II) в случае, когда $W=(CH_2)_nX$ с $X=O$ или S и $RCG1=$ малеимино, галогенацетиамидо, NH_2 , N_3 или циклооктин, а именно линкеров L(IV21)-(IV34).

Схема 14



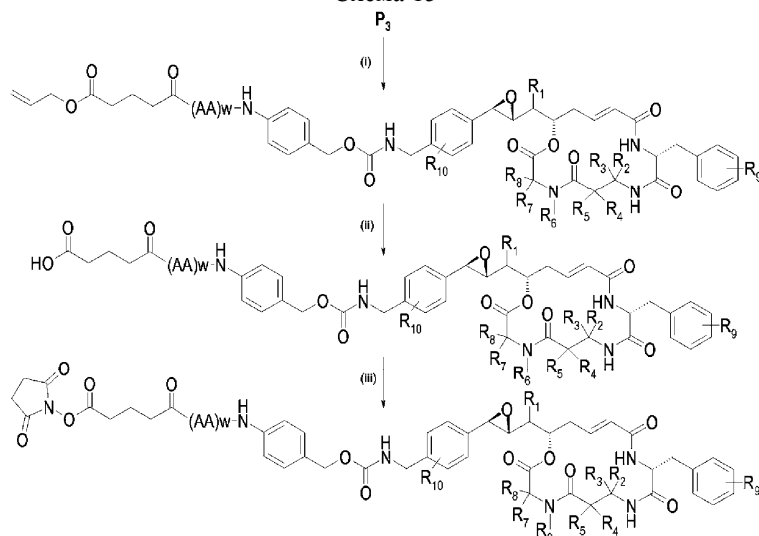
Стадия (i): образование (тио)карбамата, реакцию проводят в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (ii): снятие защитной группы Fmoc с амина в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Схема 14 описывает случай L(IV21) с $n=1$, R_{17} и $R_{18}=H$ и $ALK=(CH_2)_5$, случай L(IV25) с $n=1$ и R_{17} и $R_{18}=H$, случай L(IV29) с $n=1$, R_{17} и $R_{18}=H$ и $ALK=(CH_2)_4$, случай L(IV31) с $n=1$, R_{17} и $R_{18}=H$ и $ALK=(CH_2)_3$ и случай L(IV33) с $n=1$, R_{17} , R_{18} и $R_{22}=H$, $ALK=(CH_2)_3$ и $ALK'=(CH_2)_2$, но она может также применяться к другим линкерам L(IV21-34) с $RCG1=$ малеимино, иодацетиамидо, NH_2 , N_3 или циклооктин. Она приведена для реакционноспособной группы иодацетиамидо, но может одинаково применяться для реакционноспособной группы бромацетиамидо. Она предоставлена для линкера в пара-положении, но может одинаково применяться для орто- или мета-положений. Аналогичным образом, она приведена для соединения криптофицина, но может также применяться для получения других соединений формулы (I), в частности D₁-D₁₉.

Получение соединений формулы (II) в случае, когда $W=(CH_2)_nNH_2$ и $L=(IV35)$ с $n=1$, $R_{11}=R_{14}=R_{15}=R_{16}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$ и $ALK=(CH_2)_3$ на основе схемы 7.

Схема 15



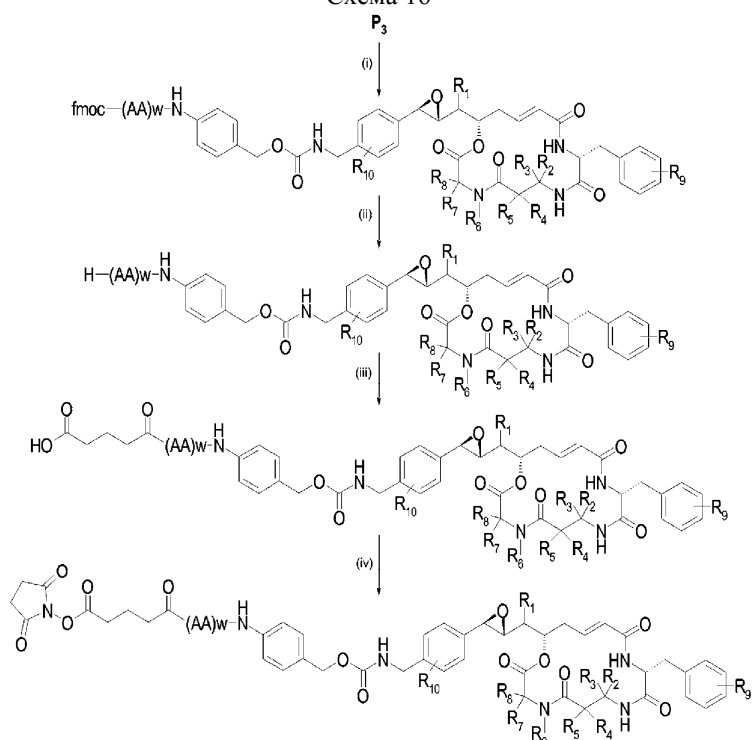
Стадия (i): образование карбамата, реакцию проводят в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (ii): снятие защитной группы с аллилового эфира в присутствии катализатора, такого как, например, тетраakis(трифенилфосфин)палладий.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира с помощью обработки ДСК в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Получение соединений формулы (II) в случае, когда $W=(CH_2)_nNH_2$ и $L=(IV35)$ с $n=1$, $R_{11}=R_{14}=R_{15}=R_{16}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$ и $ALK=(CH_2)_3$ на основе схемы 8.

Схема 16



Стадия (i): образование карбамата, реакцию проводят в присутствии основания, такого как, например, DIEA в присутствии подходящего реагента п-нитрофенилкарбоната.

Стадия (ii): снятие защитной группы Fmoc с амина в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): связывание с глутаровым ангидридом.

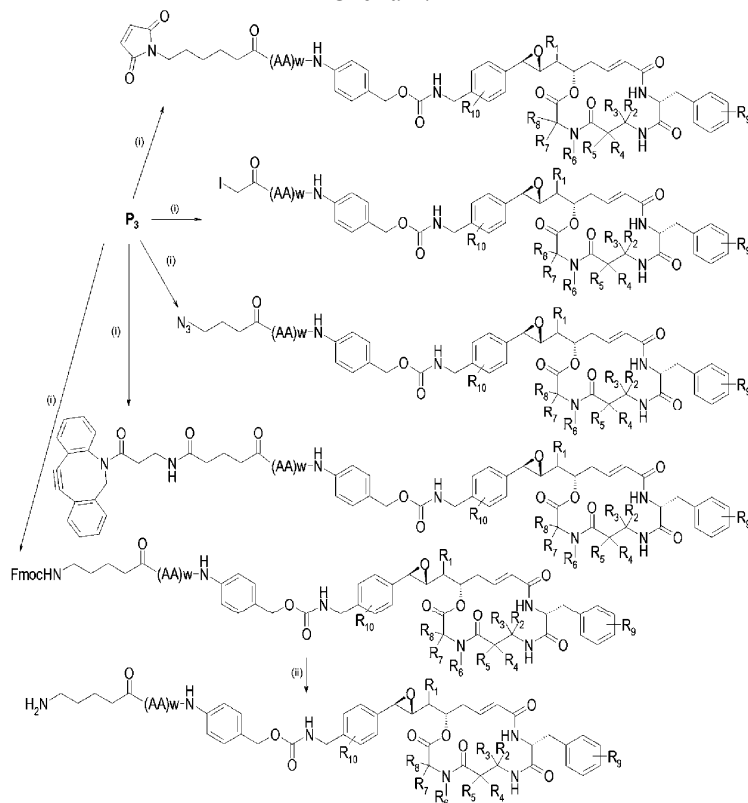
Стадия (iv): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира с помощью обработки ДСК в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Схемы 15 и 16 описывают случай $L(IV35)$ с $n=1$, $R_{11}=R_{14}=R_{15}=R_{16}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$, парабензило-

вым спиртом и $\text{ALK}=(\text{CH}_2)_3$, но они могут также применяться к другим линкерам L с $\text{RCG1}=\text{C}(=\text{O})\text{ONHS}$, а именно к случаю L(IV35) с $n \neq 1$, и/или $\text{R}_{11}, \text{R}_{14}, \text{R}_{15}, \text{R}_{16} \neq \text{H}$, и/или $\text{J}_1, \text{J}_2, \text{J}_3, \text{J}_4 \neq \text{CH}$, и/или ортобензиловым спиртом, и/или $\text{ALK} \neq (\text{CH}_2)_3$ и случаям L(IV36) и L(IV37) . Они предоставлены для линкера в пара-положении, но могут одинаково применяться для орто- или мета-положений. Аналогичным образом, они приведены для соединения криптофицина, но могут также применяться для получения других соединений формулы (I), в частности $\text{D}_1\text{-D}_{19}$.

Получение соединений формулы (II) в случае, когда $\text{W}=(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, с $n=1$, $\text{R}_{11}=\text{R}_{14}=\text{R}_{15}=\text{R}_{16}=\text{H}$, $\text{J}_1=\text{J}_2=\text{J}_3=\text{J}_4=\text{CH}$ и $\text{RCG1}=\text{малеими́до, галогенацета́мидо, NH}_2, \text{N}_3$ или циклооктин, а именно линкеров L(IV38)-L(IV151) .

Схема 17



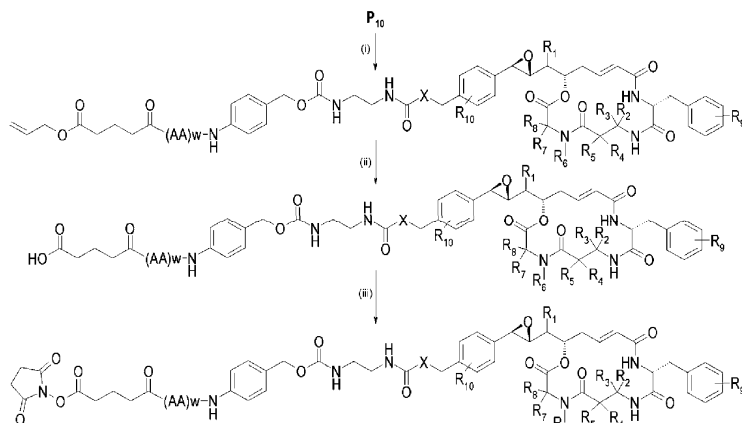
Стадия (i): образование карбамата, реакцию проводят в присутствии основания, такого как, например, DIEA, в присутствии подходящего реагента п-нитрофенилкарбоната.

Стадия (ii): снятие защитной группы Fmoc с амина в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Схема 17 описывает случаи L(IV38) с $n=1$, $\text{R}_{11}=\text{R}_{14}=\text{R}_{15}=\text{R}_{16}=\text{H}$, $\text{J}_1=\text{J}_2=\text{J}_3=\text{J}_4=\text{CH}$, парабензиловым спиртом и $\text{ALK}=(\text{CH}_2)_5$, L(IV42) с $n=1$, $\text{R}_{11}=\text{R}_{14}=\text{R}_{15}=\text{R}_{16}=\text{H}$, $\text{J}_1=\text{J}_2=\text{J}_3=\text{J}_4=\text{CH}$, и парабензиловым спиртом, L(IV46) с $n=1$, $\text{R}_{11}=\text{R}_{14}=\text{R}_{15}=\text{R}_{16}=\text{H}$, $\text{J}_1=\text{J}_2=\text{J}_3=\text{J}_4=\text{CH}$, парабензиловым спиртом и $\text{ALK}=(\text{CH}_2)_4$, L(IV48) с $n=1$, $\text{R}_{11}=\text{R}_{14}=\text{R}_{15}=\text{R}_{16}=\text{H}$, $\text{J}_1=\text{J}_2=\text{J}_3=\text{J}_4=\text{CH}$, парабензиловым спиртом и $\text{ALK}=(\text{CH}_2)_3$ и L(IV50) с $n=1$, $\text{R}_{11}=\text{R}_{14}=\text{R}_{15}=\text{R}_{16}=\text{R}_{22}=\text{H}$, $\text{J}_1=\text{J}_2=\text{J}_3=\text{J}_4=\text{CH}$, парабензиловым спиртом, $\text{ALK}=(\text{CH}_2)_3$ и $\text{ALK}'=(\text{CH}_2)_2$, но она может также применяться к другим линкерам L(IV38)-L(IV51) с $\text{RCG1}=\text{малеими́до, иодацета́мидо, NH}_2, \text{N}_3$ или циклооктин. Она приведена для парабензилового спирта, но она может также применяться для ортобензилового спирта. Она приведена для реакционноспособной группы иодацетамида, но может одинаково применяться для реакционноспособной группы бромацетамида. Она предоставлена для линкера в пара-положении, но может одинаково применяться для орто- или мета-положений. Аналогичным образом, она приведена для соединения криптофицина, но может также применяться для получения других соединений формулы (I), в частности $\text{D}_1\text{-D}_{19}$.

Получение соединений формулы (II) в случае, когда $W=(CH_2)_nX$ с $X=O$ или S и $L=(IV52)$ с $n=1$, $R_{14}=R_{15}=R_{16}=R_{17}=R_{18}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$ и $ALK=(CH_2)_n$ на основе схемы 7.

Схема 18



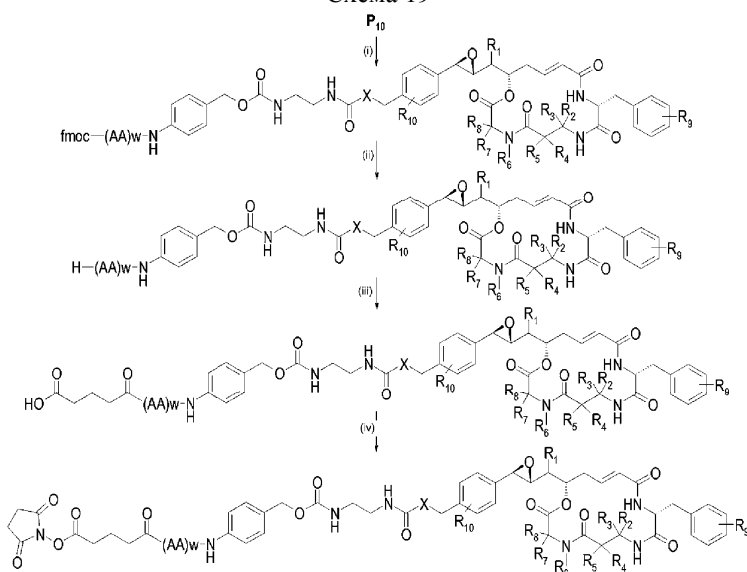
Стадия (i): образование (тио)карбамата с помощью взаимодействия с амином в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (ii): снятие защитной группы с аллилового эфира в присутствии катализатора, такого как, например, тетраис(трифенилфосфин)палладий.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира с помощью обработки ДСК в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Получение соединений формулы (II) в случае, когда $W=(CH_2)_nX$ с $X=O$ или S и $L=(IV52)$ с $n=1$, $R_{14}=R_{15}=R_{16}=R_{17}=R_{18}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$ и $ALK=CH_2$ на основе схемы 8.

Схема 19



Стадия (i): образование (тио)карбамата с помощью взаимодействия с амином в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (ii): снятие защитной группы Fmoc с амина в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

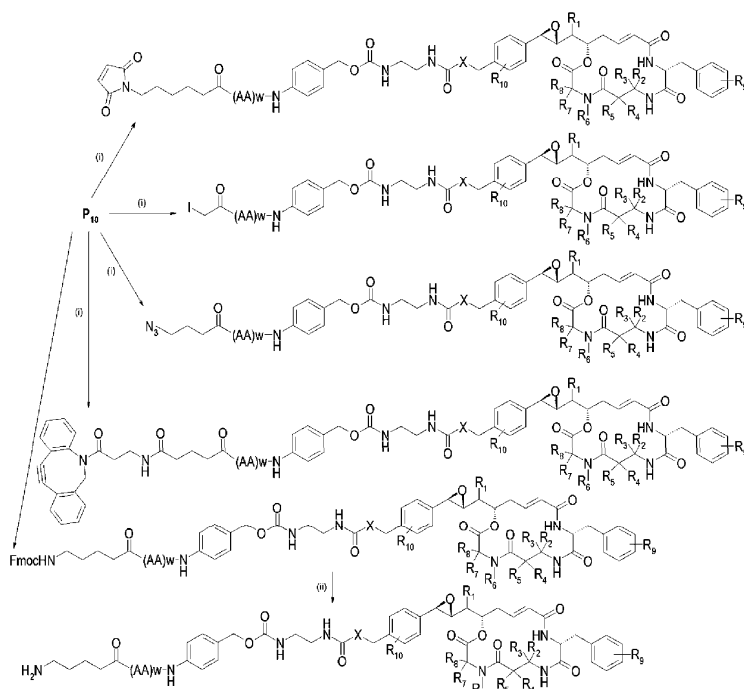
Стадия (iii): связывание с глутаровым ангидридом.

Стадия (iv): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира с помощью обработки ДСК в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Схемы 18 и 19 описывают случай $L(IV52)$ с $n=1$, $R_{14}=R_{15}=R_{16}=R_{17}=R_{18}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$, парабензиловым спиртом и $ALK=(CH_2)_3$, но они могут также применяться к другим линкерам L с $RCG1=C(=O)ONHS$, а именно к случаю $L(IV52)$ с $n \neq 1$, и/или R_{14} , R_{15} , R_{16} , R_{17} , $R_{18} \neq H$, и/или J_1 , J_2 , J_3 , $J_4 \neq CH$, и/или ортобензиловым спиртом, и/или $ALK \neq (CH_2)_3$ и случаям $L(IV53)$ и $L(IV54)$. Они предоставлены для линкера в пара-положении, но могут одинаково применяться для орто- или мета-положений. Аналогичным образом, они приведены для соединения криптофицина, но могут также применяться для получения других соединений формулы (I), в частности D_1 - D_{19} .

Получение соединений формулы (II) в случае, когда $W=(CH_2)_nX$ с $X=O$ или S и $RCG1$ =малеими́до, галогенацети́до, NH_2 , N_3 или циклоокти́н, а именно линкеров L(IV55)-(IV68).

Схема 20



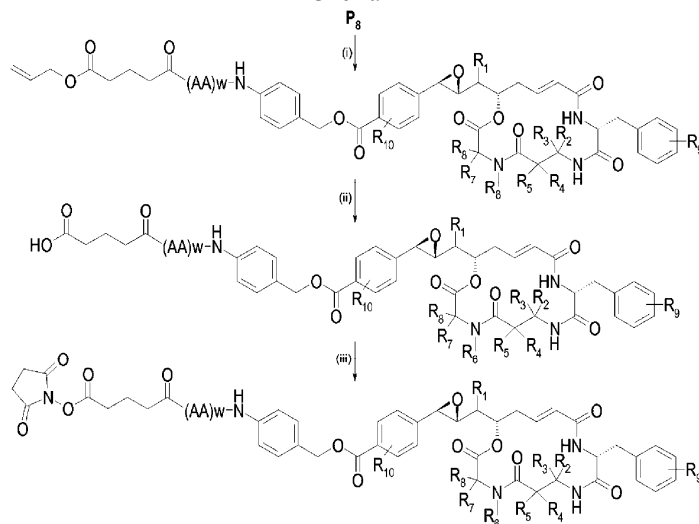
Стадия (i): образование (тио)карбамата с помощью взаимодействия с амином в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (ii): снятие защитной группы Fmoc с амина в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Схема 20 описывает случай L(IV55) с $n=1$, $R_{14}=R_{15}=R_{16}=R_{17}=R_{18}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$, парабензиловым спиртом, $ALK=(CH_2)_2$ и $ALK'=(CH_2)_5$, случай L(IV59) с $n=1$, $R_{14}=R_{15}=R_{16}=R_{17}=R_{18}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$, парабензиловым спиртом и $ALK=(CH_2)_2$, случай L(IV63) с $n=1$, $R_{14}=R_{15}=R_{16}=R_{17}=R_{18}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$, парабензиловым спиртом, $ALK=(CH_2)_2$ и $ALK'=(CH_2)_4$, случай L(IV65) с $n=1$, $R_{14}=R_{15}=R_{16}=R_{17}=R_{18}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$, парабензиловым спиртом, $ALK=(CH_2)_2$ и $ALK'=(CH_2)_3$ и случай L(IV67) с $n=1$, $R_{14}=R_{15}=R_{16}=R_{17}=R_{18}=R_{22}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$, парабензиловым спиртом, $ALK=(CH_2)_2$, $ALK'=(CH_2)_5$ и $ALK''=(CH_2)_2$, но она может также применяться к другим линкерам L(IV55-68) с $RCG1$ =малеими́до, иодацети́до, NH_2 , N_3 или циклоокти́н. Она приведена для реакционноспособной группы иодацети́до, но может одинаково применяться для реакционноспособной группы бромацети́до. Она предоставлена для линкера в пара-положении, но может одинаково применяться для орто- или мета-положений. Аналогичным образом, она приведена для соединения криптофицина, но может также применяться для получения других соединений формулы (I), в частности D₁-D₁₉.

Получение соединений формулы (II) в случае, когда $W=C(=O)O$ и $L=(IV69)$ с $R_{14}=R_{15}=R_{16}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$ и $ALK=(CH_2)_3$ на основе схемы 7.

Схема 21

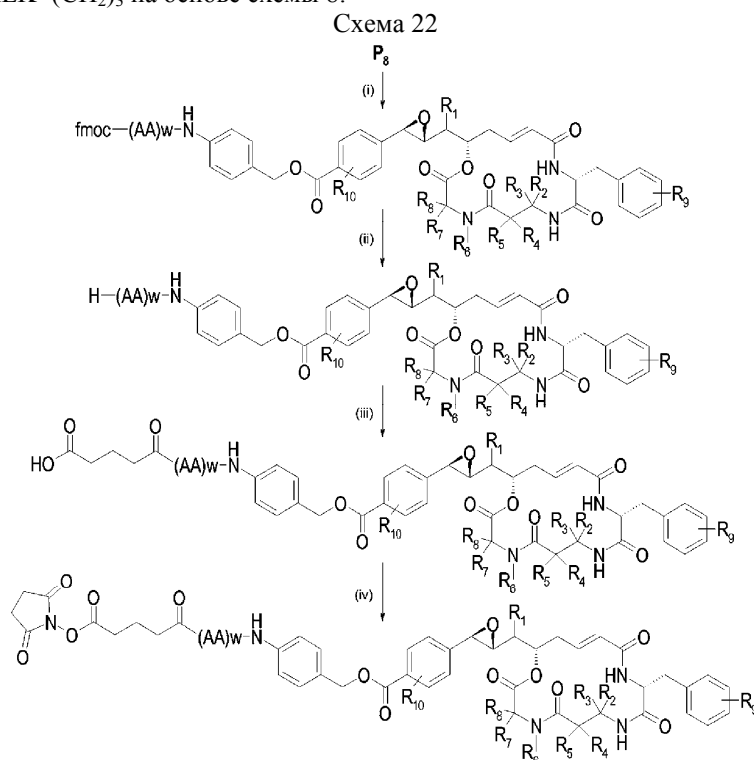


Стадия (i): этерификация в присутствии связывающего реагента, такого как, например, MNBA и основания, такого как, например, ДМАП и DIEA.

Стадия (ii): снятие защитной группы с аллилового эфира в присутствии катализатора, такого как, например, тетраакис(трифенилфосфин)палладий.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира с помощью обработки ДСК в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Получение соединений формулы (II) в случае, когда $W=C(=O)O$ и $L=(IV69)$ с $R_{14}=R_{15}=R_{16}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$ и $ALK=(CH_2)_3$ на основе схемы 8.



Стадия (i): этерификация в присутствии связывающего реагента, такого как, например, MNBA, и основания, такого как, например, ДМАП и DIEA.

Стадия (ii): снятие защитной группы Fmoc с амина в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

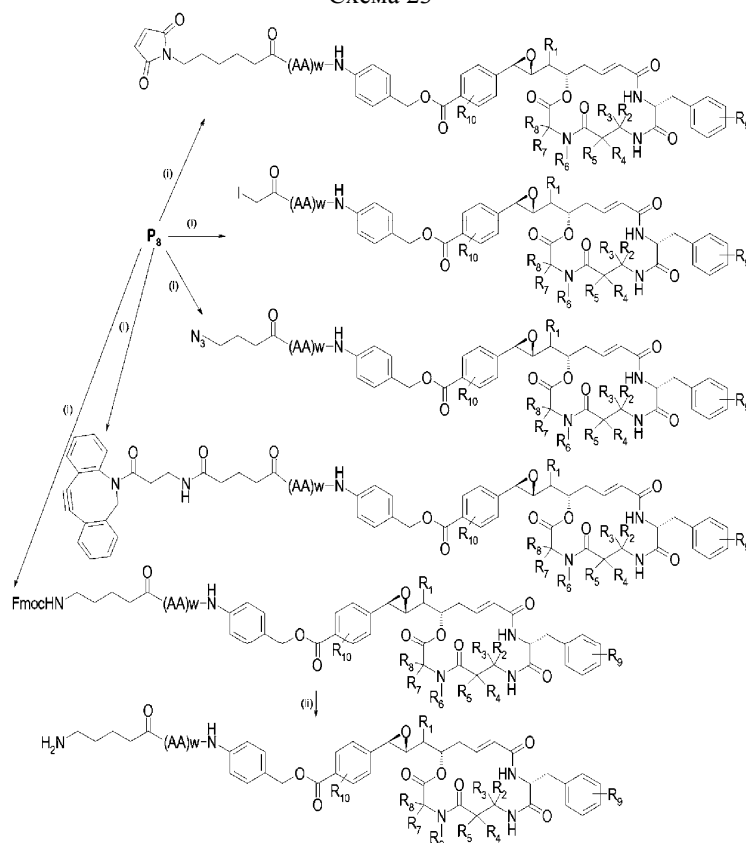
Стадия (iii): связывание с глутаровым ангидридом.

Стадия (iv): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира с помощью обработки ДСК в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Схемы 21 и 22 описывают случай $L(IV69)$ с $R_{14}=R_{15}=R_{16}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$, парабензиловым спиртом и $ALK=(CH_2)_3$, но они могут также применяться к другим линкерам L с $RCG1=C(=O)ONHS$, а именно к случаю $L(IV69)$ с R_{14} , R_{15} , $R_{16}\neq H$, и/или J_1 , J_2 , J_3 , $J_4\neq CH$, и/или ортобензиловым спиртом, и/или $ALK\neq(CH_2)_3$ и случаям $L(IV70)$ и $L(IV71)$. Они предоставлены для линкера в пара-положении, но могут одинаково применяться для орто- или мета-положений. Аналогичным образом, они приведены для соединения криптофицина, но могут также применяться для получения других соединений формулы (I), в частности D_1 - D_{19} .

Получение соединений формулы (II) в случае, когда $W=C(=O)O$ с $R_{14}=R_{15}=R_{16}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$ и $RCG1=$ малеимидо, галогенацетиамидо, NH_2 , N_3 или циклооктин, а именно линкеров L(IV72)-L(IV85).

Схема 23



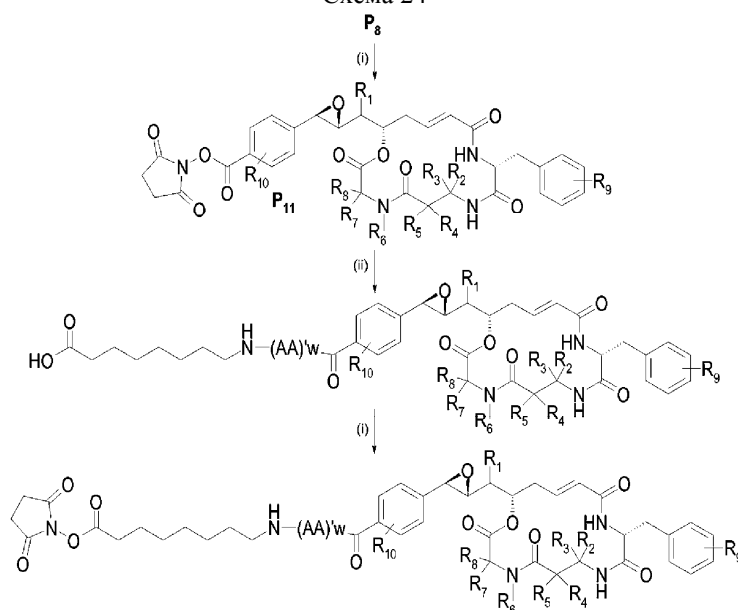
Стадия (i): этерификация в присутствии связывающего реагента, такого как, например, MNBA, и основания, такого как, например, ДМАП и DIEA.

Стадия (ii): снятие защитной группы Fmoc с амина в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Схема 23 описывает случаи L(IV72) с $n=1$, $R_{14}=R_{15}=R_{16}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$, парабензиловым спиртом и $ALK=(CH_2)_5$, L(IV76) с $n=1$, $R_{14}=R_{15}=R_{16}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$, и парабензиловым спиртом, L(IV80) с $n=1$, $R_{14}=R_{15}=R_{16}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$, парабензиловым спиртом и $ALK=(CH_2)_4$, L(IV82) с $n=1$, $R_{14}=R_{15}=R_{16}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$, парабензиловым спиртом и $ALK=(CH_2)_3$ и L(IV84) с $n=1$, $R_{14}=R_{15}=R_{16}=R_{22}=H$, $J_1=J_2=J_3=J_4=CH$, парабензиловым спиртом, $ALK=(CH_2)_3$ и $ALK'=(CH_2)_2$, но она может также применяться к другим линкерам L(IV72)-L(IV85) с $RCG1=$ малеимидо, иодацетиамидо, NH_2 , N_3 или циклооктин. Она приведена для парабензилового спирта, но она может также применяться для ортобензилового спирта. Она приведена для реакционноспособной группы иодацетиамидо, но может одинаково применяться для реакционноспособной группы бромацетиамидо. Она предоставлена для линкера в пара-положении, но может одинаково применяться для орто- или мета-положений. Аналогичным образом, она приведена для соединения криптофизина, но может также применяться для получения других соединений формулы (I), в частности D₁-D₁₉.

Получение соединений формулы (II) в случае, когда $W=C(=O)O$ и $L=(V86)$ с $R_{25}=H$ и $ALK=(CH_2)_7$.

Схема 24



Стадия (i): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира с помощью обработки ДСК в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

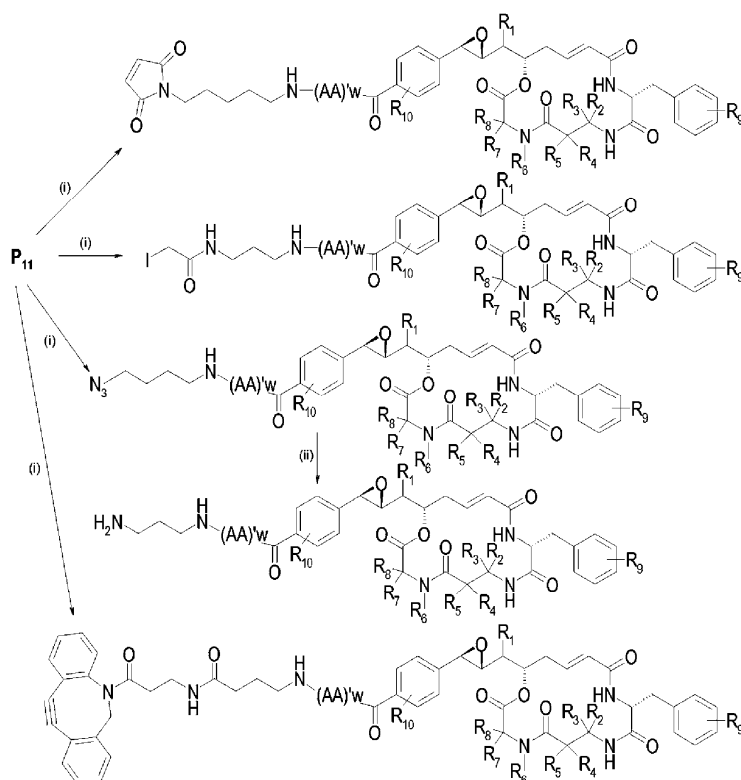
Стадия (ii): образование пептидной связи в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира с помощью обработки ДСК в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Схема 24 описывает случай $L(V86)$ с $R_{25}=H$ и $ALK=(CH_2)_7$, но она может также применяться к другим линкерам L с $RCG1=C(=O)ONHS$, а именно к случаю $L(V86)$ с $R_{25}\neq H$ и/или $ALK\neq(CH_2)_7$ и случаям $L(V87)$ и $L(V88)$. Она предоставлена для линкера в пара-положении, но может одинаково применяться для орто- или мета-положений. Аналогичным образом, она приведена для соединения криптофицина, но может также применяться для получения других соединений формулы (I), в частности D_1 - D_{19} .

Получение соединений формулы (II) в случае, когда $W=C(=O)O$ с $R_{30}=H$ и $RCG1$ =малеимино, галогенацетиамидо, NH_2 , N_3 или циклооктин, а именно линкеров $L(V89)$ - $L(V101)$.

Схема 25



Стадия (i): образование пептидной связи в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

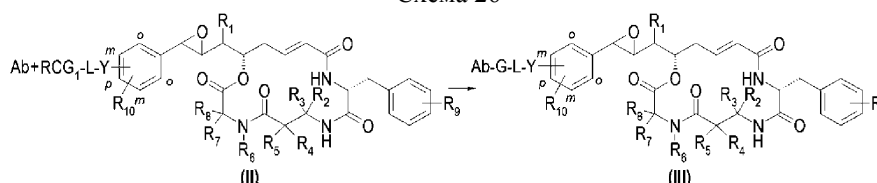
Стадия (ii): восстановление азидо с помощью обработки восстановителем, таким как, например, ТСЕР.

Схема 25 описывает случаи L(V89) с $R_{25}=H$ и $ALK=(CH_2)_5$, L(V93) с $R_{25}=H$ и $ALK=(CH_2)_3$, L(V96) с $R_{25}=H$ и $ALK=(CH_2)_4$, L(V98) с $R_{25}=H$ и $ALK=(CH_2)_3$ и L(V100) с $R_{22}=R_{25}=H$, $ALK=(CH_2)_3$ и $ALK'=(CH_2)_2$, но она может также применяться к другим линкерам L(V89)-L(V101) с $RCG1$ =малеимидо, иодацетиамидо, NH_2 , N_3 или циклооктин. Она приведена для реакционноспособной группы иодацетиамидо, но может одинаково применяться для реакционноспособной группы бромацетиамидо. Она предоставлена для линкера в пара-положении, но может одинаково применяться для орто- или мета-положений. Аналогичным образом, она приведена для соединения криптофицина, но может также применяться для получения других соединений формулы (I), в частности D₁-D₁₉.

Способ получения конъюгатов криптофицина.

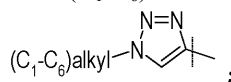
Соединения формулы (III) могут быть получены в соответствии со схемой 26, исходя из полезной нагрузки криптофицина формулы (II) и антитела (Ab).

Схема 26



в которой

Y представляет собой (C₁-C₆)алкил-NR₁₁ или (C₁-C₆)алкил-O или (C₁-C₆)алкил-S; или, альтернативно, Y представляет собой C(=O)O или O(C₁-C₆)алкил-C(=O)O; или, альтернативно, Y представляет собой (C₁-C₆)алкил-триазол-подобный



Y располагается в орто- (o), мета- (m) или пара- (p) положении фенильного ядра;

R₁₁ представляет собой атом водорода или (C₁-C₆)алкильную группу;

L представляет собой линкер, расположенный в орто- (o), мета- (m) или пара- (p) положении фенильного ядра, как определено выше;

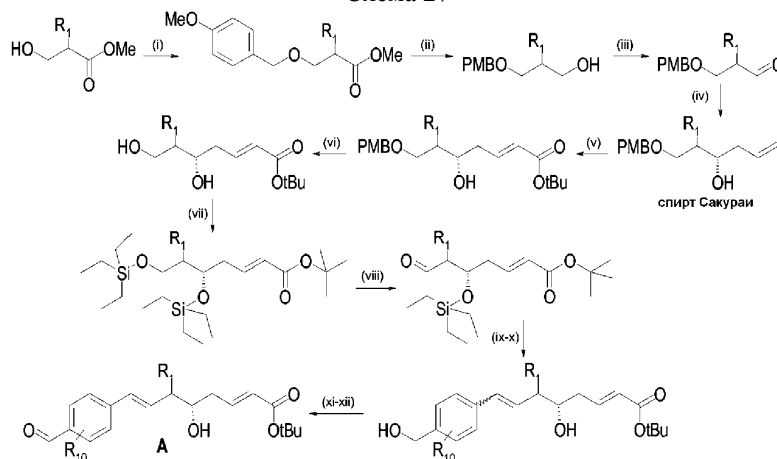
RCG₁ представляет собой реакционноспособную химическую группу, которая является реакционноспособной по отношению к реакционноспособной химической группе, присутствующей на антителе, как определено выше;

Ab представляет собой антитело.

Способ получения структурных элементов для синтеза соединений криптофицина формулы (I).

Общий синтез фрагмента A.

Схема 27



Фрагмент A может быть получен за 12 стадий, исходя из соответствующих гидроксифиров, с помощью стадий, подробно описанных ниже.

Стадия (i): защита спирта в виде п-метоксибензильного эфира с использованием п-метоксибензильного спирта, активированного в виде трихлорацетимидата, в присутствии каталитического количества кислоты, такой как, например, p-TsOH.

Стадия (ii): восстановление сложного эфира с использованием восстановителя, такого как, например, боргидрид лития.

Стадия (iii): окисление спирта с использованием окислителя, такого как, например, ТЕМПО, в присутствии гипохлорита натрия.

Стадия (iv): диастереоселективное аллилирование с использованием аллилтрибутилола в присутствии тетрахлоорида олова.

Стадия (v): кросс-метатезис с использованием трет-бутилакрилата в присутствии катализатора, такого как, например, катализатор Граббса II.

Стадия (vi): снятие защитной группы с п-метоксибензильового эфира с использованием ЦАН и последующая обработка этандитиолом в присутствии каталитического количества кислоты, такой как, например, п-TsOH.

Стадия (vii): защита спиртов в виде силиловых эфиров с использованием хлортриэтилсилана в присутствии основания, такого как, например, имидазол.

Стадия (viii): окисление по Сверну с использованием ДМСО и оксалилхлорида в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (ix): реакция Виттига с использованием подходящего галогенида фосфония, например бромида, и сильного основания, такого как, например, BuLi.

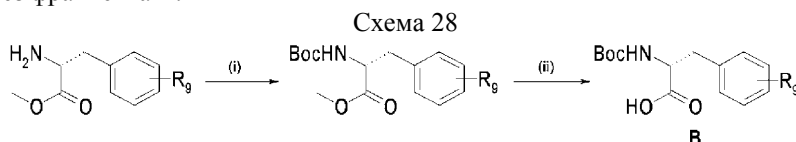
Стадия (x): снятие защитной группы с силиловового эфира с использованием, например, раствора TBAF.

Стадия (xi): окисление бензильового спирта с использованием окислителя, такого как, например, оксид марганца.

Стадия (xii): изомеризация двойной связи с использованием AIBN в присутствии бензолтиола.

Гидроксифиры являются коммерчески доступными для $R_1=Me$ (номер CAS [72657-23-9]), Et (номер CAS [72604-81-0]) и iPr (номер CAS [72604-82-1]). Получение галогенидов фосфония описано в WO 2011/001052.

Общий синтез фрагмента B.



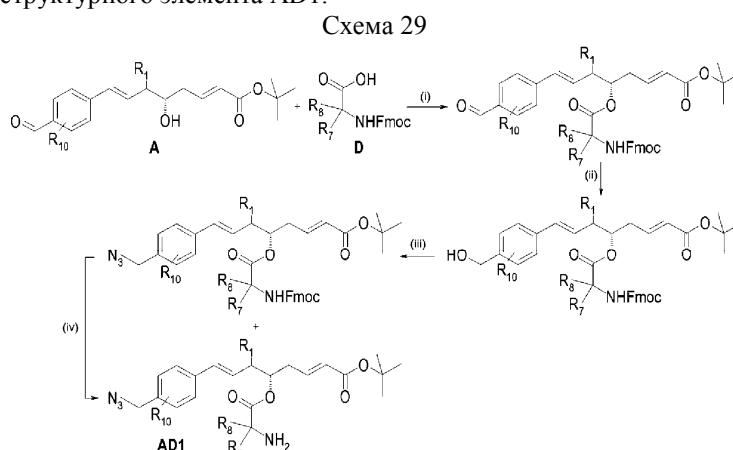
Фрагмент B может быть получен за 2 стадии, исходя из соответствующих аминокислот, с помощью стадий, подробно описанных ниже.

Стадия (i): защита амина с помощью обработки Boc_2O в присутствии основания, такого как, например, TЭА.

Стадия (ii): омыление метилового эфира с использованием основания, такого как, например, LiOH.

Аминокислоты, защищенные в виде метильовых эфиров, являются коммерчески доступными для $R_9=3-Cl$, 4-OMe (номер CAS [704870-54-2]); 3-Cl, 4-OEt (номер CAS [1256963-00-9]); 3-Cl, 4-OPr (номер CAS [1259709-59-9]); 3-Cl, 4-OMe, 5-F (номер CAS [1213670-98-4]); 3-Cl, 4-OMe, 5-Cl (номер CAS [1259701-42-2]); 3-Cl, 4-OMe, 5-OMe (номер CAS [1212820-34-2]); 3-Cl, 4-OH, 5-OMe (номер CAS [1213426-93-7]); 3-Cl, 4-NH₂ (номер CAS [1213672-64-0]); 2-Cl, 3-Cl, 4-NH₂ (номер CAS [1213607-49-8]); 3-Cl, 4-NH₂, 5-F (номер CAS [1213400-66-8]); 3-Cl, 4-NH₂, 5-Cl (номер CAS [1213480-30-8]).

Общий синтез структурного элемента AD1.



Фрагменты A и D позволяют получить структурный элемент AD1 с помощью стадий, подробно описанных ниже.

Стадия (i): этерификация фрагмента D фрагментом A в присутствии связывающего реагента, такого как, например, MNBA, и основания, такого как, например, ДМАП и DIEA.

Стадия (ii): восстановление альдегида в спирт с использованием восстановителя, такого как, например, триметоксигидрид натрия.

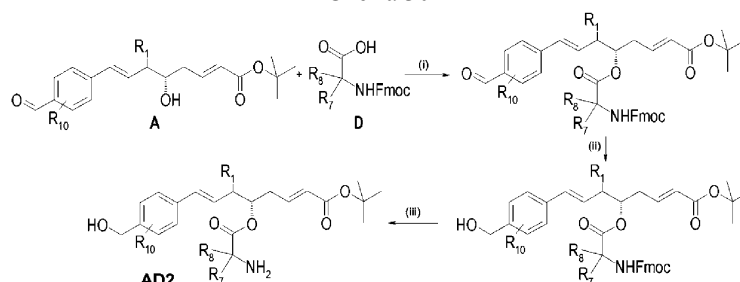
Стадия (iii): активация спирта в виде мезилата с помощью обработки метансульфонилхлоридом в присутствии основания, такого как, например, TЭА; замещение мезилата азидогруппой с помощью обра-

ботки азидом натрия.

Стадия (iv): снятие защитной группы с амина с помощью обработки основанием, таким как, например, пиперидин.

Общий синтез структурного элемента AD2.

Схема 30



Фрагменты A и D позволяют получить структурный элемент AD2 с помощью стадий, подробно описанных ниже.

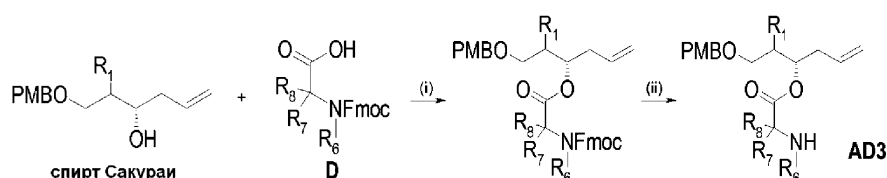
Стадия (i): этерификация фрагмента D фрагментом A в присутствии связывающего реагента, такого как, например, MNBA, и основания, такого как, например, ДМАП и DIEA.

Стадия (ii): восстановление альдегида в спирт с использованием восстановителя, такого как, например, триметоксисборгидрид натрия.

Стадия (iii): снятие защитной группы с амина с помощью обработки основанием, таким как, например, пиперидин.

Общий синтез структурного элемента AD3.

Схема 31

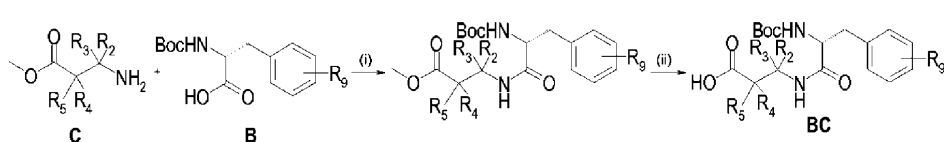


Стадия (i): этерификация фрагмента D спиртом Сакураи в присутствии связывающего реагента, такого как, например, MNBA, и основания, такого как, например, ДМАП и DIEA.

Стадия (ii): снятие защитной группы с амина с помощью обработки основанием, таким как, например, пиперидин.

Общий синтез структурного элемента BC.

Схема 32



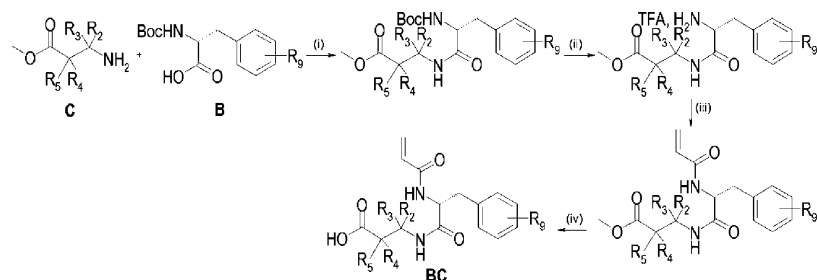
Фрагменты B и C позволяют получить структурный элемент BC с помощью стадий, подробно описанных ниже.

Стадия (i): образование пептидной связи фрагмента B с фрагментом C в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, HOBt и EDC, и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (ii): омыление метилового эфира с использованием основания, такого как, например, LiOH.

Общий синтез альтернативного структурного элемента BC.

Схема 33



Фрагменты B и C позволяют получить альтернативный структурный элемент BC с помощью стадий, подробно описанных ниже.

Стадия (i): образование пептидной связи фрагмента B с фрагментом C в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, HOBt и EDC, и основания, такого как, например, DIEA.

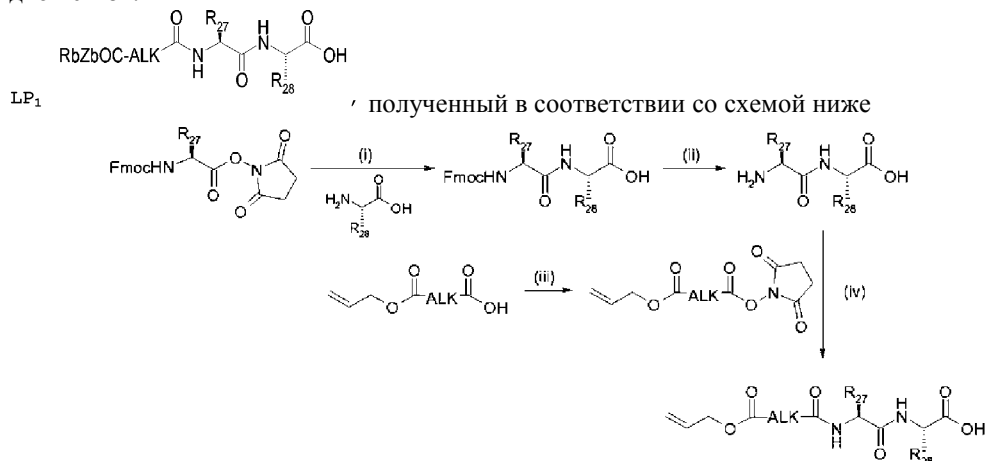
Стадия (ii): снятие защитной группы Boc в кислых условиях с использованием, например, ТФУК.

Стадия (iii): образование акриламида с помощью обработки акрилоилхлоридом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iv): омыление метилового эфира с использованием основания, такого как, например, tBuOK.

Получение прекурсоров линкера LP.

LP может представлять собой один из следующих: LP₁-LP₁₀₁ описаны с использованием L-аминокислот, но могут также применяться D-аминокислоты. Они приведены для w=2, но могут аналогичным образом применяться к w>2, повторяя столько раз, сколько потребуется, стадию образования пептидной связи.



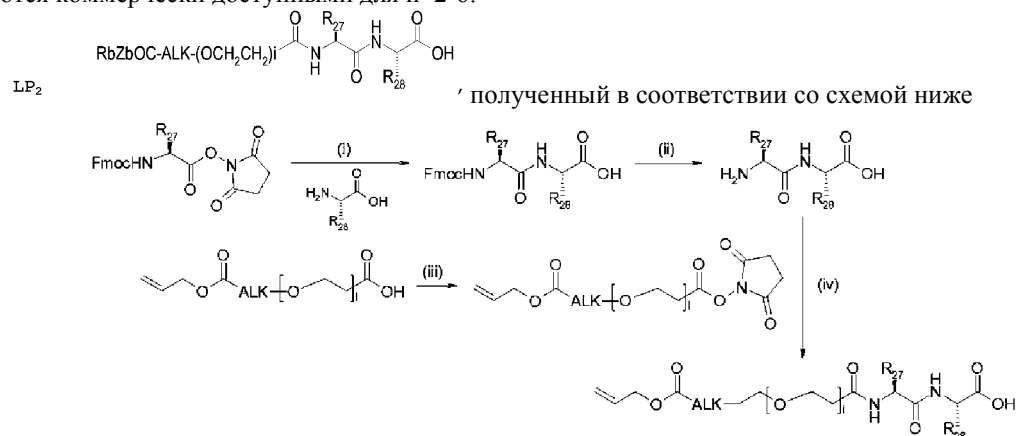
Стадия (i): образование пептидной связи между Fmoc-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂O, в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EDC.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят при КТ в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/CH₃CN.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; дикислоты, монозащищенные в виде аллилового эфира, являются коммерчески доступными для n=2 (моноаллилсукцинат) или могут быть получены с помощью переэтерификации метиловых или трет-бутиловых моноэфиров, которые являются коммерчески доступными для n=2-6.



Стадия (i): образование пептидной связи между Fmoc-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂O, в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

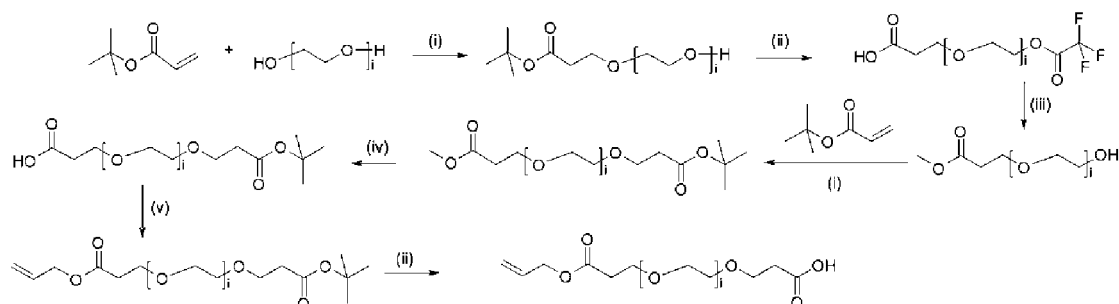
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, ДЦК на подложке.

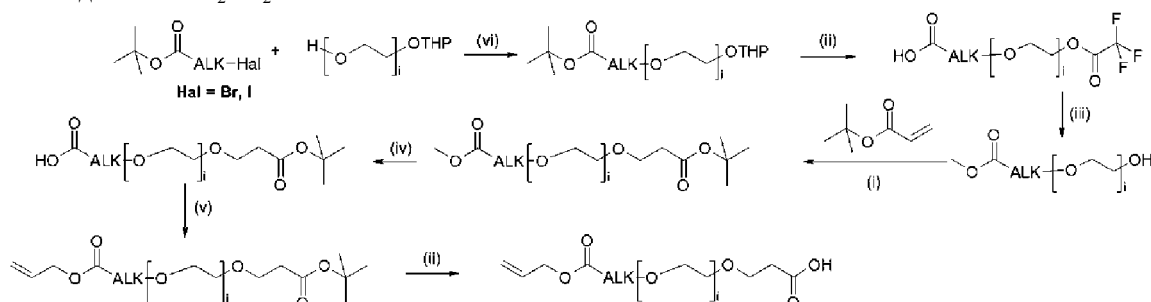
Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ CH_3CN .

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; ПЭГ-дикислоты, монозащищенные в виде аллилового эфира, могут быть получены в соответствии со схемой ниже:

когда $\text{ALK}=\text{CH}_2\text{CH}_2$



когда $\text{ALK}\neq\text{CH}_2\text{CH}_2$



Стадия (i): удлинение ПЭГ-цепи; реакцию проводят в безводном полярном апротонном растворителе, таком как ТГФ или ДМФ, с помощью обработки ненасыщенной защищенной кислоты алкоксидом, полученным действием натрия в каталитическом количестве.

Стадия (ii): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты. В последнем случае может быть образован трифторацетат спиртовой функциональной группы, присутствующей в структуре. Данный трифторацетат расщепляется в течение следующей стадии (iii).

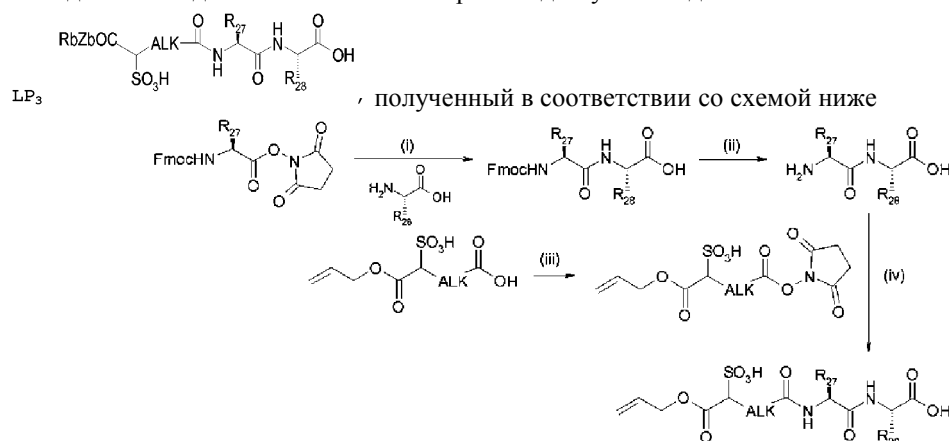
Стадия (iii): защита карбоновой кислоты в виде метилового эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как MeOH, с помощью обработки триметилсилилдиазометаном.

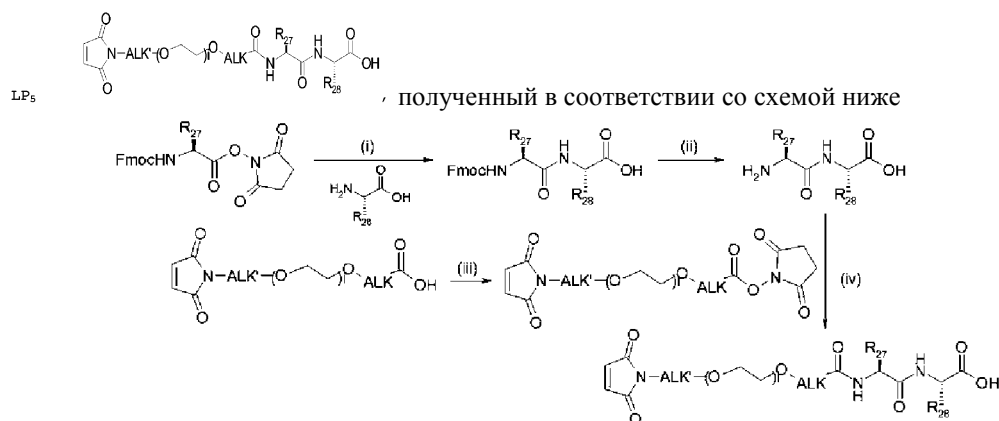
Стадия (iv): омыление метилового эфира; реакцию проводят в смеси полярных растворителей, такой как смесь ТГФ/ H_2O , в присутствии LiOH.

Стадия (v): защита карбоновой кислоты в виде аллилового эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии аллилового спирта, связывающего агента, такого как, например, EDC, и основания, такого как, например, ДМАП.

Стадия (vi): удлинение ПЭГ-цепи; реакцию проводят в безводном полярном апротонном растворителе, таком как ТГФ или ДМФ, с помощью обработки галогенированного эфира алкоксидом ПЭГ-диола, монозащищенного в виде эфира ТГФ. Получение данного типа монозащищенного ПЭГ-диола подробно описано в литературе: см., например, Richard A., et al., Chem. Eur. J. 2005, 11, 7315-7321 или Sakellariou E.G., et al., Tetrahedron 2003, 59, 9083-9090.

Исходные ПЭГ-диолы являются коммерчески доступными для $i=3-12$.





Стадия (i): образование пептидной связи между Fmoc-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂О, в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

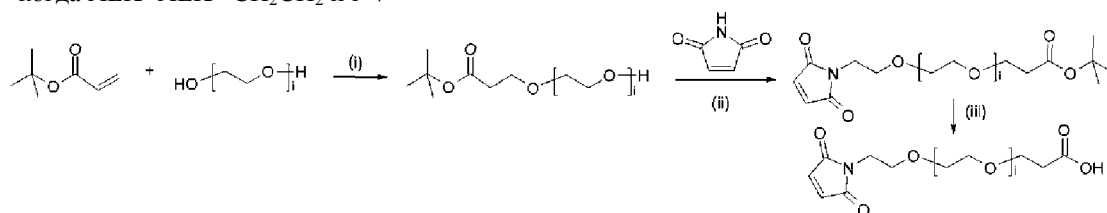
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/МеОН, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, ДЦК на подложке.

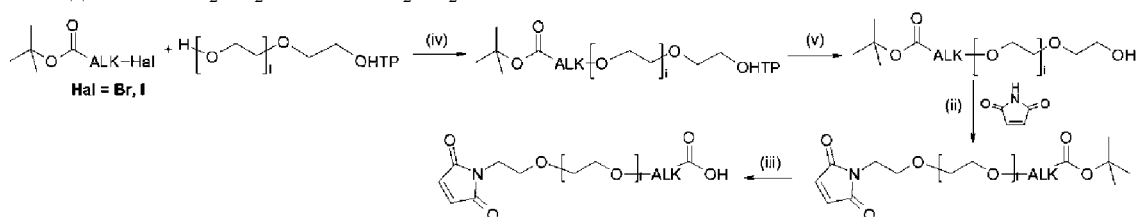
Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/СН₃CN.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; малеимидокислоты являются коммерчески доступными для $ALK=ALK'=CH_2CH_2$ и $i=1-7$ и могут быть получены иным образом в соответствии со схемой ниже:

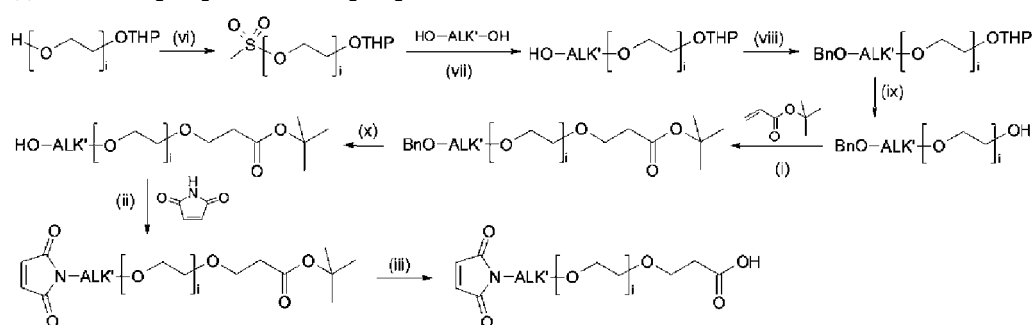
когда $ALK=ALK'=CH_2CH_2$ и $i>7$



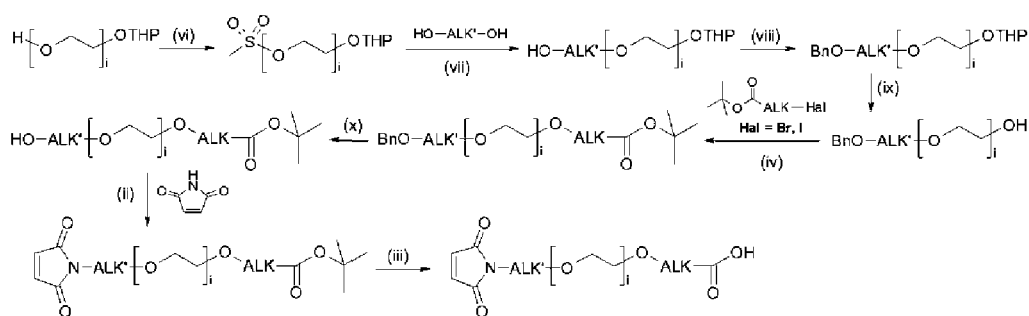
когда $ALK \neq CH_2CH_2$ и $ALK'=CH_2CH_2$



когда $ALK=CH_2CH_2$ и $ALK' \neq CH_2CH_2$



когда ALK и $ALK' \neq CH_2CH_2$



Стадия (i): удлинение ПЭГ-цепи; реакцию проводят в безводном полярном апротонном растворителе, таком как ТГФ или ДМФ, с помощью обработки ненасыщенной защищенной кислоты алкоксидом, полученным действием натрия в каталитическом количестве.

Стадия (ii): реакция Мицунобу на малеимиде; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ТГФ, с помощью обработки малеимида ПЭГ-гидроксикислотой в присутствии PPh_3 и DIAD.

Стадия (iii): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

Стадия (iv): удлинение ПЭГ-цепи; реакцию проводят в безводном полярном апротонном растворителе, таком как ТГФ или ДМФ, с помощью обработки галогенированного эфира алкоксидом ПЭГ-диола, монозащищенного в виде эфира ТГФ. Получение данного типа монозащищенного ПЭГ-диола подробно описано в литературе, см., например, Richard A., et al., Chem. Eur. J. 2005, 11, 7315-7321 или Sakellariou E.G., et al., Tetrahedron 2003, 59, 9083-9090.

Стадия (v): селективное снятие защитной группы с эфира ТГФ; реакцию проводят в полярном протонном растворителе, таком как MeOH, с использованием каталитического количества ацетилхлорида.

Стадия (vi): активация спирта в виде мезилата; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки метансульфонилхлоридом в присутствии основания, такого как, например, ТЭА.

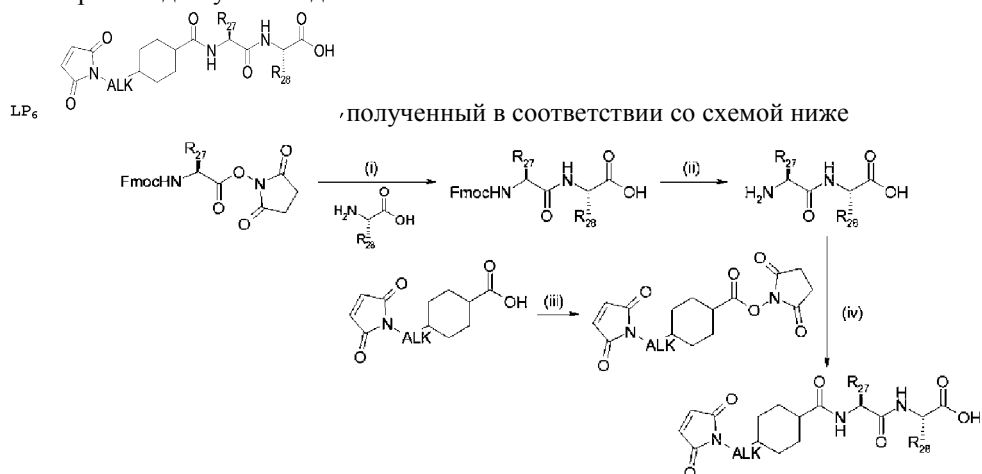
Стадия (vii): нуклеофильное замещение; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДМФ, в присутствии основания, такого как, например, гидрид натрия.

Стадия (viii): защита спирта в виде бензильного эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ТГФ, с помощью обработки бензилбромидом в присутствии основания, такого как, например, гидрид натрия.

Стадия (ix): снятие защитной группы со спирта с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

Стадия (x): снятие защитной группы со спирта с помощью гидрогенолиза в присутствии катализатора, такого как, например, палладий на угле.

Исходные ПЭГ-диолы являются коммерчески доступными для $i=3-12$. Исходные ALK-диолы являются коммерчески доступными для $n=1-12$.



Стадия (i): образование пептидной связи между Fmoc-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

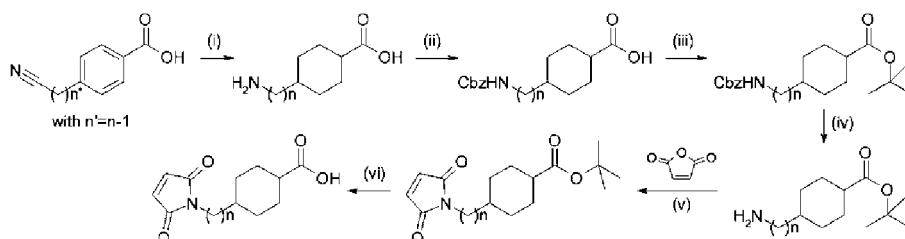
Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном рас-

творителе, таком как смесь ДМФ/Н₂O, с помощью обработки N,N'-дисулцинимидилкарбонатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

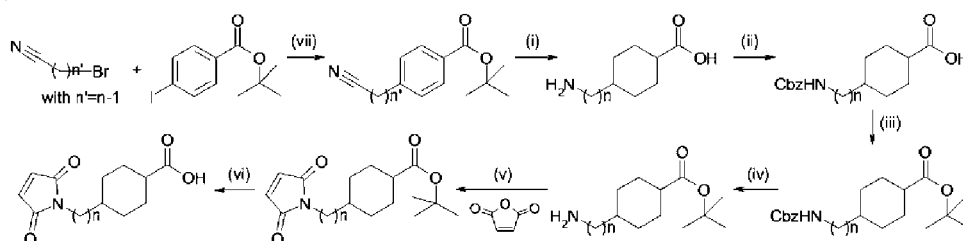
Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/CH₃CN.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; малеимидоциклогексанкарбоновая кислота является коммерчески доступной для ALK=CH₂ и может быть получена иным образом в соответствии со схемой ниже.

Когда n=2-4



Когда n>4



Стадия (i): гидрирование; реакцию проводят при 60°C в уксусной кислоте в присутствии катализатора, такого как оксид платины, под давлением водорода, например, 60 фунт/кв.дюйм.

Стадия (ii): защита амина; реакцию проводят в полярном протонном растворителе, таком как смесь диоксан/Н₂O, с помощью обработки бензилхлорформиатом в присутствии основания, такого как, например, NaOH.

Стадия (iii): защита карбоновой кислоты; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки трет-бутанолом в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EDC, и основания, такого как, например, ДМАП.

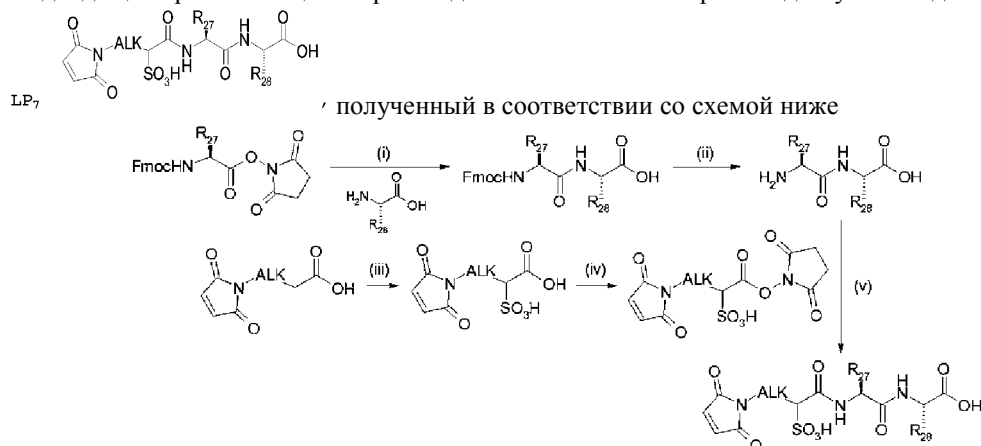
Стадия (iv): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят с помощью гидрогенолиза в полярном протонном растворителе, таком как MeOH, в присутствии катализатора, такого как, например, палладий.

Стадия (v): введение фрагмента малеимида; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДМФ, с помощью обработки малеиновым ангидридом в присутствии NHS и связывающего реагента, такого как, например, EDC.

Стадия (vi): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

Стадия (vii): катализируемое палладием образование связи; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ТГФ, с помощью обработки бром-ALK-цианопроизводным в присутствии хлорида лития, цинка и триметилхлорсилана и катализатора, такого как, например, тетра-кис(трифенилфосфин)палладий.

Подходящие бром-ALK-цианопроизводные являются коммерчески доступными для n=1-12.



Стадия (i): образование пептидной связи между Fmoc-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂О, в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

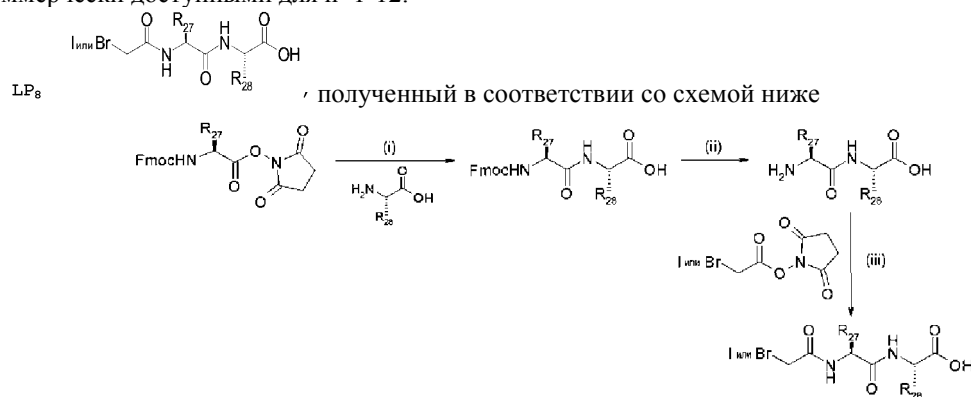
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/МеОН, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): α-сульфирование карбоновой кислоты; реакцию проводят при 75°C в полярном апротонном растворителе, таком как ДХЭ, с помощью обработки хлорсульфоновой кислотой в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iv): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят при КТ в полярном растворителе, таком как смесь ДМФ/Н₂О, с помощью обработки N,N'-дисукцинимидилкарбонатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (v): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят при КТ в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/СН₃CN.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; малеимидокислоты являются коммерчески доступными для n=1-12.

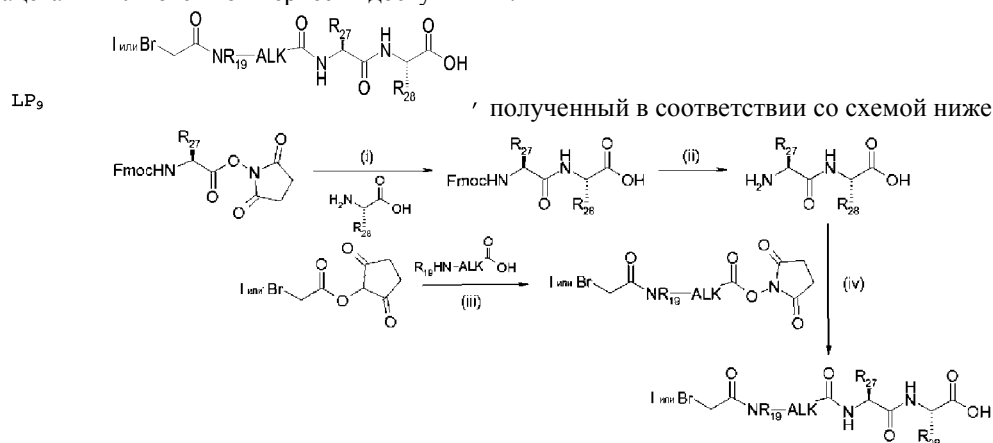


Стадия (i): образование пептидной связи между Fmoc-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂О, в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/МеОН, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/СН₃CN.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; N-сукцинимидилбromo- и иодоацетаты являются коммерчески доступными.



Стадия (i): образование пептидной связи между Fmoc-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂О, в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

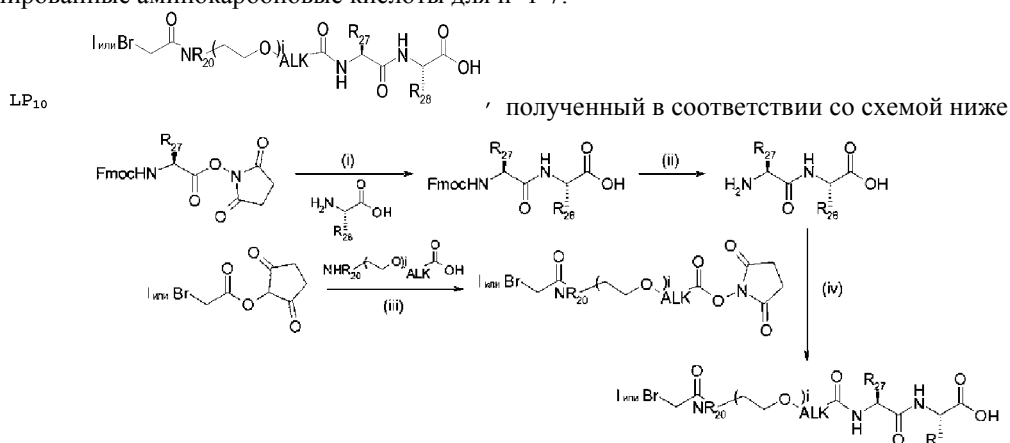
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/МеОН, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): образование связи и активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; образование связи N-сукцинимидилbromo- и иодоацетата с аминокислотой проводят при КТ в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ДМФ, с последующим добавлением N,N'-дисукцинимидилкарбоната и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в

полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/CH₃CN.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; N-сукцинимидилбромо- и иодоацетаты являются коммерчески доступными, аминокарбоновые кислоты также для n=1-12 и N-метилированные аминокарбоновые кислоты для n=1-7.



