

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991985 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.25

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.03.27

(54) КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО (КАЛС) НА ОСНОВЕ ИНГИБИТОРОВ ГДАЦ И ПРИМЕНЕНИЕ В ТЕРАПИИ

(31) 17163065.0

(32) 2017.03.27

(33) EP

(86) PCT/EP2018/057744

(87) WO 2018/178060 2018.10.04

(71) Заявитель:
АЛЬФАСИГМА С.П.А. (IT)

(72) Изобретатель:

Вешн Лоредана, Де Сантис Рита,
Милаццо Фердинандо Мария,
Джаннини Джузеппе, Таддеи
Маурицио, Фальтони Валентина,
Петриччи Елена (IT)

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

(57) Данное изобретение относится к новым конъюгатам антитело-лекарственное средство на основе ингибиторов гистондеацетилазы (иГДАЦ), в частности, с антителами, направленными на рецепторы ErbB1, ErbB2 и ErbB3, фармацевтическим композициям, содержащим указанные антитела, а также к их применению в лечении рака или опухоли и других заболеваний, где модулирование одной или более изоформ гистондеацетилазы может быть эффективным для терапевтических вмешательств.

A1

201991985

201991985

A1

**КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО (КАЛС) НА ОСНОВЕ
ИНГИБИТОРОВ ГДАЦ И ПРИМЕНЕНИЕ В ТЕРАПИИ**

Область техники

Данное изобретение относится к новым конъюгатам антитело-лекарственное средство на основе ингибиторов гистондеацетилазы (иГДАЦ), применяемым для лечения пролиферативных заболеваний. Изобретение, в частности, относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему антитело к ErbB1, ErbB2, ErbB3 рецепторам или родственным молекулярным целям. В изобретении также представлены новые ингибиторы ГДАЦ, которые содержатся в конъюгатах антитело-лекарственное средство. Более того, изобретение относится к фармацевтическим композициям КАЛС и их применению в лечении рака или опухолей и других заболеваний, где модулирование одной или более изоформ гистондеацетилазы может быть эффективным для терапевтических вмешательств.

Уровень техники

Медицинские исследования сфокусированы на персонализированной медицине для лечения рака, неврологических расстройств, воспалительных заболеваний и вирусных инфекций. В настоящее время, знание о связях между генетическими изменениями и человеческими заболеваниями позволяют большее понимание их этиологии.

Эпигенетические aberrации могут способствовать возникновению и прогрессированию вышеупомянутых заболеваний человека посредством усиления или потери функции эпигенетических регуляторных белков. (*Berdasco, 2013 Hum Genet 132: 359-83*), так как более 1750 белков в клетках человека могут быть пост-трансляционно модифицированы на лизиновых остатках через ацетилирование и деацетилирование (*Choudhary 2009 Science 325: 834-40*). Деацетилирующие ферменты считаются ценными целями для лечения aberrантного деацетилирования, связанного с раком, а также для различных других заболеваний, таких как неврологические расстройства, воспаление, вирусные инфекции и

сердечнососудистые расстройства (*Minucci 2006 Nature Rev Cancer 6: 38-51; Glozak 2007 Oncogene 26: 5420-32; Zhang 2015 Med Res Rev 35: 63-84; Dinarello 2010 Mol Med 17: 333-52*).

В настоящее время несколько иГДАЦ были одобрены FDA: вориностат (Zolinza®; Merck) для лечения резистентной кожной Т-клеточной лимфомы (CTCL) (*Duvic 2007 Blood 109: 31-39*); ромидепсин (Istodax®; Celgene) для лечения CTCL и периферической Т-клеточной лимфомы (PTCL) (*VanderMolen 2011 J Antibiot (Tokyo) 64: 525-531*) и белиностат (Beleodaq®; Spectrum Pharmaceuticals) для лечения PTCL (*West 2014 J Clin Invest 124: 30-39*). В начале 2015 пероральный ранобиностат (Farydak®, Novartis) был одобрен FDA как комбинированная терапия с бортезомибом и дексаметазоном у пациентов с рецидивирующей множественной миеломой (*Garnock-Jones KP (2015) Drugs. 75: 695-704*). Снова, в январе 2015, перорально доступный низкомолекулярный бензамид ГДАЦ1,2,3 и 10 ингибитор, хидамид (Epidaza®, Shenzhen Chipscreen Biosciences (разработчик) лицензированный HUYA Bioscience) был одобрен китайским FDA для лечения рака прямой и ободочной кишки и легкого, а также для лечения рецидивирующей или рефракторной PTCL (*Ruolan Gu, (2015) Journal of Chromatography B, 1000: 181-186*).

Ингибиторы ГДАЦ (иГДАЦ) наиболее изучены как противораковые агенты, но существует растущее количество литературы, описывающей ферменты ГДАЦ как играющие важнейшую роль в других заболеваниях, таких как неврологические расстройства, воспалительные процессы и вирусные инфекции (*Dinarello 2010 Cell 140: 935-950; Gray 2011 Epigenomics 3: 431-450; Giannini 2012 Future Med Chem 4: 1439-60*).

В WO2015/157595 описаны конъюгаты цистеин-инженерных антител и гетерологической группы. Среди гетерологической группы упомянуты лекарственные средства, и среди лекарственных средств указаны ингибиторы гистондеацетилазы (ГДАЦ).

В Choi S et al in J Control. Release 152, suppl.1, 2011, e9-e10a описан генерический иГДАЦ конъюгат с CD7 антителом через PLGA наночастицы. Конъюгат сможет доставить ингибиторы ГДАЦ к Т-

клеткам человека, с CD7 рецептором яичников. В этом документе не описаны какие-либо специфические конъюгаты.

В *Battistuzzi G et al in Current Bioactive Compounds* 12, 2016, 282-288 описаны четыре стадии синтеза ингибитора ГДАЦ, который является производными тиола. В этом документе отсутствует информация по применению этого соединения для получения других фармацевтических соединений.

В *Ai T. et al in Current Med Chem* 2012, 19, 475 описано применение иГДАЦ с противораковым и синергетическим эффектом. Там описаны производные ингибитора ГДАЦ с фолиевой кислотой, ретиноевой кислотой, агентами на основе платины, ингибиторами протеинкиназы и ингибиторами инозинмонофосфатдегидрогеназы.

В *West A.C. et al in Oncoimmunology* 1, 2012, 376 описано применение сочетания ингибиторов ГДАЦ с иммуностимулирующими антителами в качестве противоракового лекарственного средства.

В частности, ГДАЦ 1, 2 и 3, преимущественно ядерные, были найдены, особенно на поздней стадии, агрессивные злокачественные образования в опухолевых клетках, и они коррелируют с плохой степенью выживаемости (*Gryder 2012 Future Med Chem* 4: 505-24); ГДАЦ6 с первичной клеточной локализацией в цитоплазме, регулируют состояния ацетилирования, и поэтому функциональность тубулина, HSP90 и других экстраядерных белков, тем самым подтверждая их вовлечение в удаление неправильно свернутых белков в клетках, подвижность клеток и метастатический потенциал (*Clawson 2016 Ann Transl Med* 4: 287).

Изоформы ГДАЦ (2, 3, 6, 9, 10) также вовлечены в хроническое кишечное воспаление, поэтому ингибиторы ГДАЦ, в дополнение к индукции апоптоза в опухолевых клетках, могут применяться для болезни воспаленного кишечника (*Felice 2015 Aliment Pharmacol Ther* 41: 26-38).

Недавно был описан новый класс эффективных пан-иГДАЦ на основе тиола (*Giannini 2014 J Med Chem* 57: 8358-77), где эффективный ингибитор ГДАЦ, ST7612AA1, выбирают в качестве лекарственного кандидата, характеризуемого широким спектром активности против солидных и гематологических злокачественных образований у человека.

ST7612AA1 демонстрирует особенность ингибировать рост нескольких опухолей, таких как Ras-мутантная карцинома толстой кишки, подвид сильно пролиферирующего дедифференцированного рака толстой кишки, ассоциированный с пониженной выживаемостью пациента; немелкоклеточные опухоли легких с диким типом EGFR (и мутантным KRAS) и T790 EGFR мутацией; рак яичников с низкими уровнями PTEN и сверхэкспрессией ErbB1 и ErbB2 или рак яичников без PTEN; рак молочной железы с тройным негативным фенотипом (TNBC), определенный отсутствием рецептора эстрогена, рецептора прогестерона и ErbB2; острый миелоидный лейкоз, диффузная В-крупноклеточная лимфома. Более того, ST7612AA1 показал способность модулировать некоторые транскрипты, вовлеченные в иммунную реакцию и в ключевые патогенетические пути, такие как NF-κB путь, и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), таким образом предлагая соответствующее вовлечение не только в рак, но и в воспалительные заболевания (*Vesci 2015 OncoTarget 20: 5735-48*).

Действие ST7612AA1 оказывается против ядерных и цитоплазматических изоформ ГДАЦ опухолевых клеток, что приводит к повышенной транскрипции е-кадгерина, кератинов и других типовых эпителиальных маркеров и, параллельно, подавлению виментина и других генов, ассоциированных с мезенхимальным фенотипом. Эти данные позволяют предположить, что лечение ST7612AA1 может вызвать "кадериновое переключение" и обратную мутацию процесса эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), благоприятствуя дифференциации клеток. Способность клеток трансдифференцировать и дедифференцировать играет ключевую роль в инвазии и метастазах через процесс ЭМП, и дифференциация может применяться как дополнительный прогностический и предсказательный индикатор терапевтической эффективности. Через ингибирование ГДАЦ6, ST7612AA1 также способен поражать не-гистоновые субстраты ГДАЦ, например, TP53, альфа-тубулин или белок температурного шока 90 (HSP90), вовлеченный в подачу сигнала повреждения ДНК, связывание фактора транскрипции, молекулярный гомеостаз и процессы восстановления ДНК.

Было доказано, что ST7612AA1 способен вызывать реактивацию ВИЧ, будучи потенциально полезным для новых терапий, ориентированных на уничтожение вирусных резервуаров (*Badia 2015 Antiviral Res 123: 62-9*).

Для улучшения опухолевой специфичности и снижения токсичности, недавно конъюгаты антитело-лекарственное средство стали клинически подтвержденным методом лечения рака. Хотя были достигнуты значительные успехи в лечении гематологических опухолей, проблемы остаются в более трудных для лечения солидных формах рака.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (КАЛС) являются быстро растущим классом противораковых лекарственных средств, которые объединяют целевые свойства mAbs с противоопухолевым действием эффективных цитотоксических лекарственных средств (*Leal M 2014 Ann NY Acad Sci 1321: 41-54*).

В настоящее время ингибиторы микротрубочек являются клинически подтвержденными полезными КАЛС. Кадцила (Трастузумаб эмтанзин; Genentech), Адцетрис (брентуксимаб ведотин; Seattle Genetics), Беспонса (Инотузумаб озогамицин; Pfizer) и Милотарг (Гемтузумаб Озогамицин; Pfizer) являются одобренными FDA терапевтическими агентами КАЛС, и более 40 других КАЛС переданы в клинику (*Okeley 2014 Hematol Oncol Clin North Am 28: 13-25; Baron 2015 J Oncol Pharm Pract 21: 132-42*).

Полезные нагрузки, в настоящее время применяемые в КАЛС, являются высокоэффективными цитотоксическими лекарственными средствами, оказывающими действие на критические клеточные процессы, требуемые для выживания. Высокоэффективные ингибиторы микротрубочек, такие как производные майтанзина (DM1/DM4) или ауристатин (ММАЕ/ММАФ), преобладают на текущем поле КАЛС. Они обычно вызывают апоптоз в клетках, переносящих митоз через остановку клеточного цикла на G2/М. Более свежие работы показывают, что ингибиторы микротрубочек также разрушают не делящиеся клетки в интерфазе. Эти открытия предоставляют объяснение того, как ингибиторы микротрубочек также являются цитотоксическими к медленно реплицирующим или не делящимся опухолевым клеткам, демонстрируя значительную токсичность.

Другие классы цитотоксических лекарственных средств, применяемые в КАЛС, включают энедины (калихеамицин), производные дуокармина, пирролобензодиазепины (ПБД) и индолинобензодиазепины, все которые поражают малую бороздку ДНК, и алкалоиды хинолина (SN-38), которые ингибируют топоизомеразу I. Таким образом, основная часть полезных нагрузок, в настоящее время применяемых в КАЛС, являются высокоэффективными, часто цитотоксическими в пикомолярном интервале, что считается требованием к стратегии КАЛС, так как только очень незначительное количество (<1%) инъекционной дозы КАЛС локализуется в опухолях (*Bornstein 2015 AAPS Journal 17: 525-34; Casi and Neri 2015 J Med Chem 58: 8751-61*).

Считается, что основная токсичность КАЛС получается из выделения полезной нагрузки из-за нестабильности линкера. Быстро делящиеся нормальные клетки, такие как клетки, выстилающие пищеварительный тракт, клетки в волосных фолликулах и миелоидные клетки, подвержены токсичности от выделенных ингибиторов микротрубочек, что вызывает желудочно-кишечные симптомы, потерю волос и миелодепрессию. Некоторые ключевые токсичности были найдены для разных полезных нагрузок. В частности, MMAE вызывают периферическую невропатию и нейтропению; MMAF связаны с тромбоцитопенией и глазной токсичностью; DM1 вызывают желудочно-кишечные проблемы, а также тромбоцитопению и нейтропению, в зависимости от линкера и последующих метаболитов; глазная токсичность является наиболее частым побочным эффектом для DM4-конъюгированных КАЛС; калихеамицин вызывает тромбоцитопению и печеночную дисфункцию; и раннее назначение SN-38 конъюгированных лекарственных средств предполагает нейтропению как частую токсичность.

Возможной стратегией минимизации токсичности КАЛС следующего поколения является селекция низкотоксичных полезных нагрузок.

Данное изобретение неожиданно демонстрирует, что конъюгаты антитело-лекарственное средство, полученные из антиопухолевого антитела, конъюгированного с лекарственным средством с низкой токсичностью, такие как иГДАЦ, могут показывать превосходную

эффективность *in vivo*. Более того, применение эпигенетических модуляторов (т.е. иГДАЦ) для построения КАЛС предоставляет первый в своем классе пример в области. Подобно ингибиторам ГДАЦ, могут применяться другие эпигенетические модуляторы, которые модулируют экспрессию гена без изменения базовой последовательности ДНК, такие как ингибиторы метилтрансферазы ДНК (азацитидин и децитабин) (*Pachaiyappan 2014 Bioorg and Med Chem Lett 24: 21-32*).

Конъюгат антитело-лекарственное средство также имеет хорошую стабильность в крови и жидкостях тела, и превосходное противораковое действие, имея низкую токсичность по сравнению с конъюгатами антитело-лекарственное средство известного уровня техники.

Поэтому объектом данного изобретения является получение конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего безопасное противораковое лекарственное средство, конъюгированное с антителом. Другим объектом данного изобретения является получение способа получения указанного конъюгата антитело-лекарственное средство (КАЛС).

Другим объектом данного изобретения является получение фармацевтической композиции, содержащей указанный конъюгат антитело-лекарственное средство.

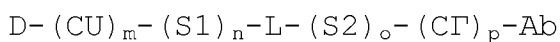
Еще одним объектом данного изобретения является получение указанного конъюгата антитело-лекарственное средство для применения в лечении рака или опухоли и других заболеваний, где модулирование одной или более изоформ гистондеацетилазы может быть эффективным для терапевтических вмешательств.

В частности, другие заболевания, такие как метаболические расстройства, аутизм или заболевания, связанные с воспалением, такие как повреждение легкого, аутоиммунное заболевание, астма и диабет 2 типа, которые демонстрируют aberrantную экспрессию гена и эпигенетическое регулирование во время из возникновения, могут быть вовлечены (*Samanta 2017 Biochim Biophys Acta 1863: 518-28; Akhtar 2013 Plos One 8:e67813; Mei 2014 Neuron 83: 27-49*). Эпигенетические модификаторы, поражающие метилирование ДНК и ферменты гистоновое деацетилирование, могут быть источником для

лечения патогенеза этих заболеваний.

Сущность изобретения

Данное изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство формулы (I)

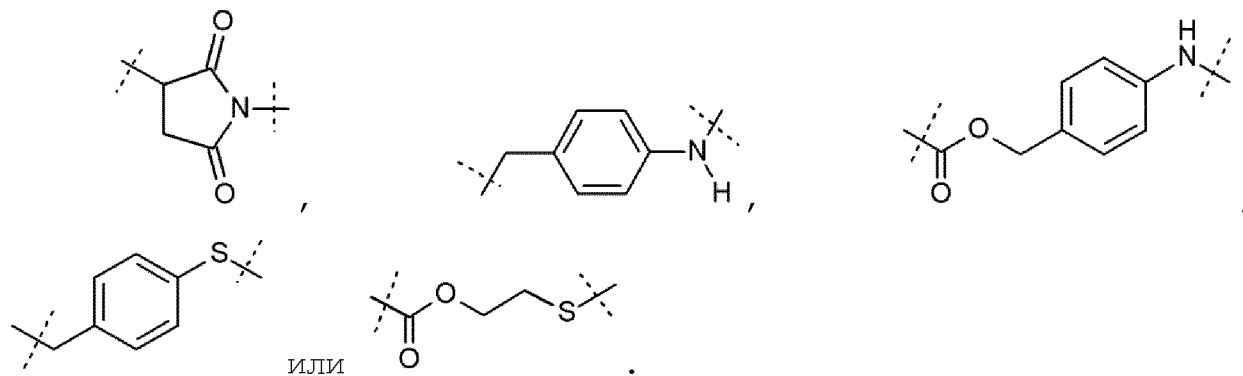


(формула I)

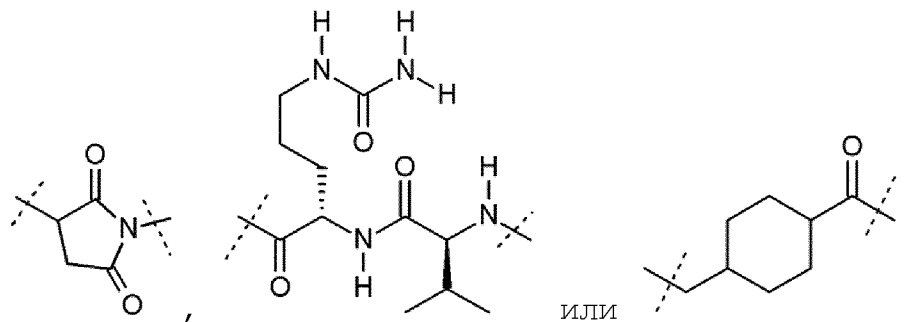
или его фармацевтически приемлемой соли, где

D является цитотоксическим лекарственным средством (также называемым боезаряд), является лекарственным ингибитором гистондеацетилазы, который содержит бензамидные, гидроксаматные или тиольные группы в качестве группы, связывающей цинк (ГСЦ),

CU является соединительной единицей, которая может отсутствовать или которую выбирают из

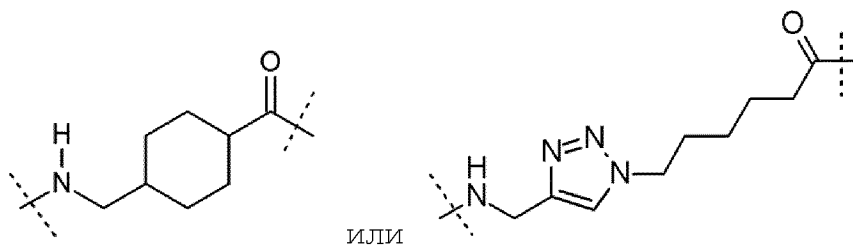


S1 является разделителем и может отсутствовать или является

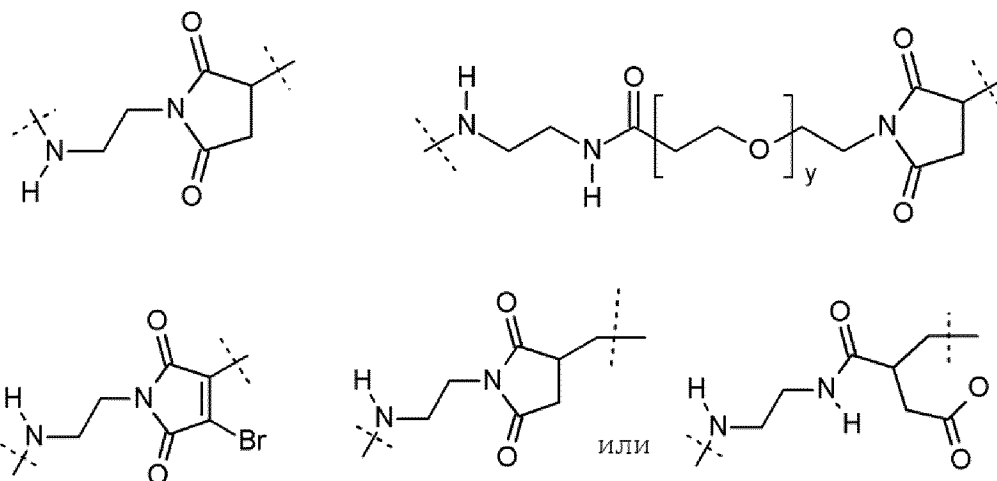


L является линкером, который выбирают из $(CH_2)_q-CO$, $NH-(CH_2)_r-(ПЭГ)_s-(CH_2)_w-CO$, $NH-CO-(CH_2)_r-(ПЭГ)_s-X-(CH_2)_w-CO$, где X может отсутствовать, является NH или O, q является целым числом 2-8, r может отсутствовать или является целым числом 1-4, s может отсутствовать или является целым числом 1-6, и w может отсутствовать или является целым числом 1-2,

S2 является разделителем и может отсутствовать или является



СГ является соединительной группой, полученной после конъюгирования с цистеинтиол- или лизинаминогруппами антител, которая может отсутствовать или является одной из следующих групп:

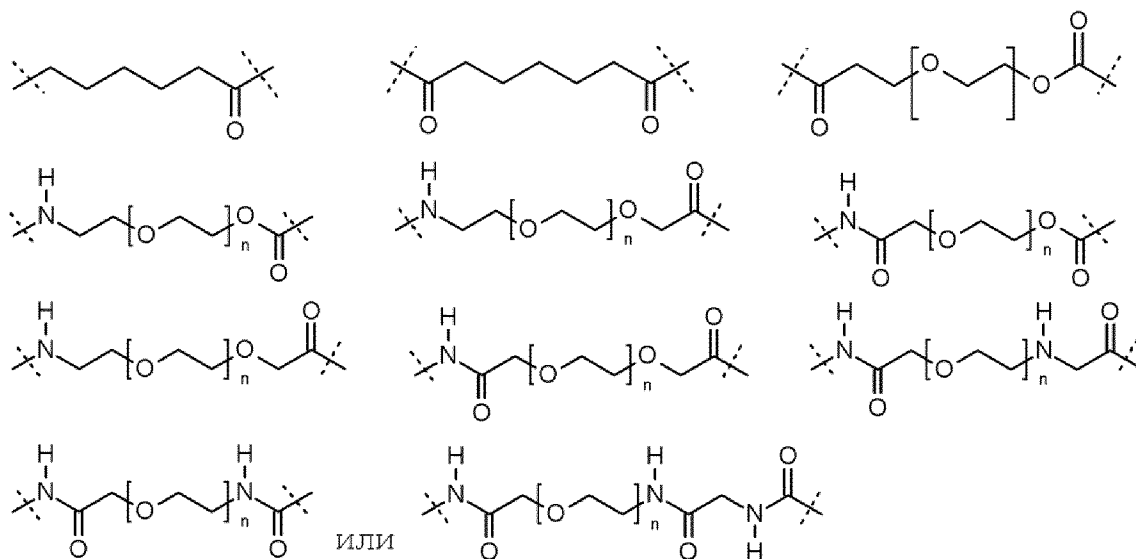


где y является целым числом от 0 до 8

Ab является антителом или его антиген-связывающим фрагментом, и

m , n , o и p являются целыми числами 0 или 1.

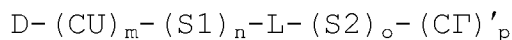
Линкер (L) предпочтительно выбирают из



где n является целым числом 2-5.