Стадия (i): образование пептидной связи между Fmoc-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂O, в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

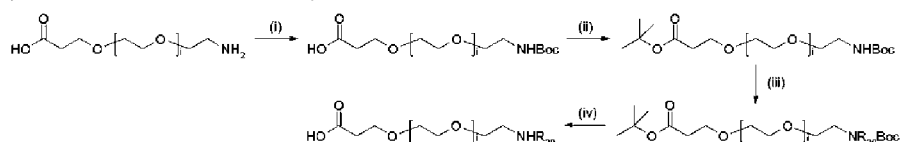
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): образование связи и активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; образование связи N-сукцинимидилбромо- и иодоацетата с аминокарбоновой кислотой проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ДМФ, с последующим добавлением N,N'-дисукуцинимидилкарбоната и основания, такого как, например, DIEA.

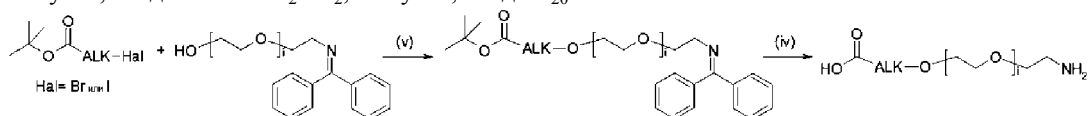
Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/CH₃CN.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; N-сукцинимидилбромо- и иодоацетаты являются коммерчески доступными; в случае, когда ALK=CH₂CH₂ и R₂₀=H, амино-ПЭГ-карбоновые кислоты являются коммерчески доступными для i=1-6 и иным образом могут быть получены из трет-бутилакрилата и соответствующего амино-ПЭГ-спирта; в случае, когда ALK≠CH₂CH₂, они могут быть получены в соответствии со схемами ниже:

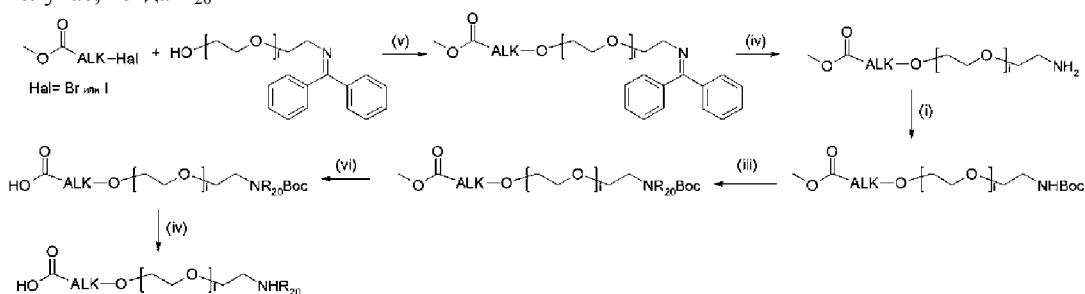
в случае, когда ALK=CH₂CH₂ и R₂₀≠H



в случае, когда ALK≠CH₂CH₂, в случае, когда R₂₀=H



в случае, когда R₂₀≠H



Стадия (i): защита амина; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки амина ди-трет-бутилдикарбонатом в присутствии основания, такого как, например, ТЭА.

Стадия (ii): защита карбоновой кислоты; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки трет-бутанолом в присутствии связывающего реагента, такого

как, например, EDC, и основания, такого как, например, ДМАП.

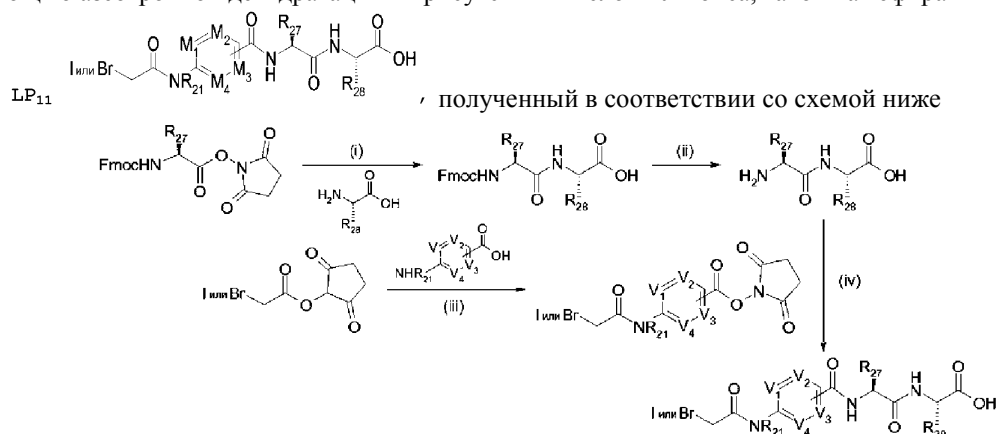
Стадия (iii): алкилирование атома азота; реакцию проводят в безводном полярном апротонном растворителе, таком как ТГФ, с помощью обработки основанием, таким как гидрид натрия, в присутствии реагента, содержащего уходящую группу, такую как галогенид.

Стадия (iv): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

Стадия (v): удлинение ПЭГ-цепи; реакцию проводят в безводном полярном апротонном растворителе, таком как ТГФ или ДМФ, с помощью обработки галогенированного эфира алкоксидом бензофенонимин-ПЭГ-спирта, полученного посредством действия гидрида натрия или нафталинида калия, как описано в WO 2007/127440.

Стадия (vi): омыление сложного эфира; реакцию проводят с помощью взаимодействия сложного эфира с LiOH в присутствии H₂O.

Амино-ПЭГ-спирты являются коммерчески доступными, например, для i=3, 4, 7, 8 или могут быть получены из ПЭГ-диолов, которые являются коммерчески доступными для i=3-12 в соответствии с методикой, описанной в US 7230101. Защиту функциональной аминогруппы бензофеноном можно проводить с помощью азеотропной дегидратации в присутствии кислоты Льюиса, такой как эфират BF₃.



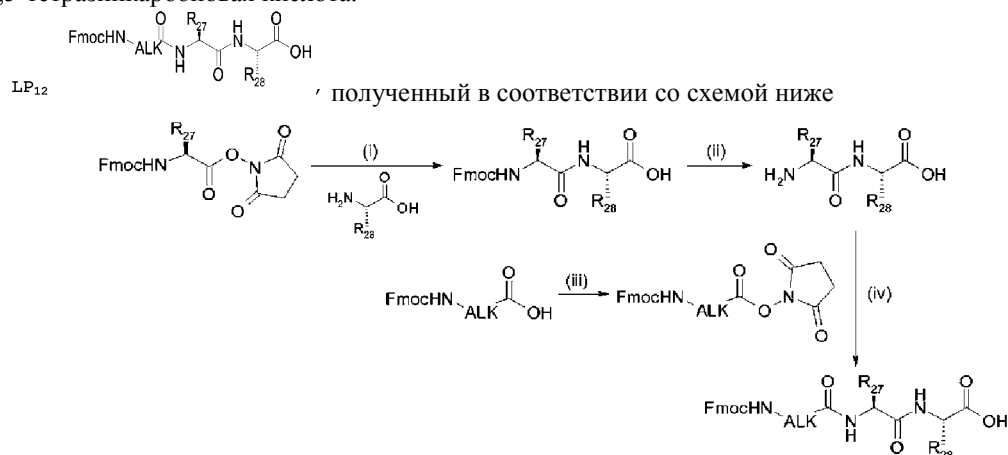
Стадия (i): образование пептидной связи между Fmoc-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/H₂O, в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): снятие защитной группы Fmoc с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): образование связи и активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; образование связи N-сукцинимидилбромо- и иодоацетата с аминокислотой проводят при КТ в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ДМФ, с последующим добавлением N,N'-дисукуцинимидилкарбоната и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят при КТ в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/CH₃CN.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; N-сукцинимидилбромо- и иодоацетаты являются коммерчески доступными; аминокислоты (гетеро)арилкарбоновые кислоты являются коммерчески доступными, например 4-амино-2-бензойная кислота, 6-амино-3-пиридинкарбоновая кислота, 5-амино-2-пиразинкарбоновая кислота, 2-амино-5-пиридинкарбоновая кислота или 6-амино-1,2,4,5-тетразинкарбоновая кислота.



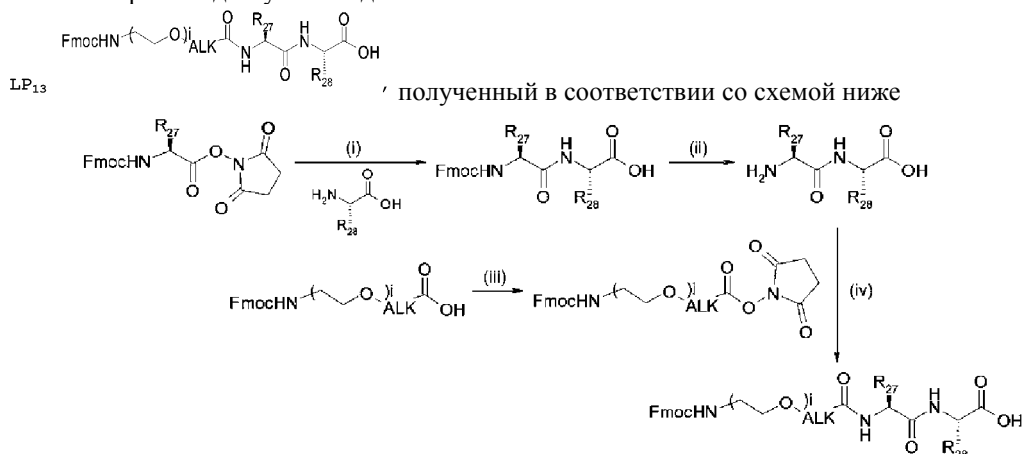
Стадия (i): образование пептидной связи между Fmoc-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EDC.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ CH_3CN .

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; аминокарбоновые кислоты являются коммерчески доступными для $n=1-11$.



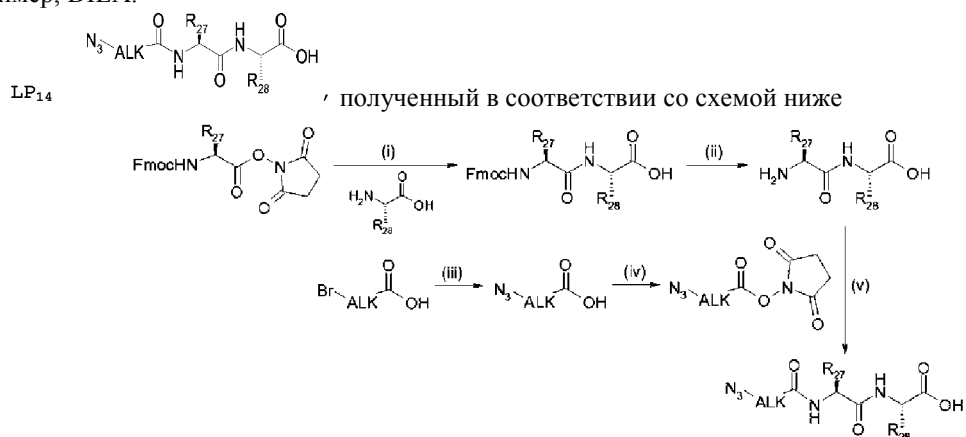
Стадия (i): образование пептидной связи между Fmoc-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, ДЦК на подложке.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ CH_3CN .

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; в случае, когда $ALK=CH_2CH_2$, Fmoc-защищенные аминокислоты являются коммерчески доступными для $i=1-6$ и иным образом могут быть получены из трет-бутилакрилата и соответствующего аминокислоты; в случае, когда $ALK \neq CH_2CH_2$, они могут быть получены в соответствии со схемами, описанными для прекурсора линкера LP₁₀. Защита функциональной аминогруппы Fmoc-группой может быть реализована с помощью обработки FmocOSu (номер CAS [82911-69-1]) в присутствии основания, такого как, например, DIEA.



Стадия (i): образование пептидной связи между Fmoc-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

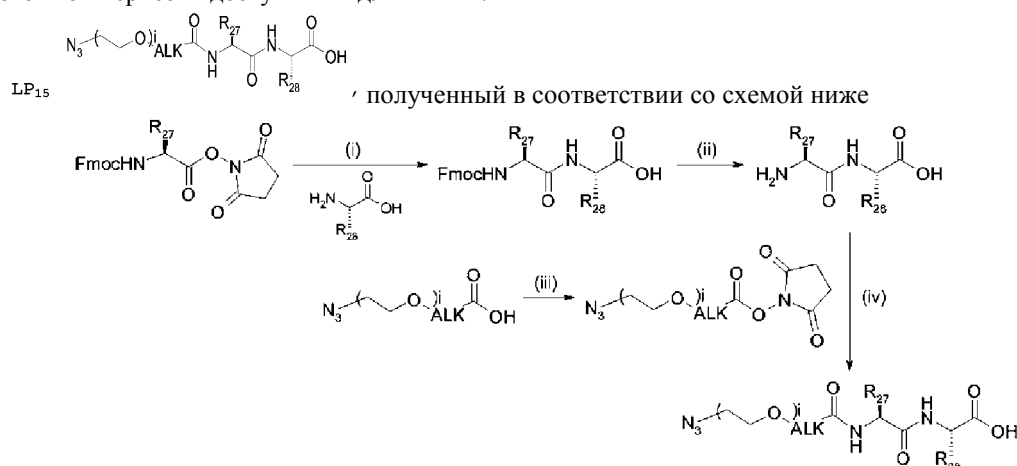
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): введение азидогруппы; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ацетон/H₂O, с помощью обработки азидом натрия.

Стадия (iv): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EDC.

Стадия (v): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/CH₃CN.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; бромокарбоновые кислоты являются коммерчески доступными для n=1-11.



Стадия (i): образование пептидной связи между Fmoc-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/H₂O в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

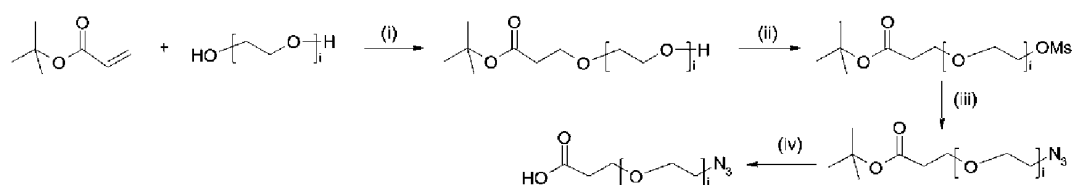
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, ДЦК на подложке.

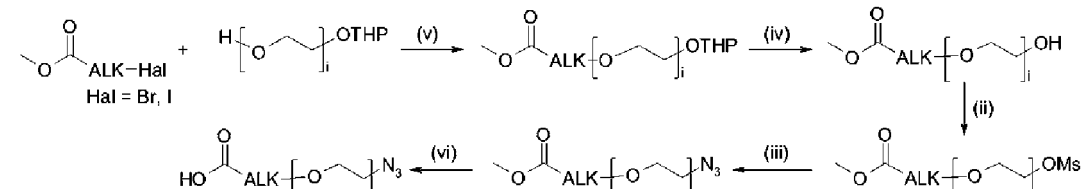
Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/CH₃CN.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; азидо-ПЭГ-кислоты могут быть получены в соответствии со схемами ниже:

когда $ALK=CH_2CH_2$



когда $ALK \neq CH_2CH_2$



Стадия (i): удлинение ПЭГ-цепи; реакцию проводят в безводном полярном апротонном растворителе, таком как ТГФ или ДМФ, с помощью обработки ненасыщенной защищенной кислоты алкоксидом, полученным действием натрия в каталитическом количестве.

Стадия (ii): активация спиртовой функциональной группы; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как ДХМ, с использованием метансульфонилхлорида в присутствии основания, такого как, например, ТЭА.

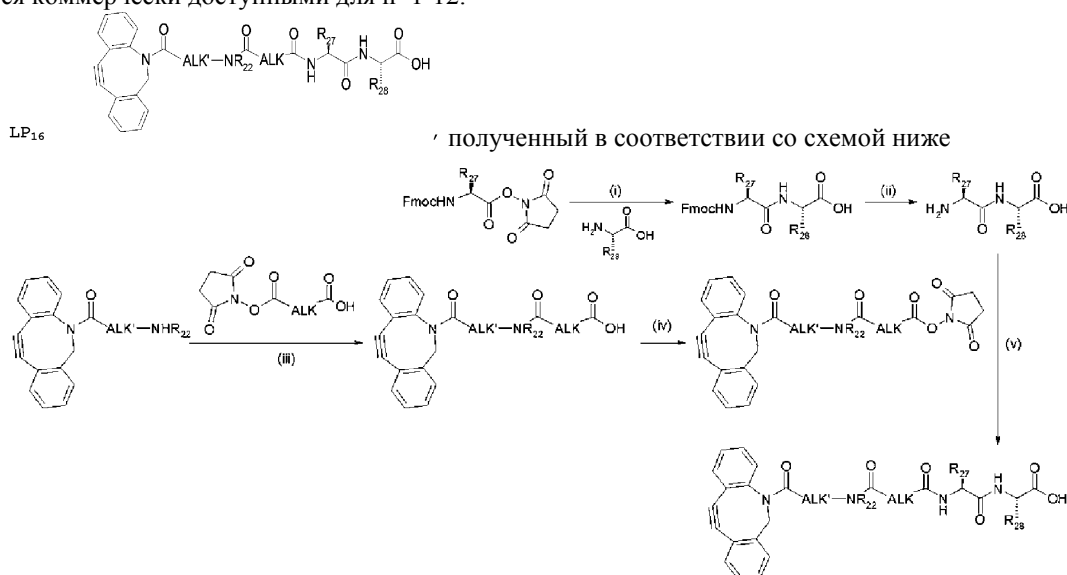
Стадия (iii): замещение мезилата азидогруппой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ацетон/H₂O, с помощью обработки азидом натрия.

Стадия (iv): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

Стадия (v): удлинение ПЭГ-цепи; реакцию проводят в безводном полярном апротонном растворителе, таком как ТГФ или ДМФ, с помощью обработки галогенированного эфира алкоксидом ПЭГ-диола, монозащищенного в виде эфира ТГФ, алкоксида, полученного, например, с гидридом натрия. Получение данного типа монозащищенного ПЭГ-диола подробно описано в литературе, см., например, Richard A. et al. Chem. Eur. J. 2005, 11, 7315-7321 или Sakellariou E.G., et al. Tetrahedron 2003, 59, 9083-9090.

Стадия (vi): омыление метилового эфира; реакцию проводят при КТ в смеси полярных растворителей, такой как смесь ТГФ/Н₂O, в присутствии LiOH.

Исходные ПЭГ-диолы являются коммерчески доступными для i=3-12; бромметилловые эфиры являются коммерчески доступными для n=1-12.



Стадия (i): образование пептидной связи между Fmoc-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂O, в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

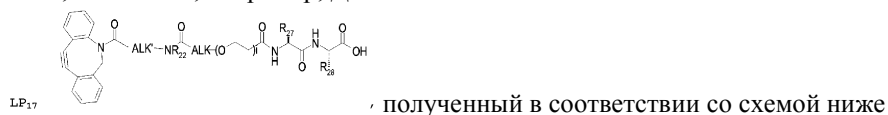
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

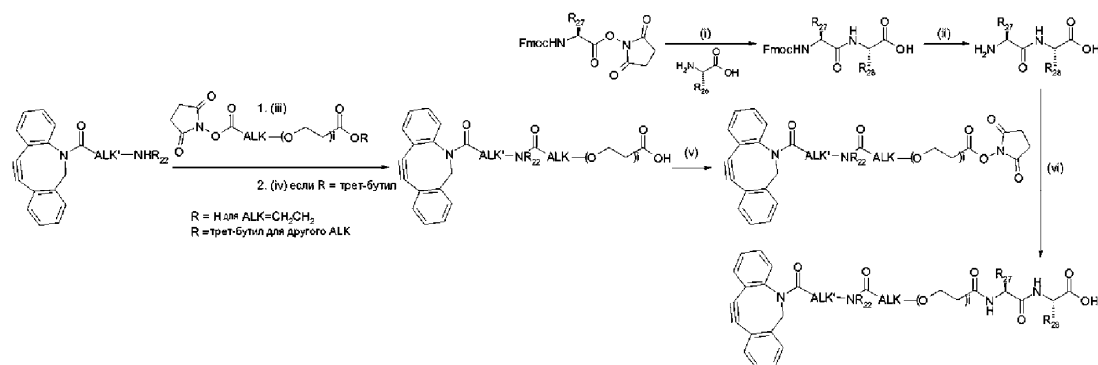
Стадия (iii): образование связи циклооктина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как ДХМ.

Стадия (iv): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EDC.

Стадия (v): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; циклооктины являются коммерчески доступными для n'=1, 2, 3 и 5; дикислоты, моноактивированные в виде NHS-эфира, являются коммерчески доступными для n=1-3 и для n=4-10, они могут быть получены путем активации коммерчески доступных дикислот с NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, ДЦК, и основания, такого как, например, ДМАП.





Стадия (i): образование пептидной связи между Fmoc-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): образование связи циклооктина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как ДХМ.

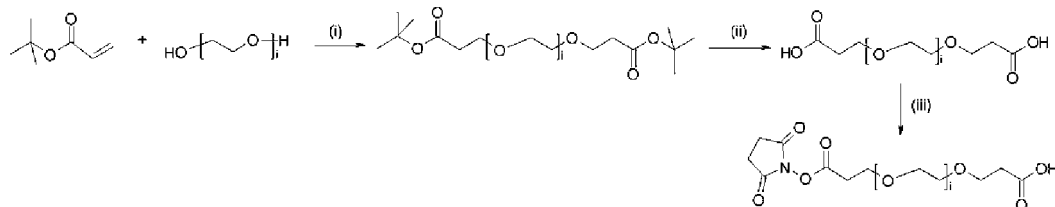
Стадия (iv): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

Стадия (v): активация циклооктин-ПЭГ-карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EDC.

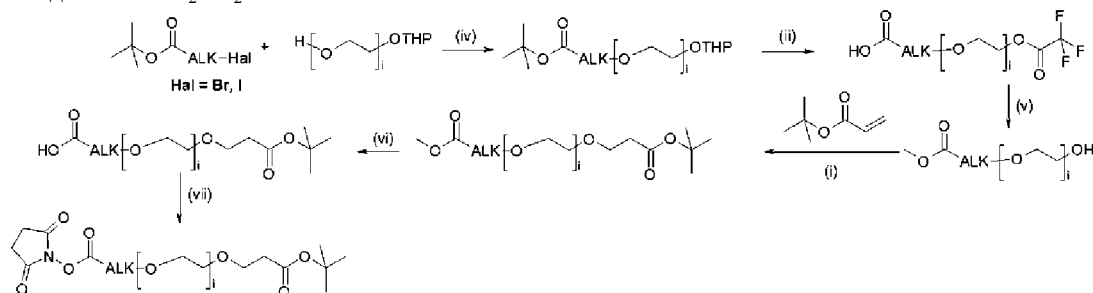
Стадия (vi): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; циклооктины являются коммерчески доступными для $n=1, 2, 3$ и 5 ; ПЭГ-дикислоты, моноактивированные в виде NHS-эфира, получают в соответствии со схемой ниже:

когда $ALK=CH_2CH_2$



когда $ALK \neq CH_2CH_2$



Стадия (i): удлинение ПЭГ-цепи; реакцию проводят в безводном полярном апротонном растворителе, таком как ТГФ или ДМФ, с помощью обработки ненасыщенной защищенной кислоты алкоксидом, полученным действием натрия в каталитическом количестве.

Стадия (ii): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

Стадия (iii): моноактивация одной кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как ТГФ, с использованием NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, ДЦК, и основания, такого как, например, ДМАП.

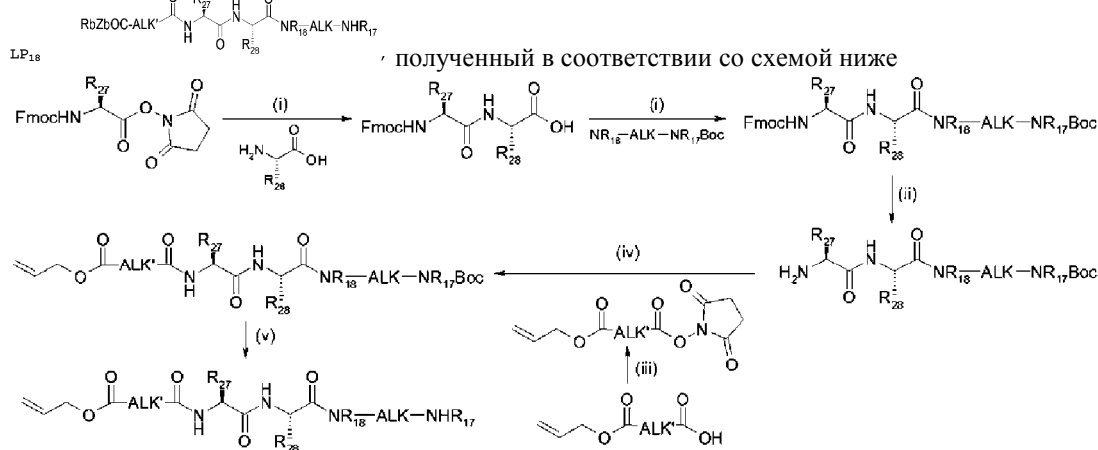
Стадия (iv): удлинение ПЭГ-цепи; реакцию проводят в безводном полярном апротонном растворителе, таком как ТГФ или ДМФ с помощью обработки галогенированного эфира алкоксидом ПЭГ-диола, монозащищенного в виде эфира ТГФ. Получение данного типа монозащищенного ПЭГ-диола подробно описано в литературе, см., например, Richard A. et al. Chem. Eur. J. 2005, 11, 7315-7321 или Sakellariou E.G., et al. Tetrahedron 2003, 59, 9083-9090.

Стадия (v): защита карбоновой кислоты в виде метилового эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как MeOH, с помощью обработки триметилсилилдиазометаном.

Стадия (vi): омыление метилового эфира; реакцию проводят в смеси полярных растворителей, такой как смесь ТГФ/Н₂O, в присутствии LiOH.

Стадия (vii): активация кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как ТГФ, с использованием NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, ДЦК, и основания, такого как, например, ДМАП.

Исходные ПЭГ-диолы являются коммерчески доступными для $i=3-12$.



Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂O, в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия, или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид, и основания, такого как, например, ТЭА.

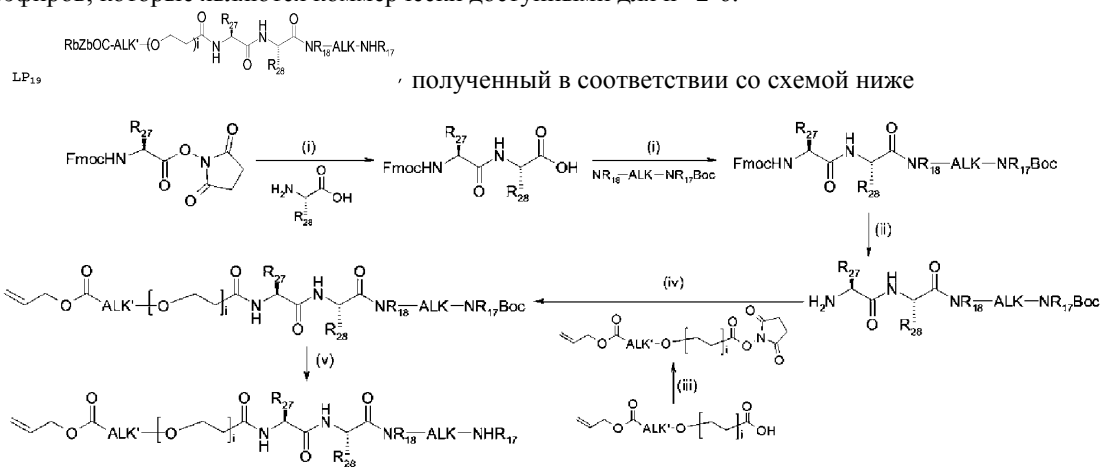
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EDC.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/CH₃CN.

Стадия (v): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины являются коммерчески доступными для $n=2-4$ и R_{17} и $R_{18}=H$ или Me независимо друг от друга. Дикислоты, монозащищенные в виде аллиловых эфиров, являются коммерчески доступными для $n=2$ (моноаллилсукцинат) или могут быть получены с помощью переэтерификации метиловых или трет-бутиловых моноэфиров, которые являются коммерчески доступными для $n'=2-6$.



Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂O, в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия, или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид, и основания, такого как, например, ТЭА.

Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком

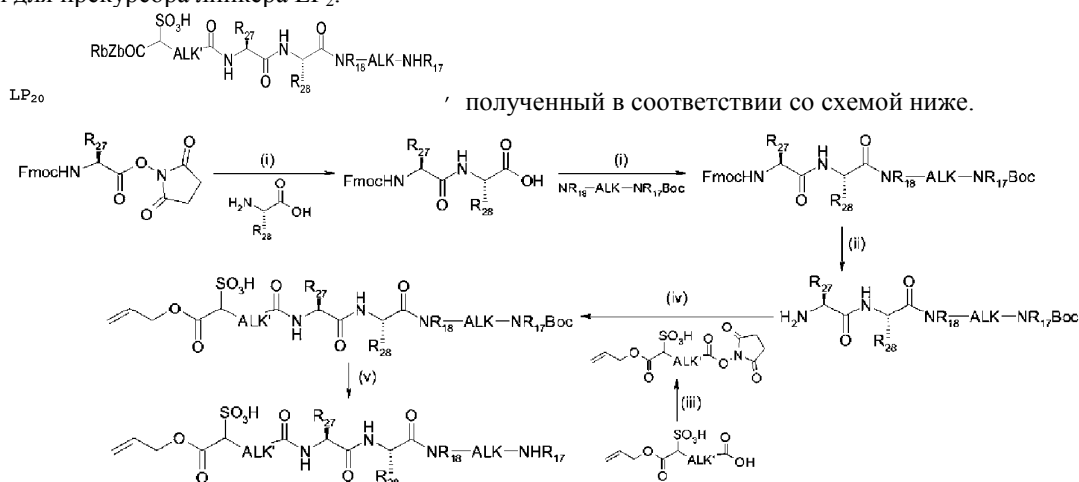
как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EDC.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ CH_3CN .

Стадия (v): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины являются коммерчески доступными для $n=2-4$ и R_{17} и $R_{18}=H$ или Me независимо друг от друга; ПЭГ-дикислоты, монозащищенные в виде аллиловых эфиров, получают в соответствии со схемами, описанными для прекурсора линкера LP₂.



Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂O, в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия, или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид, и основания, такого как, например, ТЭА.

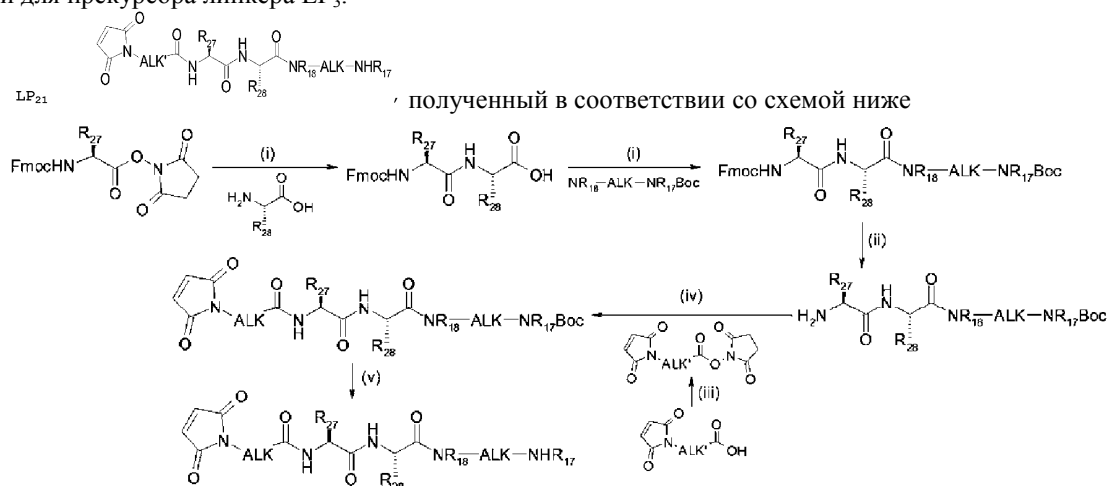
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/МеОН, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EDC.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ CH_3CN .

Стадия (v): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины являются коммерчески доступными для $n=2-4$ и R_{17} и $R_{18}=H$ или Me независимо друг от друга; сульфодикислоты, монозащищенные в виде аллилового эфира, получают в соответствии со схемами, описанными для прекурсора линкера LP₃.



Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂O, в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия, или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид, и основания, такого как, например, ТЭА.

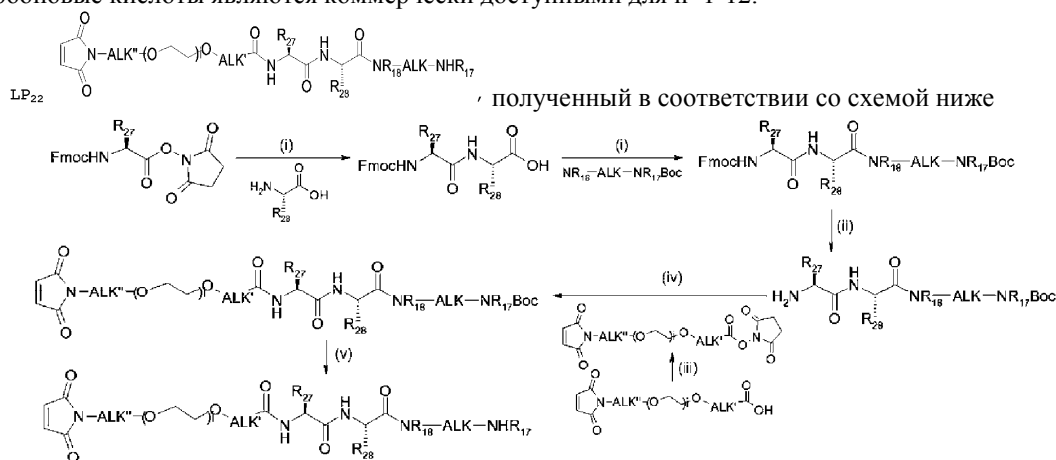
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/МеОН, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EDC.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/CH₃CN.

Стадия (v): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины являются коммерчески доступными для n=2-4 и R₁₇ и R₁₈=H или Me независимо друг от друга; малеимидокарбоновые кислоты являются коммерчески доступными для n=1-12.



Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂O, в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия, или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид, и основания, такого как, например, ТЭА.

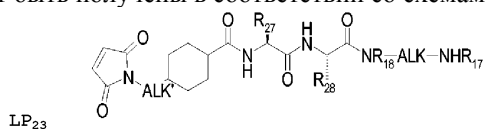
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/МеОН, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

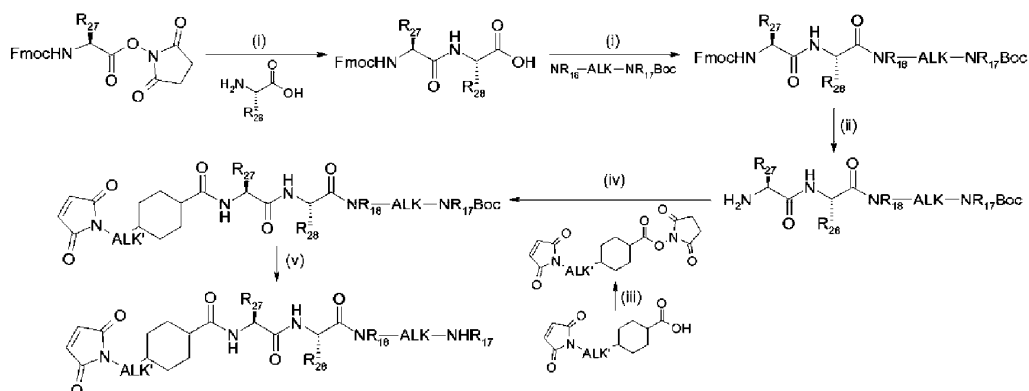
Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, ДЦК на подложке.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/CH₃CN.

Стадия (v): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины являются коммерчески доступными для n=2-4 и R₁₇ и R₁₈=H или Me независимо друг от друга; малеимидо-ПЭГ-кислоты являются коммерчески доступными для ALK=ALK'=CH₂CH₂ и i=1-1 и иным образом могут быть получены в соответствии со схемами, описанными для прекурсора линкера LP₅.





Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂О в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид, и основания, такого как, например, ТЭА.

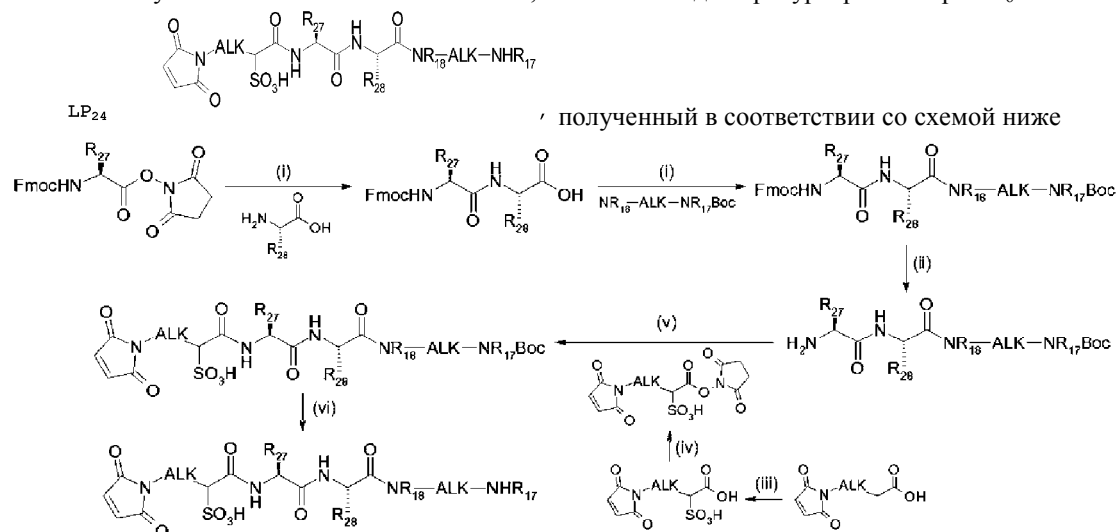
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/МeОН, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EDC.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/СН₃CN.

Стадия (v): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины являются коммерчески доступными для n=2-4 и R₁₇ и R₁₈=H или Me независимо друг от друга; малеимидоциклогексанкарбоновая кислота является коммерчески доступной для ALK=CH₂ и иным образом может быть получена в соответствии со схемами, описанными для прекурсора линкера LP₆.



Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂О, в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия, или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид, и основания, такого как, например, ТЭА.

Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/МeОН, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

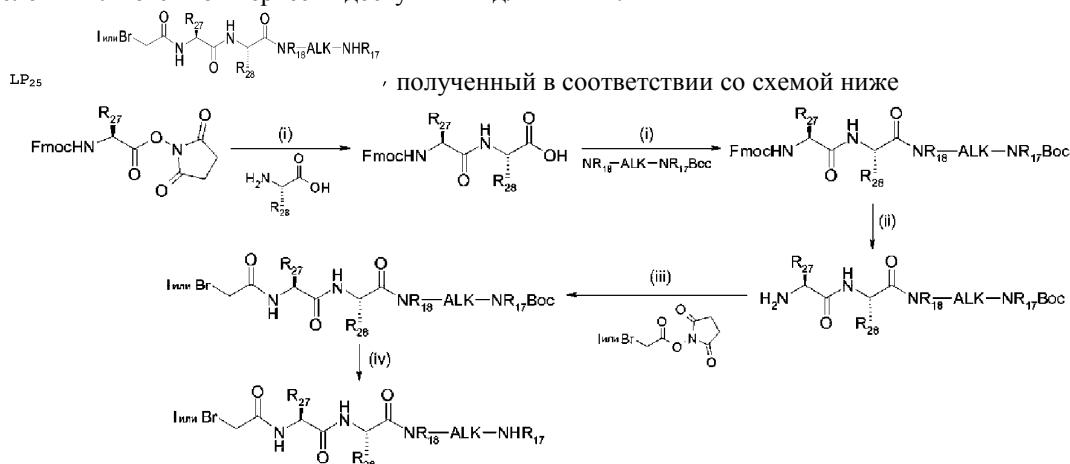
Стадия (iii): α-сульфирование карбоновой кислоты; реакцию проводят при 75°C в полярном апротонном растворителе, таком как ДХЭ, с помощью обработки хлорсульфоновой кислоты в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iv): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EDC.

Стадия (v): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/СН₃CN.

Стадия (vi): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины являются коммерчески доступными для $n=2-4$ и R_{17} и $R_{18}=H$ или Me независимо друг от друга; малеимидокислоты являются коммерчески доступными для $n=1-12$.



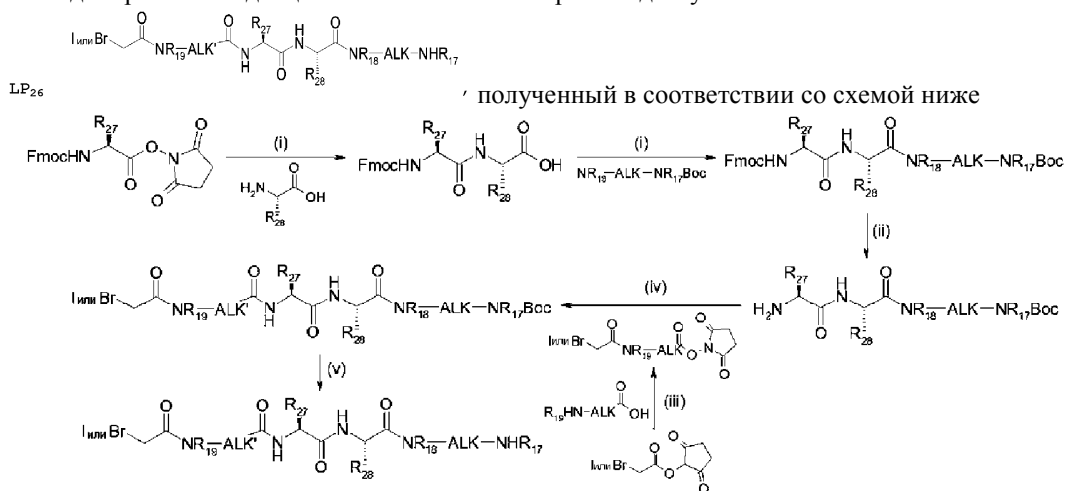
Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия, или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид, и основания, такого как, например, ТЭА.

Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ CH_3CN .

Стадия (iv): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины являются коммерчески доступными для $n=2-4$ и R_{17} и $R_{18}=H$ или Me независимо друг от друга; N-сукцинимидилбромо- и иодоацетаты являются коммерчески доступными.



Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия, или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид, и основания, такого как, например, ТЭА.

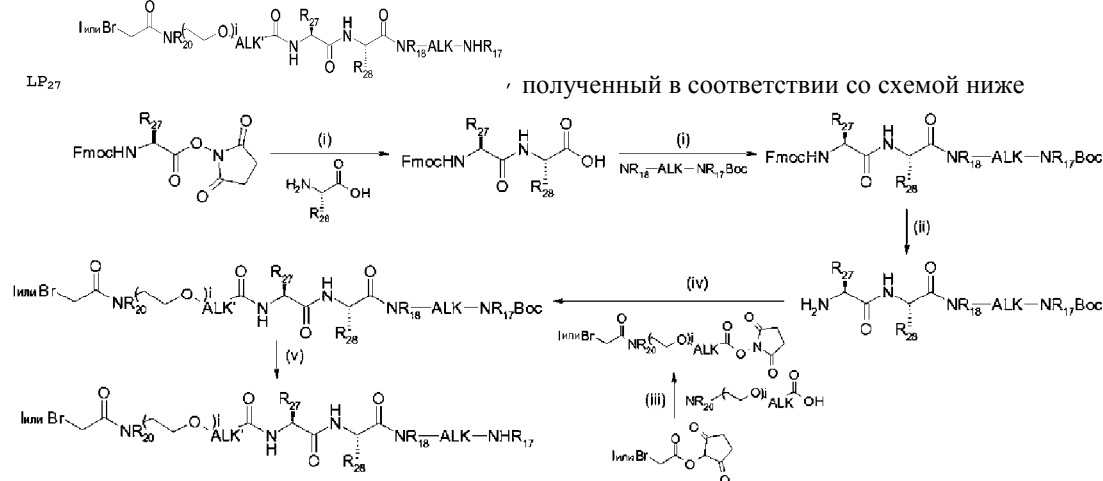
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): образование связи и активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; образование связи N-сукцинимидилбромо- и иодоацетата с аминокислотой проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ДМФ, с последующим добавлением N,N'-дисукцинимидилкарбоната и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ CH_3CN .

Стадия (v): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины являются коммерчески доступными для $n=2-4$ и R_{17} и $R_{18}=\text{H}$ или Me независимо друг от друга; N-сукцинимидилбromo- и иодоацетаты являются коммерчески доступными; аминокарбоновые кислоты являются коммерчески доступными для $n=1-12$ и N-метилированные аминокарбоновые кислоты для $n=1-7$.



Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂O, в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия, или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид, и основания, такого как, например, ТЭА.

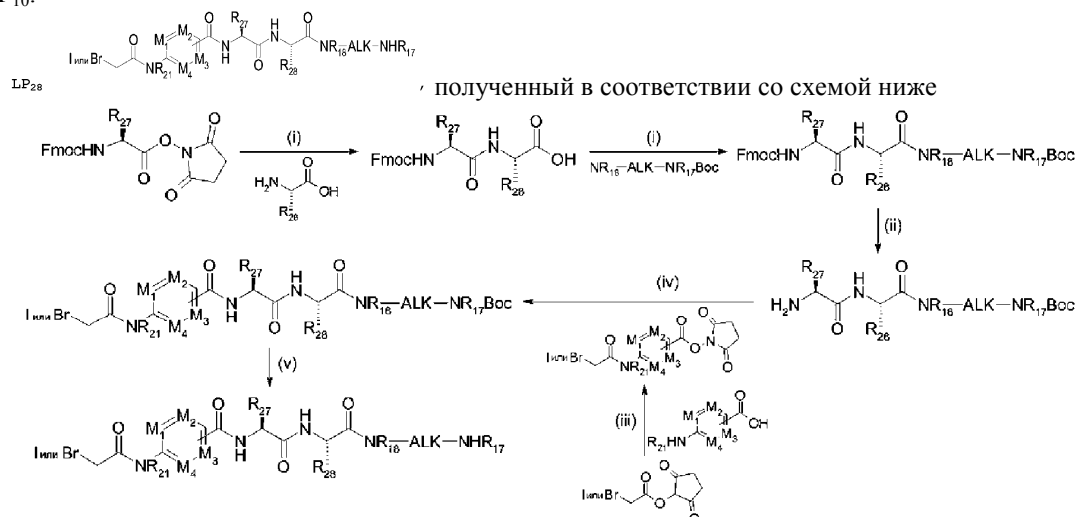
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): образование связи и активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; образование связи N-сукцинимидилbromo- и иодоацетата с аминокарбоновой кислотой проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ДМФ, с последующим добавлением N,N'-дисукцинимидилкарбоната и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/CH₃CN.

Стадия (v): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины являются коммерчески доступными для $n=2-4$ и R_{17} и $R_{18}=\text{H}$ или Me независимо друг от друга; N-сукцинимидилbromo- и иодоацетаты являются коммерчески доступными; в случае, когда $\text{ALK}=\text{CH}_2\text{CH}_2$ и $R_{20}=\text{H}$, аминок-ПЭГ-карбоновые кислоты являются коммерчески доступными для $i=1-6$ и иным образом могут быть получены из трет-бутилакрилата и соответствующего аминок-ПЭГ-спирта; в случае, когда $\text{ALK}\neq\text{CH}_2\text{CH}_2$, они могут быть получены в соответствии со схемами, описанными для прекурсора линкера LP₁₀.



Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как

смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂О, в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид, и основания, такого как, например, ТЭА.

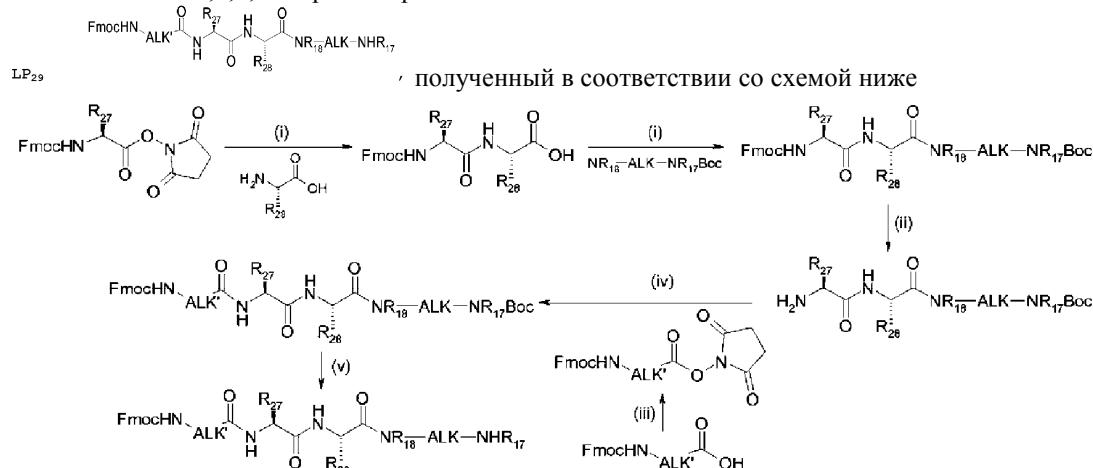
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/МеОН, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): образование связи и активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; образование связи N-сукцинимидилбromo- и иодоацетата с аминокислотой проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ДМФ, с последующим добавлением N,N'-дисукцинимидилкарбоната и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/СН₃CN.

Стадия (v): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины являются коммерчески доступными для n=2-4 и R₁₇ и R₁₈=H или Me независимо друг от друга; N-сукцинимидилbromo- и иодоацетаты являются коммерчески доступными; аминокислоты являются коммерчески доступными, например 4-амино-2-бензойная кислота, 6-амино-3-пиридинкарбоновая кислота, 5-амино-2-пиразинкарбоновая кислота, 2-амино-5-пиримидинкарбоновая кислота или 6-амино-1,2,4,5-тетразинкарбоновая кислота.



Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂О, в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия, или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид, и основания, такого как, например, ТЭА.

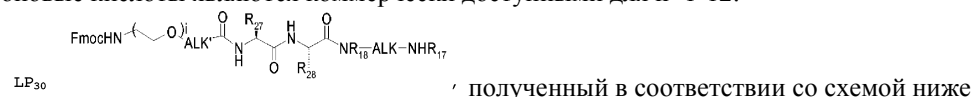
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/МеОН, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

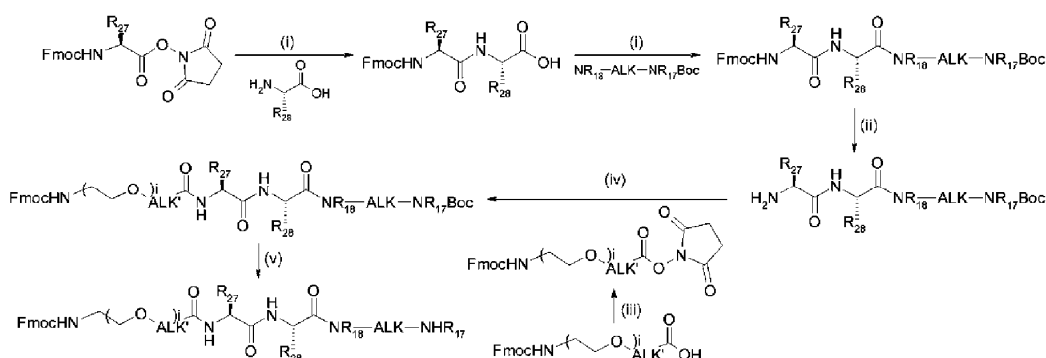
Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EDC.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/СН₃CN.

Стадия (v): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины являются коммерчески доступными для n=2-4 и R₁₇ и R₁₈=H или Me независимо друг от друга; аминокислоты являются коммерчески доступными для n=1-12.





Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂О, в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия, или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид, и основания, такого как, например, ТЭА.

Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/МeОН, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, ДЦК, на подложке.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/СН₃CN.

Стадия (v): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины являются коммерчески доступными для $n=2-4$ и R_{17} и $R_{18}=H$ или Me независимо друг от друга; Fmoc-защищенные аминокислоты являются коммерчески доступными для $i=1-6$ и иным образом могут быть получены из трет-бутилакрилата и соответствующего аминокислоты-спирта; в случае, когда $ALK \neq CH_2CH_2$, они могут быть получены в соответствии со схемами для прекурсора линкера LP₁₀. Защита функциональной аминогруппы Fmoc-группой может быть реализована с помощью обработки FmocOSu (номер CAS [82911-69-1]) в присутствии основания, такого как, например, DIEA.



Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂О, в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия, или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид, и основания, такого как, например, ТЭА.

Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/МeОН, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

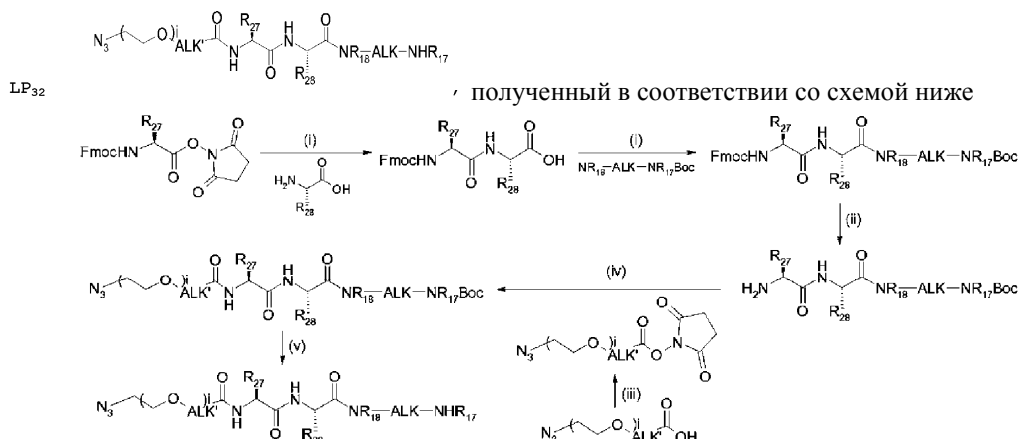
Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EDC.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/СН₃CN.

Стадия (v): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины

являются коммерчески доступными для $n=2-4$ и R_{17} и $R_{18}=H$ или Me независимо друг от друга; азиδοкарбоновые кислоты могут быть получены в соответствии со схемами, описанными для прекурсора линкера LP_{14} .



Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия, или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид и основания, такого как, например, ТЭА.

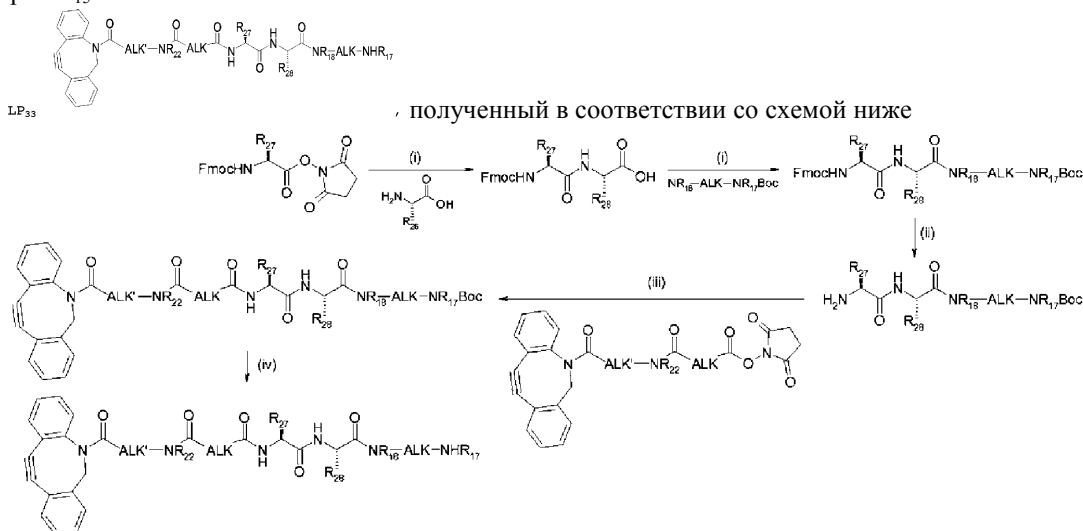
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/ $MeOH$, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как ДХМ, с помощью обработки NHS в присутствии связывающего реагента, такого как, например, ДЦК на подложке.

Стадия (iv): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ CH_3CN .

Стадия (v): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины являются коммерчески доступными для $n=2-4$ и R_{17} и $R_{18}=H$ или Me независимо друг от друга; азидо-ПЭГ-карбоновые кислоты могут быть получены в соответствии со схемами, описанными для прекурсора линкера LP_{15} .



Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия, или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид, и основания, такого как, например, ТЭА.

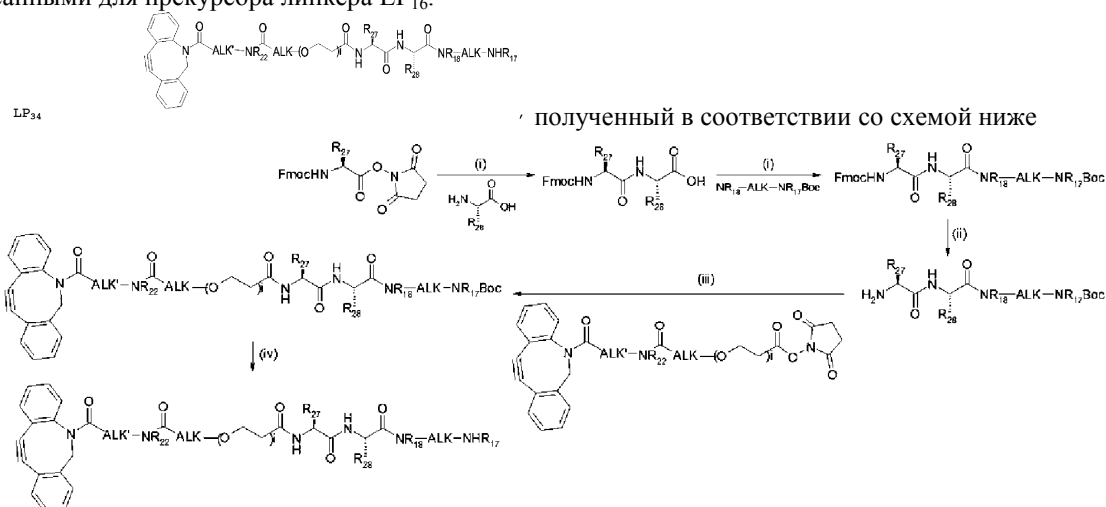
Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/ $MeOH$, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ CH_3CN .

Стадия (iv): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (на-

пример, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины являются коммерчески доступными для $n=2-4$ и R_{17} и $R_{18}=H$ или Me независимо друг от друга; циклооктиновые линкеры, активированные в виде NHS-эфиров, могут быть получены в соответствии со схемами, описанными для прекурсора линкера LP₁₆.



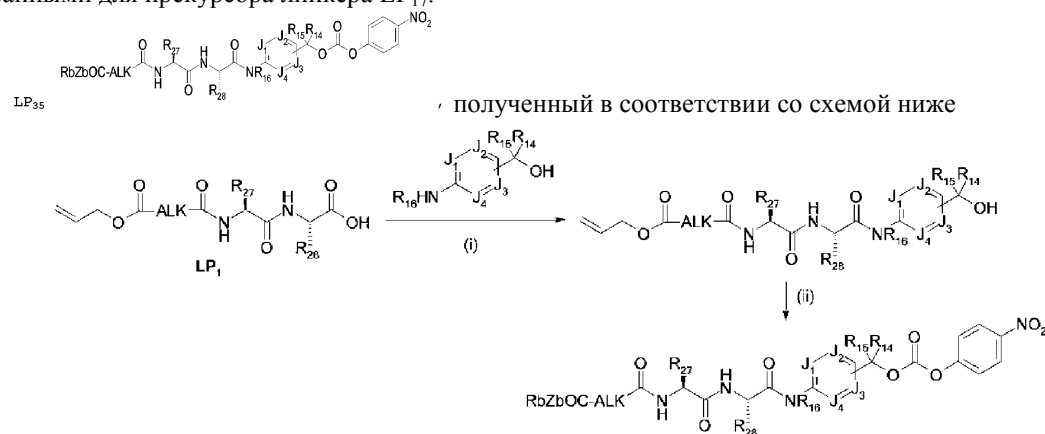
Стадия (i): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как бикарбонат натрия, или в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как пропилфосфоновый ангидрид, и основания, такого как, например, ТЭА.

Стадия (ii): снятие защитной группы с амина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии основания, такого как, например, пиперидин.

Стадия (iii): образование пептидной связи между дипептидом и NHS-эфиром; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ CH_3CN .

Стадия (iv): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

NHS-эфиры Fmoc-L-аминокислот являются коммерчески доступными; монозащищенные диамины являются коммерчески доступными для $n=2-4$ и R_{17} и $R_{18}=H$ или Me независимо друг от друга; циклооктиновые линкеры, активированные в виде NHS-эфиров, могут быть получены в соответствии со схемами, описанными для прекурсора линкера LP₁₇.

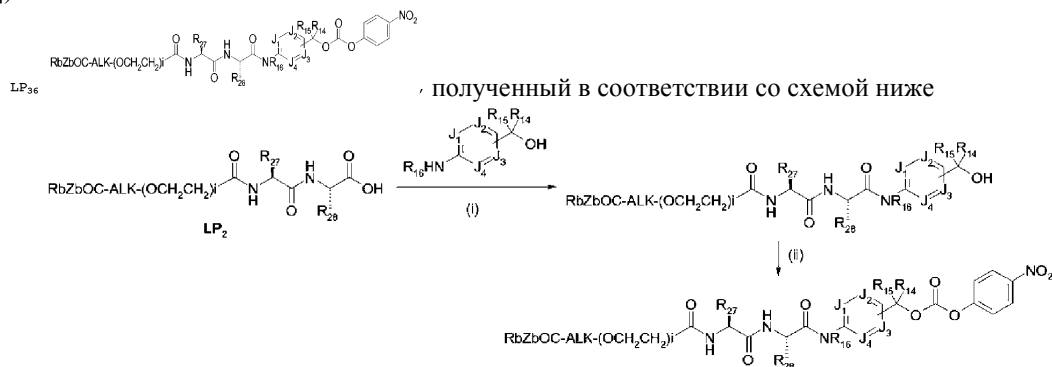


Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₁ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиадом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Многие производные анилина являются коммерчески доступными, такие как, например, 4-(гидроксиэтил)анилин (номер CAS [623-04-1]), 4-(1-гидроксиэтил)анилин (рацемический (номер CAS [14572-89-5]) или энантиомер (R) (номер CAS [210754-25-9]) или (S) (номер CAS [500229-84-5])), 4-амино- α,α -диметилбензолметанол (номер CAS [23243-04-1]), 4-амино- α -метокси- α -метилбензолметанол (номер CAS [1379318-81-6]), 4-амино- α -метил- α -трифторметилбензолметанол (номер CAS [851652-56-7]), 2-аминобензолметанол (номер CAS [5344-90-1]), 2-амино- α -метилбензолметанол (рацемический (номер CAS [10517-50-7]) или энантиомер (R) (номер CAS [3205-21-8]) или (S) (номер CAS [3205-21-8])),

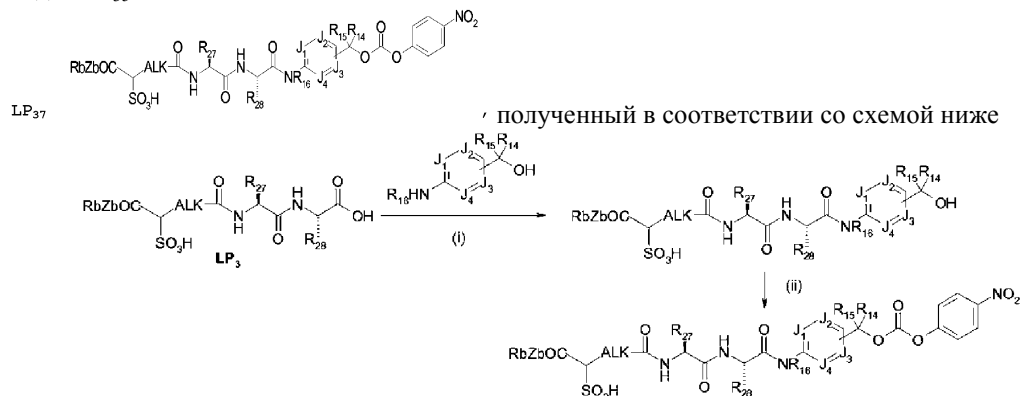
6-амино-3-пиридинметанол (номер CAS [113293-71-3]), 6-амино- α -метил-3-пиридинметанол (номер CAS [1335054-83-5]), 6-амино- α -этил-3-пиридинметанол (номер CAS [1355225-85-2]), 6-амино- α,α -диметил-3-пиридинметанол (номер CAS [843646-03-8]), 5-амино-3-пиридинметанол (номер CAS [873651-92-4]), 2-амино-3-пиридинметанол (номер CAS [23612-57-9]), 2-амино- α -метил-3-пиридинметанол (рацемический (номер CAS [869567-91-9]) или энантиомер (R) (номер CAS [936718-01-3]) или (S) (номер CAS [936718-00-2])), 2-амино- α -этил-3-пиридинметанол (номер CAS [914223-90-8]), 2-амино- α,α -диметил-3-пиридинметанол (номер CAS [213666-96-7]), 3-амино-4-пиридинметанол (номер CAS [152398-05-5]), 3-амино- α -метил-4-пиридинметанол (номер CAS [1242470-88-7]), 3-амино- α,α -метил-4-пиридинметанол (номер CAS [13357-81-8]), 4-амино-3-пиридинметанол (номер CAS [138116-34-4]), 4-амино- α -метил-3-пиридинметанол (номер CAS [741223-49-4]), 4-амино- α,α -метил-3-пиридинметанол (номер CAS [1339013-26-1]), 3-амино-2-пиридинметанол (номер CAS [52378-63-9]), 3-амино- α -метил-2-пиридинметанол (номер CAS [954240-54-1]), 3-амино- α,α -метил-2-пиридинметанол (номер CAS [899438-57-4]).



Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₂ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

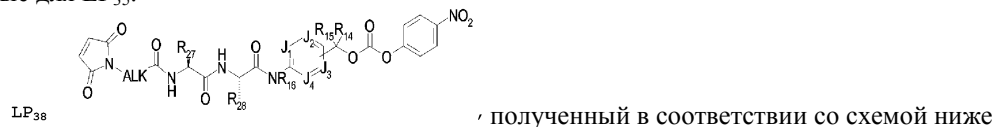
Многие производные анилина являются коммерчески доступными, такие как, например, перечисленные для LP₃₅.

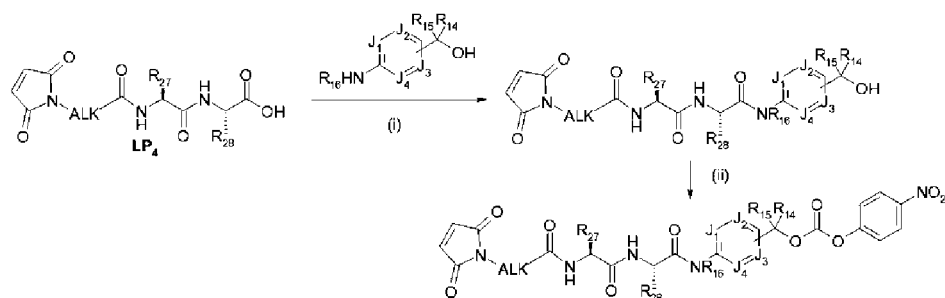


Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₃ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Многие производные анилина являются коммерчески доступными, такие как, например, перечисленные для LP₃₅.

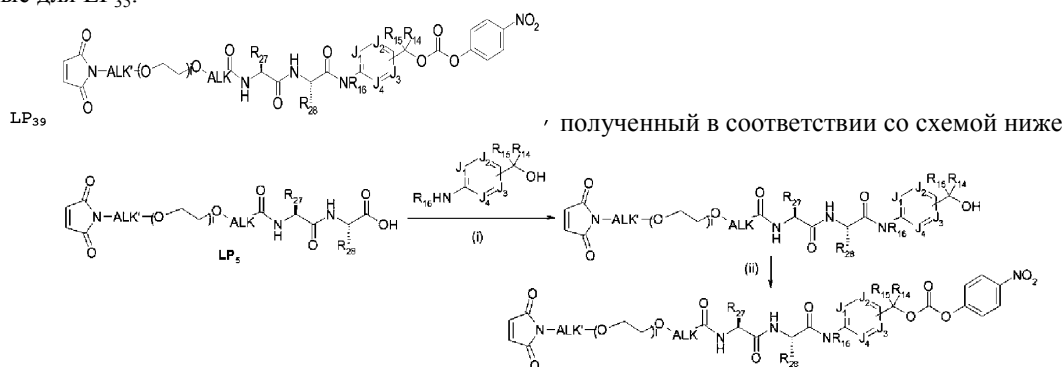




Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₄ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

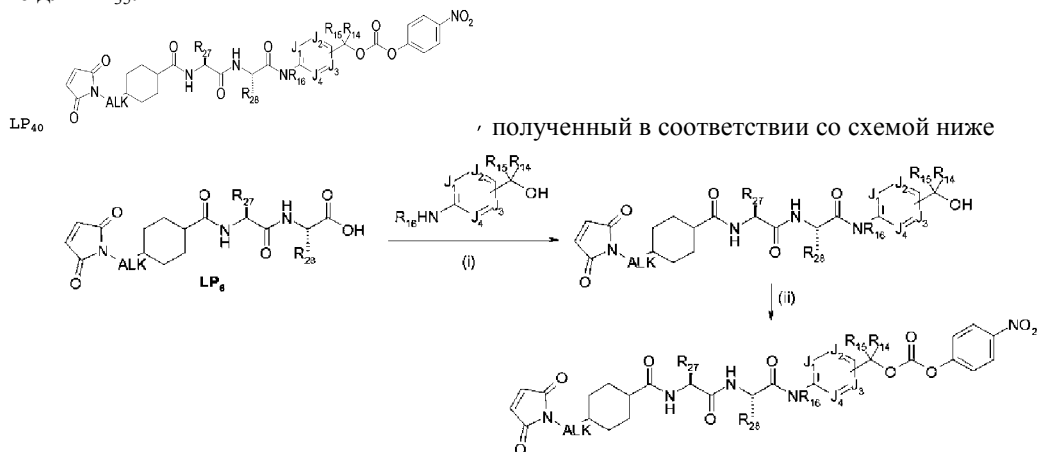
Многие производные анилина являются коммерчески доступными, такие как, например, перечисленные для LP₃₅.



Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₅ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

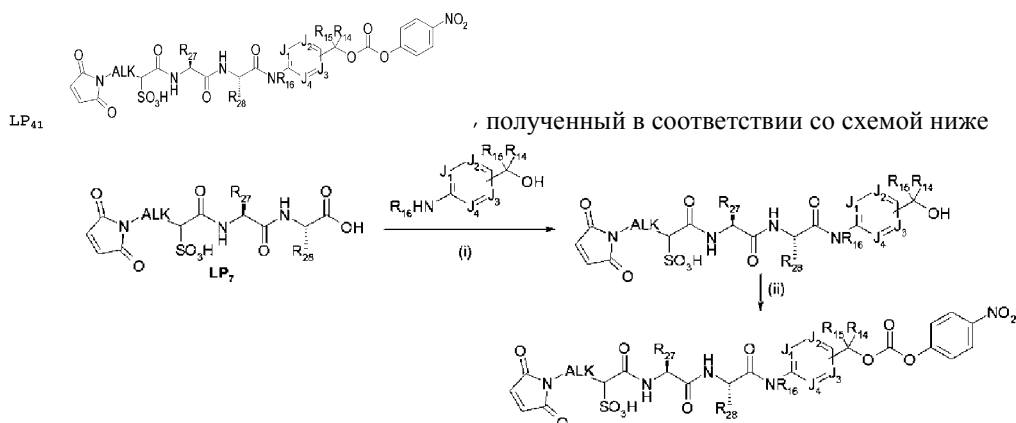
Многие производные анилина являются коммерчески доступными, такие как, например, перечисленные для LP₃₅.



Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₆ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

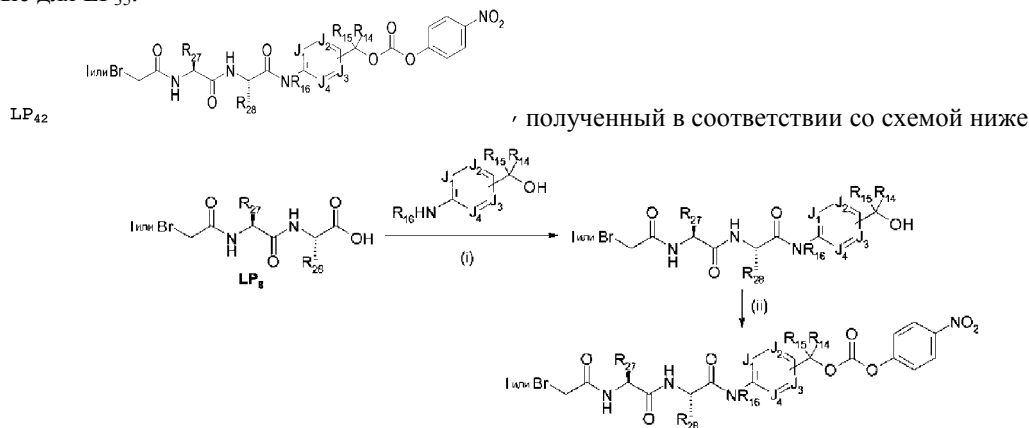
Многие производные анилина являются коммерчески доступными, такие как, например, перечисленные для LP₃₅.



Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₇ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/МeОН, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиаом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

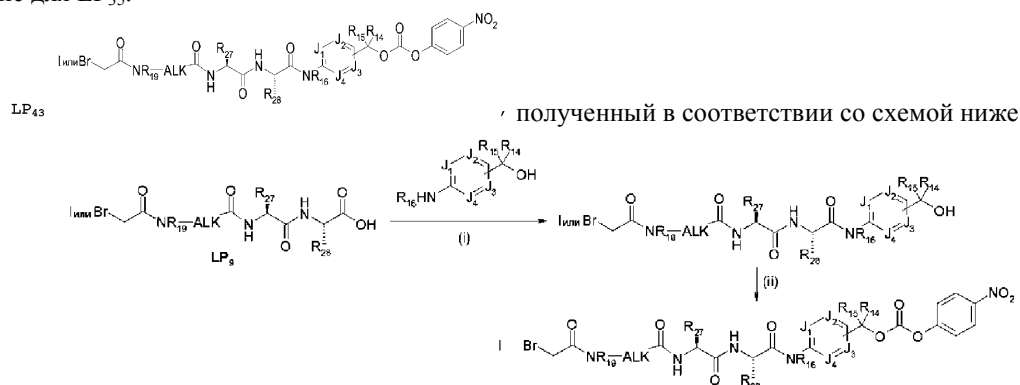
Многие производные анилина являются коммерчески доступными, такие как, например, перечисленные для LP₃₅.



Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₈ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/МeОН, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиаом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

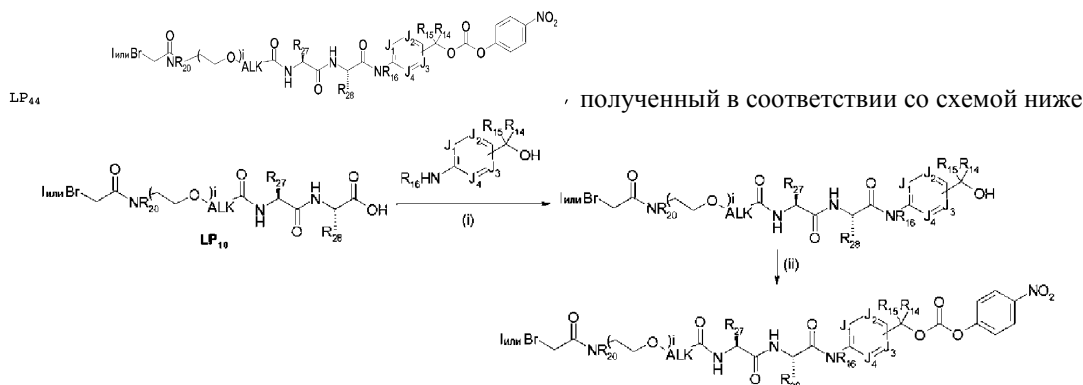
Многие производные анилина являются коммерчески доступными, такие как, например, перечисленные для LP₃₅.



Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₉ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/МeОН, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиаом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

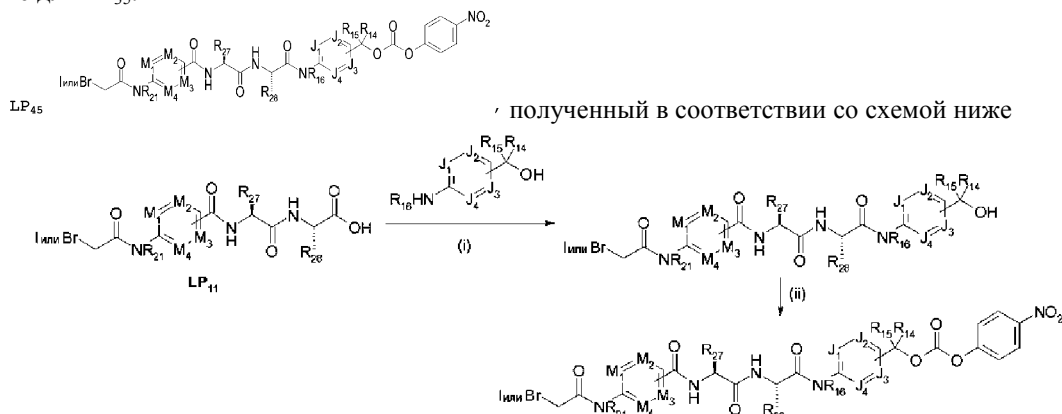
Многие производные анилина являются коммерчески доступными, такие как, например, перечисленные для LP₃₅.



Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₁₀ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

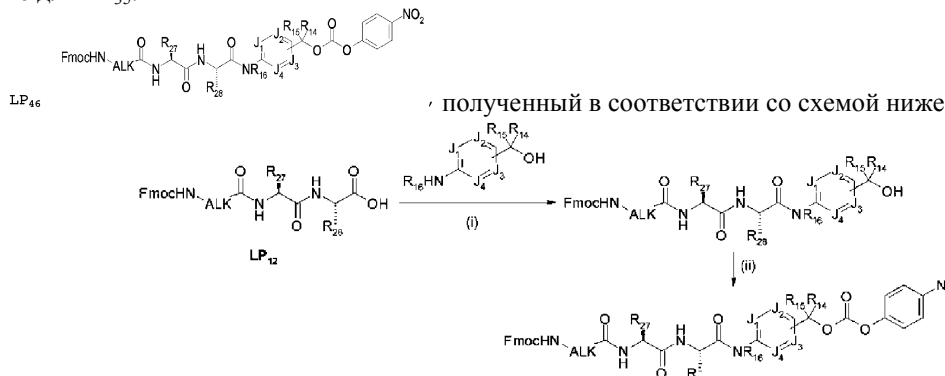
Многие производные анилина являются коммерчески доступными, такие как, например, перечисленные для LP₃₅.



Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₁₁ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

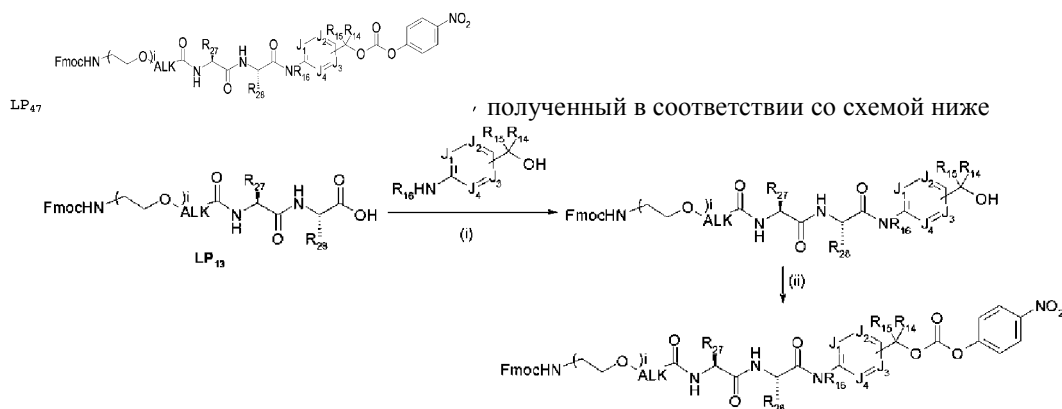
Многие производные анилина являются коммерчески доступными, такие как, например, перечисленные для LP₃₅.



Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₁₂ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

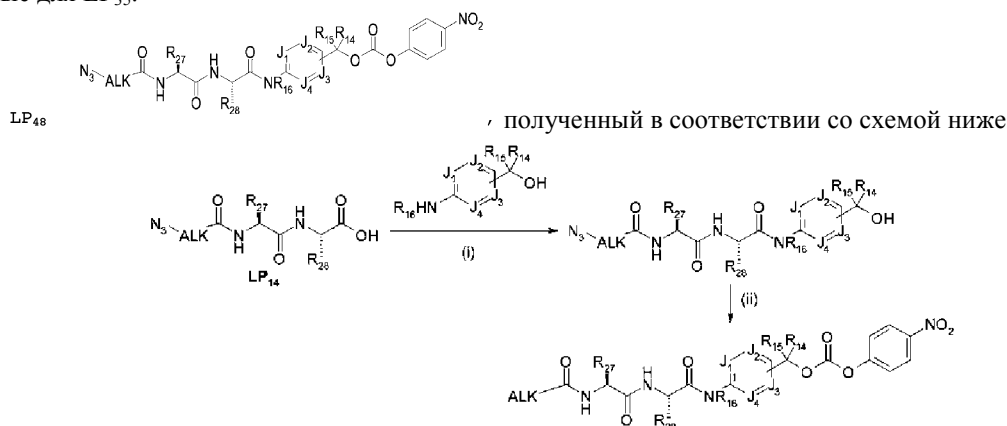
Многие производные анилина являются коммерчески доступными, такие как, например, перечисленные для LP₃₅.



Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₁₃ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

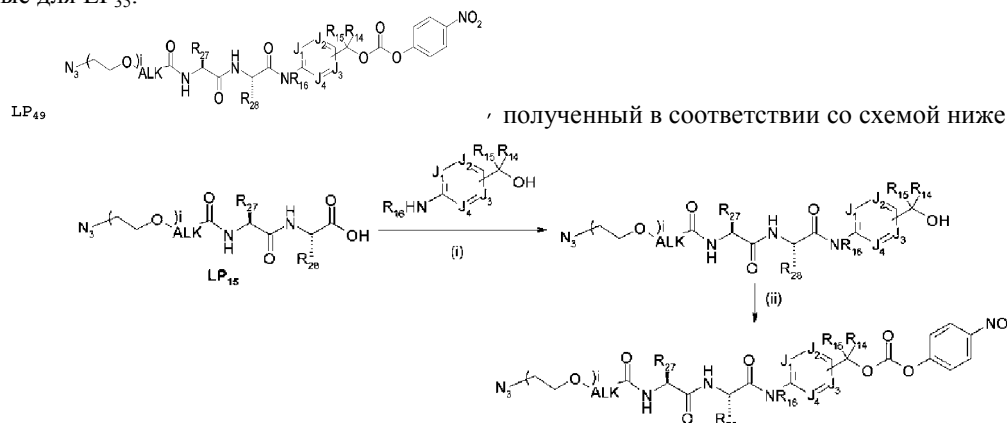
Многие производные анилина являются коммерчески доступными, такие как, например, перечисленные для LP₃₅.



Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₁₄ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

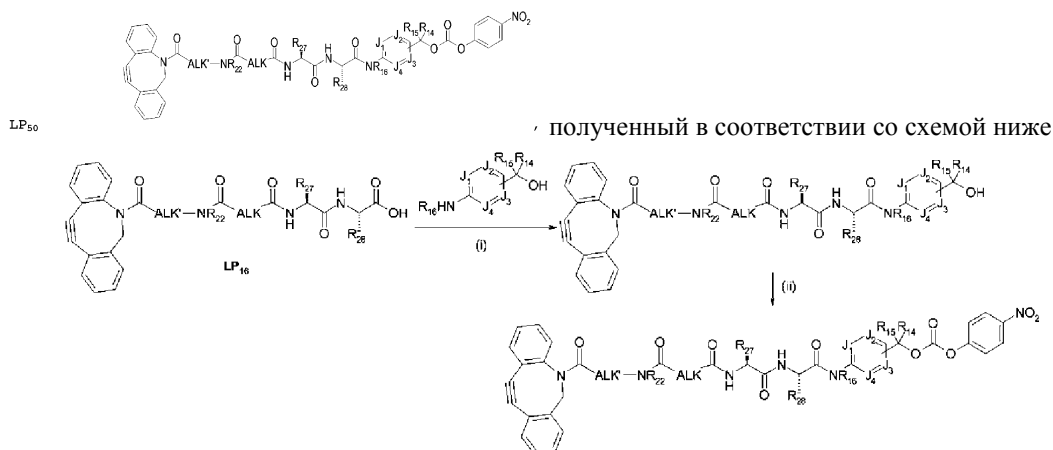
Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Многие производные анилина являются коммерчески доступными, такие как, например, перечисленные для LP₃₅.



Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₁₅ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

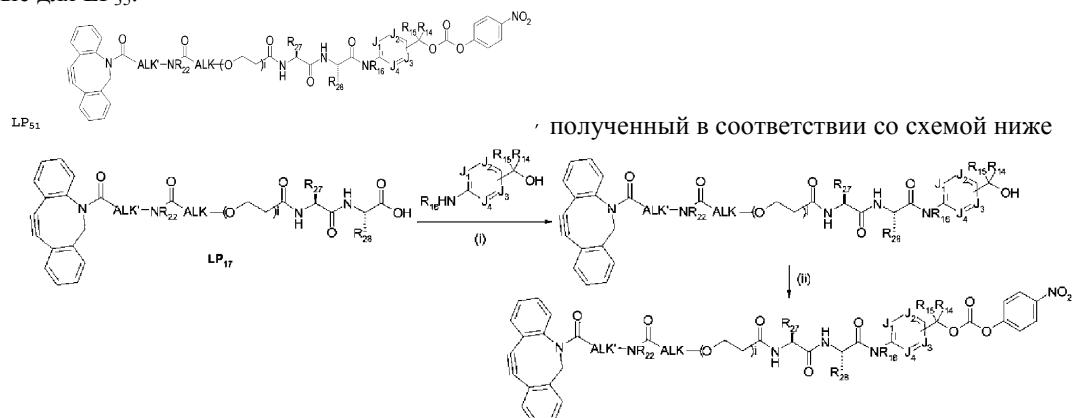
Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.



Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₁₆ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

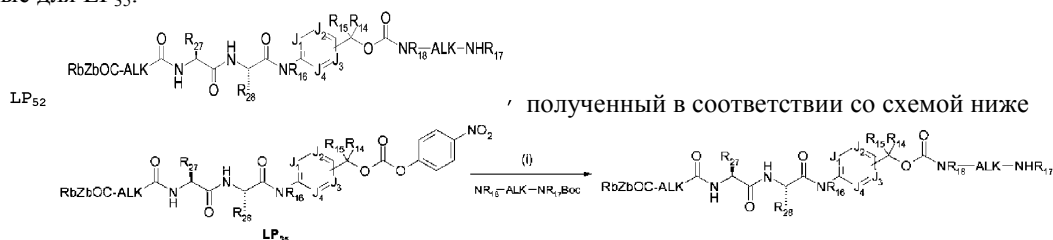
Многие производные анилина являются коммерчески доступными, такие как, например, перечисленные для LP₃₅.



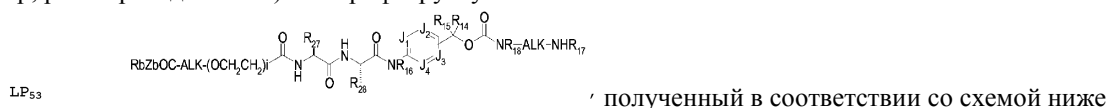
Стадия (i): образование пептидной связи между прекурсором линкера LP₁₇ и производным анилина; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/MeOH, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, EEDQ.

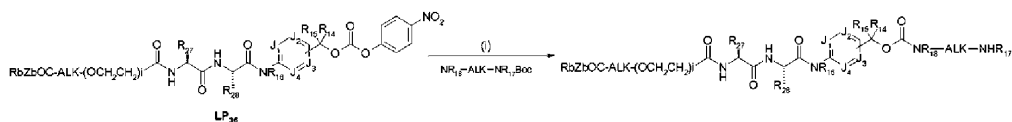
Стадия (ii): активация бензильного спирта в виде п-нитрофенилкарбоната с помощью обработки п-нитрофенилхлорформиатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Многие производные анилина являются коммерчески доступными, такие как, например, перечисленные для LP₃₅.

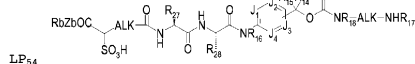


Стадия (i): образование карбамата между прекурсором линкера LP₃₅ и монозащищенным диамином; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH₃CN, в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.





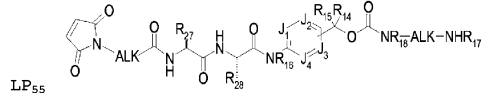
Стадия (i): образование карбамата между прекурсором линкера LP₃₆ и монозащищенным диамином; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH₃CN, в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.



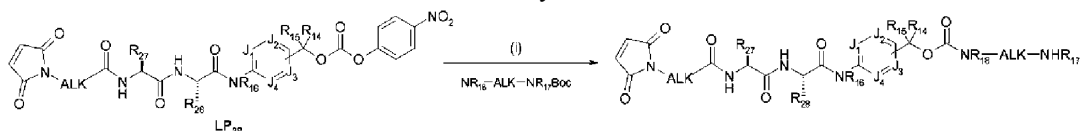
· полученный в соответствии со схемой ниже



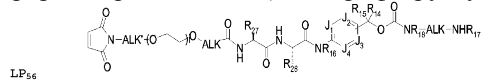
Стадия (i): образование карбамата между прекурсором линкера LP₃₇ и монозащищенным диамином; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH₃CN, в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.



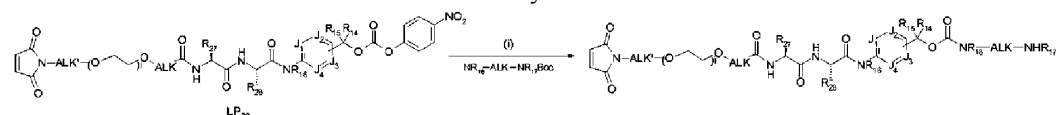
· полученный в соответствии со схемой ниже



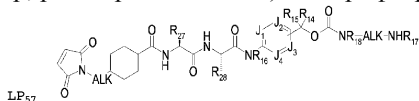
Стадия (i): образование карбамата между прекурсором линкера LP₃₈ и монозащищенным диамином; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH₃CN, в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.



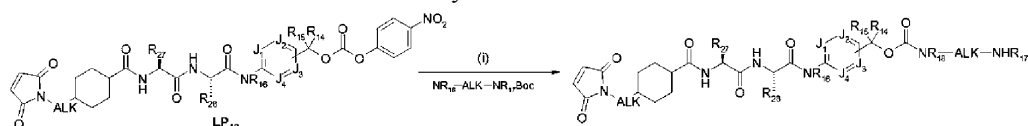
· полученный в соответствии со схемой ниже



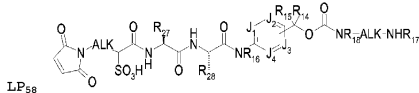
Стадия (i): образование карбамата между прекурсором линкера LP₃₉ и монозащищенным диамином; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH₃CN, в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.



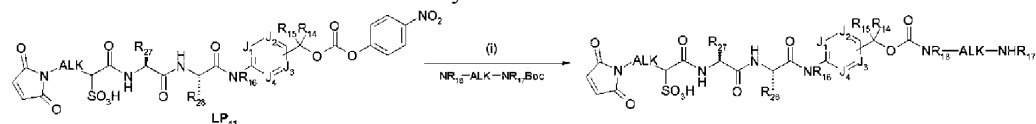
· полученный в соответствии со схемой ниже



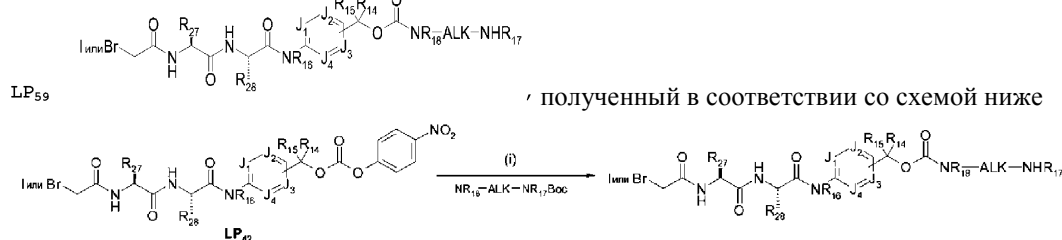
Стадия (i): образование карбамата между прекурсором линкера LP₄₀ и монозащищенным диамином; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH₃CN, в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.



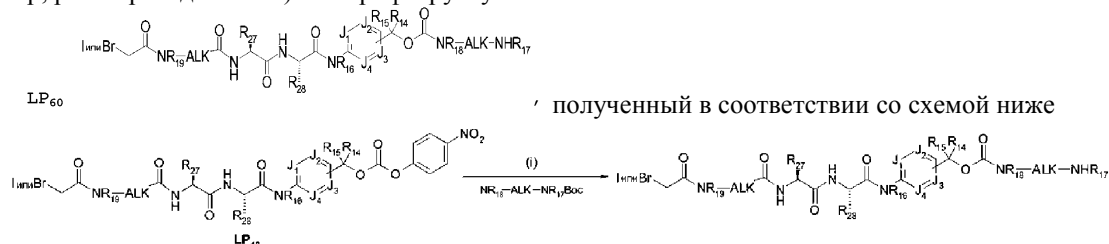
· полученный в соответствии со схемой ниже



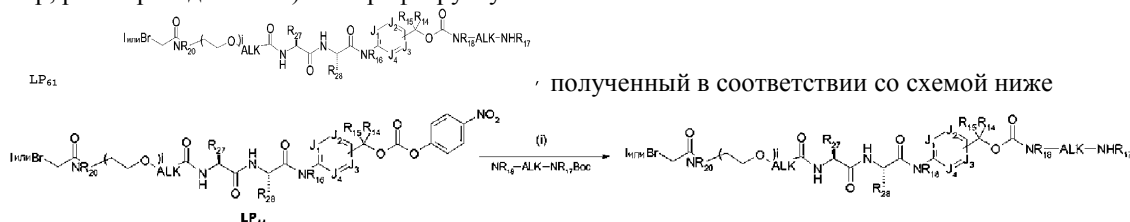
Стадия (i): образование карбамата между прекурсором линкера LP₄₁ и монозащитным диамином; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH₃CN, в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.



Стадия (i): образование карбамата между прекурсором линкера LP₄₂ и монозащитным диамином; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH₃CN, в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.



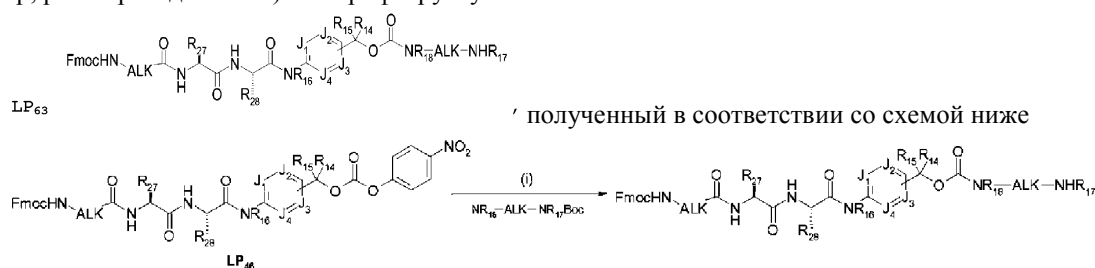
Стадия (i): образование карбамата между прекурсором линкера LP₄₃ и монозащитненным диамином; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH₃CN, в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.



Стадия (i): образование карбамата между прекурсором линкера LP₄₄ и монозащитненным диамином; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH₃CN, в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

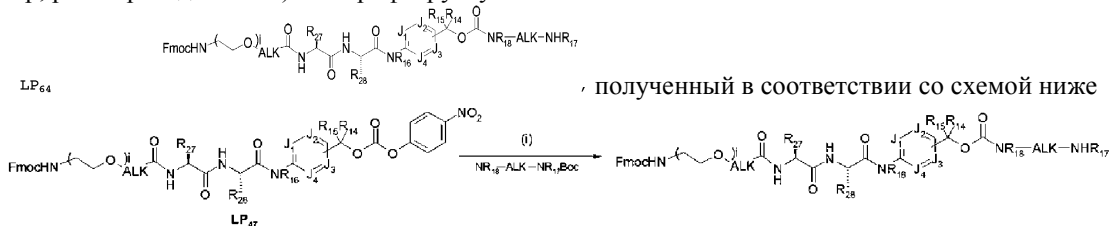


Стадия (i): образование карбамата между прекурсором линкера LP₄₅ и монозамещенным диамином; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH₃CN, в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

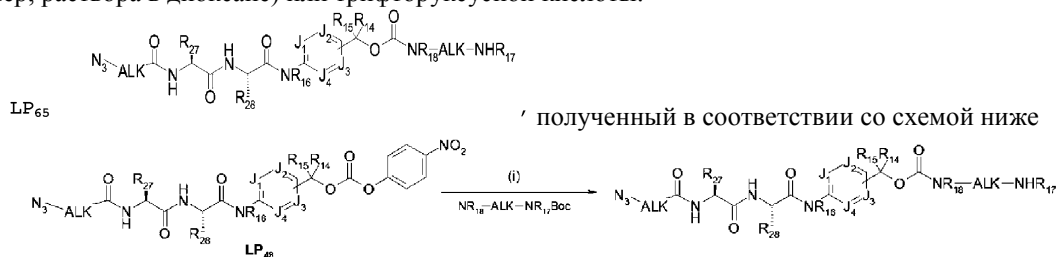


Стадия (i): образование карбамата между прекурсором линкера LP₄₆ и монозащищенным диамином;

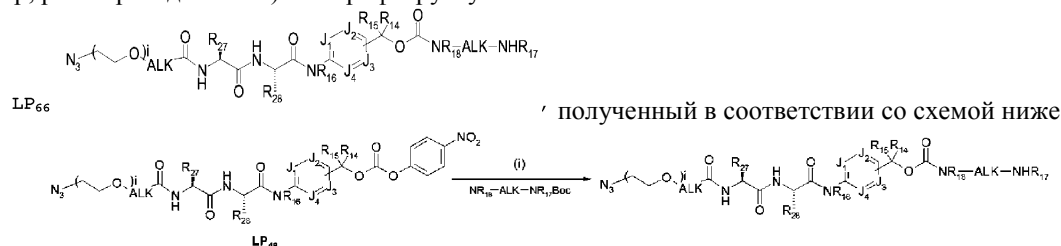
реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH_3CN , в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.



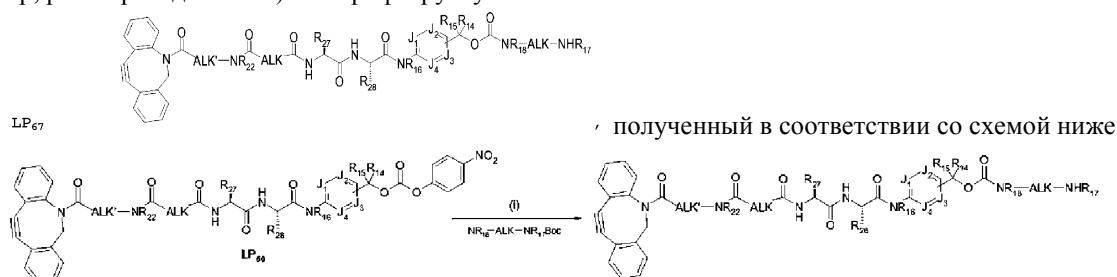
Стадия (i): образование карбамата между прекурсором линкера LP₄₇ и монозащищенным диамином; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH_3CN , в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.



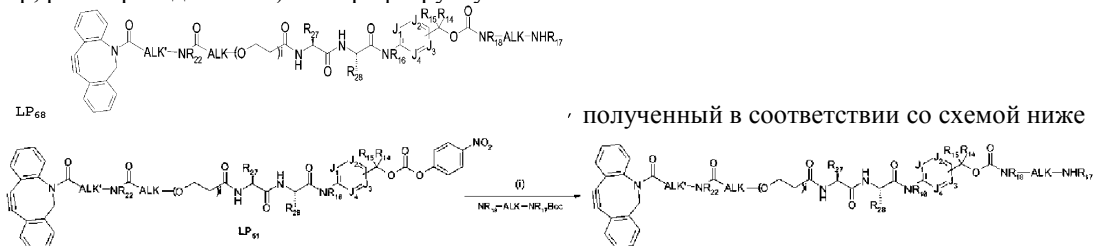
Стадия (i): образование карбамата между прекурсором линкера LP₄₈ и монозащищенным диамином; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH_3CN , в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.



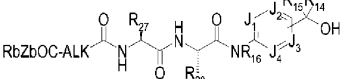
Стадия (i): образование карбамата между прекурсором линкера LP₄₉ и монозащищенным диамином; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH_3CN , в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

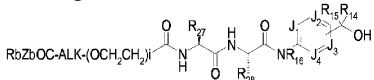


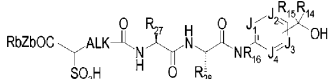
Стадия (i): образование карбамата между прекурсором линкера LP₅₀ и монозащищенным диамином; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH_3CN , в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

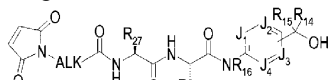


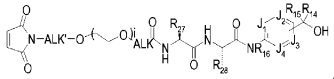
Стадия (i): образование карбамата; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH_3CN , в присутствии основания, такого как, например, DIEA; снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

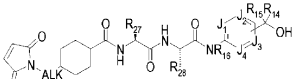

LP₆₉ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₃₅.

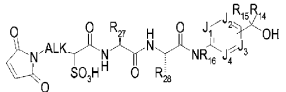

LP₇₀ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₃₆.

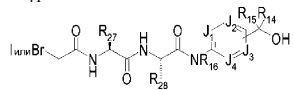

LP₇₁ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₃₇.

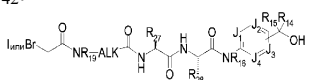

LP₇₂ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₃₈.

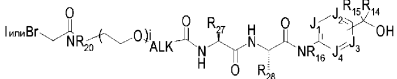

LP₇₃ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₃₉.

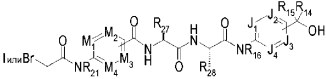

LP₇₄ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₄₀.

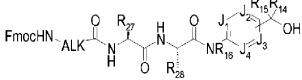

LP₇₅ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₄₁.

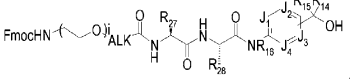

LP₇₆ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₄₂.

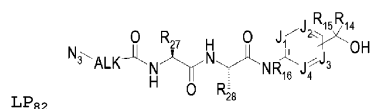

LP₇₇ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₄₃.


LP₇₈ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₄₄.

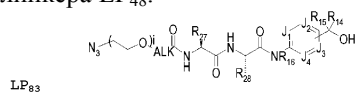

LP₇₉ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₄₅.


LP₈₀ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₄₆.

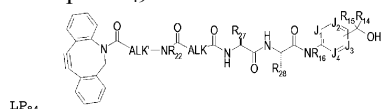

LP₈₁ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₄₇.



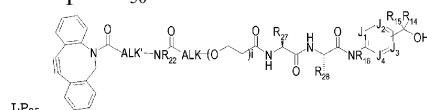
LP₈₂ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₄₈.



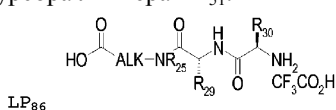
LP₈₃ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₄₉.



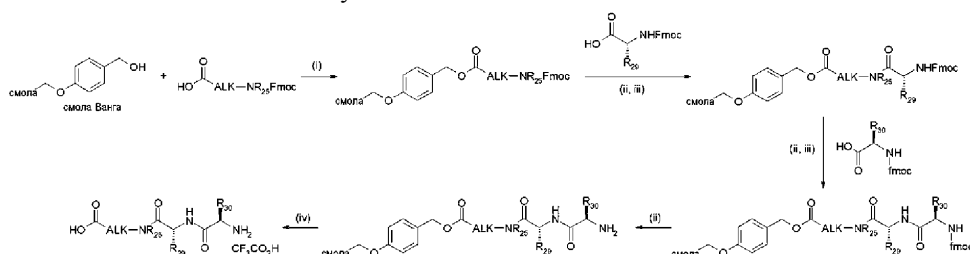
LP₈₄ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₅₀.



LP₈₅ , полученный в соответствии с 1-й стадией, описанной для прекурсора линкера LP₅₁.



LP₈₆ , полученный в соответствии со схемой ниже



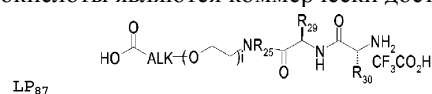
Стадия (i): образование связи кислоты на смоле Ванга с помощью этерификации; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, ДИК, и основания, такого как, например, ДМАП.

Стадия (ii): снятие защитной Fmoc-группы; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как ДМФ, с помощью обработки основанием, таким как, например, пиперидин.

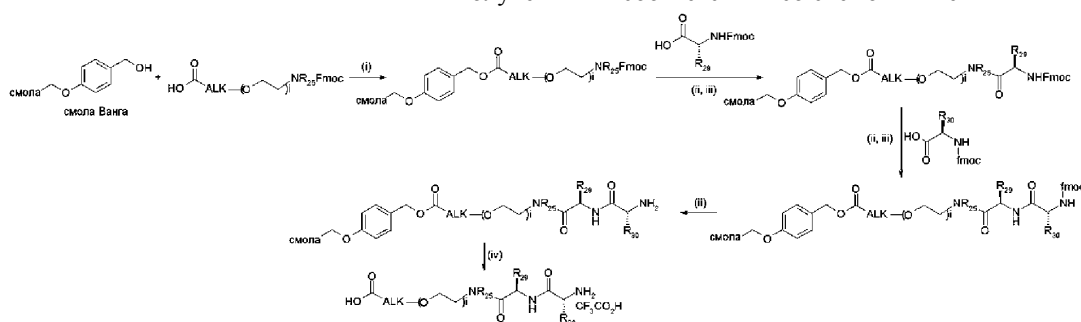
Стадия (iii): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как ДМФ, в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, НОВт и НАТУ, и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iv): расщепление смолы; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/Н₂О, в присутствии кислоты, такой как, например, ТФУК.

Fmoc-защищенные алкиламино кислоты являются коммерчески доступными для n=1-9; Fmoc-L-амино кислоты являются коммерчески доступными.



LP₈₇ , полученный в соответствии со схемой ниже



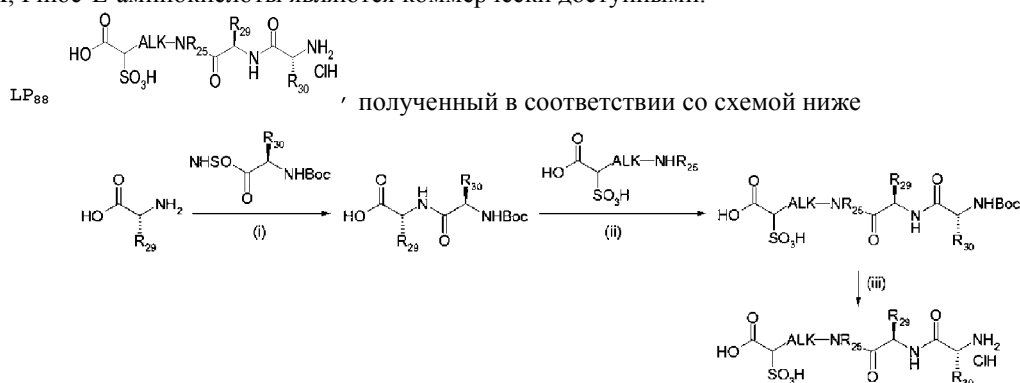
Стадия (i): образование связи кислоты на смоле Ванга с помощью этерификации; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как ДХМ, в присутствии связывающего реагента, такого как, например, ДИК, и основания, такого как, например, ДМАП.

Стадия (ii): снятие защитной Fmoc-группы; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как ДМФ, с помощью обработки основанием, таким как, например, пиперидин.

Стадия (iii): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как ДМФ, в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, HOBT и HATU, и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iv): расщепление смолы; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДХМ/Н₂О, в присутствии кислоты, такой как, например, ТФУК.

Фмос-защищенные аминок-ПЭГ-карбоновые кислоты являются коммерчески доступными для i=1-6 и иным образом могут быть получены из трет-бутилакрилата и соответствующего аминок-ПЭГ-спирта; в случае, когда $ALK \neq CH_2CH_2$, они могут быть получены в соответствии со схемами, описанными для прекурсора линкера LP₁₀. Защита функциональной аминогруппы Фмос-группой может быть реализована с помощью обработки ФмосOSu (номер CAS [82911-69-1]) в присутствии основания, такого как, например, DIEA; Фмос-L-аминокислоты являются коммерчески доступными.

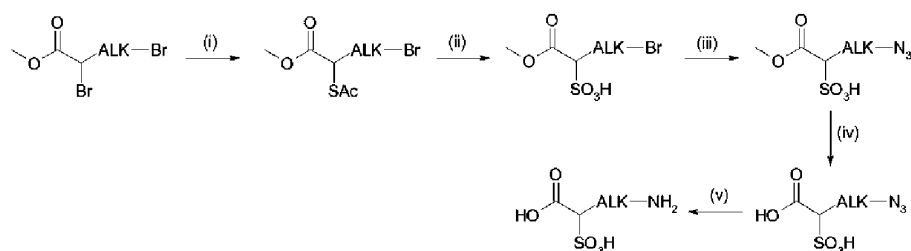


Стадия (i): образование пептидной связи между Boc-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂О, в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): образование пептидной связи с сульфоаминокислотами; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH₃CN, в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, ДЦК и HOBT, и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iii): снятие защитной Boc-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

L-аминокислоты являются коммерчески доступными; NHS-эфиры Boc-защищенных L-аминокислот являются коммерчески доступными; сульфоаминокислоты являются коммерчески доступными для n=1 и 2 или иным образом могут быть получены в соответствии со схемой ниже



Стадия (i): замещение бромидом тиоацетил; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как, например, ТГФ, с использованием тиоуксусной кислоты в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

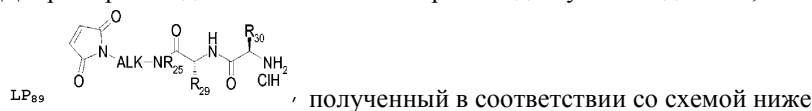
Стадия (ii): образование фрагмента сульфоновой кислоты; реакцию проводят с помощью обработки пероксидом водорода и уксусной кислотой.

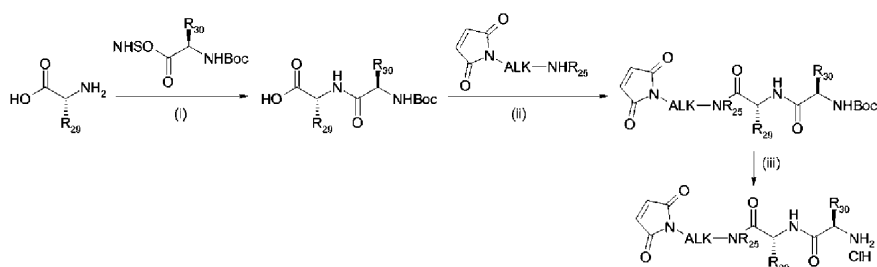
Стадия (iii): замещение бромидом азидом; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как, например, ДМА, с помощью обработки азидом натрия.

Стадия (iv): снятие защитной группы метилового эфира; реакцию проводят в кислых условиях, таких как, например, смесь HCl и AcOH.

Стадия (v): восстановление азидом; реакцию проводят с помощью гидрогенолиза в полярном растворителе, таком как Н₂О, в присутствии катализатора, такого как палладий на угле.

Дибромпроизводные являются коммерчески доступными для n=3, 4 и 9.



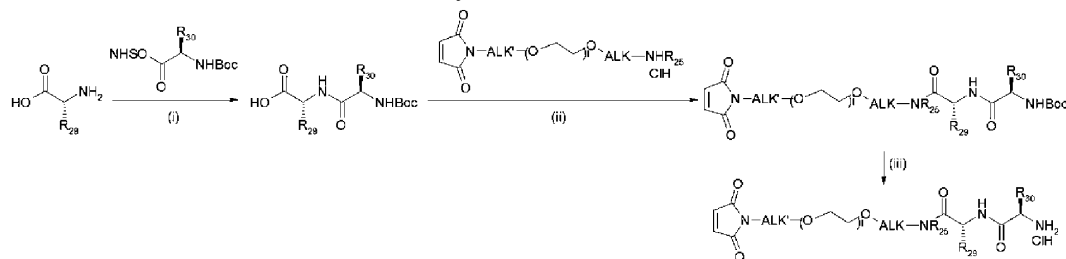
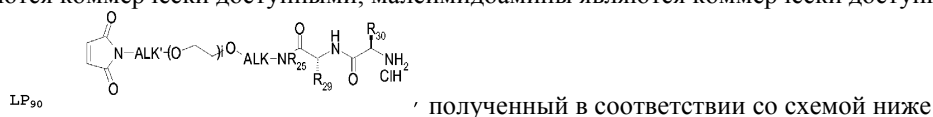


Стадия (i): образование пептидной связи между Вос-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): образование пептидной связи с малеимидами; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH_3CN , в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, ДЦК и НОВт, и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

L-аминокислоты являются коммерчески доступными; NHS-эфиры Вос-защищенных L-аминокислот являются коммерчески доступными; малеимидами являются коммерчески доступными для $n=2-6$.

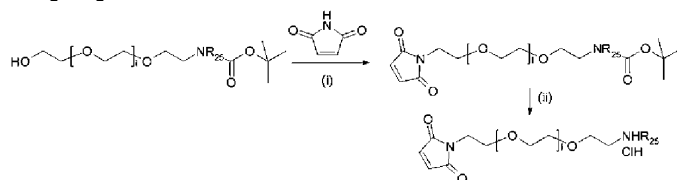


Стадия (i): образование пептидной связи между Вос-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

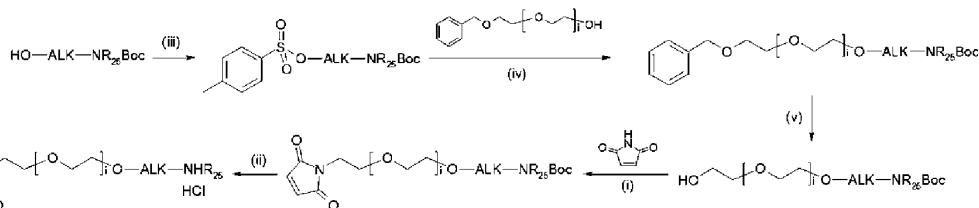
Стадия (ii): образование пептидной связи с малеимидами-ПЭГ-аминами; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH_3CN , в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, ДЦК и НОВт, и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

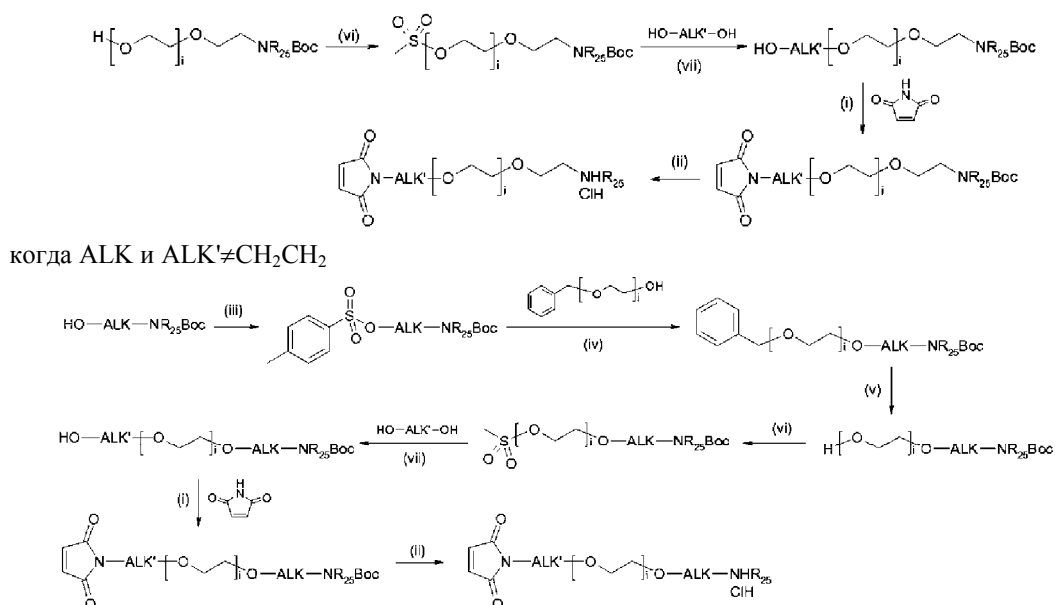
L-аминокислоты являются коммерчески доступными; NHS-эфиры Вос-защищенных L-аминокислот являются коммерчески доступными; малеимидами-ПЭГ-амины являются коммерчески доступными для $ALK=ALK'=CH_2CH_2$ и $i=0$ и 1 или иным образом могут быть получены в соответствии со схемой ниже, когда $ALK=ALK'=CH_2CH_2$ и $i>1$



когда $ALK \neq CH_2CH_2$ и $ALK'=CH_2CH_2$



когда $ALK=CH_2CH_2$ и $ALK' \neq CH_2CH_2$



Стадия (i): реакция Мицунобу на малеимиде; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как, например, ТГФ, с помощью обработки малеимида ПЭГ-гидроксикислотой в присутствии PPh_3 и DIAD.

Стадия (ii): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

Стадия (iii): активация спирта в виде тозилата; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как, например, ДХМ, с помощью обработки тозилхлоридом в присутствии основания, такого как, например, ТЭА.

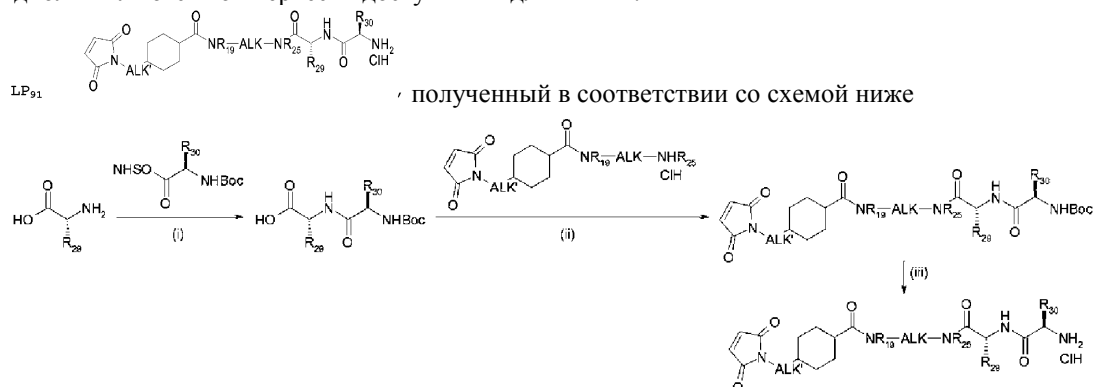
Стадия (iv): замещение тозилльной группы; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как, например, ТГФ, в присутствии основания, такого как, например, гидрид натрия.

Стадия (v): снятие защитной бензильной группы; реакцию проводят с помощью гидрогенолиза в полярном растворителе, таком как, например, MeOH, в присутствии каталитического количества катализатора, такого как, например, палладий на угле.

Стадия (vi): активация спирта в виде мезилата; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как, например, ДХМ, с помощью обработки метансульфонилхлоридом в присутствии основания, такого как, например, ТЭА.

Стадия (vii): нуклеофильное замещение; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как, например, ДМФ, в присутствии основания, такого как гидрид натрия.

Исходные Вос-защищенные ПЭГ-аминоспирты являются коммерчески доступными для $i=2-4$ или могут быть получены с помощью обработки коммерчески доступных ПЭГ-аминоспиртов Вос₂O для $i=5-8$; исходные ALK-аминоспирты являются коммерчески доступными для $n=1$ и от 3 до 10; исходные ПЭГ-диола, монозащищенные бензильной группой, являются коммерчески доступными для $i=1-9$; исходные ALK'-диола являются коммерчески доступными для $n=1-12$.

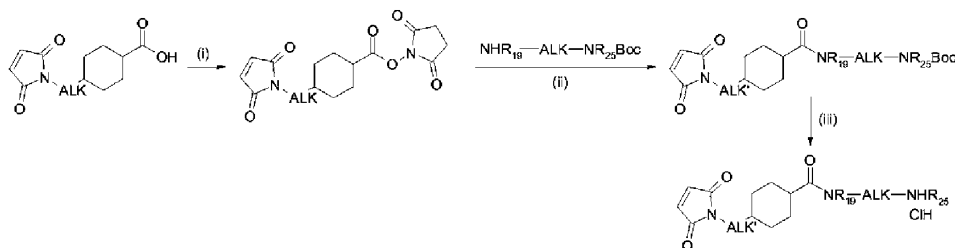


Стадия (i): образование пептидной связи между Вос-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): образование пептидной связи с малеимидами; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH_3CN , в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, ДЦК и HOBT, и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

L-аминокислоты являются коммерчески доступными; NHS-эфиры Вос-защищенных L-аминокислот являются коммерчески доступными; малеимидамины могут быть получены в соответствии со схемой ниже

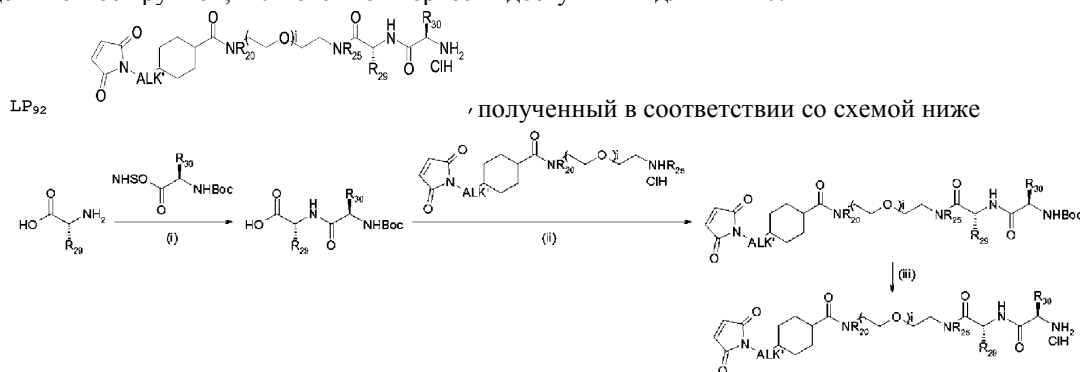


Стадия (i): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМФ/Н₂О, с помощью обработки N,N'-дисукцинимидилкарбонатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (ii): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/СН₃CN.

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

Малеимидоциклогексанкарбоновая кислота является коммерчески доступной для ALK=CH₂ или иным образом может быть получена в соответствии со схемами, описанными для LP₆; диамины, монозащищенные Вос-группой, являются коммерчески доступными для n=1-10.

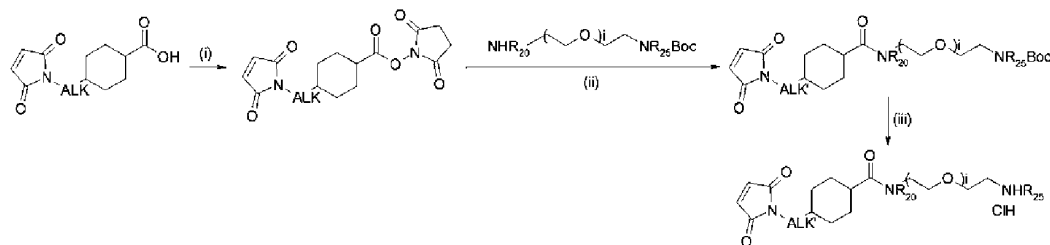


Стадия (i): образование пептидной связи между Вос-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂О, в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): образование пептидной связи с малеимидо-ПЭГ-аминами; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как СН₃CN, в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, ДЦК и НОВт, и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

L-аминокислоты являются коммерчески доступными; NHS-эфиры Вос-защищенных L-аминокислот являются коммерчески доступными; малеимидо ПЭГ-амины могут быть получены в соответствии со схемой ниже



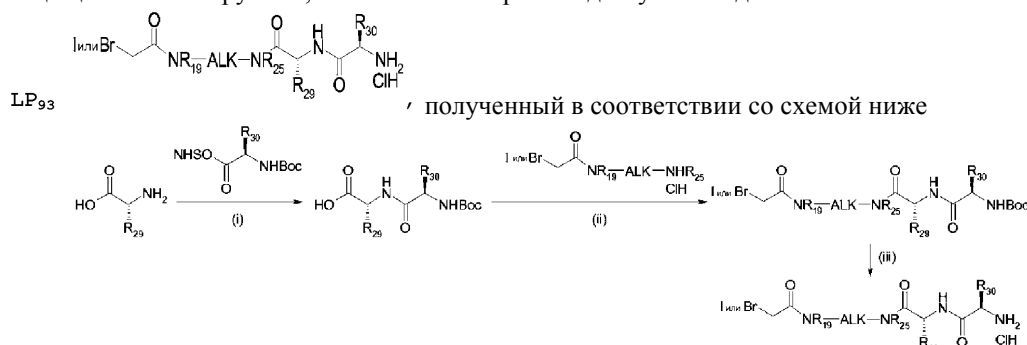
Стадия (i): активация карбоновой кислоты в виде NHS-эфира; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМФ/Н₂О, с помощью обработки N,N'-дисукцинимидилкарбонатом в присутствии основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (ii): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/СН₃CN.

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты

(например, раствора в диоксане).

Малеимидоциклогексанкарбоновая кислота является коммерчески доступной для $ALK=CH_2$ или иным образом может быть получена в соответствии со схемами, описанными для LP₆; ПЭГ-диамины, монозащищенные Вос-группой, являются коммерчески доступными для $i=1-9$.

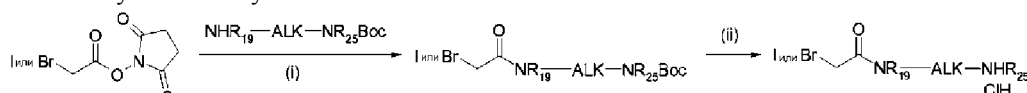


Стадия (i): образование пептидной связи между Вос-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): образование пептидной связи с галогенацетидами-ПЭГ-аминами; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH_3CN , в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, ДЦК и HOBT и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

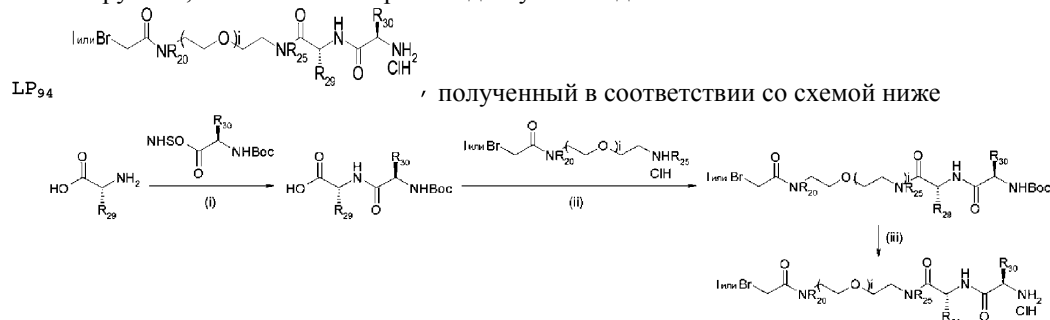
L-аминокислоты являются коммерчески доступными; NHS-эфиры Вос-защищенных L-аминокислот являются коммерчески доступными; галогенацетидами являются коммерчески доступными для $n=2-4$ и 8 или могут быть получены в соответствии со схемой ниже



Стадия (ii): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ CH_3CN .

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

N-сукцинимидилбromo- и иодоацетаты являются коммерчески доступными; диамины, монозащищенные Вос-группой, являются коммерчески доступными для $n=1-10$.

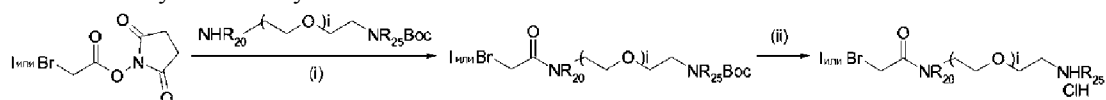


Стадия (i): образование пептидной связи между Вос-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): образование пептидной связи с галогенацетидами-ПЭГ-аминами; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH_3CN , в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, ДЦК и HOBT, и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

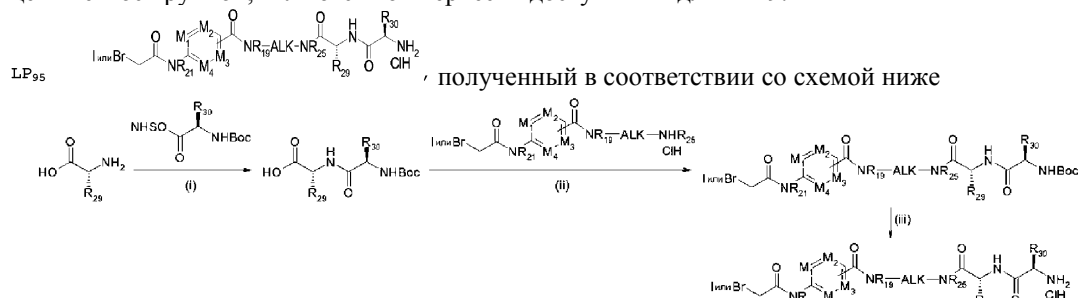
L-аминокислоты являются коммерчески доступными; NHS-эфиры Вос-защищенных L-аминокислот являются коммерчески доступными; галогенацетидами являются коммерчески доступными для $n=2-4$ и 8 или могут быть получены в соответствии со схемой ниже



Стадия (ii): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ CH_3CN .

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

N-сукцинимидилбromo- и иодоацетаты являются коммерчески доступными; ПЭГ-диамины, моно-защищенные Вос-группой, являются коммерчески доступными для $i=1-9$.

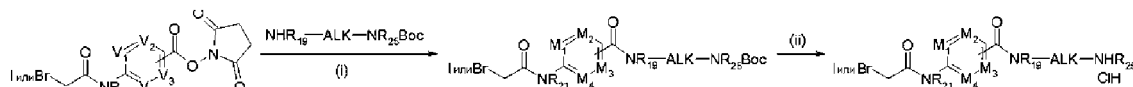


Стадия (i): образование пептидной связи между Вос-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): образование пептидной связи с галогенацетидами; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH_3CN , в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, ДЦК и HOBT, и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

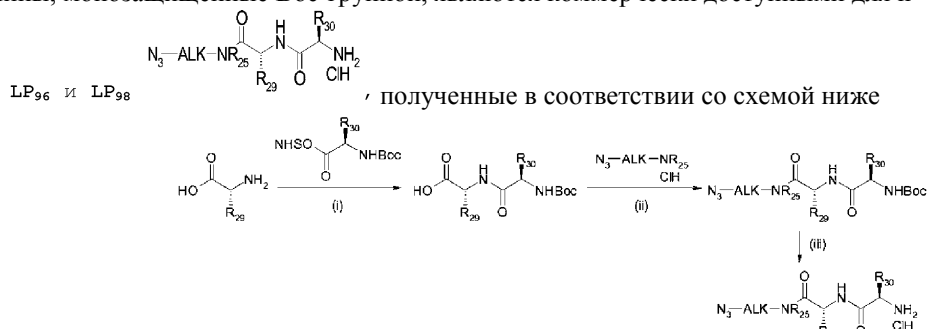
L-аминокислоты являются коммерчески доступными; NHS-эфиры Вос-защищенных L-аминокислот являются коммерчески доступными; галогенацетидами могут быть получены в соответствии со схемой ниже



Стадия (ii): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как смесь ДХМ/ CH_3CN .

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

NHS-эфиры галогенацетамидов могут быть получены, как описано для прекурсора линкера LP₁₁; диамины, монозащищенные Вос-группой, являются коммерчески доступными для $n=1-10$.

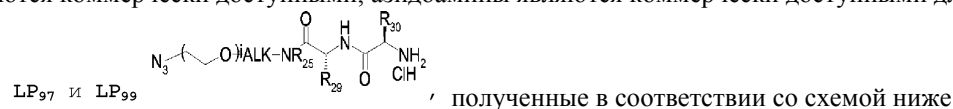


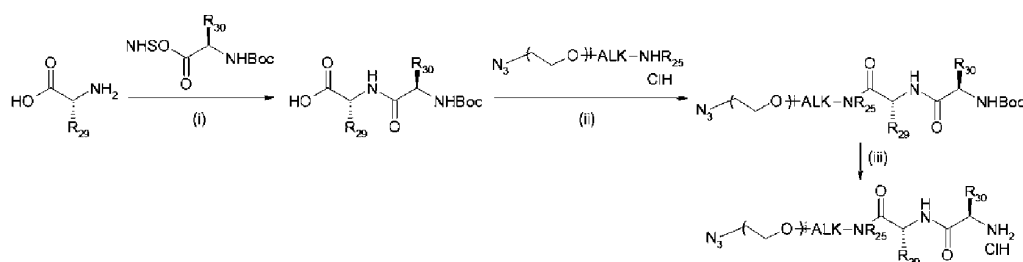
Стадия (i): образование пептидной связи между Вос-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): образование пептидной связи с азидами; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH_3CN , в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, ДЦК и HOBT, и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

L-аминокислоты являются коммерчески доступными; NHS-эфиры Вос-защищенных L-аминокислот являются коммерчески доступными; азидами являются коммерчески доступными для $n=2-8$ и 10.



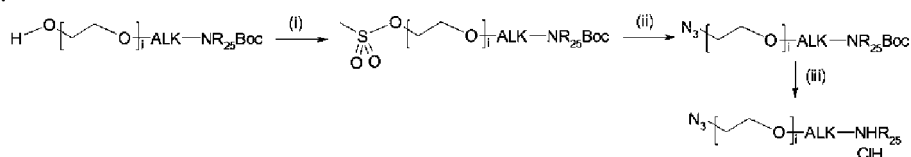


Стадия (i): образование пептидной связи между Вос-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): образование пептидной связи с азидо-ПЭГ-аминами; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH_3CN , в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, ДЦК и НОВт, и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

L-аминокислоты являются коммерчески доступными; NHS-эфиры Вос-защищенных L-аминокислот являются коммерчески доступными; для $\text{ALK}=\text{CH}_2\text{CH}_2$ азидо-ПЭГ-амины являются коммерчески доступными для $i=1-8$ и 10, для $\text{ALK}\neq\text{CH}_2\text{CH}_2$ азидо-ПЭГ-амины могут быть получены в соответствии со схемой ниже:

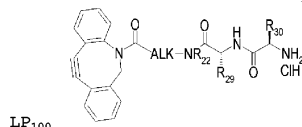


Стадия (i): активация спирта в виде мезилата; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как, например, ДХМ, с помощью обработки метансульфонилхлоридом в присутствии основания, такого как, например, ТЭА.

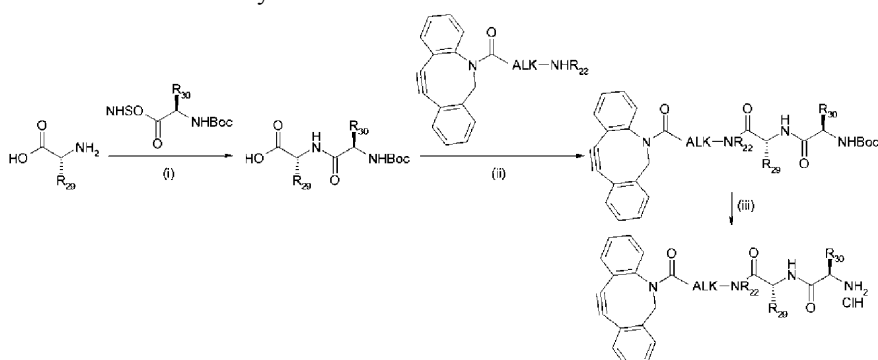
Стадия (ii): замещение мезилата азидогруппой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ацетон/ H_2O , с помощью обработки азидом натрия.

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

Исходные ПЭГ-аминоспирты могут быть получены, как описано для прекурсора линкера LP_{90} .



, полученный в соответствии со схемой ниже

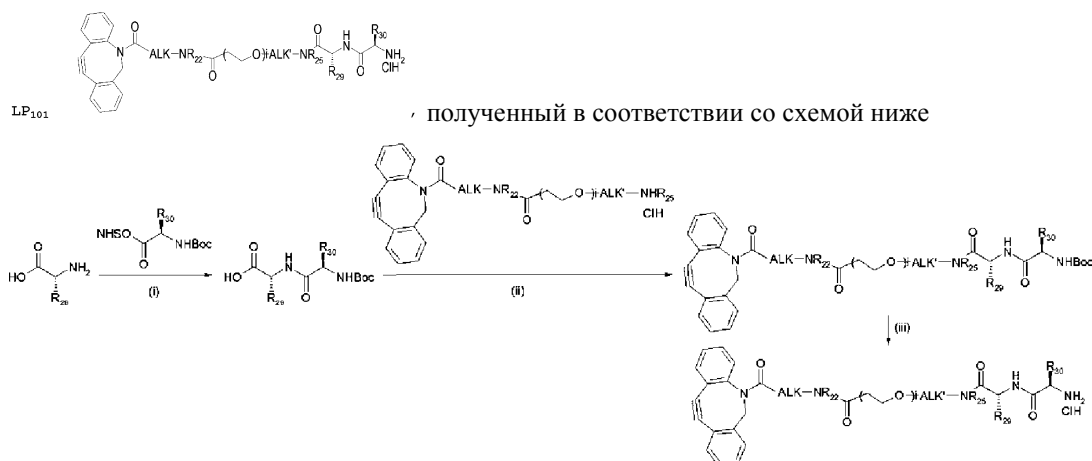


Стадия (i): образование пептидной связи между Вос-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/ H_2O , в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): образование пептидной связи с циклооктинаминами; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как CH_3CN , в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, ДЦК и НОВт, и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

Циклооктинамины являются коммерчески доступными для $n=1,2$, 3 и 5.

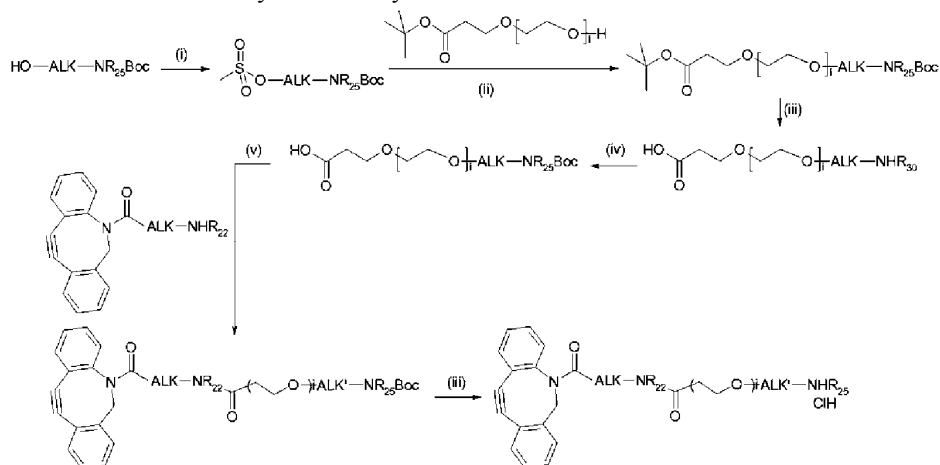


Стадия (i): образование пептидной связи между Вос-L-аминокислотой-ONHS и L-аминокислотой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как смесь ДМЭ/ТГФ/Н₂О, в присутствии основания, такого как, например, бикарбонат натрия.

Стадия (ii): образование пептидной связи с циклооктин-ПЭГ-аминами; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как СН₃CN, в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, ДЦК и НОВт, и основания, такого как, например, DIEA.

Стадия (iii): снятие защитной Вос-группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане).

Циклооктин-ПЭГ-амины могут быть получены в соответствии со схемой ниже



Стадия (i): активация спирта в виде мезилата; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как, например, ДХМ, с помощью обработки метансульфонилхлоридом в присутствии основания, такого как, например, ТЭА.

Стадия (ii): нуклеофильное замещение; реакцию проводят в полярном апротонном растворителе, таком как, например, ДМФ, в присутствии основания, такого как гидрид натрия.

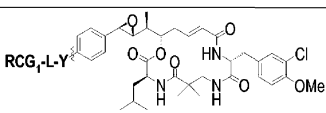
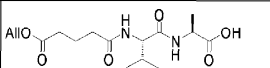
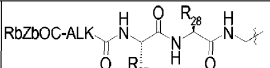
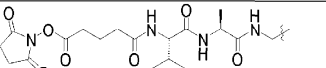
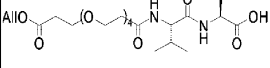
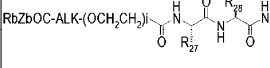
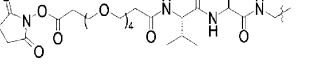
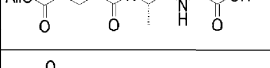
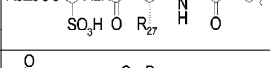
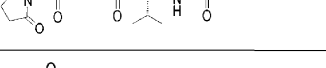
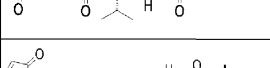
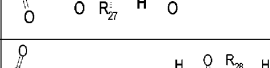
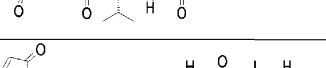
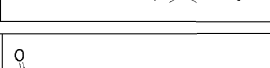
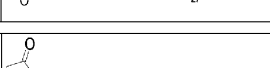
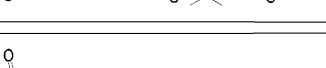
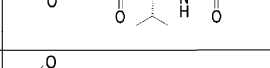
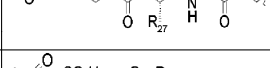
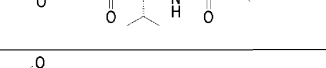
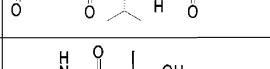
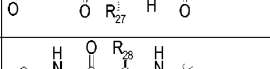
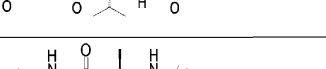
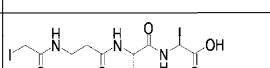
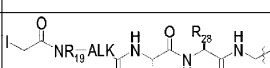
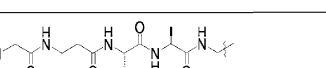
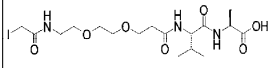
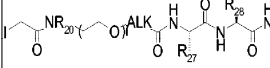
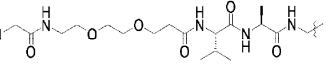
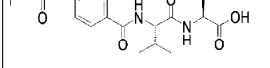
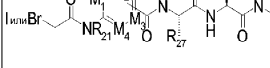
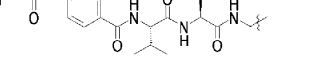
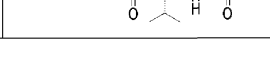
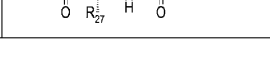
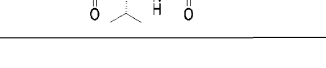
Стадия (iii): снятие защитной группы с использованием раствора хлористоводородной кислоты (например, раствора в диоксане) или трифторуксусной кислоты.

Стадия (iv): защита амина Вос-группой; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как, например, ДХМ, с помощью обработки Вос₂О в присутствии основания, такого как, например, ТЭА.

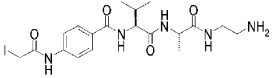
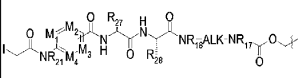
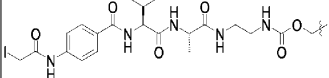
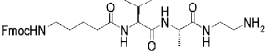
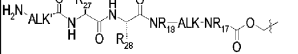
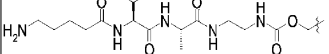
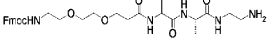
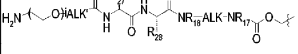
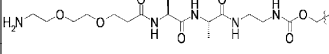
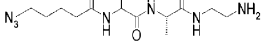
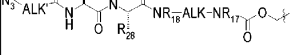
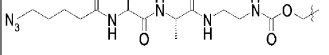
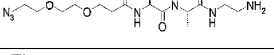
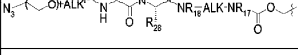
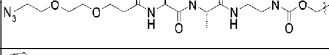
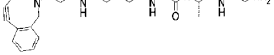
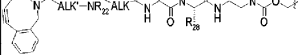
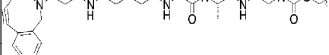
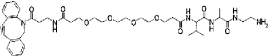
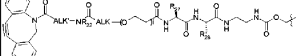
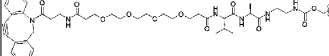
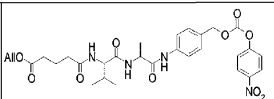
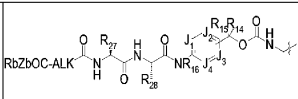
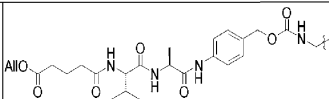
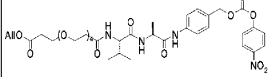
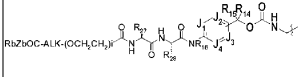
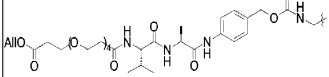
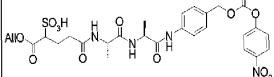
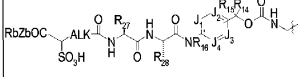
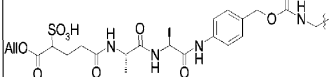
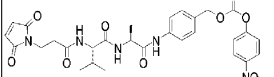
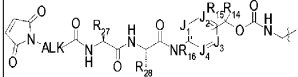
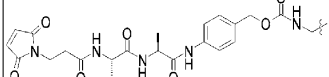
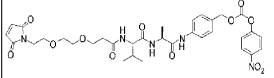
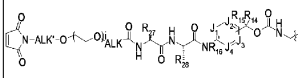
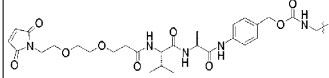
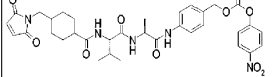
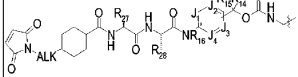
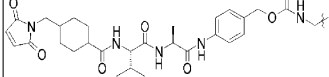
Стадия (v): образование пептидной связи; реакцию проводят в полярном растворителе, таком как, например, ДХМ, в присутствии связывающих реагентов, таких как, например, НОВт и EDC.

Исходные ALK-аминоспирты являются коммерчески доступными для n=1-10; циклооктины являются коммерчески доступными для n=1,2, 3 и 5.