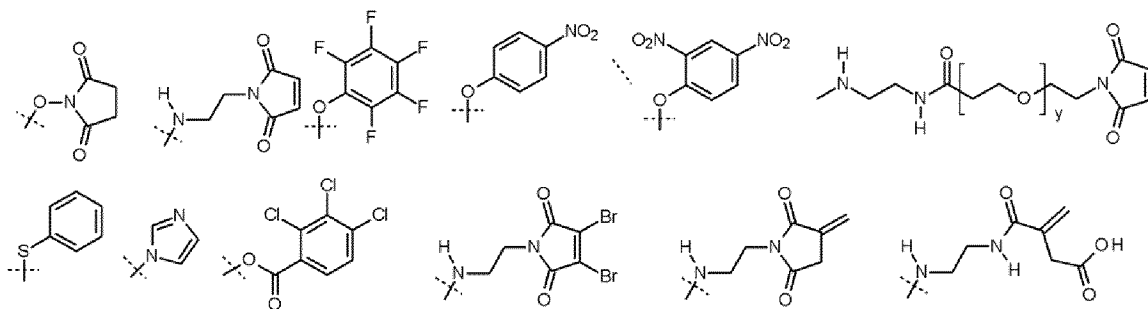
В частности, полезной нагрузкой является токсин (ингибитор

ГДАЦ), соединенный с подходящим линкером/разделителем, который заканчивается группами (т.е. малеимидом, сложными NHS эфирами), подходящими для конъюгирования с антителами, и содержит следующую часть формулы I:

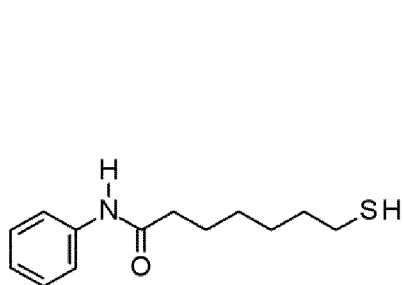


Формула II

В данном изобретении, $(CG)'$ в полезных нагрузках формулы II может быть NHS (N-гидроксисукцинимид) или активированное ацильное производное (включая пентафторфениловый эфир, п-нитро и 2,4-динитрофеноловый эфир, тиофеноловый эфир, ацилимидазол, изобутилкарбонат, трихлорбензойный ангидрид) или малеимид- или {аминокарбонил}-3-бутеновая кислота следующих формул:

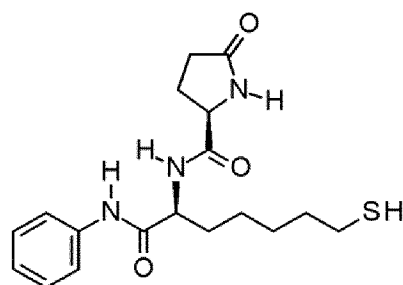


В частности, данное изобретение относится к КАЛС, имеющим в качестве боезаряда ингибитор ГДАЦ, выбирают из тиольных ингибиторов гистондеацетилазы, таких как ST7464AA1 и ST7660AA1 (тиольный аналог вориностата), имеющих следующие формулы:



ST7660AA1

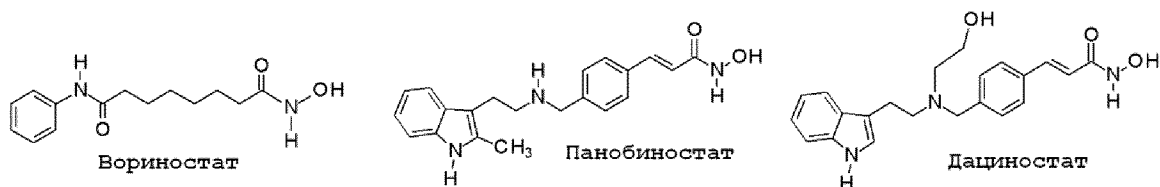
Тиольный аналог SAHA
(Вориностата)



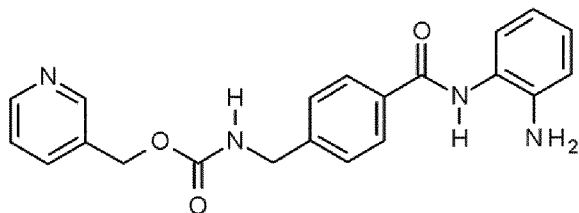
ST7464AA1

Тиол (активное лекарственное
средство) соответствующего тиацетила
ST7612AA1 (пролекарство)

или из ингибиторов гистондеацетилазы на основе гидроксаминной кислоты (ГДАЦ), таких как вориностат (SAHA), панобиностат (LBH589) или дациностат (LAQ824), имеющих следующие формулы:

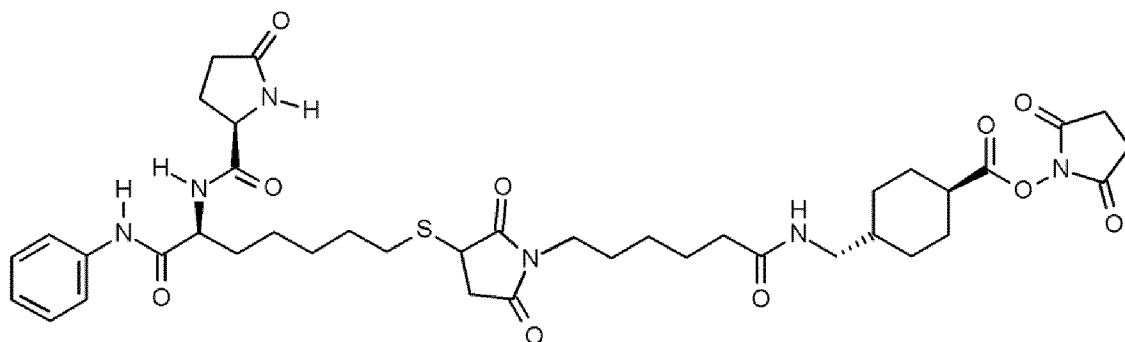


или из бензамидных ингибиторов гистондеацетилазы (ГДАЦ), таких как энтиноста́т (MS275), имеющих следующую формулу:

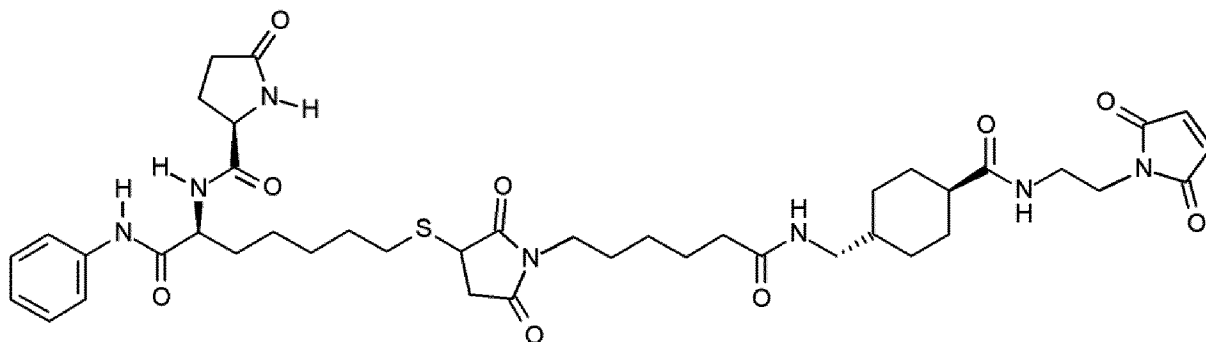


Энтиноста́т

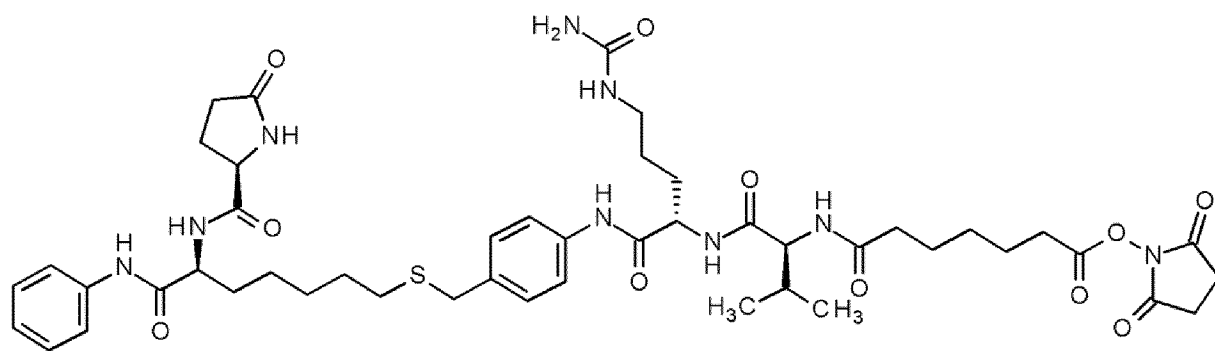
Ингибитором гистондеацетилазы и полезной нагрузкой, содержащей $D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)-(CF)'_p-$ (формула II), может быть соединение, выбранное из:



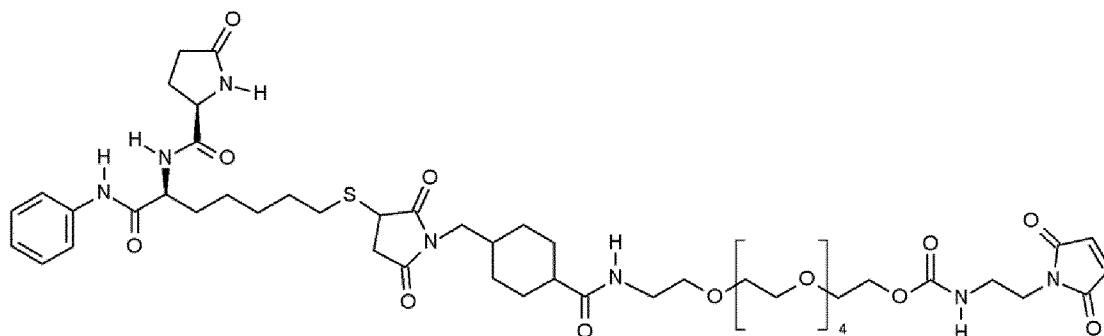
ST8128AA1 (1)



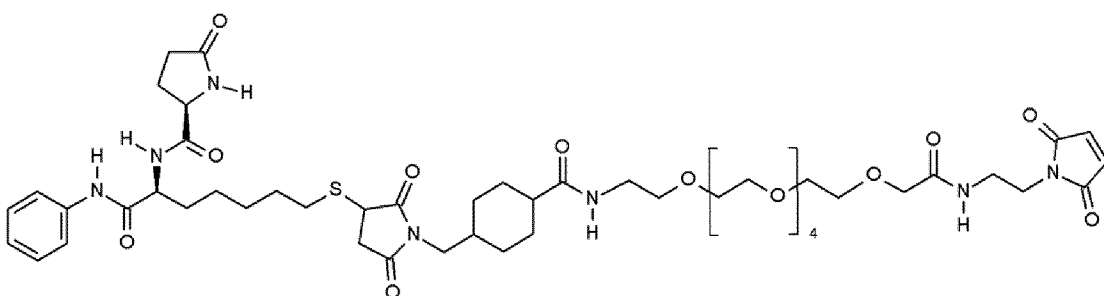
ST8152AA1 (2)



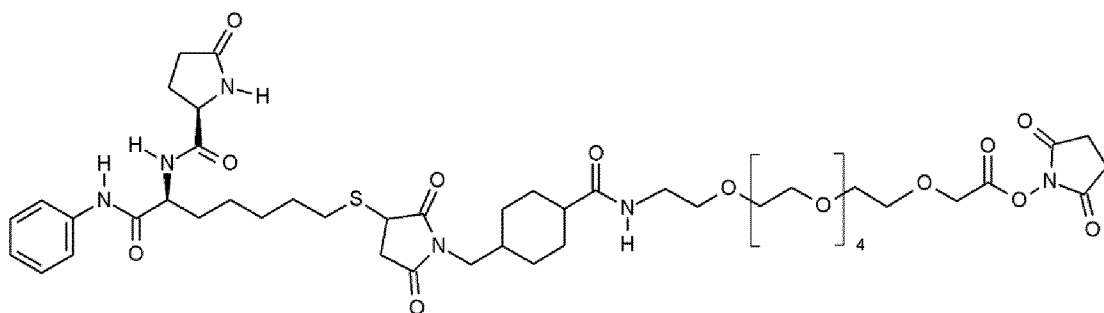
ST8132AA1 (3)



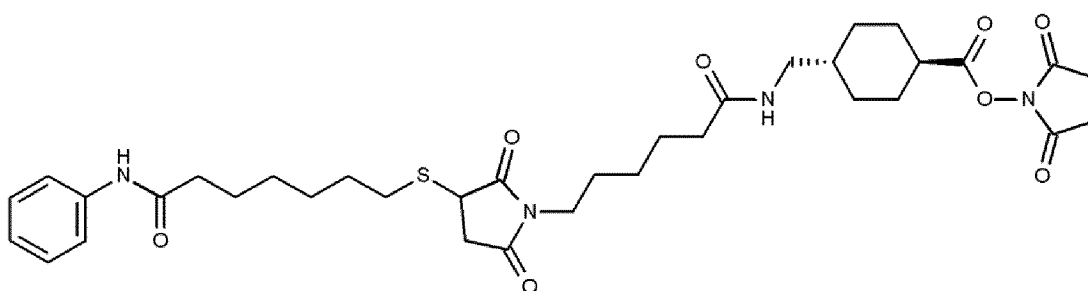
ST8190AA1 (4)



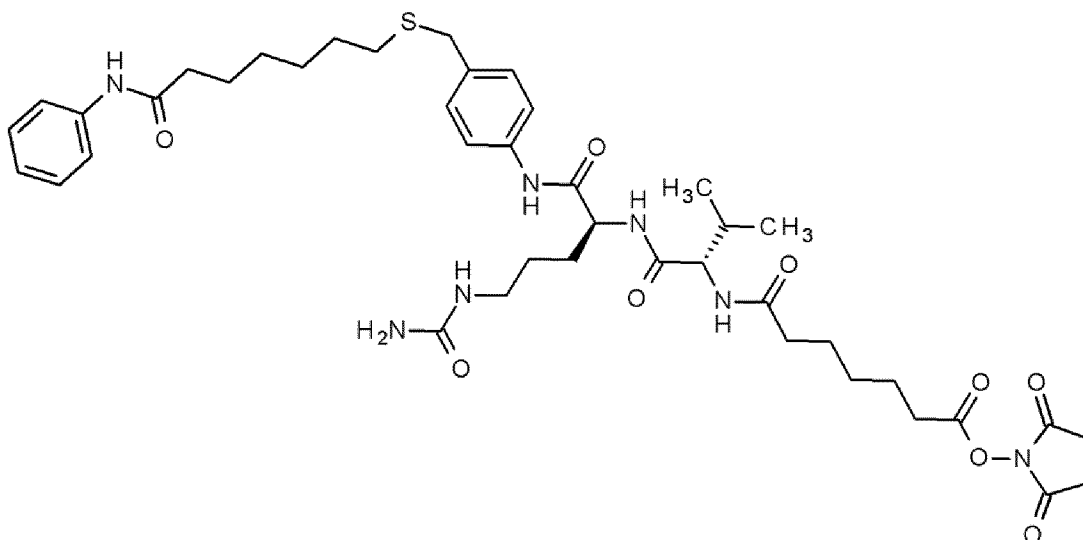
ST8189AA1 (5)



ST8191AA1 (6)

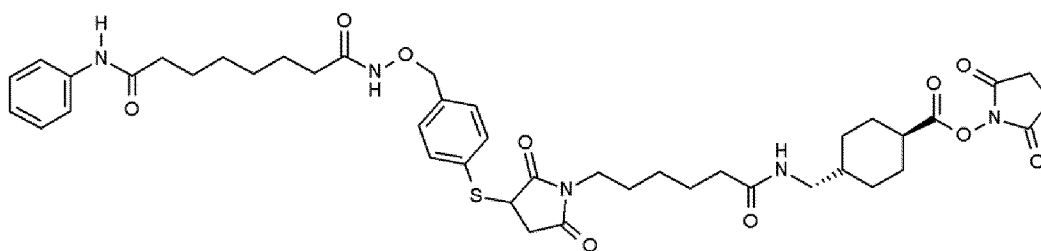


ST8197AA1 (7)

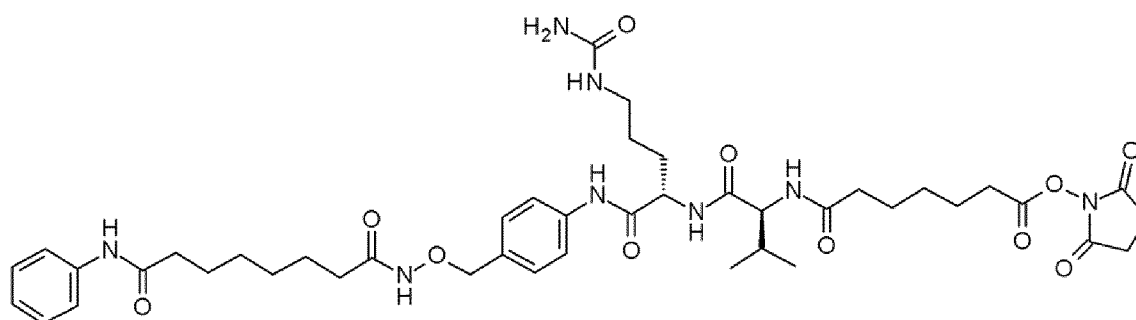


ST8235AA1 (8)

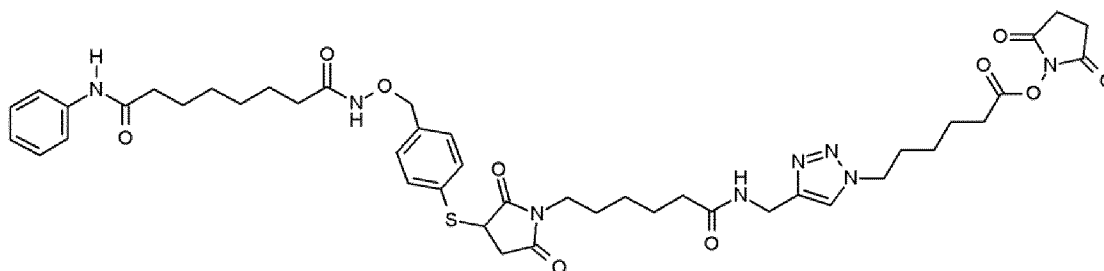
В другом варианте, изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство, где ингибитор гистондеацетилазы и полезную нагрузку, содержащую структуру $D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)-(CG)'_p$, выбирают из:



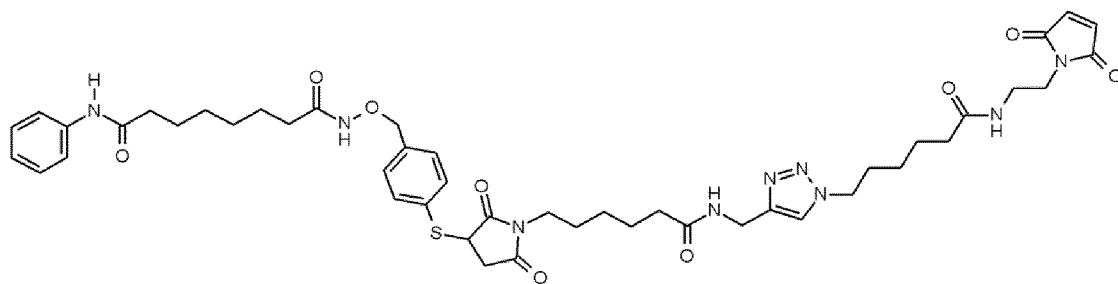
ST8217AA1 (9)



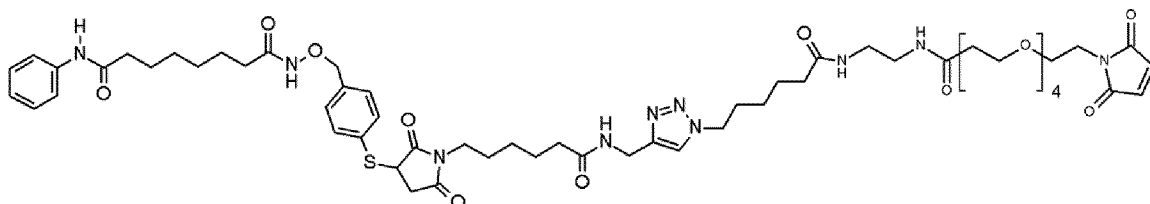
ST8201AA1 (10)



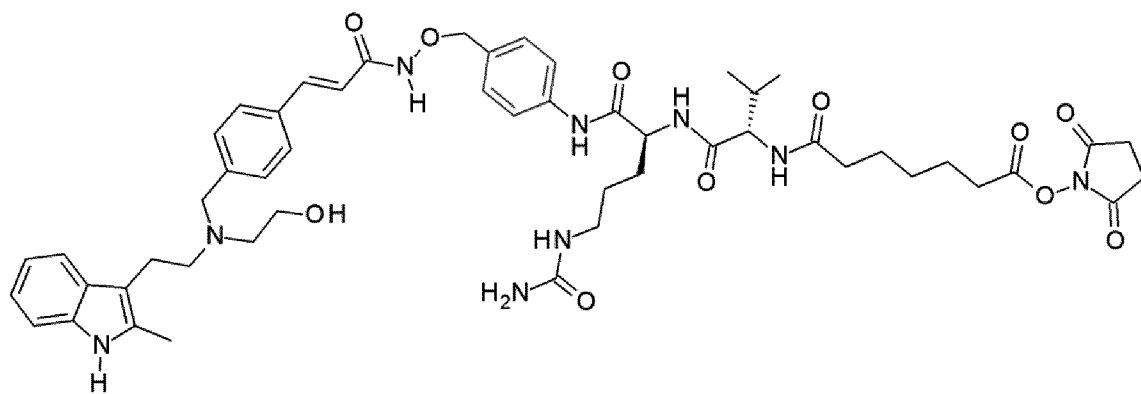
ST8215AA1 (11)



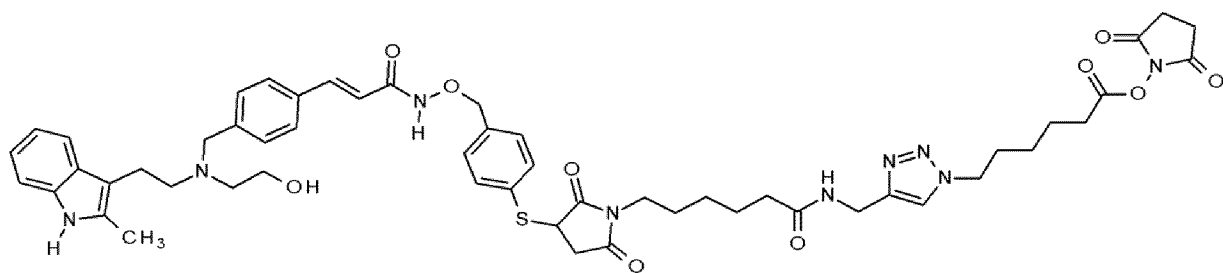
ST8216AA1 (12)



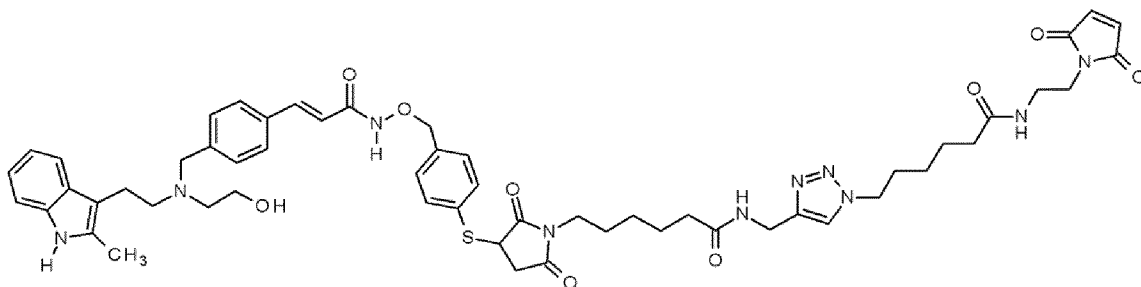
ST8236AA1 (13)



ST8232AA1 (14)



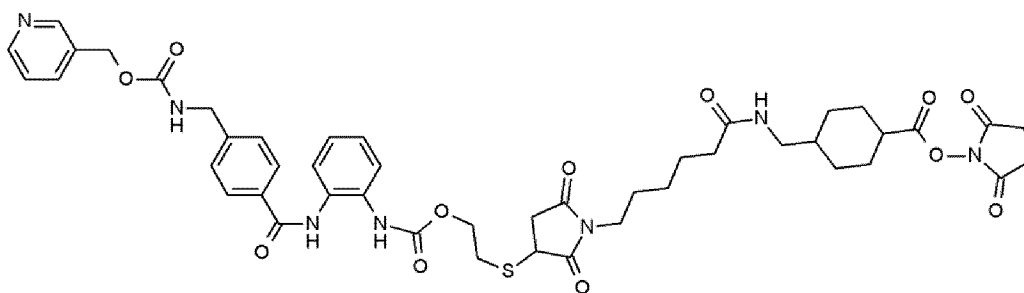
ST8233AA1 (15)



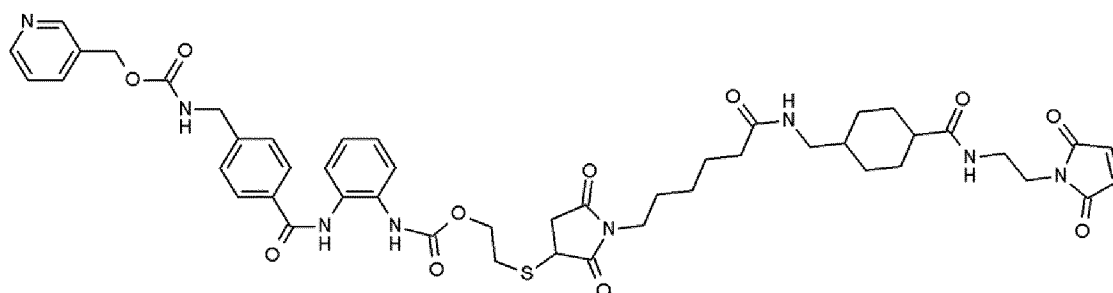
ST8234AA1 (16)

CC1=C(C2=CC=CC=C2N1)CCN(CCC)C(=O)OCCSC3C(=O)NC(=O)N3CCCCC(=O)NCC(=O)OCCCCC(=O)NCC4CCCCC4C(=O)ON5C(=O)CC5C=CC6=CC=CC=C6C(=O)NO[illegible]

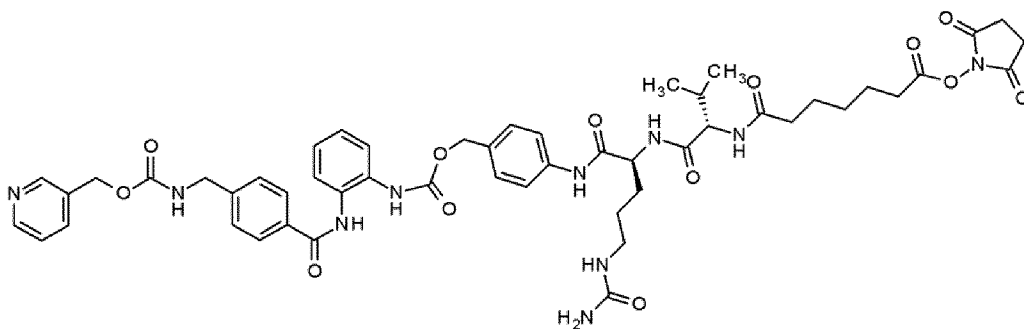
В другом варианте, изобретение относится к конъюгатам полезная нагрузка-лекарственное средство, где конъюгат полезная нагрузка-лекарственное средство выбирают из:



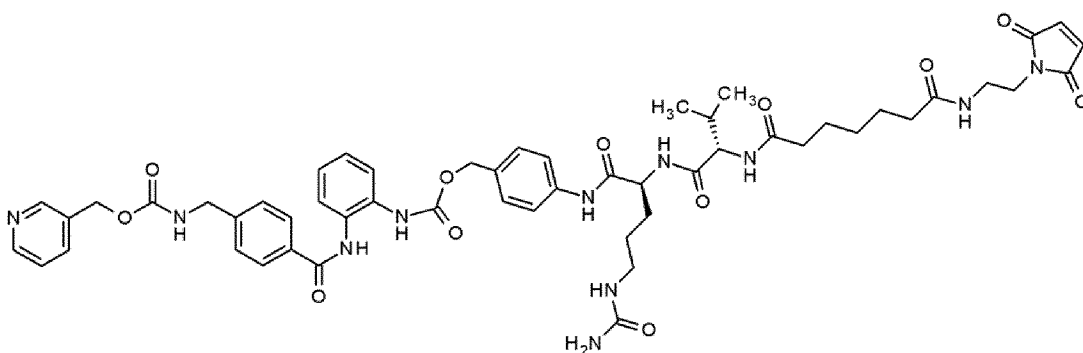
ST8225AA1 (20)



ST8226AA1 (21)



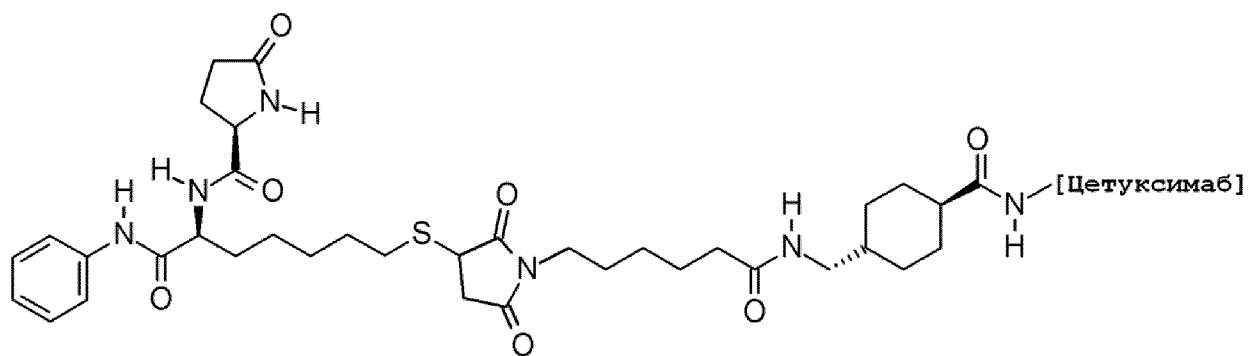
ST8227AA1 (22)



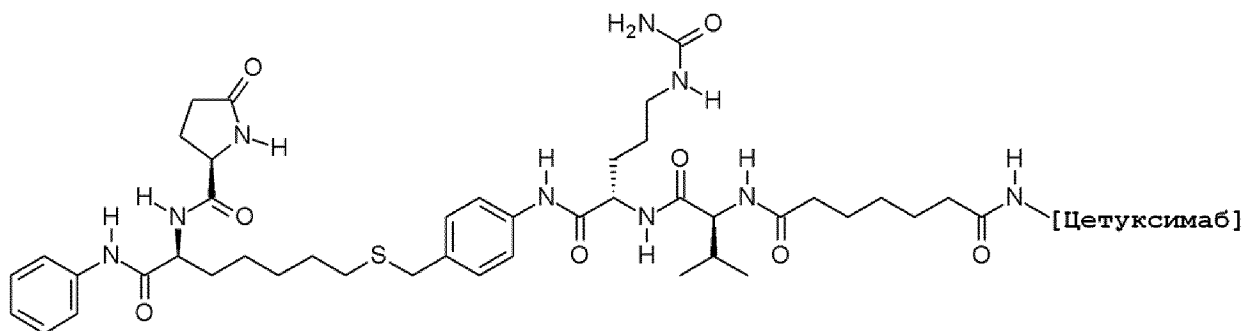
ST8228AA1 (23)

В другом варианте изобретения, конъюгат антитело-лекарственное средство (КАЛС) получают из соединений **1-23**.