Таблица I

Прекурсор линкера		Загрузки криптофидина формулы (II) ^{1, 2}		
LP	Примеры LP	RCG1-L семейство, полученное из прекурсора LP  с RCG1-L-Y =		
LP ₁		L ₁		
LP ₂		L ₂		
LP ₃		L ₃		
LP ₄		L ₄		
LP ₅		L ₅		
LP ₆		L ₆		
LP ₇		L ₇		
LP ₈		L ₈		
LP ₉		L ₉		
LP ₁₀		L ₁₀		
LP ₁₁		L ₁₁		
LP ₁₂		L ₁₂		

LP ₁₃		L ₁₃		
LP ₁₄		L ₁₄		
LP ₁₅		L ₁₅		
LP ₁₆		L ₁₆		
LP ₁₇		L ₁₇		
LP ₁₈		L ₁₈		
LP ₁₉		L ₁₉		
LP ₂₀		L ₂₀		
LP ₂₁		L ₂₁		
LP ₂₂		L ₂₂		
LP ₂₃		L ₂₃		
LP ₂₄		L ₂₄		
LP ₂₅		L ₂₅		
LP ₂₆		L ₂₆		
LP ₂₇		L ₂₇		

LP ₂₈		L ₂₈		
LP ₂₉		L ₂₉		
LP ₃₀		L ₃₀		
LP ₃₁		L ₃₁		
LP ₃₂		L ₃₂		
LP ₃₃		L ₃₃		
LP ₃₄		L ₃₄		
LP ₃₅		L ₃₅		
LP ₃₆		L ₃₆		
LP ₃₇		L ₃₇		
LP ₃₈		L ₃₈		
LP ₃₉		L ₃₉		
LP ₄₀		L ₄₀		

LP ₄₁		L ₄₁		
LP ₄₂		L ₄₂		
LP ₄₃		L ₄₃		
LP ₄₄		L ₄₄		
LP ₄₅		L ₄₅		
LP ₄₆		L ₄₆		
LP ₄₇		L ₄₇		
LP ₄₈		L ₄₈		
LP ₄₉		L ₄₉		
LP ₅₀		L ₅₀		
LP ₅₁		L ₅₁		
LP ₅₂		L ₅₂		
LP ₅₃		L ₅₃		

LP54		L54		
LP55		L55		
LP56		L56		
LP57		L57		
LP58		L58		
LP59		L59		
LP60		L60		
LP61		L61		
LP62		L62		
LP63		L63		
LP64		L64		
LP65		L65		
LP66		L66		
LP67		L67		
LP68		L68		

LP ₆₉		L ₆₉		
LP ₇₀		L ₇₀		
LP ₇₁		L ₇₁		
LP ₇₂		L ₇₂		
LP ₇₃		L ₇₃		
LP ₇₄		L ₇₄		
LP ₇₅		L ₇₅		
LP ₇₆		L ₇₆		
LP ₇₇		L ₇₇		
LP ₇₈		L ₇₈		
LP ₇₉		L ₇₉		
LP ₈₀		L ₈₀		
LP ₈₁		L ₈₁		
LP ₈₂		L ₈₂		

LP ₈₃		L ₈₃		
LP ₈₄		L ₈₄		
LP ₈₅		L ₈₅		
LP ₈₆		L ₈₆		
LP ₈₇		L ₈₇		
LP ₈₈		L ₈₈		
LP ₈₉		L ₈₉		
LP ₉₀		L ₉₀		
LP ₉₁		L ₉₁		
LP ₉₂		L ₉₂		
LP ₉₃		L ₉₃		
LP ₉₄		L ₉₄		
LP ₉₅		L ₉₅		
LP ₉₆ 1		L ₉₆		
LP ₉₈		L ₉₈		
LP ₉₇ 1		L ₉₇		
LP ₉₉		L ₉₉		
LP ₁₀₀		L ₁₀₀		
LP ₁₀₁		L ₁₀₁		

¹ примеры приведены для определенного соединения криптофицина, но могут применяться к любому соединению криптофицина формулы (I), в частности D₁-D₁₉.

² в табл. I L приведен в настоящем описании в пара-положении, но можно получить соединения аналогичным образом с L в орто- или мета-положении.

Способ получения конъюгатов формулы (III).

Конъюгаты настоящего изобретения могут быть получены с помощью способа, включающего стадии, которые заключаются в

(i) помещении во взаимодействие и предоставлении взаимодействия необязательно буферного водного раствора антитела, необязательно сначала модифицированного с помощью модифицирующего агента и раствора полезной нагрузки криптофицина формулы (II), при этом химическая группа RCG1 соединения формулы (II) является реакционноспособной по отношению к химическим группам RCG2, присутствующим на антителе, в частности к аминогруппам, присутствующим на антителах, при этом указанные химические группы RCG2 были введены, когда это необходимо, с помощью модифицирующего агента, чтобы присоединить соединение формулы (II) к антителу с помощью образования ковалентной связи;

(ii) и затем необязательном отделении конъюгата, образованного на стадии (i), от полезной нагрузки криптофицина, и/или от непрореагировавшего антитела, и/или от любых образовавшихся агрегатов.

В соответствии с одним вариантом и более конкретно на стадии (ii) конъюгат из стадии (i) отделяют только от непрореагировавшей полезной нагрузки криптофицина и от любых образовавшихся агрегатов, и любое непрореагировавшее антитело остается в растворе.

Функция помещения во взаимодействие заключается в реакции химических групп RCG1 и RCG2, чтобы обеспечить присоединение полезной нагрузки криптофицина к антителу с помощью образования ковалентной связи; предпочтительно, когда RCG1 представляет собой $-C(=O)-Z_aR_a$, реакция предпочтительно протекает по функциональным аминогруппам антитела, в частности ϵ -аминогруппам, находящимся на боковых цепях остатков лизина (Lys) антитела и α -аминогруппам N-концевых аминокислот тяжелых и легких цепей антитела. В данном случае получают конъюгат следующей формулы: $mAb-[NH-C(=O)-L^*-Крипто]_d$, при этом L^* =фрагмент линкера L содержит RCG1 $= -C(=O)-Z_aR_a$ и такой, что $L = -L^*C(=O)-Z_aR_a$ и d представляет собой соотношение лекарственного средства и антитела или DAR;

когда RCG1 представляет собой -Cl или малеимидо- или галогенацетидамидогруппу, антитело может содержать тиольные химические группы;

когда RCG1 представляет собой азидогруппу, антитело может содержать фрагмент $-C\equiv CH$ или активированную тройную связь, такую как циклооктин;

когда RCG1 представляет собой $-NH_2$, реакция может протекать по амидной функциональной группе антитела с использованием ферментативного катализа, в частности амидным группам, находящихся на боковых цепях остатков глутамина (Gln) антитела. В данном случае получают конъюгат следующей формулы: $mAb-[C(=O)-NH-L^*-Крипто]_d$, при этом L^* =фрагмент линкера L содержит RCG1 $= -NH_2$ и такой, что $L = -L^*NH_2$ и d представляет собой соотношение лекарственного средства и антитела или DAR;

когда RCG1 представляет собой $-C\equiv CH$ или активированную $C\equiv C$, такую как фрагмент циклооктина, антитело может содержать азидогруппы.

Термин "агрегаты" означает ассоциации, которые могут образовываться между двумя или более антителами, причем антитела, возможно, были модифицированы конъюгацией. Агрегаты могут образовываться под влиянием широкого спектра параметров, таких как высокая концентрация антител в растворе, pH раствора, высокое усилие сдвига, количество привитых лекарственных средств и их гидрофобный характер, температура (см. ссылки, приведенные во введении J. Membrane Sci. 2008, 318, 311-316), влияние некоторых из них, однако, не было четко выявлено. В случае белков или антител ссылка может быть сделана на AAPS Journal, "Protein Aggregation and Bioprocessing" 2006, 8(3), E572-E579. Содержание агрегата может быть определено с помощью известных методик, таких как SEC (см. в этом отношении Analytical Biochemistry 1993, 212 (2), 469-480).

Водный раствор антитела может быть заполнен буферами, такими как, например, фосфат калия, или HEPES, или смесь буферов, таких как буфер А, описанный ниже. Буфер зависит от природы антитела. Полезная нагрузка криптофицина растворяется в полярном органическом растворителе, таком как, например, ДМСО или ДМА.

Реакция протекает при температуре обычно от 20 до 40°C. Время реакции может варьироваться от 1 до 24 ч. Реакция между антителом и полезной нагрузкой криптофицина может контролироваться SEC с помощью рефрактометрического и/или ультрафиолетового детектора и/или МСВР для определения ее степени протекания. Если степень замещения является недостаточной, реакция может быть оставлена на более длительный период и/или может быть добавлено соединение криптофицина. Для более подробной информации относительно конкретных условий ссылка может быть сделана на раздел примеров. Конкретные варианты осуществления описаны в примерах 3, 7, 10, 14, 20 и 23.

Специалист в данной области техники располагает различными хроматографическими методами для разделения стадии (ii): конъюгат может быть очищен, например, с помощью пространственно-эксклюзионной хроматографии (SEC), с помощью адсорбционной хроматографии (например, ионного обмена, ИЕС), с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC), с помощью афинной хроматографии, с помощью хроматографии на смешанных носителях, таких как керамический гидроксипатит или с помощью ВЭЖХ. Также можно использовать очистку с помощью диализа или диалфильтрации.

После стадии (i) или (ii) раствор конъюгата может подвергаться стадии (iii) ультрафильтрации и/или диалфильтрации. После данных стадий таким образом получают конъюгат в водном растворе.

Антитело.

Антитело может быть моноклональным антителом, выбранным из группы, состоящей из мышиного, химерного, гуманизированного и человеческого антитела.

В одном варианте осуществления антитело представляет собой моносpezifическое антитело, т.е. антитело, специфически связывающееся с одной единственной мишенью. Альтернативно, оно может представлять собой мультисpezifическое антитело.

В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG, например антитело IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄.

Антитело в соответствии с изобретением специфически связывается с мишенью, таким образом направляя биологически активное соединение в виде цитотоксического соединения по направлению к указанной мишени. Используемый в настоящем описании "специфически связывается", или "связывается специфически", или "связывается с" или подобное означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным при физиологических условиях. Специфическое связывание может быть охарактеризовано равновесной константой диссоциации (K_D), по меньшей мере, приблизительно 1×10^{-8} М или менее (например, меньшее K_D обозначает более жесткое связывание). Способы определения, специфически связываются ли две молекулы, хорошо известны в данной области техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и подобные. Как описано в настоящей заявке, антитела были охарактеризованы, например, их специфическим связыванием с мишенью и/или антигеном-мишенью с использованием поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™.

Мишень обычно соответствует белку, экспрессируемому на поверхности клетки, например белку, экспрессируемому на поверхности опухолевых клеток.

В одном варианте осуществления мишень представляет собой рецептор EphA2. Рецептор EphA2 представляет собой эфринный рецептор и также упоминается как "рецептор EPH A2" или "рецепторный белок тирозинкиназы эпителиальных клеток" (см., например, OMIM Entry *176946, доступный на сайте omim.org/entry/176946, версия обновлена 21 июля 2016 г.). Антитело, специфически связывающееся с рецептором EphA2, может, например, соответствовать одному из антител, описанных в WO 2008/010101 или WO 2011/039724.

В другом варианте осуществления мишенью является CD19. CD19 представляет собой молекулу клеточной поверхности, специфически экспрессируемую В-лимфоцитами и фолликулярными дендритными клетками гематопоэтической системы, и также называется "В-лимфоцитарным антигеном CD19" (см., например, OMIM Entry *107265, доступный на сайте omim.org/entry/107265, последняя версия которого была обновлена 11 мая 2015 г.). Антитело, специфически связывающееся с CD19, может, например, соответствовать колтуксимабу, т.е. части (фрагменту) антитела колтуксимаба равтансина.

Антитело может быть необязательно модифицировано модифицирующим агентом, чтобы способствовать прикреплению нагрузок криптофицина, описанных ранее. Антитело может быть в частности моноклональным, поликлональным или мультисpezifическим. Оно также может быть фрагментом антитела. Оно также может представлять собой мышиное, человеческое, гуманизированное или химерное антитело. Антитело, используемое в примерах настоящего изобретения, представляет собой hu2H11_R3574, антитело-антагонист против EphA2-рецептора.

Последовательность hu2H11_R3574 описана в WO 02011/039724 (SEQ ID NO: 18 для тяжелой цепи и SEQ ID NO: 16 для легкой цепи).

Конъюгат.

Конъюгат обычно содержит от приблизительно 1 до 10 соединений криптофицина, ковалентно связанных с антителом (это степень слияния, или "соотношение лекарственного средства и антитела", или "DAR"). Это число изменяется в зависимости от природы антитела и соединения криптофицина, а также от условий работы, используемых в процессе конъюгации (например, количество эквивалентов соединения криптофицина по отношению к антителу, время реакции, природа растворителя и любого сорастворителя). Помещение антитела и соединения криптофицина во взаимодействие приводит к смеси, содержащей несколько конъюгатов, которые индивидуально отличаются друг от друга различными DAR; необязательно непрореагировавшее антитело; необязательно агрегаты. Таким образом, DAR, определенный в конечном растворе, соответствует среднему значению DAR. DAR можно рассчитать по развертке спектра SEC-BCMP конъюгата. DAR (BCMP) представляет собой предпочтительно более 0,5, более конкретно от 1 до 10 и даже более конкретно от 2 до 7.

Конъюгат может быть использован в качестве противоопухолевого средства. Благодаря наличию антитела конъюгат получают высокоселективным по отношению к опухолевым клеткам, а не к здоровым клеткам. Это позволяет направлять соединение криптофицина в окружающую среду, сходную с ними или непосредственно в них; (в этом отношении см. следующие публикации, в которых описывается использование конъюгатов моноклональных антител при лечении рака: "Antibody-drug conjugates for cancer

therapy" Carter P.J., et al., Cancer J. 2008, 14, 154-169; "Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs" Chari R., Acc. Chem. Res. 2008, 41, 98-107). Можно лечить твердые или жидкие раковые образования. Конъюгат можно использовать отдельно или в комбинации по меньшей мере с одним другим противоопухолевым средством.

Конъюгат составляют в форме буферного водного раствора при концентрации обычно от 1 до 10 мг/мл. Данный раствор может быть инъецирован в форме перфузии сам по себе или может быть повторно разбавлен с образованием перфузионного раствора.

Примеры

Следующие примеры описывают получение определенных соединений в соответствии с изобретением. Данные примеры не являются ограничивающими и просто иллюстрируют настоящее изобретение.

Используемые аналитические способы.

Высокоэффективная жидкостная хроматография - масс-спектрометрия (ЖХМС).

Способ A1.

Спектры были получены в системе Waters UPLC-SQD в режиме положительного и/или отрицательного электрораспыления (ES $\pm$) с использованием детектирования ELSD и УФ (210-400 нм).

Хроматографические условия были следующими:

колонок: ACQUITY BEH C18-1,7 мкм - 2,1×50 мм;

растворители: А: H₂O (0,1% муравьиная кислота), В: CH₃CN (0,1% муравьиная кислота);

температура колонки: 50°C;

скорость потока: 0,8 мл/мин;

градиент (2,5 мин): от 5 до 100% В через 1,8 мин; 2,4 мин: 100% В; 2,45 мин: от 100 до 5% В через 0,05 мин.

Способ A2.

Спектры были получены в системе Waters Xevo-QToF в режиме положительного электрораспыления (ES+) с использованием детектирования ELSD и УФ (210-400 нм).

Хроматографические условия были следующими:

колонок: ACQUITY BEH C18-1,7 мкм - 2,1×100 мм;

растворители: А: H₂O (0,1% муравьиная кислота), В: CH₃CN (0,1% муравьиная кислота);

температура колонки: 70°C;

скорость потока: 0,55 мл/мин;

градиент (11 мин): от 5 до 97% В через 8,3 мин; 8,6 мин: 97% В; 9 мин: от 97 до 5% В через 0,7 мин и 5% В в течение 2 мин.

Способ A3.

Спектры были получены в системе Waters Xevo-QToF в режиме положительного электрораспыления (ES+).

Хроматографические условия были следующими:

колонок: ACQUITY BEH C18-1,7 мкм - 2,1×100 мм;

растворители: А: H₂O (0,1% муравьиная кислота), В: CH₃CN (0,1% муравьиная кислота);

температура колонки: 45°C;

скорость потока: 0,6 мл/мин;

градиент (5,3 мин): 5% В в течение 0,3 мин; от 5 до 100% В через 3,7 мин; 4,6 мин: 100% В; 5,3 мин 5% В.

Способ A4.

Спектры были получены в системе Waters UPLC-SQD в режиме положительного и/или отрицательного электрораспыления (ES $\pm$) с использованием детектирования ELSD и УФ (210-400 нм).

Хроматографические условия были следующими:

колонок: ACQUITY BEH C18-1,7 мкм - 2,1×50 мм;

растворители: А: H₂O (0,1% муравьиная кислота), В: CH₃CN (0,1% муравьиная кислота);

температура колонки: 45°C;

скорость потока: 0,8 мл/мин;

градиент (10 мин): от 5 до 100% В через 8,6 мин; 9,6 мин: 100% В; 9,8 мин: 5% В.

Способ A5.

Спектры были получены в системе Waters UPLC-SQD в режиме положительного и/или отрицательного электрораспыления (ES $\pm$) с использованием детектирования ELSD и УФ (210-400 нм).

Хроматографические условия были следующими:

колонок: ACQUITY CSH C18-1,7 мкм - 2,1×50 мм;

растворители: А: H₂O (0,1% муравьиная кислота), В: CH₃CN (0,1% муравьиная кислота);

температура колонки: 40°C;

скорость потока: 0,85 мл/мин;

градиент (2,5 мин): от 5 до 100% В через 1,8 мин; 2,4 мин: 100% В; 2,45 мин: от 100 до 5% В через 0,05 мин.

^1H ядерный магнитный резонанс (ЯМР).

Спектры ^1H -ЯМР были получены на спектрометре Bruker Avance или модели DRX-300, или DRX-400, или DRX-500.

Химические сдвиги (δ) приведены в м.д.

Эксклюзионная хроматография - масс-спектрометрия высокого разрешения (SEC-MCBP).

Хроматографический анализ проводили на устройстве Agilent HP1100 и колонке Waters BEH SEC 200 1,7 мкм (2,1×150 мм) при 30°C со скоростью потока 0,5 мл/мин и изократическим элюированием (А) 25 мМ формиата аммония+1% муравьиной кислоты/(В) CH_3CN +0,1% муравьиной кислоты 70/30 в течение 15 мин. Масс-спектрометрию проводили на устройстве Waters QTOF-II с ионизацией электрораспылением в положительном режиме (ES+). Для масс-спектров проводили развертку с помощью программного обеспечения Waters MaxEnt1.

Аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC).

Анализ проводили в системе ВЭЖХ Waters Alliance или системе Hitachi Lachrom, оснащенной детектором на фотодиодной матрице и колонкой Tosoh Bioscience TSKgel G3000 SWXL 5 мкм (7,8×300 мм) со скоростью потока 0,5 мл/мин и изократическим элюированием 30 мин с буфером pH 7, содержащим 0,2М KCl, 0,052М KH_2PO_4 , 0,107М K_2HPO_4 и 20 об.% изопропанола.

Буферы.

Буфер А (pH 6,5): NaCl (50 мМ), фосфат калия (50 мМ), ЭДТА (2 мМ).

Буфер В (pH 6,5): NaCl (140 мМ), фосфат калия и натрия (9,6 мМ).

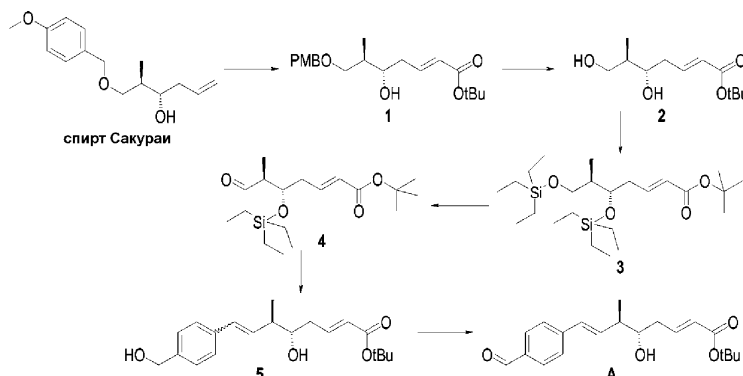
ФСБ (pH 7,4): KH_2PO_4 (1,06 мМ), NaCl (155,17 мМ), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,97 мМ).

DPBS: KCl (2,67 мМ), KH_2PO_4 (1,47 мМ), NaCl (136,9 мМ), Na_2HPO_4 (8,10 мМ) при pH 6,5 с HCl 5N (1 мл на 1000 мл буфера).

Общий способ, используемый для получения конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC).

Раствор антитела в водном буфере, состоящем из смеси буфера А и 1N HEPES 96:4, обрабатывали избытком раствора при приблизительно 10 мМ полезной нагрузки криптофицина в DMA, так что конечная концентрация антитела составляла 3 мг/мл и процент DMA в водном буфере составлял 20%. После перемешивания в течение 2 ч смесь анализировали с помощью SEC-MCBP для определения DAR по популяции мономерных антител. Если DAR находили недостаточным, смесь обрабатывали дополнительным избытком (1-5 экв.) раствора криптофицина в DMA в течение 2 дополнительных часов при КТ при перемешивании. Смесь очищали гель-фильтрацией с использованием матрицы Superdex 200 pg (HiLoad 16/60 или 26/60 колонка для обессоливания, GEHealthcare), предварительно уравновешенной в водном буфере с pH 6,5 (буфер В или DPBS), содержащем от 10 до 20% NMP. Фракции, содержащие мономерное конъюгированное антитело, объединяли и концентрировали на Amicon Ultra-15 (10k или 50k мембрана Ultracel, Millipore) до концентрации от 2 до 5 мг/мл. Затем проводили обмен или разбавление буфера в соответствующем буфере для образования конъюгата в конечном буфере. В случае буферного обмена его осуществляли с помощью гель-фильтрации с использованием матрицы Sephadex™ G25 (NAP-5, NAP-10, NAP-25/PD-10 или HiPrep 26/10 колонки для обессоливания, GEHealthcare), предварительно уравновешенной конечным водным буфером, композиция и pH которого соответствуют каждому конъюгату. Конъюгат окончательно отфильтровывали через фильтрующее устройство Steriflip® (0,22 мкм мембрана ПВДФ Durapore®, Millipore). Конечный конъюгат анализировали с помощью УФ-спектрометрии или SEC-MCBP для измерения концентрации конъюгата с помощью SEC-ВЭЖХ, чтобы определить мономерную чистоту и с помощью SEC-MCBP, чтобы определить DAR из развертки масс-спектра конъюгата.

Синтез фрагмента А: (2Е,5S,6R,7Е)-трет-бутил-8-(4-формилфенил)-5-гидрокси-6-метилокта-2,7-диеноата



Соединение 1: (2Е,5S,6R)-трет-бутил-5-гидрокси-7-((4-метоксибензил)окси)-6-метилгепт-2-еноат.

В атмосфере аргона к раствору (2R,3S)-1-[(4-метоксифенил)метокси]-2-метил-5-гексен-3-ола или спирта Сакураи (номер CAS [203926-55-0], 100 г, 399,5 ммоль) в ДХМ (350 мл) добавляли трет-бутилакрилат (354,7 мл, 2,435 моль) и катализатор Граббса (4,849 г, 2,435 моль). После перемешивания в

течение 17 ч при КТ реакционную смесь отфильтровывали на 230 г диоксида кремния и элюировали смесью гептан/АсОEt (50/50, 6×300 мл). После концентрирования остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на 1,2 кг силикагеля (градиентное элюирование гептан/EtOAc) с получением 140,8 г коричневого масла. Масло растворяли в безводном ДХМ (550 мл), добавляли 10 г смолы quadraPure™ TU для удаления избытка катализатора. Смесь перемешивали в течение 3 ч при 35°C. Смолу отфильтровывали и промывали ДХМ, фильтрат концентрировали и высушивали под вакуумом с получением 135,75 г соединения 1 в виде коричневого масла (97%).

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,85 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,42 (с, 9H); 1,72 (м, 1H); 2,18 (м, 1H); 2,30 (м, 1H); 3,24 (дд, J=7,0 и 9,3 Гц, 1H); 3,46 (дд, J=7,7 и 9,3 Гц, 1H); 3,49 (м, 1H); 3,73 (с, 3H); 4,35 (с, 2H); 4,65 (д, J=5,8 Гц, 1H); 5,76 (тд, J=1,5 и 15,6 Гц, 1H); 6,83 (тд, J=7,4 и 15,6 Гц, 1H); 6,90 (д, J=8,8 Гц, 2H); 7,23 (д, J=8,8 Гц, 2H).

Соединение 2: (2E,5S,6R)-трет-бутил-5,7-дигидрокси-6-метилгепт-2-еноат.

К раствору соединения 1 в CH₃CN (910 мл) добавляли H₂O (90 мл) и смесь охлаждали при 12°C перед добавлением через 25 мин раствора ЦАН (196,7 г, 358,9 ммоль) в H₂O (300 мл). Перемешивание продолжали в течение 1 ч при КТ. Добавляли дополнительное количество ЦАН (18,83 г, 34,36 ммоль), растворенное в смеси CH₃CN (70 мл) и H₂O (30 мл), и перемешивали в течение 1 ч при КТ для завершения реакции. Смесь гасили NaCl до насыщения водн. слоя, затем добавляли МТБЭ (400 мл). После декантации водн. слой экстрагировали МТБЭ (2×80 мл). Объединенные органические слои промывали смесью 3:1 5% NaHCO₃/H₂O (3×200 мл), насыщ. соевым раствором (2×130 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали. Водн. слой подкисляли 2N HCl до pH 4, затем насыщали NaCl и экстрагировали МТБЭ (2×150 мл). Данный второй органический слой промывали 5%-ным раствором NaHCO₃ (60 мл), насыщ. соевым раствором (60 мл), высушивали над MgSO₄, концентрировали и объединяли с первым органическим слоем с получением коричневого оранжевого масла.

Смесь растворяли в MeTГФ (300 мл), затем добавляли 1,2-этандитиол (22 мл, 0,260 моль) и п-TsOH (1,651 г, 8,590 ммоль). После перемешивания при 60°C в течение 5 ч к реакционной смеси добавляли МТБЭ (200 мл) и промывали 5%-ным раствором NaHCO₃ (2×120 мл), насыщ. соевым раствором (120 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 520 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/МТБЭ) с получением 29,48 г соединения 2 в виде желтого масла (75%).

Соединение 3: (2E,5S,6R)-трет-бутил-6-метил-5,7-бис((триэтилсилил)окси)гепт-2-еноат.

В атмосфере аргона к раствору соединения 2 (39,38 г, 0,171 моль) в безводном ДХМ (500 мл) добавляли имидазол (51,540 г, 0,749 моль). Желтую смесь охлаждали при 0°C, затем добавляли триэтилхлорсилан (63,99 мл, 0,374 моль) и раствор оставляли нагреваться до КТ в течение ночи. Реакционную смесь гасили насыщ. NH₄Cl (400 мл), МТБЭ (300 мл) и льдом. pH довели до 4 с помощью 2M NaHSO₄, слои разделяли после интенсивного перемешивания. Водн. слой экстрагировали МТБЭ (200 мл). Объединенные органические слои промывали полунасыщ. NH₄Cl (2×250 мл), фосфатным буфером pH 7 (150 мл), насыщ. соевым раствором (150 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 490 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/Et₂O) с получением 74,52 г соединения 3 в виде бледно-желтого масла (95%).

Соединение 4: (2E,5S,6S)-трет-бутил-6-метил-7-оксо-5-((триэтилсилил)окси)гепт-2-еноат.

В атмосфере аргона к раствору ДМСО (102,400 мл, 1,427 моль) в ДХМ (300 мл) добавляли по каплям при -75°C оксалилхлорид (63 мл, 0,719 моль) через 1 ч и перемешивание продолжали в течение 15 мин перед добавлением при -75°C раствора соединения 3 в ДХМ (150 мл), поддерживая температуру ниже -70°C. Реакционную смесь оставляли нагреваться до -40°C и перемешивание продолжали в течение 2 ч. Реакционную смесь снова охлаждали при -75°C, затем добавляли DIEA (425 мл, 2,432 моль) через 75 мин, поддерживая температуру ниже -65°C. Реакционную смесь оставляли нагреваться до КТ и затем гасили МТБЭ (500 мл), льдом, насыщ. NH₄Cl (200 мл) и 2M NaHSO₄ до достижения pH 4. Слои разделяли после интенсивного перемешивания. Водн. слой экстрагировали МТБЭ (200 мл). Объединенные органические слои промывали NH₄Cl (3×300 мл), фосфатным буфером pH 7 (300 мл), насыщ. соевым раствором (300 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 1,25 кг силикагеля (градиентное элюирование гептан/Et₂O) с получением 51,74 г соединения 4 в виде оранжевого масла (93%).

Соединение 5: (2E,5S,6R,7E)-трет-бутил-5-гидрокси-8-(4-(гидроксиметил)фенил)-6-метилокта-2,7-диеноат.

В атмосфере аргона к суспензии бромид фосфония (синтез, описанный в WO 2011/001052, 147 г, 0,237 моль) в безводном ТГФ (1,5 л) добавляли при -50°C 2,5M раствор n-BuLi в гексане (90 мл, 0,225 моль). Температуру позволяли нагреваться до -40°C и перемешивание продолжали в течение 15 мин. После нагревания до КТ красную смесь перемешивали в течение 1 ч. Реакционную среду охлаждали при -70°C перед добавлением раствора соединения 4 (51,63 г, 126,6 ммоль) в ТГФ (200 мл), поддерживая температуру ниже -65°C. Когда добавление завершали, реакционную смесь оставляли нагреваться до КТ и перемешивание продолжали в течение ночи. Реакционную смесь отфильтровывали для удаления не-

растворимого вещества, которое промывали МТБЭ (500 мл). Фильтрат частично концентрировали при 42°C (1/3), затем гасили льдом, NH_4Cl (500 мл), МТБЭ (500 мл) и 2М NaHSO_4 до достижения pH 4. Слои разделяли и водн. слой экстрагировали МТБЭ (200 мл). Объединенные органические слои промывали полунасыщ. NH_4Cl (250 мл), фосфатным буфером pH 7 (250 мл), насыщ. соевым раствором (250 мл), высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали и полуконцентрировали под вакуумом до 250 мбар. Суспензию разбавляли 50:50 гептан/МТБЭ (600 мл), охлажденной на ледяной бане, отфильтровывали и промывали 50:50 гептан/МТБЭ. Фильтрат концентрировали под вакуумом с получением 100,05 г в виде коричневого масла.

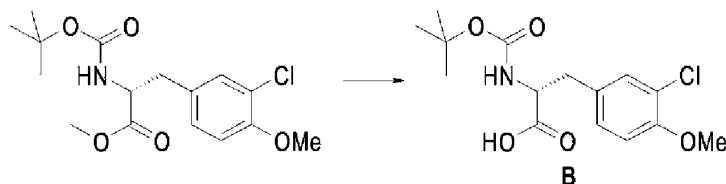
Неочищенное соединение растворяли в безводном ТГФ (320 мл), затем добавляли тригидрат ТВАФ (90 г, 282,40 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч. После концентрирования под вакуумом неочищенный продукт разбавляли 10:1 МТБЭ/ТГФ (770 мл), промывали полунасыщ. NH_4Cl (3×200 мл), 1М NaHSO_4 (200 мл), фосфатным буфером pH 7 (200 мл), насыщ. соевым раствором (200 мл), высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали и концентрировали. Водн. слой экстрагировали МТБЭ. После декантации органический слой промывали фосфатным буфером pH 7 (30 мл), насыщ. соевым раствором (30 мл), высушивали над MgSO_4 и отфильтровывали. После концентрирования объединенные органические слои очищали с помощью флэш-хроматографии на 1,25 кг силикагеля (градиентное элюирование гептан/ Et_2O) с получением 36,91 г соединения 5 в виде коричнево-красного масла (88%).

Фрагмент А: (2E,5S,6R,7E)-трет-бутил-8-(4-формилфенил)-5-гидрокси-6-метилокта-2,7-диеноат.

В атмосфере аргона к раствору соединения 5 (30,3 г, 91,7 ммоль) в безводном ДХМ (600 мл) добавляли при 10°C оксид марганца (175 г, 3,013 моль) и реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при 35°C. Окислитель отфильтровывали через слой целита и промывали теплым ацетоном. Фильтрат концентрировали с получением 30,43 г красно-оранжевого масла.

В атмосфере аргона масло разбавляли бензолом (800 мл) и нагревали с обратным холодильником в присутствии AIBN (880 мг, 4,58 ммоль) и тиофенола (2,81 мл, 27,51 ммоль) в течение 1 ч. Добавляли дополнительное количество AIBN (530 мг, 0,03 экв.) и тиофенола (1,03 мл, 10,087 ммоль) и продолжали нагревать с обратным холодильником в течение дополнительного 1 ч. Добавляли дополнительное количество AIBN (530 мг, 0,03 экв.) и тиофенола (1,03 мл, 10,087 ммоль) и продолжали нагревать с обратным холодильником в течение 3 ч. Добавляли дополнительное количество AIBN (353 мг, 1,834 ммоль) и тиофенола (468 мкл, 4,58 ммоль) и продолжали нагревать с обратным холодильником в течение 1 ч. Превращение E/Z составляло 92/8, добавляли 352,6 мг AIBN и продолжали нагревать с обратным холодильником в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждали до КТ и концентрировали под вакуумом с получением 28,03 г фрагмента А в виде оранжевого масла (92%) с соотношением E/Z выше 98/2.

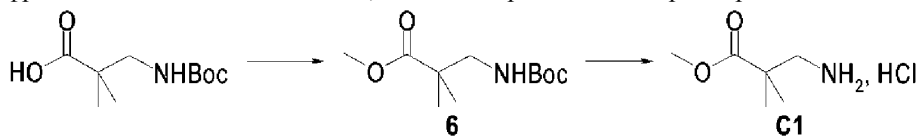
Синтез фрагмента В: (R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропановой кислоты



К раствору метил-(R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропаноата (номер CAS [162465-44-3], 30 г, 87,26 ммоль) в ТГФ (225 мл) добавляли H_2O (30 мл) и моногидрат LiOH (4,4 г, 104,85 ммоль). Реакционную среду перемешивали в течение 2 ч при КТ. По истечении этого времени реакционную среду разбавляли H_2O (200 мл), затем подкисляли при pH 25N HCl (20 мл) и экстрагировали EtOAc (2×250 мл). Объединенные органические фазы промывали H_2O (500 мл), высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали, концентрировали под вакуумом, разбавляли Et_2O и концентрировали под вакуумом с получением 26,9 г фрагмента В в виде белого твердого вещества (94%).

^1H -ЯМР (300 МГц, δ в м.д., DMCO-d_6): 1,21-1,37 (м, 9H); 2,74 (дд, $J=11,0$ и $14,3$ Гц, 1H); 2,96 (дд, $J=5,0$ и $14,3$ Гц, 1H); 3,81 (с, 3H); 4,04 (м, 1H); 6,99-7,09 (м, 2H); 7,18 (дд, $J=2,3$ и $8,7$ Гц, 1H); 7,29 (д, $J=2,3$ Гц, 1H); 12,60 (уш.м, 1H).

Синтез фрагмента C1: метил-3-амино-2,2-диметилпропаноата гидрохлорида



Соединение 6: метил-3-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2,2-диметилпропаноат.

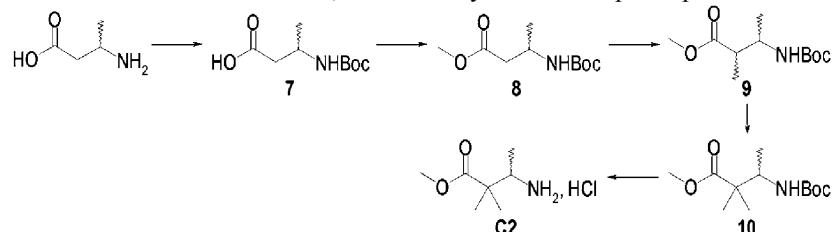
В атмосфере аргона к раствору 3-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2,2-диметилпропановой кислоты (номер CAS [180181-02-6], 250 мг, 1,09 ммоль) в ДХМ (6 мл) и MeOH (2 мл) добавляли по каплям при 0°C (триметилсилил)дiazометан (819,86 мкл, 1,64 ммоль) до желтого стойкого цвета. Затем добавляли AcOH до полного обесцвечивания. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом, затем разбавляли H_2O и дважды экстрагировали ДХМ. Объединенные органические фазы промывали насыщ. соевым

раствором, высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 260 мг соединения 6 в виде бесцветного масла (колич.).

Фрагмент C1: метил-3-амино-2, 2-диметилпропаноата гидрохлорид.

К раствору соединения 6 (260 мг, 1,12 ммоль) в 1,4-диоксане (10 мл) добавляли 4N HCl в 1,4-диоксане (2,81 мл, 11,24 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение ночи, затем концентрировали под вакуумом с получением 200 мг фрагмента C1 (колич.).

Синтез фрагмента C2: метил-3-амино-2,2-диметилбутаноата гидрохлорида



Соединение 7: 3-((трет-бутоксикарбонил)амино)бутановая кислота.

К раствору DL-3-аминомасляной кислоты (номер CAS [541-48-02], 18,72 г, 176,09 ммоль) в H_2O (96 мл) добавляли ди-трет-бутилдикарбонат (39,62 г, 176,09 ммоль) и NaOH (8,03 г, 200,74 ммоль) в H_2O (76 мл), затем трет-бутиловый спирт (132 мл). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение ночи. По истечении этого времени реакционную среду концентрировали под вакуумом, затем разбавляли EtOAc (200 мл) и подкисляли при pH 3 разбавленной HCl. После осаждения водн. фазу экстрагировали EtOAc (200 мл). Объединенные органические фазы высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 34,5 г соединения 7 в виде бесцветного масла (82%).

^1H -ЯМР (300 МГц, δ в м.д., $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$): 1,25 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 1,45 (с, 9H); 2,55 (м, 2H); 4,04 (м, 1H); 4,93 (уш.м, 1H); 8,41 (уш.м, 1H).

Соединение 8: метил-3-((трет-бутоксикарбонил)амино)бутаноат.

В атмосфере аргона раствор соединения 7 (10 г, 49,20 ммоль) в толуоле (350 мл) и MeOH (100 мл) перемешивали при $+5^\circ\text{C}$. Между $+5^\circ\text{C}$ и $+10^\circ\text{C}$ добавляли по каплям (триметилсилил)дiazометан (73,81 мл, 147,61 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 3 ч, затем испаряли под вакуумом с получением 10,8 г соединения 8 в виде бледно-желтого масла (колич.).

^1H -ЯМР (300 МГц, δ в м.д., $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$): 1,20 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 1,45 (с, 9H); 2,50 (м, 2H); 3,69 (с, 3H); 4,03 (м, 1H); 4,90 (уш.м, 1H).

Соединение 9: метил-3-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилбутаноат.

В атмосфере аргона к раствору LDA (2М в ТГФ, 25,32 мл, 50,63 ммоль) в ТГФ (48 мл) при -70°C добавляли по каплям раствор соединения 8 (5 г, 23,01 ммоль) в ТГФ (62 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при -75°C , затем по каплям добавляли иодометан (5,79 мл, 92,05 ммоль) при -70°C . Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при -75°C , затем при КТ в течение ночи. По истечении этого времени добавляли водн. раствор 20% NH_4Cl (100 мл) и Et_2O (125 мл). После осаждения органическую фазу промывали насыщ. NaHCO_3 (80 мл), затем насыщ. NaCl (80 мл). Объединенные водн. фазы экстрагировали Et_2O (125 мл). Объединенные органические фазы высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 5,49 г неочищенного масла. Кристаллизация пентаном (15 мл) обеспечивала 2,65 г соединения 9 после сушки под вакуумом. Раствор пентана концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 100 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/ Et_2O) с получением 1,98 г соединения 9. Две партии объединяли (87%) и использовали как таковые на следующей стадии.

Соединение 10: метил-3-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2,2-диметилбутаноат.

В атмосфере аргона ТГФ (46 мл) охлаждали при -72°C , затем добавляли LDA (2М в ТГФ, 22 мл, 44,0 ммоль) и по каплям добавляли при -72°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) раствор соединения 9 (4,60 г, 19,89 ммоль) в ТГФ (64 мл). Реакционную смесь перемешивали 1 ч 15 при -75°C , затем по каплям добавляли иодометан (5 мл, 79,55 ммоль) при -72°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Реакционную среду перемешивали в течение 3 ч при -75°C , затем в течение ночи при КТ. По истечении этого времени добавляли водн. раствор 20% NH_4Cl (50 мл) и Et_2O (80 мл). После осаждения органическую фазу промывали насыщ. NaHCO_3 (50 мл) и насыщ. соевым раствором (50 мл). Объединенные водн. фазы экстрагировали Et_2O (80 мл). Объединенные органические фазы высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 6,5 г неочищенного масла, которое очищали с помощью флэш-хроматографии на 200 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/ $i\text{Pr}_2\text{O}$) с получением 1,9 г соединения 10 в виде бесцветного масла (39%).

^1H -ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMCO-d_6): 0,92 (д, $J=7,1$ Гц, 3H); 1,02 (с, 3H); 1,04 (с, 3H); 1,48 (с, 9H); 3,58 (с, 3H); 3,88 (м, 1H); 6,62 (уш.д, $J=10,5$ Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES $m/z=146$, $m/z=246$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; $t_R=1,2$ мин.

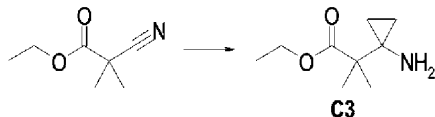
Фрагмент C2: метил-3-амино-2,2-диметилбутаноата гидрохлорид.

В круглодонную колбу при магнитном перемешивании вводили соединение 10 (0,3 г, 1,22 ммоль) с

последующим добавлением 1,4-диоксана (5 мл) и 4N HCl в 1,4-диоксане (5 мл). Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение ночи, затем концентрировали под вакуумом. Полученное неочищенное твердое вещество осаждали в $i\text{Pr}_2\text{O}$ (15 мл), отфильтровывали и высушивали с получением 210 мг фрагмента C2 в виде белого твердого вещества (95%).

ЖХМС (A1): ES $m/z=146$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; $t_R=0,8$ мин.

Синтез фрагмента C3: этил-2-(1-аминоциклопропил)-2,2-диметилпропаноата

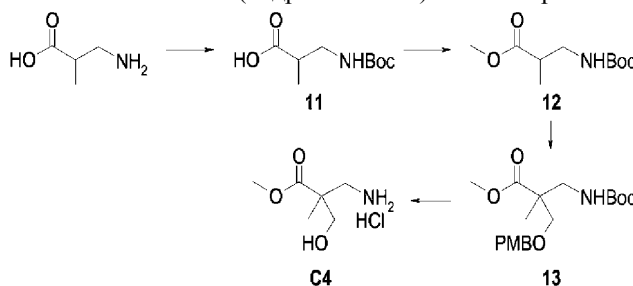


В атмосфере аргона к раствору этил-2-циано-2-метилпропионата (номер CAS [1572-98-1], 2 г, 13,88 ммоль) в Et_2O (48 мл) добавляли изопропоксид титана(IV) (4,63 г, 15,97 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 10 мин при КТ, затем охлаждали при -5°C . Раствор этилмагнийбромида 3М в Et_2O (9,72 мл, 29,16 ммоль) добавляли по каплям при $(-5)-0^\circ\text{C}$ через 25 мин, затем реакционную смесь перемешивали 40 мин без охлаждающей бани. В это время ТСХ показала, что реакция была завершена. Реакционную среду охлаждали при 0°C и добавляли по каплям при 0°C диэтилэфират трифторида бора (3М в Et_2O , 3,6 мл, 29,16 ммоль).

Реакционную смесь перемешивали 30 мин без охлаждающей бани. По истечении этого времени 1N HCl добавляли при 0°C до pH 1-2 (8 мл), затем 2N NaOH до pH 8 (28 мл), реакционную смесь экстрагировали EtOAc (3×150 мл). Объединенные органические фазы высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 2,4 г неочищенного желтого масла, которое очищали с помощью флэш-хроматографии на 70 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 915 мг фрагмента C3 в виде бледно-желтого масла (39%).

^1H -ЯМР (400 МГц, δ в м.д., $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$): 0,52 (м, 2H); 0,70 (м, 2H); 1,11 (с, 6H); 1,27 (т, $J=7,2$ Гц, 3H); 1,64 (уш.с, 2H); 4,18 (к, $J=7,2$ Гц, 2H).

Синтез фрагмента C4: метил-3-амино-2-(гидроксиметил)-2-метилпропаноата гидрохлорида



Соединение 11: 3-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпропановая кислота.

К раствору DL-3-аминоизомасляной кислоты (номер CAS [10569-72-9], 5 г, 47,52 ммоль) в 2N NaOH (24,7 мл) добавляли по каплям раствор Boc_2O (11,73 г, 53,22 ммоль) в ТГФ (75 мл), поддерживая температуру реакционной среды ниже 30°C с помощью холодной водяной бани. Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 18 ч, затем концентрировали под вакуумом, разбавляли в H_2O (75 мл) и промывали МТБЭ (3×150 мл). Водную фазу подкисляли до pH 3 с помощью добавления лимонной кислоты при 100 г/л (150 мл) и экстрагировали EtOAc (3×150 мл). Объединенные органические фазы промывали H_2O (3×45 мл), высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 9,4 г соединения 11 в виде бесцветного масла (97%).

^1H -ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d_6): 1,01 (д, $J=7,1$ Гц, 3H); 1,38 (с, 9H); 2,48 (м, 1H); 2,91 (дт, $J=6,1$, 6,5 и 13,5 Гц, 1H); 3,15 (ддд, $J=6,1$, 7,4 и 13,5 Гц, 1H); 6,80 (т, $J=6,1$ Гц, 1H); 12,15 (уш.с, 1H).

Соединение 12: метил-3-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-метилпропаноат.

К раствору соединения 11 (9,4 г, 46,25 ммоль) в ацетоне (300 мл) добавляли K_2CO_3 (16,14 г, 115,63 ммоль) и CH_3I (13,26 г, 92,5 ммоль). Реакционную среду, желтую суспензию, перемешивали при КТ в течение 20 ч, затем отфильтровывали через Celacel. Полученный таким образом осадок промывали ацетоном, фильтрат концентрировали под вакуумом, разбавляли ДХМ (100 мл), отфильтровывали через Celacel, полученный таким образом осадок промывали ДХМ и фильтрат концентрировали под вакуумом с получением 9,4 г соединения 12 в виде желтой жидкости (93%).

^1H -ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d_6): 1,01 (д, $J=7,1$ Гц, 3H); 1,37 (с, 9H); 2,54 (м, 1H); 2,91 (дт, $J=6,2$ и 13,5 Гц, 1H); 3,15 (ддд, $J=6,2$, 6,9 и 13,5 Гц, 1H); 3,59 (с, 3H); 6,90 (т, $J=6,2$ Гц, 1H).

Соединение 13: метил-3-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-(((4-метоксибензил)окси)метил)-2-метилпропаноат.

К раствору DIEA (3,2 мл, 22,45 ммоль) в ТГФ (10 мл), охлажденном при -75°C , по каплям добавляли раствор 1,6M $n\text{-BuLi}$ в ТГФ (14 мл, 22,4 ммоль). Реакционную среду перемешивали при -75°C в течение 20 мин; затем добавляли по каплям при -75°C раствор соединения 12 (2 г, 9,21 ммоль) в ТГФ (16 мл) и реакционную смесь перемешивали при -75°C в течение 10 мин. Затем к реакционной смеси быстро до-

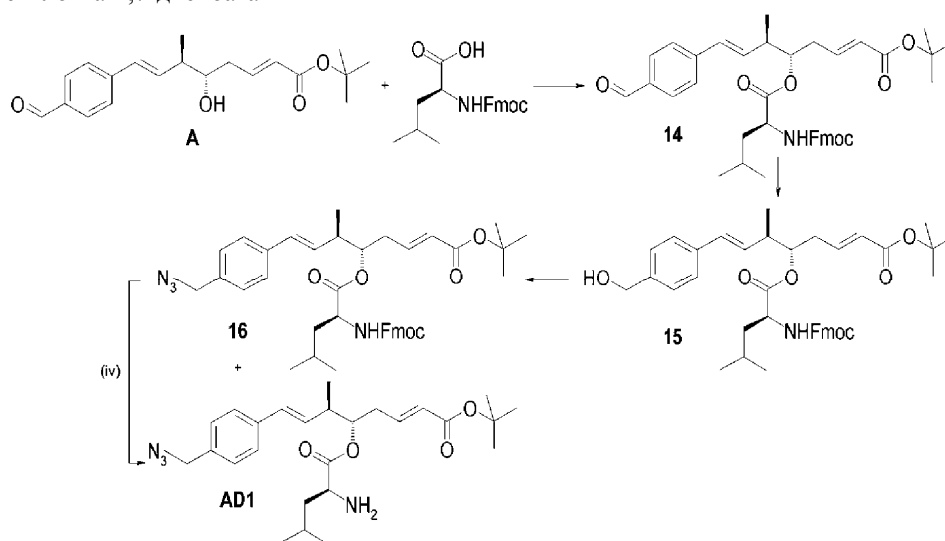
бавляли раствор 1-((хлорметокси)метил)-4-метоксибензола (1,72 г, 9,21 ммоль) в ТГФ (16 мл) и перемешивание продолжали при -25°C в течение 4 ч. Реакционную среду разбавляли ДХМ (100 мл) перед добавлением раствора лимонной кислоты при 100 г/л (50 мл), поддерживая температуру ниже 5°C. Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 15 мин. Органическую фазу промывали раствором лимонной кислоты при 100 г/л (2×50 мл), H₂O (3×50 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 4,08 г желто-оранжевого масла, которое очищали с помощью флэш-хроматографии на 150 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/EtOAc) с получением 2,05 г соединения 13 в виде бесцветного масла (60%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 1,03 (с, 3H); 1,37 (с, 9H); 3,14 (д, J=6,8 Гц, 2H); 3,31 (д, J=9,1 Гц, 1H); 3,48 (д, J=9,1 Гц, 1H); 3,58 (с, 3H); 3,73 (с, 3H); 4,38 (с, 2H); 6,76 (т, J=7,1 Гц, 1H); 6,90 (д, J=8,9 Гц, 2H); 7,20 (м, 2H).

Фрагмент С4: метил-3-амино-2-(гидроксиметил)-2-метилпропаноата гидрохлорид.

Соединение 13 (1,5 г, 4,08 ммоль) обрабатывали 4М раствором HCl в диоксане (24 мл) при КТ в течение 1 ч. Реакционную среду затем концентрировали под вакуумом и совместно испаряли в присутствии толуола с получением 794 мг фрагмента С4 в виде вязкого масла (колич.).

Синтез AD1: (2E,5S,6R,7E)-трет-бутил-5-(((S)-2-амино-4-метилпентаноил)окси)-8-(4-(азидометил)фенил)-6-метилокта-2,7-диеноата



Соединение 14: (2E,5S,6R,7E)-трет-бутил-5-(((S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-4-метилпентаноил)окси)-8-(4-формилфенил)-6-метилокта-2,7-диеноат.

В атмосфере аргона в круглодонной колбе при магнитном перемешивании вводили Fmoc-Leu-OH (4,9 г, 13,86 ммоль) с последующим добавлением фрагмента А (3,5 г, 10,59 ммоль) в ДХМ (100 мл) и DIEA (6,6 мл, 38,13 ммоль). Затем добавляли MNBA (5 г, 14,52 ммоль) и ДМАП (620 мг, 5,07 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение ночи при КТ. По истечении этого времени реакционную среду промывали H₂O (100 мл) и насыщ. соевым раствором (100 мл). Органическую фазу высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 9,1 г неочищенного оранжевого масла, которое очищали с помощью флэш-хроматографии на 400 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/AcOEt) с получением 5 г соединения 14 в виде бледно-желтого масла (71%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,77 (д, J=6,8 Гц, 6H); 1,05 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,33-1,64 (м, 4H); 1,38 (с, 9H); 2,39-2,63 (частично скрытый м, 2H); 4,01 (м, 1H); 4,13-4,31 (м, 3H); 4,95 (м, 1H); 5,81 (д, J=15,9 Гц, 1H); 6,37 (дд, J=8,8 и 16,2 Гц, 1H); 6,52 (д, J=16,2 Гц, 1H); 6,70 (тд, J=7,3 и 15,9 Гц, 1H); 7,29 (т, J=7,9 Гц, 2H); 7,40 (т, J=7,9 Гц, 2H); 7,56 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,67 (дд, J=7,9 Гц, 2H); 7,74-7,82 (м, 3H); 7,87 (д, J=7,9 Гц, 2H); 9,93 (с, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=666 [M+H]⁺, m/z=689 [M+Na]⁺; t_R=1,92 мин.

Соединение 15: (2E,5S,6R,7E)-трет-бутил-5-(((S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-4-метилпентаноил)окси)-8-(4-(гидроксиметил)фенил)-6-метилокта-2,7-диеноат.

В атмосфере аргона к раствору соединения 14 (5 г, 7,51 ммоль) в MeTГФ (60 мл) порциями добавляли триметоксиборгидрид натрия (1,2 г, 8,91 ммоль). Реакционную среду перемешивали в течение 5 ч при КТ. По истечении этого времени добавляли насыщ. NH₄Cl (100 мл) и ацетон (20 мл). Реакционную среду перемешивали в течение 1 ч при КТ. После осаждения органическую фазу промывали H₂O, затем насыщ. соевым раствором (50 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 5,3 г неочищенного желтого масла, которое очищали с помощью флэш-хроматографии на 300 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/AcOEt) с получением 3,15 г соединения 15 в виде белого полутвердого вещества (63%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,80 (м, 6H); 1,02 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,35-1,66 (м, 4H); 1,38 (с, 9H); 2,35-2,56 (частично скрытый м, 2H); 4,02 (м, 1H); 4,15-4,32 (м, 3H); 4,43 (д, J=5,5 Гц, 2H); 4,92 (м,

1H); 5,12 (т, J=5,5 Гц, 1H); 5,80 (д, J=15,9 Гц, 1H); 6,10 (дд, J=8,8 и 16,2 Гц, 1H); 6,39 (д, J=16,2 Гц, 1H); 6,69 (м, 1H); 7,20 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,28-7,33 (м, 4H); 7,41 (т, J=7,9 Гц, 2H); 7,69 (т, J=7,9 Гц, 2H); 7,80 (д, J=8,2 Гц, 1H); 7,88 (д, J=7,9 Гц, 2H). ЖХМС (A1): ES m/z =668 $[M+H]^+$; m/z =690 $[M+Na]^+$; m/z =712 $[M+HCO_2H]^+$; t_R =1,84 мин.

Соединение 16: (2E,5S,6R,7E)-трет-бутил-5-(((S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-4-метилпентаноил)окси)-8-(4-(азидометил)фенил)-6-метилокта-2,7-диеноат.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу вводили соединение 15 (3,15 г, 4,72 ммоль) и ДХМ (50 мл). При 0°C добавляли ТЭА (987 мкл, 7,08 ммоль) с последующим добавлением метансульфонилхлорида (438 мкл, 5,66 ммоль), реакционную среду перемешивали в течение 1 ч при 0°C и 13 ч при КТ. По истечении этого времени добавляли ДХМ (50 мл) и воду (50 мл). После осаждения органическую фазу промывали насыщ. соевым раствором (3×25 мл), высушивали над $MgSO_4$ и концентрировали под вакуумом. В атмосфере аргона полученный таким образом неочищенный продукт растворяли в ДМФ (50 мл) и добавляли азид натрия (644 мг, 9,91 ммоль). Реакционную среду перемешивали в течение ночи при КТ. По истечении этого времени ДМФ концентрировали под вакуумом и добавляли $AcOEt$. Полученную смесь промывали 0,1N HCl (25 мл), насыщ. $NaHCO_3$ (25 мл) и насыщ. соевым раствором (25 мл), высушивали над $MgSO_4$, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 3,3 г неочищенного продукта, который очищали с помощью флэш-хроматографии на 200 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/ $AcOEt$) с получением 1,8 г соединения 16 в виде бесцветной смолы (55%) и 740 мг соединения AD1 (33%).

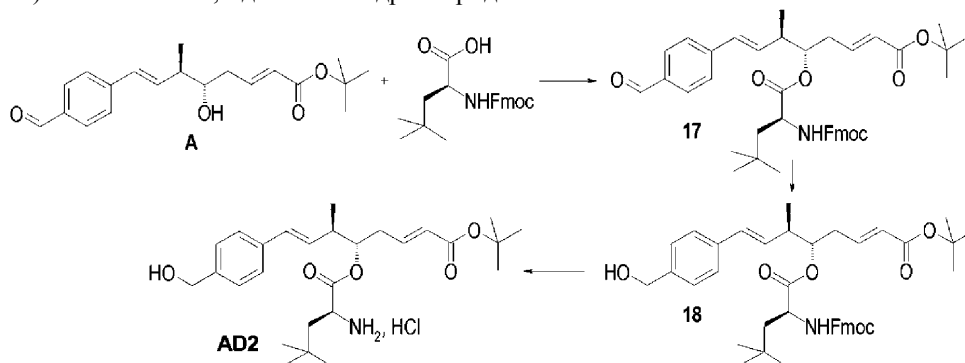
ЖХМС (A2): ES m/z =715 $[M+Na]^+$; t_R =8,95 мин.

Соединение AD1: (2E,5S,6R,7E)-трет-бутил-5-(((S)-2-амино-4-метилпентаноил)окси)-8-(4-(азидометил)фенил)-6-метилокта-2,7-диеноат.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу при магнитном перемешивании вводили соединение 16 (1,8 г, 2,6 ммоль) и ДХМ (50 мл) с последующим добавлением пиперидина (1,6 мл, 16,2 ммоль). Реакционную среду перемешивали в течение ночи при КТ. По истечении этого времени ее промывали 1N HCl , затем насыщ. $NaHCO_3$, насыщ. соевым раствором, высушивали над $MgSO_4$, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 2 г неочищенного продукта, который очищали с помощью флэш-хроматографии на 130 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/ $AcOEt$) с получением 1,48 г соединения AD1 в виде бледно-желтого масла (колич.).

ЖХМС (A3): ES m/z =471 $[M+H]^+$; t_R =2,65 мин.

Синтез AD2: (2E,5S,6R,7E)-трет-бутил-5-(((S)-2-амино-4,4-диметилпентаноил)окси)-8-(4-(гидроксиметил)фенил)-6-метилокта-2,7-диеноата гидрохлорида



Соединение 17: (2E,5S,6R,7E)-трет-бутил-5-(((S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-4,4-диметилпентаноил)окси)-8-(4-формилфенил)-6-метилокта-2,7-диеноат.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору соединения А (1,633 г, 4,94 ммоль) в ДХМ (60 мл) добавляли L-Fmoc-трет-Leu-OH (1,82 г, 4,94 ммоль), DIEA (2,57 мл, 14,83 ммоль), MNBA (1,70 г, 4,94 ммоль) и ДМАП (241,51 мг, 1,98 ммоль). После перемешивания в течение 2 ч при КТ реакционную среду разбавляли H_2O (50 мл) и дважды экстрагировали ДХМ. Объединенные органические фазы промывали лимонной кислотой (2×50 мл), насыщ. $NaHCO_3$ (50 мл) и насыщ. соевым раствором (50 мл), высушивали над $MgSO_4$, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 3,24 г неочищенного соединения 17, используемого непосредственно в последующем восстановлении (96%).

Соединение 18: (2E,5S,6R,7E)-трет-бутил-5-(((S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-4,4-диметилпентаноил)окси)-8-(4-(гидроксиметил)фенил)-6-метилокта-2,7-диеноат.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору соединения 17 (3,24 г, 4,77 ммоль) в MeTГФ (60 мл) добавляли триметоксиборгидрид натрия (670,56 мг, 5,24 ммоль) при 0°C. После перемешивания в течение 1 ч при КТ добавляли дополнительное количество триметоксиборгидрида натрия (304 мг, 2,38 ммоль) и перемешивали в течение 2 ч. Затем реакционную среду охлаждали при 0°C, разбавляли ацетоном (18 мл) и насыщ. NH_4Cl (36 мл) и экстрагировали $AcOEt$. Объединенные органические фазы промывали насыщ. соевым раствором, высушивали над $MgSO_4$, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 100 г силикагеля (градиент гептан/ $AcOEt$) с по-

лучением 2,61 г соединения 18 в виде бесцветного аморфного твердого вещества (80%).

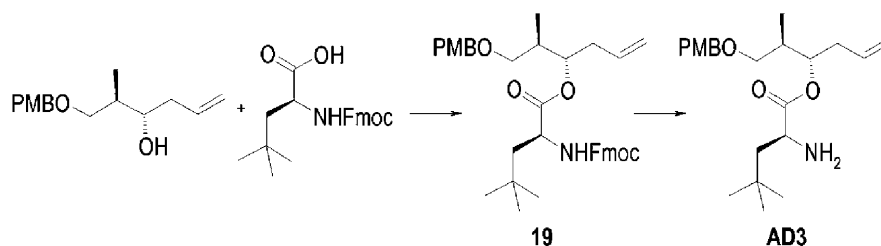
¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,80 (с, 9H); 1,02 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,35-1,60 (м, 4H); 1,38 (с, 9H); 2,37-2,58 (частично скрытый м, 2H); 4,04 (м, 1H); 4,16-4,33 (м, 3H); 4,45 (д, J=5,7 Гц, 2H); 4,91 (м, 1H); 5,12 (т, J=5,7 Гц, 1H); 5,80 (д, J=16,0 Гц, 1H); 6,10 (дд, J=8,8 и 16,2 Гц, 1H); 6,39 (д, J=16,2 Гц, 1H); 6,69 (м, 1H); 7,21 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,25-7,33 (м, 4H); 7,40 (т, J=7,9 Гц, 2H); 7,68 (т, J=7,9 Гц, 2H); 7,78 (д, J=8,3 Гц, 1H); 7,88 (д, J=7,9 Гц, 2H). ЖХМС (A1): ES m/z=608; m/z=682 [M+H]⁺; m/z=726 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=1,85 мин.

Соединение AD2: (2E,5S,6R,7E)-трет-бутил-5-(((S)-2-амино-4,4-диметилпентаноил)окси)-8-(4-(гидроксиметил)фенил)-6-метилокта-2,7-диеноата гидрохлорид.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору соединения 18 (2,61 г, 3,83 ммоль) в ДХМ (40 мл) добавляли пиперидин (7,60 мл, 76,56 ммоль) и реакционную среду перемешивали в течение 1 ч при КТ. Затем ее концентрировали и экстрагировали AcOEt. Объединенные органические слои промывали 1N HCl, H₂O и насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом. Остаток разбавляли iPr₂O (50 мл) и перемешивали в течение 40 ч при КТ. Неочищенный продукт отфильтровывали, промывали iPr₂O и высушивали под вакуумом в течение 3 ч при 40°C с получением 1,706 г соединения AD2 в виде бесцветного аморфного твердого вещества (90%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,88 (с, 9H); 1,10 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,39-1,49 (м, 1H); 1,42 (с, 9H); 1,75 (дд, J=6,1 и 15,1 Гц, 1H); 2,47-2,64 (частично скрытый м, 2H); 3,92 (т, J=5,5 Гц, 1H); 4,47 (д, J=5,7 Гц, 2H); 5,02 (м, 1H); 5,15 (т, J=5,7 Гц, 1H); 5,90 (д, J=15,9 Гц, 1H); 6,15 (дд, J=8,3 и 16,1 Гц, 1H); 6,44 (д, J=16,1 Гц, 1H); 6,77 (тд, J=7,3 и 15,9 Гц, 1H); 7,26 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,34 (д, J=8,4 Гц, 2H); 8,10 (уш.м, 3H). ЖХМС (A1): ES m/z=460 [M+H]⁺; t_R=0,95 мин.

Синтез AD3: (2R,3S)-1-((4-метоксибензил)окси)-2-метилгекс-5-ен-3-ил-(S)-2-амино-4,4-диметилпентаноата



Соединение 19: (2R,3S)-1-((4-метоксибензил)окси)-2-метилгекс-5-ен-3-ил-(S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-4,4-диметилпентаноат.

К раствору спирта Сакураи (1,02 г, 4,08 ммоль) и (S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-4,4-диметилпентановой кислоты (1,5 г, 4,08 ммоль) в ТГФ (15 мл) добавляли 2,4,6-трихлорбензоилхлорид (1,02 г, 4,08 ммоль), по каплям ТЭА (1,14 мл, 8,16 ммоль) и ДМАП (126,0 мг, 1,02 ммоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 5 ч, затем охлаждали, используя ледяную баню, перед добавлением 1N HCl (60 мл), поддерживая температуру ниже 10°C. Полученную среду перемешивали при КТ в течение 15 мин и экстрагировали EtOAc (3×50 мл). Объединенные органические фазы промывали насыщ. NaHCO₃ (15 мл), насыщ. соевым раствором (3×15 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью трех последовательных флэш-хроматографий на силикагеле (150 г, градиентное элюирование гептан/EtOAc, 150 г и 20 г, градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 1,78 г соединения 19 в виде бесцветного масла (72%).

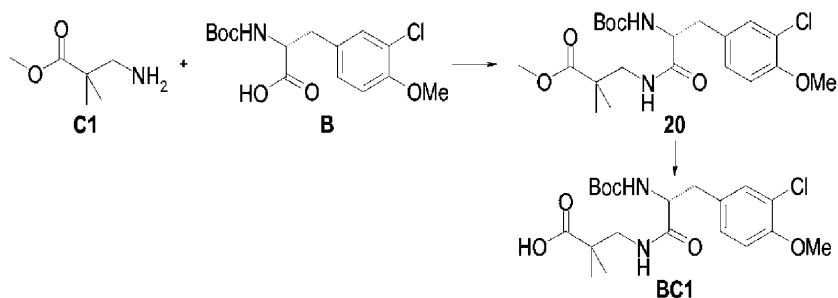
¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,85 (д, J=7,1 Гц, 3H); 0,89 (с, 9H); 1,51 (дд, J=2,8 и 14,3 Гц, 1H); 1,61 (дд, J=9,0 и 14,3 Гц, 1H); 1,95 (м, 1H); 2,21 (м, 1H); 2,31 (м, 1H); 3,20 (дд, J=6,5 и 9,6 Гц, 1H); 3,35 (м, 1H); 3,73 (с, 3H); 4,04 (м, 1H); 4,18-4,34 (м, 5H); 4,83 (м, 1H); 5,00 (дк, J=2,1 и 10,3 Гц, 1H); 5,05 (дк, J=2,1 и 7,3 Гц, 1H); 5,70 (м, 1H); 6,87 (д, J=8,7 Гц, 2H); 7,17 (д, J=8,7 Гц, 2H); 7,30 (м, 2H); 7,41 (т, J=7,8 Гц, 2H); 7,70 (д, J=7,8 Гц, 2H); 7,75 (д, J=8,3 Гц, 1H); 7,90 (д, J=7,8 Гц, 2H). ЖХМС (A5): ES m/z=600 [M+H]⁺; m/z=617 [M+H+NH₃]⁺; m/z=644 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=1,86 мин.

Соединение AD3: (2R,3S)-1-((4-метоксибензил)окси)-2-метилгекс-5-ен-3-ил-(S)-2-амино-4,4-диметилпентаноат.

К раствору соединения 19 (1,78 г, 2,98 ммоль) в ДХМ (63 мл) добавляли по каплям пиперидин (1,77 мл, 17,9 ммоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 4 ч, разбавляли ДХМ (150 мл), промывали 1N HCl (2×20 мл), насыщ. NaHCO₃ (20 мл), насыщ. соевым раствором (3×20 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 50 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/EtOAc) с получением 644 мг соединения AD3 в виде бесцветного масла (57%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,88 (с, 9H); 0,89 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,21 (дд, J=6,9 и 13,9 Гц, 1H); 1,56 (дд, J=5,0 и 13,9 Гц, 1H); 1,66 (уш.с, 2H); 2,00 (м, 1H); 2,24 (м, 1H); 2,33 (м, 1H); 3,26 (м, 2H); 3,38 (дд, J=5,5 и 9,4 Гц, 1H); 3,74 (с, 3H); 4,36 (с, 2H); 4,84 (м, 1H); 5,00-5,10 (м, 2H); 5,72 (м, 1H); 6,89 (д, J=8,8 Гц, 2H); 7,22 (д, J=8,8 Гц, 2H). ЖХМС (A5): ES m/z=378 [M+H]⁺; t_R=0,88 мин.

Синтез BC1: 3-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилпропановой кислоты



Соединение 20: метил-3-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилпропаноат.

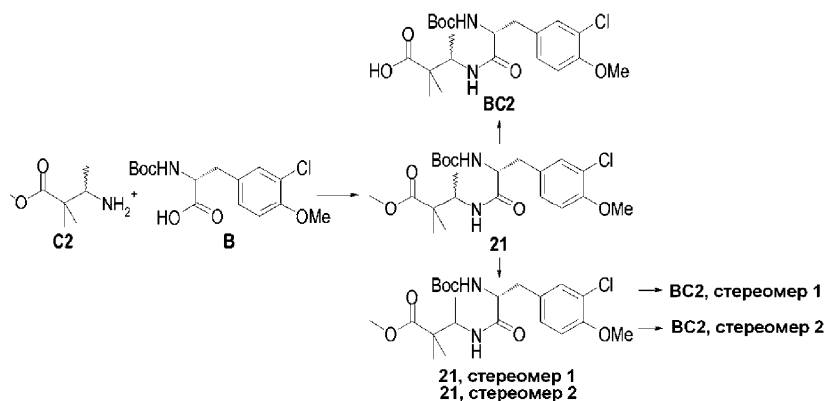
В атмосфере аргона в круглодонную колбу вводили фрагмент C1 (981,45 мг, 4,00 ммоль) и ДХМ (50 мл) с последующим добавлением DIEA (1,84 мл, 10,92 ммоль), фрагмента В (1,2 г, 3,64 ммоль), НОВт (563,40 мг, 4,00 ммоль) и EDC (1,45 мл, 8,01 ммоль). Реакционную среду перемешивали в течение ночи при КТ. По истечении этого времени реакционную среду разбавляли H₂O (30 мл) и дважды экстрагировали ДХМ. Объединенные органические фазы промывали насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 2,5 г неочищенного масла, которое очищали с помощью флэш-хроматографии на 110 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/АсОEt) с получением 1,06 г соединения 20 в виде белого безе (66%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 1,06 (с, 3H); 1,07 (с, 3H); 1,30 (с, 9H); 2,65 (дд, J=11,6 и 13,9 Гц, 1H); 2,82 (дд, J=4,0 и 13,9 Гц, 1H); 3,18 (дд, J=6,1 и 13,4 Гц, 1H); 3,29 (частично скрытый м, 1H); 3,60 (с, 3H); 3,81 (с, 3H); 4,11 (м, 1H); 6,90 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,04 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,19 (дд, J=2,3 и 8,6 Гц, 1H); 7,33 (уш.с, 1H); 7,75 (большой т, J=6,1 Гц, 1H).

Соединение BC1: 3-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилпропановая кислота.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу вводили соединение 20 (1,06 г, 2,39 ммоль) и ТГФ (25 мл) с последующим добавлением LiOH (70,18 мг, 2,87 ммоль) и H₂O (1 мл). Реакционную среду перемешивали в течение нескольких часов перед добавлением 70 мг LiOH и перемешивали в течение ночи при КТ. По истечении этого времени добавляли смолу Amberlit до pH 4, отфильтровывали, затем промывали ТГФ и концентрировали под вакуумом с получением 1 г соединения BC1 в виде белого твердого вещества (97%).

Синтез BC2: 3-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилбутановой кислоты



Соединение 21: метил-3-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилбутаноат.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу вводили фрагмент В (1,02 г, 2,78 ммоль) и ДХМ (25 мл) с последующим добавлением EDC (592 мг, 3,03 ммоль) и НОВт (478 мг, 3,03 ммоль). Реакционную среду перемешивали 15 мин, затем добавляли фрагмент C2 (0,5 г, 2,75 ммоль) и DIEA (1,7 мл, 9,73 ммоль). Реакционную среду перемешивали в течение ночи при КТ. По истечении этого времени реакционную среду концентрировали под вакуумом, затем разбавляли АсОEt. Органический слой промывали насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 1,45 г неочищенного масла, которое очищали с помощью флэш-хроматографии на 100 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/АсОEt) с получением 845 мг соединения 21 в виде белой пены (67%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): смесь диастереомеров 50:50; 0,87 (д, J=6,8 Гц, 1,5H); 0,97 (д, J=6,8 Гц, 1,5H); 1,01 (с, 1,5H); 1,03 (с, 1,5H); 1,07 (с, 3H); 1,31 (с, 9H); 2,58-2,87 (м, 2H); 3,59 (с, 1,5H); 3,60

(с, 1,5H); 3,81 (с, 3H); 3,99-4,20 (м, 2H); 6,90 (д, J=9,0 Гц, 0,5H); 6,97 (д, J=9,0 Гц, 0,5H); 7,05 (уш.д, J=8,6 Гц, 1H); 7,19 (расщепл. дд, J=2,4 и 8,6 Гц, 1H); 7,32 (д, J=2,4 Гц, 0,5H); 7,34 (д, J=2,4 Гц, 0,5H); 7,54 (д, J=10,1 Гц, 0,5H); 7,62 (д, J=10,1 Гц, 0,5H). ЖХМС (A3): смесь диастереомеров 50:50; ES m/z=457 [M+H]⁺; m/z=479 [M+Na]⁺; t_R=3,19-3,2 мин.

Соединение 21 стереоизомеры 1 и 2: метил-3-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилбутаноат стереоизомеры 1 и 2.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору фрагмента В (1,17 г, 3,55 ммоль) в ДХМ (30 мл) добавляли EDC (741,75 мг, 3,87 ммоль), НОВт (592,57 мг, 3,87 ммоль). После перемешивания в течение 15 мин при КТ добавляли фрагмент С2 (639 мг, 3,52 ммоль) и DIEA (2,17 мл, 12,31 ммоль). Реакционную среду перемешивали в течение 4 ч, затем концентрировали и разбавляли АсОEt (100 мл). Органические слои промывали Н₂О (2×10 мл) и насыщ. соевым раствором (2×10 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом. Неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии на 50 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/АсОEt) с получением 1,306 г смеси диастереомеров (81%), которые разделяли двумя последовательными флэш-хроматографиями, первая на 100 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/МеОН) с получением 376 мг соединения 21 стереоизомера 1 (23%), вторая на 70 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/МеОН) с получением 181 мг соединения 21 стереоизомера 1 (11%), 279 мг соединения 21 стереоизомера 2 (17%) и 476 мг смеси диастереомеров.

Соединение 21 стереоизомер 1

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,85 (д, J=6,8 Гц, 3H); 1,07 (с, 6H); 1,31 (с, 9H); 2,57 (м, 1H); 2,80 (дд, J=5,2 и 13,8 Гц, 1H); 3,60 (с, 3H); 3,81 (с, 3H); 4,05 (м, 1H); 4,16 (м, 1H); 6,99 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,05 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,20 (дд, J=2,0 и 8,6 Гц, 1H); 7,34 (д, J=2,0 Гц, 1H); 7,57 (д, J=10,1 Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=381; m/z=401; m/z=455 [M-H]⁻; m/z=457 [M+H]⁺; t_R=1,29 мин.