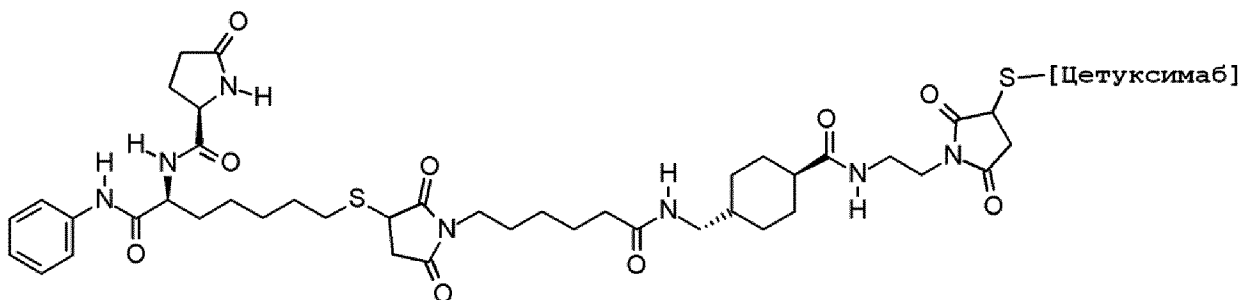
В другом варианте, КАЛС выбирают из соединений, представленных формулами **24- 37**:



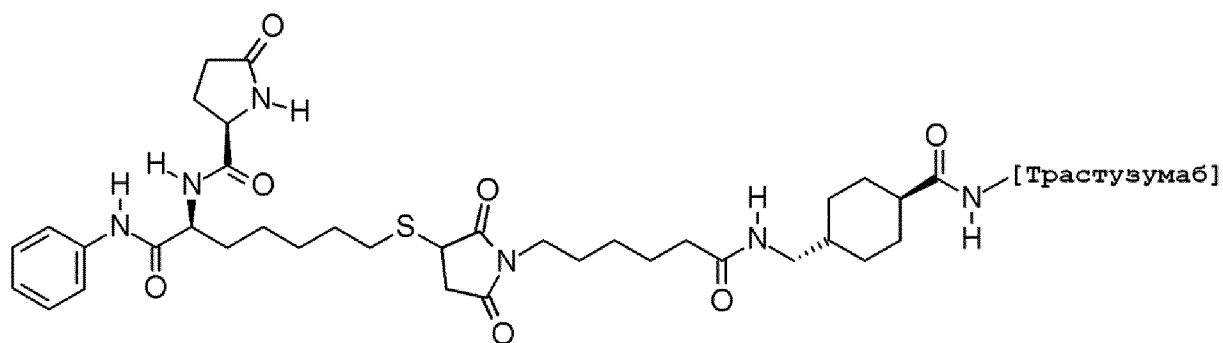
ST8154AA1 (24)



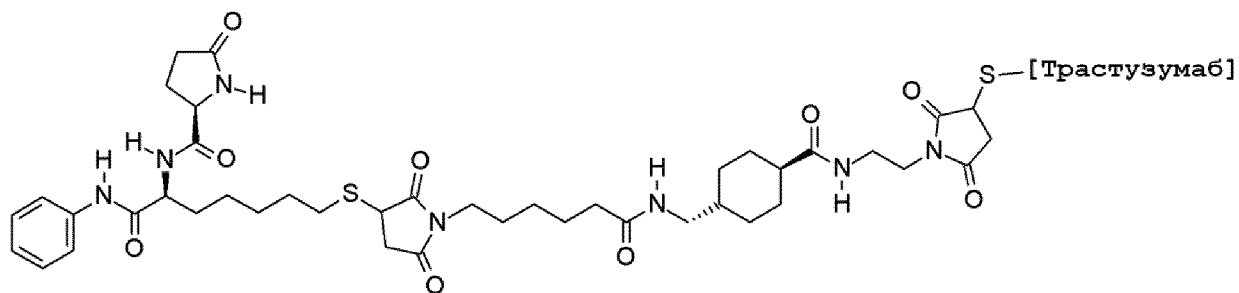
ST8155AA1 (25)



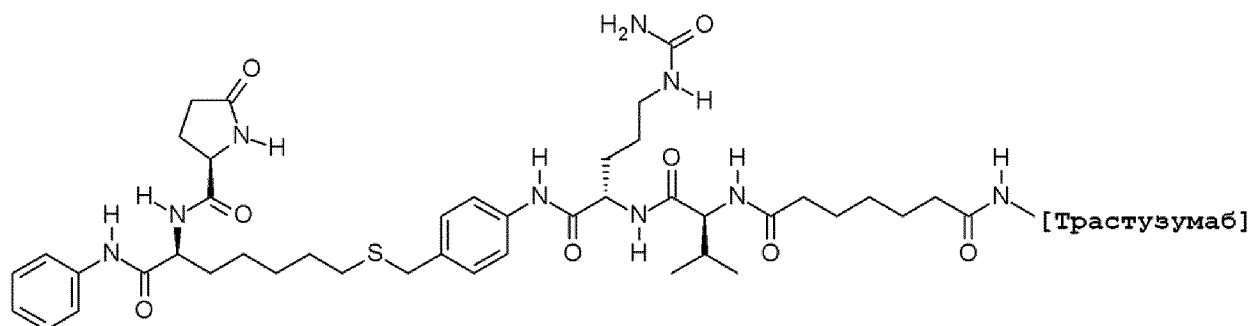
ST8177AA1 (26)



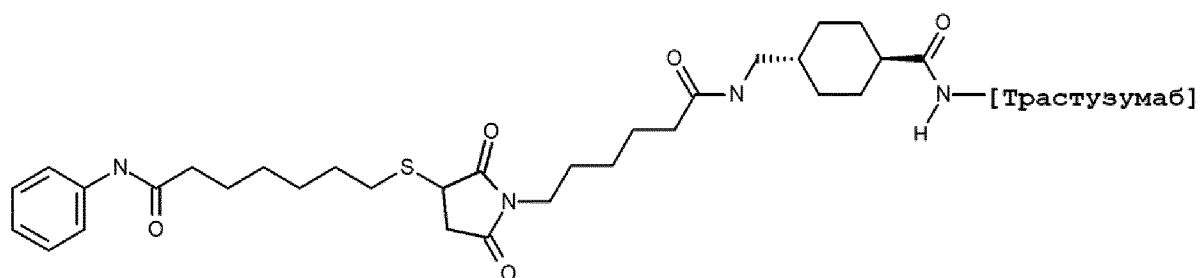
ST8178AA1 (27)



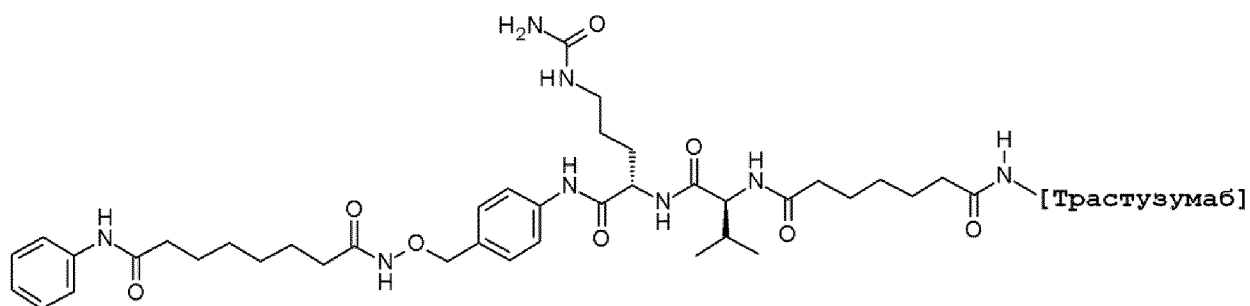
ST8176AA1 (28)



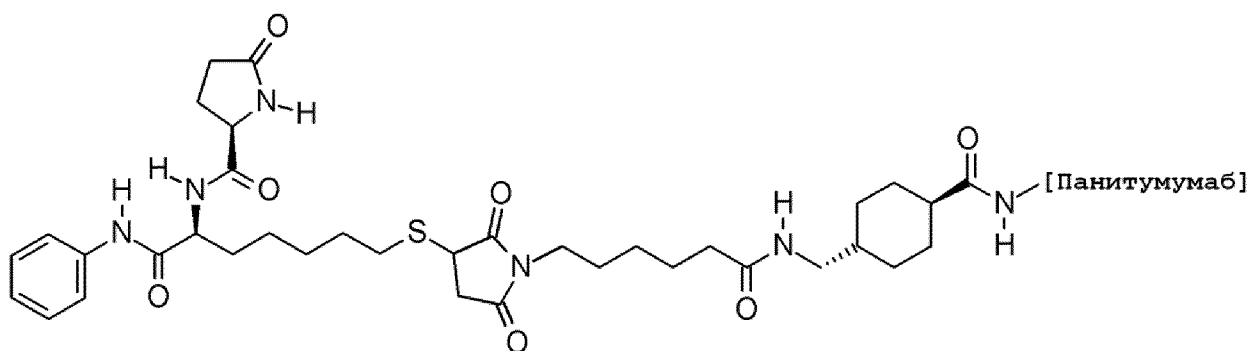
ST8179AA1 (29)



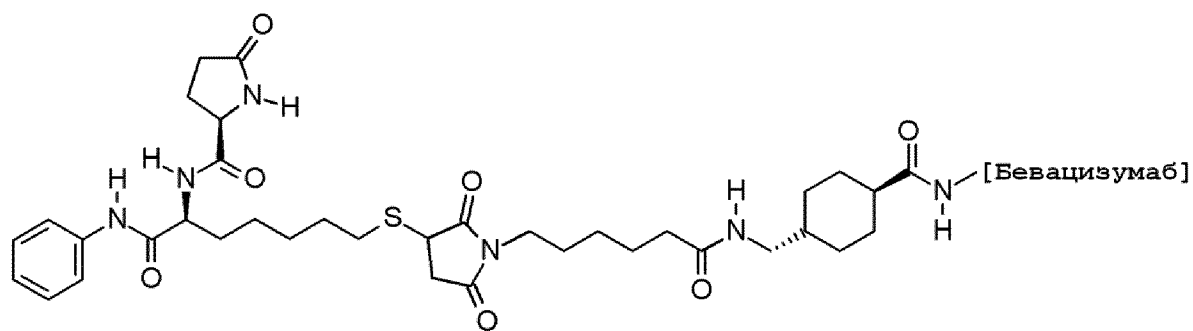
ST8205AA1 (30)



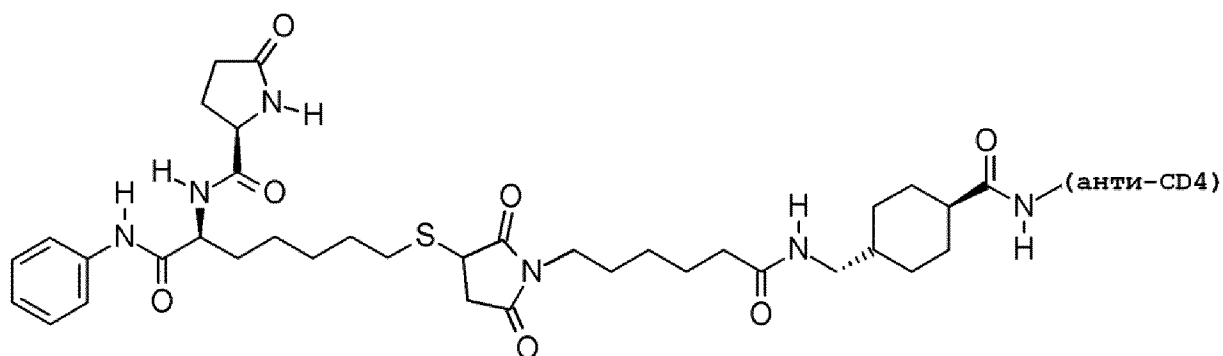
ST8202AA1 (31)



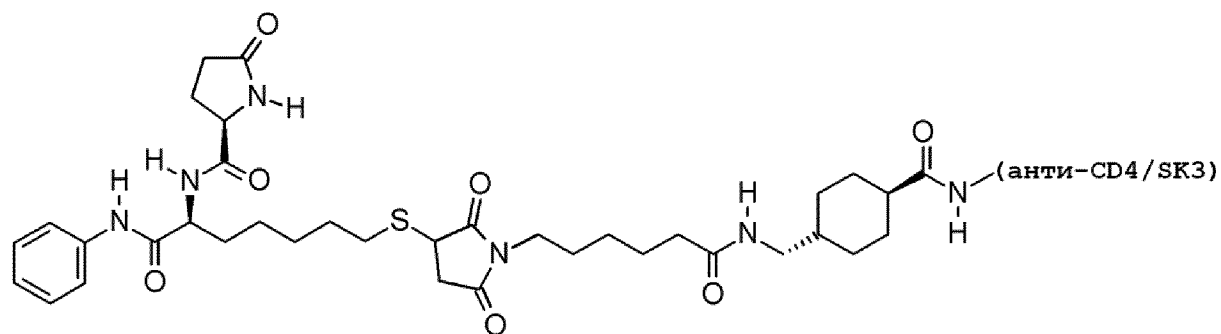
ST8193AA1 (32)



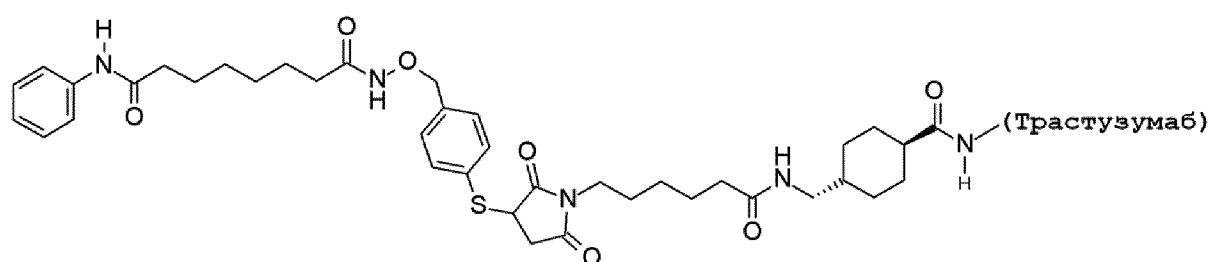
ST8194AA1 (33)



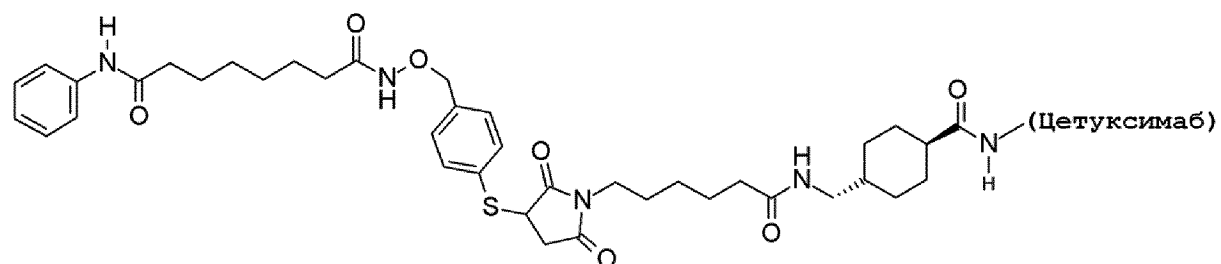
ST8212AA1 (34)



ST8213AA1 (35)



ST8218AA1 (36)



ST8219AA1 (37)

Особенно предпочтительными являются КАЛС формул 24-29.

Другие варианты данного изобретения включают другие Further КАЛС, где mAb может быть выбран из указанных в данном изобретении.

В данном изобретении также представлена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество производного формулы I с фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

Фармацевтическая композиция может быть для энтерального или парентерального введения, где энтеральное введение включает пероральный, аэрозольный, ректальный или буккальный путь, и парентеральное введение включает подкожный, внутримышечный или внутривенный и интрадермальный путь.

В данном изобретении также представлена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество производного формулы I в сочетании с другими известными противораковыми лечениями, такими как радиационная терапия или химиотерапевтический режим, в сочетании с цитостатическим или цитотоксическим агентами, антибиотиками, алкилирующими агентами, антиметаболитами, гормональными агентами, интерферонами, ингибиторами циклооксигеназы (например, ингибиторами COX-2), ингибиторами металлопротеиназы, ингибиторами теломеразы, ингибиторами тирозинкиназы, агентами против рецептора фактора роста, анти-HER2 агентами, анти-EGFR агентами, противоангиогенезными агентами (например, ингибиторами ангиогенеза), ингибиторами фарнезилтрансферазы, ингибиторами пути трансдукции сигнала ras-raf, ингибиторами клеточного цикла, другими ингибиторами cdks, агентами связывания тубулина, ингибиторами топоизомеразы I, ингибиторами топоизомеразы II и подобными.

Дополнительно, в изобретении представлен продукт, содержащий производное формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль, как определено выше, и один или более химиотерапевтических агентов, в виде объединенного препарата для одновременного, отдельного или последовательного применения в противораковой терапии.

В еще одном аспекте, в изобретении представлено производное формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, как определено выше, для применения в качестве лекарственного средства.

Более того, данное изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство или фармацевтическим композициям, содержащим конъюгаты антитело-лекарственное средство в соответствии с данным изобретением для применения в лечении рака или опухоли. Изобретение более конкретно относится к лечению рака или опухоли, экспрессирующих ErbB1, ErbB2 и/или ErbB3 рецепторы. Конкретные примеры рака, лечимого в соответствии с данным изобретением, включают карциномы, включая карциному мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, почек, печени, легкого, включая мелкоклеточный рак легкого, пищевода, желчного пузыря, яичников, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы, простаты и кожи, включая плоскоклеточную карциному; гемопоэтические опухоли лимфатических клеток, включая лейкоз, острый лимфатический лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, ходжкинскую лимфому, неходжкинскую лимфому, лимфому волосистых клеток и лимфому Буркитта; гемопоэтические опухоли миелогенных клеток, включая острый и хронический миелогенный лейкоз, миелодиспластический синдром и промиелоцитарный лейкоз; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, нейробластому, глиому и шванному; и другие опухоли, включая меланому, семиному, тератоканциному, остеосаркому, пигментарную ксеродермию, кератоксантому, фолликулярный рак щитовидной железы, саркому Капоши и мезотелиому. Кроме того, реактивация ВИЧ, вызванная КАЛС на основе иГДАЦ, может быть потенциально полезной для новых терапий, предназначенных для уничтожения вирусных резервуаров (*Badia 2015 Antiviral Res 123: 62-9*). В связи с этим, описанные выше конъюгаты антитело-лекарственное средство могут применяться в качестве адъювантного терапевтического средства в лечении ВИЧ.

Более того, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей указанные конъюгаты антитело-лекарственное средство, а также к указанным конъюгатам антитело-лекарственное средство или указанной фармацевтической композиции для применения в лечении рака или опухоли, экспрессирующих рецептор, выбранный из ErbB1, ErbB2 или ErbB3.

Выгодные эффекты

Конъюгаты антитело-лекарственное средство в соответствии с данным изобретением является более эффективным, чем отдельные антитела и цитотоксический агент, даваемые в той же концентрации, тем же способом и по той же схеме. Более того, было неожиданным, что цитотоксический агент, такой как ингибитор ГДАЦ, конъюгированный с антителами, в субоптимальных дозах, является очень эффективным, не зависящим от линкеров или типа конъюгирования (лизин или цистеин). Следовательно, такие КАЛС на основе ингибиторов ГДАЦ позволяют получить противоопухолевое действие при более низких дозах, чем соответствующие антитела, что дает незначительную токсичность.

Краткое описание чертежей

На **фигуре 1** показан масс спектр MALDI Цетуксимаба (верх) и его конъюгированных форм ST8154AA1 **(24)** с полезной нагрузкой-NHS ST8128AA1 **(1)** (низ). ОЛА, рассчитанный из разности масс, составляет 8,9.

На **фигуре 2** показан масс спектр MALDI Трастузумаба (верх) и его конъюгированных форм ST8178AA1 **(27)** с полезной нагрузкой-NHS ST8128AA1 **(1)** (низ). ОЛА, рассчитанный из разности масс, составляет 6,9.

На **фигуре 3** показано связывание (анализ FACS) природного Цетуксимаба и полученных из Цетуксимаба КАЛС, ST8154AA1 **(24)** и ST8177AA1 **(26) (А)** или ST8219AA1 **(37) (В)**, с различными колониями опухолевых клеток. Связывание антитела, определенное FITC-конъюгированным мышинным анти-человеческим Ig (BD). Серые пики относятся к клеткам без первичного антитела.

На **фигуре 4** показано связывание (анализ FACS) природного Трастузумаба и полученных из Трастузумаба КАЛС, ST8178AA1 **(27)** и ST8176AA1 **(28) (А)** или ST8205AA1 **(30)** и ST8218AA1 **(36) (В)**, с

различными колониями опухолевых клеток. Связывание антитела, определенное FITC-конъюгированным мышинным анти-человеческим Ig (BD). Серые пики относятся к клеткам без первичного антитела.

На **фигуре 5** показана иммунореактивность КАЛС, тестируемая антиген-специфическим ELISA. Активность измерена против А) химеры рекомбинантного человеческого EGF-R/Erb1 Fc или В) рекомбинантного человеческого белка ErbB2/HER2. Определение через анти-человеческое антитело, конъюгированное с легкой цепью К пероксидазы хрена (HRP) и добавлением субстрата. Оптическая плотность при 450 нм измеряют спектрофотометром ELISA. Результаты являются средними ($\pm$ CO) для двух независимых повторов.

На **фигуре 6** показано антипролиферативное действие ST8154AA1 **(24)** на NCI-H1975 клетки немелкоклеточного рака легких после 6 дней лечения. Значение IC50 $\pm$ CO для КАЛС составляет 250 $\pm$ 10 нМ, по сравнению с Цетуксимабом, который был не эффективен (IC50 >500 нМ).

На **фигуре 7** показано антипролиферативное действие ST8154AA1 **(24)** на Calu-3 клетки немелкоклеточного рака легких после 6 дней лечения. Значение IC50 $\pm$ CO для КАЛС составляет 450 $\pm$ 10 нМ, по сравнению с Цетуксимабом, который был не эффективен (IC50 >500 нМ).

На **фигуре 8** показано действие полученных из Цетуксимаба КАЛС ST8154AA1 **(24)** и ST8177AA1 **(26)** (А) или ST8219AA1 **(37)** (В), на уровень ацетилированного- α -тубулина в различных колониях опухолевых клеток. Клетки культивируют в течение 3 часов при 37°C с антителами (5 мкг/мл). После двух промывок клетки затем фиксируют и окрашивают мышинным анти-ацетилированный- α -тубулин IgG и затем FITC-конъюгированным козым анти-мышинным IgG. Краситель Draq5 окрашивает ядро и цитоплазму. Врезки показывают сигналы флуоресценции, специфически ассоциированные с ацетилированным- α -тубулином. Изображения флуоресценции получают одновременным многопараметрическим анализом (OMA) Operetta. Каждое изображение является типовым для, по крайней мере, 5 полей двойных лунок. Увеличение 60x. Данные взяты из одного репрезентативного эксперимента из двух.

На **фигуре 9a** и **фигуре 9b** показано действие полученных из Трастузумаба КАЛС ST8178AA1 **(27)** и ST8176AA1 **(28)** (A), или ST8202AA1 **(31)**, ST8205AA1 **(30)** и ST8218AA1 **(36)** (B), на уровень ацетилированного- α -тубулинв в различных колониях опухолевых клеток. Клетки культивируют в течение 3 часов при 37°C с антителами (5 мкг/мл). После двух промывок клетки затем фиксируют и окрашивают мышинным анти-ацетилированный- α -тубулин IgG и затем FITC-конъюгированным козьим анти-мышинным IgG. Краситель Draq5 окрашивает ядро и цитоплазму. Врезки показывают сигналы флуоресценции, специфически ассоциированные с ацетилированным- α -тубулином. Изображения флуоресценции получают одновременным многопараметрическим анализом (OMA) Operetta. Каждое изображение является типовым для, по крайней мере, 5 полей двойных лунок. Увеличение 60x. Данные взяты из одного репрезентативного эксперимента из двух.

На **фигуре 10** показано действие полученных из Цетуксимаба КАЛС ST8154AA1 **(24)** и ST8177AA1 **(26)** (A), или ST8219AA1 **(37)** (B), на уровень ацетилированного-гистона H3 в различных колониях опухолевых клеток. Клетки культивируют в течение 3 часов при 37°C с антителами (5 мкг/мл). После двух промывок клетки затем фиксируют и окрашивают кроличьим анти-ацетилированный-гистон H3 IgG и затем FITC-конъюгированным козьим анти-кроличьим IgG. Краситель Draq5 окрашивает ядро и цитоплазму. Врезки показывают сигналы флуоресценции, специфически ассоциированные с ацетилированным-гистон H3. Изображения флуоресценции получают одновременным многопараметрическим анализом (OMA) Operetta. Каждое изображение является типовым для, по крайней мере, 5 полей двойных лунок. Увеличение 60x. Данные взяты из одного репрезентативного эксперимента из двух.

На **фигуре 11** показано действие полученных из Трастузумаба КАЛС ST8178AA1 **(27)** и ST8176AA1 **(28)** (A), или ST8202AA1 **(31)**, ST8205AA1 **(30)** и ST8218AA1 **(36)** (B), на уровень ацетилированного-гистона H3 в различных колониях опухолевых клеток. Клетки культивируют в течение 3 часов при 37°C с антителами (5 мкг/мл). После двух промывок клетки затем фиксируют и окрашивают

кроличьим анти-ацетилованный-гистон H3 IgG и затем FITC-конъюгированным козьим анти-кроличьим IgG. Краситель Draq5 окрашивает ядро и цитоплазму. Врезки показывают сигналы флуоресценции, специфически ассоциированные с ацетилованным-гистон H3. Изображения флуоресценции получают одновременным многопараметрическим анализом (OMA) Operetta. Каждое изображение является типовым для, по крайней мере, 5 полей двойных лунок. Увеличение 60x. Данные взяты из одного репрезентативного эксперимента из двух.

На **фигуре 12** показано действие КАЛС на ацетилирование α -тубулина и гистона H4 в A549 (A) и SKBR3 (B) колониях клеток. Клетки культивируют 3 часа при 37°C с антителами (20 мкг/мл) и затем проводят вестерн-блоттинг для полных белковых лизатов. Типовые блоты показаны.

На **фигуре 13** показано противоопухолевое действие ST8155AA1 (25), ST8154AA1 (24) и ST7612AA1, данных внутрибрюшинно по схеме q4dx4, по сравнению с Цетуксимабом у мышей с пк NCI-H1975 опухолью. Опухолевые клетки (5×10^6) пк вводят в правый бок мыши. КАЛС и Цетуксимаб дают в дозе 50 мг/кг, а ST7612AA1 в дозе 120 мг/кг. Очаги опухоли оценивают цифровым циркулем (n=8 мышей/группу, среднее и СОС, $^{***}P < 0,001$ и $^{**}P < 0,01$ к только Цетуксимабу, тест Манна-Уитни).

На **фигуре 14** показано противоопухолевое действие КАЛС ST8154AA1 (24), по сравнению с Цетуксимабом, в опухолях, развившихся у мышей Nu/Nu после п.к. инъекции 5×10^6 клеток A549. Развитие повреждения и реакцию на лечение антителом отслеживают с помощью цифрового циркуля. Мышам вводят в.б. либо (24) и Цетуксимаб (4 дозы 50 мг/кг один раз в сутки каждые 4 дня), либо ФРФБ (n=10 мышей/группу, среднее и СОС, $^{\circ}P < 0,05$ к Цетуксимабу; $^{**}P < 0,01$ и $^{*}P < 0,05$ к носителю, тест Манна-Уитни).

На **фигуре 15** показано антиметастатическое действие ST8154AA1 (24) по сравнению с Цетуксимабом (Ctx) на искусственном метастатическом раке легких, возникающем при инъекции 5×10^6 A549-luc-C8 (A549luc) клеток в хвостовую вену иммунодефицитных SCID/beige мышей. Изображения биолуминесценции

опухоли (ИБЛ) записывают на Xenogen IVIS Imaging System 200, в различные моменты времени (+35, +49 и +56 дней после инъекции клеток), после в.б. инъекции люциферина (150 мкг/мышь). Мышей обрабатывают аэрозолем с ФРФБ или ST8154AA1 или Ctx (3,5 мл 100 мкг/мл раствора) q7dx4 (n=12 мышей/группу, среднее и СОС, °P<0,01 к Ctx; *P<0,05 и **P<0,01 к носителю).

На **фигуре 16** показано противоопухолевое действие ST8154AA1 **(24)** по сравнению с Цетуксимабом (Ctx) и ST7612AA1 против ортотопической опухоли поджелудочной железы. Клетки опухоли 1×10^6 вводят непосредственно в поджелудочную железу. Массу опухоли оценивают через 90 дней после инъекции опухоли. Мышей лечат внутрибрюшинно **(24)** или Ctx (4 дозы 40 мг/кг один раз каждые 4 дня), ФРФБ и ST7612AA1 (200 мг/кг, q4dx4) (n=10 мышей/группу); среднее и СОС, °P<0,05 к Ctx, *P<0,05 и **P<0,01 к носителю.

На **фигуре 17** показано противоопухолевое действие ST8154AA1 **(24)** по сравнению с Цетуксимабом, доставленным внутрибрюшинно (q4dx5) против полученного у пациента ксенотрансплантата опухоли (ППК) рака поджелудочной железы, имплантированного пк голым мышам. Мыши NOD SCID получают пк клетки опухоли (51000 клеток) от пациента PA5363. Лечение мышей с опухолью проводят КАЛС в дозе 40 мг/кг вб. Рост опухоли оценивают цифровым циркулем (n=10 мышей/группу). Среднее и СОС, °P<0,05 к Цетуксимабу, ***P<0,001 к носителю.

На **фигуре 18** показано противоопухолевое действие ST8178AA1 **(27)** по сравнению с Трастузумабом, доставляемым внутрибрюшинно по схеме q4dx4 против рака яичников SKOV-3. Опухоли выращивают у мышей Nu/Nu после п.к. введения 5×10^6 клеток яичников SKOV-3. Лечение проводят КАЛС и Трастузумабом в дозе 15 мг/кг, вб (n=11 мышей/группу; среднее и СОС, *P<0,05 к носителю, °P<0,05 к Трастузумабу, тест Манна-Уитни).

На **фигуре 19** показано противоопухолевое действие ST8176AA1 **(28)** по сравнению с Трастузумабом, доставляемым внутрибрюшинно по схеме q4dx4 против рака яичников SKOV-3. Опухоли выращивают у мышей Nu/Nu после п.к. введения 5×10^6 клеток яичников SKOV-3. Лечение проводят КАЛС и Трастузумабом в дозе 30 и 15 мг/кг, вб

(n=12 мышей/группу; среднее и СОС, $*P<0,05$ к носителю, $^{\circ}P<0,05$ к Трастузумабу, тест Манна-Уитни).

На **фигуре 20** показано противоопухолевое действие ST8176AA1 **(28)** по сравнению с Трастузумабом, доставляемым внутрибрюшинно по схеме q4dx4 против рака яичников SKOV-3. Опухоли выращивают у мышей Nu/Nu после п.к. введения 10×10^6 клеток яичников SKOV-3. Лечение проводят КАЛС и Трастузумабом в дозе 15 мг/кг, вб (n=9 мышей/группу). Кривую выживания получают анализом Каплана-Мейера. $*P<0,05$ и $**P<0,01$ к носителю, $^{\circ}P<0,05$ к Трастузумабу.

На **фигуре 21** показано противоопухолевое действие ST8176AA1 **(28)** по сравнению с Трастузумабом, доставляемым внутрибрюшинно по схеме q4dx4 против LS174-Т рака толстой кишки. Опухоли выращивают у мышей Nu/Nu после в.б. введения 10×10^6 клеток LS174Т рака толстой кишки. Лечение проводят КАЛС и Трастузумабом в дозе 15 мг/кг, вб (n=9 мышей/группу). Кривую выживания получают анализом Каплана-Мейера. Значения Р рассчитывают с применением двухстороннего логарифмического рангового критерия, $*P<0,05$ к носителю и $^{\circ}P<0,05$ к Трастузумабу.

На **фигуре 22** показано противоопухолевое действие ST8176AA1 **(28)** по сравнению с Трастузумабом, доставляемым внутрибрюшинно по схеме q4dx4 против LS174-Т рака толстой кишки. Опухоли выращивают у мышей Nu/Nu после п.к. введения 5×10^6 клеток LS174Т рака толстой кишки. Лечение проводят КАЛС и Трастузумабом в дозе 15 мг/кг, вб (n=10 мышей/группу; среднее и СОС, $*p<0,05$ к носителю, $^{\circ}P<0,05$ к Трастузумабу, тест Манна-Уитни).

На **фигуре 23** показано противоопухолевое действие ST8176AA1 **(28)** по сравнению с Трастузумабом, доставляемым внутрибрюшинно по схеме q4dx4 против ППК (полученного у пациента ксенотрансплантата) рака поджелудочной железы. Клетки опухоли поджелудочной железы человека (77×10^3) от пациента PA5363 пк вводят мышам NOD-SCID. Лечение проводят ST8176AA1 или Трастузумабом в дозе 15 мг/кг. (n=10 мышей/группу; среднее и СОС, $*P<0,05$ к носителю и $^{\circ}P<0,05$ к Трастузумабу, тест Манна-Уитни).

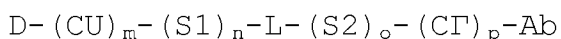
Подробное описание изобретения

Изобретение относится к новым КАЛС, полученным из противораковых антител, конъюгированных с полезными нагрузками на основе иГДАЦ. Показано, что такие КАЛС специфически связываются с опухолевыми рецепторами, чтобы быть поглощенными и доставленными в лизосомы. Эти свойства неожиданно коррелируют с *in vitro* цитотоксичностью и *in vivo* противоопухолевым действием несмотря на низкую активность ГДАЦ. Конъюгаты антитело-лекарственное средство в соответствии с данным изобретением особенно полезны в лечении опухолей или любых других заболеваний, где модулирование одной или более изоформ гистондеацетилазы и экспрессии рецепторов ErbB является эффективным для терапевтического вмешательства.

В данном изобретении описаны безопасные и эффективные КАЛС, содержащие безопасные иГДАЦ, конъюгированные через линкер с антителом, и в частности, иммуноглобулином, применяемым для лечения рака. Эпигенетический модулятор, ингибитор ГДАЦ позволяет создавать КАЛС с пониженными отрицательными и токсическими эффектами.

Предпочтительным вариантом данного изобретения является применение КАЛС на основе иГДАЦ для терапии рака, экспрессирующего рецепторы, такие как ErbB1, ErbB2 или ErbB3, включающего, например, рак легкого, молочной железы, толстой кишки, мозга, головы и шеи, эндометрия, почек, поджелудочной железы, желудка, пищевода, яичников и простаты и лейкоз.

Данное изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство формулы (I)

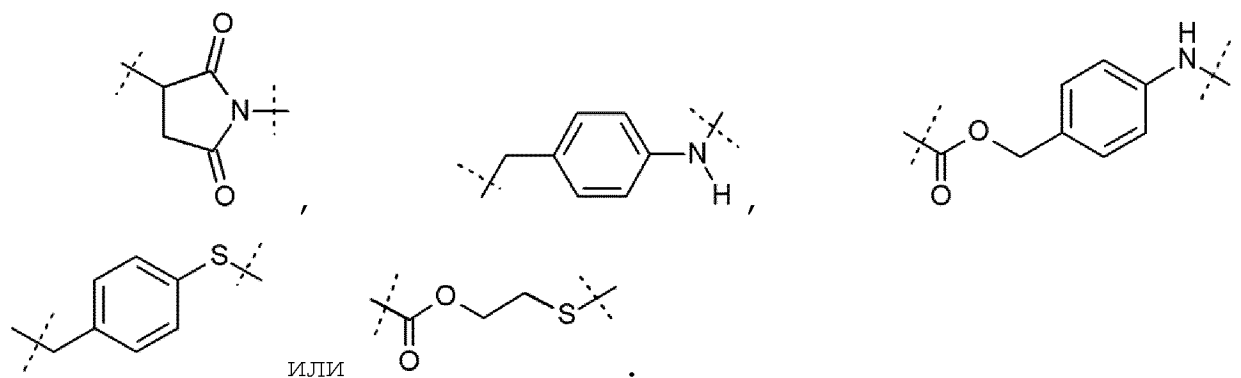


(формула I)

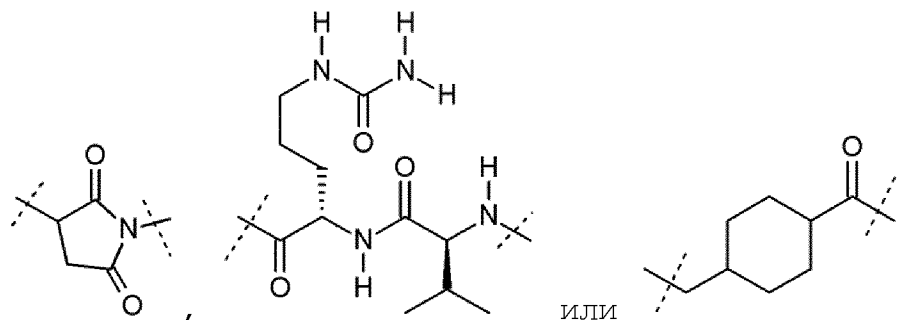
или его фармацевтически приемлемой соли, где

D является цитотоксическим лекарственным средством (также называемым боезаряд), является лекарственным ингибитором гистондеацетилазы, который содержит бензамидные, гидроксаматные или тиольные группы в качестве группы, связывающей цинк (ГСЦ),

CU является соединительной единицей, которая может отсутствовать или которую выбирают из

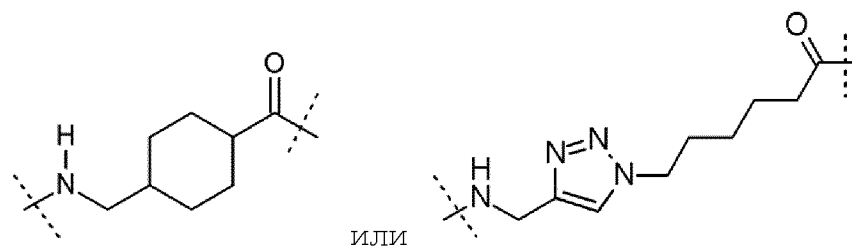


S1 является разделителем и может отсутствовать или является

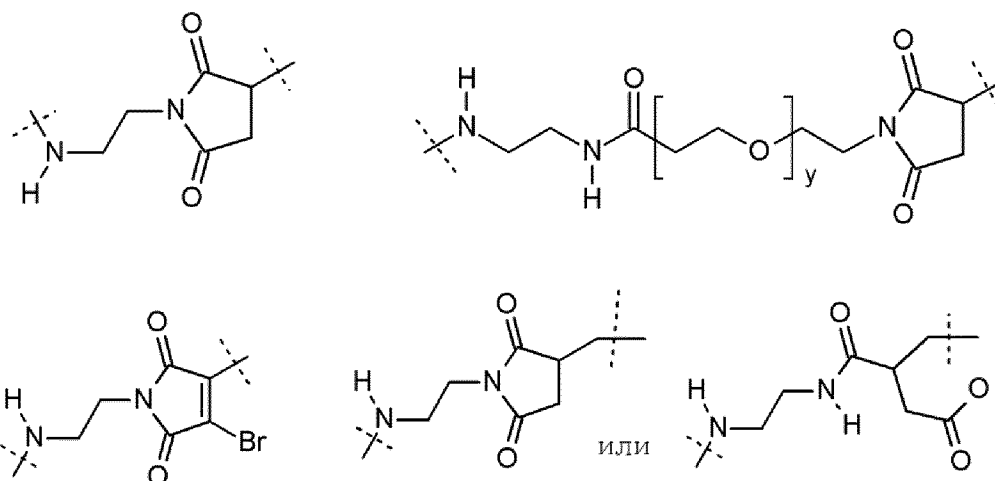


L является линкером, который выбирают из $(\text{CH}_2)_q\text{-CO}$, $\text{NH-}(\text{CH}_2)_r\text{-(ПЭГ)}_s\text{-}(\text{CH}_2)_w\text{-CO}$, $\text{NH-CO-}(\text{CH}_2)_r\text{-(ПЭГ)}_s\text{-X-}(\text{CH}_2)_w\text{-CO}$, где X может отсутствовать, является NH или O, q является целым числом 2-8, r может отсутствовать или является целым числом 1-4, s может отсутствовать или является целым числом 1-6, и w может отсутствовать или является целым числом 1-2,

S2 является разделителем и может отсутствовать или является



SG является соединительной группой, полученной после конъюгирования с цистеинтиол- или лизинаминогруппами антител, которая может отсутствовать или является одной из следующих групп:

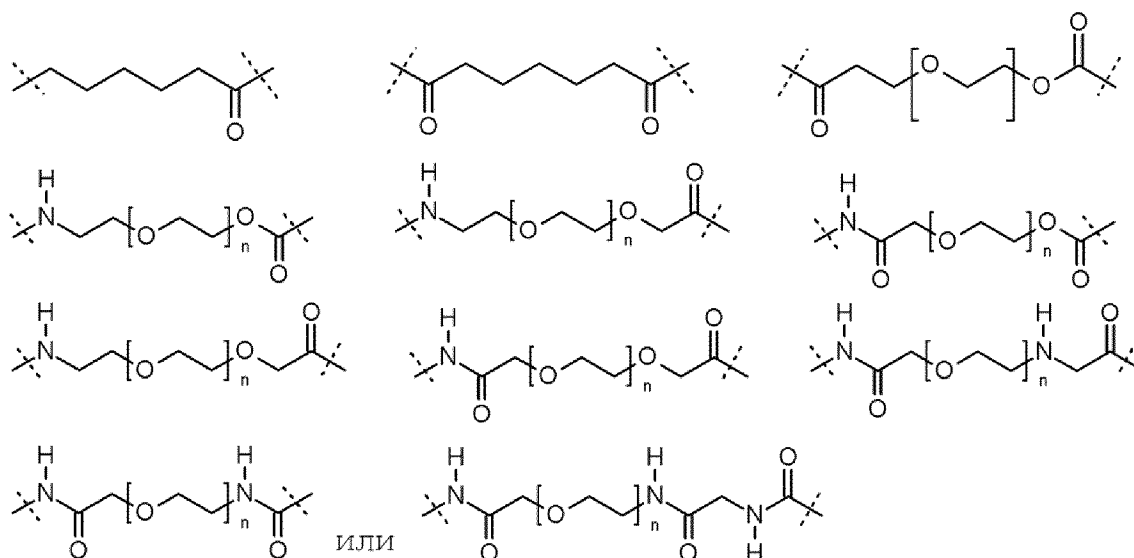


где y является целым числом от 0 до 8

Ab является антителом или его антиген-связывающим фрагментом, и

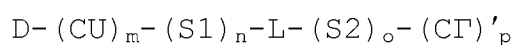
m , n , o и p являются целыми числами 0 или 1.

Линкер (L) предпочтительно выбирают из



где n является целым числом 2-5.

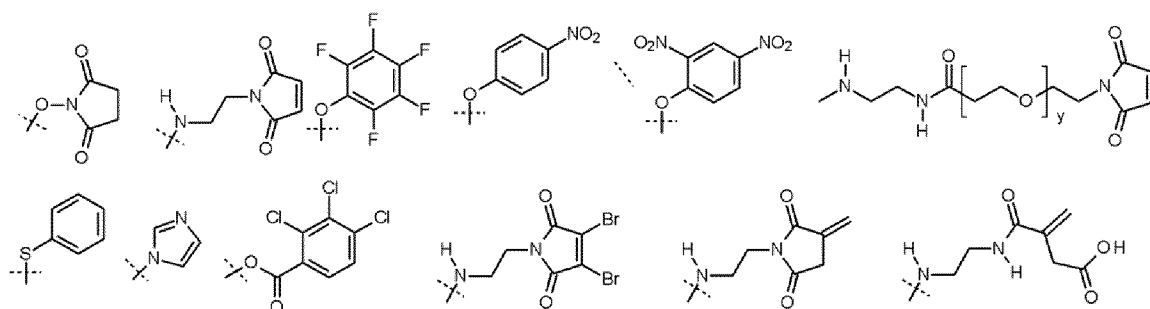
В частности, полезной нагрузкой является токсин (ингибитор ГДАЦ), соединенный с подходящим линкером/разделителем, который заканчивается группами (т.е. малеимидом, сложными NHS эфирами), подходящими для конъюгирования с антителами, и содержит следующую часть формулы I:



Формула II

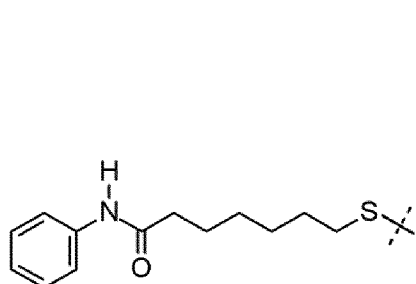
В данном изобретении, $(CG)'$ в полезных нагрузках формулы II может быть NHS (N-гидрохсисукцинимид) или активированное

ацильное производное (включая пентафторфениловый эфир, п-нитро и 2,4-динитрофеноловый эфир, тиофеноловый эфир, ацилимидазол, изобутилкарбонат, трихлорбензойный ангидрид) или малеимид- или {аминокарбонил}-3-бутеновая кислота следующих формул:

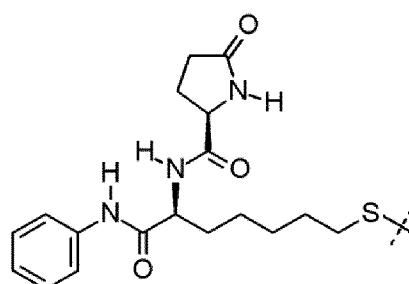


Ингибитором гистондеацетилазы (ГДАЦ), применяемым в полезной нагрузке $D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)_o-(CF)_p-$, может быть ингибитор гистондеацетилаз, известный в данной области техники, и относящийся к следующим категориям:

- ингибиторы гистондеацетилазы на основе тиола, такие как ST7464AA1 и ST7660AA1 (тиольный аналог вориностата), имеющие следующие формулы:



Тиольный аналог SAHA
(Вориностата)



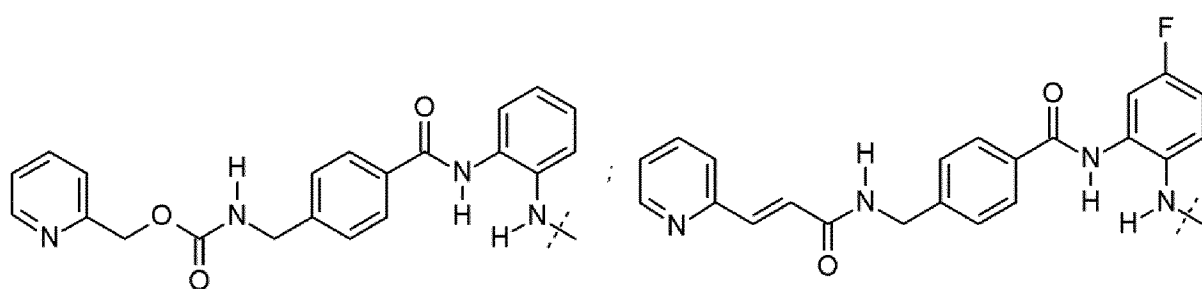
Тиол (активное лекарственное средство) соответствующего тиацетила ST7612AA1 (пролекарство)

- ингибиторы гистондеацетилазы (ГДАЦ) на основе гидроксаминной кислоты, такие как вориностат (SAHA), панобиностат (LBH589) или дацинонат (LAQ824), имеющие следующие формулы:

Ингибитор ГДАЦ	ADC на основе конъюгирования ГСЦ (группы, связывающей цинк)	Другие ADC на основе бокового конъюгирования
Вориностат (SAHA)		

Панобиностат (LBH589)		
Дациностат (LAQ824)		

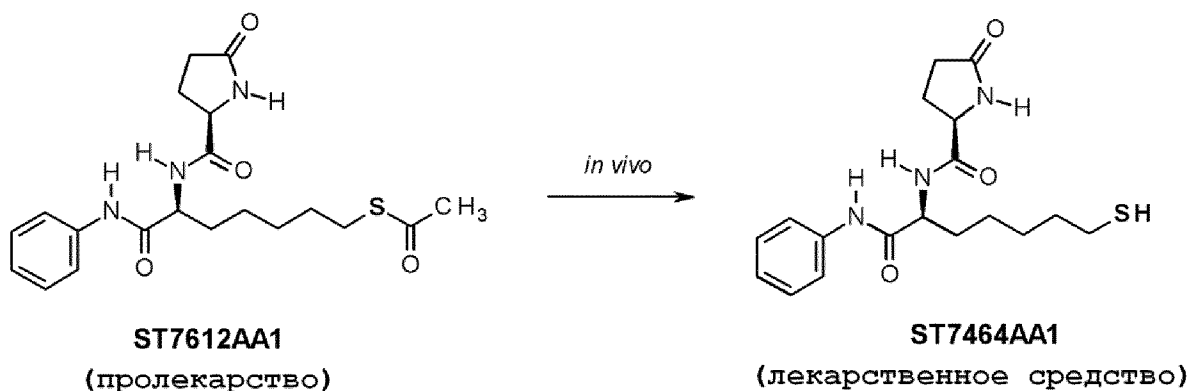
- ингибиторы гистондеацетилазы (ГДАЦ) на основе бензамида, такие как этиностат (MS275) и хидамид (CS055), имеющие следующую формулу:



Этиностат (SNDX-275 или MS-275)

Хидамид (CS055/HBI-8000)

В конкретном варианте, ингибитором гистондеацетилазы является ST7464AA1, лекарственное средство соответствующего пролекарства ST7612AA1, перорального ингибитора гистондеацетилазы на основе тиола.