Соединение 21 стереоизомер 2

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,95 (д, J=6,8 Гц, 3H); 1,00 (с, 3H); 1,03 (с, 3H); 1,31 (с, 9H); 2,55 (м, 1H); 2,80 (дд, J=5,0 и 14,3 Гц, 1H); 3,59 (с, 3H); 3,81 (с, 3H); 4,09-4,22 (м, 2H); 6,92 (д, J=8,8 Гц, 1H); 7,05 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,20 (дд, J=2,0 и 8,6 Гц, 1H); 7,34 (д, J=2,0 Гц, 1H); 7,64 (д, J=10,1 Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=381; m/z=401; m/z=455 [M-H]⁻; m/z=457 [M+H]⁺; t_R=1,29 мин.

Соединение BC2: 3-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилбутановая кислота.

Соединение 21 (0,845 г, 1,85 ммоль) и МеОН (20 мл) вводили в круглодонную колбу с последующим добавлением 1,8 мл 10М NaOH. Раствор перемешивали и нагревали при 50°C в течение ночи. Реакционную среду испаряли под вакуумом, затем разбавляли Н₂О (20 мл) и нейтрализовали 5N HCl. Раствор дважды экстрагировали АсОEt. Объединенные органические слои промывали насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 800 мг соединения BC2 в виде белой пены (97%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): смесь диастереомеров 50:50; 0,91 (д, J=6,8 Гц, 1,5H); 0,97 (д, J=6,8 Гц, 1,5H); 1,00 (с, 3H); 1,03 (с, 1,5H); 1,07 (с, 1,5H); 1,31 (с, 9H); 2,57 (м, 1H); 2,83 (м, 1H); 3,81 (с, 3H); 4,01-4,16 (м, 2H); 6,90 (д, J=9,0 Гц, 0,5H); 6,95 (д, J=9,0 Гц, 0,5H); 7,03 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,20 (уш., J=8,6 Гц, 1H); 7,31 (уш.с, 1H); 7,49 (д, J=10,1 Гц, 0,5H); 7,54 (д, J=10,1 Гц, 0,5H); 11,94 (уш.м, 1H). ЖХМС (A1): смесь диастереомеров 50:50; ES m/z=387; m/z=443 [M+H]⁺; t_R=1,20-1,21 мин.

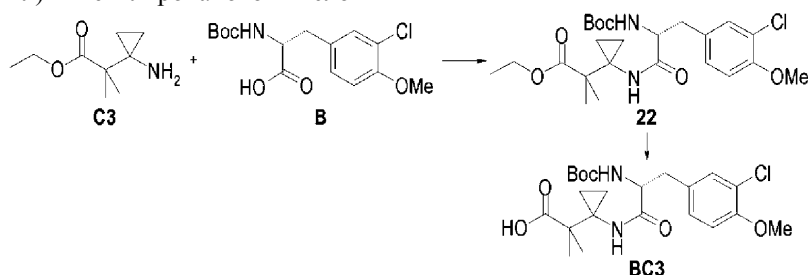
Соединение BC2 стереоизомер 1: 3-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилбутановая кислота стереоизомер 1.

Соединение 21 стереоизомер 1 (0,325 г, 1,85 ммоль) и МеОН (8 мл) вводили в круглодонную колбу с последующим добавлением 0,692 мл 10М NaOH. Желтый раствор перемешивали и нагревали при 50°C в течение ночи. Реакционную среду испаряли под вакуумом, затем разбавляли Н₂О (20 мл) и экстрагировали АсОEt (3×5 мл). Водн. слои подкисляли 5N HCl и экстрагировали АсОEt (3×30 мл). Объединенные органические фазы промывали насыщ. соевым раствором (5 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 303 мг соединения BC2 стереоизомера 1 в виде белой пены (96%), используемой непосредственно в следующей реакции.

Соединение BC2 стереоизомер 2: 3-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилбутановая кислота стереоизомер 2.

Соединение 21 стереоизомер 2 (1,094 г, 2,39 ммоль), ТГФ (5 мл) и Н₂О (5 мл) вводили в круглодонную колбу с последующим добавлением LiOH (301 мг, 7,18 ммоль). Раствор перемешивали в течение 44 ч при КТ. Реакция не была завершена, добавляли LiOH (301 мг). Смесь перемешивали в течение 48 ч, затем добавляли 301 мг LiOH в ТГФ (10 мл) и Н₂О (5 мл) и реакционную среду перемешивали в течение 40 ч при 60°C. Реакционную среду испаряли под вакуумом. 1М лимонную кислоту добавляли до pH 2 и смесь экстрагировали АсОEt (2×20 мл). Объединенные органические слои промывали Н₂О, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 1,096 г соединения BC2 стереоизомера 2 в виде белого аморфного твердого вещества (колич.), используемого непосредственно в следующей реакции.

Синтез BC3: этил-2-((R)-1-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропан-амидо)циклопропил)-2-метилпропановой кислоты



Соединение 22: этил-2-((R)-1-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропан-амидо)циклопропил)-2-метилпропаноат.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу вводили фрагмент C3 (1,2 г, 7,01 ммоль) и ТГФ (16,5 мл) с последующим добавлением фрагмента В (2,54 г, 7,71 ммоль), НОВт (1,77 г, 8,76 ммоль), EDC (1,23 г, 8,06 ммоль) и DIEA (1,35 мл, 7,71 ммоль). Реакционную среду перемешивали в течение 2 ч при КТ. По истечении этого времени реакционную среду разбавляли H₂O (25 мл) и экстрагировали AcOEt (250 мл). Органические слои промывали H₂O (2×25 мл), насыщ. соевым раствором (2×25 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали и очищали с помощью флэш-хроматографии, первая на 200 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/AcOEt) с получением 2,16 г соединения 22 в виде бесцветной пены (64%) и 343 мг смеси, содержащей ожидаемое соединение, которое дополнительно очищали на 30 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/AcOEt) с получением 160 мг соединения 22 в виде бесцветной пены (4,7%).

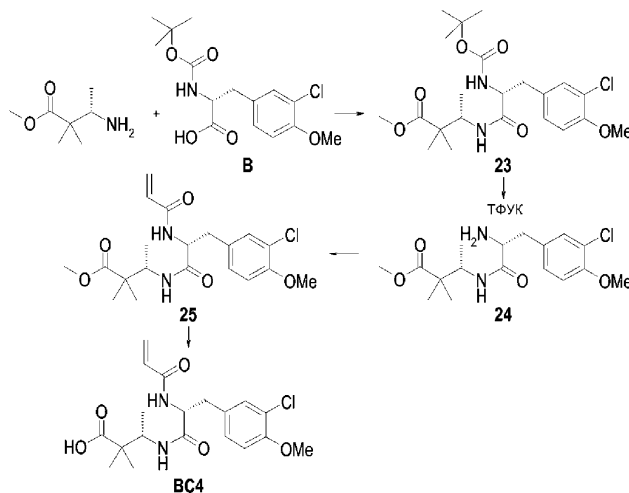
¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,62 (м, 1H); 0,74-0,99 (м, 3H); 1,03 (с, 3H); 1,10 (с, 3H); 1,24 (т, J=7,2 Гц, 3H); 1,42 (с, 9H); 2,90 (м, 2H); 3,88 (с, 3H); 4,08 (м, 1H); 4,10 (к, J=7,2 Гц, 2H); 4,96 (м, 1H); 6,33 (уш.с, 1H); 6,85 (д, J=8,5 Гц, 1H); 7,03 (дд, J=2,4 и 8,5 Гц, 1H); 7,17 (д, J=2,4 Гц, 1H).

Соединение BC3: 2-((R)-1-(2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропан-амидо)циклопропил)-2-метилпропановая кислота.

Соединение 22 (2,09 г, 4,33 ммоль), ТГФ (10 мл) и H₂O (8 мл) вводили в круглодонную колбу с последующим добавлением LiOH (726,33 мг, 17,31 ммоль). Раствор перемешивали и нагревали при 65°C. Через 16 ч реакция не была завершена, добавляли 726,33 мг LiOH в 10 мл H₂O. Смесь перемешивали в течение 48 ч при 65°C. После охлаждения реакционную среду разбавляли H₂O (20 мл), затем экстрагировали AcOEt (3×40 мл). Органические слои промывали H₂O (2×10 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 1,29 г смеси сложного эфира/кислоты. Водн. слой подкисляли 5N HCl до pH 3, затем экстрагировали AcOEt (3×50 мл). Органические слои промывали H₂O (2×10 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 787 мг соединения BC3 в виде бежевой пены (40%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,50-0,90 (м, 4H); 1,03 (с, 6H); 1,30 (с, 9H); 2,60 (дд, J=10,5 и 14,1 Гц, 1H); 2,78 (дд, J=5,0 и 14,1 Гц, 1H); 3,81 (с, 3H); 3,97 (м, 1H); 6,80 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,03 (д, J=8,5 Гц, 1H); 7,18 (дд, J=2,0 и 8,5 Гц, 1H); 7,31 (д, J=2,0 Гц, 1H); 7,86 (с, 1H); 12,11 (уш.м, 1H).

Синтез BC4: (S)-3-((R)-2-акриламидо-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилбутановой кислоты



Соединение 23: метил-(S)-3-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилбутаноат.

К раствору фрагмента В (2 г, 6,06 ммоль) в ДХМ (60 мл) добавляли EDC (1,13 мл, 7,06 ммоль) и

НОВт (948 мг, 6,67 ммоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 15 мин, затем добавляли метил-(S)-3-амино-2,2-диметилбутаноат (881 мг, 6,06 ммоль) и DIEA (1,53 мл, 9,10 ммоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 4 ч, концентрировали под вакуумом и разбавляли EtOAc (100 мл) и H₂O (20 мл). Водную фазу экстрагировали EtOAc (20 мл); объединенные органические фазы промывали насыщ. соевым раствором (2×20 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 150 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/EtOAc) с получением 2,21 г соединения 23 в виде бесцветного лака (79%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,88 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,08 (с, 6H); 1,32 (с, 9H); 2,67 (дд, J=9,9 и 13,6 Гц, 1H); 2,82 (дд, J=5,2 и 13,6 Гц, 1H); 3,62 (с, 3H); 3,83 (с, 3H); 4,06 (м, 1H); 4,77 (м, 1H); 6,97 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,05 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,20 (дд, J=2,4 и 8,6 Гц, 1H); 7,33 (д, J=2,4 Гц, 1H); 7,55 (д, J=9,8 Гц, 1H).

Соединение 24: метил-(S)-3-((R)-2-амино-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилбутаноата 2,2,2-трифторацетат.

К раствору соединения 23 (2,2 г, 4,81 ммоль) в ДХМ (25 мл) добавляли ТФУК (3,6 мл, 48,1 ммоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение ночи, концентрировали под вакуумом и соиспаряли в присутствии толуола с получением 2,0 г соединения 24 в виде диастереомерной смеси (88%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,80 (д, J=6,9 Гц, 3H); 1,04 (с, 3H); 1,10 (с, 3H); 2,95 (д, J=7,0 Гц, 2H); 3,62 (с, 3H); 3,84 (с, 3H); 4,00 (м, 1H); 4,15 (м, 1H); 7,10-7,30 (м, 3H); 8,00 (д, J=9,5 Гц, 1H); 8,22 (уш.с, 3H).

Соединение 25: метил-(S)-3-((R)-2-акриламидо-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилбутаноат.

К раствору соединения 24 (2,0 г, 4,25 ммоль) в ДХМ (20 мл) добавляли акрилоилхлорид (536 мкл, 6,37 ммоль) и DIEA (2,5 мл, 12,74 ммоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 2 ч, затем разбавляли H₂O (20 мл). Водную фазу экстрагировали ДХМ (2×20 мл), объединенные органические фазы промывали насыщ. соевым раствором (2×20 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 100 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/EtOAc) с получением 850 мг соединения 25 в виде смеси диастереомеров 85:15 (68%).

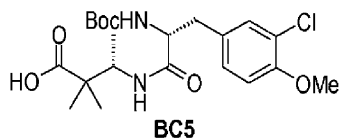
¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,85 (д, J=6,9 Гц, 3H); 1,03 (с, 3H); 1,04 (с, 3H); 2,72 (дд, J=9,7 и 13,9 Гц, 1H); 2,86 (дд, J=5,8 и 13,9 Гц, 1H); 3,58 (с, 3H); 3,80 (с, 3H); 4,15 (м, 1H); 4,56 (м, 1H); 5,56 (дд, J=2,3 и 10,2 Гц, 1H); 6,03 (дд, J=2,3 и 17,2 Гц, 1H); 6,28 (дд, J=10,2 и 17,2 Гц, 1H); 7,02 (д, J=8,5 Гц, 1H); 7,17 (дд, J=2,2 и 8,5 Гц, 1H); 7,31 (д, J=2,2 Гц, 1H); 7,72 (д, J=9,8 Гц, 1H); 8,36 (д, J=8,6 Гц, 1H).

Соединение BC4: (S)-3-((R)-2-акриламидо-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилбутановая кислота.

К раствору tBuOK (1,11 г, 9,86 ммоль) в ТГФ (4 мл), охлажденному при 0°C, добавляли H₂O (47 мкл) и соединение 25 (450 мг, 1,10 ммоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 3 ч, затем подкисляли 1N HCl (5 мл). Водную фазу экстрагировали ДХМ (2×20 мл); объединенные органические фазы промывали H₂O (30 мл), насыщ. соевым раствором (20 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом. Два диастереомера разделяли с помощью сверхкритической флюидной хроматографии на колонке Chiralpak AS 10 мкм (изократическое элюирование при 85/15 CO₂/[MeOH+0,1% ТЭА] с получением 385 мг соединения BC4 в виде аморфного твердого вещества (89%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,88 (д, J=6,9 Гц, 3H); 0,99 (с, 3H); 1,00 (с, 3H); 2,71 (дд, J=9,4 и 13,7 Гц, 1H); 2,88 (дд, J=5,3 и 13,7 Гц, 1H); 3,80 (с, 3H); 4,10 (м, 1H); 4,54 (м, 1H); 5,55 (дд, J=2,3 и 10,2 Гц, 1H); 6,01 (дд, J=2,3 и 17,1 Гц, 1H); 6,28 (дд, J=10,2 и 17,1 Гц, 1H); 7,02 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,17 (дд, J=2,4 и 8,7 Гц, 1H); 7,32 (д, J=2,4 Гц, 1H); 7,80 (д, J=9,8 Гц, 1H); 8,39 (д, J=8,8 Гц, 1H); 12,00 (уш.с, 1H). ЖХМС (A5): ES m/z=395 [M-H]⁻; m/z=397 [M+H]⁺; t_R=0,92 мин.

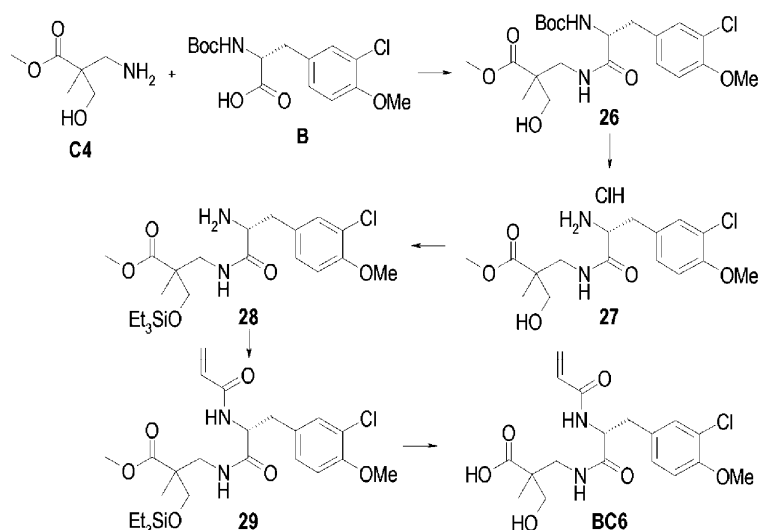
Синтез BC5: (S)-3-((R)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилбутановой кислоты



Соединение BC5 получали, исходя из метил-(3S)-3-амино-2,2-диметилбутаноата (MFCD09256689) и после общего синтеза структурного элемента BC, изображенного на схеме 32 и описанного для соединений BC1 и BC2.

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,89 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,02 (с, 3H); 1,04 (с, 3H); 1,30 (с, 9H); 2,68 (дд, J=13,6 и 10,2 Гц, 1H); 2,82 (дд, J=5,2 и 13,6 Гц, 1H); 3,80 (с, 3H); 4,05 (м, 1H); 4,12 (м, 1H); 7,00 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,05 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,20 (дд, J=2,2 и 8,7 Гц, 1H); 7,32 (д, J=2,2 Гц, 1H); 7,52 (д, J=9,9 Гц, 1H); 12,35 (уш.с, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=441 [M-H]⁻; m/z=443 [M+H]⁺; m/z=883 [2M-H]⁻; t_R=1,16 мин.

Синтез BC6 : 3-((R)-2-акриламино-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2-(гидроксиметил)-2-метилпропановой кислоты



Соединение 26: метил-3-((R)-2-(трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2-(гидроксиметил)-2-метилпропаноат.

К раствору фрагмента C4 (1,059 г, 5,77 ммоль) в ТГФ (60 мл) добавляли DIEA (2,06 мл, 11,76 ммоль), фрагмент В (1,90 г, 5,77 ммоль), HOBt (935 мг, 6,92 ммоль) и EDC (1,23 мл, 6,92 ммоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 48 ч, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 200 г силикагеля (изократическое элюирование гептан/EtOAc) с получением 1,05 г соединения 26 в виде бесцветного масла (39%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,98 (с, 3H); 1,30 (с, 9H); 2,63 (м, 1H); 2,83 (м, 1H); 3,18-3,48 (м, 4H); 3,60 (с, 3H); 3,80 (с, 3H); 4,10 (м, 1H); 4,81 (м, 1H); 6,98 (д, J=8,9 Гц, 1H); 7,04 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,20 (дд, J=2,1 и 8,7 Гц, 1H); 7,35 (д, J=2,1 Гц, 1H); 7,83 (м, 1H). ЖХМС (A5): ES m/z=457 [M-H]⁻; m/z=459 [M+H]⁺; m/z=503 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=1,1 мин.

Соединение 27: метил-3-((R)-2-амино-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2-(гидроксиметил)-2-метилпропаноата гидрохлорид.

Соединение 26 (1,05 г, 2,29 ммоль) обрабатывали HCl 4M в диоксане (16 мл, 64 ммоль) в течение 1 ч при КТ. Реакционную среду концентрировали под вакуумом и дважды соиспаряли в присутствии толуола. Неочищенный продукт растирали с iPr₂O (10 мл), отфильтровывали и дважды промывали iPr₂O (5 мл). Затем осадок растворяли в ДХМ, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 809 мг соединения 27 в виде белой пены (90%), которую использовали без дополнительной очистки.

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,92 (с, 1,5H); 0,97 (с, 1,5H); 2,88 (м, 1H); 3,00 (м, 1H); 3,19-3,47 (м, 4H); 3,60 (с, 3H); 3,85 (с, 3H); 4,05 (м, 1H); 4,89 (м, 1H); 7,11 (расщепл. д., J=8,6 Гц, 1H); 7,19 (расщепл. дд, J=2,0 и 8,6 Гц, 1H); 7,38 (расщепл. д, J=2,0 Гц, 1H); 8,15 (уш.с, 3H); 8,39 (м, 1H).

Соединение 28: метил-3-((R)-2-амино-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2-метил-2-(((триэтилсилил)окси)метил)пропаноат.

К раствору соединения 27 (809 мг, 2,05 ммоль) в ДХМ (4 мл), охлажденному на ледяной бане, добавляли ТЭА (1,43 мл, 10,23 ммоль) и хлортриэтилсилан (1,37 мл, 8,19 ммоль), поддерживая при этом температуру ниже 4°C. Перемешивание при 4°C проводили в течение 10 мин, затем реакционную среду перемешивали при КТ в течение 20 ч. Насыщ. солевой раствор (20 мл) и ДХМ добавляли к среде, которую перемешивали в течение 10 мин. Органическую фазу промывали насыщ. соевым раствором (3×10 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 70 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 706 мг соединения 28 в виде бледно-желтого масла (73%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,52 (к, J=8,0 Гц, 6H); 0,89 (т, J=8,0 Гц, 9H); 0,98 (с, 3H); 1,70 (уш.с, 2H); 2,54 (м, 1H); 2,82 (м, 1H); 3,18-3,45 (м, 3H); 3,58 (м, 2H); 3,60 (с, 3H); 3,80 (с, 3H); 7,03 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,14 (дд, J=2,3 и 8,7 Гц, 1H); 7,28 (расщепл. д, J=2,3 Гц, 1H); 7,78 (м, 1H). ЖХМС (A5): ES m/z=471 [M-H]⁻; m/z=473 [M+H]⁺; m/z=517 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=0,97 мин.

Соединение 29: метил-3-((R)-2-акриламино-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2-метил-2-(((триэтилсилил)окси)метил)пропаноат.

К раствору соединения 28 (704 мг, 1,49 ммоль) в ДХМ (19 мл), охлажденному на бане лед/ацетон, добавляли DIEA (780 мкл, 4,46 ммоль) и по каплям акрилоилхлорид (181 мкл, 2,23 ммоль). Реакционную среду перемешивали при 0-5°C в течение 1 ч, затем добавляли EtOAc (38 мл) и среду промывали 1N HCl (5 мл), насыщ. NaHCO₃ (5 мл), насыщ. соевым раствором (3×15 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 30 г силика-

геля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 742 мг соединения 29 в виде бесцветного масла (94%).

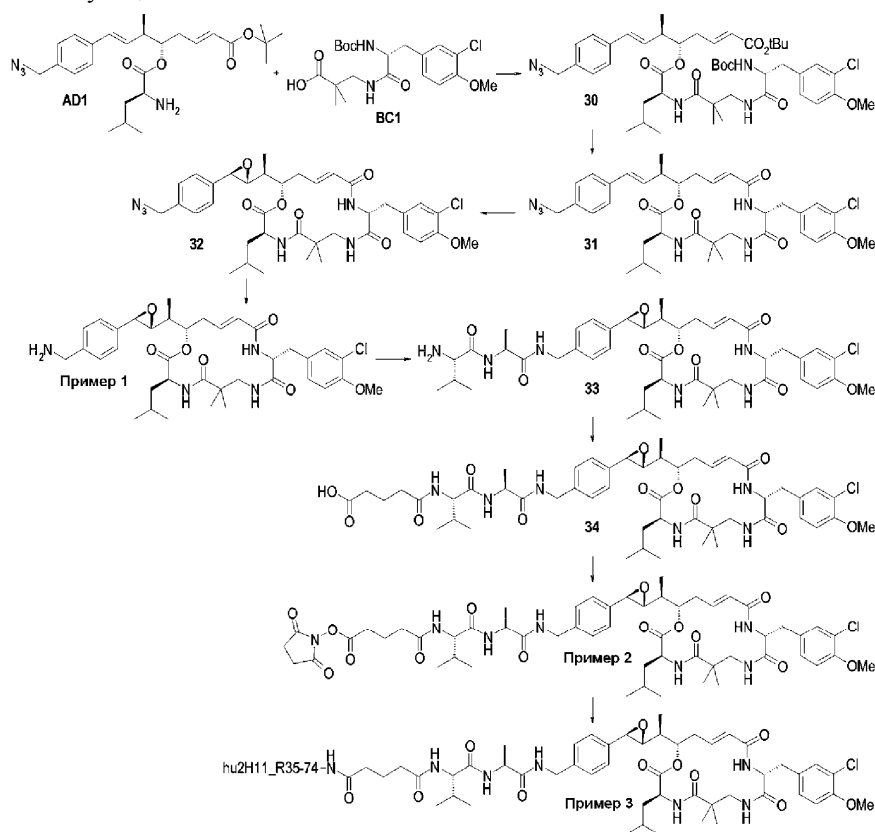
¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,52 (расщепл. к, J=8,0 Гц, 6H); 0,89 (расщепл. т, J=8,0 Гц, 9H); 0,99 (с, 1,5H); 1,01 (с, 1,5H); 2,69 (м, 1H); 2,87 (м, 1H); 3,20 (м, 1H); 3,28 (м, 1H); 3,50 (дд, J=3,1 и 9,9 Гц, 1H); 3,58 (с, 3H); 3,68 (д, J=9,9 Гц, 1H); 3,80 (с, 3H); 4,59 (м, 1H); 5,55 (д, J=10,3 Гц, 1H); 6,00 (д, J=17,3 Гц, 1H); 6,25 (расщепл. дд, J=10,3 и 17,3 Гц, 1H); 7,02 (д, J=8,5 Гц, 1H); 7,18 (расщепл. дд, J=2,0 и 8,5 Гц, 1H); 7,31 (расщепл. д, J=2,0 Гц, 1H); 7,96 (м, 1H); 8,39 (д, J=8,9 Гц, 1H). ЖХМС (A5): ES m/z=525 [M-H]⁻; m/z=527 [M+H]⁺; m/z=571 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=1,54 мин.

Соединение ВС6: 3-((R)-2-акриламидо-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2-(гидроксиметил)-2-метилпропановая кислота.

К суспензии tBuOK (1,42 г, 12,65 ммоль) в ТГФ (7 мл), охлажденной на бане лед/ацетон, добавляли H₂O (50 мкл), среду перемешивали в течение 10 мин перед добавлением раствора соединения 29 (741 мг, 1,41 ммоль) в ТГФ (7 мл). Перемешивание проводили при 0°C в течение 10 мин, затем при КТ в течение 1 ч. Реакционную среду охлаждали с помощью ледяной бани перед добавлением 1N HCl (16,9 мл). После 15 мин перемешивания реакционную среду экстрагировали ДХМ (3×25 мл). Объединенные органические фазы промывали насыщ. соевым раствором (2×15 мл), H₂O (15 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 656 мг соединения BC6 в виде желтой пены (колич.).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,91 (с, 3H); 2,69 (м, 1H); 2,90 (дд, J=4,8 и 13,6 Гц, 1H); 3,18-3,42 (м, 4H); 3,80 (с, 3H); 4,59 (м, 1H); 4,73 (уш.с, 1H); 5,55 (д, J=2,3 и 10,3 Гц, 1H); 6,00 (дд, J=2,3 и 17,2 Гц, 1H); 6,24 (дд, J=10,3 и 17,2 Гц, 1H); 7,03 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,19 (дд, J=2,0 и 8,7 Гц, 1H); 7,35 (д, J=2,0 Гц, 1H); 8,00 (м, 1H); 8,39 (д, J=8,8 Гц, 1H); 12,30 (уш.с, 1H). ЖХМС (A5): ES m/z=397 [M-H]⁻; m/z=399 [M+H]⁺; t_R=0,77 мин.

Синтез примеров 1-3: бензилового амина аза-C52, NHS-эфира глутарил-Val-Ala-аза-C52 бензилового амина и соответствующего ADC



Соединение 30: (6R,13S)-(1E,3R,4S,6E)-1-(4-(азидометил)фенил)-8-(трет-бутокси)-3-метил-8-оксоокта-1,6-диен-4-ил-6-(3-хлор-4-метоксибензил)-13-изобутил-2,2,10,10-тетраметил-4,7,11-триоксо-3-окса-5,8,12-триазатетрадекан-14-оат.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу вводили соединение BC1 (899,55 мг, 2,10 ммоль) в ДМФ (25 мл), НАТУ (861 мг, 2,20 ммоль) и HOAt (302 мг, 2,20 ммоль). Смесь перемешивали в течение 30 мин при КТ. После этого добавляли соединение AD1 (940 мг, 2 ммоль) и DIEA (1,05 мл, 5,99 ммоль). Реакционную среду перемешивали в течение 4 ч при КТ. По истечении этого времени реакционную среду разбавляли H₂O (50 мл) и экстрагировали AcOEt (2×40 мл). Органические слои промывали насыщ. соевым раствором (25 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали и очищали с помощью

флэш-хроматографии на 80 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/АсОEt) с получением 1,011 г соединения 30 в виде желтого полутвердого вещества (57%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,76 (д, J=6,7 Гц, 3H); 0,78 (д, J=6,7 Гц, 3H); 1,03 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,07 (с, 6H); 1,39 (с, 9H); 1,37-1,63 (м, 3H); 1,41 (с, 9H); 2,36-2,60 (частично скрытый м, 3H); 2,64 (дд, J=9,5 и 14,1 Гц, 1H); 2,86 (дд, J=5,6 и 14,1 Гц, 1H); 3,18 (дд, J=6,1 и 13,5 Гц, 1H); 3,25 (дд, J=6,9 и 13,5 Гц, 1H); 3,79 (с, 3H); 4,09 (м, 1H); 4,26 (м, 1H); 4,40 (с, 2H); 4,92 (м, 1H); 5,81 (д, J=15,9 Гц, 1H); 6,17 (дд, J=8,4 и 16,1 Гц, 1H); 6,44 (д, J=15,9 Гц, 1H); 6,70 (м, 1H); 6,94 (д, J=8,9 Гц, 1H); 7,02 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,18 (дд, J=2,3 и 8,9 Гц, 1H); 7,31 (м, 3H); 7,42 (д, J=8,5 Гц, 2H); 7,59 (т, J=6,3 Гц, 1H); 7,77 (д, J=7,9 Гц, 1H). ЖХМС (А1): ES m/z=879 [M-H]⁻; m/z=881 [M+H]⁺; m/z=925 [M-H+HCO₂N]⁻; t_R=1,89 мин.

Соединение 31: (3S,10R,16S,E)-16-((R,E)-4-(4-(азидометил)фенил)бут-3-ен-2-ил)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-3-изобутил-6,6-диметил-1-окса-4,8,11-триазаациклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

Соединение 31 получали за две стадии.

Стадия 1: в круглодонную колбу вводили соединение 30 (1,011 г, 1,15 ммоль) в ДХМ (10 мл). После охлаждения до 0°C добавляли ТФУК (1,72 мл, 22,94 ммоль) и 100 мкл Н₂O. Реакционную среду перемешивали в течение 72 ч при КТ. По окончании добавления к среде добавляли толуол и концентрировали под вакуумом с получением 900 мг интермедиата аминокислоты (колич.).

¹H ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,76 (д, J=6,7 Гц, 3H); 0,78 (д, J=6,7 Гц, 3H); 1,03 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,07 (с, 3H); 1,08 (с, 3H); 1,38-1,62 (м, 3H); 2,35-2,58 (частично скрытый м, 3H); 2,79 (дд, J=11,0 и 13,8 Гц, 1H); 3,00 (дд, J=4,1 и 13,8 Гц, 1H); 3,16 (дд, J=5,9 и 13,5 Гц, 1H); 3,28-3,39 (скрытый м, 1H); 3,81 (с, 3H); 4,03 (м, 1H); 4,26 (м, 1H); 4,40 (с, 2H); 4,92 (м, 1H); 5,82 (д, J=16,1 Гц, 1H); 6,16 (дд, J=8,8 и 16,4 Гц, 1H); 6,42 (д, J=16,4 Гц, 1H); 6,73 (м, 1H); 7,09 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,18 (дд, J=2,0 и 8,6 Гц, 1H); 7,32 (д, J=8,6 Гц, 2H); 7,37 (д, J=2,0 Гц, 1H); 7,41 (д, J=8,6 Гц, 2H); 7,84 (д, J=7,9 Гц, 1H); 8,01 (уш.с большой, 3H); 8,10 (т, J=6,4 Гц, 1H); 12,2 (уш.с, 1H). ЖХМС (А1): ES m/z=723 [M-H]⁻; m/z=725 [M+H]⁺; t_R=1,09 мин.

Стадия 2: в круглодонную колбу к раствору интермедиата аминокислоты (840 мг, 1,16 ммоль) в 200 мл СН₃CN добавляли DIEA (1,95 мл, 11,58 ммоль), HOAt (159,23 мг, 1,16 ммоль) и NATU (499,40 мг, 1,27 ммоль). Реакционную среду перемешивали в течение 3 ч при КТ. После концентрирования под вакуумом неочищенный продукт разбавляли АсОEt (200 мл), нейтрализовали 0,5М лимонной кислотой (12 мл) и 1N HCl (6 мл). Органический слой отделяли, промывали насыщ. NaHSO₃, насыщ. NaHSO₃, насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали и очищали с помощью флэш-хроматографии на 40 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 558 мг соединения 31 в виде белого твердого вещества (68%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,60 (д, J=6,7 Гц, 3H); 0,61 (д, J=6,7 Гц, 3H); 0,97 (с, 3H); 1,07 (с, 3H); 1,09 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,15 (м, 1H); 1,33-1,48 (м, 2H); 2,24 (м, 1H); 2,53-2,70 (м, 2H); 2,88 (уш.д, J=13,6 Гц, 1H); 3,01 (дд, J=3,5 и 14,5 Гц, 1H); 3,23-3,32 (скрытый м, 1H); 3,80 (с, 3H); 4,18 (м, 1H); 4,35 (м, 1H); 4,40 (с, 2H); 4,95 (м, 1H); 5,86 (дд, J=1,7 и 15,8 Гц, 1H); 6,13 (дд, J=8,8 и 16,1 Гц, 1H); 6,40 (м, 1H); 6,47 (д, J=16,1 Гц, 1H); 7,04 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,18 (дд, J=2,0 и 8,6 Гц, 1H); 7,29 (д, J=2,0 Гц, 1H); 7,32 (д, J=8,6 Гц, 2H); 7,41 (уш.д, J=8,6 Гц, 3H); 7,89 (д, J=8,9 Гц, 1H); 8,1 (д, J=8,2 Гц, 1H). ЖХМС (А1): ES m/z=705 [M-H]⁻; m/z=707 [M+H]⁺; t_R=1,58 мин.

Соединение 32: (3S,10R,16S,E)-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(азидометил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-3-изобутил-6,6-диметил-1-окса-4,8,11-триазаациклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

В круглодонную колбу к раствору соединения 31 (410 мг, 0,579 ммоль) в ДХМ (50 мл) добавляли при 0°C м-СРВА (259 мг, 1,16 ммоль). После перемешивания в течение 16 ч при КТ добавляли дважды м-СРВА (130 мг) в течение 24 ч. После завершения реакции неочищенную смесь перемешивали в течение 1 ч с насыщ. NaHCO₃ (15 мл) и насыщ. Na₂S₂O₃ (15 мл), затем экстрагировали ДХМ (3×15 мл). Органические слои промывали насыщ. соевым раствором (15 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали с получением 440 мг смеси α- и β-эпоксидов в виде желтого полутвердого вещества. α- и β-эпоксиды разделяли с помощью хиральной жидкой хроматографии, которую проводили на колонке 76×350 мм, заполненной 1,1 кг 10 мкм Chiralpak AD (трис-3,5-диметилфенилкарбамат амилозы, покрытый на носителе из силикагеля, Chiral Technologies Europe), используя изократическое элюирование с 80:20 гептан/ЕtОН. После концентрирования получали 185 мг соединения 32 в виде белого твердого вещества (44%) и 118 мг α-эпоксида получали в виде белого твердого вещества (28%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,72 (д, J=6,7 Гц, 3H); 0,74 (д, J=6,7 Гц, 3H); 0,96 (с, 3H); 1,04 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,08 (с, 3H); 1,11 (м, 1H); 1,40-1,55 (м, 2H); 1,79 (м, 1H); 2,26 (м, 1H); 2,64 (м, 2H); 2,85 (уш.д, J=13,2 Гц, 1H); 3,00 (м, 2H); 3,25 (дд, J=10,2 и 13,2 Гц, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,90 (д, J=2,0 Гц, 1H); 4,17 (м, 1H); 4,35 (м, 1H); 4,46 (с, 2H); 5,12 (м, 1H); 5,80 (дд, J=1,7 и 16,0 Гц, 1H); 6,39 (ддд, J=3,8, 11,6 и 16,0 Гц, 1H); 7,04 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,18 (дд, J=2,0 и 8,6 Гц, 1H); 7,29 (д, J=2,0 Гц, 1H); 7,31-7,40 (м, 5H); 7,94 (д, J=9,1 Гц, 1H); 8,40 (д, J=8,1 Гц, 1H). ЖХМС (А1): ES m/z=723 [M+H]⁺; t_R=1,48 мин.

Пример 1. (3S,10R,16S,E)-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(аминометил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-3-изобутил-6,6-диметил-1-окса-4,8,11-триазаациклогексадек-13-ен-2,5,9,12-

тетраон.

В круглодонную колбу к раствору соединения 32 (185 мг, 255,79 мкмоль) в ДХМ (6 мл), MeOH (6 мл) и H₂O (0,8 мл) добавляли ТСЕР (81,47 мг, 281,37 мкмоль). Раствор перемешивали в течение 16 ч при КТ. После завершения реакции неочищенную смесь разбавляли насыщ. NaHCO₃ (15 мл) и экстрагировали ДХМ (2×30 мл). Органические слои промывали насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали и очищали с помощью двух последовательных флэш-хроматографий на 15 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 90 мг примера 1 в виде белого твердого вещества (51%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,72 (д, J=6,6 Гц, 3H); 0,75 (д, J=6,6 Гц, 3H); 0,97 (с, 3H); 1,03 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,07 (с, 3H); 1,14 (м, 1H); 1,42-1,57 (м, 2H); 1,77 (м, 1H); 1,92 (уш.м, 2H); 2,26 (м, 1H); 2,64 (м, 2H); 2,86 (уш.д, J=13,0 Гц, 1H); 2,94 (дд, J=2,0 и 8,0 Гц, 1H); 3,00 (дд, J=3,6 и 14,4 Гц, 1H); 3,27 (дд, J=10,2 и 13,0 Гц, 1H); 3,70 (с, 2H); 3,80 (с, 3H); 3,84 (д, J=2,0 Гц, 1H); 4,18 (м, 1H); 4,34 (м, 1H); 5,11 (м, 1H); 5,79 (дд, J=1,7 и 15,6 Гц, 1H); 6,38 (ддд, J=4,1, 11,6 и 15,6 Гц, 1H); 7,05 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,16 (дд, J=2,0 и 8,6 Гц, 1H); 7,22 (д, J=8,5 Гц, 2H); 7,28 (д, J=2,0 Гц, 1H); 7,31 (д, J=8,5 Гц, 2H); 7,35 (д, J=10,2 Гц, 1H); 7,91 (д, J=9,0 Гц, 1H); 8,38 (д, J=8,0 Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=695 [M-H]⁻; m/z=697 [M+H]⁺; t_R=0,83 мин.

Соединение 33: (S)-2-амино-N-((S)-1-((4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-3-изобутил-6,6-диметил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазадициклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)амино)-1-оксопропан-2-ил)-3-метилбутанамид.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору примера 1 (90 мг, 129,01 мкмоль) в ДХМ (20 мл) добавляли (S)-2-((S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)пропановой кислоты или FmocValAla (номер CAS [150114-97-9], 79,47 мг, 193,61 мкмоль), EDC (34,27 мкл, 193,61 мкмоль) и HOBT (20,93 мг, 154,9 мкмоль). Реакционную среду перемешивали в течение ночи при КТ. По истечении этого времени добавляли пиперидин (129 мкл, 1,29 ммоль) и перемешивали в течение 2 ч. Растворитель удаляли и неочищенный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на 15 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 50 мг соединения 33 (45%) в виде белого твердого вещества.

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,75 (м, 9H); 0,88 (д, J=7,1 Гц, 3H); 0,96 (с, 3H); 1,03 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,08 (с, 3H); 1,18 (м, 1H); 1,23 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,42-1,57 (м, 2H); 1,70 (уш.м, 2H); 1,79 (м, 1H); 1,92 (м, 1H); 2,26 (м, 1H); 2,63 (м, 2H); 2,86 (уш.д, J=13,0 Гц, 1H); 2,99 (м, 3H); 3,22-3,33 (частично скрытый м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,86 (д, J=2,0 Гц, 1H); 4,18 (м, 1H); 4,28 (д, J=6,3 Гц, 2H); 4,33 (м, 2H); 5,11 (м, 1H); 5,79 (дд, J=1,7 и 15,6 Гц, 1H); 6,39 (ддд, J=4,1, 11,6 и 15,6 Гц, 1H); 7,03 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,16 (дд, J=2,0 и 8,6 Гц, 1H); 7,24 (с, 4H); 7,28 (д, J=2,0 Гц, 1H); 7,37 (д, J=10,2 Гц, 1H); 7,92 (д, J=9,1 Гц, 1H); 8,07 (уш.д, J=8,3 Гц, 1H); 8,38 (д, J=8,1 Гц, 1H); 8,42 (т, J=6,3 Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=434 [M+2H]²⁺; m/z=865 [M-H]⁻; m/z=867 [M+H]⁺; m/z=911 [M-H+HCO₂N]⁻; t_R=0,88 мин.

Соединение 34: 5-(((S)-1-(((S)-1-((4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-3-изобутил-6,6-диметил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазадициклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-5-оксопентановая кислота.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору соединения 33 (54 мг, 57,64 мкмоль) в ДМФ (5 мл) добавляли глутаровый ангидрид (8 мг, 69,17 мкмоль). Реакционную среду перемешивали в течение 3,5 ч при КТ. По истечении этого времени растворитель удаляли и неочищенный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на 1,8 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 51 мг соединения 34 в виде белого твердого вещества (90%).

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,73 (д, J=6,7 Гц, 3H); 0,76 (д, J=6,7 Гц, 3H); 0,81 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,84 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,97 (с, 3H); 1,03 (д, J=7,2 Гц, 3H); 1,05 (с, 3H); 1,15 (м, 1H); 1,22 (д, J=7,2 Гц, 3H); 1,43-1,52 (м, 2H); 1,70 (м, 2H); 1,77 (м, 1H); 1,97 (м, 1H); 2,17 (м, 2H); 2,24 (м, 1H); 2,55-2,68 (м, 2H); 2,85 (уш.д, J=12,7 Гц, 1H); 2,96 (дд, J=1,8 и 7,7 Гц, 1H); 2,99 (дд, J=3,0 и 14,6 Гц, 1H); 3,23-3,40 (частично скрытый м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,85 (д, J=1,8 Гц, 1H); 4,22-4,38 (м, 4H); 5,11 (м, 1H); 5,79 (д, J=14,9 Гц, 1H); 6,37 (ддд, J=4,1, 11,3 и 14,9 Гц, 1H); 7,04 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,15 (дд, J=2,0 и 8,7 Гц, 1H); 7,23 (уш.с, 4H); 7,28 (д, J=2,0 Гц, 1H); 7,37 (уш.д, J=10,7 Гц, 1H); 7,87 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,93 (д, J=9,2 Гц, 1H); 8,06 (м большой, 1H); 8,37 (уш.м, 1H); 8,41 (уш.м, 1H); 12,03 (уш.м, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=979 [M-H]⁻; m/z=981 [M+H]⁺; t_R=1,17 мин.

Пример 2. 2,5-Диоксипирролидин-1-ил-5-(((S)-1-(((S)-1-((4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-3-изобутил-6,6-диметил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазадициклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-5-оксопентаноат.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору соединения 34 (30 мг, 30,56 мкмоль) в ТГФ (5 мл) добавляли DIEA (5,34 мкл, 30,56 мкмоль) и ДСК (16,31 мг, 61,13 мкмоль). Реакционную среду перемешивали в течение 2 ч при КТ. По истечении этого времени растворитель удаляли и неочищенный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на 1,3 г силикагеля (градиентное элюирование

ДХМ/*i*PrOH) с получением 9 мг примера 2 в виде белого твердого вещества. Вторую партию, содержащую ожидаемое соединение, а также примесь, разбавляли MeTГФ, дважды промывали H₂O, насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали с получением 15 мг примера 2 в виде белого твердого вещества (общий выход 73%).

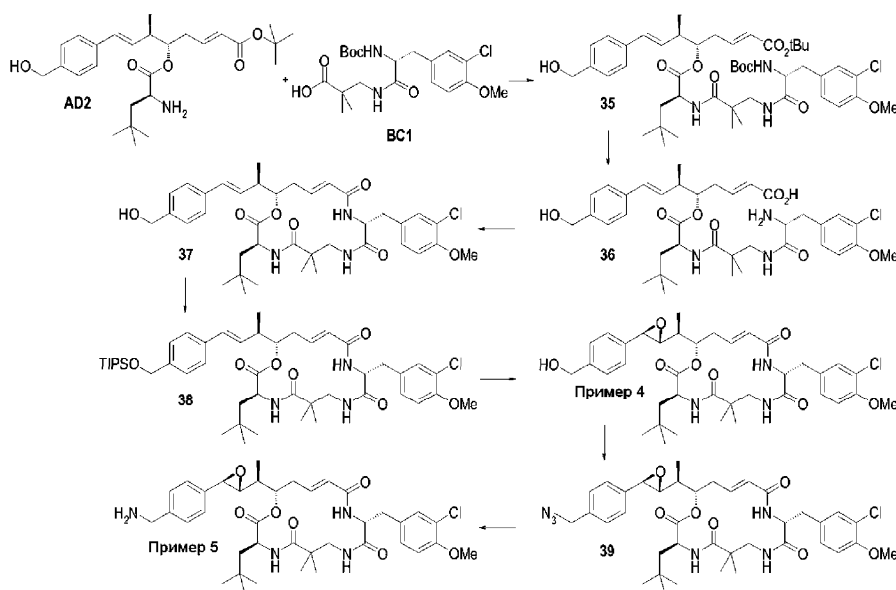
¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,73 (д, J=6,7 Гц, 3H); 0,77 (д, J=6,7 Гц, 3H); 0,82 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,84 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,96 (с, 3H); 1,03 (д, J=7,2 Гц, 3H); 1,07 (с, 3H); 1,15 (м, 1H); 1,23 (д, J=7,2 Гц, 3H); 1,43-1,56 (м, 2H); 1,78 (м, 1H); 1,81 (м, 1H); 1,97 (м, 1H); 2,20-2,33 (м, 3H); 2,58-2,69 (м, 4H); 2,80 (с, 4H); 2,85 (уш.д, J=12,7 Гц, 1H); 2,98 (дд, J=2,1 и 7,9 Гц, 1H); 3,00 (дд, J=3,2 и 14,7 Гц, 1H); 3,22-3,34 (частично скрытый м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,85 (д, J=2,1 Гц, 1H); 4,15 (м, 2H); 4,22-4,38 (м, 4H); 5,11 (м, 1H); 5,79 (д, J=15,1 Гц, 1H); 6,38 (ддд, J=3,9, 11,2 и 15,1 Гц, 1H); 7,04 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,15 (дд, J=2,2 и 8,7 Гц, 1H); 7,22 (уш.с, 4H); 7,29 (д, J=2,2 Гц, 1H); 7,36 (уш.д, J=10,3 Гц, 1H); 7,89 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,92 (д, J=8,9 Гц, 1H); 8,04 (д, J=7,4 Гц, 1H); 8,32 (т, J=6,1 Гц, 1H); 8,39 (д, J=8,0 Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=540; m/z=1076 [M-H]⁻; m/z=1078 [M+H]⁺; m/z=1122 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=1,23 мин.

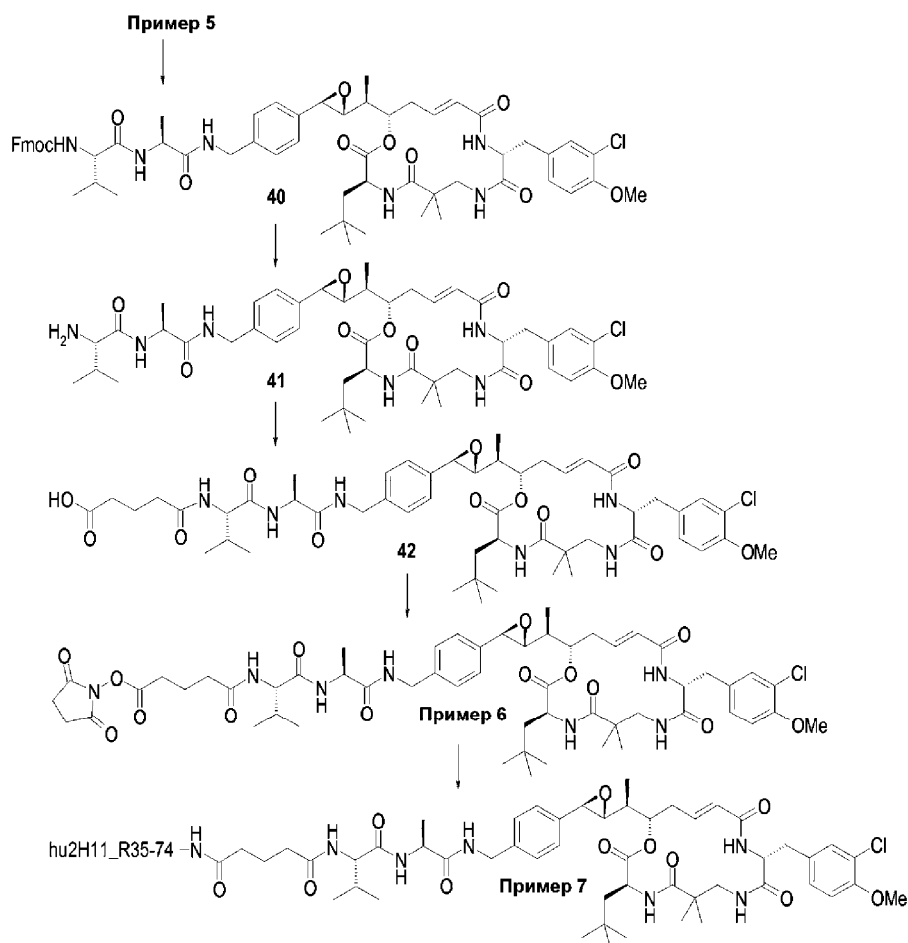
Пример 3. mAb-Пр. 2.

Общий способ, описанный ранее, был использован для получения примера 3. 60 мг hu2H11_R35-74 подвергали взаимодействию с 161 мкл 9,96 мМ раствора примера 2 в ДМА (1,733 мг, 4 экв.) в течение 2 ч. В это время добавляли 121 мкл раствора примера 2 (3 экв.) и среду перемешивали в течение 2 ч. В это время добавляли 121 мкл раствора примера 2 (3 экв.) и перемешивали в течение 2 ч. После очистки на Superdex 200 pg в DPBS pH 6,5+20% NMP, концентрирования на Amicon Ultra-15, буферного обмена на PD-10 в буфере В pH 6,5+5% NMP и фильтрования на Steriflip 39,9 мг примера 3 получали в виде бесцветного прозрачного раствора в концентрации 2,28 мг/мл с DAR 4,6 (МСВР), мономерной чистотой 99% и общим выходом 66%.

SEC-MCBP: спектр для интактного ADC на фиг. 1; $m/z=150346$ (D1); $m/z=151307$ (D2); $m/z=152274$ (D3); $m/z=153240$ (D4); $m/z=154200$ (D5); $m/z=155165$ (D6); $m/z=156133$ (D7); $m/z=157095$ (D8).

Синтез примеров 4-7: бензилового амина (S)-3-неопентил-аза-C52, NHS-эфира глутарил-Val-Ala-(S)-3-неопентил-аза-C52 бензилового амина и соответствующего ADC





Соединение 35: (6R,13S)-(1E,3R,4S,6E)-8-(трет-бутоксипен-1-ил)-4-(4-(гидроксиметил)фенил)-3-метил-8-оксоокта-1,6-диен-4-ил-6-(3-хлор-4-метоксибензил)-2,2,10,10-тетраметил-13-неопентил-4,7,11-триоксо-3-окса-5,8,12-триазатетрадекан-14-оат.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору фрагмента BC1 (1,32 г, 3,08 ммоль) в ДХМ (60 мл) добавляли DIEA (1,53 мл, 9,25 ммоль), HOAt (503,75 мг, 3,70 ммоль) и HATU (1,41 г, 3,70 ммоль). Желтую суспензию перемешивали в течение 30 мин при КТ, затем добавляли фрагмент AD2 (1,7 г, 3,08 ммоль). Реакционную среду перемешивали в течение 2 ч при КТ. По истечении этого времени добавляли 1,53 мл DIEA и перемешивали в течение 1 ч. Смесь нейтрализовали 1М лимонной кислотой (50 мл) и экстрагировали AcOEt (2×80 мл). Органические слои промывали 1М NaHSO₄, H₂O, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали и очищали с помощью флэш-хроматографии на 100 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/AcOEt) с получением 1,475 г соединения 35 в виде бесцветного твердого вещества (57%).

Соединение 36: (2E,5S,6R,7E)-5-(((S)-2-(3-((R)-2-амино-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилпропанамидо)-4,4-диметилпентаноилокси)-8-(4-(гидроксиметил)фенил)-6-метилокта-2,7-диеновая кислота.

В круглодонную колбу к раствору соединения 35 (1,475 г, 1,69 ммоль) в ДХМ (20 мл) добавляли ТФУК (8 мл, 52,27 ммоль) и H₂O (2 мл). Реакционную среду перемешивали в течение 5 ч при КТ. Растворитель удаляли. Остаток разбавляли H₂O (20 мл) и AcOEt (20 мл) и обрабатывали 2М NaOH (2 мл) в течение 2 ч при КТ. Органический слой отделяли и водн. слой экстрагировали AcOEt (2×10 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали с получением 1,24 г бесцветного твердого вещества. Твердое вещество растворяли в AcOEt (10 мл) и H₂O (10 мл) и обрабатывали 2М NaOH (400 мкл) в течение 2 ч при КТ. Органический слой отделяли, водн. слой экстрагировали AcOEt (2×10 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали и очищали с помощью флэш-хроматографии на 100 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/AcOEt) с получением 990 мг соединения 36 в виде белого твердого вещества (82%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,80 (с, 9H); 0,99 (с, 3H); 1,02 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,05 (с, 3H); 1,52 (дд, J=2,0 и 14,8 Гц, 1H); 1,69 (дд, J=9,9 и 14,8 Гц, 1H); 2,36-2,61 (частично скрытый м, 4H); 2,84 (дд, J=5,0 и 13,9 Гц, 1H); 3,18 (д, J=7,5 Гц, 2H); 3,40 (дд, J=5,1 и 8,1 Гц, 1H); 3,80 (с, 3H); 4,29 (м, 1H); 4,45 (с, 2H); 4,90 (м, 1H); 5,12 (уш.м, 1H); 5,81 (д, J=15,5 Гц, 1H); 6,10 (дд, J=8,4 и 15,9 Гц, 1H); 6,40 (д, J=15,9 Гц, 1H); 6,70 (тд, J=7,5 и 15,5 Гц, 1H); 7,01 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,11 (дд, J=2,4 и 8,7 Гц, 1H); 7,25 (м, 3H); 7,32 (д,

$J=8,2$ Гц, 2H); 7,72 (т, $J=6,5$ Гц, 1H); 7,79 (д, $J=7,8$ Гц, 1H).

ЖХМС (A1): ES $m/z=712$ [M-H]⁻; $m/z=714$ [M+H]⁺; $t_R=0,94$ мин.

Соединение 37: (3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-16-((R,E)-4-(4-(гидроксиметил)фенил)бут-3-ен-2-ил)-6,6-диметил-3-неопентил-1-окса-4,8,11-триазациклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу вводили соединение 36 (990 мг, 1,39 ммоль) и CH₃CN (150 мл), нагревали на водяной бане при 50°C до полной солиubilизации и перемешивали в течение 10 мин. После этого добавляли DIEA (687,20 мкл, 4,16 ммоль), HOAt (207,51 мг, 1,52 ммоль) и HATU (579,7 мг, 1,52 ммоль) и перемешивали в течение 30 мин при КТ. Реакционную среду нейтрализовали 1М лимонной кислотой (30 мл). Растворитель удаляли и водн. слой экстрагировали AcOEt (2×40 мл). Органические слои промывали 1М NaHSO₄, H₂O, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали. Неочищенное твердое вещество разбавляли H₂O (200 мл) и перемешивали в течение 1 ч. Твердое вещество отфильтровывали, затем разбавляли AcOEt, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали с получением смеси соединения 37 и HATU. Твердое вещество перемешивали с MeTGF (50 мл) и H₂O (50 мл). Органический слой отделяли, промывали H₂O (4×20 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали и очищали с помощью флэш-хроматографии на 10 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/AcOEt) с получением 680 мг соединения 37 в виде бесцветного твердого вещества (70%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,68 (с, 9H); 0,98 (с, 3H); 1,03 (с, 3H); 1,09 (д, $J=6,9$ Гц, 3H); 1,19 (уш.д, $J=14,5$ Гц, 1H); 1,58 (дд, $J=10,3$ и 14,5 Гц, 1H); 2,23 (м, 1H); 2,52-2,70 (м, 3H); 2,86 (уш.д, $J=12,7$ Гц, 1H); 3,00 (дд, $J=3,3$ и 14,8 Гц, 1H); 3,22-3,33 (частично скрытый м, 1H); 3,80 (с, 3H); 4,18 (м, 1H); 4,42 (м, 1H); 4,46 (д, $J=6,0$ Гц, 2H); 4,91 (м, 1H); 5,13 (т, $J=6,0$ Гц, 1H); 5,85 (уш.д, $J=15,0$ Гц, 1H); 6,05 (дд, $J=8,4$ и 15,9 Гц, 1H); 6,40 (м, 2H); 7,03 (д, $J=8,7$ Гц, 1H); 7,18 (дд, $J=2,2$ и 8,7 Гц, 1H); 7,25 (д, $J=8,5$ Гц, 2H); 7,29 (д, $J=2,2$ Гц, 1H); 7,31 (д, $J=8,5$ Гц, 2H); 7,42 (д, $J=10,6$ Гц, 1H); 7,94 (д, $J=9,1$ Гц, 1H); 8,41 (д, $J=8,2$ Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES $m/z=694$ [M-H]⁻; $m/z=696$ [M+H]⁺; $t_R=1,36$ мин.

Соединение 38: (3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6-диметил-3-неопентил-16-((R,E)-4-(4-(((триизопропилсилил)окси)метил)фенил)бут-3-ен-2-ил)-1-окса-4,8,11-триазациклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

В атмосфере аргона при 0°C в круглодонную колбу к раствору соединения 37 (680 мг, 0,976 ммоль) в CHCl₃ (10 мл) добавляли 1H-имидазол (305,84 мг, 4,49 ммоль) и хлортриизопропилсилан (480,13 мкл, 2,25 ммоль). Реакционную среду перемешивали в течение 5 ч при КТ, затем разбавляли насыщ. NH₄Cl и МГБЭ (30 мл). Органический слой промывали 1М NaHSO₄, насыщ. NaHCO₃, насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали с получением 970 мг соединения 38 в виде оранжевого аморфного твердого вещества (колич.).

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,63 (с, 9H); 0,87-1,17 (м, 31H); 1,53 (дд, $J=10,9$ и 14,3 Гц, 1H); 2,22 (м, 1H); 2,51-2,70 (м, 3H); 2,86 (уш.д, $J=13,0$ Гц, 1H); 3,00 (дд, $J=3,2$ и 14,9 Гц, 1H); 3,24-3,35 (частично скрытый м, 1H); 3,80 (с, 3H); 4,18 (м, 1H); 4,41 (м, 1H); 4,76 (с, 2H); 4,91 (м, 1H); 5,87 (уш.д, $J=15,4$ Гц, 1H); 6,06 (дд, $J=8,9$ и 15,9 Гц, 1H); 6,40 (м, 2H); 7,03 (д, $J=8,5$ Гц, 1H); 7,18 (уш.д, $J=8,5$ Гц, 1H); 7,25 (д, $J=8,3$ Гц, 2H); 7,28 (д, $J=8,3$ Гц, 2H); 7,30 (уш.с., 1H); 7,42 (д, $J=10,5$ Гц, 1H); 7,93 (д, $J=9,2$ Гц, 1H); 8,42 (д, $J=8,1$ Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES $m/z=850$ [M-H]⁻; $m/z=852$ [M+H]⁺; $m/z=896$ [M-H+HCO₂H]⁻; $t_R=2,15$ мин.

Пример 4. (3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(гидроксиметил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-6,6-диметил-3-неопентил-1-окса-4,8,11-триазациклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

Пример 4 получали за 2 стадии.

Стадия 1: в атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору соединения 38 (832 мг, 0,976 ммоль) в ДХМ (10 мл) добавляли за три раза м-СРВА (339,15 мг, 1,51 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 50 ч при КТ, затем разбавляли ДХМ (10 мл) и перемешивали в течение 15 мин с насыщ. NaHCO₃ (30 мл) и Na₂S₂O₃ (30 мл). Органический слой отделяли, промывали насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали с получением 1,1 г смеси α - и β -эпоксидов в виде бесцветной пены (колич.).

Стадия 2: смесь α - и β -эпоксидов разбавляли в ТГФ (30 мл) и добавляли 1М TBAF (952,32 мкл). После перемешивания в течение 2 ч добавляли 952 мкл TBAF. После перемешивания в течение 1 ч смесь разбавляли H₂O (50 мл) и экстрагировали AcOEt (3×50 мл). Органические слои промывали насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали с получением 770 мг смеси α - и β -эпоксидов в виде желтого твердого вещества (колич.). α - и β -эпоксиды разделяли с помощью хиральной жидкостной хроматографии, которую проводили на колонке 76×350 мм, заполненной 1,1 кг 10 мкм Chiralpak AD (трис-3,5-диметилфенилкарбамат амилозы, покрытый на носителе из силикагеля, Chiral Technologies Europe), используя изократическое элюирование с 75:25 гептан/EtOH. После концентрирования получали 190 мг примера 4 в виде белого твердого вещества (31%) и 125 мг α -эпоксида в виде белого твердого вещества (20%).

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,81 (с, 9H); 0,98 (с, 3H); 1,03 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 1,05 (с, 3H);

1,26 (м, 1H); 1,71 (дд, J=10,4 и 14,5 Гц, 1H); 1,82 (м, 1H); 2,26 (м, 1H); 2,52 (м, 2H); 2,84 (д, J=12,8 Гц, 1H); 2,92 (дд, J=2,1 и 7,8 Гц, 1H); 3,00 (дд, J=3,1 и 14,5 Гц, 1H); 3,24-3,36 (частично скрытый м, 1H); 3,81 (с, 3H); 3,90 (д, J=2,1 Гц, 1H); 4,17 (ддд, J=3,4, 8,0 и 11,7 Гц, 1H); 4,42 (м, 1H); 4,50 (д, J=6,0 Гц, 2H); 5,10 (м, 1H); 5,20 (т, J=6,0 Гц, 1H); 5,79 (дд, J=1,8 и 15,4 Гц, 1H); 6,39 (ддд, J=3,8, 11,5 и 15,4 Гц, 1H); 7,05 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,16 (дд, J=2,1 и 8,6 Гц, 1H); 7,26 (д, J=8,3 Гц, 2H); 7,29 (д, J=2,1 Гц, 1H); 7,32 (д, J=8,3 Гц, 2H); 7,41 (д, J=10,3 Гц, 1H); 8,02 (д, J=9,2 Гц, 1H); 8,38 (д, J=8,2 Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=710 [M-H]⁻; m/z=712 [M+H]⁺; t_R=1,28 мин.

Соединение 39: (3S,10R,16S,E)-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(азидометил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6-диметил-3-неопентил-1-окса-4,8,11-триазациклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору примера 4 (100 мг, 140 мкмоль) в ТГФ (5 мл) добавляли ДФФА (156,82 мкл, 701,98 мкмоль) и DBU (110,22 мкл, 701,98 мкмоль). Раствор перемешивали в течение 6 ч при КТ, затем разбавляли H₂O и экстрагировали AcOEt (3×30 мл). Органический слой отделяли, промывали насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали и очищали на 15 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/iPrOH) с получением 100 мг соединения 39 в виде белого твердого вещества (40%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,80 (с, 9H); 0,97 (с, 3H); 1,03 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,04 (с, 3H); 1,28 (д, J=14,5 Гц, 1H); 1,69 (дд, J=10,7 и 14,5 Гц, 1H); 1,84 (м, 1H); 2,28 (м, 1H); 2,62 (м, 2H); 2,84 (д, J=12,8 Гц, 1H); 2,93-3,03 (м, 2H); 3,22-3,34 (частично скрытый м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,92 (уш.с, 1H); 4,17 (м, 1H); 4,40-4,49 (м, 3H); 5,10 (м, 1H); 5,80 (д, J=15,8 Гц, 1H); 6,39 (ддд, J=3,8, 11,7 и 15,8 Гц, 1H); 7,03 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,16 (дд, J=2,2 и 8,7 Гц, 1H); 7,28 (д, J=2,1 Гц, 1H); 7,32 (д, J=8,3 Гц, 2H); 7,39 (д, J=8,3 Гц, 2H); 7,41 (м, 1H); 8,00 (д, J=9,1 Гц, 1H); 8,36 (д, J=8,2 Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=735 [M-H]⁻; m/z=737 [M+H]⁺; t_R=1,54 мин.

Пример 5. (3S,10R,16S,E)-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(аминометил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6-диметил-3-неопентил-1-окса-4,8,11-триазациклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

В круглодонную колбу к раствору соединения 39 (100 мг, 122,07 мкмоль) в ДХМ (2,5 мл) и MeOH (2,5 мл) добавляли по каплям раствор ТСЕР (38,88 мг, 134,28 мкмоль) в H₂O (500 мкл). Реакционную среду перемешивали в течение 24 ч при КТ. Реакционную смесь разбавляли H₂O и насыщ. NaHCO₃, экстрагировали ДХМ (3×10 мл). Органический слой отделяли, промывали насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали с получением 73 мг примера 5 в виде белого твердого вещества (84%), используемого без дополнительной очистки на следующей стадии.

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,82 (с, 9H); 0,97 (с, 3H); 1,03 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,04 (с, 3H); 1,29 (д, J=14,4 Гц, 1H); 1,70 (дд, J=10,2 и 14,4 Гц, 1H); 1,80 (м, 1H); 2,02 (уш.м, 2H); 2,25 (м, 1H); 2,62 (м, 2H); 2,83 (д, J=13,0 Гц, 1H); 2,93 (дд, J=2,2 и 7,8 Гц, 1H); 2,99 (дд, J=3,4 и 14,5 Гц, 1H); 3,23-3,35 (частично скрытый м, 1H); 3,71 (с, 2H); 3,80 (с, 3H); 3,88 (д, J=2,2 Гц, 1H); 4,17 (ддд, J=3,5, 8,5 и 11,5 Гц, 1H); 4,41 (м, 1H); 5,09 (м, 1H); 5,79 (д, J=15,7 Гц, 1H); 6,39 (ддд, J=3,7, 11,4 и 15,7 Гц, 1H); 7,05 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,16 (дд, J=2,3 и 8,7 Гц, 1H); 7,22 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,28 (д, J=2,3 Гц, 1H); 7,34 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,40 (д, J=10,3, 1H); 8,02 (д, J=8,9 Гц, 1H); 8,38 (д, J=8,2 Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=709 [M-H]⁻; m/z=711 [M+H]⁺; t_R=0,86 мин.

Соединение 40: (9H-флуорен-9-ил)метил-((S)-1-(((S)-1-((4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6-диметил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазациклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу вводили пример 5 (73 мг, 82,10 мкмоль) и ДМФ (1 мл) с последующим добавлением FmocValAla (50,55 мг, 123,16 мкмоль), HOBt (17,75 мг, 131,37 мкмоль), ДХМ (10 мл) и EDC (14,53 мкл, 82,10 мкмоль). Раствор перемешивали в течение 4 ч при КТ, затем разбавляли H₂O (10 мл) и экстрагировали ДХМ (3×20 мл). Органический слой отделяли, промывали H₂O, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали и очищали на 15 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/iPrOH) с получением 90 мг соединения 40 в виде бесцветного твердого вещества (99%).

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,80 (с, 9H); 0,84 (д, J=7,1 Гц, 3H); 0,86 (д, J=7,1 Гц, 3H); 0,93 (с, 3H); 1,02 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,04 (с, 3H); 1,24 (д, J=7,3 Гц, 3H); 1,29 (д, J=14,5 Гц, 1H); 1,70 (дд, J=10,5 и 14,5 Гц, 1H); 1,81 (м, 1H); 1,99 (м, 1H); 2,25 (м, 1H); 2,60 (м, 2H); 2,82 (д, J=13,0 Гц, 1H); 2,91 (дд, J=1,9 и 7,6 Гц, 1H); 2,99 (дд, J=3,4 и 14,5 Гц, 1H); 3,29 (м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,88 (д, J=1,9 Гц, 1H); 3,90 (м, 1H); 4,16 (ддд, J=3,4, 8,0 и 11,8 Гц, 1H); 4,20-4,35 (м, 6H); 4,41 (м, 1H); 5,09 (м, 1H); 5,79 (д, J=15,7 Гц, 1H); 6,39 (ддд, J=3,7, 11,6 и 15,7 Гц, 1H); 7,05 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,15 (дд, J=2,5 и 8,6 Гц, 1H); 7,21 (д, J=8,5 Гц, 2H); 7,24 (д, J=8,5 Гц, 2H); 7,28 (д, J=2,5 Гц, 1H); 7,32 (т, J=7,9 Гц, 2H); 7,38-7,47 (м, 4H); 7,73 (т, J=7,9 Гц, 2H); 7,89 (д, J=7,9 Гц, 2H); 8,03 (д, J=9,1 Гц, 1H); 8,05 (д, J=7,9 Гц, 1H); 8,39 (м, 2H). ЖХМС (A1): ES m/z=1103 [M+H]⁺; m/z=1147 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=1,71 мин.

Соединение 41: (S)-2-амино-N-((S)-1-((4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6-диметил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазациклогексадек-13-ен-16-ил)

этил)оксиран-2-ил)бензил)амино)-1-оксопропан-2-ил)-3-метилбутанамид.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу вводили соединение 40 (104 мг, 76,65 мкмоль) в ДХМ (5 мл) с последующим добавлением пиперидина (138,87 мкл, 1,40 ммоль). Раствор перемешивали в течение 5 ч при КТ, затем концентрировали и очищали на 10 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH/H₂O) с получением 50 мг соединения 41 в виде бесцветного твердого вещества (60%).

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,76 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,81 (с, 9H); 0,88 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,97 (с, 3H); 1,02 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,04 (с, 3H); 1,22 (д, J=7,3 Гц, 3H); 1,29 (д, J=14,6 Гц, 1H); 1,66 (уш.м, 2H); 1,70 (дд, J=10, 6 и 14,6 Гц, 1H); 1,81 (м, 1H); 1,92 (м, 1H); 2,25 (м, 1H); 2,60 (м, 2H); 2,83 (д, J=13,0 Гц, 1H); 2,93 (дд, J=1,9 и 7,4 Гц, 1H); 2,99 (м, 2H); 3,28 (дд, J=10,4 и 13,0 Гц, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,89 (д, J=1,9 Гц, 1H); 4,16 (ддд, J=3,2 и 8,2 и 11,8 Гц, 1H); 4,29 (д, J=6,0 Гц, 2H); 4,34 (м, 1H); 4,41 (м, 1H); 5,09 (м, 1H); 5,79 (дд, J=1,7 и 15,5 Гц, 1H); 6,38 (ддд, J=3,8, 11,3 и 15,5 Гц, 1H); 7,04 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,16 (дд, J=2,2 и 8,7 Гц, 1H); 7,25 (м, 4H); 7,29 (д, J=2,2 Гц, 1H); 7,40 (д, J=10,4 Гц, 1H); 8,02 (д, J=9,1 Гц, 1H); 8,08 (д большой, J=7,7 Гц, 1H); 8,39 (д, J=8,2 Гц, 1H); 8,45 (т, J=6,0 Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=441 [M+2H]²⁺; m/z=879 [M-H]⁻; m/z=881 [M+H]⁺; m/z=925 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=0,99 мин.

Соединение 42: 5-(((S)-1-(((S)-1-((4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6-диметил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазаациклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-5-оксопентановая кислота.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу вводили соединение 41 (50 мг, 51,05 мкмоль) в ДХМ (10 мл) с последующим добавлением глутарового ангидрида (10,48 мг, 91,89 мкмоль). Реакционную среду перемешивали в течение 2 ч при КТ, концентрировали и очищали на 10 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH/H₂O) с получением 42 мг соединения 42 в виде бесцветного твердого вещества (82%).

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,80 (с, 9H); 0,82 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,85 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,97 (с, 3H); 1,02 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,04 (с, 3H); 1,23 (д, J=7,2 Гц, 3H); 1,29 (д, J=14,2 Гц, 1H); 1,70 (м, 3H); 1,81 (м, 1H); 1,96 (м, 1H); 2,18-2,25 (м, 5H); 2,61 (м, 2H); 2,83 (д, J=13,0 Гц, 1H); 2,93 (дд, J=2,0 и 7,4 Гц, 1H); 3,00 (дд, J=3,1 и 14,5 Гц, 1H); 3,29 (дд, J=10,4 и 13,0 Гц, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,89 (д, J=2,0 Гц, 1H); 4,16 (м, 2H); 4,25-4,31 (м, 3H); 4,42 (м, 1H); 5,09 (м, 1H); 5,79 (дд, J=1,9 и 15,5 Гц, 1H); 6,39 (ддд, J=3,8, 11,6 и 15,5 Гц, 1H); 7,05 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,15 (дд, J=2,1 и 8,7 Гц, 1H); 7,23 (м, 4H); 7,28 (д, J=2,1 Гц, 1H); 7,40 (д, J=10,4 Гц, 1H); 7,83 (д, J=8,7 Гц, 1H); 8,02 (м, 2H); 8,35 (т, J=6,1 Гц, 1H); 8,39 (д, J=8,0 Гц, 1H); 12,04 (уш.м, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=498 [M+2H]²⁺; m/z=993 [M-H]⁻; m/z=995 [M+H]⁺; t_R=1,27 мин.

Пример 6. 2,5-Диоксипирролидин-1-ил-5-(((S)-1-(((S)-1-((4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6-диметил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазаациклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-5-оксопентановая кислота.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу вводили соединение 42 (23 мг, 23,10 мкмоль) в ДХМ (5 мл) с последующим добавлением ДСК (8,29 мг, 32,34 мкмоль) и DIEA (5,63 мкл, 32,34 мкмоль). Реакционную среду перемешивали в течение 2 ч при КТ. По истечении этого времени добавляли 2 мг ДСК, 1 мкл DIEA и ДХМ (2 мл) и перемешивали в течение 1 ч при КТ. Растворитель удаляли и неочищенный остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на 10 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/iPrOH) с получением 20 мг примера 6 в виде бесцветного твердого вещества (79%).

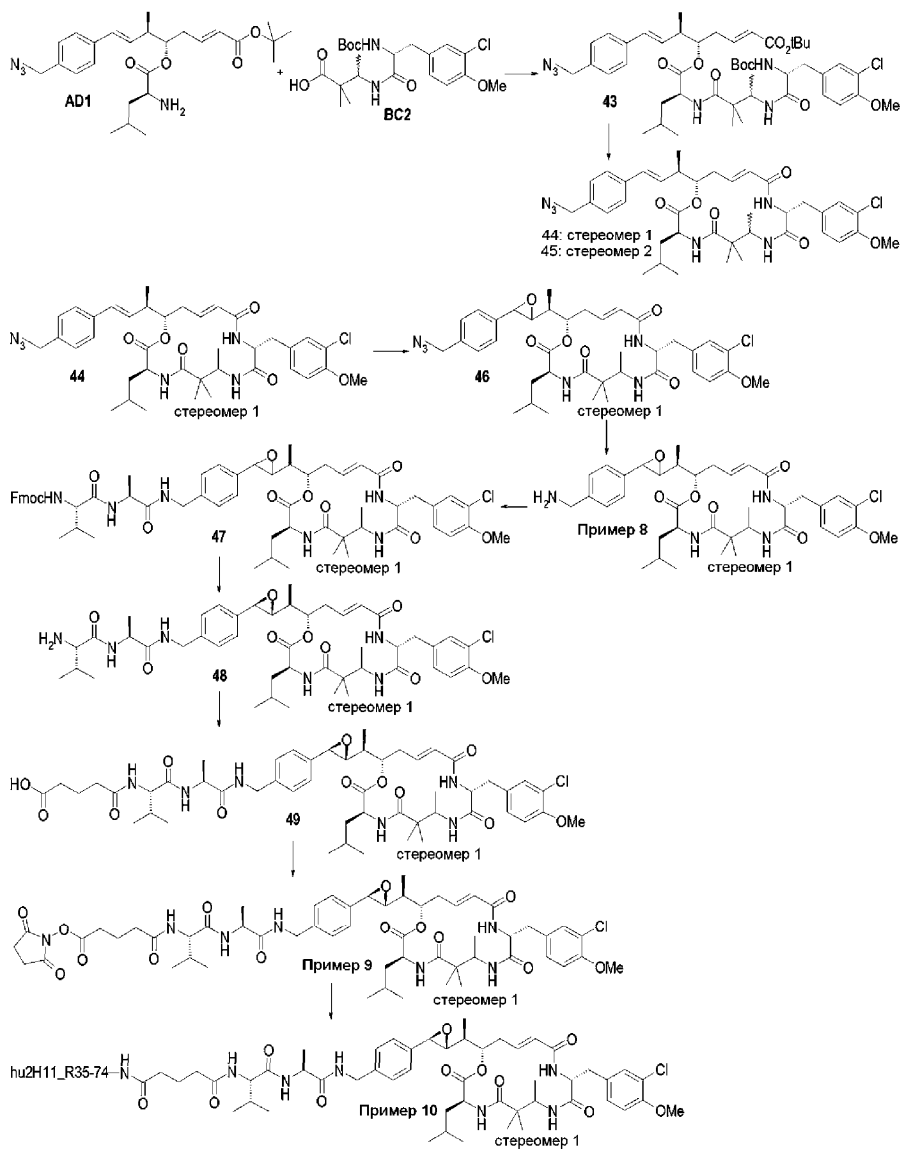
¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,80 (с, 9H); 0,82 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,85 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,97 (с, 3H); 1,02 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,04 (с, 3H); 1,23 (д, J=7,2 Гц, 3H); 1,30 (д, J=14,2 Гц, 1H); 1,70 (дд, J=10,7 и 14,7 Гц, 1H); 1,81 (м, 3H); 1,97 (м, 1H); 2,21-2,32 (м, 3H); 2,61 (м, 2H); 2,68 (т, J=7,8 Гц, 2H); 2,80 (уш.с, 4H); 2,83 (д, J=13,0 Гц, 1H); 2,94 (дд, J=2,0 и 7,6 Гц, 1H); 3,00 (дд, J=3,4 и 14,9 Гц, 1H); 3,28 (дд, J=10,5 и 13,0 Гц, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,88 (д, J=2,0 Гц, 1H); 4,16 (м, 2H); 4,23-4,31 (м, 3H); 4,42 (м, 1H); 5,10 (м, 1H); 5,79 (дд, J=1,9 и 15,3 Гц, 1H); 6,39 (ддд, J=3,8, 11,4 и 15,3 Гц, 1H); 7,05 (д, J=8,8 Гц, 1H); 7,16 (дд, J=2,2 и 8,8 Гц, 1H); 7,23 (м, 4H); 7,28 (д, J=2,2 Гц, 1H); 7,40 (д, J=10,5 Гц, 1H); 7,89 (д, J=8,7 Гц, 1H); 8,02 (д, J=9,1 Гц, 1H); 8,06 (д, J=7,5 Гц, 1H); 8,34 (т, J=6,1 Гц, 1H); 8,39 (д, J=8,1 Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=546,5 [M+2H]²⁺; m/z=1090 [M-H]⁻; m/z=1092 [M+H]⁺; m/z=1136 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=1,34 мин.

Пример 7. mAb-Пр. 6.

Общий способ, описанный ранее, был использован для получения примера 7. 60 мг hu2H11_R35-74 подвергали взаимодействию с 233 мкл 10,6 мМ раствора примера 6 в ДМА (5 экв.) в течение 2 ч. После очистки на Superdex 200 pg в DPBS pH 6,5+20% NMP, концентрирования на Amicon Ultra-15, буферного обмена на NAP-25 в буфере В pH 6,5+5% NMP и фильтрования на Steriflip 39 мг примера 7 получали в виде бесцветного прозрачного раствора в концентрации 1,98 мг/мл с DAR 4,1 (MCBP), мономерной чистотой 100% и общим выходом 66%.

SEC-MCBP: спектр для интактного ADC на фиг. 2; m/z=149370 (голое mAb); m/z=150357 (D1); m/z=151330 (D2); m/z=152307 (D3); m/z=153285 (D4); m/z=154262 (D5); m/z=155238 (D6); m/z=156222 (D7).

Синтез примеров 8-10: бензилового амина 7-Ме-аза-C52 стереоизомера 1, NHS-эфира глутарил-Val-Ala-7-Ме-аза-C52-бензилового эфира стереоизомера 1 и соответствующего ADC



Соединение 43: (6R,13S)-(1E,3R,4S,6E)-1-(4-(азидометил)фенил)-8-(трет-бутокси)-3-метил-8-оксоокта-1,6-диен-4-ил-6-(3-хлор-4-метоксибензил)-13-изобутил-2,2,9,10,10-пентаметил-4,7,11-триоксо-3-окса-5,8,12-триазатетрадекан-14-оат.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу вводили фрагмент BC2 (1,10 г, 2,48 ммоль) в ДМФ (5 мл) с последующим добавлением НАТУ (950 мг, 2,5 ммоль) и HOAt (340 мг, 2,5 ммоль). Смесь перемешивали в течение 30 мин при КТ, затем добавляли фрагмент AD1 (1,24 г, 2,18 ммоль) и DIEA (1,2 мл, 6,87 ммоль). Желтый раствор перемешивали в течение 16 ч при КТ, гасили H₂O и экстрагировали AcOEt (3×30 мл). Органические слои промывали H₂O, насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали и очищали на 200 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/AcOEt) с получением 1,55 г соединения 43 в виде белого безе (77%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 55/45 смесь диастереомеров; 0,82-0,89 (м, 6H); 0,85 (д, J=7,0 Гц, 1,65H); 0,91 (д, J=7,0 Гц, 1,35H); 0,99-1,09 (м, 9H); 1,30 (с, 9H); 1,40 (с, 10H); 1,50-1,70 (м, 2H); 2,38-2,59 (частично скрытый м, 3H); 2,68 (м, 1H); 2,84 (м, 1H); 3,79 (с, 1,35H); 3,81 (с, 1,65H); 4,00-4,18 (м, 2H); 4,30 (м, 1H); 4,40 (уш.с, 2H); 4,92 (м, 1H); 5,81 (д, J=15,7 Гц, 1H); 6,18 (дд, J=8,3 и 16,1 Гц, 1H); 6,45 (д, J=16,1 Гц, 1H); 6,71 (тд, J=7,3 и 15,7 Гц, 1H); 6,94 (д, J=8,1 Гц, 0,45H); 6,96 (д, J=8,1 Гц, 0,55H); 7,04 (расщепл. д J=8,7 Гц, 1H); 7,19 (уш.д, J=8,7 Гц, 1H); 7,30 (д, J=7,8 Гц, 2H); 7,32 (уш.с, 1H); 7,41 (д, J=8,7 Гц, 2H); 7,52 (д, J=10,1 Гц, 0,45H); 7,59 (д, J=10,1 Гц, 0,55H); 7,74 (м, 1H). ЖХМС (A1): смесь диастереомеров 55/45; ES m/z=895 [M+H]⁺; m/z=917 [M+Na]⁺; t_R=6,94-6,98 мин.

Соединения 44 и 45: (3S,10R,16S,E)-16-((R,E)-4-(4-(азидометил)фенил)бут-3-ен-2-ил)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-3-изобутил-6,6,7-триметил-1-окса-4,8,11-триазациклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

Соединения 44 и 45 получали за две стадии.

Стадия 1: при 0°C в круглодонную колбу к раствору соединения 43 (1,50 г, 1,67 ммоль) в 11 мл ДХМ добавляли ТФУК (2,6 мл, 34,65 ммоль) и 100 мкл H₂O. Смесь перемешивали в течение 15 мин при 0°C и при КТ в течение 6,5 ч. Реакционную среду затем испаряли под вакуумом и соиспаряли в присут-

ствии толуола с получением 1,7 г незащищенного интермедиата в виде оранжевого твердого вещества.

^1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMCO-d_6): смесь диастереомеров 55/45; 0,70-0,80 (м, 7,65H); 0,90 (с, 1,35H); 0,95 (м, 3H); 1,01-1,09 (м, 6H); 1,38-1,68 (м, 3H); 2,40-2,60 (частично скрытый м, 3H); 2,80-3,02 (м, 2H); 3,81 (с, 1,35H); 3,82 (с, 1,65H); 3,96-4,08 (м, 1H); 4,18 (м, 1H); 4,28 (м, 1H); 4,41 (с, 2H); 4,91 (м, 1H); 5,83 (д, $J=15,7$ Гц, 0,45H); 5,85 (д, $J=15,7$ Гц, 0,55H); 6,18 (м, 1H); 6,43 (д, $J=16,1$ Гц, 0,45H); 6,46 (д, $J=16,1$ Гц, 0,55H); 6,74 (м, 1H); 7,08-7,20 (м, 2H); 7,30 (скрытый м, 0,45H); 7,32 (д, $J=7,8$ Гц, 2H); 7,37 (д, $J=2,0$ Гц, 0,55H); 7,42 (м, 2H); 7,76 (д, $J=8,00$ Гц, 0,45H); 7,79 (д, $J=8,00$ Гц, 0,55H); 7,86 (д, $J=10,1$ Гц, 0,55H); 8,00 (д, $J=10,1$ Гц, 0,45H); 8,11 (уш.м, 3H); 12,22 (уш.м, 1H). ЖХМС (A1): смесь диастереомеров 55/45; ES $m/z=737$ $[\text{M-H}]^-$; $m/z=739$ $[\text{M+H}]^+$; $t_R=1,07$ -1,09 мин.

Стадия 2: в круглодонную колбу к раствору незащищенного интермедиата (1,43 г, 1,68 ммоль) в 25 мл CH_3CN добавляли DIEA (3 мл, 16,23 ммоль), HOAt (250,91 мг, 1,84 ммоль) и HATU (700,91 мг, 1,84 ммоль). Смесь перемешивали в течение 1 ч при КТ. Затем растворитель удаляли, среду разбавляли AcOEt (200 мл), нейтрализовали 0,5М лимонной кислотой и HCl. Органический слой отделяли, промывали насыщ. NaHSO_3 , насыщ. NaHCO_3 , насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали, концентрировали и очищали на 100 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 640 мг соединений 44 и 45 в виде желтого твердого вещества (53%).

Диастереомеры при C7 разделяли с помощью хиральной жидкостной хроматографии, которую проводили на колонке 76,5×350 мм, заполненной 1,1 кг 10 мкм Whelk 01 SS (4-(3,5-динитробензамидо)тетрагидрофенантрен, Regis Technologies) с использованием изократического элюирования с 50:50 гептан/EtOH. После концентрирования 210 мг соединения 44 (стереоизомер 1) получали в виде белого твердого вещества (17%) и 236 мг соединения 45 (стереоизомер 2) получали в виде белого твердого вещества (19%).

Соединение 44 (стереоизомер 1):

^1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMCO-d_6): 0,60 (д, $J=6,7$ Гц, 3H); 0,62 (д, $J=6,7$ Гц, 3H); 0,98 (с, 3H); 1,05 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 1,10 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 1,14 (с, 3H); 1,18 (м, 1H); 1,40-1,54 (м, 2H); 2,24 (м, 1H); 2,48-2,61 (частично скрытый м, 2H); 2,65 (дд, $J=11,8$ и 14,5 Гц, 1H); 3,04 (дд, $J=3,2$ и 14,5 Гц, 1H); 3,55 (м, 1H); 3,81 (с, 3H); 4,19 (м, 2H); 4,40 (с, 2H); 4,96 (м, 1H); 5,91 (дд, $J=1,4$ и 15,5 Гц, 1H); 6,13 (дд, $J=8,9$ и 16,1 Гц, 1H); 6,40 (ддд, $J=3,9$, 11,3 и 15,5 Гц, 1H); 6,46 (д, $J=16,1$ Гц, 1H); 7,03 (д, $J=8,7$ Гц, 1H); 7,19 (дд, $J=2,1$ и 8,7 Гц, 1H); 7,30 (д, $J=2,1$ Гц, 1H); 7,32 (д, $J=8,4$ Гц, 2H); 7,41 (д, $J=8,4$ Гц, 2H); 7,87 (д, $J=8,9$ Гц, 1H); 8,36 (д, $J=9,9$ Гц, 1H); 8,40 (д, $J=8,0$ Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES $m/z=719$ $[\text{M-H}]^-$; $m/z=721$ $[\text{M+H}]^+$; $t_R=1,61$ мин.

Соединение 45 (стереоизомер 2):

^1H -ЯМР (δ в м.д., DMCO-d_6): 0,59 (д, $J=6,7$ Гц, 3H); 0,67 (д, $J=6,7$ Гц, 3H); 0,88 (д, $J=6,7$ Гц, 3H); 1,03 (с, 3H); 1,10 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 1,19 (с, 3H); 1,21 (м, 1H); 1,49-1,60 (м, 2H); 2,23 (м, 1H); 2,46-2,61 (частично скрытый м, 2H); 2,71 (дд, $J=11,3$ и 14,5 Гц, 1H); 2,98 (дд, $J=3,7$ и 14,5 Гц, 1H); 3,48 (м, 1H); 3,80 (с, 3H); 4,05 (м, 1H); 4,11 (ддд, $J=3,7$, 7,6 и 11,3 Гц, 1H); 4,40 (с, 2H); 4,90 (м, 1H); 5,93 (д, $J=15,7$ Гц, 1H); 6,14 (дд, $J=8,7$ и 16,1 Гц, 1H); 6,47 (д, $J=16,1$ Гц, 1H); 6,51 (ддд, $J=5,2$, 10,3 и 15,5 Гц, 1H); 7,02 (д, $J=8,7$ Гц, 1H); 7,21 (дд, $J=2,4$ и 8,7 Гц, 1H); 7,31 (д, $J=8,4$ Гц, 2H); 7,37 (д, $J=2,4$ Гц, 2H); 7,41 (д, $J=8,4$ Гц, 2H); 7,87 (д, $J=6,9$ Гц, 1H); 7,89 (д, $J=9,0$ Гц, 1H); 8,51 (д, $J=7,6$ Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES $m/z=719$ $[\text{M-H}]^-$; $m/z=721$ $[\text{M+H}]^+$; $t_R=1,61$ мин.

Соединение 46: (3S,10R,16S,E)-16-((S)-1-(3-(4-(азидометил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-3-изобутил-6,6,7-триметил-1-окса-4,8,11-триазабис(гексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон).

При 0°C в атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору соединения 44 (154 мг, 213,51 мкмоль) в ДХМ (10 мл) добавляли м-CPBA (80 мг, 324,51 мкмоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 5 д. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (15 мл) и перемешивали 15 мин с насыщ. NaHCO_3 (6 мл) и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (6 мл). Органический слой отделяли, промывали насыщ. соевым раствором (2×3 мл), высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали и концентрировали с получением 150 мг соединения 46 в виде белого твердого вещества (колич.).

^1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMCO-d_6): смесь диастереомеров 60/40; 0,75 (д, $J=6,8$ Гц, 1,8H); 0,79 (д, $J=6,8$ Гц, 3H); 0,85 (д, $J=6,8$ Гц, 1,2H); 0,95-0,99 (м, 4,2H); 1,02-1,09 (м, 4,8H); 1,15 (с, 1,8H); 1,18 (с, 1,2H); 1,20 (м, 0,6H); 1,38 (м, 0,4H); 1,59-1,62 (м, 2H); 1,80 (м, 0,6H); 1,89 (м, 0,4H); 2,25 (м, 0,6H); 2,40-2,71 (частично скрытый м, 2,4H); 2,96-3,08 (м, 2H); 3,54 (м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,82 (д, $J=1,9$ Гц, 0,4H); 3,92 (д, $J=1,9$ Гц, 0,6H); 4,14-4,29 (м, 2H); 4,40-4,50 (м, 2H); 5,11 (м, 1H); 5,85 (дд, $J=2,0$ и 15,5 Гц, 0,6H); 5,95 (дд, $J=2,0$ и 15,5 Гц, 0,4H); 6,38 (м, 1H); 7,04 (расщепл. д, $J=8,8$ Гц, 1H); 7,16 (дд, $J=2,2$ и 8,8 Гц, 0,6H); 7,19 (дд, $J=2,2$ и 8,8 Гц, 0,4H); 7,28 (д, $J=2,2$ Гц, 0,6H); 7,30 (д, $J=2,2$ Гц, 0,4H); 7,30-7,40 (м, 4H); 7,89 (д, $J=8,1$ Гц, 0,6H); 7,92 (д, $J=8,1$ Гц, 0,4H); 8,29 (д, $J=10,0$ Гц, 0,6H); 8,32 (д, $J=8,1$ Гц, 0,6H); 8,35 (д, $J=10,0$ Гц, 0,4H); 8,40 (д, $J=8,1$ Гц, 0,4H). ЖХМС (A1): ES $m/z=735$ $[\text{M-H}]^-$; $m/z=737$ $[\text{M+H}]^+$; $t_R=1,52$ мин.

Пример 8. (3S,10R,16S,E)-16-((S)-1-(3-(4-(аминометил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-3-изобутил-6,6,7-триметил-1-окса-4,8,11-триазабис(гексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон).

При 0°C в круглодонную колбу к раствору соединения 46 (60 мг, 81,38 мкмоль) в ДХМ (3 мл) и MeOH (3 мл) добавляли по каплям раствор TCEP (38,9 мг, 134,3 мкмоль) в 1 мл H_2O . Реакционную смесь перемешивали при КТ в течение 35 ч, затем разбавляли ДХМ (15 мл) и насыщ. NaHCO_3 . После переме-

шивания в течение 10 мин органический слой отделяли, промывали насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали на 5 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 23 мг примера 8 в виде белого твердого вещества (40%).

^1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMCO-d_6): смесь диастереомеров 60/40; 0,77 (д, $J=7,0$ Гц, 1,8H); 0,81 (расщепл. д, $J=7,0$ Гц, 3H); 0,88 (д, $J=7,0$ Гц, 1,4H); 0,95 (д, $J=7,0$ Гц, 1,2H); 0,98 (с, 1,8H); 1,00 (с, 1,2H); 1,02-1,09 (м, 4,8H); 1,17 (с, 1,8H); 1,19 (с, 1,2H); 1,22 (м, 0,6H); 1,40 (м, 0,4H); 1,51-1,64 (м, 2H); 1,78 (м, 0,6H); 1,89 (м, 0,4H); 2,28 (м, 0,6H); 2,40-2,71 (частично скрытый м, 2,4H); 2,96 (дд, $J=2,2$ и 7,5 Гц, 0,6H); 2,99 (дд, $J=2,2$ и 7,5 Гц, 0,4H); 3,03 (м, 1H); 3,55 (м, 1H); 3,70 (с, 1,2H); 3,72 (с, 1,8H); 3,78 (д, $J=2,2$ Гц, 0,4H); 3,81 (с, 3H); 3,88 (д, $J=2,2$ Гц, 0,6H); 4,12-4,30 (м, 2H); 5,12 (м, 1H); 5,84 (дд, $J=1,8$ и 15,6 Гц, 0,6H); 5,96 (дд, $J=1,8$ и 15,6 Гц, 0,4H); 6,39 (м, 1H); 7,05 (д, $J=8,7$ Гц, 1H); 7,16-7,38 (м, 6H); 7,90 (д, $J=8,1$ Гц, 0,6H); 7,93 (д, $J=8,1$ Гц, 0,4H); 8,28 (д, $J=10,0$ Гц, 0,6H); 8,32 (д, $J=8,1$ Гц, 0,6H); 8,37 (д, $J=10,0$ Гц, 0,4H); 8,41 (д, $J=8,1$ Гц, 0,4H). ЖХМС (A1): ES $m/z=709$ $[\text{M-H}]^-$; $m/z=711$ $[\text{M+H}]^+$; $t_R=0,86$ мин.

Соединение 47: (9H-флуорен-9-ил)метил((S)-1-(((S)-1-((4-(3-((S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-3-изобутил-6,6,7-триметил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазадициклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу вводили пример 8 (110 мг, 154,65 мкмоль) и ДМФ (2 мл) с последующим добавлением FmocValAla (90 мг, 219 мкмоль), HOBt (30 мг, 222 мкмоль), ДХМ (10 мл) и EDC (35 мкл, 197,52 мкмоль). Раствор перемешивали при КТ в течение 3 ч 30, затем гасили H_2O (10 мл) и экстрагировали ДХМ (3×10 мл). Органический слой отделяли, промывали насыщ. NaHCO_3 , насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали, концентрировали в присутствии толуола и очищали на 15 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 49 мг соединения 47 в виде белого твердого вещества (46%).

^1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMCO-d_6): смесь диастереомеров 60/40; 0,76 (д, $J=7,0$ Гц, 1,8H); 0,80 (м, 3H); 0,82-0,89 (м, 6,4 Гц); 0,95 (д, $J=7,0$ Гц, 1,2H); 0,98 (с, 1,8H); 1,00 (с, 1,2H); 1,02-1,09 (м, 4,8H); 1,17 (с, 1,8H); 1,19 (с, 1,2H); 1,20-1,32 (м, 3,6H); 1,40 (м, 0,4H); 1,51-1,63 (м, 2H); 1,78 (м, 0,6H); 1,85 (м, 0,4H); 2,00 (м, 1H); 2,27 (м, 0,6H); 2,40-2,72 (частично скрытый м, 2,4H); 2,96 (м, 1H); 3,04 (м, 1H); 3,55 (м, 1H); 3,77 (д, $J=2,2$ Гц, 0,4H); 3,81 (с, 3H); 3,88 (д, $J=2,2$ Гц, 0,6H); 3,90 (м, 1H); 4,15-4,38 (м, 6H); 5,12 (м, 1H); 5,85 (дд, $J=1,8$ и 15,6 Гц, 0,6H); 5,95 (дд, $J=1,8$ и 15,6 Гц, 0,4H); 6,39 (м, 1H); 7,05 (расщепл. д, $J=8,7$ Гц, 1H); 7,15-7,48 (м, 19H); 7,73 (т, $J=8,1$ Гц, 2H); 7,90 (д, $J=8,1$ Гц, 2,6H); 7,92 (д, $J=8,1$ Гц, 0,4H); 8,05 (д, $J=8,1$ Гц, 1H); 8,25-8,45 (м, 3H). ЖХМС (A1): ES $m/z=552$ $[\text{M+2H}]^{2+}$; $m/z=1103$ $[\text{M+H}]^+$; $m/z=1147$ $[\text{M-H+HCO}_2\text{H}]^-$; $t_R=1,55$ -1,57 мин.

Соединение 48: (2S)-2-амино-N-((2S)-1-((4-(2R,3R)-3-((1S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-3-изобутил-6,6,7-триметил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазадициклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)амино)-1-оксопропан-2-ил)-3-метилбутанамид.

В круглодонную колбу добавляли пиперидин (60 мкл, 600,6 мкмоль) к раствору соединения 47 (50 мг, 45,30 мкмоль) в ДХМ (5 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 24 ч при КТ, концентрировали под вакуумом и очищали на 5 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 70 мг α - и β -эпоксидов.

^1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMCO-d_6): смесь диастереомеров 60/40; 0,75 (д, $J=7,0$ Гц, 1,8H); 0,80 (м, 3H); 0,82-0,92 (м, 6,4H); 0,96 (д, $J=7,0$ Гц, 1,2H); 0,98 (с, 1,8H); 1,00 (с, 1,2H); 1,02-1,09 (м, 4,8H); 1,15 (с, 1,8H); 1,19 (с, 1,2H); 1,20-1,42 (м, 4H); 1,50-1,70 (скрытый м, 2H); 1,78 (м, 0,6H); 1,85 (м, 0,4H); 2,00 (м, 1H); 2,25 (м, 0,6H); 2,40-2,72 (частично скрытый м, 2,4H); 2,92-3,08 (м, 3H); 3,54 (м, 1H); 3,79 (д, $J=2,1$ Гц, 0,4H); 3,81 (с, 3H); 3,88 (д, $J=2,1$ Гц, 0,6H); 4,13-4,41 (м, 6H); 5,12 (м, 1H); 5,85 (д, $J=15,4$ Гц, 0,6H); 5,93 (д, $J=15,4$ Гц, 0,4H); 6,38 (м, 1H); 7,05 (д, $J=8,7$ Гц, 1H); 7,15-7,32 (м, 6H); 7,90 (д, $J=8,3$ Гц, 0,6H); 7,93 (д, $J=8,3$ Гц, 0,4H); 8,10-8,55 (м, 7H). ЖХМС (A1): ES $m/z=441$ $[\text{M+2H}]^{2+}$; $m/z=879$ $[\text{M-H}]^-$; $m/z=881$ $[\text{M+H}]^+$; $m/z=925$ $[\text{M-H+HCO}_2\text{H}]^-$; $t_R=0,92$ мин.

α - и β -эпоксиды разделяли с помощью хиральной жидкостной хроматографии, которую проводили на колонке 76×350 мм, заполненной 1,1 кг 10 мкм Chiralpak AD (трис-3,5-диметилфенилкарбамат амилосы, покрытый на носителе из силикагеля, Chiral Technologies Europe), используя изократическое элюирование с 70:30 гептан/EtOH. После концентрирования получали 28 мг соединения 48 в виде белого твердого вещества (70%) и 19 мг α -эпоксида в виде белого твердого вещества.

^1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMCO-d_6): 0,75 (д, $J=7,0$ Гц, 6H); 0,80 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 0,88 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 0,98 (с, 3H); 1,03 (д, $J=7,0$ Гц, 6H); 1,17 (с, 3H); 1,23 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 1,35 (м, 1H); 1,50-1,68 (м, 2H); 1,78 (м, 1H); 1,91 (м, 1H); 2,26 (м, 1H); 2,58-2,70 (м, 2H); 2,96 (дд, $J=1,9$ и 7,7 Гц, 1H); 2,99 (д, $J=4,8$ Гц, 1H); 3,02 (дд, $J=3,3$ и 14,8 Гц, 1H); 3,53 (м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,89 (д, $J=1,9$ Гц, 1H); 4,10-4,23 (м, 3H); 4,28 (д, $J=6,1$ Гц, 2H); 4,35 (м, 1H); 5,11 (м, 1H); 5,83 (дд, $J=1,9$ и 15,2 Гц, 1H); 6,37 (ддд, $J=4,0$, 11,2 и 15,2 Гц, 1H); 7,03 (д, $J=8,8$ Гц, 1H); 7,18 (дд, $J=2,4$ и 8,8 Гц, 1H); 7,26 (с, 4H); 7,29 (д, $J=2,4$ Гц, 1H); 7,90 (д, $J=8,2$ Гц, 1H); 8,08 (уш.д, $J=7,7$ Гц, 1H); 8,29 (д, $J=10,1$ Гц, 1H); 8,33 (д, $J=8,2$ Гц, 1H); 8,46 (т, $J=6,7$ Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES $m/z=441$ $[\text{M+2H}]^{2+}$; $m/z=879$ $[\text{M-H}]^-$; $m/z=881$ $[\text{M+H}]^+$; $m/z=925$ $[\text{M-H+HCO}_2\text{H}]^-$; $t_R=0,92$ мин.

Соединение 49: 5-(((S)-1-(((S)-1-((4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-3-изобутил-6,6,7-триметил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазациклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-5-оксопентановая кислота.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору глутарового ангидрида (3,78 мг, 32,44 мкмоль) в ДХМ (4 мл) добавляли раствор соединения 48 (26 мг, 29,5 мкмоль) в ДХМ (9 мл). Полученную смесь перемешивали в течение 2 ч при КТ, концентрировали под вакуумом и очищали на 2,5 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH/H₂O) с получением 18 мг соединения 49 в виде белого твердого вещества (61%).

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,78 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,80 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,82 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,84 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,97 (с, 3H); 1,03 (д, J=7,0 Гц, 6H); 1,15 (с, 3H); 1,23 (уш.д, J=7,0 Гц, 4H); 1,49-1,61 (м, 2H); 1,70 (м, 2H); 1,78 (м, 1H); 1,97 (м, 1H); 2,20 (м, 4H); 2,25 (м, 1H); 2,62 (м, 2H); 2,95 (м, 1H); 3,02 (м, 1H); 3,53 (м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,88 (с, 1H); 4,10-4,22 (м, 3H); 4,24-4,31 (м, 3H); 5,11 (м, 1H); 5,83 (д, J=15,7 Гц, 1H); 6,36 (м, 1H); 7,03 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,19 (уш.д, J=8,7 Гц, 1H); 7,23 (м, 4H); 7,29 (уш.с, 1H); 7,87 (д, J=8,9 Гц, 1H); 7,90 (д, J=8,1 Гц, 1H); 8,06 (д большой, J=7,3 Гц, 1H); 8,29 (д, J=10,1 Гц, 1H); 8,37 (м, 2H); 12,0 (уш.м, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=993 [M-H]⁻; m/z=995 [M+H]⁺; t_R=1,21 мин.

Пример 9. 2,5-Диоксопирролидин-1-ил-5-(((S)-1-(((S)-1-((4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-3-изобутил-6,6,7-триметил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазациклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-5-оксопентановая кислота.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору соединения 49 (15 мг, 15,07 мкмоль) в ДХМ (5 мл) добавляли ДСК (5,63 мг, 21,09 мкмоль) и DIEA (3,56 мкл, 21,09 мкмоль). Полученную смесь перемешивали в течение 1 ч при КТ, концентрировали под вакуумом и очищали на 2,5 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 7,7 мг примера 9 в виде белого твердого вещества (47%).

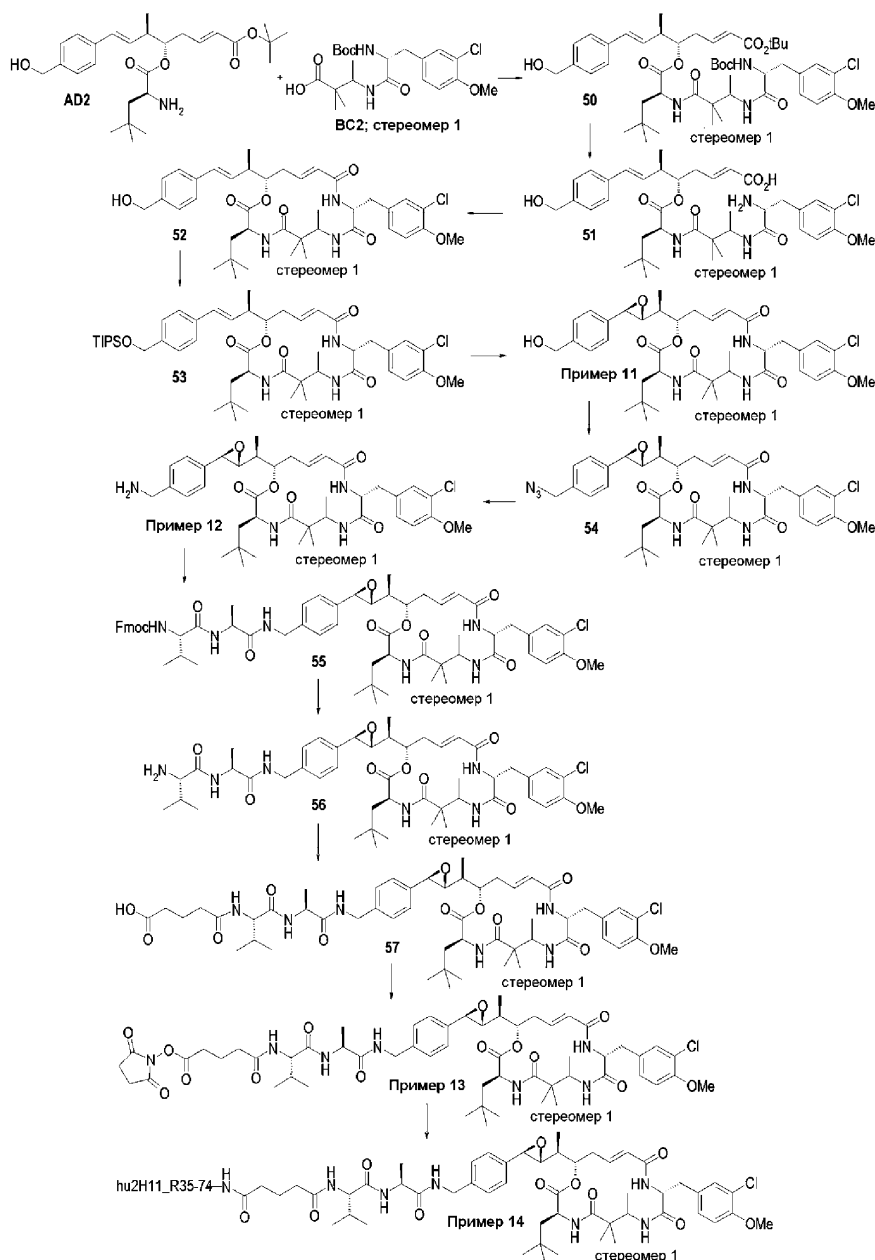
¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,78 (д, J=6,7 Гц, 3H); 0,80 (д, J=6,7 Гц, 3H); 0,82 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,85 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,99 (с, 3H); 1,04 (д, J=7,2 Гц, 6H); 1,18 (с, 3H); 1,26 (м, 4H); 1,57 (м, 2H); 1,79 (м, 1H); 1,83 (м, 2H); 1,99 (м, 1H); 2,22-2,33 (м, 3H); 2,60-2,71 (м, 4H); 2,82 (с, 4H); 2,97 (дд, J=2,1 и 7,7 Гц, 1H); 3,04 (дд, J=3,4 и 14,7 Гц, 1H); 3,55 (м, 1H); 3,81 (с, 3H); 3,89 (д, J=2,1 Гц, 1H); 4,19 (м, 3H); 4,26-4,34 (м, 3H); 5,12 (м, 1H); 5,86 (дд, J=2,0 и 15,7 Гц, 1H); 6,38 (ддд, J=3,8, 11,2 и 15,7 Гц, 1H); 7,05 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,19 (дд, J=2,2 и 8,7 Гц, 1H); 7,26 (м, 4H); 7,29 (д, J=2,2 Гц, 1H); 7,91 (м, 2H); 8,09 (м, 1H); 8,29 (д, J=9,9 Гц, 1H); 8,35 (м, 2H). ЖХМС (A1): ES m/z=1092 [M+H]⁺; m/z=1136 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=1,26 мин.

Пример 10. mAb-пр. 9.

Общий способ, описанный ранее, был использован для получения примера 10. 60 мг hu2H11_R35-74 подвергали взаимодействию с 198 мкл 10,78 mM раствора примера 9 в ДМА (5 экв.) в течение 2 ч. В это время добавляли 120 мкл раствора примера 9 (3 экв.) и среду перемешивали в течение 2 ч. После очистки на Superdex 200 pg в DPBS pH 6,5+20% NMP, концентрирования на Amicon Ultra-15, буферного обмена на PD-10 в буфере В pH 6,5+5% NMP и фильтрования на Steriflip 46 мг примера 10 получали в виде бесцветного прозрачного раствора в концентрации 2,23 мг/мл с DAR 4,7 (MCBP), мономерной чистотой 99,2% и общим выходом 78%.

SEC-MCBP: спектр для интактного ADC на фиг. 3; m/z=150345 (D1); m/z=151319 (D2); m/z=152297 (D3); m/z=153274 (D4); m/z=154251 (D5); m/z=155222 (D6); m/z=156202 (D7); m/z=157183 (D8).

Синтез примеров 11-14: бензилового амина 3-(S)-неопентил-7-Ме-аза-C52 стереоизомера 1, NHS-эфира глутарил-Val-Ala-3-(S)-неопентил-7-Ме-аза-C52-бензилового амина стереоизомера 1 и соответствующего ADC



Соединение 50: (6R,13S)-(1E,3R,4S,6E)-8-(трет-бутокс)-1-(4-(гидроксиметил)фенил)-3-метил-8-оксоокта-1,6-диен-4-ил-6-(3-хлор-4-метоксибензил)-2,2,9,10,10-пентаметил-13-неопентил-4,7,11-триоксо-3-окса-5,8,12-триазатетрадекан-14-оат.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору фрагмента BC2 (742 мг, 1,68 ммоль) в ДМФ (20 мл) добавляли НАТУ (716 мг, 1,83 ммоль) и HOAt (251 мг, 1,83 ммоль). Смесь перемешивали в течение 30 мин при КТ. Затем добавляли раствор фрагмента AD1 (730 мг, 1,59 ммоль) в ДМФ (10 мл) и DIEA (981 мкл, 5,56 ммоль). Реакционную среду перемешивали в течение 24 ч при КТ. По истечении этого времени реакционную среду разбавляли льдом (200 г), экстрагировали AcOEt (4×200 мл). Органические слои промывали H₂O (80 мл), насыщ. соевым раствором (2×80 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали и очищали с помощью двух последовательных флэш-хроматографий, первая на 300 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) и вторая на 70 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 428 мг соединения 50 в виде бесцветной пены (30%).

Соединение 51: (2E,5S,6R,7E)-5-(((2S)-2-(3-((R)-2-амино-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилбутанамидо)-4,4-диметилпентаноил)окси)-8-(4-(гидроксиметил)фенил)-6-метилокта-2,7-диеновая кислота.

В круглодонную колбу вводили соединение 50 (428 мг, 483,87 мкмоль) и ДХМ (27 мл). Раствор охлаждали при 0°C, затем добавляли ТФУК (8 мл, 106,62 ммоль). Смесь перемешивали в течение 1,5 ч при КТ. Растворитель удаляли и соиспаряли при пониженном давлении с толуолом (3×100 мл). Неочищенное масло разбавляли 1:1 AcOEt/H₂O (75 мл) и нейтрализовали 2M NaOH (250 мкл) до pH 6-7. Смесь перемешивали в течение 6 ч при КТ. Слои разделяли. Водн. слой экстрагировали AcOEt (3×50 мл). Органиче-

ские слои промывали насыщ. соевым раствором (2×15 мл), высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали и концентрировали с получением 374 мг соединения 51 в виде бесцветной пены (колич.).

Соединение 52: (3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-16-((R,E)-4-(4-(гидроксиметил)фенил)бут-3-ен-2-ил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-1-окса-4,8,11-триазаациклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору соединения 51 (352 мг, 483,31 мкмоль) в CH_3CN (60 мл) добавляли HATU (208 мг, 531,64 ммоль), HOAt (73,09 мг, 531,64 мкмоль) и DIEA (244,52 мкл, 1,45 ммоль). Реакционную среду перемешивали в течение 45 мин при КТ. По истечении этого времени реакционную среду нейтрализовали 0,5N лимонной кислотой до pH 4, концентрировали частично под вакуумом и экстрагировали AcOEt (150 мл). Органический слой промывали насыщ. NaHCO_3 (10 мл), насыщ. соевым раствором (3×10 мл), высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали, концентрировали и очищали с помощью флэш-хроматографии на 15 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 188 мг соединения 52 в виде бесцветной пены (54%).

Соединение 53: (3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-16-((R,E)-4-(4-((триизопропилсилил)окси)метил)фенил)бут-3-ен-2-ил)-1-окса-4,8,11-триазаациклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

При 0°C в атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору соединения 52 (188 мг, 264,68 мкмоль) в ДХМ (7 мл) добавляли 1Н-имидазол (83,72 мг, 1,2 ммоль) и 1М хлортриизопропилсилан (134,15 мкл). Реакционную среду перемешивали в течение 5 ч при КТ, затем гасили насыщ. NH_4Cl и перемешивали в течение 15 мин. Слои разделяли. Водн. слой экстрагировали ДХМ (3×25 мл). Органические слои промывали 1М NaHSO_4 (10 мл), насыщ. NaHCO_3 (10 мл), насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали, концентрировали и очищали с помощью флэш-хроматографии на 10 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 137 мг соединения 53 в виде бесцветной пены (59%).

Пример 11. (3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(гидроксиметил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-1-окса-4,8,11-триазаациклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

Пример 11 получали за две стадии.

Стадия 1: при 0°C в атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору соединения 53 (137 мг, 158,08 мкмоль) в ДХМ (5,5 мл) добавляли раствор м-CPBA (50,66 мг, 205,51 мкмоль) в ДХМ (2 мл) и реакционную среду перемешивали в течение 2 ч. Затем дважды добавляли 39 мг м-CPBA после 2 ч перемешивания. После 16 ч перемешивания смесь гасили насыщ. NaHCO_3 (30 мл) и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (30 мл), перемешивали в течение 15 мин и разбавляли ДХМ (40 мл). Слои разделяли. Водн. слой экстрагировали ДХМ (2×20 мл). Органические слои промывали насыщ. соевым раствором (2×8 мл), высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали и концентрировали с получением 160 мг α - и β -эпоксидов в виде бесцветного твердого вещества (колич.).

^1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMSO-d_6): смесь диастереомеров 60/40; 0,80-0,91 (м, 12H); 0,97-1,09 (м, 24H); 1,12-1,21 (м, 6H); 1,32 (д, $J=14,7$ Гц, 0,6H); 1,40 (д, $J=14,7$ Гц, 0,4H); 1,70-1,87 (м, 1H); 1,90 (дд, $J=10,1$ и 14,7 Гц, 0,4H); 1,97 (дд, $J=10,1$ и 14,7 Гц, 0,6H); 2,28 (м, 0,6H); 2,40 (м, 0,4H); 2,55-2,79 (м, 2H); 2,90-3,00 (м, 2H); 3,44 (м, 1H); 3,79 (д, $J=2,1$ Гц, 0,4H); 3,80 (с, 3H); 3,90 (д, $J=2,1$ Гц, 0,6H); 4,03-4,22 (м, 2H); 4,78 (с, 0,8H); 4,80 (с, 1,2H); 5,03 (м, 1H); 5,90 (дд, $J=1,5$ и 15,5 Гц, 0,6H); 5,99 (дд, $J=1,5$ и 15,5 Гц, 0,4H); 6,40-6,55 (м, 1H); 7,02-7,07 (м, 1H); 7,13-7,38 (м, 6H); 7,85-7,93 (м, 2H); 8,40 (д, $J=7,3$ Гц, 0,6H); 8,51 (д, $J=7,3$ Гц, 0,4H). ЖХМС (A1): ES $m/z=880$ $[\text{M-H}]^-$; $m/z=882$ $[\text{M+H}]^+$; $m/z=926$ $[\text{M-H+HCO}_2\text{H}]^-$; $t_R=2,05$ -2,06 мин.

Стадия 2: при 0°C в атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору α - и β -эпоксидов (177 мг, 200,53 мкмоль) в ТГФ (7,5 мл) добавляли по каплям 1М TBAF (221 мкл, 221 мкмоль). После перемешивания в течение 2 ч при КТ добавляли 50 мкл TBAF и перемешивали в течение 3,5 ч. Реакционную среду разбавляли H_2O (9 мл), перемешивали в течение 10 мин и экстрагировали ДХМ (3×25 мл). Объединенные органические слои промывали насыщ. соевым раствором (3×8 мл), высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали и концентрировали с получением 210 мг α - и β -эпоксидов в виде бесцветного твердого вещества (колич.).

^1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMSO-d_6): смесь диастереомеров 60/40; 0,82-1,25 (м, 21H); 1,32 (д, $J=14,5$ Гц, 0,6H); 1,42 (д, $J=14,5$ Гц, 0,4H); 1,80 (м, 1H); 1,91 (дд, $J=10,0$ и 14,5 Гц, 0,4H); 1,98 (дд, $J=10,0$ и 14,5 Гц, 0,6H); 2,22-2,48 (м, 1H); 2,55-2,78 (м, 2H); 2,89-3,03 (м, 2H); 3,44 (м, 1H); 3,79 (д, $J=2,2$ Гц, 0,4H); 3,80 (с, 3H); 3,90 (д, $J=2,2$ Гц, 0,6H); 4,04-4,22 (м, 2H); 4,48 (д, $J=5,8$ Гц, 0,8H); 4,50 (д, $J=5,8$ Гц, 1,2H); 5,03 (м, 1H); 5,16 (т, $J=5,8$ Гц, 0,4H); 5,19 (т, $J=5,8$ Гц, 0,6H); 5,89 (дд, $J=1,9$ и 15,6 Гц, 0,6H); 5,99 (дд, $J=1,9$ и 15,6 Гц, 0,4H); 6,40-6,52 (м, 1H); 7,02 (д, $J=8,7$ Гц, 0,6H); 7,04 (д, $J=8,7$ Гц, 0,4H); 7,16-7,37 (м, 6H); 7,83-7,94 (м, 2H); 8,39 (д, $J=7,4$ Гц, 0,6H); 8,50 (д, $J=7,4$ Гц, 0,4H). ЖХМС (A1): ES $m/z=724$ $[\text{M-H}]^-$; $m/z=726$ $[\text{M+H}]^+$; $t_R=1,29$ мин.

α - и β -эпоксиды разделяли с помощью хиральной жидкостной хроматографии, которую проводили на колонке 76×350 мм, заполненной 1,1 кг 10 мкм Chiralpak AD (трис-3,5-диметилфенилкарбамат амило-

зы, покрытый на носителе из силикагеля, Chiral Technologies Europe), используя изократическое элюирование с 75:25 гептан/ЕtОН. После концентрирования получали 66 мг примера 11 в виде белого твердого вещества (45%) и 45 мг α -эпоксида в виде белого твердого вещества (31%).

^1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMSO-d_6): 0,82-0,89 (м, 12Н); 0,99 (с, 3Н); 1,03 (д, $J=6,9$ Гц, 3Н); 1,19 (с, 3Н); 1,34 (д, $J=14,6$ Гц, 1Н); 1,80 (м, 1Н); 1,98 (дд, $J=10,1$ и 14,6 Гц, 1Н); 2,26 (м, 1Н); 2,61 (м, 1Н); 2,69 (дд, $J=11,1$ и 14,6 Гц, 1Н); 2,91 (дд, $J=2,1$ и 7,8 Гц, 1Н); 2,94 (дд, $J=3,7$ и 14,6 Гц, 1Н); 3,42 (м, 1Н); 3,80 (с, 3Н); 3,91 (д, $J=2,1$ Гц, 1Н); 4,03-4,14 (м, 2Н); 4,50 (д, $J=5,8$ Гц, 2Н); 5,03 (м, 1Н); 5,19 (т, $J=5,8$ Гц, 1Н); 5,89 (дд, $J=2,1$ и 15,5 Гц, 1Н); 6,43 (ддд, $J=4,7$, 10,9 и 15,5 Гц, 1Н); 7,03 (д, $J=8,7$ Гц, 1Н); 7,20 (дд, $J=2,3$ и 8,7 Гц, 1Н); 7,23 (д, $J=8,4$ Гц, 2Н); 7,30 (д, $J=2,3$ Гц, 1Н); 7,33 (д, $J=8,4$ Гц, 2Н); 7,86 (д, $J=8,4$ Гц, 1Н); 7,92 (д, $J=7,1$ Гц, 1Н); 8,39 (д, $J=9,1$ Гц, 1Н). ЖХМС (А1): ES $m/z=724$ $[\text{M-H}]^-$; $m/z=726$ $[\text{M+H}]^+$; $t_R=1,29$ мин.

Соединение 54: (3S,10R,16S,E)-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(азидометил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-1-окса-4,8,11-триазаацетилгексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору примера 11 (66 мг, 90,87 мкмоль) в ТГФ (5 мл) добавляли при 0°C ДФФА (100,23 мкл, 454,36 мкмоль) и DBU (69,27 мкл, 454,36 мкмоль). Раствор перемешивали в течение 5 ч при КТ, затем разбавляли H_2O и экстрагировали AcOEt (2 $\times$ 15 мл). Органический слой отделяли, промывали насыщ. соевым раствором (2 $\times$ 5 мл), высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали, концентрировали и очищали на 15 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/ $i\text{PrOH}$) с получением 64 мг соединения 54 в виде бесцветного твердого вещества (94%).

Пример 12. (3S,10R,16S,E)-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(аминометил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-1-окса-4,8,11-триазаацетилгексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

В круглодонную колбу к раствору соединения 54 (64 мг, 85,18 мкмоль) в ДХМ (3 мл), MeOH (3 мл) и H_2O (400 мкл) добавляли ТСЕР (26,86 мг, 93,70 мкмоль). Реакционную среду перемешивали в течение 24 ч при КТ. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (15 мл) и насыщ. NaHCO_3 , перемешивали в течение 10 мин и экстрагировали ДХМ (3 $\times$ 15 мл). Объединенные органические слои промывали насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали, концентрировали и очищали с помощью флэш-хроматографии на 4,5 г аминопропилмодифицированного силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/ MeOH) с получением 42 мг примера 12 в виде белого твердого вещества (68%).

Соединение 55: (9Н-флуорен-9-ил)метил-((2S)-1-(((2S)-1-((4-((2R,3R)-3-((1S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазаацетилгексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу вводили пример 12 (42 мг, 57,91 мкмоль) и ДМФ (1 мл) с последующим добавлением FmocValAla (34,44 мг, 86,86 мкмоль), HOBT (13,20 мг, 93,81 мкмоль), ДХМ (10 мл) и EDC (10,36 мкл, 57,91 мкмоль).

Реакционную среду перемешивали в течение 3 ч при КТ и затем разбавляли H_2O (15 мл), перемешивали в течение 10 мин при КТ и экстрагировали ДХМ (3 $\times$ 20 мл). Объединенные органические слои высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали и концентрировали с получением 83 мг соединения 55 в виде белого твердого вещества (колич.).

Соединение 56: (2S)-2-амино-N-((2S)-1-((4-((2R,3R)-3-((1S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазаацетилгексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)амино)-1-оксопропан-2-ил)-3-метилбутанамид.

В круглодонную колбу добавляли пиперидин (57,8 мкл, 579,10 мкмоль) к раствору соединения 55 (64,73 мг, 57,91 мкмоль) в ДХМ (10 мл). После перемешивания в течение 5 ч добавляли 57,8 мкл пиперидина и среду перемешивали в течение ночи при КТ. Реакционную среду концентрировали под вакуумом и очищали на 15 г силикагеля (градиент ДХМ/ $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$) с получением 30 мг соединения 56 в виде бесцветного твердого вещества (58%).

^1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMSO-d_6): 0,86 (д, $J=7,0$ Гц, 3Н); 0,82-0,90 (м, 15Н); 1,00 (с, 3Н); 1,03 (д, $J=7,0$ Гц, 3Н); 1,19 (с, 3Н); 1,24 (д, $J=7,0$ Гц, 3Н); 1,34 (д, $J=14,6$ Гц, 1Н); 1,66 (уш.м, 2Н); 1,80 (м, 1Н); 1,91 (м, 1Н); 1,98 (дд, $J=10,2$ и 14,6 Гц, 1Н); 2,27 (м, 1Н); 2,60 (м, 1Н); 2,69 (дд, $J=11,1$ и 14,6 Гц, 1Н); 2,91 (дд, $J=2,0$ и 7,7 Гц, 1Н); 2,94 (дд, $J=3,7$ и 14,6 Гц, 1Н); 2,99 (д, $J=4,9$ Гц, 1Н); 3,43 (м, 1Н); 3,80 (с, 3Н); 3,91 (д, $J=2,0$ Гц, 1Н); 4,03-4,12 (м, 2Н); 4,29 (д, $J=6,2$ Гц, 2Н); 4,34 (м, 1Н); 5,03 (м, 1Н); 5,89 (дд, $J=1,8$ и 15,6 Гц, 1Н); 6,43 (ддд, $J=4,8$, 10,9 и 15,6 Гц, 1Н); 7,02 (д, $J=8,6$ Гц, 1Н); 7,20 (дд, $J=2,2$ и 8,6 Гц, 1Н); 7,22 (д, $J=8,4$ Гц, 2Н); 7,26 (д, $J=8,4$ Гц, 2Н); 7,32 (д, $J=2,2$ Гц, 1Н); 7,86 (д, $J=8,4$ Гц, 1Н); 7,92 (д, $J=7,2$ Гц, 1Н); 8,07 (уш.д, $J=7,9$ Гц, 1Н); 8,40 (д, $J=7,3$ Гц, 1Н); 8,45 (т, $J=6,2$ Гц, 1Н). ЖХМС (А1): ES $m/z=448$ $[\text{M+2H}]^{2+}$; $m/z=893$ $[\text{M-H}]^-$; $m/z=895$ $[\text{M+H}]^+$; $m/z=939$ $[\text{M+H+HCO}_2\text{H}]^+$; $t_R=1,29$ мин.

Соединение 57: 5-(((2S)-1-(((2S)-1-((4-((2R,3R)-3-((1S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазаацетилгексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-5-оксопентановая кислота.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору глутарового ангидрида (4,29 мг, 36,85 мкмоль) в ДХМ (2 мл) добавляли раствор соединения 56 (30 мг, 33,5 мкмоль) в ДХМ (6 мл). Реакционную среду перемешивали в течение 2 ч при КТ, концентрировали частично под вакуумом и очищали на 2,5 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH/H₂O) с получением 34 мг соединения 57 в виде бесцветного лака (колич.).

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,80-0,89 (м, 18H); 0,99 (с, 3H); 1,03 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,19 (с, 3H); 1,24 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,34 (д, J=14,6 Гц, 1H); 1,70 (м, 2H); 1,80 (м, 1H); 1,97 (м, 2H); 2,19 (м, 4H); 2,26 (м, 1H); 2,60 (м, 1H); 2,70 (дд, J=11,2 и 14,6 Гц, 1H); 2,90 (дд, J=2,2 и 7,8 Гц, 1H); 2,95 (дд, J=3,7 и 14,6 Гц, 1H); 3,43 (м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,91 (д, J=2,2 Гц, 1H); 4,03-4,18 (м, 3H); 4,22-4,33 (м, 3H); 5,03 (м, 1H); 5,90 (д, J=15,5 Гц, 1H); 6,43 (ддд, J=4,9, 11,0 и 15,5 Гц, 1H); 7,02 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,19-7,28 (м, 5H); 7,32 (д, J=2,2 Гц, 1H); 7,85 (уш.д, J=8,9 Гц, 2H); 7,91 (д, J=7,2 Гц, 1H); 8,06 (уш.д, J=7,5 Гц, 1H); 8,36 (уш.т, J=6,6 Гц, 1H); 8,42 (д, J=7,8 Гц, 1H); 12,10 (уш.м, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=1007 [M-H]⁻; m/z=1009 [M+H]⁺; t_R=1,21 мин.

Пример 13. 2,5-Диоксипирролидин-1-ил-5-(((2S)-1-(((2S)-1-((4-((2R,3R)-3-((1S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазадициклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксипропан-2-ил)бензил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-5-оксопентанонат.

В атмосфере аргона в круглодонную колбу к раствору соединения 57 (33 мг, 32,69 мкмоль) в ДХМ (8 мл) добавляли ДСК (11,72 мг, 45,76 мкмоль) и DIEA (7,7 мкл, 45,76 мкмоль). Реакционную среду перемешивали в течение 1 ч при КТ, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью двух последовательных флэш-хроматографий на 2,5 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/iPrOH) с получением 17,9 мг примера 13 в виде бесцветного твердого вещества (49%).

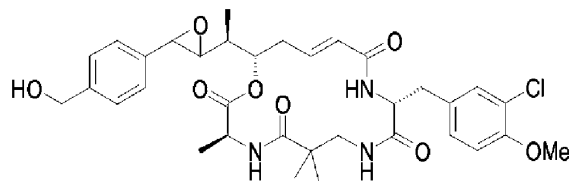
¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,80-0,90 (м, 18H); 1,00 (с, 3H); 1,04 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,19 (с, 3H); 1,24 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,34 (д, J=14,6 Гц, 1H); 1,80 (м, 1H); 1,83 (м, 2H); 1,98 (м, 2H); 2,26 (м, 1H); 2,29 (м, 2H); 2,60 (м, 1H); 2,68 (т, J=7,5 Гц, 2H); 2,70 (дд, J=11,2 и 14,6 Гц, 1H); 2,80 (с, 4H); 2,91 (дд, J=2,2 и 7,6 Гц, 1H); 2,95 (дд, J=3,7 и 14,6 Гц, 1H); 3,43 (м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,90 (д, J=2,2 Гц, 1H); 4,06-4,15 (м, 2H); 4,18 (дд, J=6,9 и 8,7 Гц, 1H); 4,21-4,33 (м, 3H); 5,03 (м, 1H); 5,89 (д, J=15,5 Гц, 1H); 6,43 (ддд, J=4,9, 10,9 и 15,5 Гц, 1H); 7,02 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,20 (дд, J=2,3 и 8,7 Гц, 1H); 7,23 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,25 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,31 (д, J=2,3 Гц, 1H); 7,84 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,89 (м, 2H); 8,04 (д, J=7,5 Гц, 1H); 8,33 (т, J=6,5 Гц, 1H); 8,39 (д, J=7,6 Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES m/z=796; m/z=1104 [M-H]⁻; m/z=1106 [M+H]⁺; m/z=1150 [M+HCO₂H]⁺; t_R=1,26 мин.

Пример 14. mAb-пр. 13.

Общий способ, описанный ранее, был использован для получения примера 14. 60 мг hu2H11_R35-74 подвергали взаимодействию с 200 мкл 10,05 mM раствора примера 13 в ДМА (5 экв.) в течение 2 ч. В это время добавляли 180 мкл раствора примера 13 (4,5 экв.) и среду перемешивали в течение 2 ч. После очистки на Superdex 200 pg в буфере В pH 6,5+10% NMP, концентрирования на Amicon Ultra-15, буферного обмена на PD-10 в буфере В pH 6,5+5% NMP и фильтрования на Steriflip 46 мг примера 14 получали в виде бесцветного прозрачного раствора в концентрации 2 мг/мл с DAR 3,5 (MCBP), мономерной чистотой 99,7% и общим выходом 77%.

SEC-MCBP: спектр для интактного ADC на фиг. 4; m/z=149336 (голое mAb); m/z=150328 (D1); m/z=151319 (D2); m/z=152311 (D3); m/z=153302 (D4); m/z=154295 (D5); m/z=155290 (D6); m/z=156282 (D7).

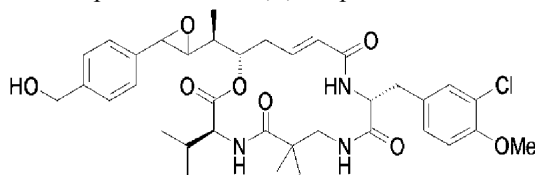
Пример 15. (3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-16-((S)-1-(3-(4-(гидроксиметил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-3,6,6-триметил-1-окса-4,8,11-триазадициклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон



Пример 15 получали по следующему общему пути В, изображенному на схеме 2 и описанному для примеров 4 и 11.

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): смесь диастереомеров 65/35; 0,93-1,26 (м, 12H); 1,75 (м, 0,65H); 1,83 (м, 0,35H); 2,22 (м, 0,65H); 2,41 (м, 0,35H); 2,55-2,70 (м, 2H); 2,81 (д, J=13,7 Гц, 0,65H); 2,88 (д, J=13,7 Гц, 0,35H); 2,93 (дд, J=2,1 и 8,2 Гц, 0,65H); 3,00 (м, 1,35H); 3,22-3,35 (частично скрытый м, 1H); 3,77 (д, J=2,1 Гц, 0,35H); 3,81 (с, 3H); 3,88 (д, J=2,1 Гц, 0,65H); 4,25-4,39 (м, 1,65H); 4,34 (м, 0,35H); 4,48 (д, J=6,0 Гц, 0,7H); 4,50 (д, J=6,0 Гц, 1,3H); 5,08 (м, 1H); 5,17 (т, J=6,0 Гц, 0,35H); 5,20 (т, J=6,0 Гц, 0,65H); 5,78 (дд, J=1,9 и 15,5 Гц, 0,65H); 5,89 (дд, J=1,9 и 15,5 Гц, 0,35H); 6,40 (м, 1H); 7,04 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,16 (дд, J=2,2 и 8,7 Гц, 0,65H); 7,19 (дд, J=2,2 и 8,7 Гц, 0,35H); 7,20-7,34 (м, 5H); 7,58 (уш.д, J=10,2 Гц, 0,65H); 7,64 (уш.д, J=10,2 Гц, 0,35H); 8,00 (д, J=8,4 Гц, 0,65H); 8,07 (д, J=8,4 Гц, 0,35H); 8,35 (д, J=8,3 Гц, 0,65H); 8,44 (д, J=8,3 Гц, 0,35H). ЖХМС (A1): ES m/z=654 [M-H]⁻; m/z=656 [M+H]⁺; t_R=1,06 мин.

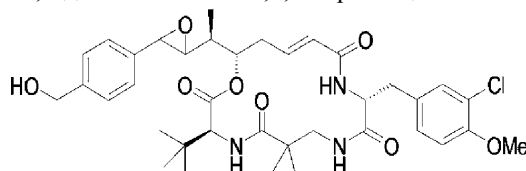
Пример 16. (3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-16-((S)-1-(3-(4-(гидроксиметил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-6,6-диметил-3-изопропил-1-окса-4,8,11-триазабиклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон



Пример 16 получали по следующему общему пути В, изображенному на схеме 2 и описанному для примеров 4 и 11.

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): смесь диастереомеров 60/40; 0,72 (д, J=7,0 Гц, 1,8H); 0,82 (д, J=7,0 Гц, 1,2H); 0,84 (д, J=7,0 Гц, 1,8H); 0,87 (д, J=7,0 Гц, 1,2H); 0,98 (с, 1,8H); 0,99 (д, J=7,0 Гц, 1,8H); 1,01 (с, 1,2H); 1,05 (д, J=7,0 Гц, 1,2H); 1,09 (с, 1,8H); 1,11 (с, 1,2H); 1,82 (м, 1H); 1,91 (м, 0,6H); 2,01 (м, 0,4H); 2,30 (м, 1H); 2,52-2,72 (м, 2H); 2,88-3,04 (м, 3H); 3,25-3,35 (скрытый м, 1H); 3,79 (д, J=2,2 Гц, 0,4H); 3,80 (с, 3H); 3,88 (д, J=2,2 Гц, 0,6H); 4,09-4,21 (м, 2H); 4,48 (д, J=5,8 Гц, 0,8H); 4,50 (д, J=5,8 Гц, 1,2H); 5,14-5,29 (м, 2H); 5,79 (дд, J=1,7 и 15,4 Гц, 0,6H); 5,90 (дд, J=1,7 и 15,4 Гц, 0,4H); 6,40-6,52 (м, 1H); 7,05 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,10 (дд, J=2,0 и 10,2 Гц, 1H); 7,17 (м, 1H); 7,21-7,35 (м, 5H); 7,70 (д, J=9,3 Гц, 0,6H); 7,80 (д, J=9,3 Гц, 0,4H); 8,39 (д, J=8,0 Гц, 0,6H); 8,44 (д, J=8,0 Гц, 0,4H). ЖХМС (A1): ES m/z=682 [M-H]⁻; m/z=684 [M+H]⁺; t_R=1,16 мин.

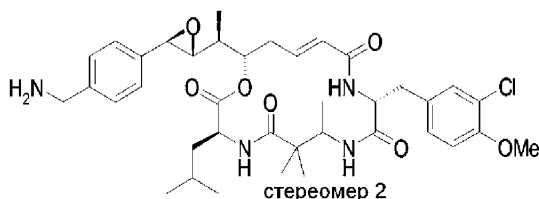
Пример 17. (3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-16-((S)-1-(3-(4-(гидроксиметил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-3-трет-бутил-6,6-диметил-1-окса-4,8,11-триазабиклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон



Пример 17 получали по следующему общему пути В, изображенному на схеме 2 и описанному для примеров 4 и 11.

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): смесь диастереомеров 50/50; 0,90 (с, 4,5H); 0,91 (с, 4,5H); 1,00 (д, J=7,0 Гц, 1,5H); 1,03 (с, 1,5H); 1,05 (с, 1,5H); 1,06 (д, J=7,0 Гц, 1,5H); 1,10 (с, 1,5H); 1,12 (с, 1,5H); 1,85 (м, 1H); 2,32 (м, 1H); 2,55-2,72 (м, 2H); 2,90-3,03 (м, 3H); 3,25-3,35 (скрытый м, 1H); 3,81 (с, 3H); 3,90 (д, J=2,2 Гц, 1H); 4,15 (м, 1H); 4,36 (д, J=10,0 Гц, 0,5H); 4,43 (д, J=10,0 Гц, 0,5H); 4,49 (д, J=5,9 Гц, 1H); 4,51 (д, J=5,9 Гц, 1H); 5,15 (т, J=5,9 Гц, 0,5H); 5,18 (т, J=5,9 Гц, 0,5H); 5,29 (м, 1H); 5,79 (дд, J=2,0 и 15,4 Гц, 0,5H); 5,90 (д, J=15,4 Гц, 0,5H); 6,39 (м, 1H); 6,91 (дд, J=2,5 и 10,4 Гц, 0,5H); 6,98 (дд, J=2,5 и 10,4 Гц, 0,5H); 7,05 (расщепл. д, J=8,7 Гц, 1H); 7,15 (расщепл. дд, J=2,4 и 8,7 Гц, 1H); 7,20-7,39 (м, 6H); 8,32 (д, J=7,9 Гц, 0,5H); 8,40 (д, J=7,9 Гц, 0,5H). ЖХМС (A4): ES m/z=696 [M-H]⁻; m/z=698 [M+H]⁺; t_R=4,13-4,16 мин.

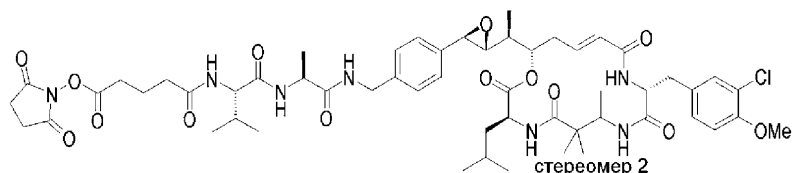
Пример 18. (3S,10R,16S,E)-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(аминометил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-3-изобутил-6,6,7-триметил-1-окса-4,8,11-триазабиклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон



Пример 18 получали по следующему общему пути А, изображенному на схеме 1 и описанному для примера 8.

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,78 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,84 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,87 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,00 (с, 3H); 1,03 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,19 (с, 3H); 1,30 (м, 1H); 1,50-1,90 (м, 5H); 2,28 (м, 1H); 2,55-2,76 (м, 2H); 2,90-3,00 (м, 2H); 3,48 (м, 1H); 3,70 (с, 2H); 3,80 (с, 3H); 3,89 (с, 1H); 4,02-4,15 (м, 2H); 5,06 (м, 1H); 5,88 (д, J=15,5 Гц, 1H); 6,47 (м, 1H); 7,03 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,20 (м, 3H); 7,31 (м, 3H); 7,80 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,89 (д, J=7,3 Гц, 1H); 8,41 (д, J=8,2 Гц, 1H).

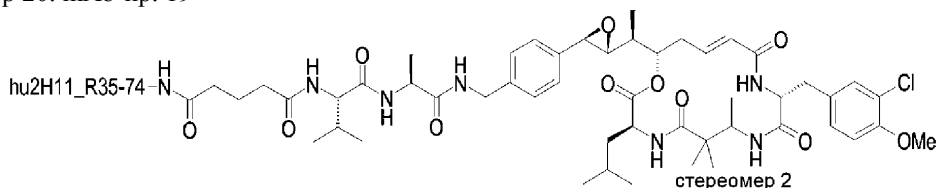
Пример 19. 2,5-Диоксопирролидин-1-ил-5-(((S)-1-(((S)-1-((4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-3-изобутил-6,6,7-триметил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазабиклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-5-оксопентаноат



Пример 19 получали, как показано на схеме 3 и описано для примеров 2, 6, 9 и 13.

^1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMCO-d_6): 0,79 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 0,81-0,89 (м, 18H); 1,01 (с, 3H); 1,03 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 1,20 (с, 3H); 1,24 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 1,31 (м, 1H); 1,60-1,74 (м, 2H); 1,78-1,86 (м, 3H); 1,96 (м, 1H); 2,21-2,31 (м, 3H); 2,55-2,72 (м, 4H); 2,80 (с, 4H); 2,96 (м, 2H); 3,47 (м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,89 (д, $J=2,2$ Гц, 1H); 4,03-4,14 (м, 2H); 4,17 (дд, $J=6,8$ и $8,6$ Гц, 1H); 4,21-4,33 (м, 3H); 5,06 (м, 1H); 5,89 (д, $J=15,5$ Гц, 1H); 6,47 (ддд, $J=5,2$, $10,5$ и $15,5$ Гц, 1H); 7,02 (д, $J=8,7$ Гц, 1H); 7,20 (дд, $J=2,3$ и $8,7$ Гц, 1H); 7,23 (м, 4H); 7,32 (д, $J=2,3$ Гц, 1H); 7,80 (д, $J=8,3$ Гц, 1H); 7,89 (м, 2H); 8,04 (д, $J=7,6$ Гц, 1H); 8,32 (т, $J=6,3$ Гц, 1H); 8,42 (д, $J=7,6$ Гц, 1H). ЖХМС (A1): ES $m/z=1092$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; $m/z=1136$ $[\text{M}-\text{H}+\text{HCO}_2\text{H}]^-$; $t_R=1,23$ мин.

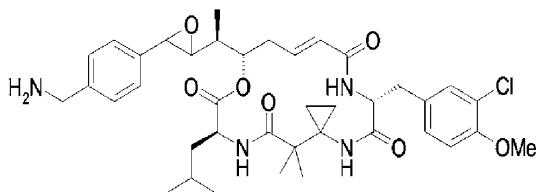
Пример 20. mAb-пр. 19



Пример 20 получали аналогично примерам 3, 7, 10 и 14. 45 мг примера 20 получали в виде бесцветного прозрачного раствора в концентрации 2,55 мг/мл с DAR 4,4 (MCBP), мономерной чистотой 99,1% и общим выходом 78%.

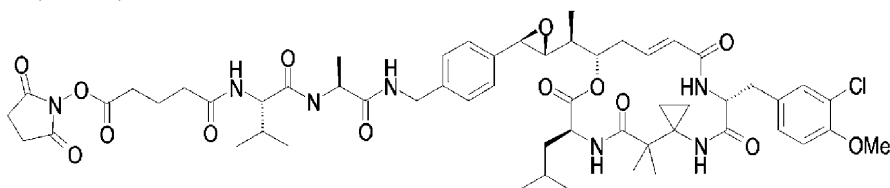
SEC-MCBP: спектр для интактного ADC на фиг. 5; $m/z=150368$ (D1); $m/z=151350$ (D2); $m/z=152327$ (D3); $m/z=153304$ (D4); $m/z=154281$ (D5); $m/z=155255$ (D6); $m/z=156237$ (D7); $m/z=157217$ (D8).

Пример 21. (3S,10R,16S,E)-16-((S)-1-(3-(4-(аминометил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-7-циклопропил-3-изобутил-6,6-диметил-1-окса-4,8,11-триазацкло-гексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон



Пример 21 получали по следующему общему пути А, изображенному на схеме 1 и описанному для примеров 1 и 8.

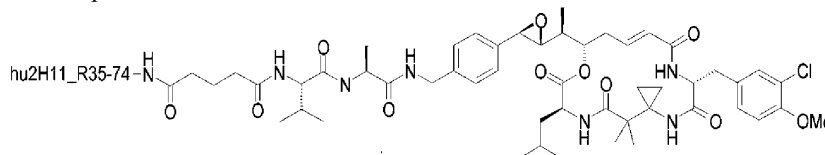
Пример 22. 2,5-Диоксипирролидин-1-ил-5-(((S)-1-(((S)-1-((4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-7-циклопропил-3-изобутил-6,6-диметил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазацклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)амино)-1-оксoproпан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксobутан-2-ил)амино)-5-оксопентаноат



Пример 22 получали, как показано на схеме 3 и описано для примеров 2, 6, 9 и 13.

^1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMCO-d_6): 0,34 (м, 1H); 0,66 (м, 1H); 0,74 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 0,76 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 0,78 (с, 3H); 0,80 (м, 1H); 0,82 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 0,85 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 1,04 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 1,08 (с, 3H); 1,11 (м, 1H); 1,20 (м, 1H); 1,23 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 1,43-1,54 (м, 2H); 1,78 (м, 1H); 1,82 (м, 2H); 1,98 (м, 1H); 2,22 (м, 1H); 2,28 (м, 2H); 2,65 (м, 3H); 2,79 (м, 1H); 2,81 (с, 4H); 2,97 (дд, $J=2,2$ и $7,9$ Гц, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,89 (д, $J=2,2$ Гц, 1H); 4,02 (м, 1H); 4,17 (дд, $J=6,7$ и $8,7$ Гц, 1H); 4,27 (д, $J=6,3$ Гц, 2H); 4,30 (м, 1H); 4,37 (м, 1H); 5,10 (м, 1H); 5,79 (дд, $J=1,8$ и $15,5$ Гц, 1H); 6,39 (ддд, $J=4,0$, $11,6$ и $15,5$ Гц, 1H); 7,02 (д, $J=8,7$ Гц, 1H); 7,11 (дд, $J=2,3$ и $8,7$ Гц, 1H); 7,20 (д, $J=2,3$ Гц, 1H); 7,22 (м, 4H); 7,46 (с, 1H); 7,77 (д, $J=9,0$ Гц, 1H); 7,89 (д, $J=8,6$ Гц, 1H); 8,05 (д, $J=7,5$ Гц, 1H); 8,29 (д, $J=7,6$ Гц, 1H); 8,32 (т, $J=6,3$ Гц, 1H).