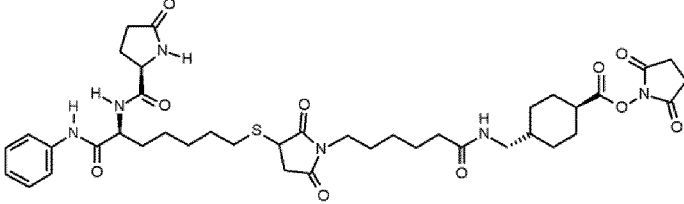


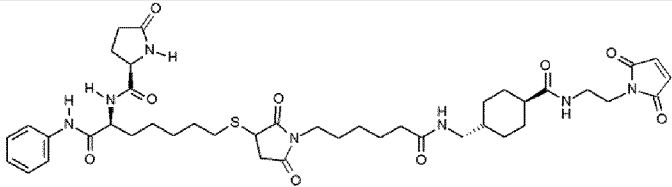
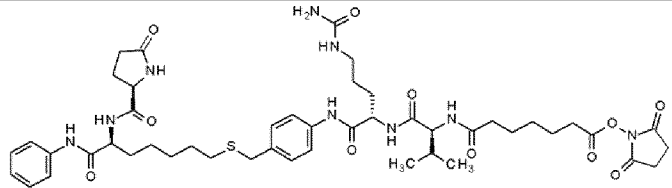
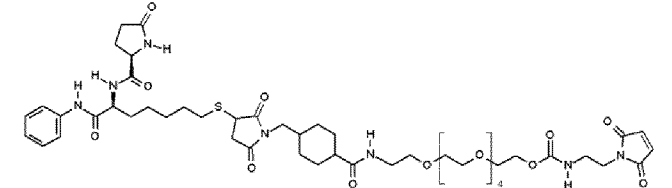
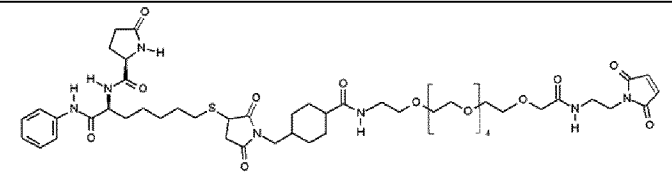
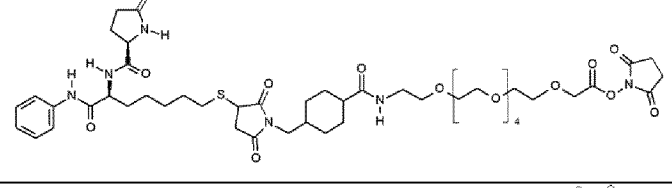
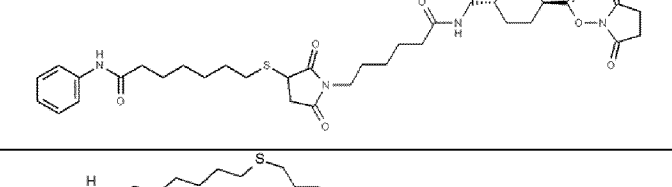
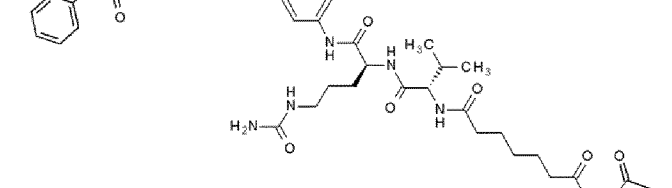
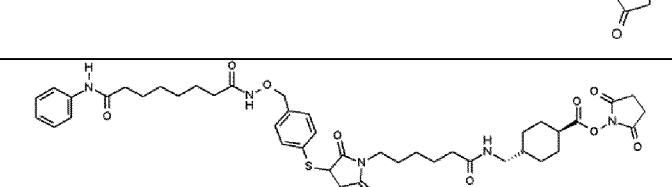
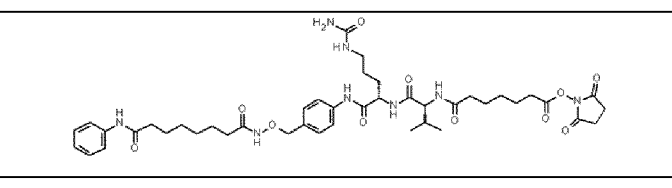
Полезная нагрузка содержит "уходящая группа", которая относится к группе, которая может быть замещена другой группой в реакции замещения. Такие уходящие группы хорошо известны в данной области техники, и их примеры включают, но не ограничены ими, галогенида (фторид, хлорид, бромид и йодид), азиды, сульфонаты (например, необязательно замещенный C1-C6

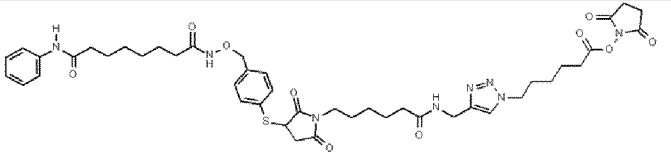
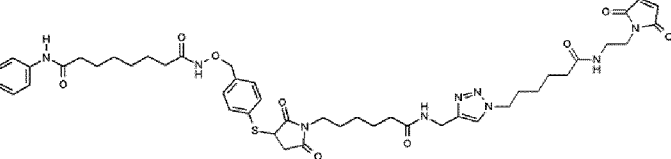
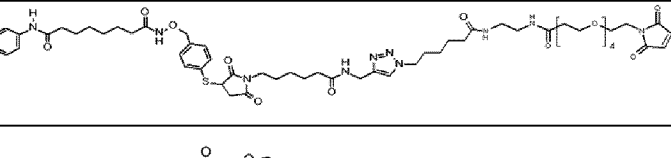
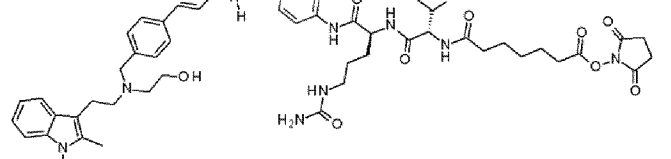
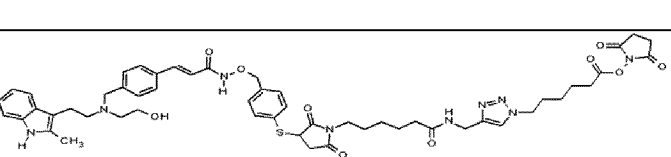
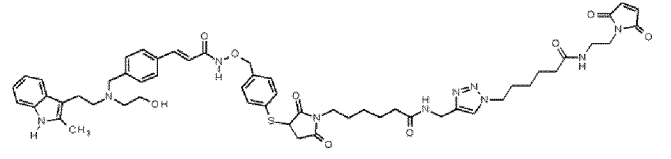
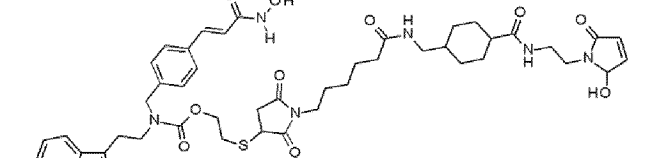
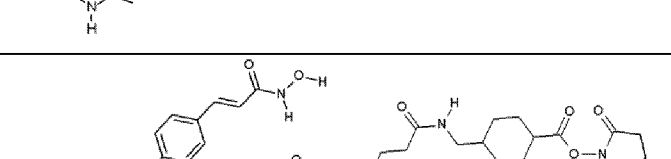
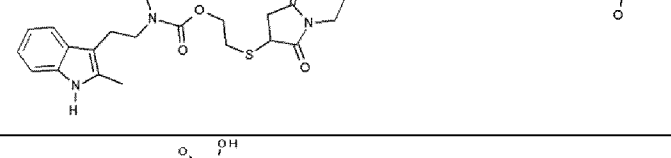
алкансульфонат, такой как этансульфонат или трифторметансульфонат, или необязательно замещенный C7-C12 алкилбензолсульфонат, такой как -толуолсульфонат), сукцинимид-N-оксид, п-нитрофеноксид, пентафторфеноксид, тетрафторфеноксид, карбоксилаты, аминокарбоксилаты (карбаматы) и алкоксикарбоксилаты (карбонаты). Для замещения на насыщенном атоме углерода, галогениды и сульфонаты являются предпочтительными уходящими группами. Для замещения на карбонильном атоме углерода, галогенид, сукцинимид-N-оксид, п-нитрофеноксид, пентафторфеноксид, тетрафторфеноксид, карбоксилат или алкоксикарбоксилат (карбонат), например, могут применяться в качестве уходящей группы. Термин "уходящая группа" также относится к группе, которая отщепляется в результате реакции отщепления, например, реакции электронного каскада или реакции пироксикликации. В этом случае, галогенид, сульфонат, азид, аминокарбоксилат (карбамат) или алкоксикарбоксилат (карбонат), например, могут применяться в качестве уходящей группы.

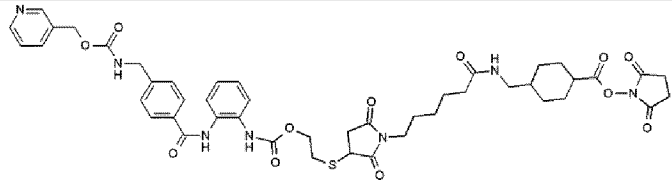
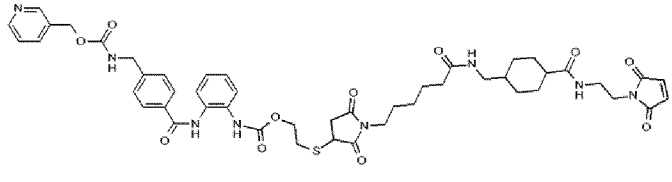
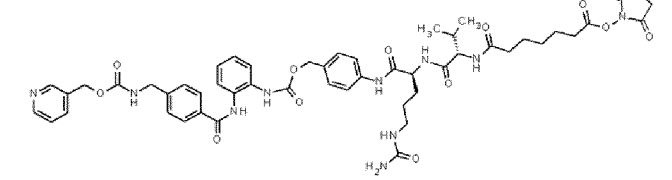
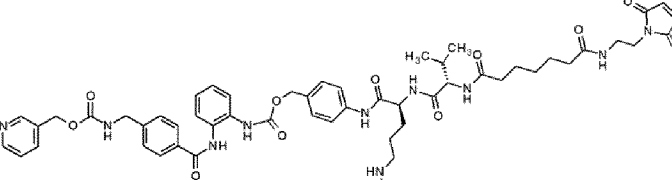
Специалисту в данной области техники известно, что превращение химической функциональной группы в другую может потребовать, чтобы один или более реакционноспособных центров в соединении, содержащем такую функциональную группу, обязательно был замещен для того, чтобы избежать нежелательных побочных реакций. Защита таких реакционноспособных центров и последующее снятие защиты в конце синтетических превращений может осуществляться следующими стандартными методами, описанными в литературе (см, например, Green, Theodora W. and Wuts, Peter G.M. - Protective Groups in Organic Synthesis, Third Edition, John Wiley & Sons Inc., New York (NY), 1999).

Таблица 1. Полезные нагрузки

Ид. №	Код ST	Химическая структура	М.М.	Класс
(1)	8128AA1		810,9	NHS

(2)	8152AA1		836,0	Малеим ид
(3)	8132AA1		964,1	NHS
(4)	8190AA1		1030,2	Малеим ид
(5)	8189AA1		1044,2	Малеим ид
(6)	8191AA1		889,0	NHS
(7)	8197AA1		684,8	Малеим ид
(8)	8235AA1		838,0	NHS
(9)	8217AA1		834,0	NHS
(10)	8201AA1		865,0	NHS

(11)	8215AA1		889,0	NHS
(12)	8216AA1		914,1	Малеим ид
(13)	8236AA1		1161,4	Малеим ид
(14)	8232AA1		994,1	Малеим ид
(15)	8233AA1		1018,2	NHS
(16)	8234AA1		1043,2	Малеим ид
(17)	8229AA1		928,1	Малеим ид
(18)	8230AA1		903,0	NHS
(19)	8231AA1		1019,2	Малеим ид

(20)	8225AA1		928,0	NHS
(21)	8226AA1		953,1	Малеим ид
(22)	8227AA1		1021,1	NHS
(23)	8228AA1		1046,1	Малеим ид

В конкретном предпочтительном варианте, ингибитором гистондеацетилазы является соединение ST7612AA1, являющееся пролекарством соединения ST7464AA1, как показано выше.

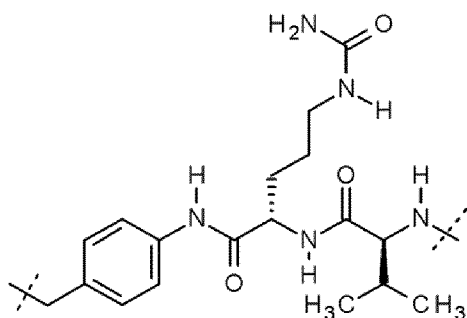
Другие примеры полезных нагрузок, применяемых в соответствии с данным изобретением, включают соединения из таблицы 1 выше. Полезные нагрузки со специфическим линкером, содержащим N-гидроксисукцинимидную (NHS) группу (т.е. ST8128AA1, ST8132AA1), способны к ковалентному связыванию, через амидную связь, с боковой цепью остатка Lys mAbs, который содержит аминоспецифический сложный эфир NHS, который может взаимодействовать с лизинами антитела. Полезные нагрузки со специфическим линкером, содержащим малеимидную группу (т.е. ST8152AA1, ST8189AA1), способны к ковалентному связыванию, через реакцию конъюгирования малеимид-тиол, с Cys на mAbs, после их восстановления.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (КАЛС) отличаются от полезных нагрузок для соединительной группы (СГ) где, в полезных нагрузках (СГ)' она является NHS или Малеимидом, а в конъюгатах антитела (СГ) отсутствует, в КАЛС на основе NHS полезной нагрузки, тогда как она является сукцинимидильной

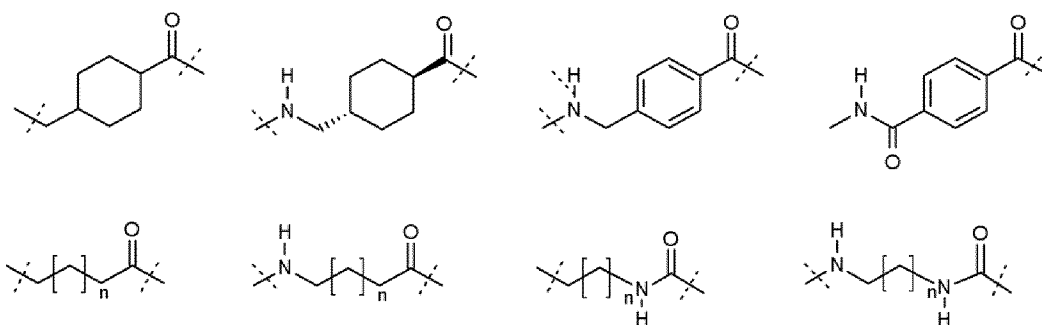
группой в КАЛС на основе малеимидной полезной нагрузки.

Более того, разделитель (S1), если присутствует, может быть отщепляемым или не отщепляемым. Типовой разделитель, отщепляемый протеазой, содержит группу, отличающуюся быстрым ферментным выделением лекарственного средства в целевой клетке, такую как валиновый-цитруллиновый (Val-Cit) дипептид.

Примером отщепляемого разделителя является



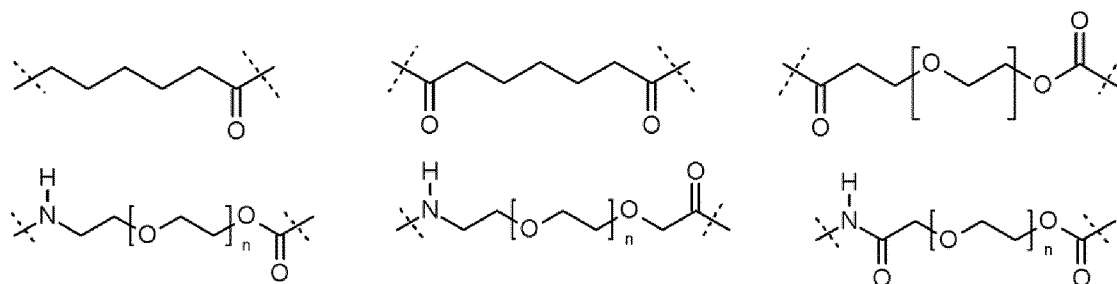
Примерами не отщепляемого разделителя являются

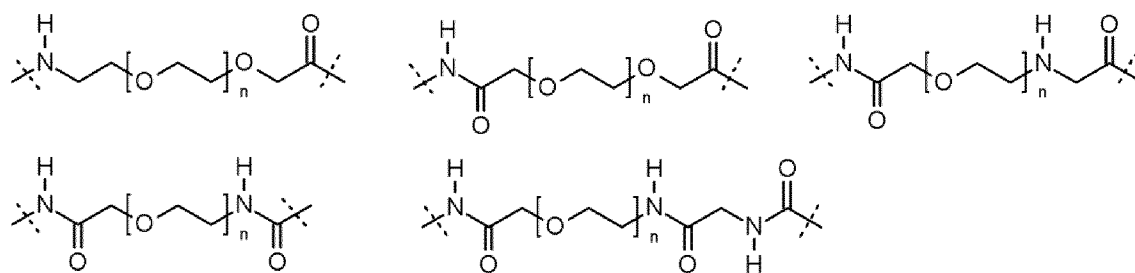


$n=0-4$

Заявленные конъюгаты антитело-лекарственное средство могут также содержать линкер (L), которым может быть $(CH_2)_q-CO$, $NH-(CH_2)_r-(ПЭГ)_s-(CH_2)_w-CO$, $NH-CO-(CH_2)_r-(ПЭГ)_s-X-(CH_2)_w-CO$, где X может отсутствовать, является NH, O, q равно 2-8, r отсутствует или равно 1-4, s отсутствует или равно 1-6 и w отсутствует или равно 1-2

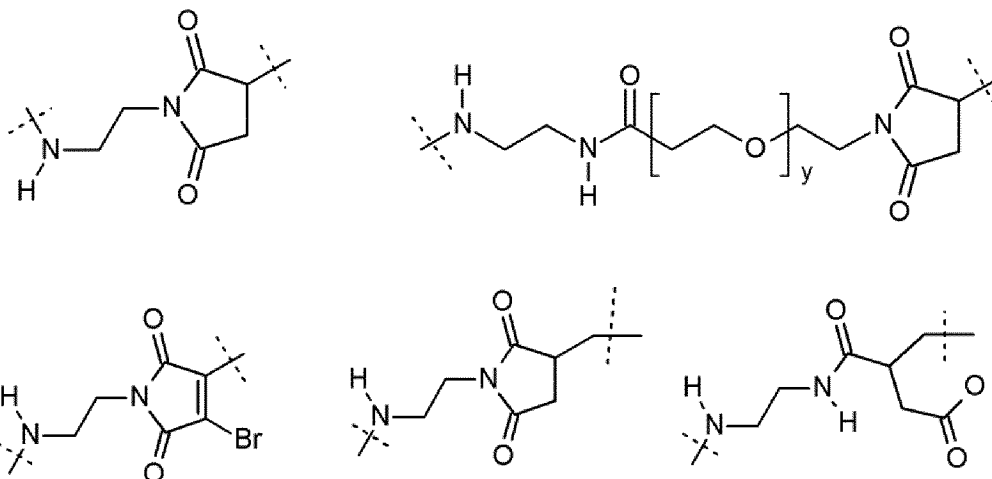
Примеры линкера (L):





$n=2-5$

Заявленные конъюгаты антитело-лекарственное средство могут также содержать соединяющую группу (СГ), образованную после конъюгирования с цистеиновой тиольной или лизиновой аминогруппой антител, которая может отсутствовать или является одной из следующих групп: NHS или активированное ацилпроизводное (включая сложный эфир 1-гидроксibenзотриазола, сложный эфир этил 2-циано-2-(гидроксиимино)ацетата, сложный эфир N-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолона, сложный эфир пентафторенила, п-нитро и сложный эфир 2,4-динитрофенола, сложный эфир динитрофенола, сложный эфир тиофенола, ацилимидазол, изобутилкарбонат, трихлорбензойный ангидрид, пиваловый ангидрид, 3,5-диметокситриазин) или малеимид- или 3-метиленсукцинимид, 3,4-диброммалеимид или {аминокарбонил}-3-бутеновую кислоту следующих формул:



где y равно 0-8

Описанные здесь иммуноглобулиновые векторы направлены против семейства рецепторов тирозинкиназы (РТК). Оно является суперсемейством трансмембранных белков, которые медируют внутриклеточные сигналы через фосфорилирование субстратных белков, вовлеченных в пролиферацию, выживание, дифференциацию

или миграцию клетки.

В частности, семейство рецептора эпидермального фактора роста человека (HER) принадлежит к суперсумейству РТК и содержит четыре члена: ErbB1/EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), ErbB2, ErbB3 и ErbB4. Физиологически эти рецепторы активированы лигандами семейства EGF.

EGFR играет причинную роль в развитии и сохранении многих карцином человека, с мутацией и сверхэкспрессией, наблюдаемой во множестве типов опухолей (*Burgess AW 2008 Growth Factors 26: 263-74*).

EGFR становится клинически подтвержденной целью для антител, а также для ингибиторов тирозинкиназы, которые широко применяются при раке легкого, головы и шеи, толстой кишки и поджелудочной железы (*Mendelsohn J 2006 Semin Oncol 33: 369-85; Feiner 2016 Exp Rev Proteomics, Sep 13: 817-32; Enrique AA 2012 Front Biosci 4: 12-22; Landi L 2014 Expert Opin Pharmacol Ther 15: 2293-305*).

Несмотря на успех этих ингибиторов, значительное количество пациентов с EGFR-положительными опухолями не реагируют на современные EGFR-нацеленные терапевтические средства, так как множество мутаций (например, EGFR, KRAS, BRAF, PI3K и PTEN) может способствовать внутренней или приобретенной резистентности (*Chong CR 2013 Nat Med 19: 1389-400*).

КАЛС на основе ингибитора микротрубочек, нацеленные на EGFR, являются неоднозначной терапевтической стратегией в том, что они могут улучшать активность анти-EGFR антител через обход резистентности, медиированной мутациями нисходящей подачи сигнала, но, из-за известной токсичности этих антител (т.е. кожная сыпь, диарея, запор, стоматит, утомляемость и электролитные нарушения) (*Li T 2009 Target Oncol 4: 107-19*) они могут иметь ограниченную применимость. Было неожиданно обнаружено, что КАЛС, полученные конъюгированием анти-белок семейства EGFR антител с низкотоксичными иГДАЦ, являются эффективными противораковыми агентами.

Антителом, применяемым в заявленном конъюгате антитело-лекарственное средство, в частности является антитело,

направленное против белка семейства EGFR. Более конкретно, антитело может быть направлено против ErbB1, ErbB2 или ErbB3 рецепторов. Те же полезные нагрузки, конъюгированные с другими антителами, могут быть направлены против других рецепторов, поглощенных опухолевыми клетками для выделения ИГДАЦ.

Например, по аналогии с EGFR, c-Met, вовлеченный в рост, выживание и распространение различных видов рака человека и сверхэкспрессирующийся в различных солидных опухолях, поглощается в ответ на связывание с HGF (фактор роста гепатоцитов), что приводит к убиквитинированию и разложению c-Met (*Mellman 2013 Cold Spring Harb Perspect Biol 5:a016949*).

Кроме того, интегрины имеют основные роли во взаимодействиях опухоль-stroma, и aberrантное рециркулирование 25 различных интегриновых гетеродимеров вовлечено в рост, инвазию, метастазы и эвазию апоптоза опухоли (*Mosesson 2008 Nat Rev Cancer 8: 835-50*).

В одном варианте, антитело выбирают из Трастузумаба, Цетуксимаба, Бевацизумаба, Панитумумаба, анти-CD4 или анти-CD30 антител и родственных биоподобных антител.

Термины антитело или иммуноглобулин могут применяться взаимозаменяемо в более широком смысле и включают моноклональные антитела, поликлональные антитела, выделенные, инжиниринговые или рекомбинантные антитела, полноразмерные или интактные антитела, мультивалентные или мультиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела или фрагменты антител, до тех пор, пока они демонстрируют желаемое биологическое действие. В случае рекомбинантного антитела, которое является результатом экспрессии рекомбинантной ДНК в живых клетках, антитело может быть получено из любых видов, и его предпочтительно получают из человека, крысы, мыши или кролика. Если антитело получено из видов, отличных от человека, оно предпочтительно является химерным или гуманизированным антителом, полученным методами, хорошо известными в данной области техники.

Антителом также может быть химически синтезированное антитело.

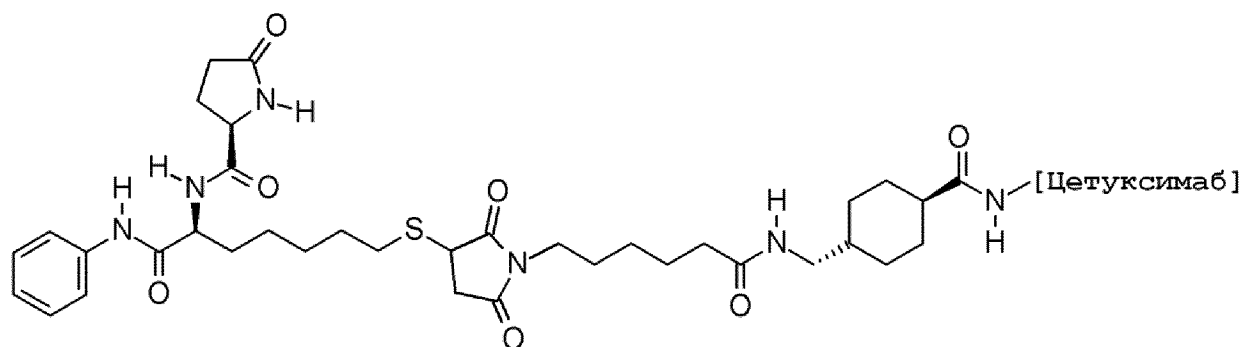
Антитело может быть нацелено на раковые или опухолевые

клетки, о которых идет речь, в частности, раковые или опухолевые клетки, экспрессирующие ErbB1, ErbB2 и/или ErbB3 рецепторы. В частности, антитело обладает свойством распознавать указанные раковые или опухолевые клетки, обладают свойством связываться с указанными раковыми или опухолевыми клетками и свойством быть поглощенным указанными опухолевыми или раковыми клетками.

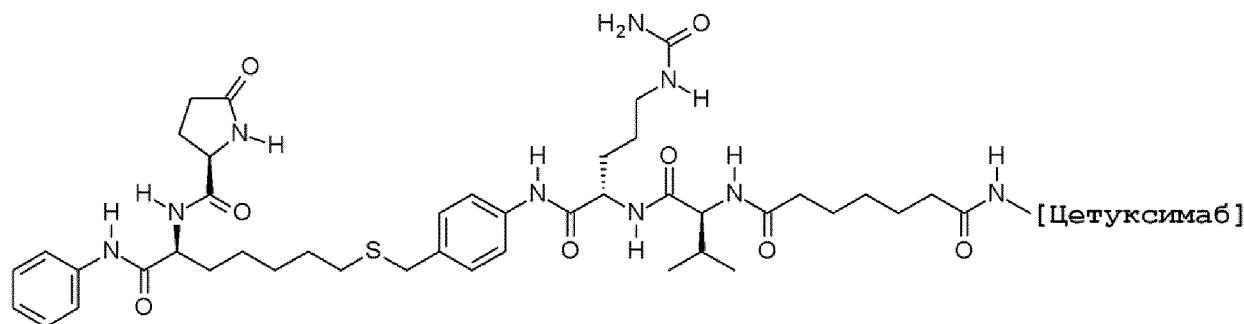
Способы получения указанных антител хорошо известны в данной области техники [т.е., Chem. Soc. Rev., 2016, 45, 1691-1719; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 26 (2016) 1542-1545].

Вместо антитела, также может применяться антиген-связывающий фрагмент, который означает любой пептид, полипептид или белок, сохраняющий способность связываться с целью (антигеном) антитела. Примеры антиген-связывающих фрагментов включают Fv, ScFv (Sc означает одноцепочечный), Fab, F(ab')₂, Fab', ScFv', Fc фрагменты или диатела или фрагменты, период полужизни которых повышается химической модификацией, такой как, например, ПЭГилирование или введение в липосому.

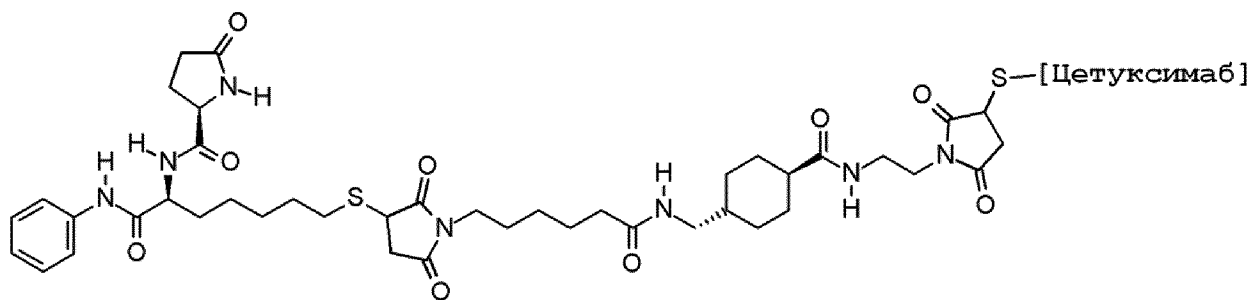
В одном варианте, конъюгат антитело-лекарственное средство (КАЛС) или его фармацевтически приемлемую соль выбирают из соединений, имеющих формулы:



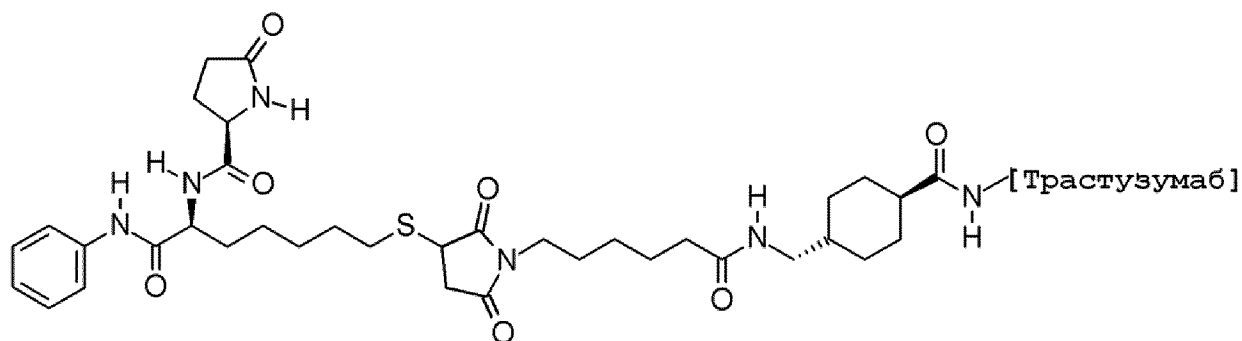
ST8154AA1 (24)



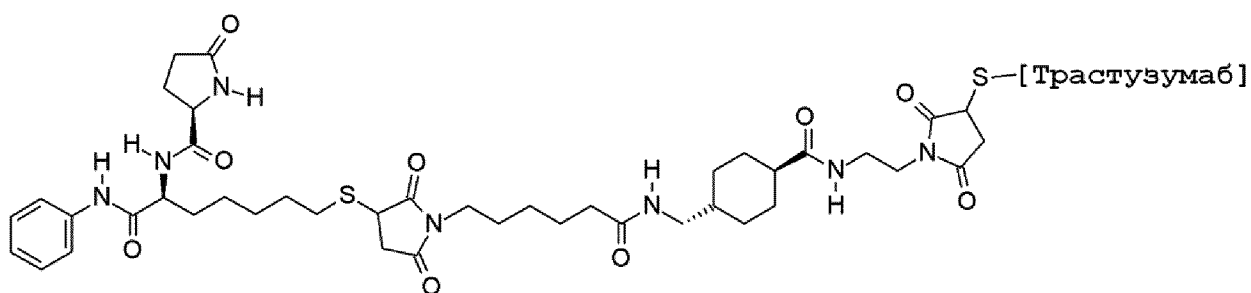
ST8155AA1 (25)



ST8177AA1 (26)

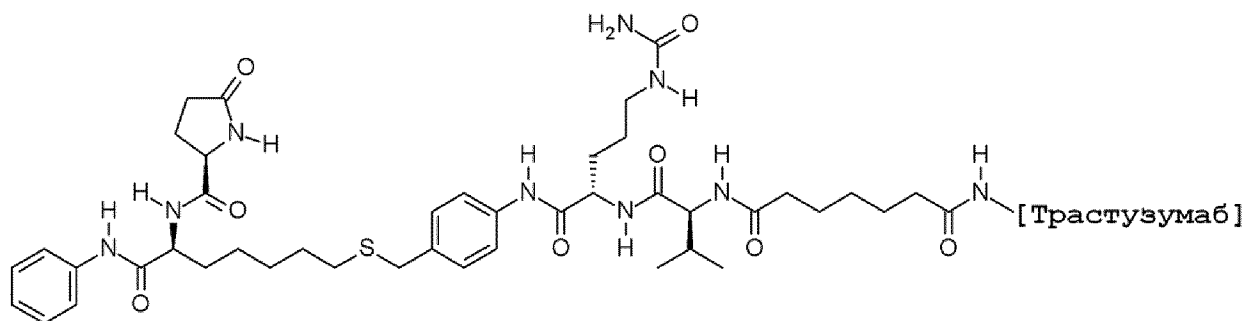


ST8178AA1 (27)

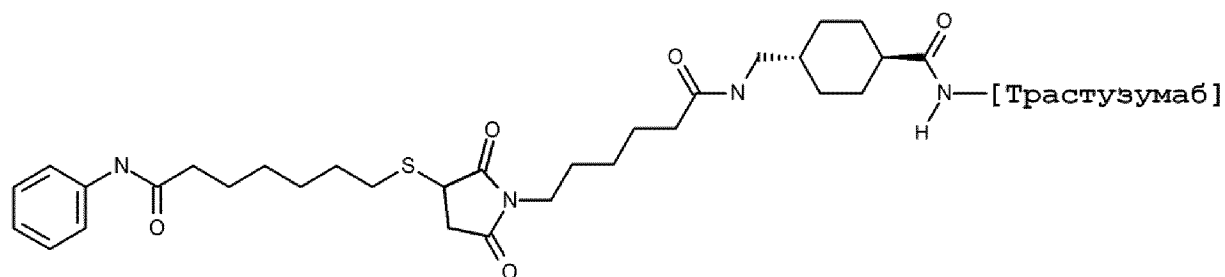


ST8176AA1 (28)

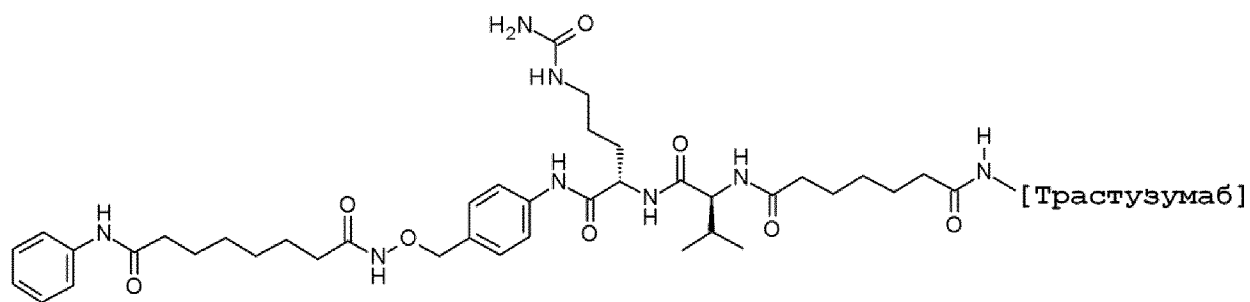
В другом варианте формулы I представлено соединение, такое как конъюгат антитело-лекарственное средство (КАЛС) или его фармацевтически приемлемая соль, формулы (If):



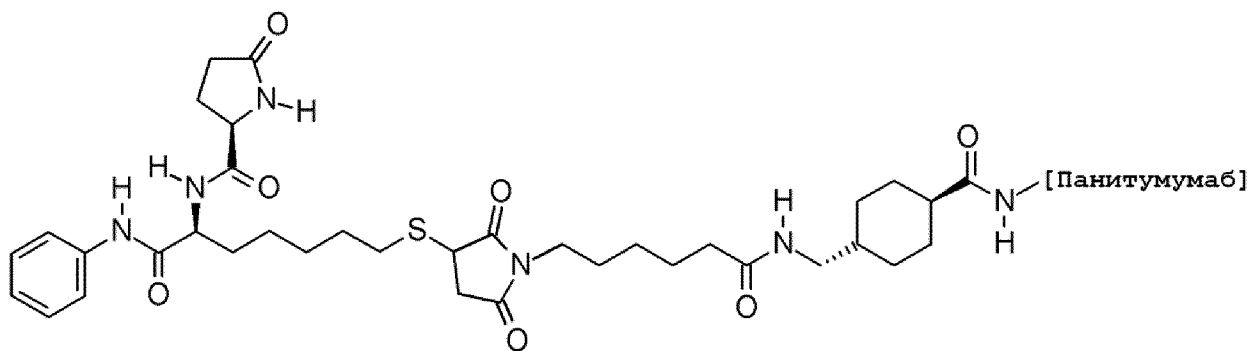
ST8179AA1 (29)



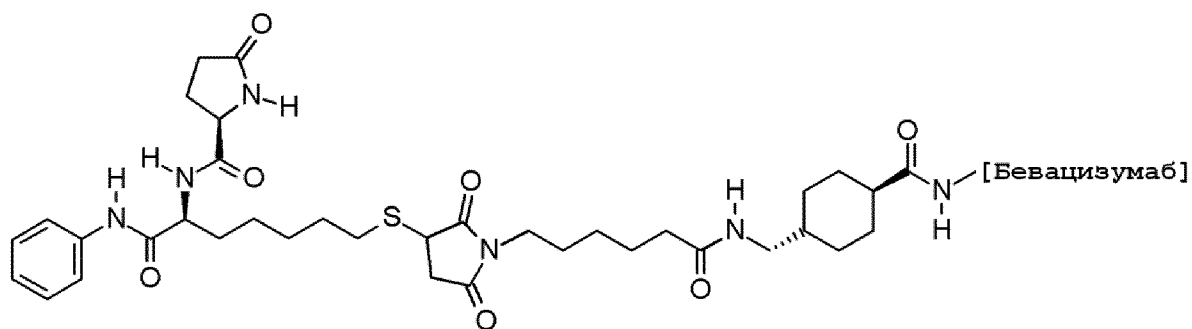
ST8205AA1 (30)



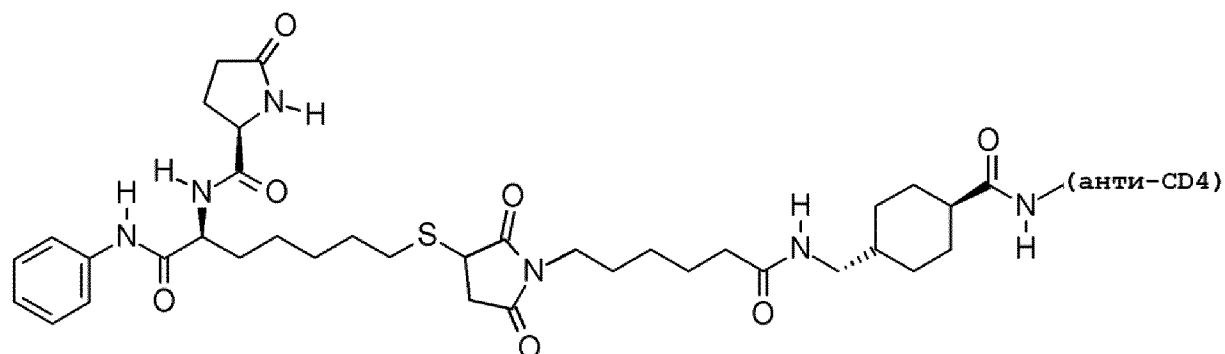
ST8202AA1 (31)



ST8193AA1 (32)



ST8194AA1 (33)



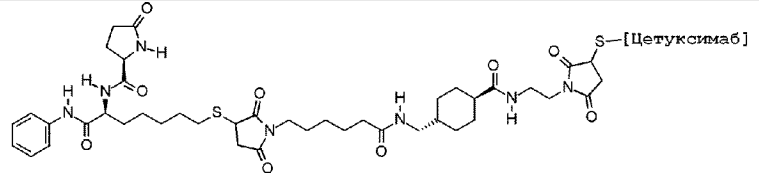
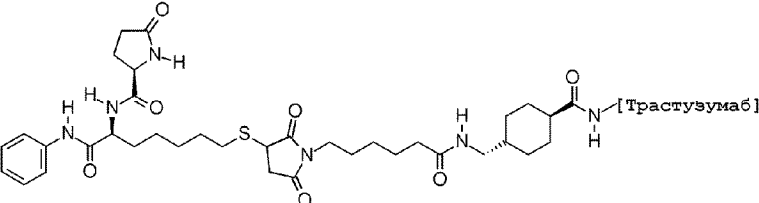
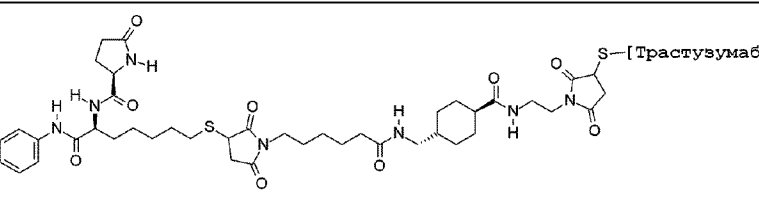
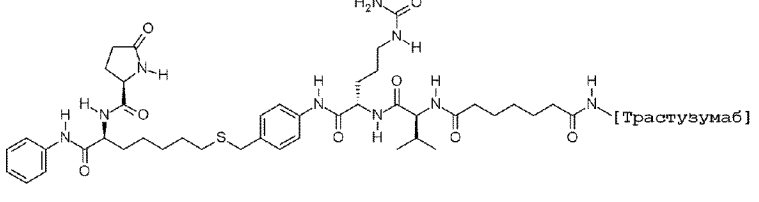
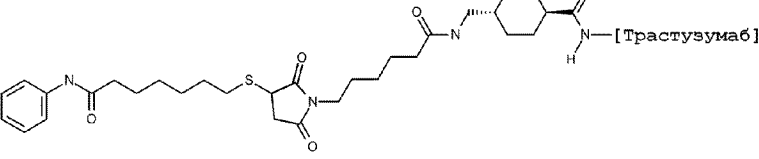
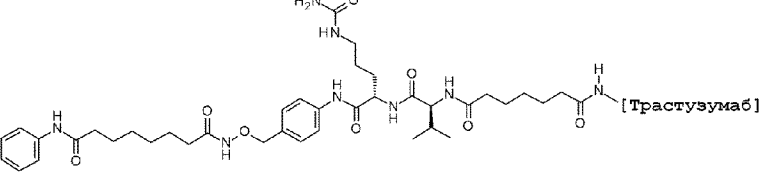
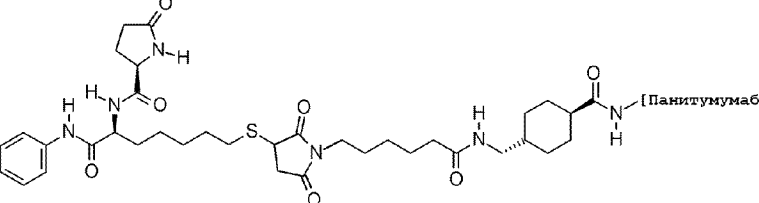
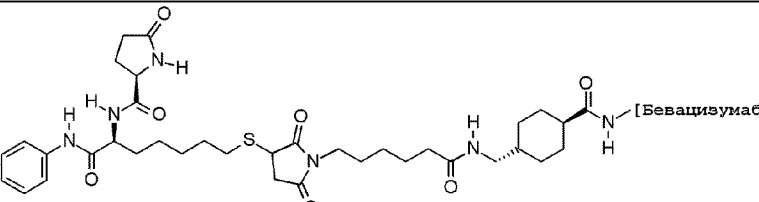
лекарственное средство (КАЛС) на основе ингибиторов ГДАЦ.

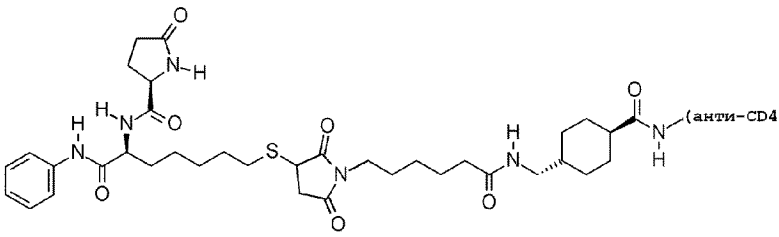
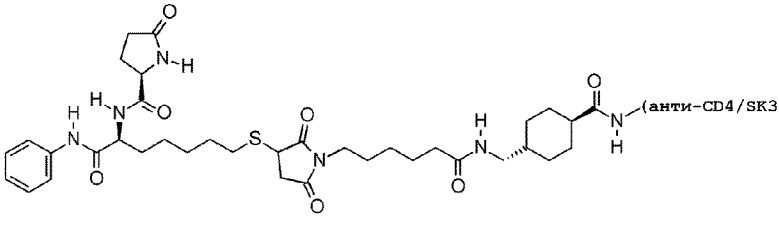
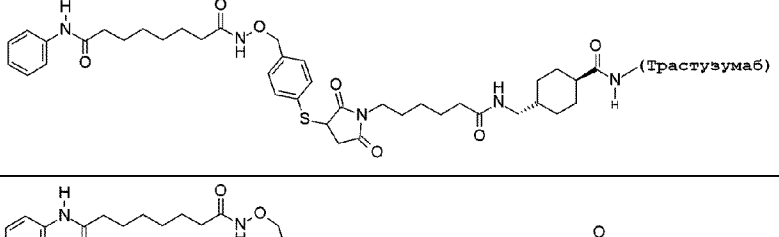
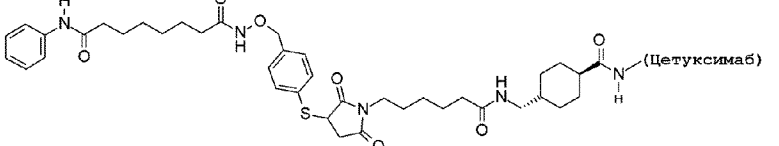
В другом варианте представлен способ получения полезной нагрузки, который включает введение тиольных, гидроксиминовых или бензамидных остатков ингибитора ГДАЦ, подходящей соединительной единицы (С.Е.), к которой присоединяют другие компоненты полезной нагрузки, если есть. Разделитель (S1) – который может быть отщепляемым (обычно валиновый-цитруллиновый дипептид (Val-Cit), субстрат фермента катепсина) или не отщепляемым – линкер (L), второй разделитель (S2) и концевая группа (СГ)', подходящая для конъюгирования в лизин или цистеином антитела.

В другом варианте представлен способ получения конъюгатов антитело-лекарственное средство (КАЛС) на основе ГДАЦ, который обычно включает реакцию конъюгирования между остатком (СГ)' части молекулы полезной нагрузки и аминогруппой лизинового остатка иммуноглобулина (Ab). Для конъюгирования с цистеинами, S-S цистиновые связи иммуноглобулина должны быть предварительно восстановлены подходящим восстанавливающим агентом. На сульфгидрильных группах (-SH) свободных цистеиновых остатков продолжают последующую реакцию конъюгирования с полезной нагрузкой, имеющей соответствующую группу (СГ)'.

Таблица 2. КАЛС

Ид. № код ST	Химическая структура	МК	ОЛА
(24) 8154AA1		Lys	8,0 (± 1)
(25) 8155AA1		Lys	6,1 (± 1)

(26) 8177AA1		Cys	4,0 (± 0,7)
(27) 8178AA1		Lys	8,0 (± 0,2)
(28) 8176AA1		Cys	4,5 (± 0,5)
(29) 8179AA1		Lys	6,1 (± 0,2)
(30) 8205AA1		Lys	6,2 (± 0,2)
(31) 8202AA1		Lys	5,5 (± 0,5)
(32) 8193AA1		Lys	9,0 (± 2)
(33) 8194AA1		Lys	6,5 (± 0,5)

(34) 8212AA1		Lys	8,0 (± 0,2)
(35) 8213AA1		Lys	4,0 (± 1)
(36) 8218AA1		Lys	5,0 (± 0,5)
(37) 8219AA1		Lys	4,0 (± 0,5)

МК: Место конъюгирования

Данное изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей указанные выше конъюгаты антитело-лекарственное средство. Указанные фармацевтические композиции содержат, по крайней мере, эксципиент и/или фармацевтически приемлемый носитель. Активный ингредиент может вводиться в стандартной форме введения в смеси с обычными фармацевтическими носителями животным или человеку. Подходящие стандартные формы включают формы для энтерального или парентерального введения, где энтеральное введение включает пероральный, аэрозольный, ректальный или буккальный способ, и парентеральное введение включает подкожный, внутримышечный или внутривенный и чрезкожный путь.

Фармацевтическая композиция может быть для энтерального или парентерального введения, где энтеральное введение включает пероральный, аэрозольный, ректальный или буккальный способ, и парентеральное введение включает подкожный, внутримышечный или внутривенный и чрезкожный путь.

Твердая композиция для перорального введения может быть

таблеткой, пилулей, порошком, капсулой или гранулятом. В этих композициях, конъюгат антитело-лекарственное средство в соответствии с данным изобретением смешивают с одним или более инертным разбавителем, таким как крахмал, целлюлоза, сахароза, лактоза или двуокись кремния. Эти композиции могут также содержать другие вещества, такие как смазывающие агенты, такие как стеарат магния или тальк, или красящие агенты или агенты для покрытия.

Стерильной композицией для парентерального введения может предпочтительно быть водным или не водным раствором, суспензией или эмульсией. Применяемый растворитель или носитель может быть получен из воды, пропилентгликоля или полиэтиленгликоля, растительных масел, органических сложных эфиров для инъекций или других подходящих органических растворителей. Эти композиции также могут включать адъюванты, в частности, смачивающие, изотонические, эмульгирующие, диспергирующие и стабилизирующие агенты.

В данном изобретении представлен *in vitro* анализ пролиферации клеток как демонстрация эффективности новых КАЛС.

Конкретным вариантом изобретения является состав, подходящий для местной доставки распылением. В связи с этим, конъюгаты антитело-лекарственное средство в соответствии с данным изобретением особенно подходят для лечения заболеваний, связанных с легкими или брюшной полостью, таких как рак легкого или брюшной полости, или рака яичников, шейки матки-эндометрия, желудка, толстой кишки, аппендикса, псевдомиксомы брюшины, рака поджелудочной железы, метастазов в печени, редких новообразований (саркома брюшной полости не кишечных тканей).

В данном изобретении также представлено соединение формулы (I), как определено выше, для применения в способе лечения рака, расстройств пролиферации клеток и вирусных инфекций.

Предпочтительно, соединение формулы (I), как определено выше, применяют в способе лечения определенных типов рака, таких как, но не ограниченных ими: карциномы, включая карциному мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, почек, печени, легкого, включая мелкоклеточный рак легкого, пищевода, желчного

пузыря, яичников, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы, простаты и кожи, включая плоскоклеточную карциному; гемопоэтические опухоли лимфатических клеток, включая лейкоз, острый лимфатический лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, ходжкинскую лимфому, неходжкинскую лимфому, лимфому волосистых клеток и лимфому Буркитта; гемопоэтические опухоли миелогенных клеток, включая острый и хронический миелогенный лейкоз, миелодиспластический синдром и промиелоцитарный лейкоз; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, нейробластому, глиому и шванному; и другие опухоли, включая меланому, семиному, тератокарциному, остеосаркому, пигментарную ксеродермию, кератоксантому, фолликулярный рак щитовидной железы, саркому Капоши и мезотелиому.

В данном изобретении представлен *in vitro* анализ пролиферации клеток как демонстрация эффективности новых КАЛС.

Соединения в соответствии с данным изобретением связываются с рецептором сопоставимым образом со свободными антителами, и связывание КАЛС с ErbB1- и ErbB2-экспрессирующими опухолевыми клетками подтверждается анализом FACS.

Анализ флуоресценции демонстрирует, что соединения в соответствии с данным изобретением способны поглощаться опухолевыми клетками сопоставимым образом с их природными аналоговыми антителами без снижения скорости связывания. Более того, все КАЛС в соответствии с данным изобретением взаимодействуют с их специфическим рецептором с эффективностью, сравнимой с эффективностью природных антител, связанных с КАЛС, таких как, например, Цетуксимаб или Трастузумаб.

КАЛС в соответствии с данным изобретением сохраняют свою целостность при распылении, и поэтому они могут быть включены в композиции для распыления, что является эффективным способом доставки mAbs при респираторных заболеваниях. Этот способ является неинвазивным способом, подходящим для нацеливания лекарственных средств в легкие, ограничивая воздействие на

вторичные органы.

Соединения в соответствии с данным изобретением ингибируют пролиферацию опухолевых клеток со значениями IC_{50} ниже, чем значения только Цетуксимаба, при оценке на клетках аденокарциномы легких, тем самым подтверждая их противоопухолевую эффективность.

Все тестируемые КАЛС вызывают соответствующее повышение уровня ацетилирования α -тубулина и гистона H3 во всех тестируемых колониях опухолевых клеток, благодаря прямому ферментному ингибированию ГДАЦ6 и ГДАЦ I класса, соответственно.

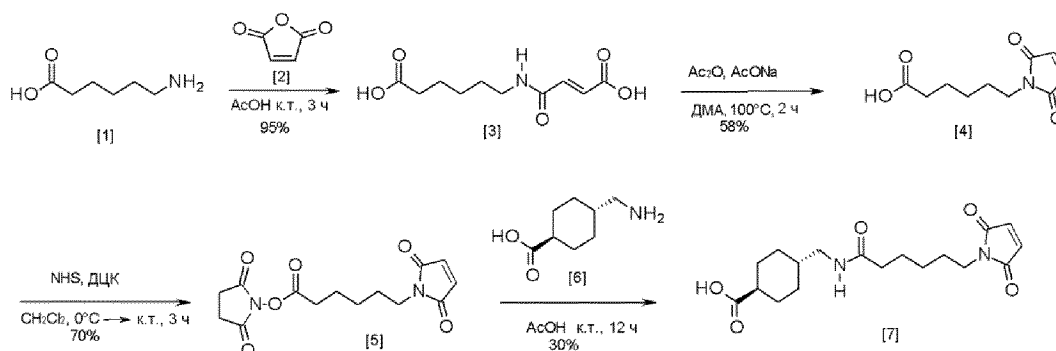
In vivo эксперимент продемонстрировал, что соединения в соответствии с данным изобретением являются более эффективными в ингибировании роста опухолей легкого, толстой кишки, поджелудочной железы, яичников, по сравнению с только Цетуксимабом и Трастузумабом.