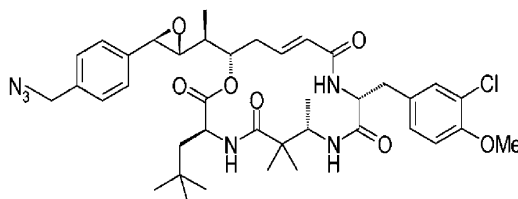
Пример 23. mAb-пр. 22



Пример 23 получали аналогично примерам 3, 7, 10 и 14. 45 мг примера 23 получали в виде бесцветного прозрачного раствора в концентрации 2,14 мг/мл с DAR 3,6 (МСВР), мономерной чистотой 100% и общим выходом 75%.

SEC-МСВР: спектр для интактного ADC на фиг. 6; $m/z=150341$ (D1); $m/z=151329$ (D2); $m/z=152317$ (D3); $m/z=153308$ (D4); $m/z=154296$ (D5); $m/z=155287$ (D6); $m/z=156279$ (D7); $m/z=157267$ (D8).

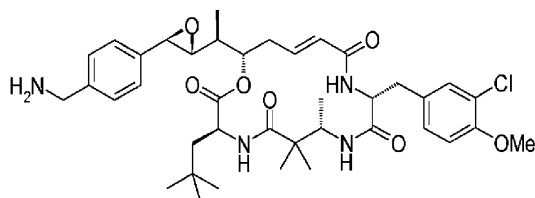
Пример 24. (3S,7S,10R,16S,E)-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(азидометил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-1-окса-4,8,11-триазаациклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон



Пример 24 получали по следующему общему пути С, изображенному на схеме 3 и описанному для примера 32.

^1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMSO-d_6): 0,83 (с, 9H); 0,88 (д, $J=6,8$ Гц, 3H); 1,00 (с, 3H); 1,03 (д, $J=7,1$ Гц, 3H); 1,19 (с, 3H); 1,33 (д, $J=14,5$ Гц, 1H); 1,84 (м, 1H); 1,97 (дд, $J=9,8$ и $14,5$ Гц, 1H); 2,27 (дд, $J=11,1$ и $14,5$ Гц, 1H); 2,61 (м, 1H); 2,69 (дд, $J=11,1$ и $14,2$ Гц, 1H); 2,92 (дд, $J=2,1$ и $7,7$ Гц, 1H); 2,96 (дд, $J=3,6$ и $14,2$ Гц, 1H); 3,43 (м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,96 (д, $J=2,1$ Гц, 1H); 4,08 (ддд, $J=3,6$, $7,1$ и $11,1$ Гц, 1H); 4,12 (м, 1H); 4,46 (с, 2H); 5,05 (ддд, $J=1,3$, $3,9$ и $11,3$ Гц, 1H); 5,90 (дд, $J=1,3$ и $15,3$ Гц, 1H); 6,45 (ддд, $J=4,7$, $10,7$ и $15,3$ Гц, 1H); 7,02 (д, $J=8,7$ Гц, 1H); 7,20 (дд, $J=2,4$ и $8,7$ Гц, 1H); 7,32 (м, 3H); 7,40 (д, $J=8,4$ Гц, 2H); 7,88 (д, $J=8,4$ Гц, 1H); 7,92 (д, $J=7,1$ Гц, 1H); 8,40 (д, $J=7,4$ Гц, 1H). ЖХМС (A5): ES $m/z=749$ $[\text{M-H}]^-$; $m/z=751$ $[\text{M+H}]^+$; $m/z=795$ $[\text{M-H+HCO}_2\text{H}]^-$; $t_R=1,52$ мин.

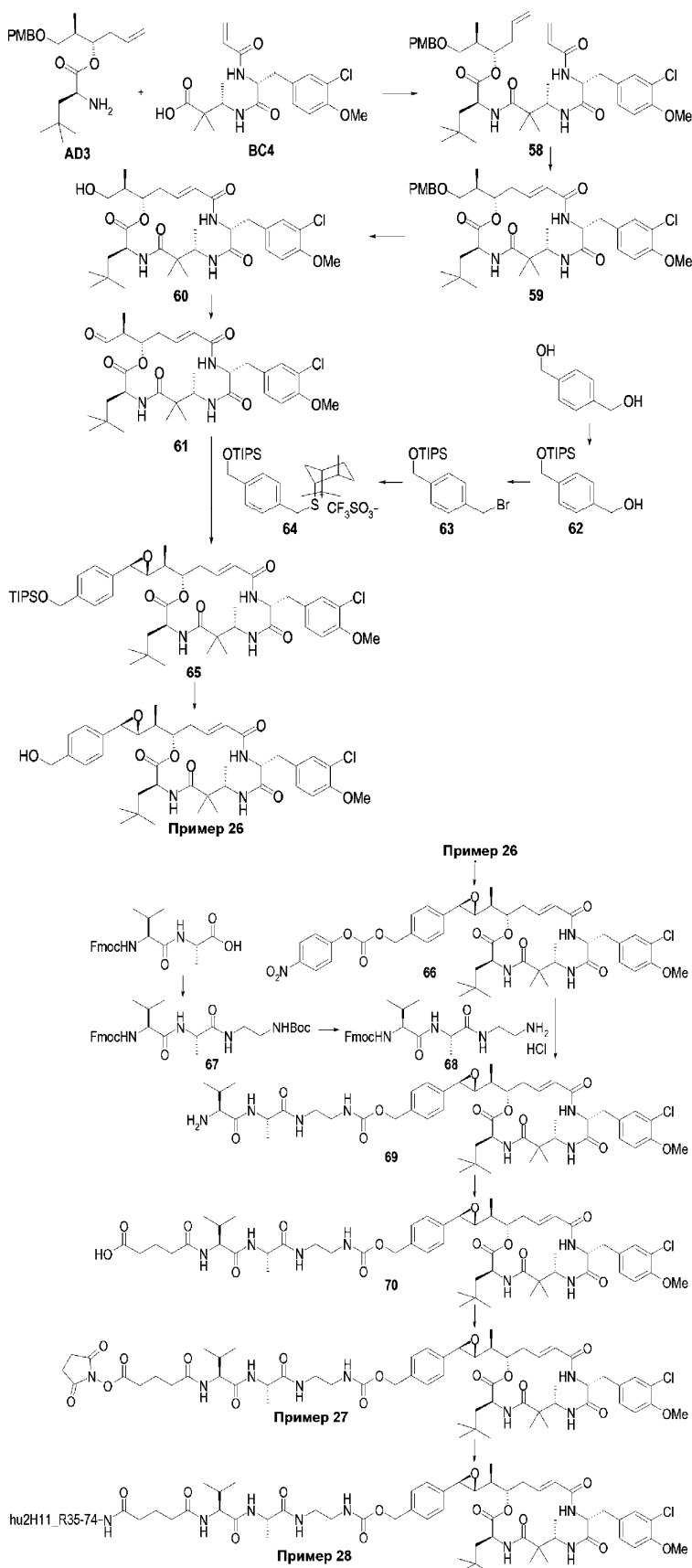
Пример 25. (3S,7S,10R,16S,E)-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(аминометил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-1-окса-4,8,11-триазаациклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон



Пример 25 получали, как описано для примеров 1, 5, 8 и 11.

^1H -ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d_6): 0,86 (с, 9H); 0,88 (д, $J=6,9$ Гц, 3H); 0,98 (с, 3H); 1,02 (д, $J=7,1$ Гц, 3H); 1,18 (с, 3H); 1,34 (д, $J=14,5$ Гц, 1H); 1,80 (м, 1H); 1,98 (дд, $J=9,8$ и $14,5$ Гц, 1H); 2,27 (дд, $J=11,1$ и $14,5$ Гц, 1H); 2,40 (уш.м, 2H); 2,62 (м, 1H); 2,68 (дд, $J=11,1$ и $14,2$ Гц, 1H); 2,90 (дд, $J=2,1$ и $7,7$ Гц, 1H); 2,96 (дд, $J=3,6$ и $14,2$ Гц, 1H); 3,43 (м, 1H); 3,76 (с, 2H); 3,80 (с, 3H); 3,91 (д, $J=2,1$ Гц, 1H); 4,02-4,15 (м, 2H); 5,04 (ддд, $J=1,3$, $3,9$ и $11,3$ Гц, 1H); 5,88 (дд, $J=1,3$ и $15,4$ Гц, 1H); 6,45 (ддд, $J=4,7$, $10,7$ и $15,3$ Гц, 1H); 7,03 (д, $J=8,5$ Гц, 1H); 7,20 (дд, $J=2,2$ и $8,5$ Гц, 1H); 7,23 (д, $J=8,3$ Гц, 2H); 7,32 (д, $J=2,2$ Гц, 2H); 7,36 (д, $J=8,3$ Гц, 2H); 7,86 (д, $J=8,3$ Гц, 1H); 7,93 (д, $J=6,9$ Гц, 1H); 8,40 (д, $J=7,1$ Гц, 1H). ЖХМС (A5): ES $m/z=723$ $[\text{M-H}]^-$; $m/z=725$ $[\text{M+H}]^+$; $m/z=769$ $[\text{M-H+HCO}_2\text{H}]^-$; $t_R=0,87$ мин.

Синтез примеров 26-28: 3-(S)-неопентил-7-(S)-Ме-аза-C52-бензилового спирта, NHS-эфира глутарил-Val-Ala-EDA-3-(S)-неопентил-7-(S)-Ме-аза-C52-бензилового спирта и соответствующего ADC



Соединение 58: (2R,3S)-1-((4-метоксибензил)окси)-2-метилгекс-5-ен-3-ил-(S)-2-((S)-3-((R)-2-акрил-амидо-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамидо)-2,2-диметилбутанамидо)-4,4-диметилпентаноат.

К раствору соединения BC4 (365 мг, 919,7 мкмоль) в ДМФ (12 мл) добавляли NATU (402 мг, 1,06 ммоль) и HOAt (144 мг, 1,06 ммоль), реакционную среду перемешивали при КТ в течение 30 мин, затем добавляли раствор соединения AD3 (365 мг, 965,7 мкмоль) в ДМФ (5 мл) и DIEA (562 мкл, 3,22 ммоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 4 ч, затем разбавляли H₂O (50 мл) и экстрагировали

EtOAc (3×50 мл). Объединенные органические фазы промывали H₂O (15 мл), насыщ. соевым раствором (3×15 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью двух последовательных флэш-хроматографий на 30 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/МеОН и гептан/EtOAc) с получением 564 мг соединения 58 в виде бесцветной пены (81%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,83 (д, J=6,9 Гц, 3H); 0,85 (с, 9H); 0,87 (д, J=6,9 Гц, 3H); 1,00 (с, 3H); 1,03 (с, 3H); 1,55 (дд, J=2,4 и 14,5 Гц, 1H); 1,78 (дд, J=9,5 и 14,5 Гц, 1H); 1,96 (м, 1H); 2,20 (м, 1H); 2,30 (м, 1H); 2,72 (дд, J=9,6 и 13,9 Гц, 1H); 2,87 (дд, J=5,3 и 13,9 Гц, 1H); 3,20 (дд, J=6,5 и 9,5 Гц, 1H); 3,37 (дд, J=5,4 и 9,5 Гц, 1H); 3,76 (с, 3H); 3,80 (с, 3H); 4,19 (м, 1H); 4,28 (м, 1H); 4,34 (с, 2H); 4,55 (м, 1H); 4,82 (м, 1H); 5,00 (д, J=10,2 Гц, 1H); 5,07 (д, J=17,4 Гц, 1H); 5,55 (дд, J=2,3 и 10,2 Гц, 1H); 5,71 (м, 1H); 6,01 (дд, J=2,3 и 17,1 Гц, 1H); 6,28 (дд, J=10,2 и 17,1 Гц, 1H); 6,90 (д, J=8,7 Гц, 2H); 7,02 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,17 (дд, J=2,3 и 8,6 Гц, 1H); 7,22 (д, J=8,7 Гц, 2H); 7,32 (д, J=2,3 Гц, 1H); 7,65 (д, J=9,5 Гц, 1H); 7,70 (д, J=7,9 Гц, 1H); 8,35 (д, J=8,4 Гц, 1H). ЖХМС (A5): ES m/z=754 [M-H]⁻; m/z=756 [M+H]⁺; m/z=800 [M-H+HCO₂N]⁻; t_R=1,62 мин.

Соединение 59: (3S,7S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-16-((R)-1-((4-метоксибензил)окси)пропан-2-ил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-1-окса-4,8,11-триазабициклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

К раствору соединения 58 (560 мг, 740,4 мкмоль) в ДХМ (56 мл) добавляли в атмосфере Ag катализатор Граббса I (31,0 мг, 37,02 мкмоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 1 ч 30 мин до добавления 31,0 мг катализатора. Перемешивание проводили при КТ в течение 1 ч 30 мин до добавления 31,0 мг катализатора и реакционную среду перемешивали при КТ в течение 1 ч. 30 мин. Концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 25 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/МеОН) с получением 330 мг соединения 59 (61%) и 220 мг, которые дополнительно очищали с помощью флэш-хроматографии на 15 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/МеОН) с получением 204 мг соединения 59 (37%) в виде смеси с трициклогексилфосфиноксидом.

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,85 (с, 9H); 0,88 (д, J=6,9 Гц, 3H); 0,91 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,04 (с, 3H); 1,20 (с, 3H); 1,29 (д, J=14,5 Гц, 1H); 1,95 (дд, J=9,8 и 14,5 Гц, 1H); 1,99 (м, 1H); 2,26 (м, 1H); 2,43 (м, 1H); 2,72 (дд, J=10,1 и 14,3 Гц, 1H); 2,97 (дд, J=3,6 и 14,3 Гц, 1H); 3,27 (дд, J=6,1 и 9,3 Гц, 1H); 3,40 (дд, J=5,8 и 9,3 Гц, 1H); 3,46 (м, 1H); 3,72 (с, 3H); 3,80 (с, 3H); 4,10 (м, 1H); 4,13 (м, 1H); 4,38 (с, 2H); 4,97 (м, 1H); 5,93 (д, J=15,4 Гц, 1H); 6,43 (дд, J=4,8, 10,7 и 15,4 Гц, 1H); 6,90 (д, J=8,7 Гц, 2H); 7,02 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,17 (д, J=8,6 Гц, 3H); 7,36 (д, J=2,3 Гц, 1H); 7,88 (м, 2H); 8,48 (д, J=7,5 Гц, 1H). ЖХМС (A5): ES m/z=726 [M-H]⁻; m/z=728 [M+H]⁺; m/z=772 [M-H+HCO₂N]⁻; t_R=1,54 мин.

Соединение 60: (3S,7S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-16-((R)-1-гидроксипропан-2-ил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-1-окса-4,8,11-триазабициклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

Соединение 59 (532 мг, 730,4 мкмоль) обрабатывали раствором ТФУК (3,93 мл) в ДХМ (36 мл) при КТ в течение 30 мин. Реакционную среду выливали в 9% водн. NaHCO₃ (130 мл) при магнитном перемешивании. Перемешивание продолжали в течение 30 мин, затем водную фазу экстрагировали ДХМ (2×70 мл). Объединенные органические фазы промывали H₂O (3×20 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 30 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/МеОН) с получением 299 мг соединения 60 в виде белой пены (67%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,88 (д, J=6,9 Гц, 3H); 0,89 (с, 9H); 0,90 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,03 (с, 3H); 1,20 (с, 3H); 1,36 (дд, J=1,8 и 14,5 Гц, 1H); 1,80 (м, 1H); 1,96 (дд, J=9,6 и 14,5 Гц, 1H); 2,25 (м, 1H); 2,43 (м, 1H); 2,72 (дд, J=11,1 и 14,3 Гц, 1H); 2,97 (дд, J=3,8 и 14,3 Гц, 1H); 3,25 (м, 1H); 3,45 (м, 2H); 3,80 (с, 3H); 4,10 (м, 1H); 4,16 (м, 1H); 4,57 (т, J=5,3 Гц, 1H); 4,98 (м, 1H); 5,93 (дд, J=1,3 и 15,3 Гц, 1H); 6,45 (дд, J=4,9, 10,7 и 15,3 Гц, 1H); 7,02 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,22 (дд, J=2,3 и 8,6 Гц, 1H); 7,36 (д, J=2,3 Гц, 1H); 7,89 (м, 2H); 8,48 (д, J=7,3 Гц, 1H). ЖХМС (A5): ES m/z=606 [M-H]⁻; m/z=608 [M+H]⁺; t_R=1,2 мин.

Соединение 61: (S)-2-((3S,7S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазабициклогексадек-13-ен-16-ил)пропаналь.

К раствору соединения 60 (297 мг, 488,4 мкмоль) в ДХМ (6 мл), охлажденному на бане лед/ацетон, добавляли при 0°C раствор KBr (58,11 мг, 488,4 мкмоль) в H₂O (1,18 мл), ТЕМРО (1,57 мг, 9,8 мкмоль) и по каплям водный раствор 1,56М гипохлорита натрия pH 9,5 (467,6 мкл, 732,52 мкмоль). Перемешивание проводили при 0°C в течение 15 мин, затем добавляли при 0°C насыщ. Na₂S₂O₃ (3,56 мл), ледяную баню удаляли и реакционную среду перемешивали в течение 10 мин. Затем его экстрагировали ДХМ (3×25 мл), объединенные органические фазы промывали H₂O (2×10 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 15 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/МеОН) с получением 139 мг соединения 61 в виде белого лака (47%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,85 (с, 9H); 0,90 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,03 (с, 3H); 1,04 (д, J=6,9 Гц, 3H); 1,20 (с, 3H); 1,26 (д, J=15,3 Гц, 1H); 1,95 (м, 1H); 2,44 (м, 1H); 2,57 (м, 1H); 2,72 (дд, J=11,2 и 14,4 Гц, 1H); 2,80 (м, 1H); 2,98 (дд, J=3,1 и 14,4 Гц, 1H); 3,80 (с, 3H); 4,10 (м, 3H); 5,22 (м, 1H); 5,98 (д, J=15,3 Гц, 1H); 6,47 (дд, J=4,9, 10,8 и 15,3 Гц, 1H); 7,04 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,22 (дд, J=2,3 и 8,7 Гц, 1H); 7,37 (с, 1H); 7,90 (м, 1H); 7,92 (д, J=8,2 Гц, 1H); 8,53 (д, J=7,6 Гц, 1H); 9,68 (с, 1H). ЖХМС (A5): ES m/z=604 [M-

H⁺; m/z=606 [M+H]⁺; m/z=650 [M-H+HCO₂N]⁺; t_R=1,28 мин.

Соединение 62: (4-(((триизопропилсилил)окси)метил)фенил)метанол.

К раствору 1,4-бензолдиметанола (2 г, 14,33 ммоль) в ТГФ (100 мл) добавляли имидазол (1,13 г, 16,48 ммоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 15 мин, затем добавляли триизопропилсилилхлорид (3,14 мл, 14,33 ммоль) и перемешивание продолжали при КТ в течение ночи. К реакционной смеси добавляли Et₂O (50 мл) и органическую фазу дважды промывали насыщ. соевым раствором (100 мл), отфильтровывали над MgSO₄, концентрировали под вакуумом, растворяли в ДХМ, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 200 г силикагеля (изократическое элюирование 8:2 гептан/EtOAc) с получением 1,9 г соединения 62 в виде бесцветного масла (45%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 1,04 (д, J=6,7 Гц, 18H); 1,15 (м, 3H); 4,48 (д, J=5,7 Гц, 2H); 4,78 (с, 2H); 5,13 (т, J=5,7 Гц, 1H); 7,29 (с, 4H).

Соединение 63: ((4-(бромметил)бензил)окси)триизопропилсилан.

К суспензии N-бромсукцинимид (1,29 г, 7,16 ммоль) в ДХМ (65 мл), охлажденной при 0°C, добавляли по каплям диметилсульфид (953 мкл, 12,9 ммоль). Перемешивание проводили при 0°C в течение 10 мин, затем реакционную среду охлаждали при -20°C и перемешивали при -20°C в течение 10 мин. Затем по каплям добавляли раствор соединения 62 (1,9 г, 6,45 ммоль) в ДХМ (30 мл), охлажденный до -20°C. Перемешивание проводили при -20°C в течение 15 мин, затем при 0°C в течение 15 мин и при КТ в течение ночи. Реакционную среду дважды промывали насыщ. соевым раствором (100 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью двух последовательных флэш-хроматографий на 40 г силикагеля (градиентное элюирование гептан/EtOAc). Фракции, содержащие ожидаемое соединение, объединяли, концентрировали под вакуумом и растворяли в гептане (8 мл). Суспензию отфильтровывали, фильтрат концентрировали под вакуумом, растворяли в Et₂O (5 мл), охлаждали при -20°C, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом с получением 1,18 г соединения 63 в виде бледно-желтого масла (51%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 1,04 (д, J=6,8 Гц, 18H); 1,15 (м, 3H); 4,70 (с, 2H); 4,81 (с, 2H); 7,29 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,41 (д, J=8,4 Гц, 2H). ЖХМС (A5): ES m/z=104; m/z=356 [M]⁺; t_R=1,99 мин.

Соединение 64: (1R, 4S, 5R, 6S)-4,7,7-триметил-6-(4-(((триизопропилсилил)окси)метил)бензил)-6-тиабицикло[3.2.1]октан-6-ил трифторметансульфонат.

К (1R,4R,5R)-4,7,7-триметил-6-тиабицикло[3.2.1]октану (номер CAS [5718-75-2], 562,3 мг, 3,3 ммоль) добавляли раствор соединения 63 (1,18 г, 3,3 ммоль) в ДХМ (3,4 мл). Затем по каплям добавляли раствор трифторметансульфоната лития (2,63 г, 16,51 ммоль) в H₂O (3 мл) и реакционную среду перемешивали при КТ в течение ночи. Затем в реакционную среду добавляли H₂O (15 мл) и ДХМ (15 мл) и перемешивание продолжали при КТ в течение 10 мин. Водную фазу экстрагировали ДХМ (3×20 мл), объединенные органические фазы промывали насыщ. соевым раствором (3×8 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом. Бледно-желтое масло растирали в iPr₂O (5 мл), таким образом полученное твердое вещество отфильтровывали, промывали iPr₂O (2×5 мл) и высушивали под вакуумом с получением 1,125 г соединения 64 в виде белого твердого вещества (57%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 1,04 (м, 21H); 1,15 (м, 3H); 1,45 (м, 1H); 1,60 (м, 2H); 1,68 (с, 3H); 1,71 (м, 1H); 1,74 (с, 3H); 1,98 (м, 1H); 2,40 (д, J=14,6 Гц, 1H); 2,45 (м, 1H); 2,58 (уш.д, J=14,6 Гц, 1H); 3,85 (м, 1H); 4,56 (д, J=12,6 Гц, 1H); 4,83 (с, 2H); 4,90 (д, J=12,6 Гц, 1H); 7,44 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,57 (д, J=8,4 Гц, 2H).

Соединение 65: (3S,7S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(((триизопропилсилил)окси)метил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-1-окса-4,8,11-триаза-циклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

К раствору соединений 61 (138 мг, 227,7 мкмоль) и 64 (149,5 мг, 250,4 мкмоль) в ДХМ (4 мл), охлажденному до -70°C, добавляли по каплям ВЕМР (номер CAS [98015-45-3], 90,2 мкл, 296,0 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при -70°C в течение 2 ч, к реакционной смеси добавляли насыщ. солевой раствор (7 мл), баню удаляли и продолжали энергичное перемешивание до КТ. Водную фазу экстрагировали ДХМ (3×20 мл), объединенные органические фазы высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 10 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 163 мг соединения 65 в виде бесцветного масла (30%) и 60 мг соединения 61 (43%).

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,84 (с, 9H); 0,88 (д, J=6,9 Гц, 3H); 1,00 (с, 3H); 1,04 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,05 (д, J=7,3 Гц, 18H); 1,15 (м, 3H); 1,19 (с, 3H); 1,32 (д, J=14,8 Гц, 1H); 1,82 (м, 1H); 1,97 (дд, J=9,9 и 14,8 Гц, 1H); 2,28 (дт, J=11,1 и 14,9 Гц, 1H); 2,61 (м, 1H); 2,69 (дд, J=11,2 и 14,3 Гц, 1H); 2,91 (дд, J=2,2 и 7,6 Гц, 1H); 2,95 (дд, J=3,8 и 14,3 Гц, 1H); 3,43 (м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,91 (д, J=2,2 Гц, 1H); 4,08 (ддд, J=3,8, 7,4 и 11,2 Гц, 1H); 4,12 (м, 1H); 4,81 (с, 2H); 5,04 (ддд, J=1,5, 4,5 и 11,1 Гц, 1H); 5,89 (дд, J=1,5 и 15,2 Гц, 1H); 6,44 (ддд, J=4,5, 10,6 и 15,2 Гц, J=2,3 Гц, 1H); 7,36 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,88 (д, J=8,4 Гц, 1H); 7,91 (д, J=7,1 Гц, 1H); 8,39 (д, J=7,4 Гц, 1H). ЖХМС (A4): ES m/z=120; m/z=882 [M+H]⁺; t_R=7,65 мин.

Пример 26. (3S,7S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(гидроксиметил)

фенил)оксиран-2-ил)этил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-1-окса-4,8,11-триазациклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

К раствору соединения 65 в ТГФ, охлажденному при 0°C, добавляли ТВАФ. Реакционную среду перемешивали при 0°C в течение 1 ч 30 мин, затем добавляли H₂O (5 мл) и перемешивание продолжали в течение 20 мин. Реакционную среду экстрагировали ДХМ (3×20 мл), объединенную органическую фазу промывали насыщ. соевым раствором (3×5 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 15 г силикагеля (градиентное элюирование EtOAc/MeOH/H₂O) с получением 69 мг примера 26 в виде белого лака (91%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,85 (с, 9H); 0,89 (д, J=6,9 Гц, 3H); 1,00 (с, 3H); 1,04 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,19 (с, 3H); 1,35 (д, J=14,8 Гц, 1H); 1,80 (м, 1H); 1,99 (дд, J=9,9 и 14,8 Гц, 1H); 2,27 (дт, J=11,1 и 14,9 Гц, 1H); 2,61 (м, 1H); 2,69 (дд, J=11,2 и 14,3 Гц, 1H); 2,90 (дд, J=2,2 и 7,6 Гц, 1H); 2,95 (дд, J=3,8 и 14,3 Гц, 1H); 3,43 (м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,91 (д, J=2,2 Гц, 1H); 4,06-4,15 (м, 2H); 4,50 (д, J=5,9 Гц, 2H); 5,03 (дд, J=1,5, 3,7 и 11,5 Гц, 1H); 5,20 (т, J=5,9 Гц, 1H); 5,89 (дд, J=1,5 и 15,3 Гц, 1H); 6,43 (ддд, J=4,6, 10,7 и 15,3 Гц, 1H); 7,02 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,20 (дд, J=2,2 и 8,6 Гц, 1H); 7,23 (д, J=8,3 Гц, 2H); 7,32 (м, 3H); 7,87 (д, J=8,3 Гц, 1H); 7,92 (д, J=7,0 Гц, 1H); 8,40 (д, J=7,4 Гц, 1H). ЖХМС (A5): ES m/z=724 [M-H]⁻; m/z=726 [M+H]⁺; m/z=770 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=1,29 мин.

Соединение 66: 4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,7S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазациклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил(4-нитрофенил)карбонат.

К раствору примера 26 (68 мг, 93,6 мкмоль) в ДХМ (5 мл) добавляли бис(4-нитрофенил)карбонат (118,7 мг, 374,5 мкмоль) и по каплям DIEA (49 мкл, 281,0 мкмоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 6 д, затем добавляли насыщ. солевой раствор и экстрагировали ДХМ (3×10 мл). Объединенные органические фазы высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 5 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 79 мг соединения 66 в виде белого лака (94%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,85 (с, 9H); 0,89 (д, J=6,9 Гц, 3H); 1,00 (с, 3H); 1,05 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,19 (с, 3H); 1,34 (д, J=14,6 Гц, 1H); 1,83 (м, 1H); 1,97 (дд, J=9,9 и 14,6 Гц, 1H); 2,28 (дт, J=11,1 и 14,9 Гц, 1H); 2,61 (м, 1H); 2,69 (дд, J=11,2 и 14,3 Гц, 1H); 2,93 (м, 2H); 3,42 (м, 1H); 3,79 (с, 3H); 3,99 (д, J=2,2 Гц, 1H); 4,09 (м, 2H); 5,05 (дд, J=1,3, 4,0 и 11,1 Гц, 1H); 5,31 (с, 2H); 5,89 (дд, J=1,3 и 15,3 Гц, 1H); 6,47 (ддд, J=4,8, 10,8 и 15,3 Гц, 1H); 7,01 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,21 (дд, J=2,2 и 8,6 Гц, 1H); 7,31 (д, J=2,2 Гц, 1H); 7,36 (д, J=8,5 Гц, 2H); 7,50 (д, J=8,5 Гц, 2H); 7,59 (д, J=9,3 Гц, 2H); 7,87 (д, J=8,3 Гц, 1H); 7,92 (д, J=7,0 Гц, 1H); 8,32 (д, J=9,3 Гц, 2H); 8,39 (д, J=7,4 Гц, 1H). ЖХМС (A5): ES m/z=889 [M-H]⁻; m/z=891 [M+H]⁺; m/z=935 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=1,55 мин.

Соединение 67: (9H-флуорен-9-ил)метил-((S)-1-(((S)-1-((2-NBoc-аминоэтил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамата гидрохлорид.

К суспензии Fmoc-Val-Ala-OH (3,5 г, 8,53 ммоль) в ДХМ (100 мл) добавляли ТЭА (3,6 мл, 25,58 мл), что приводило к полному растворению исходного материала, N-Boc-EDA (1,62 мл, 10,23 ммоль) и раствор пропилфосфонового ангидрида (6,51 г, 10,23 ммоль) 50% в ДХМ. Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 3 ч, затем добавляли 1N NaOH (50 мл) и суспензию отфильтровывали, промывали H₂O и ДХМ. Органическую фазу фильтрата промывали H₂O. Осадок и органическую фазу объединяли, частично концентрировали под вакуумом, отфильтровывали, промывали ДХМ и высушивали с получением 3,952 г соединения 67 в виде белого порошка (84%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,84 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,86 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,19 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,37 (с, 9H); 1,99 (м, 1H); 2,92-3,14 (м, 4H); 3,88 (дд, J=6,9 и 9,1 Гц, 1H); 4,19-4,35 (м, 4H); 6,71 (м, 1H); 7,32 (м, 2H); 7,38 (м, 1H); 7,42 (м, 2H); 7,73 (м, 2H); 7,84 (т, J=6,8 Гц, 1H); 7,89 (д, J=7,8 Гц, 2H); 7,92 (д, J=7,8 Гц, 1H).

Соединение 68: (9H-флуорен-9-ил)метил-((S)-1-(((S)-1-((2-аминоэтил)амино)-1-оксопропан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамата гидрохлорид.

К суспензии соединения 67 (100 мг, 159,5 мкмоль) в диоксане (3 мл) добавляли HCl 4N в диоксане (905 мкл, 3,62 ммоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 20 ч, затем концентрировали под вакуумом. Неочищенный продукт ресуспендировали в iPr₂O (3 мл), погружали в ультразвуковую баню и отфильтровывали. Полученный таким образом осадок промывали iPr₂O (2×3 мл) и высушивали под вакуумом с получением 78 мг соединения 68 в виде белого твердого вещества (88%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,85 (д, J=6,9 Гц, 3H); 0,87 (д, J=6,9 Гц, 3H); 1,23 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,99 (м, 1H); 2,83 (м, 2H); 3,29 (м, 2H); 3,89 (дд, J=6,9 и 8,9 Гц, 1H); 4,19-4,38 (м, 4H); 7,33 (м, 2H); 7,42 (м, 3H); 7,75 (м, 2H); 7,88 (уш.с, 3H); 7,90 (д, J=7,6 Гц, 2H); 8,08 (д, J=7,3 Гц, 1H); 8,14 (д, J=5,9 Гц, 1H).

Соединение 69: 4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,7S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазациклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)пропанамидо)этил)карбамат.

К суспензии соединений 66 (78 мг, 87,5 мкмоль) и 68 (51,4 мг, 105,0 мкмоль) в ДХМ добавляли

DIEA (44,0 мкл, 262,5 мкмоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение ночи, затем добавляли соединение 68 (24 мг, 49 мкмоль) и DIEA (15 мкл) и перемешивание продолжали при КТ в течение 1 д. Добавляли пиперидин (87,0 мкл, 875,0 мкмоль) и перемешивание продолжали при КТ в течение ночи. Реакционную среду концентрировали под вакуумом и очищали с помощью двух последовательных флэш-хроматографий на 5 г силикагеля (градиентное элюирование EtOAc/MeOH/H₂O) с получением 57 мг соединения 69 в виде белого лака (66%).

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,75 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,85 (с, 9H); 0,86 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,87 (д, J=6,7 Гц, 3H); 0,99 (с, 3H); 1,04 (д, J=7,0 Гц, 3H); 1,18 (м, 6H); 1,33 (д, J=14,5 Гц, 1H); 1,75 (уш.с, 2H); 1,81 (м, 1H); 1,92 (м, 1H); 1,98 (дд, J=10,0 и 14,5 Гц, 1H); 2,28 (м, 1H); 2,61 (м, 1H); 2,69 (дд, J=11,3 и 14,7 Гц, 1H); 2,90 (дд, J=2,0 и 7,5 Гц, 1H); 2,96 (м, 1H); 2,98 (д, J=4,7 Гц, 1H); 3,05 (м, 2H); 3,12 (м, 2H); 3,43 (м, 1H); 3,81 (с, 3H); 3,93 (д, J=2,0 Гц, 1H); 4,09 (м, 2H); 4,26 (м, 1H); 5,01 (с, 2H); 5,04 (м, 1H); 5,89 (дд, J=1,5 и 15,2 Гц, 1H); 6,45 (ддд, J=4,5, 10,4 и 15,2 Гц, 1H); 7,02 (д, J=8,8 Гц, 1H); 7,20 (дд, J=2,4 и 8,8 Гц, 1H); 7,26 (т, J=6,0 Гц, 1H); 7,29 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,32 (д, J=2,5 Гц, 1H); 7,37 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,88 (д, J=8,4 Гц, 1H); 7,93 (д, J=7,1 Гц, 1H); 8,00 (т, J=6,0 Гц, 1H); 8,03 (д, J=8,1 Гц, 1H); 8,41 (д, J=7,2 Гц, 1H). ЖХМС (A5): ES m/z=492 [M+2H]²⁺; m/z=980 [M-H]⁻; m/z=982 [M+H]⁺; m/z=1026 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=0,91 мин.

Соединение 70: (9S,12S)-1-(4-((2R, 3R)-3-((S)-1-((3S,7S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазаацетилгексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)фенил)-12-изопропил-9-метил-3,8,11,14-тетраоксо-2-окса-4,7,10,13-тетраазаоктадекан-18-овая кислота.

К раствору соединения 69 (56,0 мг, 56,8 мкл) в ДХМ (8 мл) добавляли раствор глутарового ангидрида (7,27 мг, 62,5 мкмоль) в ДХМ (4 мл). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 2 ч, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 5 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH/H₂O) с получением 35,5 мг соединения 70 в виде белого лака (56%).

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,81 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,83 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,85 (с, 9H); 0,87 (д, J=6,5 Гц, 3H); 0,99 (с, 3H); 1,04 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,19 (м, 6H); 1,32 (д, J=14,3 Гц, 1H); 1,70 (м, 2H); 1,81 (м, 1H); 1,92 (м, 1H); 1,98 (м, 2H); 2,15 (м, 2H); 2,19 (т, J=7,5 Гц, 2H); 2,27 (м, 1H); 2,61 (м, 1H); 2,69 (дд, J=11,1 и 14,1 Гц, 1H); 2,91 (д, J=7,6 Гц, 1H); 2,95 (м, 1H); 3,04 (м, 2H); 3,10 (м, 2H); 3,41 (м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,93 (с, 1H); 4,03-4,16 (м, 3H); 4,19 (м, 1H); 5,01 (с, 2H); 5,04 (м, 1H); 5,89 (д, J=15,6 Гц, 1H); 6,43 (ддд, J=5,3, 11,0 и 15,6 Гц, 1H); 7,02 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,20 (дд, J=2,3 и 8,7 Гц, 1H); 7,28 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,30 (м, 1H); 7,32 (д, J=2,3 Гц, 1H); 7,36 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,88 (м, 2H); 7,93 (д, J=7,4 Гц, 1H); 7,98 (уш.с, 1H); 8,06 (уш.с, 1H); 8,42 (д, J=7,4 Гц, 1H). ЖХМС (A5): ES m/z=549 [M+2H]²⁺; m/z=1094 [M-H]⁻; m/z=1096 [M+H]⁺; t_R=1,21 мин.

Пример 27. 2,5-Диоксопирролидин-1-ил-(9S,12S)-1-(4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,7S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазаацетилгексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)фенил)-12-изопропил-9-метил-3,8,11,14-тетраоксо-2-окса-4,7,10,13-тетраазаоктадекан-18-оат.

К раствору соединения 70 (14,6 мг, 13,3 мкмоль) в ДХМ (5 мл) в атмосфере Ar добавляли ДСК (4,3 мг, 16,0 мкмоль) и DIEA (2,8 мкл, 16,0 мкмоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 3 ч, затем добавляли ДСК (1,5 мг, 5,6 мкмоль) и DIEA (1 мкл, 5,7 мкмоль) и перемешивание проводили при КТ в течение 1 ч.

Реакционную среду концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 16,4 г диол-модифицированного силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/iPrOH) с получением 11,4 мг примера 27 в виде белого лака (72%).

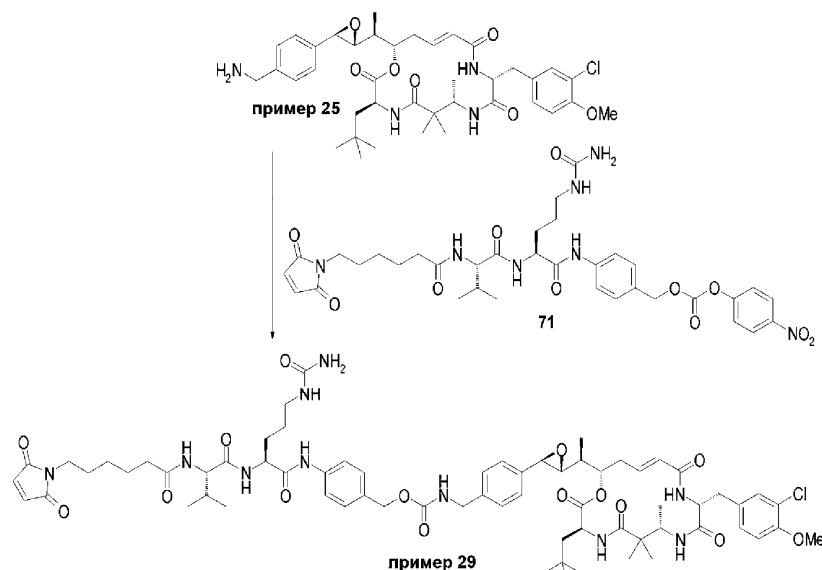
¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,81 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,83 (д, J=7,0 Гц, 3H); 0,85 (с, 9H); 0,88 (д, J=6,5 Гц, 3H); 0,99 (с, 3H); 1,04 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,19 (м, 6H); 1,34 (д, J=14,4 Гц, 1H); 1,83 (м, 3H); 1,98 (м, 2H); 2,26 (м, 1H); 2,29 (м, 2H); 2,60 (м, 1H); 2,68 (т, J=7,6 Гц, 2H); 2,70 (дд, J=11,2 и 14,3 Гц, 1H); 2,80 (с, 4H); 2,91 (дд, J=2,3 и 7,6 Гц, 1H); 2,95 (дд, J=3,7 и 14,3 Гц, 1H); 2,99-3,20 (м, 4H); 3,43 (м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,93 (д, J=2,2 Гц, 1H); 4,05-4,25 (м, 4H); 5,01 (м, 2H); 5,03 (м, 1H); 5,89 (дд, J=1,6 и 15,4 Гц, 1H); 6,44 (ддд, J=4,6, 10,9 и 15,4 Гц, 1H); 7,02 (д, J=8,5 Гц, 1H); 7,20 (м, 2H); 7,28 (д, J=8,5 Гц, 2H); 7,31 (д, J=2,3 Гц, 1H); 7,37 (д, J=8,5 Гц, 2H); 7,86 (м, 3H); 7,91 (д, J=7,1 Гц, 1H); 7,95 (д, J=7,6 Гц, 1H); 8,39 (д, J=7,3 Гц, 1H). ЖХМС (A5): ES m/z=311; m/z=1191 [M-H]⁻; m/z=1193 [M+H]⁺; m/z=1237 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=1,26 мин.

Пример 28. mAb-пр. 27.

Пример 28 получали аналогично примерам 3, 7, 10 и 14. 1,56 мг примера 28 получали в виде бесцветного прозрачного раствора в концентрации 0,78 мг/мл с DAR 4 (MCBP), мономерной чистотой 100% и общим выходом 13%.

SEC-MCBP: m/z=149405 (голое mAb); m/z=150486 (D1); m/z=151568 (D2); m/z=152645 (D3); m/z=153725 (D4); m/z=154802 (D5); m/z=155882 (D6); m/z=156961 (D7); m/z=158039 (D8).

Синтез примера 29: малеимида-мс-vc-PAVA-3-(S)-неопентил-7-(S)-Me-аза-C52-бензилового амина



Соединение 71: 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо)-3-метил-бутанамидо)-5-уреидопentanамидо)бензил(4-нитрофенил)карбонат.

Соединение 72 получали, как описано Verma V.A., et al., in Bioorg Med Chem Lett 2015, 25, 864-868.

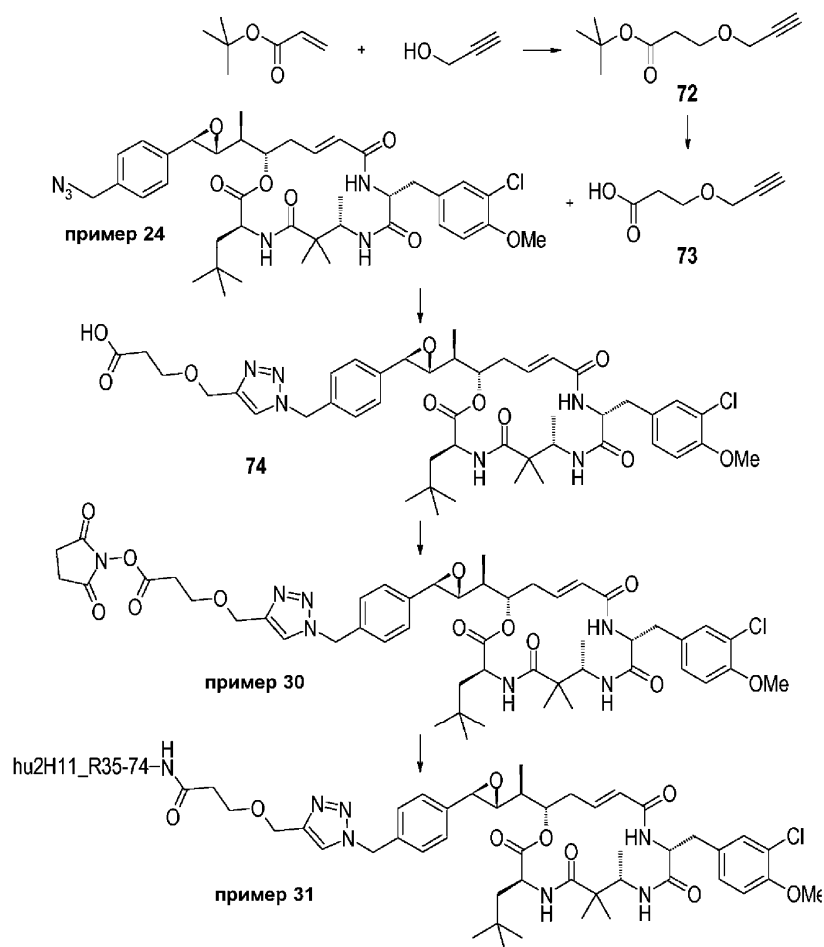
^1H -ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d_6): 0,83 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 0,87 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 1,18 (м, 2H); 1,31-1,75 (м, 8H); 1,96 (м, 1H); 2,10 (м, 1H); 2,18 (м, 1H); 2,96 (м, 1H); 3,01 (м, 1H); 3,37 (т, $J=7,2$ Гц, 2H); 4,19 (дд, $J=7,0$ и 8,6 Гц, 1H); 4,38 (м, 1H); 5,24 (с, 2H); 5,42 (с, 2H); 5,98 (т, $J=6,0$ Гц, 1H); 7,00 (с, 2H); 7,40 (д, $J=8,7$ Гц, 2H); 7,57 (д, $J=9,2$ Гц, 2H); 7,66 (д, $J=8,7$ Гц, 2H); 7,81 (д, $J=8,6$ Гц, 1H); 8,12 (д, $J=7,9$ Гц, 1H); 8,31 (д, $J=9,2$ Гц, 2H); 10,08 (с, 1H). ЖХМС (A5): ES $m/z=738$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; $m/z=782$ $[\text{M}-\text{H}+\text{HCO}_2\text{H}]^-$; $t_R=1,1$ мин.

Пример 29. 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамидо)-3-метил-бутанамидо)-5-уреидопentanамидо)бензил-(4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,7S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метокси-бензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазациклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)карбамат.

К соединению 71 (16,0 мг, 21,7 мкмоль) добавляли раствор примера 25 (14,3 мг, 19,7 мкмоль) в ДХМ (2,5 мл) и DIEA (3,4 мкл, 19,7 мкмоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение ночи, затем добавляли ДМФ (1 мл) и перемешивание продолжали при КТ в течение 1 д. H_2O (8 мл) добавляли к реакционной среде, перемешивание продолжали в течение 15 мин, затем водную фазу экстрагировали ДХМ (3×10 мл). Объединенные органические фазы высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали, концентрировали под вакуумом, дважды соиспаряли с толуолом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 5 г на силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 15,8 мг примера 29 в виде белого твердого вещества (60%).

^1H -ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d_6): 0,81 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 0,85 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 0,86 (с, 9H); 0,89 (д, $J=6,8$ Гц, 3H); 0,99 (с, 3H); 1,04 (д, $J=7,0$ Гц, 3H); 1,18 (с, 3H); 1,19 (м, 2H); 1,31-1,75 (м, 9H); 1,80 (м, 1H); 1,96 (м, 2H); 2,10 (м, 1H); 2,18 (м, 1H); 2,27 (м, 1H); 2,61 (м, 1H); 2,69 (дд, $J=10,8$ и 14,3 Гц, 1H); 2,90 (дд, $J=2,1$ и 7,6 Гц, 1H); 2,96 (м, 2H); 3,01 (м, 1H); 3,37 (т, $J=7,2$ Гц, 2H); 3,42 (м, 1H); 3,80 (с, 3H); 3,90 (д, $J=2,1$ Гц, 1H); 4,08 (м, 1H); 4,11 (м, 1H); 4,20 (м, 3H); 4,39 (м, 1H); 4,97 (с, 2H); 5,04 (м, 1H); 5,40 (с, 2H); 5,89 (дд, $J=1,7$ и 15,5 Гц, 1H); 5,97 (т, $J=6,2$ Гц, 1H); 6,45 (ддд, $J=4,8$, 10,7 и 15,5 Гц, 1H); 6,99 (с, 2H); 7,01 (д, $J=8,7$ Гц, 1H); 7,20 (дд, $J=2,2$ и 8,7 Гц, 1H); 7,21-7,30 (м, 6H); 7,31 (д, $J=2,2$ Гц, 1H); 7,59 (д, $J=8,7$ Гц, 2H); 7,78 (м, 2H); 7,85 (д, $J=8,5$ Гц, 1H); 7,90 (д, $J=6,9$ Гц, 1H); 8,07 (д, $J=7,8$ Гц, 1H); 8,39 (д, $J=7,3$ Гц, 1H); 9,97 (с, 1H). ЖХМС (A5): ES $m/z=662$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$; $m/z=1322$ $[\text{M}-\text{H}]^-$; $m/z=1324$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; $m/z=1368$ $[\text{M}-\text{H}+\text{HCO}_2\text{H}]^-$; $t_R=1,3$ мин.

Синтез примеров 30 и 31: NHS-эфира нерасщепляемого триазол-3-(S)-неопентил-7-(S)-Me-аза-C52 и соответствующего ADC



Соединение 72: трет-бутил-3-(проп-2-ин-1-илокси)пропаноат.

К раствору пропаргильового спирта (1,362 мл, 23,4 ммоль) в ТГФ (23 мл) добавляли натрий (20,08 мг, 0,874 ммоль), реакционную среду нагревали при 60°C до полной солиubilизации натрия, затем охлаждали при КТ перед добавлением трет-бутилакрилата (2,286 мл, 15,6 ммоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение ночи, затем добавляли H₂O (25 мл) и водную фазу экстрагировали EtOAc (3×25 мл). Объединенную органическую фазу высушивали над Na₂SO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом с получением 2 г соединения 72 в виде бесцветного масла (70%).

Соединение 73: 3-(проп-2-ин-1-илокси)пропановая кислота.

К раствору соединения 72 (2,0 г, 10,86 ммоль) в ДХМ (50 мл) добавляли ТФУК (8,065 мл, 108,6 ммоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение ночи, концентрировали под вакуумом, соиспаряли с толуолом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 80 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 1,1 г соединения 73 в виде масла (80%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 2,46 (т, J=6,4 Гц, 2H); 3,43 (т, J=2,4 Гц, 1H); 3,63 (т, J=6,4 Гц, 2H); 4,11 (д, J=2,4 Гц, 2H); 12,20 (уш., 1H).

Соединение 74: 3-((1-(4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,7S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазабицикло[6,2,1]окта-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)пропановая кислота.

К раствору примера 24 (50 мг, 66,6 мкмоль) в ТГФ (0,5 мл) добавляли соединение 73 (17,05 мг, 113,1 мкмоль), 0,1M водн. сульфат меди(II) (266 мкл, 26,6 мкмоль) и 0,2M водн. аскорбат натрия (266 мкл, 53,2 мкмоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 1 д, затем добавляли H₂O (1 мл) и водную фазу экстрагировали EtOAc (3×1 мл). Объединенные органические фазы промывали насыщ. соевым раствором, высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью фильтрования на Sephadex LH20 (элюирование ДХМ) с получением 40 мг масла, которое дополнительно очищали с помощью флэш-хроматографии на 5 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 20 мг соединения 74 (35%).

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,82 (с, 9H); 0,88 (д, J=6,7 Гц, 3H); 1,00 (с, 3H); 1,04 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,18 (с, 3H); 1,31 (д, J=14,6 Гц, 1H); 1,80 (м, 1H); 1,97 (дд, J=10,0 и 14,6 Гц, 1H); 2,25 (м, 1H); 2,42 (т, J=6,6 Гц, 2H); 2,60 (м, 1H); 2,70 (дд, J=10,9 и 14,4 Гц, 1H); 2,90 (дд, J=2,2 и 7,6 Гц, 1H); 2,95 (дд, J=3,6 и 14,4 Гц, 1H); 3,44 (м, 1H); 3,62 (т, J=6,6 Гц, 2H); 3,80 (с, 3H); 3,94 (д, J=2,2 Гц, 1H); 4,08 (м, 2H); 4,49 (с, 2H); 5,03 (м, 1H); 5,59 (с, 2H); 5,89 (дд, J=1,7 и 15,3 Гц, 1H); 6,43 (ддд, J=4,8, 10,8 и 15,3 Гц, 1H); 7,02 (д, J=8,7

Гц, 1H); 7,20 (дд, J=2,4 и 8,7 Гц, 1H); 7,29 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,32 (д, J=2,4 Гц, 1H); 7,35 (д, J=8,4 Гц, 2H); 7,85 (д, J=8,4 Гц, 1H); 7,90 (д, J=7,0 Гц, 1H); 8,13 (с, 1H); 8,46 (м, 1H); 12,20 (уш, 1H). ЖХМС (А5): ES $m/z=440$ $[M+2H]^{2+}$; $m/z=877$ $[M-H]^{-}$; $m/z=879$ $[M+H]^{+}$; $t_R=1,24$ мин.

Пример 30. 2,5-Диоксопирролидин-1-ил-3-((1-(4-((2R,3R)-3-((S)-1-((3S,7S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6,6,7-триметил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-1-окса-4,8,11-триазадициклогексадек-13-ен-16-ил)этил)оксиран-2-ил)бензил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)пропаноат.

К раствору соединения 74 (20 мг, 22,7 мкмоль) в ДХМ (5 мл) добавляли DIEA (5,0 мкл, 28,5 мкмоль) и ДСК (6,34 мг, 23,8 мкмоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 3 ч, затем добавляли ДСК (3 мг, 11,3 мкмоль) и DIEA (5 мкл, 28,5 мкмоль) и перемешивание проводили при КТ в течение 2 ч. Затем реакционную среду концентрировали под вакуумом и очищали с помощью двух последовательных флэш-хроматографий на 1,5 г диол-модифицированного силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/iPrOH) с получением 11,5 мг примера 30 (50%).

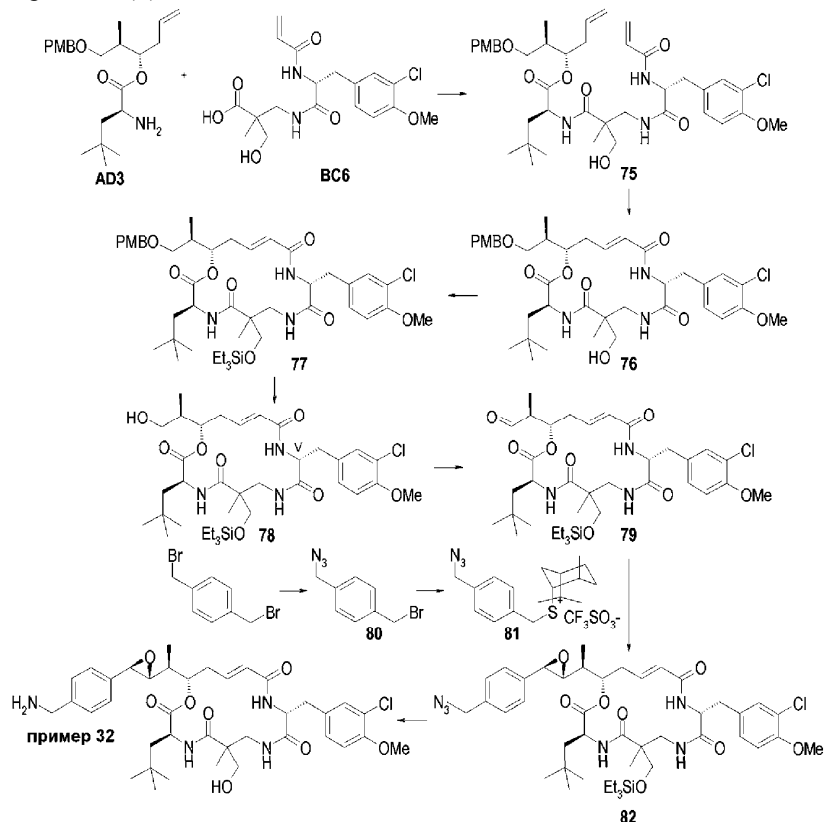
1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., $DMCO-d_6$): 0,83 (с, 9H); 0,87 (д, J=6,6 Гц, 3H); 0,99 (с, 3H); 1,03 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,04 (д, J=6,6 Гц, 3H); 1,19 (с, 3H); 1,32 (д, J=14,5 Гц, 1H); 1,81 (м, 1H); 1,96 (дд, J=10,2 и 14,5 Гц, 1H); 2,25 (м, 1H); 2,60 (м, 1H); 2,70 (дд, J=11,2 и 14,5 Гц, 1H); 2,80 (с, 4H); 2,90 (дд, J=2,0 и 7,4 Гц, 1H); 2,94 (т, J=6,1 Гц, 2H); 2,97 (дд, J=3,6 и 14,1 Гц, 1H); 3,42 (м, 1H); 3,74 (т, J=6,1 Гц, 2H); 3,80 (с, 3H); 3,92 (д, J=2,0 Гц, 1H); 4,09 (м, 2H); 4,55 (с, 2H); 5,03 (м, 1H); 5,59 (с, 2H); 5,89 (дд, J=1,6 и 15,2 Гц, 1H); 6,44 (дд, J=4,7, 10,6 и 15,2 Гц, 1H); 7,02 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,20 (дд, J=2,4 и 8,6 Гц, 1H); 7,29 (д, J=8,3 Гц, 2H); 7,32 (м, 3H); 7,86 (д, J=8,4 Гц, 1H); 7,90 (д, J=6,9 Гц, 1H); 8,14 (с, 1H); 8,39 (д, J=7,5 Гц, 1H). ЖХМС (А5): ES $m/z=120$; $m/z=974$ $[M-H]^{-}$; $m/z=976$ $[M+H]^{+}$; $m/z=1020$ $[M+H+HCO_2H]^{+}$; $t_R=1,29$ мин.

Пример 31. mAb-пр. 30.

Пример 31 получали аналогично примерам 3, 7, 10 и 14. 5,4 мг примера 31 получали в виде бесцветного прозрачного раствора в концентрации 1,8 мг/мл с DAR 4 (МСВР), мономерной чистотой 98,1% и общим выходом 45%.

SEC-МСВР: $m/z=149399$ (голое mAb); $m/z=150245$ (D1); $m/z=151101$ (D2); $m/z=151965$ (D3); $m/z=152831$ (D4); $m/z=153679$ (D5); $m/z=154546$ (D6); $m/z=155408$ (D7); $m/z=156273$ (D8); $m/z=157284$ (D9).

Синтез примера 32: 3-(S)-неопентил-6-Ме-6-CH₂OH-аза-C52-бензилового амина



Соединение 75: (2R,3S)-1-((4-метоксибензил)окси)-2-метилгекс-5-ен-3-ил-(2S)-2-((4-((R)-2-акриламида-3-(3-хлор-4-метоксифенил)пропанамида)-3-(гидроксиметил)-3-метил-2-оксобутил)амино)-4,4-диметилпентаноат.

К раствору соединения BC6 (385,6 мг, 773,5 мкмоль) в ДМФ (12 мл) добавляли NATU (348,7 мг, 889,5 мкмоль) и HOAt (122,3 мг, 889,5 мкмоль). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 30 мин, затем добавляли раствор соединения AD3 (292 мг, 773,5 мкмоль) в ДМФ (5 мл) и DIEA (475,2 мкл,

2,71 ммоль) и перемешивание продолжали при КТ в течение 4 ч. Добавляли H₂O (50 мл) и водную фазу экстрагировали EtOAc (3×50 мл). Объединенные органические фазы промывали H₂O (15 мл), насыщ. соевым раствором (3×15 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 30 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 383 мг соединения 75 в виде желтого масла (65%).

¹H-ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): смесь диастереомеров 55/45; 0,85-0,88 (м, 12H); 0,91 (с, 1,65H); 0,92 (с, 1,35H); 1,56 (м, 1H); 1,60 (м, 1H); 1,98 (м, 1H); 2,21 (м, 1H); 2,30 (м, 1H); 2,71 (м, 1H); 2,92 (м, 1H); 3,19-3,45 (м, 6H); 3,73 (с, 3H); 3,80 (с, 3H); 4,29 (м, 1H); 4,33 (м, 2H); 4,58 (м, 1H); 4,82 (м, 1H); 4,95-5,09 (м, 3H); 5,55 (дд, J=2,2 и 10,2 Гц, 1H); 5,71 (м, 1H); 6,01 (дд, J=2,2 и 17,2 Гц, 1H); 6,23 (дд, J=10,2 и 17,2 Гц, 1H); 6,89 (м, 2H); 7,01 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,17 (дд, J=2,2 и 8,6 Гц, 1H); 7,21 (м, 2H); 7,34 (д, J=2,2 Гц, 1H); 7,82 (д, J=8,0 Гц, 0,45H); 7,84 (д, J=8,0 Гц, 0,55H); 7,98 (т, J=6,5 Гц, 0,45H); 8,00 (т, J=6,5 Гц, 0,55H); 8,39 (д, J=8,6 Гц, 1H). ЖХМС (A5): ES m/z=756 [M-H]⁻; m/z=758 [M+H]⁺; m/z=802 [M-H+HCO₂N]⁻; t_R=1,54-1,56 мин.

Соединение 76: (3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6-(гидроксиметил)-16-((R)-1-((4-метоксибензил)окси)пропан-2-ил)-6-метил-3-неопентил-1-окса-4,8,11-триазабис(гексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон).

К раствору соединения 75 (380 мг, 501,1 мкмоль) в ДХМ (38 мл) в атмосфере Ar добавляли катализатор Граббса I (20,97 мг, 25,05 мкмоль). Реакционную среду перемешивали в атмосфере Ar при КТ в течение 4 ч, затем добавляли катализатор Граббса I (20,97 мг, 25,05 мкмоль). Перемешивание продолжали при КТ в течение 3 ч, затем добавляли катализатор Граббса I (20,97 мг, 25,05 мкмоль) и перемешивание продолжали при КТ. После 24 ч реакции добавляли катализатор Граббса I (20,97 мг, 25,05 мкмоль) и перемешивание продолжали в течение 4 ч. Реакционную среду концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 20 г силикагеля (изократическое элюирование гептан/EtOAc) с получением 170 мг соединения 76 стереоизомера 1 (56%) и 138 мг соединения 76 стереоизомера 2 (37%).

Соединение 16 стереоизомер 1

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,83 (с, 9H); 0,91 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,02 (с, 3H); 1,30 (дд, J=2,4 и 14,6 Гц, 1H); 1,53 (дд, J=9,9 и 14,6 Гц, 1H); 1,99 (м, 1H); 2,28 (м, 1H); 2,45 (м, 1H); 2,67 (м, 1H); 2,91 (дд, J=3,0 и 13,7 Гц, 1H); 2,97 (дд, J=4,0 и 14,5 Гц, 1H); 3,17-3,49 (м, 5H); 3,72 (с, 3H); 3,80 (с, 3H); 4,18 (м, 1H); 4,37 (м, 2H); 4,50 (тд, J=2,4 и 9,6 Гц, 1H); 5,00 (м, 3H); 5,82 (дд, J=1,9 и 15,4 Гц, 1H); 6,39 (ддд, J=4,2, 11,6 и 15,4 Гц, 1H); 6,90 (д, J=8,7 Гц, 2H); 7,04 (д, J=8,6 Гц, 1H); 7,12 (м, 1H); 7,15 (дд, J=2,3 и 8,6 Гц, 1H); 7,21 (д, J=8,7 Гц, 2H); 7,28 (д, J=2,3 Гц, 1H); 8,09 (д, J=9,6 Гц, 1H); 8,38 (д, J=8,0 Гц, 1H). ЖХМС (A4): ES m/z=728 [M-H]⁻; m/z=730 [M+H]⁺; m/z=774; t_R=5,15 мин.

Соединение 16 стереоизомер 2

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,83 (с, 9H); 0,88 (с, 3H); 0,91 (д, J=7,1 Гц, 3H); 1,28 (дд, J=2,4 и 14,6 Гц, 1H); 1,67 (дд, J=9,9 и 14,6 Гц, 1H); 1,99 (м, 1H); 2,28 (м, 1H); 2,45 (м, 1H); 2,67 (м, 1H); 3,02 (дд, J=3,3 и 14,2 Гц, 1H); 3,08 (дд, J=1,9 и 13,5 Гц, 1H); 3,25-3,42 (м, 4H); 3,55 (дд, J=5,1 и 11,0 Гц, 1H); 3,73 (с, 3H); 3,81 (с, 3H); 4,17 (м, 1H); 4,37 (м, 2H); 4,44 (тд, J=2,1 и 9,3 Гц, 1H); 4,80 (т, J=5,1 Гц, 1H); 5,00 (м, 2H); 5,86 (дд, J=1,6 и 15,1 Гц, 1H); 6,38 (ддд, J=4,0, 11,4 и 15,3 Гц, 1H); 6,90 (д, J=8,8 Гц, 2H); 7,04 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,19 (дд, J=2,2 и 8,7 Гц, 1H); 7,22 (д, J=8,8 Гц, 2H); 7,30 (д, J=2,2 Гц, 1H); 7,42 (д, J=10,4 Гц, 1H); 7,92 (д, J=8,9 Гц, 1H); 8,45 (д, J=8,0 Гц, 1H). ЖХМС (A4): ES m/z=728 [M-H]⁻; m/z=730 [M+H]⁺; m/z=774; t_R=4,79 мин.

Соединение 77: (3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-16-((R)-1-((4-метоксибензил)окси)пропан-2-ил)-6-метил-3-неопентил-6-(((триэтилсилил)окси)метил)-1-окса-4,8,11-триазабис(гексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон).

К раствору соединения 76 стереоизомера 1 (170 мг, 232,8 мкмоль) в ДХМ (3 мл), охлажденному на ледяной бане, добавляли при 4°C хлортриэтилсилан (159,3 мкл, 931,1 мкмоль) и по каплям ТЭА (131,1 мкл, 931,1 мкмоль). Реакционную среду перемешивали при 4°C в течение 30 мин, затем при КТ в течение 20 ч. Реакционную среду разбавляли ДХМ (50 мл) и соевым раствором (10 мл) и перемешивание продолжали в течение 10 мин. Органическую фазу промывали насыщ. соевым раствором (2×10 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали и концентрировали под вакуумом. Другой диастереомер соединения 76 (138 мг, 189,0 мкмоль) защищали подобным образом, обе партии объединяли и очищали с помощью флэш-хроматографии на 20 г силикагеля (изократическое элюирование гептан/EtOAc) с получением 139 мг соединения 77 стереоизомера 1 в виде бесцветной пены (39%) и 107 мг соединения 77 стереоизомера 2 в виде бесцветной пены (30%).

Соединение 77 стереоизомер 1

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMSO-d₆): 0,62 (к, J=8,1 Гц, 6H); 0,83 (с, 9H); 0,91 (д, J=7,1 Гц, 3H); 0,96 (т, J=8,1 Гц, 9H); 1,04 (с, 3H); 1,66 (дд, J=3,4 и 14,4 Гц, 1H); 1,43 (дд, J=9,3 и 14,4 Гц, 1H); 1,99 (м, 1H); 2,28 (м, 1H); 2,47 (м, 1H); 2,68 (м, 1H); 2,92 (дд, J=3,0 и 13,5 Гц, 1H); 2,99 (дд, J=4,0 и 14,8 Гц, 1H); 3,21-3,40 (м, 3H); 3,48 (м, 1H); 3,63 (д, J=10,3 Гц, 1H); 3,73 (с, 3H); 3,81 (с, 3H); 4,17 (м, 1H); 4,36 (м, 2H); 4,51 (тд, J=2,9 и 9,4 Гц, 1H); 5,02 (м, 1H); 5,82 (дд, J=1,8 и 15,4 Гц, 1H); 6,39 (ддд, J=4,3, 11,6 и 15,4 Гц, 1H); 6,89 (д, J=8,7 Гц, 2H); 7,02 (м, 1H); 7,04 (д, J=8,7 Гц, 1H); 7,15 (дд, J=2,3 и 8,7 Гц, 1H); 7,21 (д, J=8,7 Гц,

2Н); 7,29 (д, J=2,3 Гц, 1Н); 7,96 (д, J=9,4 Гц, 1Н); 8,31 (д, J=8,0 Гц, 1Н). ЖХМС (А4): ES m/z=842 [M-H]⁻; m/z=844 [M+H]⁺; m/z=888 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=7,08 мин.

Соединение 77 стереоизомер 2

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,52 (к, J=8,1 Гц, 6Н) 0,84 (с, 9Н); 0,88-0,93 (м, 15Н); 1,29 (дд, J=2,6 и 14,5 Гц, 1Н); 1,68 (дд, J=10,1 и 14,5 Гц, 1Н); 1,99 (м, 1Н); 2,28 (м, 1Н); 2,47 (м, 1Н); 2,68 (м, 1Н); 3,01 (дд, J=3,4 и 14,5 Гц, 1Н); 3,15 (д, J=12,8 Гц, 1Н); 3,33 (м, 1Н); 3,48 (д, J=10,4 Гц, 1Н); 3,73 (с, 3Н); 3,81 (с, 3Н); 3,83 (д, J=10,4 Гц, 1Н); 4,17 (м, 1Н); 4,36 (м, 2Н); 4,45 (тд, J=2,4 и 9,2 Гц, 1Н); 5,01 (м, 1Н); 5,84 (дд, J=1,8 и 15,3 Гц, 1Н); 6,39 (ддд, J=3,9, 11,4 и 15,3 Гц, 1Н); 6,90 (д, J=8,8 Гц, 2Н); 7,05 (д, J=8,6 Гц, 1Н); 7,19 (дд, J=2,2 и 8,6 Гц, 1Н); 7,22 (д, J=8,8 Гц, 2Н); 7,30 (д, J=2,2 Гц, 1Н); 7,47 (д, J=10,4 Гц, 1Н); 8,01 (д, J=9,2 Гц, 1Н); 8,41 (д, J=8,0 Гц, 1Н). ЖХМС (А4): ES m/z=842 [M-H]⁻; m/z=844 [M+H]⁺; m/z=888 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=6,88 мин.

Соединение 78: (3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-16-((R)-1-гидроксипропан-2-ил)-6-метил-3-неопентил-6-(((триэтилсилил)окси)метил)-1-окса-4,8,11-триазаациклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

К раствору обоих диастереомеров соединения 77 (245 мг, 290,1 мкмоль) в ДХМ (10 мл) и H₂O (2,5 мл), охлажденному на бане лед/ацетон, добавляли DDQ (339,4 мг, 1,45 ммоль) и 2,6-ди-трет-бутилпиридин (171,7 мг, 870,3 мкмоль). Реакционную среду перемешивали при 0°C в течение 2 ч, затем разбавляли водн. NaHCO₃ (10 мл) и ДХМ (10 мл) и перемешивание продолжали в течение 10 мин. Водную фазу экстрагировали ДХМ (3×20 мл), объединенные органические фазы промывали насыщ. соевым раствором (3×5 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 20 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 155 мг соединения 78 в виде белой пены (74%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 0,49-0,65 (м, 6Н); 0,80-1,07 (м, 24Н); 1,35-1,71 (м, 2Н); 1,83 (м, 1Н); 2,28 (м, 1Н); 2,47 (м, 1Н); 2,68 (м, 1Н); 2,90-3,50 (м, 5,96Н); 3,65 (д, J=10,6 Гц, 0,52Н); 3,80 (с, 3Н); 3,82 (д, J=10,6 Гц, 0,52Н); 4,18 (м, 1Н); 4,29-4,70 (м, 2Н); 5,02 (м, 1Н); 5,80-5,89 (м, 1Н); 6,05 (м, 0,11Н); 6,39 (м, 0,89Н); 6,98-7,31 (м, 3,48Н); 7,47 (д, J=10,6 Гц, 0,52Н); 7,87 (д, J=9,4 Гц, 0,11Н); 7,96 (д, J=9,4 Гц, 0,52Н); 8,00 (д, J=9,4 Гц, 0,37Н); 8,31 (д, J=8,0 Гц, 0,63Н); 8,42 (д, J=8,4 Гц, 0,37Н). ЖХМС (А4): ES m/z=722 [M-H]⁻; m/z=724 [M+H]⁺; m/z=768 [M-H+HCO₂H]⁻; t_R=5,68-5,78 мин.

Соединение 79: (2S)-2-((3S,10R,16S,E)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6-метил-3-неопентил-2,5,9,12-тетраоксо-6-(((триэтилсилил)окси)метил)-1-окса-4,8,11-триазаациклогексадек-13-ен-16-ил)пропаналь.

К раствору соединения 78 (154 мг, 212,6 мкмоль) в ДХМ (1,5 мл), охлажденному на бане лед/ацетон, добавляли при 0°C раствор KBr (25,6 мг, 212,6 мкмоль) в H₂O (612 мкл), раствор ТЕМПО при 5 мг/мл в ДХМ (137 мкл, 4,25 мкмоль) и по каплям водный раствор 1,56М гипохлорита натрия pH 9,5 (204 мкл, 318,9 мкмоль). Перемешивание продолжали при 0°C в течение 15 мин, затем добавляли при 0°C насыщ. Na₂S₂O₃ (1,9 мл), ледяную баню удаляли и реакционную среду перемешивали в течение 10 мин. Затем ее экстрагировали ДХМ (3×20 мл), объединенные органические фазы промывали H₂O (2×10 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 15 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 36 мг соединения 61 (23%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): смесь диастереомеров 72/28: 0,49-0,65 (м, 6Н); 0,80-1,08 (м, 24Н); 1,32-1,69 (м, 2Н); 2,40 (м, 1Н); 2,68 (м, 2Н); 2,79 (м, 1Н); 2,89-3,70 (м, 5Н); 3,80 (с, 3Н); 4,10-4,53 (м, 2Н); 5,02 (м, 0,28Н); 5,28 (м, 0,72Н); 5,78-5,91 (м, 1Н); 6,07 (м, 0,28Н); 6,40 (м, 0,72Н); 7,00-7,51 (м, 4Н); 7,90 (д, J=9,4 Гц, 0,28Н); 7,98 (д, J=9,4 Гц, 0,72Н); 8,34 (м, 1Н); 9,59 (д, J=2,5 Гц, 0,28Н); 9,63 (д, J=1,8 Гц, 0,72Н). ЖХМС (А5): m/z=722 [M+H]⁺; t_R=1,71 мин.

Соединение 80: 1-(азидометил)-4-(бромметил)бензол.

К раствору п-ксилолдибромида (2,0 г, 7,2 ммоль) в ДМФ (20 мл) добавляли через 20 мин раствор азид натрия (584,9 мг, 8,64 ммоль) в ДМФ (20 мл). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение 20 ч, затем выливали на лед (100 г) и экстрагировали EtOAc (3×50 мл). Объединенную органическую фазу промывали насыщ. соевым раствором (3×15 мл), высушивали над MgSO₄, отфильтровывали, концентрировали под вакуумом, соиспаряли с толуолом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 70 г силикагеля (элюирование Et₂O) с получением 773 мг соединения 80 в виде бесцветного масла (47%).

¹H-ЯМР (400 МГц, δ в м.д., ДМСО-d₆): 4,45 (с, 2Н); 4,71 (с, 2Н); 7,35 (д, J=8,5 Гц, 2Н); 7,47 (д, J=8,5 Гц, 2Н).

Соединение 81: (1R,4S,5R,6S)-6-(4-(азидометил)бензил)-4,7,7-триметил-6-тиабицикло[3.2.1]октан-6-ия трифторметансульфонат.