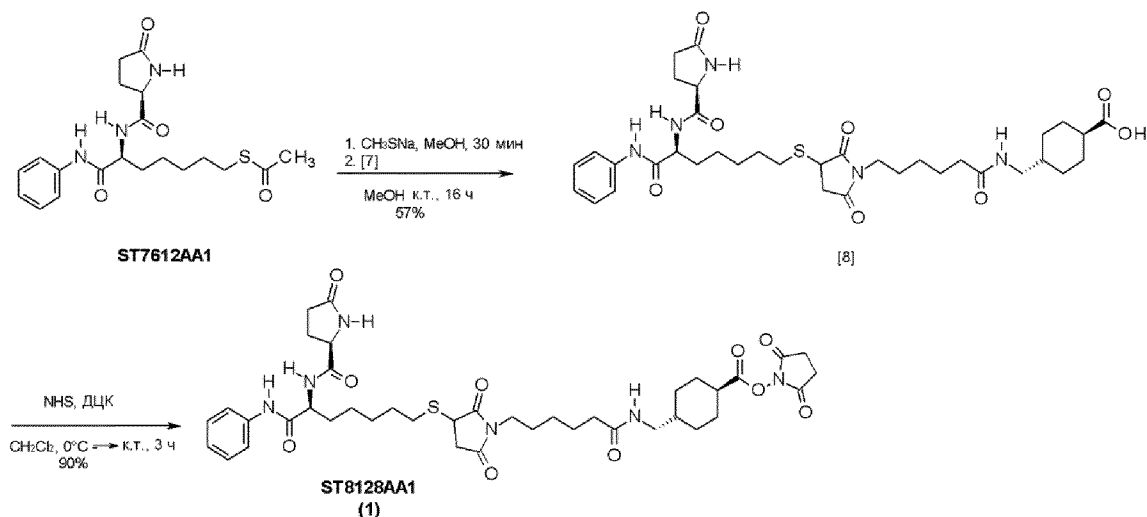
Новые КАЛС показывают противоопухолевое действие при введении аэрозолем и внутривнутрибрюшинным путем на местную опухоль, применимы для внутривнутрибрюшинной аэрозольной химиотерапии под давлением (ВАХД).

Примеры

Данное изобретение далее описано со ссылкой на следующие примеры. Специалист в данной области поймет, что эти примеры предназначены только для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Пример 1: Синтез и исследование полезной нагрузки (1), ST8128AA1





(Е) – 6–(3–Карбоксиакриламидо)гексановая кислота [3]

Раствор малеинового ангидрида [2] (1,95 г, 19,9 ммоль) в ледяной уксусной кислоте (10 мл) добавляют по каплям к перемешиваемому раствору 6-аминокапроновой кислоты [1] (2,6 г, 19,9 ммоль) в ледяной уксусной кислоте (10 мл). Смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 3 часов. Осадок, образовавшийся в течение реакции, затем фильтруют, промывают диэтиловым эфиром с получением соединения [3] в виде белого твердого вещества, 4,3 г (95% выход). Какая-либо другая очистка твердого вещества не требуется.

^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 9,10 (с, 1H), 6,35 (д, $J=12,6$ Гц, 1H), 6,18 (д, $J=12,6$ Гц, 1H), 3,12 (м, 2H), 2,15 (т, $J=7,4$ Гц, 2H), 1,44 (м, 4H), 1,33–1,12 (м, 2H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, ДМСО) δ 174,8, 172,4, 165,8, 133,5, 132,2, 33,9, 28,5, 26,3, 24,5, 21,4.

6–(2,5–Диоксо-2,5–дигидро-1H–пиррол-1-ил)гексановая кислота [4]

Уксусный ангидрид (3,8 мл, 40,75 ммоль) и ацетат натрия (418 мг, 5,09 ммоль) добавляют при комнатной температуре к раствору соединения [3] (4,3 г, 20,37 ммоль) в диметилацетамиде (20 мл) при энергичном перемешивании, и затем нагревают до 100°C в течение 2 часов. Затем смесь охлаждают до комнатной температуры, разбавляют дихлорметаном (35 мл) и промывают 5–6 раз HCl 0,5 М (6 порций по 10 мл каждая) для удаления диметилацетамида. Органический слой сушат над безводным

сульфатом натрия, фильтруют и растворитель удаляют в вакууме с получением продукта [4] в виде бесцветного масла, 2,5 г (58% выход).

^1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 9,87 (шс, 1H), 6,76 (д, $J=1,6$ Гц, 2H), 3,54–3,38 (м, 2H), 2,52–2,39 (м, 1H), 2,30–2,26 (м, 1H), 1,70–1,46 (м, 4H), 1,39–1,19 (м, 2H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, MeOD) δ 179,4, 171,1, 133,9, 36,9, 33,2, 29,2, 24,1, 23,3.

2,5-Диоксопирролидин-1-ил 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил) гексаноат [5]

Дициклогексилкарбодиимид (2,68 г, 13,02 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (1,36 г, 11,84 ммоль) добавляют при комнатной температуре к перемешиваемому раствору соединения [4] (2,5 г, 11,84 ммоль) в безводном дихлорметане (15 мл) и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 3 часов. Белое твердое вещество фильтруют с дихлорметаном для удаления дициклогексилмочевины, органическую фазу промывают HCl 0,1N и водой, затем сушат над безводным сульфатом натрия и растворитель удаляют ротормым выпариванием. Полученный остаток подвергают флэш-хроматографии на колонке в системе среднего давления Sepacore® Buchi (силикагель; градиент А: петролейный эфир/В: этилацетат; В% 0–80 за 15 минут) с получением активированной кислоты [5] в виде белого твердого вещества, 2,4 г (70%). МС: m/z 309 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 6,78 (с, 2H), 3,49–3,46 (м, 2H), 2,82 (с, 4H), 2,62–2,59 (м, 2H), 1,78–1,65 (м, 2H), 1,64–1,50 (м, 2H), 1,46–1,26 (м, 2H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, MeOD) δ 169,8, 169,0, 167,3, 132,5, 35,4, 28,6, 26,1, 23,8, 23,6, 22,3.

4-((6-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил) гексанамидо) метил) циклогексанкарбоновая кислота [7]

транс-4-(Аминометил)циклогексанкарбоновую кислоту [6] (2,38 г, 15,17 ммоль) добавляют при комнатной температуре к перемешиваемому раствору соединения [5] (2,46 г, 7,98 ммоль) в ледяной уксусной кислоте (20 мл), и реакционную смесь

перемешивают при комнатной температуре в течение 16 часов. Уксусную кислоту удаляют при пониженном давлении, остаток разбавляют дихлорметаном и промывают водой для удаления N-гидроксисукцинамида. Органический слой сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и растворитель удаляют в вакууме. Остаток подвергают флэш-хроматографии на системе среднего давления Sepacore® Buchi, силикагель с градиентом 0-100% этилацетата в петролейном эфире за 7 минут, и 100% этилацетата за 5 минут, с получением compound [7] в виде белого твердого вещества, 807 мг (30% выход). **МС:** m/z 349 $[M-H]^+$.

1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 10,47 (шс, 1H), 7,81 (с, 1H), 6,66 (д, $J=2,3$ Гц, 2H), 3,35 (с, 2H), 2,88 (с, 2H), 2,04 (с, 2H), 1,86 (д, $J=10,5$ Гц, 2H), 1,68 (д, $J=10,1$ Гц, 2H), 1,47 (с, 2H), 1,36-1,03 (м, 8H), 0,85 (д, $J=11,7$ Гц, 2H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, MeOD) δ 176,8, 173,0, 169,5, 132,4, 43,4, 41,5, 35,9, 35,5, 33,8, 27,9, 26,6, 25,9, 24,4, 23,6.

4-((6-(2,5-Диоксо-3-((7-оксо-6-(5-оксопирролидин-2-карбоксамидо)-7-(фениламино)гептил)тио)пирролидин-1-ил)гексанамидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота (8)

Раствор тиометилата натрия 1M в дегазированном метаноле (17 мг, 0,25 ммоль, 0,250 мл) добавляют при комнатной температуре к раствору **ST7612AA1** (100 мг, 0,25 ммоль) в дегазированном метаноле. Перемешиваемую смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 30 минут. Реакционную смесь промывают N_2 в течение 5-10 минут для удаления MeSH и добавляют соединение **7** (88 мг, 0,25 ммоль). Смесь хранят при комнатной температуре в течение 16 часов. Затем растворитель удаляют ротормым выпариванием, и неочищенный продукт очищают хроматографией на колонке с градиентом 2-20% метанол в дихлорметане. Соединение (8) получают в виде белого твердого вещества, 102 мг (57%). **МС:** m/z 737 $[M+Na]^+$.

1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 9,97 (шс, с), 7,92 (м, 2H), 7,60 (м, 2H), 7,34 (м, 2H), 7,14 (м, 1H), 4,57 (м, 1H), 4,31 (м, 1H), 3,54 (м, 2H), 3,06 (д, $J=4,7$ Гц, 2H), 2,49-2,14 (м, 4 H), 2,10-2,02 (м, 7 H), 1,87-1,62 (м, 12 H), 1,76-1,23 (м, 12H), 1,01 (д,

$J=12,4$ Гц, 2H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, MeOD) δ 179,6, 178,4, 177,0, 175,3, 174,7, 173,0, 170,7, 128,0 (2C), 123,7, 119,5 (2C), 77,6, 56,2, 53,5, 44,6 (2C), 42,7, 38,6, 37,7, 35,5, 35,0, 31,4, 30,3, 29,1 (2C), 28,9, 28,0 (3C), 27,4, 26,4, 25,5, 25,0, 24,6, 24,4.

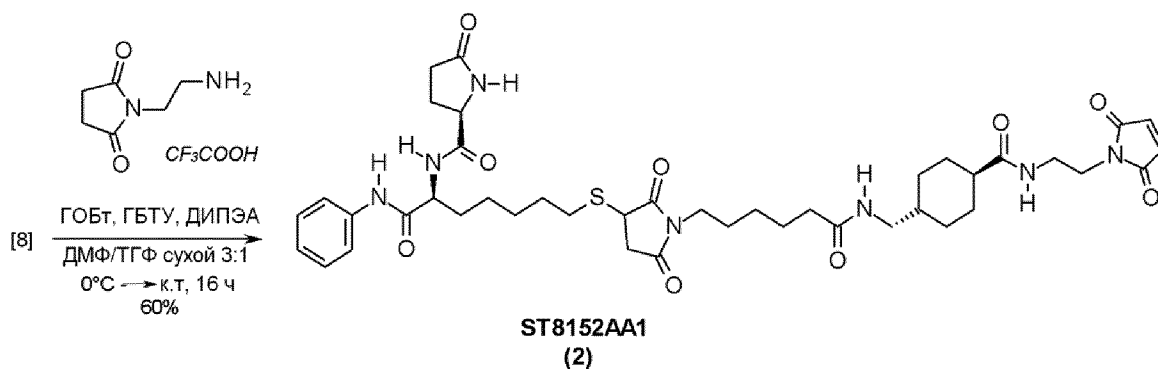
2,5-Диоксопирролидин-1-ил 4-((6-(2,5-диоксо-3-((7-оксо-6-(5-оксопирролидин-2-карбоксамидо)-7-(фениламино) гептил) тию) пирролидин-1-ил) гексанамидо) метил) циклогексанкарбоксилат (1), ST8128AA1.

В 50 мл колбе под N_2 соединение [8] (102 мг, 0,14 ммоль) растворяют в безводном дихлорметане (5 мл), содержащем 0,1 мл сухого диметилформамида. N-Гидроксисукцинамид (24 мг, 0,21 ммоль) и дициклокарбодиимид (50 мг, 0,24 ммоль) добавляют при комнатной температуре, и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 16 часов. Растворитель удаляют, и остаток очищают флэш-хроматографией в 2-6% метаноле в дихлорметане. Продукт **ST8128AA1** получают в виде бесцветной вязкой жидкости; 101 мг (90% выход). **МС:** m/z 811 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 833 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 9,43 (с, 1H), 7,78 (д, $J=7,0$ Гц, 1H), 7,54 (д, $J=7,6$ Гц, 2H), 7,35-7,14 (м, 2H), 7,08 (т, $J=7,0$ Гц, 1H), 6,12 (с, 1H), 4,67 (д, $J=6,4$ Гц, 1H), 4,23 (с, 1H), 3,69 (с, 1H), 3,48 (с, 2H), 3,17-2,93 (м, 3H), 2,83 (с, 5H), 2,26-2,03 (м, 9H), 1,97-1,71 (м, 8H), 1,71-1,18 (м, 16H), 1,02 (дд, $J=24,0, 11,7$ Гц, 2H).

^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ 178,9, 176,7, 176,4, 174,4, 173,2, 172,7, 170,5, 170,3, 168,9, 137,4, 128,48 (2C), 124,06, 119,58 (2C), 53,9, 45,4, 45,1, 42,1, 39,2, 38,7, 38,3, 37,6, 37,3, 36,3, 32,1, 31,3 (4C), 29,9, 28,8, 28,2, 27,2, 26,2, 25,3, 18,6, 17,3, 12,0.

Пример 2: Синтез и исследование полезной нагрузки (2), ST8152AA1

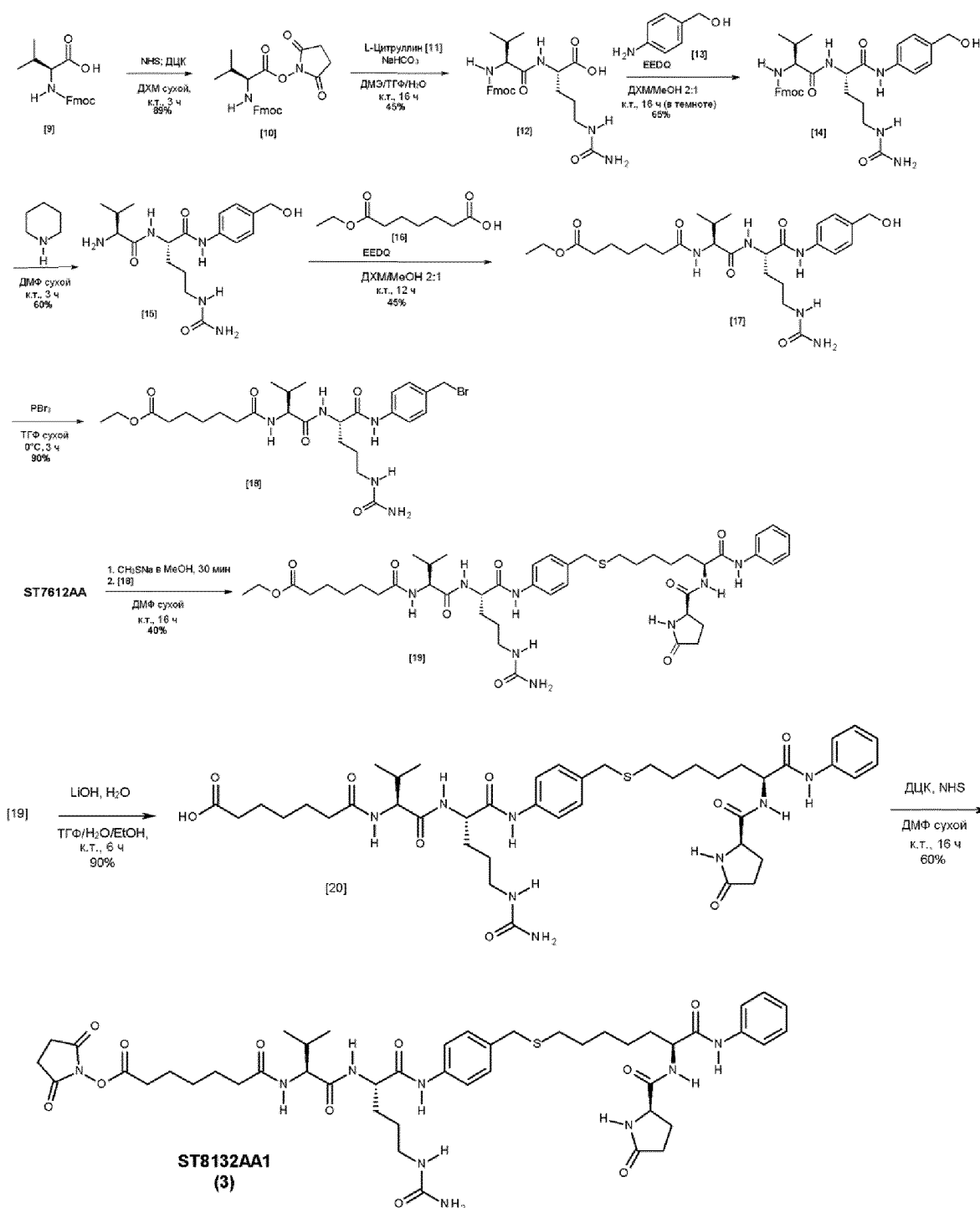


N-(7-((1-(6-((4-((2-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил) этил) карбамоил) циклогексил) метил) амино) -6-оксогексил) -2,5-диоксопирролидин-3-ил) тио) -1-оксо-1-(фениламино) гептан-2-ил) -5-оксопирролидин-2-карбоксамид (2), ST8152AA1.

В 50 мл колбе под N_2 соединение [8] (87 мг, 0,11 ммоль) растворяют в смеси тетрагидрофурана/диметилформамида 3:1 (4 мл) при 0°C . Затем добавляют трифторуксусную соль N-(2-аминоэтил)малеимида (33 мг, 0,13 ммоль), гидрат 1-гидроксибензотриазола (22 мг, 0,16 ммоль), ГБТУ (61 мг, 0,16 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин (0,048 мл, 0,27 ммоль), и смесь выдерживают при 0°C в течение 30 минут, и затем при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь разбавляют дихлорметаном и промывают два раза водой и два раза насыщенным раствором соли, сушат над безводным сульфатом натрия и растворитель удаляют роторным выпариванием. Остаток очищают флэш-хроматографией на колонке 2-20% метанолом в дихлорметане. Продукт **ST8152AA1** получают в виде бесцветной вязкой жидкости, 55 мг (60% выход). **МС:** m/z 859 $[M+Na]^+$.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 9,46 (шс, 1H), 7,60 (д, $J=7,9$ Гц, 2H), 7,36-7,23 (м, 2H), 7,09 (т, $J=7,4$ Гц, 1H), 6,72 (с, 2H), 6,49 (т, $J=5,6$ Гц, 1H), 6,32 (т, $J=5,7$ Гц, 1H), 4,65 (д, $J=6,1$ Гц, 1H), 4,37-4,24 (м, 1H), 3,83-3,60 (м, 2H), 3,60-3,37 (м, 5H), 3,25-2,97 (м, 4H), 2,89-2,61 (м, 2H), 2,60-2,11 (м, 4H), 2,00 (м, 5H), 1,90-1,72 (м, 13H), 1,72-1,15 (м, 8H), 0,94 (дд, $J=24,3, 11,4$ Гц, 2H).

Пример 3: Синтез и исследование полезной нагрузки (3), ST8132AA1



(S) -2,5-Диоксопирролидин-1-ил 2-(((9Н-флуорен-9-ил) метокси) карбонил) амина) -3-метилбутаноат [10]

Дициклокарбодиимид (1,55 г, 7,52 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (762 мг, 6,63 ммоль) добавляют при комнатной температуре к перемешиваемому раствору Fmoc-Val-OH [9] (1,5 г, 4,42 ммоль) в безводном дихлорметане (25 мл). Смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 3 часов. Белое твердое вещество, образовавшееся в этой реакции, фильтруют с дихлорметаном для удаления дициклогексилмочевины, органическую

фазу промывают HCl 0,1N и водой, затем сушат над безводным сульфатом натрия и растворитель удаляют роторным выпариванием. Остаток подвергают флэш-хроматографии на колонке в 1% метаноле в дихлорметане с получением продукта [10] в виде белого твердого вещества, 1,7 г (89% выход). **МС:** m/z 459 $[M+Na]^+$.

1H ЯМР (400 МГц, $CDCl_3$) δ 7,80 (д, $J=7,5$ Гц, 2H), 7,68–7,55 (м, 2H), 7,43 (т, $J=7,4$ Гц, 2H), 7,34 (дд, $J=15,9, 8,5$ Гц, 2H), 4,70 (д, $J=4,6$ Гц, 1H), 4,56–4,40 (м, 3H), 4,28 (т, $J=6,6$ Гц, 1H), 2,85 (с, 4H), 2,37 (дд, $J=12,3, 6,5$ Гц, 1H), 1,08 (дд, $J=11,0, 6,9$ Гц, 6H).

(S)-2-((S)-2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентановая кислота [12]

Соединение [10] (1,7 г, 3,9 ммоль) в диметоксиэтаноле (10 мл) добавляют к раствору L-цитруллина [11] (700 мг, 4 ммоль), растворенного в смеси тетрагидрофурана и водного бикарбоната натрия (344 мг, 4 ммоль в 10 мл воды). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 16 часов. Добавляют раствор лимонной кислоты 15% в воде (50 мл), и смесь экстрагируют 10% изопропиловым спиртом в этилацетате (2×75 мл). Растворитель удаляют роторным выпариванием. После добавления диэтилового эфира и облучения ультразвуком образуется твердое вещество. Фильтрация с последующим промыванием диэтиловым эфиром дает [12] в виде белого твердого вещества, 870 мг (45%). **МС:** m/z 495 $[M-H]^-$.

1H ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 8,19 (шм, 3H), 7,87 (т, $J=25,1$ Гц, 2H), 7,77 (т, $J=6,8$ Гц, 2H), 7,49–7,23 (м, 4H), 5,99 (с, 1H), 5,43 (с, 2H), 4,45–4,08 (м, 4H), 3,97 (т, $J=7,5$ Гц, 1H), 2,99 (д, $J=5,1$ Гц, 2H), 2,02 (д, $J=6,1$ Гц, 1H), 1,74 (с, 1H), 1,61 (д, $J=7,5$ Гц, 1H), 1,44 (с, 2H), 0,91 (дд, $J=12,5, 6,3$ Гц, 6H).

^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО) δ 173,4, 171,3, 169,8, 167,8, 158,8, 156,0, 143,8, 140,7, 127,6, 127,0, 65,7, 59,8, 51,9, 46,7, 30,5, 26,6, 19,18 (2C).

(9H-флуорен-9-ил)метил ((S)-1-(((S)-1-((4-(гидроксиметил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамат [14]

EEDQ (840 мг, 3,4 ммоль) добавляют к раствору, содержащему соединение [12] (870 мг, 1,7 ммоль) и *p*-аминобензиловый спирт (227 мг, 1,8 ммоль) в дихлорметане/метаноле 2:1 (15 мл). Реакционную смесь оставляют в темноте при комнатной температуре в течение 16 часов. Растворители удаляют, и полученный твердый остаток фильтруют с применением диэтилового эфира с получением продукта [14] в виде белого твердого вещества, 660 мг (65% выход). **МС:** m/z 624 $[M+Na]^+$.

1H ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 10,00 (шс, 1H), 8,13 (м, 4H), 7,92 (д, $J=7,3$ Гц, 2H), 7,76 (д, $J=7,6$ Гц, 2H), 7,58 (д, $J=8,1$ Гц, 2H), 7,51-7,10 (м, 2H), 6,02 (с, 1H), 5,43 (м, 4H), 5,13 (с, 1H), 4,47 (с, 3H), 4,31 (м, 4H), 3,13-2,74 (м, 2H), 2,03 (с, 1H), 1,83-1,55 (м, 2H), 1,43 (с, 2H), 0,90 (д, $J=6,7$ Гц, 6H).

^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО) δ 171,2, 170,4, 158,93, 156,15, 144,6, 143,8, 140,7, 137,5, 127,6, 127,2 (2C), 125,3, 120,1 (2C), 118,9, 65,7, 62,6, 60,1, 53,0, 46,7, 31,0, 30,5, 26,7, 19,6, 18,7.

(S)-2-((S)-2-Амино-3-метилбутанамидо)-N-(4-(гидроксиметил)фенил)-5-уреидопентанамида [15]

Пиперидин (2,2 мл) добавляют к раствору соединения [14] (660 мг, 1,09 ммоль) в безводном диметилформамиде (5 мл), и реакционную смесь оставляют при комнатной температуре на 3 ч. Растворитель удаляют в вакууме, и остаток обрабатывают дихлорметаном с получением твердого вещества, которое фильтруют с получением продукта [15], 240 мг (60% мг). **МС:** m/z 380 $[M+H]^+$.

1H ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 10,11 (с, 1H), 8,25 (с, 1H), 7,58 (д, $J=8,2$ Гц, 2H), 7,27 (д, $J=8,2$ Гц, 2H), 6,10 (с, 1H), 5,46 (с, 2H), 4,48 (м, 3H), 3,23-3,09 (м, 2H), 3,11-2,88 (м, 2H), 1,99 (дд, $J=12,2$, 6,4 Гц, 2H), 1,99 (дд, $J=12,2$, 6,4 Гц, 1H), 1,81-1,55 (м, 2H), 1,55-1,28 (м, 2H), 1,04-0,68 (м, 6H).

^{13}C ЯМР (101 МГц, ДМСО) δ 173,3, 170,4, 158,9, 137,5, 126,9 (2C), 125,3, 119,9 (2C), 62,6, 59,3, 52,6, 31,1, 29,9, 26,6, 19,3, 17,0 (2C).

Этил 7-(((S)-1-(((S)-1-((4-(гидроксиметил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-

7-оксогептаноат [17]

ЕЕDQ (311 мг, 1,26 ммоль) добавляют к раствору соединения [15] (240 мг, 0,63 ммоль) и моноэтилпимелата [16] (0,123 мл, 0,69 ммоль) в смеси дихлорметана/метанола 2:1 (20 мл). Реакционную смесь оставляют в темноте при комнатной температуре на 12 часов. Растворители удаляют, и остаток очищают хроматографией на колонке 2-20% метанол в дихлорметане с получением продукта [17] в виде вязкого твердого вещества, 170 мг (45% выход). **МС:** m/z 572 $[M+Na]^+$.

1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,59 (д, $J=8,3$ Гц, 2H), 7,34 (д, $J=8,3$ Гц, 2H), 4,65-4,44 (м, 4H), 4,25 (д, $J=7,4$ Гц, 1H), 4,15 (дд, $J=14,2$, 7,1 Гц, 2H), 3,30-3,06 (м, 2H), 2,34 (дд, $J=13,9$, 6,7 Гц, 2H), 2,13 (д, $J=6,9$ Гц, 1H), 1,92 (дд, $J=14,1$, 6,2 Гц, 2H), 1,89-1,74 (м, 2H), 1,74-1,34 (м, 12H), 1,30 (дд, $J=18,0$, 10,9 Гц, 3H), 1,06-0,84 (м, 8H).

^{13}C ЯМР (101 МГц, MeOD) δ 174,5, 172,1, 171,7, 170,4, 158,9, 136,5, 126,8 (2C), 124,1, 120,9 (2C), 62,9, 59,5, 58,6, 53,0, 38,4, 34,7, 33,0, 29,8, 29,2, 27,9, 27,2, 25,0, 23,6, 17,5, 16,9, 12,7.

Этил 7-(((S)-1-(((S)-1-((4-(бромметил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)амино)-7-оксогептаноат [18]

Трибромид фосфора (0,043 мл, 0,46 ммоль) добавляют при 0°C к раствору соединения [17] (170 мг, 0,31 ммоль) в безводном тетрагидрофуране (5 мл). Смесь хранят при 0°C в течение 3 часов. Реакционную смесь переносят непосредственно на колонку с силикагелем для очистки флэш-хроматографией, 1-6% метанол в дихлорметане, с получением продукта [18] в виде белого твердого вещества, 170 мг (90% выход). **МС:** m/z 613 $[M+H]^+$; 635 $[M+Na]^+$.

1H ЯМР (400 МГц, Ацетон- d_6) δ 9,85 (д, $J=6,1$ Гц, 1H), 7,85 (дд, $J=25,2$, 8,1 Гц, 2H), 7,39 (дт, $J=44,7$, 22,3 Гц, 2H), 4,90-4,54 (м, 5H), 4,19-3,97 (м, 2H), 3,58 (т, $J=6,6$ Гц, 1H), 3,36 (д, $J=20,6$ Гц, 2H), 2,41 (дд, $J=21,3$, 6,3 Гц, 2H), 2,33-2,16 (м, 3H), 2,14-2,02 (м, 2H), 2,04-1,93 (м, 2H), 1,93-1,73 (м, 2H), 1,71-1,46 (м, 2H), 1,48-1,13 (м, 6H), 1,11-0,77 (м, 8H).