К (1R,4R,5R)-4,7,7-триметил-6-тиабицикло[3.2.1]октану (номер CAS [5718-75-2], 580,1 мг, 3,41 ммоль) добавляли раствор соединения 80 (770 мг, 3,41 ммоль) в ДХМ (2,2 мл). Затем по каплям добавляли раствор трифторметансульфоната лития (2,71 г, 17,03 ммоль) в H₂O (2 мл) и реакционную среду перемешивали при КТ в течение 2 д. Затем в реакционную среду добавляли H₂O (15 мл) и ДХМ (15 мл) и перемешивание продолжали при КТ в течение 10 мин.

Водную фазу экстрагировали ДХМ (3×15 мл), объединенные органические фазы промывали насыщ.

солевым раствором (3×8 мл), высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали и концентрировали под вакуумом. Бледно-желтое масло растирали в $i\text{Pr}_2\text{O}$ (5 мл), таким образом полученное твердое вещество отфильтровывали, промывали $i\text{Pr}_2\text{O}$ (2×5 мл) и высушивали под вакуумом с получением 1,266 г соединения 81 в виде белого твердого вещества (79%).

^1H -ЯМР (400 МГц, δ в м.д., DMCO-d_6): 1,08 (д, $J=7,2$ Гц, 3H); 1,45 (м, 1H); 1,55-1,80 (м, 3H); 1,69 (с, 3H); 1,75 (с, 3H); 1,99 (м, 1H); 2,40 (д, $J=13,8$ Гц, 1H); 2,45 (м, 1H); 2,59 (дм, $J=13,8$ Гц, 1H); 3,88 (т, $J=4,6$ Гц, 1H); 4,52 (с, 2H); 4,60 (д, $J=12,8$ Гц, 1H); 4,90 (д, $J=12,8$ Гц, 1H); 7,47 (д, $J=8,5$ Гц, 2H); 7,61 (д, $J=8,5$ Гц, 2H).

Соединение 82: (3S,10R,16S,E)-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(азидометил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6-метил-3-неопентил-6-(((триэтилсилил)окси)метил)-1-окса-4,8,11-триаза-циклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

К раствору соединений 79 (35 мг, 48,5 мкмоль) и 81 (24,8 мг, 53,3 мкмоль) в ДХМ (1,5 мл), охлажденному до -70°C , добавляли по каплям ВЕМР (номер CAS [98015-45-3], 18,6 мкл, 63,0 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при -70°C в течение 2 ч 30 мин, в реакционную смесь добавляли насыщ. солевой раствор (1,5 мл), баню удаляли и продолжали энергичное перемешивание до КТ. Водную фазу экстрагировали ДХМ (3×10 мл), объединенные органические фазы высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 5 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH) с получением 10,2 мг соединения 82 в виде бесцветного лака (24%).

^1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMCO-d_6): 0,61 (к, $J=8,1$ Гц, 6H); 0,80 (с, 9H); 0,98 (т, $J=8,1$ Гц, 9H); 1,02 (с, 3H); 1,03 (д, $J=7,1$ Гц, 3H); 1,34 (дд, $J=2,5$ и 14,4 Гц, 1H); 1,44 (дд, $J=10,0$ и 14,4 Гц, 1H); 1,85 (м, 1H); 2,27 (м, 1H); 2,62 (м, 2H); 2,88 (дд, $J=2,6$ и 13,5 Гц, 1H); 2,97 (дд, $J=3,7$ и 14,2 Гц, 1H); 3,00 (дд, $J=2,3$ и 7,3 Гц, 1H); 3,35 (м, 1H); 3,48 (дд, $J=9,5$ и 14,2 Гц, 1H); 3,61 (д, $J=10,3$ Гц, 1H); 3,81 (с, 3H); 3,92 (д, $J=2,3$ Гц, 1H); 4,15 (м, 1H); 4,46 (с, 2H); 4,48 (тд, $J=2,5$ и 9,7 Гц, 1H); 5,10 (м, 1H); 5,78 (дд, $J=2,2$ и 15,3 Гц, 1H); 6,40 (ддд, $J=4,3$, 11,6 и 15,3 Гц, 1H); 7,04 (м, 2H); 7,14 (дд, $J=2,3$ и 8,6 Гц, 1H); 7,28 (д, $J=2,3$ Гц, 1H); 7,33 (д, $J=8,4$ Гц, 2H); 7,39 (д, $J=8,4$ Гц, 2H); 7,96 (д, $J=9,7$ Гц, 1H); 8,28 (д, $J=8,0$ Гц, 1H). ЖХМС (A5): ES $m/z=120$; $m/z=865$ $[\text{M-H}]^-$; $m/z=867$ $[\text{M+H}]^+$; $m/z=911$ $[\text{M-H+HCO}_2\text{H}]^-$; $t_R=1,87$ мин.

Пример 32. (3S,10R,16S,E)-16-((S)-1-((2R,3R)-3-(4-(аминометил)фенил)оксиран-2-ил)этил)-10-(3-хлор-4-метоксибензил)-6-метил-3-неопентил-6-(((триэтилсилил)окси)метил)-1-окса-4,8,11-триаза-циклогексадек-13-ен-2,5,9,12-тетраон.

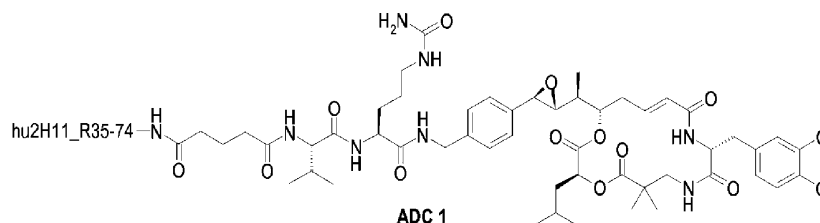
К раствору соединения 82 (9,4 мг, 10,84 мкмоль) в ДХМ (1,3 мл) и MeOH (0,7 мл) добавляли раствор ТСЕР (3,45 мг, 11,9 мкмоль) в H_2O (0,7 мл). Реакционную среду перемешивали при КТ в течение ночи, затем добавляли водн. NaHCO_3 (2,5 мл) и перемешивание продолжали в течение 10 мин. Водную фазу экстрагировали ДХМ (3×10 мл), объединенные органические фазы высушивали над MgSO_4 , отфильтровывали, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии на 5 г силикагеля (градиентное элюирование ДХМ/MeOH/ H_2O) с получением 4,55 мг примера 32 в виде белого лака (57%).

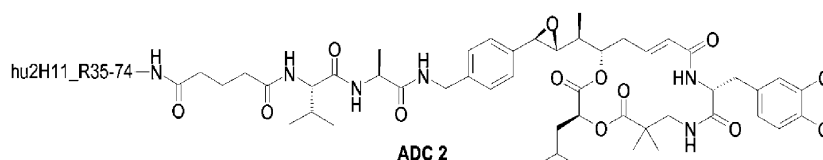
^1H -ЯМР (500 МГц, δ в м.д., DMCO-d_6): 0,82 (с, 9H); 1,01 (с, 3H); 1,03 (д, $J=7,1$ Гц, 3H); 1,33 (дд, $J=2,3$ и 14,5 Гц, 1H); 1,56 (дд, $J=10,1$ и 14,5 Гц, 1H); 1,82 (м, 1H); 2,27 (м, 1H); 2,64 (м, 2H); 2,88 (дд, $J=2,6$ и 13,5 Гц, 1H); 2,92 (дд, $J=2,2$ и 7,3 Гц, 1H); 2,96 (дд, $J=4,0$ и 11,2 Гц, 1H); 3,19 (дд, $J=4,3$ и 10,9 Гц, 1H); 3,41 (м, 2H); 3,74 (с, 2H); 3,81 (с, 3H); 3,88 (д, $J=2,2$ Гц, 1H); 4,18 (м, 1H); 4,47 (тд, $J=2,1$ и 9,4 Гц, 1H); 4,91 (дд, $J=4,2$ и 6,2 Гц, 1H); 5,08 (м, 1H); 5,76 (дд, $J=2,3$ и 15,5 Гц, 1H); 6,40 (ддд, $J=3,7$, 11,5 и 15,5 Гц, 1H); 7,05 (д, $J=8,8$ Гц, 1H); 7,11 (м, 1H); 7,14 (дд, $J=2,4$ и 8,8 Гц, 1H); 7,22 (д, $J=8,3$ Гц, 2H); 7,25 (д, $J=2,4$ Гц, 1H); 7,35 (д, $J=8,3$ Гц, 2H); 8,08 (д, $J=9,4$ Гц, 1H); 8,31 (д, $J=8,0$ Гц, 1H). ЖХМС (A5): ES $m/z=725$ $[\text{M-H}]^-$; $m/z=727$ $[\text{M+H}]^+$; $t_R=0,79$ мин.

Фармакологические результаты

Соединения изобретения подвергали фармакологическим исследованиям для определения их противоопухолевого действия. ADC формулы (III) также оценивали с точки зрения стабильности в плазме.

В целях иллюстрации также были исследованы два конъюгата, ADC1 и ADC2, приведенные ниже, полученные из WO 2011/001052.





Оценка ингибирования пролиферации клеточных линий HCT116 и MDA-MB-231 с помощью соединений криптофицина формулы (I).

Клетки HCT116 и MDA-MB-231 в фазе их экспоненциального роста трипсинизировали и ресуспендировали в их соответствующей культуральной среде (DMEM/F12 Gibco #21331, 10% ФБС Gibco #10500-056, 2 нМ глутамин Gibco #25030 для клеток MDA-MB-231; DMEM Gibco #11960, 10% ФБС Gibco #10500-056, 2 мМ глутамина Gibco #25030 для клеток HCT116). Клеточную суспензию высевали в 96-луночные культуральные планшеты Cytostar (GE Healthcare Europe, #RPNQ0163) в полную культуральную среду, содержащую сыворотку с плотностью 5000 клеток/лунка. После инкубирования в течение 4 ч последовательные разведения соединений криптофицина добавляли в лунки при концентрациях, снижающихся от 10^{-7} до 10^{-12} М (в трех повторностях для каждой концентрации). Клетки культивировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, в присутствии соединений криптофицина в течение 3 д. На 4-й день в каждую лунку добавляли 10 мкл раствора ¹⁴C-тимидина (0,1 мКи/лунка, Perkin Elmer #NEC56825000). Включение ¹⁴C-тимидина измеряли через 96 ч после начала эксперимента с помощью счетчика микробета-радиоактивности (Perkin Elmer). Данные были выражены в виде процента выживаемости с помощью определения соотношения между уменьшенным количеством, полученным с клетками, обработанными соединением криптофицина, и количеством, полученным с клетками контрольных лунок (обработанных только культуральной средой).

Ингибирующая активность представлена концентрацией, которая ингибирует 50% активности.

Таблица II

	Структурный комментарий ¹	IC ₅₀ (нМ) HCT116	IC ₅₀ (нМ) MDA-MB-231
C52	β-эпоксид	76	90
Пр. 1	β-эпоксид	163	250
Пр. 4	β-эпоксид	51	82
Пр. 8	α/β-эпоксид 3:7	518	564
Пр. 11	β-эпоксид	не иссл.	102
Пр. 15	α/β-эпоксид 35:65	не иссл.	511
Пр. 16	α/β-эпоксид 4:6	не иссл.	2815
Пр. 17	α/β-эпоксид 5:5	не иссл.	856
Пр. 18	β-эпоксид	179	228
Пр. 21	α/β-эпоксид 3:7	не иссл.	456
Пр. 32	β-эпоксид	не иссл.	1777

Соединения криптофицина формулы (I) исследовали или в виде чистых β-эпоксидов, или в виде смеси α- и β-эпоксидов, как указано в колонке, озаглавленной "структурный комментарий". Из литературы известно, что β-эпоксиды обычно являются в 50-100 раз более эффективными, чем α-эпоксиды (см., например, Al-Awar R.S., et al., J. Med. Chem 2003, 46, 2985-3007).

Было обнаружено, что соединения криптофицина формулы (I) ингибируют пролиферацию клеточных линий HCT116 и MDA-MB-231 с IC₅₀ в диапазоне от 50 нМ до 2,815 нМ.

Оценка ингибирования пролиферации клеточной линии MDA-MB-231 с помощью ADC формулы (III).

Клетки MDA-MB-231 в фазе их экспоненциального роста трипсинизировали и ресуспендировали в их культуральной среде (DMEM/F12 Gibco #21331, 10% ФБС Gibco #10500-056, 2 нМ глутамин Gibco #25030). Клеточную суспензию высевали в 96-луночные культуральные планшеты Cytostar (GE Healthcare Europe, #RPNQ0163) в полную культуральную среду, содержащую сыворотку с плотностью 5000 клеток/лунка. После инкубирования в течение 4 ч последовательные разведения ADC добавляли в лунки при концентрациях, снижающихся от 10^{-7} до 10^{-12} М (в трех повторностях для каждой концентрации). Клетки культивировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, в присутствии ADC в течение 3 д. На 4-й день в каждую лунку добавляли 10 мкл раствора ¹⁴C-тимидина (0,1 мКи/лунка, Perkin Elmer #NEC56825000). Включение ¹⁴C-тимидина измеряли через 96 ч после начала эксперимента с помощью

счетчика микробета-радиоактивности (Perkin Elmer). Данные были выражены в виде процента выживаемости с помощью определения соотношения между уменьшенным количеством, полученным с клетками, обработанными ADC, и количеством, полученным с клетками контрольных лунок (обработанных только культуральной средой). В некоторых экспериментах голые антитела добавляли в лунки в концентрации 1 мкМ в начале эксперимента и ингибирование пролиферации измеряли, как описано ранее.

Таблица III

	IC ₅₀ (пМ) , MDA-MB-231	
	ADC отдельно	в присутствии голого антитела
ADC1	42	4571
ADC2	46	9377
Пр. 3	20	3738
Пр. 7	38	18042
Пр. 10	35	10367
Пр. 14	53	25887
Пр. 20	43	11871
Пр. 23	129	64270
Пр. 31	72	31784

Было обнаружено, что ADC криптофина формулы (III), также как ADC1 и ADC2 ингибируют пролиферацию клеточной линии MDA-MB-231 с IC₅₀ в диапазоне от 20 до 130 пМ и коэффициент селективности только ADC в сравнении с ADC + голое антитело между 185 и 500.

Определение МПД ADC формулы (III) после однократного в/в введения у мышей SCID.

МПД определяли как максимальную дозу, которая не вызывает 15% потери массы тела в течение 3 последующих дней для отдельной мыши, или 20% потери массы тела в течение 1 дня, или смертность. Ее оценивали после однократной внутривенной (в/в) болюсной инъекции у 3 самок мышей SCID и в течение 28 дней после обработки.

Таблица IV

	МПД (мг/кг)
Пр. 3	20
Пр. 7	30
Пр. 10	40
Пр. 14	≥50
Пр. 20	20
Пр. 23	≥40

ADC криптофина формулы (III) продемонстрировало МПД у мышей SCID в диапазоне от 20 до ≥50 мг/кг.

Оценка противоопухолевой активности in vivo ADC формулы (III) в отношении MDA-MB-231 у мышей SCID после однократного в/в введения.

Противоопухолевую активность in vivo оценивали при 3 концентрациях доз в отношении измеряемых ксенотрансплантатов MDA-MB-231 груди, имплантированных п/к у самок мышей SCID. Контрольные группы оставались необработанными. Конъюгаты вводили с помощью однократной в/в болюсной инъекции, день лечения был указан на каждом графике стрелкой (▼).

Для оценки противоопухолевой активности конъюгатов животных взвешивали два раза в неделю и опухоли измеряли два раза в неделю циркулем. Вес тела животных включал вес опухоли. Объем опухоли рассчитывали по формуле масса (мм³)=[длина (мм)×ширина (мм)²]/2. Первичными конечными точками эффективности являлись ΔT/ΔC, процентная медианная регрессия, частичная и полная регрессии (PR и CR). Изменения объема опухоли для каждой обработанной (Т) и контрольной (С) рассчитывали для каждой опухоли путем вычитания объема опухоли в день первой обработки (день постановки) из объема опухоли в указанный день наблюдения. Медиана ΔT была рассчитана для группы, подвергавшейся обработке, и медиана ΔC была рассчитана для контрольной группы. Затем вычисляли соотношение ΔT/ΔC и

выражали в процентах $\Delta T/\Delta C = (\text{дельта } T / \text{дельта } C) \times 100$.

Процент регрессии опухоли определяли как % уменьшения объема опухоли в группе, подвергавшейся обработке, в определенный день наблюдения (t) по сравнению с ее объемом в первый день первой обработки (t₀). В определенный момент времени и для каждого животного рассчитывали % регрессии. Затем рассчитывали медиану % регрессии для группы.

$$\% \text{ регрессии (при } t) = ((\text{объем}_{t_0} - \text{объем}_t) / \text{объем}_{t_0}) \times 100.$$

Регрессии определяли как частичные (PR), если объем опухоли уменьшался до 50% от объема опухоли в начале обработки, и полные (CR), когда объем опухоли не мог быть измерен (0 мм³). Выживших без опухоли (TFS) определяли как животных с необнаруживаемыми опухолями в конце исследования (>100 дней после последней обработки).

Оценка противоопухолевой активности in vivo пр. 3 в отношении MDA-MB-231 у мышей SCID после однократного в/в введения.

Таблица V

	Доза (мг/кг)	Медиана $\Delta T/\Delta C$ в % (день)	Медиана % регрессии	Регрессии		
				PR	CR	TFS
Контроль	–	–	–	–	–	–
ADC2	2, 5	<0 (д53)	90%	4/6	3/6	0/6
	1, 25	18 (д49)	–	0/6	0/6	0/6
Пр. 3	2, 5	<0 (д53)	100%	6/6	5/6	0/6
	1, 25	9 (д53)	–	2/6	0/6	0/6
	0, 625	44 (д42)	–	0/6	0/6	0/6

Оценка противоопухолевой активности in vivo пр. 7 в отношении MDA-MB-231 у мышей SCID после однократного в/в введения.

Таблица V

	Доза (мг/кг)	Медиана $\Delta T/\Delta C$ в % (день)	Медиана % регрессии	Регрессии		
				PR	CR	TFS
Контроль	–	–	–	–	–	–
ADC2	2, 5	<0 (д53)	90%	4/6	3/6	0/6
	1, 25	18 (д49)	–	0/6	0/6	0/6
Пр. 7	2, 5	<0 (д53)	100%	6/6	6/6	1/6
	1, 25	<0 (д53)	64%	5/6	1/6	0/6
	0, 625	42 (д42)	–	0/6	0/6	0/6

Оценка противоопухолевой активности in vivo пр. 10 в отношении MDA-MB-231 у мышей SCID после однократного в/в введения.

Таблица VI

	Доза (мг/кг)	Медиана $\Delta T/\Delta C$ в % (день)	Медиана % регрессии	Регрессии		
				PR	CR	TFS
Контроль	–	–	–	–	–	–
ADC2	2, 5	<0 (д42)	14%	0/6	0/6	0/6
	1, 25	6 (д42)	–	0/6	0/6	0/6
Пр. 10	2, 5	<0 (д59)	95%	6/6	3/6	0/6
	1, 25	<0 (д46)	32%	0/6	0/6	0/6
	0, 625	16 (д42)	–	0/6	0/6	0/6

Оценка противоопухолевой активности in vivo пр. 14 в отношении MDA-MB-231 у мышей SCID после однократного в/в введения.

Таблица VII

	Доза (мг/кг)	Медиана $\Delta T/\Delta C$ в % (д34)	Медиана % регрессии	Регрессии		
				PR	CR	TFS
Контроль	–	–	–	–	–	–
ADC2	2,5	21	–	0/6	0/6	0/6
	1,25	48	–	0/6	0/6	0/6
Пр. 14	5	<0	100%	6/6	6/6	1/6
	2,5	<0	11%	1/6	0/6	0/6
	1,25	39	–	0/6	0/6	0/6

Оценка противоопухолевой активности in vivo пр. 20 в отношении MDA-MB-231 у мышей SCID после однократного в/в введения.

Таблица VIII

	Доза (мг/кг)	Медиана $\Delta T/\Delta C$ в % (день 40)	Медиана % регрессии	Регрессии		
				PR	CR	TFS
Контроль	–	–	–	–	–	–
ADC2	2,5	<0	49%	4/6	0/6	0/6
	1,25	14	–	0/6	0/6	0/6
Пр. 20	5	<0	100%	6/6	6/6	6/6
	2,5	<0	100%	6/6	4/6	1/6
	1,25	<0	3%	3/6	1/6	0/6

Оценка противоопухолевой активности in vivo пр. 23 в отношении MDA-MB-231 у мышей SCID после однократного в/в введения.

Таблица VIII

	Доза (мг/кг)	Медиана $\Delta T/\Delta C$ в % (день 40)	Медиана % регрессии	Регрессии		
				PR	CR	TFS
Контроль	–	–	–	–	–	–
ADC2	2,5	<0	49%	4/6	0/6	0/6
	1,25	14	–	0/6	0/6	0/6
Пр. 23	5	<0	81%	6/6	3/6	0/6
	2,5	16	–	1/6	0/6	0/6
	1,25	36	–	0/6	0/6	0/6

Данные результаты показали, что все исследованные примеры изобретения, также как ADC2 проявляли противоопухолевую активность при дозах в диапазоне от 0,625 до 5 мг/кг.

Определение ФК-параметров пр. 3 и пр. 7 после однократного в/в введения у мышей SCID (5 мг/кг).

Фармакокинетику in vivo ADC и общего антитела оценивали у самок мышей SCID после введения конъюгата с помощью однократной в/в болюсной инъекции. Самок мышей SCID (5-6 недель, масса в среднем 20-25 г) помещали в стерильную комнату в асептических условиях в ламинарный бокс и кормили неограниченно. ADC вводили (несерийный дизайн, n=3/время выборки) в виде в/в болюса при одной величине дозы (10 мл/кг). Для каждого животного и в каждый выбранный момент времени (т.е. 0,083, 0,25, 24, 72, 96, 168, 240, 336 ч) 600 мкл крови собирали через пункцию сердца и затем образцы крови центрифугировали (15 мин при 4°C и 3500 об/мин). Количественное определение ADC и общего антитела в образцах плазмы проводили с использованием иммуноанализов. Концентрация в плазме в зависимости от временных профилей и ФК-параметры конъюгата и общего антитела у мышей были охарактери-

зованы с использованием некомпартментного анализа (Phoenix, WinNonLin версия 6.3) и показаны на фиг. 15 и 16. Площадь под кривой концентрация-время AUC (мкг.день/мл) оценивали с помощью правила трапеций. Концентрация при $t=0$ C_0 (мкг/мл), клиренс CL (л/(день.кг)) и терминальный период полувыведения $t_{1/2}$ (день) были получены и рассчитаны по кривой.

Табл ица IX	Анализируемые вещества	C_0 (мкг/мл)	AUC _{посл} (мкг.день/мл)	$t_{посл}$ (день)	AUC (мкг.день/мл)	CL (л/(день.кг))	V_{ss} (л/кг)	$t_{1/2z}$ (день)
Пр. 3	ADC	62,8	191	14	217	0,023	0,14	4,8
	общее	74,9	455	14	791 ^a	0,0063 ^a	0,10 ^a	11 ^a
Пр. 7	ADC	81,8	235	14	266	0,019	0,12	4,8
	общее	77,4	368	14	741 ^b	0,0067 ^b	0,14 ^b	16 ^b

a: информативные данные только как AUC_{ext}>>30% (т.е. 42%);

b: информативные данные только как AUC_{ext}>>30% (т.е. 50%).

Оценка с помощью MCBP плазменной стабильности ADC криптофицина формулы (III) после однократного в/в введения у мышей SCID при 5 мг/кг.

Образцы плазмы из ФК-исследования также анализировали с помощью ЖХ-MCBP. Хроматографический анализ проводили на колонке Waters Acquity I Class и Waters Mass Prep Micro Desalting 20 мкм (2,1×5 мм) при 80°C с градиентным элюированием (А) вода+0,1% муравьиной кислоты/(В) CH₃CN+0,1% муравьиной кислоты, описанным ниже.

Время (мин)	%В	Поток (мл/мин)
0,00	5	0,5
0,50	5	0,5
0,51	5	0,2
2,00	90	0,2
2,10	5	0,5
2,70	90	0,5
2,80	5	0,5
3,40	90	0,5
3,50	5	0,5
4,00	5	0,5

Масс-спектрометрию проводили на устройстве Waters QTOF Synapt G2-S с ионизацией электрораспылением в положительном режиме (ES⁺). Для масс-спектров проводили развертку с помощью программного обеспечения Waters Biopharmalynx. Спектры MCBP были получены для всех исследуемых примеров и показаны на фиг. 20-25.

Данные результаты показали, что все исследуемые примеры изобретения не проявили метаболизирования, наблюдаемого с эталонными ADC, ADC1 и ADC2.

Поэтому очевидно, что соединения изобретения обладают противоопухолевой активностью и что конъюгаты изобретения демонстрируют улучшенную стабильность в плазме мышей.

Соответственно, в другом своем аспекте изобретение также относится к применению соединений криптофицина формулы (I) или конъюгатов формулы (III) в качестве противоопухолевых средств.

Настоящее изобретение в соответствии с другим своим аспектом также обеспечивает лекарственные средства, которые содержат конъюгат формулы (III).

Данные лекарственные средства применяются терапевтически, в частности при лечении рака.

В соответствии с другим своим аспектом настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим в качестве действующего начала конъюгат формулы (III) в соответствии с изобретением. Данные фармацевтические композиции содержат эффективную дозу по меньшей мере одного конъюгата формулы (III) в соответствии с изобретением и также по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

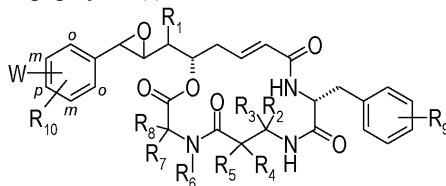
Указанные эксципиенты выбирают в соответствии с фармацевтической формой и желаемым способом введения из стандартных эксципиентов, которые известны специалисту в данной области техники.

Настоящее изобретение в соответствии с другим своим аспектом также обеспечивает способ лече-

ния указанных выше патологий, который включает введение пациенту эффективной дозы конъюгата формулы (III) в соответствии с изобретением.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

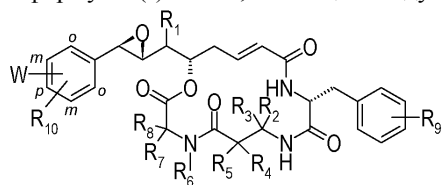
1. Соединение криптофицина формулы (I)



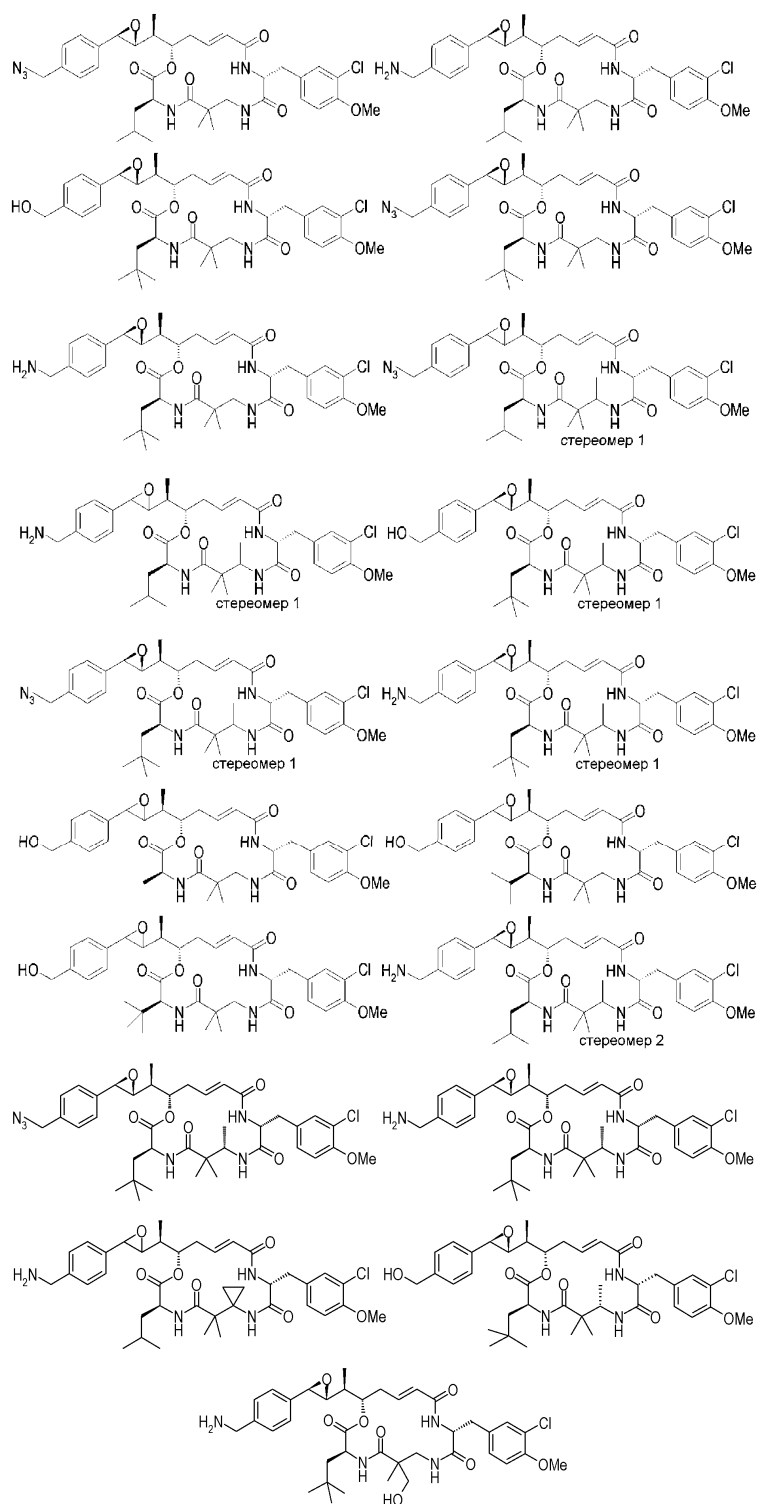
в которой

- R₁ представляет собой (C₁-C₆)алкильную группу;
- R₂ представляет собой атом водорода или (C₁-C₆)алкильную группу;
- R₃ представляет собой атом водорода;
- или, альтернативно, R₂ и R₃ образуют вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, (C₃-C₆)циклоалкильную группу;
- R₄ представляет собой (C₁-C₆)алкильную группу или группу (C₁-C₆)алкил-ОН;
- R₅ представляет собой (C₁-C₆)алкильную группу;
- R₆ представляет собой атом водорода;
- R₇ представляет собой (C₁-C₆)алкильную группу;
- R₈ представляет собой атом водорода;
- R₉ представляет собой один или два заместителя фенильного ядра, выбранных независимо друг от друга из атома водорода, (C₁-C₄)алкокси или атома галогена;
- R₁₀ представляет собой четыре заместителя фенильного ядра, которые представляют собой атом водорода;
- W представляет собой (C₁-C₆)алкил-NH(R₁₁), (C₁-C₆)алкил-ОН или (C₁-C₆)алкил-N₃;
- R₁₁ представляет собой атом водорода.

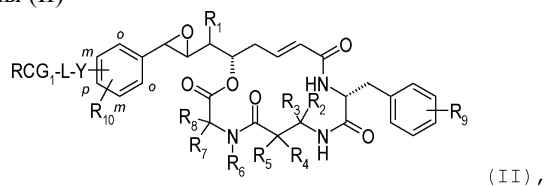
2. Соединение криптофицина формулы (I) по п.1, имеющее следующую структуру:



- 3. Соединение криптофицина формулы (I) по любому из пп.1 или 2, отличающееся тем, что R₁ представляет собой метильную группу.
- 4. Соединение криптофицина формулы (I) по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что каждый из R₂ и R₃ представляет собой атом водорода, или один из R₂ и R₃ представляет собой метильную группу и другой представляет собой атом водорода, или R₂ и R₃ образуют вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, циклопропильную группу.
- 5. Соединение криптофицина формулы (I) по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что каждый из R₄ и R₅ представляет собой метильную группу.
- 6. Соединение криптофицина формулы (I) по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что R₉ представляет собой два заместителя, выбранных из метоксигруппы и атома хлора.
- 7. Соединение криптофицина формулы (I) по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что каждый из R₂ и R₃ представляет собой атом водорода; и R₉ представляет собой два заместителя, выбранных из метоксигруппы и атома хлора.
- 8. Соединение криптофицина формулы (I) по любому из пп.1-6, отличающееся тем, что R₂ и R₃ представляет собой (C₁-C₆)алкил и другой представляет собой атом водорода; и R₉ представляет собой два заместителя, выбранных из метоксигруппы и атома хлора.
- 9. Соединение криптофицина формулы (I) по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что W представляет собой группу CH₂-NH₂ или CH₂-ОН.
- 10. Соединения криптофицина формулы (I) по п.1, которые выбраны из следующего списка:



11. Соединение формулы (II)



в которой

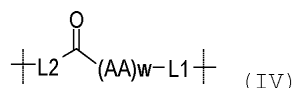
R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 и R_{10} представляют собой, как определено по пп.1-8;

Y представляет собой $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ алкил- NR_{11} , $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ алкил- O , $\text{C}(=\text{O})\text{O}$, $\text{C}(=\text{O})\text{NH}$ или $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ алкил-триазольную группу;

L представляет собой линкер;

RCG1 представляет собой реакционноспособную химическую группу, присутствующую на конце

линкера,
где L имеет формулу (IV)



в которой

L1 представляет собой

одинарную связь или группу NR₁₆(гетеро)арил-CR₁₅R₁₄-O-C(=O), если Y = (C₁-C₆)алкил-N(R₁₁);

группу NR₁₈-(C₂-C₆)алкил-NR₁₇-C(=O) или группу NR₁₆(гетеро)арил-CR₁₅R₁₄-O-C(=O)NR₁₈-(C₂-C₆)алкил-NR₁₇-C(=O), если Y = (C₁-C₆)алкил-O- или (C₁-C₆)алкил-S;

группу NR₁₆(гетеро)арил-CR₁₅R₁₄, если Y = C(=O)O, C(=O)NH, (C₁-C₆)алкил-C(=O)O или (C₁-C₆)алкил-C(=O)NH;

гетероарильная группа состоит из арильной группы, содержащей от 2 до 10 атомов углерода и от 1 до 5 гетероатомов, таких как азот, кислород или сера, включенных в кольцо и связанных с атомами углерода, образующими кольцо; арильная группа состоит из циклической ароматической группы, содержащей от 5 до 10 атомов углерода;

R₁₁, R₁₄, R₁₅, R₁₆, R₁₇ и R₁₈ представляют собой независимо друг от друга атом водорода или (C₁-C₆)алкильную группу;

(AA)_w представляет собой последовательность w аминокислот AA, связанных вместе через пептидные связи;

w представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 12;

L2 представляет собой одинарную связь, или (C₁-C₆)алкильную группу, или группу (C₁-C₆)алкил-(OCH₂CH₂)_i, или (C₁-C₆)алкил-(OCH₂CH₂)_i-O-(C₁-C₆)алкильную группу, или (CH₂CH₂O)_i-(C₁-C₆)алкильную группу, или CH(SO₃H)-(C₁-C₆)алкильную группу, или группу (C₁-C₆)алкил-CH(SO₃H), или (C₁-C₆)алкил-циклогексильную группу, или NR₁₉-(C₁-C₆)алкильную группу, или NR₂₀-(CH₂CH₂O)_i-(C₁-C₆)алкильную группу, или NR₂₁-арильную группу, или NR₂₁-гетероарильную группу, или (C₁-C₆)алкил-NR₂₂C(=O)-(C₁-C₆)алкильную группу, или группу (C₁-C₆)алкил-NR₂₂C(=O)-(C₁-C₆)алкил-(OCH₂CH₂)_i; гетероарильная группа состоит из арильной группы, содержащей от 2 до 10 атомов углерода и от 1 до 5 гетероатомов, таких как азот, кислород или сера, включенных в кольцо и связанных с атомами углерода, образующими кольцо; арильная группа состоит из циклической ароматической группы, содержащей от 5 до 10 атомов углерода;

R₁₉, R₂₀, R₂₁ и R₂₂ представляют собой независимо друг от друга атом водорода или (C₁-C₆)алкильную группу;

i представляет собой целое число от 1 до 50;

AA обозначает природную или неприродную аминокислоту конфигурации D или L, выбранную из аланина (Ala), β-аланина, γ-аминомасляной кислоты, 2-амино-2-циклогексилуксусной кислоты, 2-амино-2-фенилуксусной кислоты, аргинина (Arg), аспарагина (Asn), аспарагиновой кислоты (Asp), цитруллина (Cit), цистеина (Cys), α,α-диметил-γ-аминомасляной кислоты, β,β-диметил-γ-аминомасляной кислоты, глутамина (Gln), глутаминовой кислоты (Glu), глицина (Gly), гистидина (His), изолейцина (Ile), лейцина (Leu), лизина (Lys), ε-ацетиллизина (AcLys), метионина (Met) орнитина (Orn), фенилаланина (Phe), пролина (Pro), серина (Ser), треонина (Thr), триптофана (Trp), тирозина (Tyr), валина (Val);

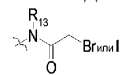
RCG1 выбран из

группы -C(=O)-Z_aR_a, для которой Z_a представляет собой одинарную связь, O или NH и R_a представляет собой H или (C₁-C₆)алкильную, (C₃-C₇)циклоалкильную, (C₆-C₁₀)арильную, (C₅-C₁₀)гетероарильную или (C₃-C₇)гетероциклоалкильную группу или сукцинимидильную группу;

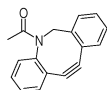


одной из следующих реакционноспособных групп: малеимидо

группа; галогенацетиамидо



группа с R₁₃, представляющим атом водорода или (C₁-C₆)алкильную группу; -Cl; -N₃; -OH; -SH; -NH₂;

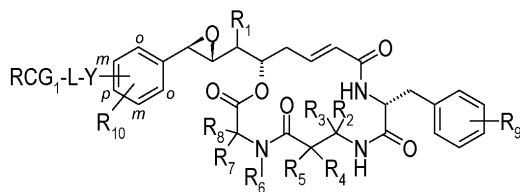


-C≡CH, группа или группа O-(C₁-C₆)алкилгидроксиламина;

гетероарильная группа состоит из арильной группы, содержащей от 1 до 5 гетероатомов, таких как азот, кислород или сера, включенных в кольцо и связанных с атомами углерода, образующими кольцо;

гетероциклоалкильная группа состоит из циклоалкильной группы, содержащей от 1 до 3 гетероатомов, таких как азот, кислород или сера, включенных в кольцо и связанных с атомами углерода, образующими кольцо.

12. Соединение формулы (II) по п.11, имеющее следующую структуру:

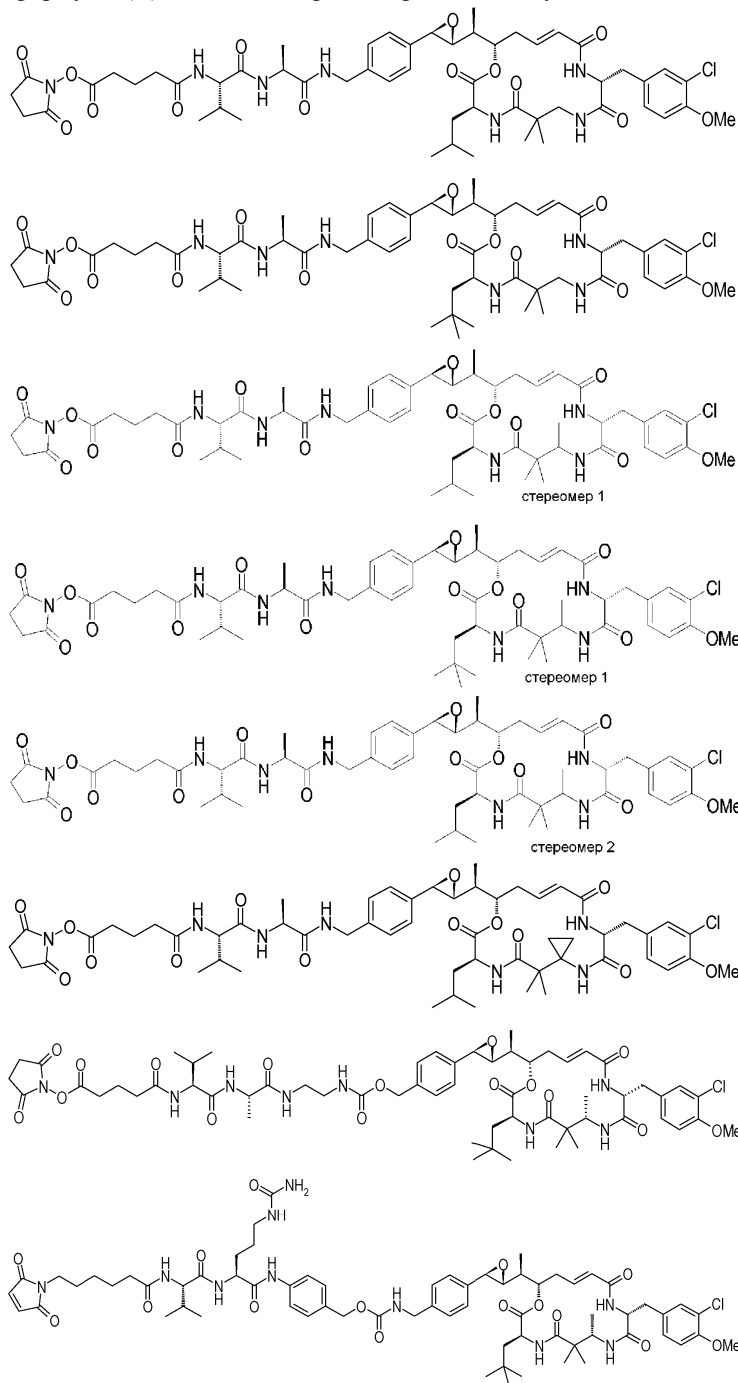


13. Соединение формулы (II) по любому из пп.11 или 12, отличающееся тем, что Y представляет собой (C₁-C₆)алкил-NR₁₁, предпочтительно Y представляет собой CH₂-NH.

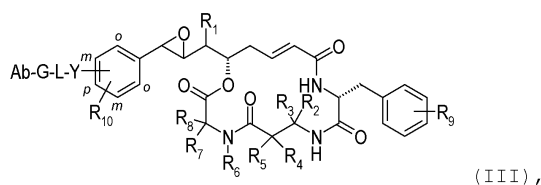
14. Соединение формулы (II) по п.11, отличающееся тем, что последовательность AA представляет собой аланин (Ala), цитруллин (Cit), глутамин (Gln), глицин (Gly), ε-ацетиллизин (AcLys), валин (Val).

15. Соединение формулы (II) по любому из пп.11-14, отличающееся тем, что L2 представляет собой (C₁-C₆)алкильную группу или группу (C₁-C₆)алкил-(OCH₂CH₂)_i или CH(SO₃H)-(C₁-C₆)алкильную группу.

16. Соединение формулы (II) по п.11, которое выбрано из следующего списка:



17. Конъюгат формулы (III)



в которой

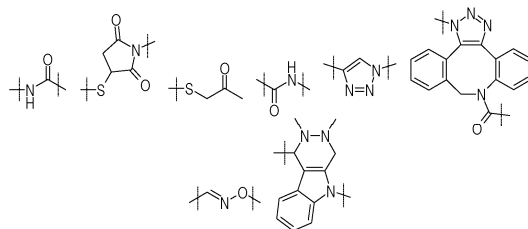
$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} представляют собой, как определено по пп.1-8;

Y и L представляют собой, как определено по пп.11-15;

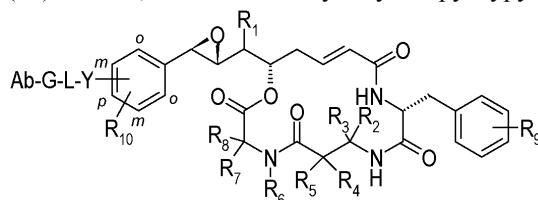
G получают взаимодействием между RCG1, реакционноспособной химической группой, присутствующей на конце линкера, и RCG2, ортогональной реакционноспособной химической группой, присутствующей на (Ab);

Ab представляет собой антитело; где

G выбран из



18. Конъюгат формулы (III) по п.17, имеющий следующую структуру:



19. Конъюгат формулы (III) по любому из пп.17 или 18, отличающийся тем, что RCG2 выбран из ϵ -аминогрупп лизина, находящихся на боковых цепях остатков лизина, которые присутствуют на поверхности антитела;

α -аминогрупп N-концевых аминокислот тяжелых и легких цепей антитела;

групп сахаридов шарнирной области;

тиолов цистеинов, образованных путем восстановления внутрицепочечных дисульфидных связей, или тиолов сконструированных цистеинов;

амидных групп, находящихся на боковых цепях некоторых остатков глутамина, которые присутствуют на поверхности антитела;

альдегидных групп, введенных с использованием формилглицинообразующего фермента.

20. Конъюгат формулы (III) по любому из пп.17 или 18, отличающийся тем, что

когда RCG1 представляет собой N-гидроксисукцинимидиловый эфир, RCG2 представляет собой группу $-NH_2$;

когда RCG1 представляет собой малеимидо или галогенацетиамидо функциональную группу или группу $-Cl$, RCG2 представляет собой группу $-SH$;

когда RCG1 представляет собой группу $-N_3$, RCG2 представляет собой группу $-C\equiv CH$ или активированную $C\equiv C$;

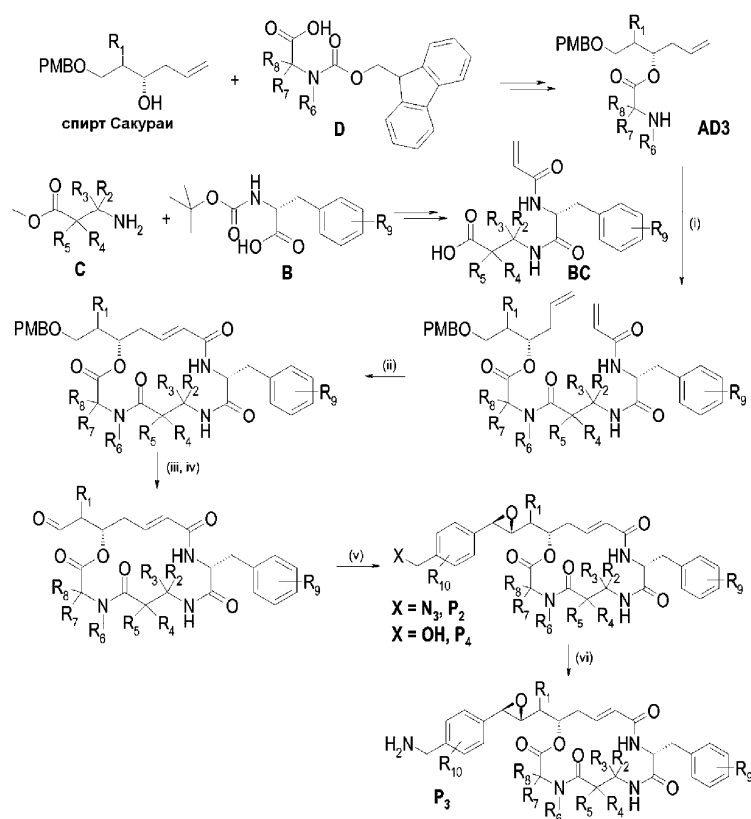
когда RCG1 представляет собой группу $-OH$ или $-NH_2$, RCG2 представляет собой карбоновую кислоту или амидную функциональную группу;

когда RCG1 представляет собой группу $-SH$, RCG2 представляет собой малеимидо или галогенацетиамидо функциональную группу;

когда RCG1 представляет собой функциональную группу $-C\equiv CH$ или активированную $C\equiv C$, RCG2 представляет собой группу $-N_3$;

когда RCG1 представляет собой $-O$ -алкилгидроксиламинную функциональную группу или реакционный субстрат Пикте-Шпенглера, RCG2 представляет собой альдегидную или кетонную функциональную группу.

21. Способ получения соединения криптофицина формулы (I), включающий стадию



в которой

стадия (i) представляет собой пептидное сочетание между фрагментами AD3 и альтернативным BC в присутствии реагентов сочетания;

стадия (ii) представляет собой макроциклизацию посредством реакции метатезиса с замыканием цикла в присутствии катализатора;

стадия (iii) представляет собой снятие защитной группы п-метоксибензилового эфира в кислых условиях;

стадия (iv) представляет собой окисление спирта с использованием окислителя;

стадия (v) представляет собой введение эпоксида путем асимметрической реакции Кори-Чайковского с использованием соответственно замещенного полученного на основе изотиоцинеола хирального сульфония в присутствии основания;

стадия (vi) представляет собой восстановление азидогруппы.

22. Способ получения конъюгата формулы (III), включающий стадии:

(i) взаимодействие необязательно буферизованного водного раствора антитела, необязательно модифицированного с помощью модифицирующего агента, и раствора соединения формулы (II), как определено из пп.11-16, при этом химическая группа RCG1 соединения формулы (II) является реакционно-способной по отношению к химическим группам RCG2, присутствующим на антителе, в частности к аминогруппам, присутствующим на антителах, при этом указанные химические группы RCG2 были введены, когда это необходимо, с помощью модифицирующего агента, чтобы присоединить соединение формулы (II) к антителу с помощью образования ковалентной связи;

(ii) и затем необязательное отделение конъюгата, образованного на стадии (i), от соединения формулы (II), и/или от непрореагировавшего антитела, и/или от любых образовавшихся агрегатов.

23. Фармацевтическая композиция для лечения рака, отличающаяся тем, что она содержит конъюгат формулы (III) по любому из пп.17-20 и один фармацевтически приемлемый эксципиент.

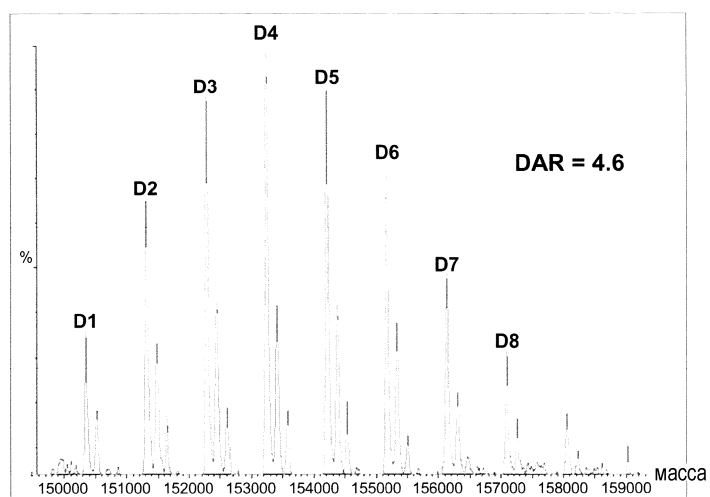
24. Применение соединения криптофицина формулы (I) по любому из пп.1-10 в качестве противоопухолевого средства.

25. Применение конъюгата формулы (III) по любому из пп.17-20 в качестве противоопухолевого средства.

26. Лекарственное средство для лечения рака, отличающееся тем, что оно содержит соединение криптофицина формулы (I) по любому из пп.1-10.

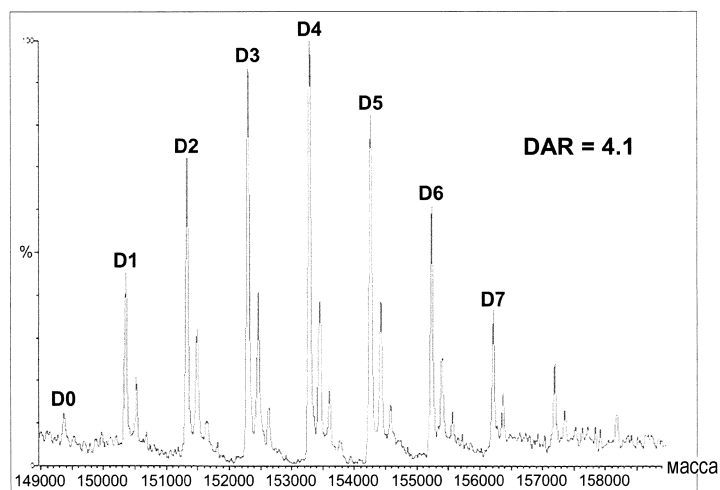
27. Лекарственное средство для лечения рака, отличающееся тем, что оно содержит конъюгат формулы (III) по любому из пп.17-20.

Масс-спектр высокого разрешения Пр.3 (способ В1)



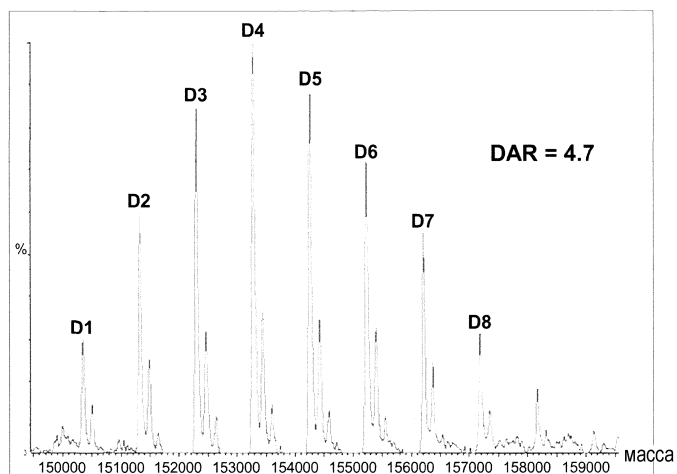
Фиг. 1

Масс-спектр высокого разрешения Пр.7 (способ В1)



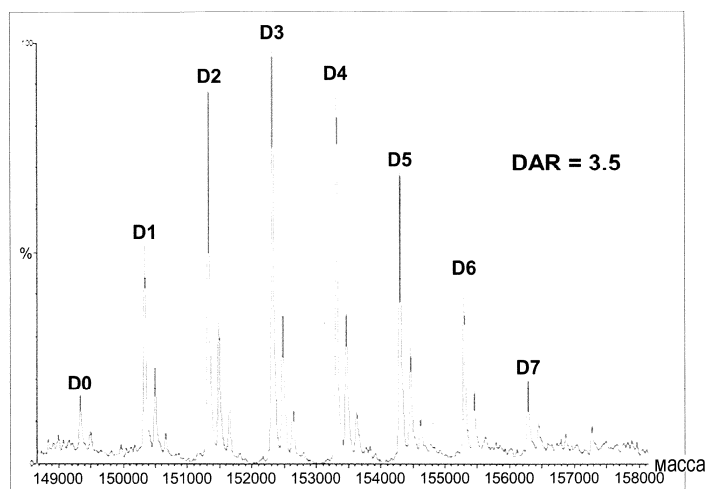
Фиг. 2

Масс-спектр высокого разрешения Пр.10 (способ В1)



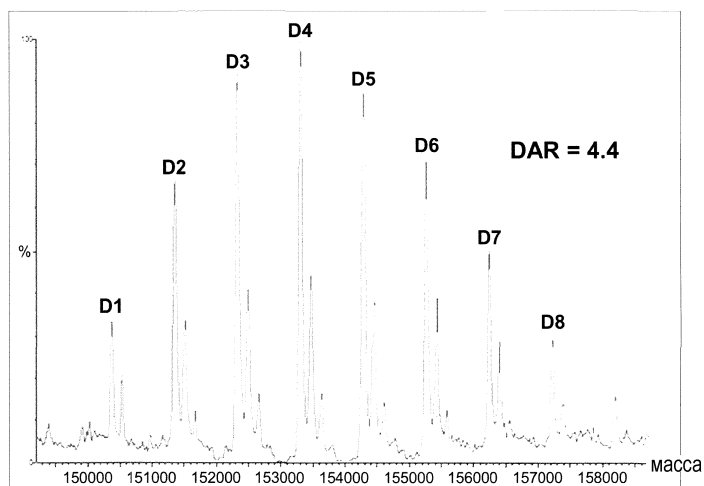
Фиг. 3

Масс-спектр высокого разрешения Пр.14 (способ В1)



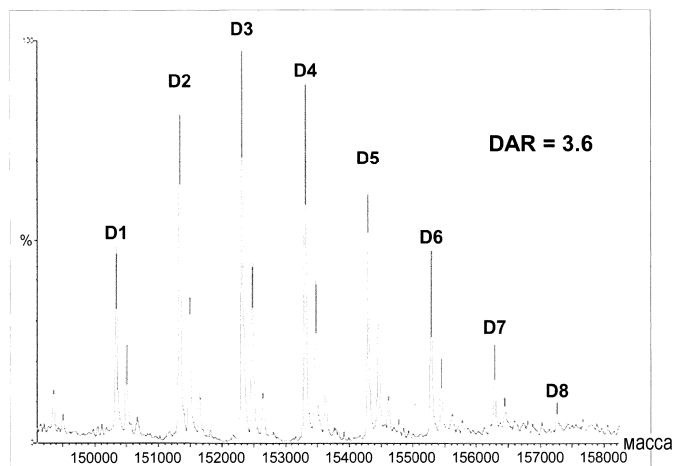
Фиг. 4

Масс-спектр высокого разрешения Пр.20 (способ В1)

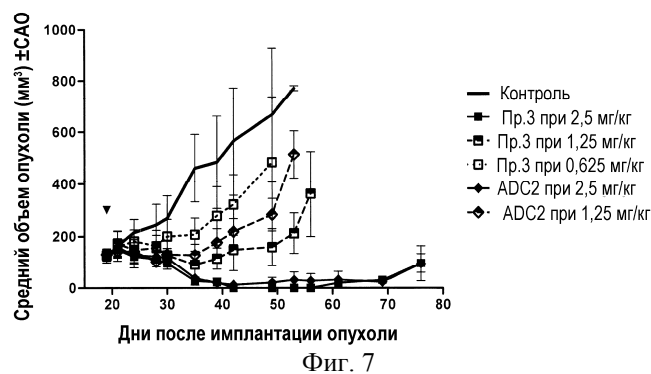
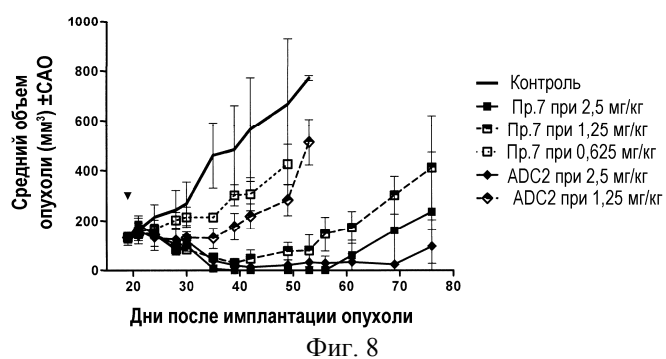
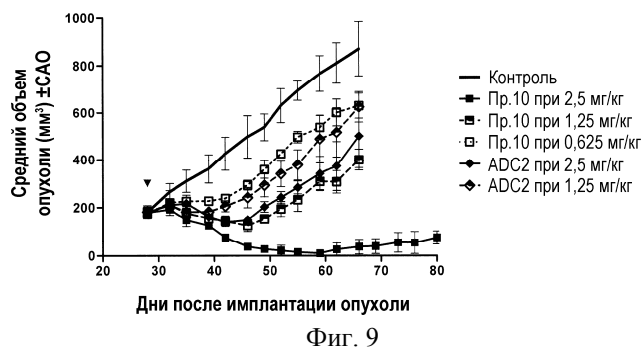
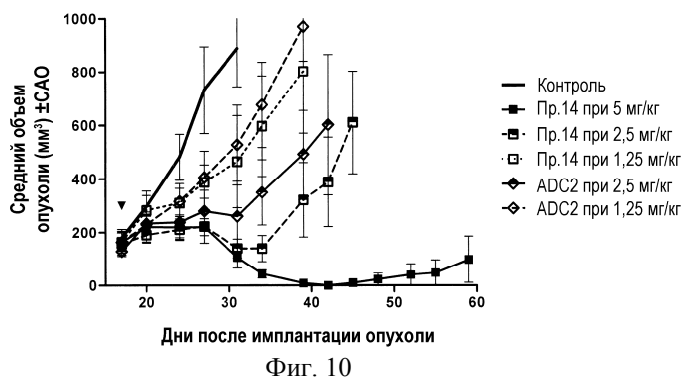


Фиг. 5

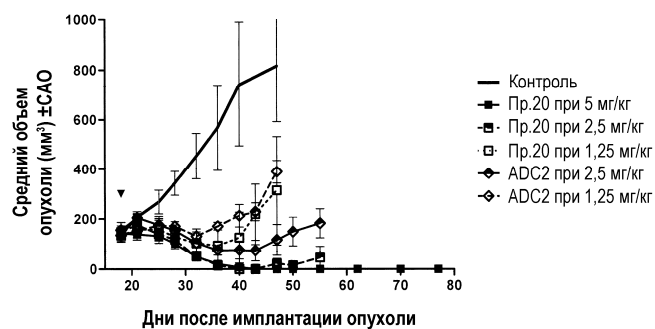
Масс-спектр высокого разрешения Пр.23 (способ В1)



Фиг. 6

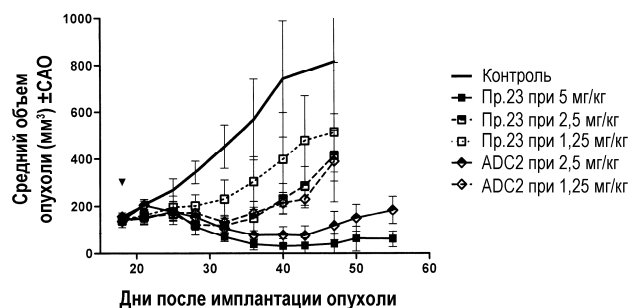
Эффективность *in vivo* Пр.3 в отношении MDA-MB-231 ксенотрансплантата у мышей SCIDЭффективность *in vivo* Пр.7 в отношении MDA-MB-231 ксенотрансплантата у мышей SCIDЭффективность *in vivo* Пр.10 в отношении MDA-MB-231 ксенотрансплантата у мышей SCIDЭффективность *in vivo* Пр.14 в отношении MDA-MB-231 ксенотрансплантата у мышей SCID

Эффективность *in vivo* Пр.20 в отношении MDA-MB-231 ксенотрансплантата у мышей SCID



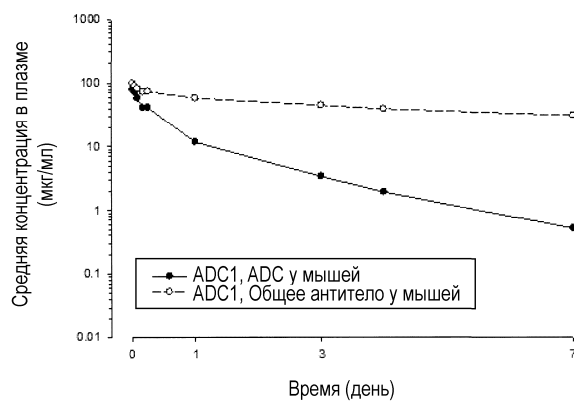
Фиг. 11

Эффективность *in vivo* Пр.23 в отношении MDA-MB-231 ксенотрансплантата у мышей SCID



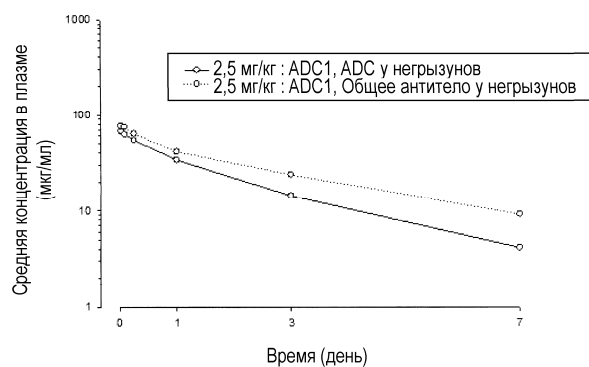
Фиг. 12

ФК-профиль *in vivo* ADC1 после однократного в/в введения у мышей SCID (10 мг/кг)



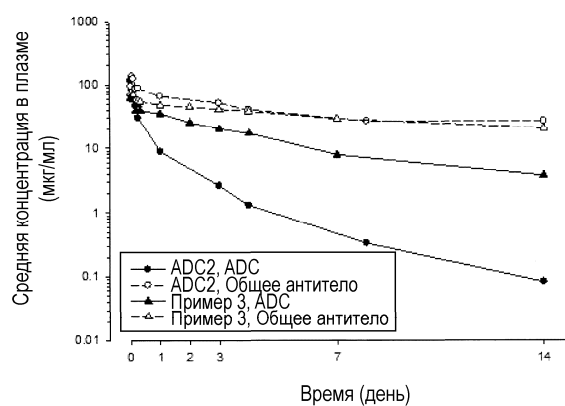
Фиг. 13

ФК-профиль in vivo ADC1 после однократного в/в введения
у негрызунов (2,5 мг/кг)



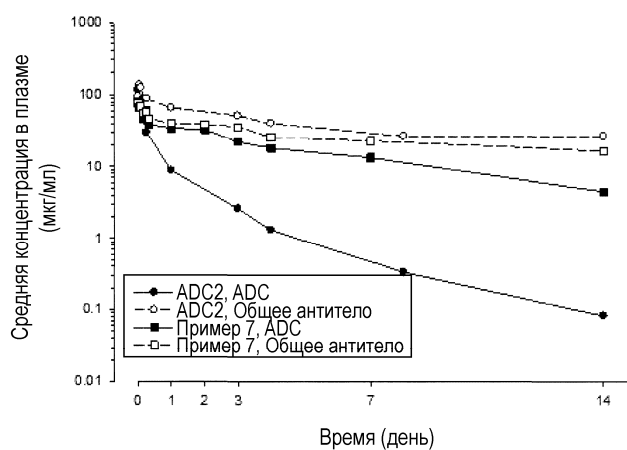
Фиг. 14

ФК-профиль in vivo Пр.3 после однократного в/в введения
у мышей SCID (5 мг/кг)



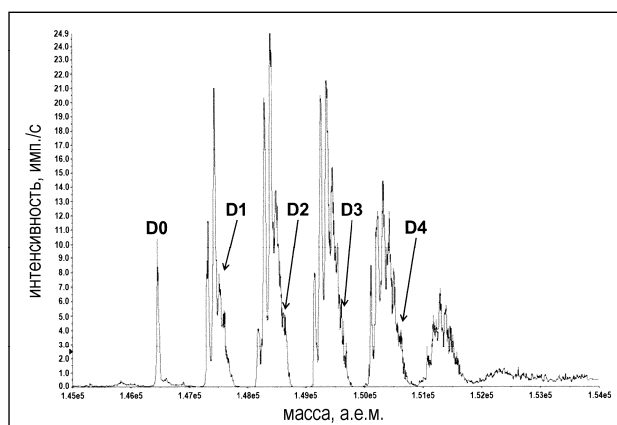
Фиг. 15

ФК-профиль in vivo Пр.7 после однократного в/в введения
у мышей SCID (5 мг/кг)



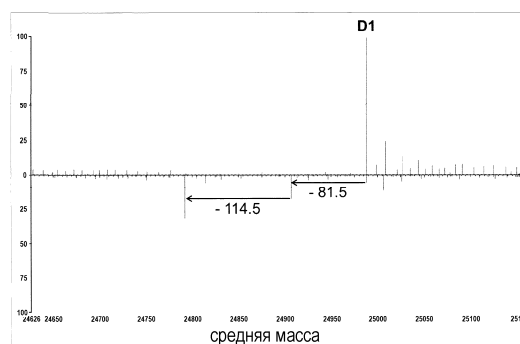
Фиг. 16

Спектр МСВР дегликозилированного ADC1 через 96 ч после однократного в/в введения у мышей SCID при 10 мг/кг (способ В2)



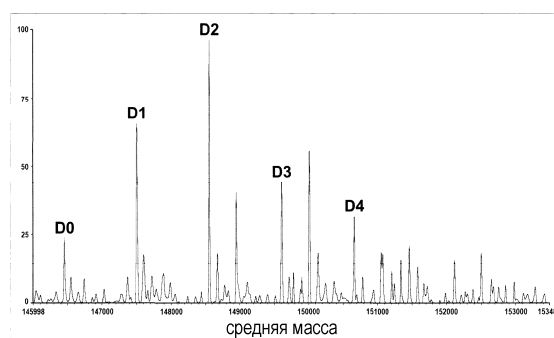
Фиг. 17

Спектр МСВР легкой цепи ADC2 через 96 ч после однократного в/в введения у мышей SCID при 10 мг/кг (способ В2)



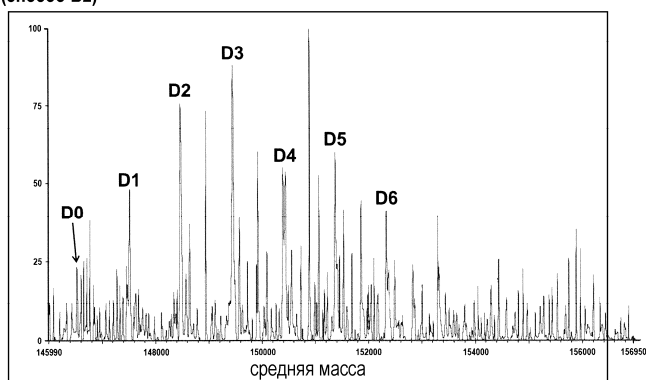
Фиг. 18

Спектр МСВР дегликозилированного ADC1 через 6 д после однократного в/в введения у негрызунов при 5 мг/кг (способ В2)



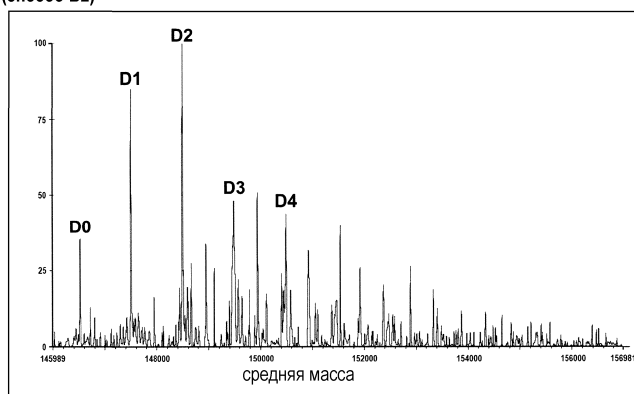
Фиг. 19

Спектр МСВР Пр.3 через 96 ч после однократного в/в введения у мышей SCID при 5 мг/кг (способ В2)



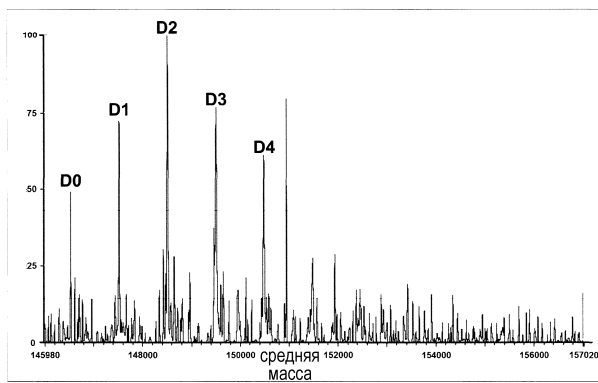
Фиг. 20

Спектр МСВР Пр.7 через 96 ч после однократного в/в введения у мышей SCID при 5 мг/кг (способ В2)



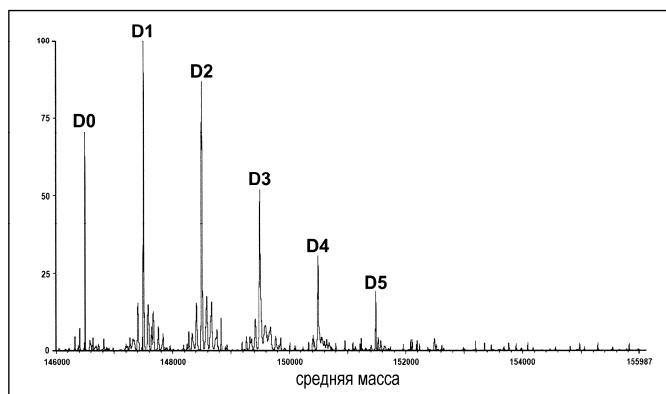
Фиг. 21

Спектр МСВР Пр.10 через 96 ч после однократного в/в введения у мышей SCID при 5 мг/кг (способ В2)



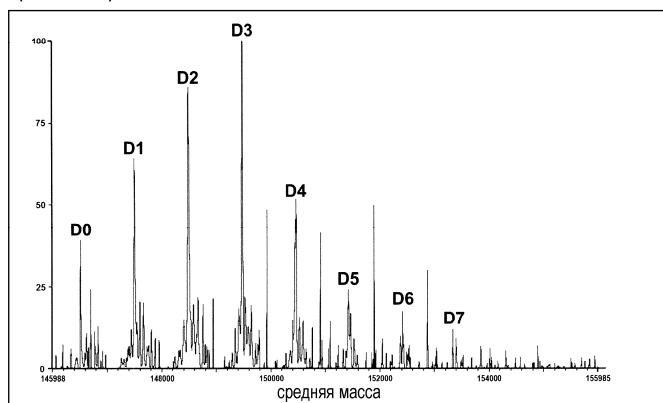
Фиг. 22

Спектр МСВР Пр.14 через 96 ч после однократного в/в введения у мышей SCID при 5 мг/кг (способ В2)



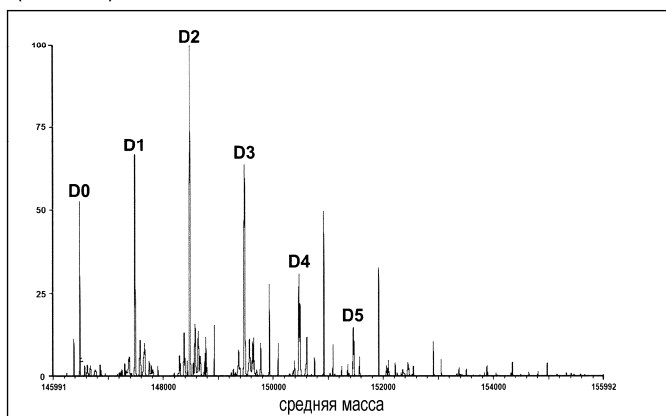
Фиг. 23

Спектр МСВР Пр.20 через 96 ч после однократного в/в введения у мышей SCID при 5 мг/кг (способ В2)



Фиг. 24

Спектр МСВР Пр.23 через 96 ч после однократного в/в введения у мышей SCID при 5 мг/кг (способ В2)



Фиг. 25



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2