Этил 7-(((S)-3-метил-1-оксо-1-(((S)-1-оксо-1-(4-(((S)-7-оксо-6-(R)-5-оксопирролидин-2-карбоксамидо)-7-(фениламино) гептил) тию) метил) фенил) амино)-5-уреидопентан-2-ил) амино) бутан-2-ил) амино)-7-оксогептаноат [19]

ST7612AA1 (125 мг, 0,31 ммоль) растворяют в дегазированном метаноле (8 мл) в 50 мл колбе в атмосфере N₂. Раствор тиометилата натрия 1M в дегазированном метаноле (22 мг, 0,31 ммоль) добавляют при комнатной температуре к первому раствору. Перемешиваемую смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 30 минут. Раствор промывают N₂ в течение 5-10 минут для удаления MeSH, затем растворитель удаляют роторным выпариванием. Соединение [18] (170 мг, 0,31 ммоль), растворенное в минимальном количестве безводного диметилформамида, добавляют к остатку, и смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 16 часов. Растворитель удаляют роторным выпариванием, и неочищенный продукт очищают хроматографией на колонке, 1-40% метанол в дихлорметане, с получением соединения [19] в виде аморфного твердого вещества; 106 мг (40% выход). **МС:** *m/z* 896 [M+H]⁺; 918 [M+Na]⁺.

¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,60 (с, 4H), 7,43-7,18 (м, 4H), 7,13 (с, 1H), 4,55 (м, 4H), 4,40 (м, 2H), 4,13 (м, 2H), 3,66 (м, 6H), 3,19 (с, 4H), 2,75 (с, 2H), 2,37 (м, 6H), 2,11 (с, 2H), 1,97 (с, 1H), 1,82 (с, 2H), 1,64 (с, 7H), 1,42 (с, 4H), 1,27 (с, 4H), 1,01 (с, 6H).

7-(((S)-3-Метил-1-оксо-1-(((S)-1-оксо-1-(4-(((S)-7-оксо-6-(R)-5-оксопирролидин-2-карбоксамидо)-7-(фениламино) гептил) тию) метил) фенил) амино)-5-уреидопентан-2-ил) амино) бутан-2-ил) амино)-7-оксогептановая кислота [20]

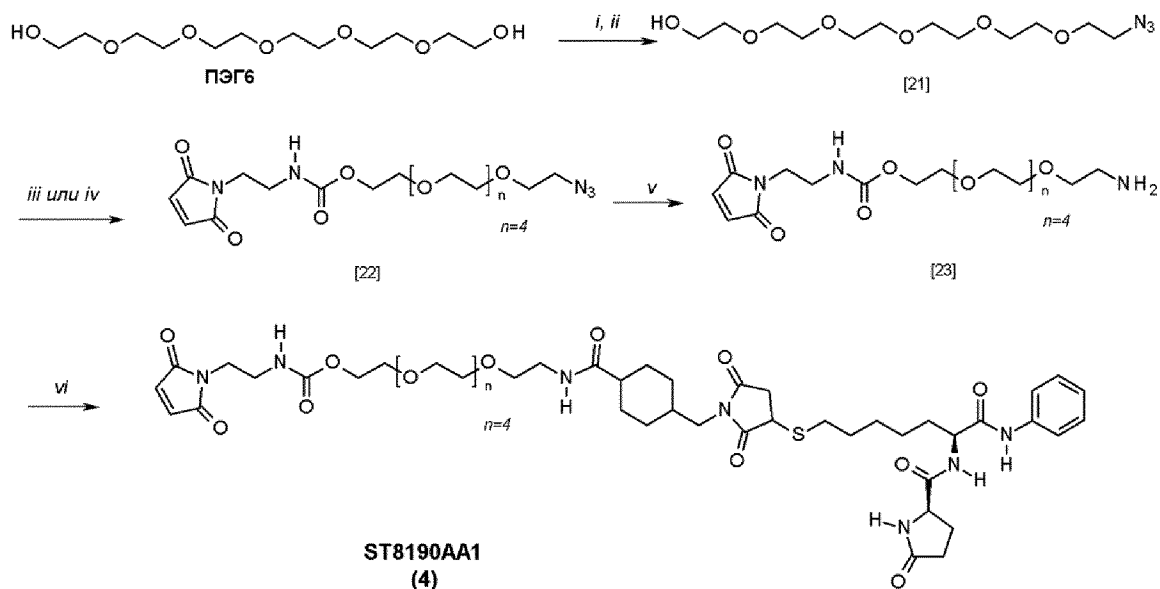
Моногидрат гидроксида лития (42 мг, 1 ммоль) добавляют к раствору [19] (300 мг, 0,33 ммоль) в смеси тетрагидрофурана/воды/этанола 1:1:1 (12 мл). Реакционную смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 6 часов, затем ее разбавляют этилацетатом и промывают HCl 1N. Неочищенный продукт (180 мг) сразу применяют на следующей стадии без очистки. **МС:** *m/z* 874 [M+Li]⁺; 890 [M+Na]⁺.

2,5-Диоксопирролидин-1-ил 7-(((S)-3-метил-1-оксо-1-(((S)-1-оксо-1-(4-(((S)-7-оксо-6-((R)-5-оксопирролидин-2-карбоксамидо)-7-(фениламино) гептил) тио) метил) фенил) амино)-5-уреидопентан-2-ил) амино) бутан-2-ил) амино)-7-оксогептаноат (3), ST8132AA1.

Дициклогексилкарбодиимид (70 мг, 0,35 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (34 мг, 0,3 ммоль) добавляют при комнатной температуре к перемешиваемому раствору соединения [20] (180 мг, 0,20 ммоль) в безводном диметилформамиде (3 мл). Смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 16 часов. Белое твердое вещество, образовавшееся в реакции, фильтруют для удаления дициклогексилмочевины, органическую фазу промывают HCl 0,1N и водой, затем сушат над безводным сульфатом натрия, и растворитель удаляют в вакууме. Полученный остаток подвергают флэш-хроматографии на колонке 2-20% метанол в дихлорметане с получением активированной кислоты (3) в виде белого вязкого твердого вещества, 109 мг (60% выход). МС: m/z 987 $[M+Na]^+$.

1H ЯМР (400 МГц, ДМСО) δ 10,10 (с, 4H), 9,95 (с, 1H), 7,59 (м, 4H), 7,33 (т, $J=7,5$ Гц, 2H), 7,24 (д, $J=7,8$ Гц, 2H), 7,08 (т, $J=7,2$ Гц, 1H), 6,00 (с, 1H), 5,42 (с, 2H), 4,43 (д, $J=14,3$ Гц, 2H), 3,67 (с, 1H), 3,12-2,90 (м, 2H), 2,84 (с, 4H), 2,65 (м, 5H), 2,53 (с, 6H), 2,17 (м, 2H), 1,63 (м, 10H), 1,36 (с, 4H), 0,94-0,75 (м, 8H).

Пример 4: Синтез и исследование полезной нагрузки (4), ST8190AA1



i. Тозил-Cl, ТЭА, ТГФ; ii. NaN_3 , ДМФ; iii. *p*-нитрофенилхлорформиат, ДМАП, ДХМ; iv. трифторацетат *N*-(2-аминоэтил)малеимида, ДБУ, ДХМ; v. PPh_3 , ТГФ; vi. 4-((2,5-диоксо-3-((6*S*)-7-оксо-6-(5-оксопирролидине-2-карбоксамидо)-7-(фениламино) гептил) тио) пирролидин-1-ил) метил) циклогексан-1-карбоновая кислота, ГОБт, ГВТУ, ДИПЭА, ТГФ.

2[-2-(2-{2-[2-(2-Гидроксиэтокси)этокси]этокси}этокси)этокси]этилазид [21]

К раствору гексаэтиленгликоля (50 г, 177 ммоль) и триэтиламина (14 мл, 100 ммоль) в ТГФ (250 мл) добавляют *пара*-толуолсульфонилхлорид (13 г, 70 ммоль) в ТГФ (250 мл), и раствор перемешивают в течение ночи. Затем раствор разбавляют CH_2Cl_2 (200 мл) промывают 1N HCl (3×150 мл) и насыщенным раствором соли (150 мл) и сушат над Na_2SO_4 . После фильтрации и выпаривания растворителей в вакууме остаток очищают хроматографией на колонке (двуокись кремния, 2% метанол в CH_2Cl_2) с получением монотозильного производного (24,4 г, 56 ммоль, 80% по сравнению с *p*-TsCl) в виде бесцветного масла: **ТСХ** (CH_2Cl_2 :MeOH 95:5): $R_f=0,32$.

^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) $\delta=7,79$ (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 7,33 (д, $J=8,0$ Гц, 2H), 4,09–4,07 (м, 2H), 3,74–3,56 (м, 22H), 2,97 (ш, 1H, OH), 2,44 (с, 3H); ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) $\delta=145,0$, 133,3, 130,0, 128,2, 72,7, 70,9–70,5, 69,5, 68,9, 61,9, 21,8; **МС**: m/z 437 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Затем смесь тозилъного производного (20,4 г, 56 ммоль) и NaN_3 (3,7 г, 57 ммоль) в ДМФ (150 мл) перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. ДМФ выпаривают в вакууме, и остаток растворяют в AcOEt и фильтруют над Celite®. AcOEt выпаривают при пониженном давлении с получением чистого соединения [21] (14,6 г, 48 ммоль, 85%): **ТСХ** (CH_2Cl_2 :MeOH 94:6): $R_f=0,38$; **^1H ЯМР** (400 МГц, CDCl_3) $\delta=3,72-3,57$ (м, 22H), 3,38-3,36 (м, 2H), 2,80 (шс, 1H); **^{13}C ЯМР** (100 МГц, CDCl_3) $\delta=72,8, 70,7-70,1, 61,8, 50,7$.

17-Азидо-3,6,9,12,15-пентаоксагептадецил (2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этил)карбамат [22]

К раствору соединения [21] (500 мг, 1,63 ммоль) в CH_2Cl_2 (50 мл) и ДМАП (1 г, 9 ммоль) добавляют 4-нитрофенилхлорформат (1,15 г, 5,7 ммоль) при 0°C. Смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем раствор разбавляют CH_2Cl_2 (50 мл) промывают 1N HCl (3×25 мл) и насыщенным раствором соли (50 мл) и сушат над Na_2SO_4 сухим. После фильтрации и выпаривания растворителей в вакууме остаток очищают хроматографией на колонке (CH_2Cl_2 :MeOH 95:5). Желтое твердое вещество отделяют (501 мг, 61%): $R_f=0,75$; **^1H ЯМР** (400 МГц, CDCl_3) $\delta=8,23$ (дд, $J=9,6, 2,8$ Гц, 2H), 7,35 (дд, $J=9,5, 2,9$ Гц, 2H), 4,43-4,35 (м, 2H), 3,81-3,74 (м, 2H), 3,74-3,52 (м, 24H), 3,34 (дд, $J=6,6, 3,5$ Гц, 2H); **МС**: m/z 471 $[\text{M}-\text{H}]^-$. пара-Нитро производное (501 мг, 1 ммоль) и ДБУ (1,5 мл, 10 ммоль) растворяют в CH_2Cl_2 и добавляют трифторацетат *N*-(2-аминоэтил)малеимида (254 мг, 1 ммоль). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Раствор затем разбавляют CH_2Cl_2 (25 мл), промывают 1N HCl (3×10 мл) и насыщенным раствором соли (20 мл) и сушат над Na_2SO_4 сухим. После фильтрации и выпаривания растворителей в вакууме остаток очищают хроматографией на колонке (CH_2Cl_2 :MeOH 95:5) с получением белого твердого вещества (47 мг, 0,1 ммоль, 10%). **^1H ЯМР** (400 МГц, CDCl_3) δ : 7,80 (с, 1H), 3,92-3,50 (м, 24H), 3,38-3,36 (м, 4H); **^{13}C ЯМР** (100 МГц, CDCl_3) $\delta=171,2, 157,2, 135,6, 72,8, 70,7-70,1, 61,8, 50,7$. **МС**: m/z 474 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

17-Амино-3,6,9,12,15-пентаоксагептадецил (2-(2,5-диоксо-

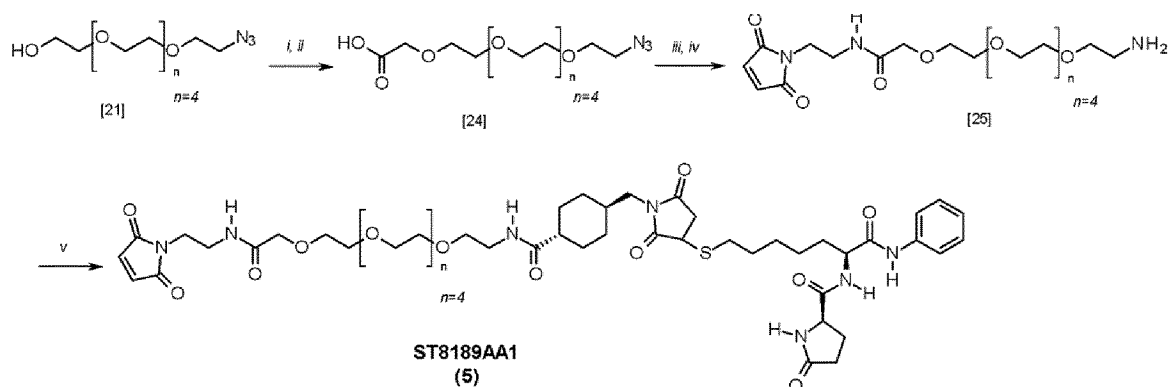
2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил) этил) карбамат [23]

Раствор соединения [22] (47 мг, 0,1 ммоль) в сухом ТГФ (10 мл) охлаждают до 0°C. Добавляют трифенилфосфин (53 г, 0,2 ммоль), и смесь перемешивают в течение 24 ч при комнатной температуре. Затем добавляют H₂O (5 мл) для гидролиза промежуточных фосфорных аддуктов, и раствор перемешивают в течение еще 24 ч при комнатной температуре. ТГФ выпаривают, и твердый остаток суспендируют в воде (10 мл). Нерастворимые соли фильтруют, и фильтрат промывают толуолом (5×5 мл) и выпаривают с получением соединения [23] (44 мг, 0,1 ммоль, 99%) в виде бледно-желтого масла, которое применяют на следующей стадии без дальнейшей очистки. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ=7,80 (с, 1H), 3,92-3,50 (м, 22H), 3,38-3,36 (м, 4H) 3,01-3,11 (м, 2H), 1,81 (шс, 2H); MS: m/z 448 [M+H]⁺.

1-((1S,4R)-4-((2,5-Диоксо-3-(((6S)-7-оксо-6-(5-оксопирролидин-2-карбоксамидо)-7-(фениламино) гептил) тию) пирролидин-1-ил) метил) циклогексил)-1-оксо-5,8,11,14,17-пентаокса-2-азанонадекан-19-ил (2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил) этил) карбамат (4), ST8190AA1

4-((2,5-Диоксо-3-(((6S)-7-оксо-6-(5-оксопирролидин-2-карбоксамидо)-7-(фениламино) гептил) тию) пирролидин-1-ил) метил) циклогексан-1-карбоновую кислоту (60 мг, 0,1 ммоль) растворяют в сухом ТГФ (15 мл), и реакционную смесь охлаждают до 0°C. Добавляют ГОБт (20 мг, 0,15 ммоль), ГВТУ (57 мг, 0,15 ммоль), соединение [23] (44 мг, 0,1 ммоль) и ДИПЭА (48 мкл, 0,25 ммоль), и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Раствор затем разбавляют AcOEt (15 мл) и экстрагируют H₂O (3×10 мл). Органические фазы сушат над Na₂SO₄ сухим, и после фильтрации и выпаривания растворителей в вакууме остаток очищают хроматографией на колонке (CH₂Cl₂:MeOH 98:2) с получением **ST8190AA1** в виде бесцветного масла (31 мг, 0,03 ммоль, 10%). MS: m/z 1031 [M+H]⁺.

Пример 5: Синтез и исследование полезной нагрузки (5), ST8189AA1



i. EtOCOCH₂Br, NaN, ТГФ; ii. LiOH, ТГФ, H₂O, EtOH; iii. трифторацетат *N*-(2-аминоэтил)малеимида, ДБУ, ДХМ; iv. PPh₃, ТГФ; v. 4-((2,5-диоксо-3-(((6*S*)-7-оксо-6-(5-оксопирролидин-2-карбоксамидо)-7-(фениламино)гептил)тио)-пирролидин-1-ил)метил)циклогексан-1-карбоновая кислота, ГОВт, ГВТУ, ДИПЭА, ТГФ.

20-Азидо-3,6,9,12,15,18-гексаоксаэйкозановая кислота [24]

NaN 60% масс. в минеральном масле (29 мг, 0,39 ммоль) суспендируют в сухом ТГФ (5 мл) и раствор соединения [21] (100 мг, 0,32 ммоль) в сухом ТГФ (3 мл) медленно добавляют при 0°C. После перемешивания в течение 20 мин при 0°C добавляют раствор этилбромацетата (53 мкл, 0,48 ммоль) в сухом ТГФ (3 мл), и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Медленно добавляют H₂O (1 мл), и растворитель выпаривают при пониженном давлении. Полученное твердое вещество очищают флэш-хроматографией (CH₂Cl₂:MeOH 95:5) с получением бледно-розового масла с количественным выходом (51 мг, 0,13 ммоль). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ=4,28 (с, 2H); 4,21 (кв, 2H); 3,92-3,50 (м, 22H), 3,38-3,36 (м, 4H), 2,05-1,98 (м, 2H); 1,23 (т, 3H); МС: *m/z* 394 [M+H]⁺. Этиловый эфир (51 мг, 0,13 ммоль) растворяют в 1:1:1 смеси H₂O, ТГФ и EtOH (15 мл) и добавляют моногидрат LiOH (16 мг, 0,39 ммоль). Смесь перемешивают при кипении с обратным холодильником в течение 2 ч, затем добавляют HCl до pH 7. Растворители выпаривают при пониженном давлении, и полученное твердое вещество промывают EtOH (2×10 мл). Раствор выпаривают с получением бесцветного масла соединения [24] (47 мг, 0,13 ммоль), сразу применяют на следующей стадии. МС: *m/z* 364 [M+H]⁺.

20-Амино-*N*-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-1-ил)этил)-

3,6,9,12,15,18-гексаоксаэйкозанамид [25]

Раствор соединения [24] (47 мг, 0,13 ммоль) растворяют в сухом ТГФ (15 мл) и реакционную смесь охлаждают до 0°C. Добавляют ГОБт (26 мг, 0,2 ммоль), ГВТУ (76 мг, 0,2 ммоль), трифторацетат *N*-(2-аминоэтил)малеимида (33 мг, 0,13 ммоль) и ДИПЭА (63 мкл, 0,33 ммоль), и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Затем раствор разбавляют AcOEt (15 мл) и экстрагируют H₂O (3×10 мл). Органические фазы сушат над Na₂SO₄ сухим и, после фильтрации и выпаривания растворителей в вакууме, остаток очищают хроматографией на колонке (CH₂Cl₂:MeOH 98:2) с получением бесцветного масла (49 мг, 0,10 ммоль). **МС:** *m/z* 488 [M+H]⁺.

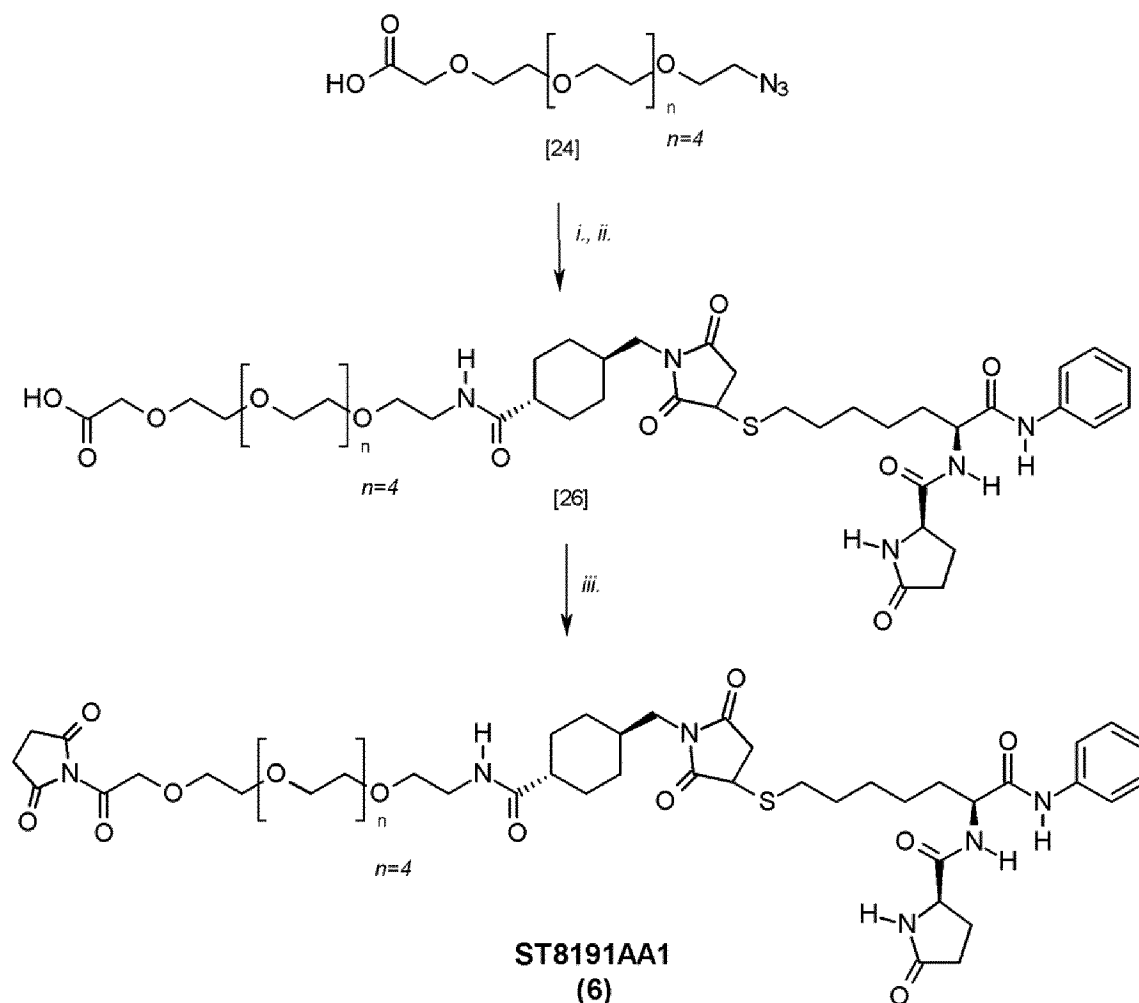
Полученное производное азидо (49 мг, 0,10 ммоль) растворяют в сухом ТГФ (10 мл) при 0°C. Добавляют трифенилфосфин (53 г, 0,2 ммоль), и смесь перемешивают в течение 24 ч при комнатной температуре. Затем добавляют H₂O (5 мл) для гидролиза промежуточных фосфорных аддуктов, и раствор перемешивают в течение еще 24 ч при комнатной температуре. ТГФ выпаривают, и твердый остаток суспендируют в воде (10 мл). Нерастворимые соли фильтруют, и фильтрат промывают толуолом (5×5 мл) и выпаривают с получением соединения [25] (46 мг, 0,1 ммоль, 99%) в виде бледно-желтого масла, которое применяют на следующей стадии без дальнейшей очистки. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ=8,03 (шс, 1H); 7,80 (с, 1H), 4,26 (с, 2H); 3,92-3,50 (м, 26H), 3,03-3,07 (м, 2H), 1,81 (шс, 2H); **МС:** *m/z* 462 [M+H]⁺.

N-((2S)-7-((1-((4-((1-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-4-оксо-6,9,12,15,18,21-гексаокса-3-азатрикозан-23-ил) карбамоил) циклогексил) метил)-2,5-диоксопирролидин-3-ил) тио)-1-оксо-1-(фениламино) гептан-2-ил)-5-оксопирролидин-2-карбоксамид (5), ST8189AA1

4-((2,5-Диоксо-3-(((6S)-7-оксо-6-(5-оксопирролидин-2-карбоксамидо)-7-(фениламино) гептил) тио) пирролидин-1-ил) метил) циклогексан-1-карбоновую кислоту (60 мг, 0,1 ммоль) растворяют в сухом ТГФ (15 мл), и реакционную смесь охлаждают до 0°C. Добавляют ГОБт (20 мг, 0,15 ммоль), ГВТУ (57 мг, 0,15

ммоль), соединение [25] (46 мг, 0,1 ммоль) и ДИПЭА (48 мкл, 0,25 ммоль), и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Раствор затем разбавляют AcOEt (15 мл) и экстрагируют H₂O (3×10 мл). Органические фазы сушат над Na₂SO₄ сухим и, после фильтрации и выпаривания растворителей в вакууме, остаток очищают хроматографией на колонке (CH₂Cl₂:MeOH 98:2) с получением полезной нагрузки ST8189AA1 в виде бесцветного масла (21 мг, 0,02 ммоль, 20%). МС: *m/z* 1045 [M+H]⁺.

Пример 6: Синтез и исследование полезной нагрузки (6), ST8191AA1



i. PPh₃, ТГФ; ii. 4-((2,5-диоксо-3-((6*S*)-7-оксо-6-(5-оксопирролидин-2-карбоксамидо)-7-(фениламино) гептил) тию) - пирролидин-1-ил) метил) циклогексан-1-карбоновая кислота, ДЦК, NHS, ДХМ; iii. ДЦК, NHS, ДХМ.

1-(4-((2,5-Диоксо-3-((6*S*)-7-оксо-6-(5-оксопирролидин-2-карбоксамидо)-7-(фениламино) гептил) тию) пирролидин-1-ил) метил) циклогексил)-1-оксо-5,8,11,14,17,20-гексаокса-2-

азадокозан-22-овая кислота [26]

Азид [24] (49 мг, 0,10 ммоль) растворяют в сухом ТГФ (10 мл) при 0°C. Добавляют трифенилфосфин (53 мг, 0,2 ммоль), и смесь перемешивают в течение 24 ч при комнатной температуре. Затем добавляют H₂O (5 мл) для гидролиза промежуточных фосфорных аддуктов, и раствор перемешивают в течение еще 24 ч при комнатной температуре. ТГФ выпаривают, и твердый остаток суспендируют в воде (10 мл). Нерастворимые соли фильтруют, и фильтрат промывают толуолом (5×5 мл) и выпаривают с получением 20-амино-3,6,9,12,15,18-гексаоксаэйкозановой кислоты (46 мг, 0,1 ммоль, 99%) в виде бледно-желтого масла, которое применяют на следующей стадии без дальнейшей очистки. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ=12,0 (шс, 1H); 4,26 (с, 2H); 3,92-3,50 (м, 22H), 3,03-3,07 (м, 2H), 1,81 (шс, 2H); МС: m/z 340 [M+H]⁺.

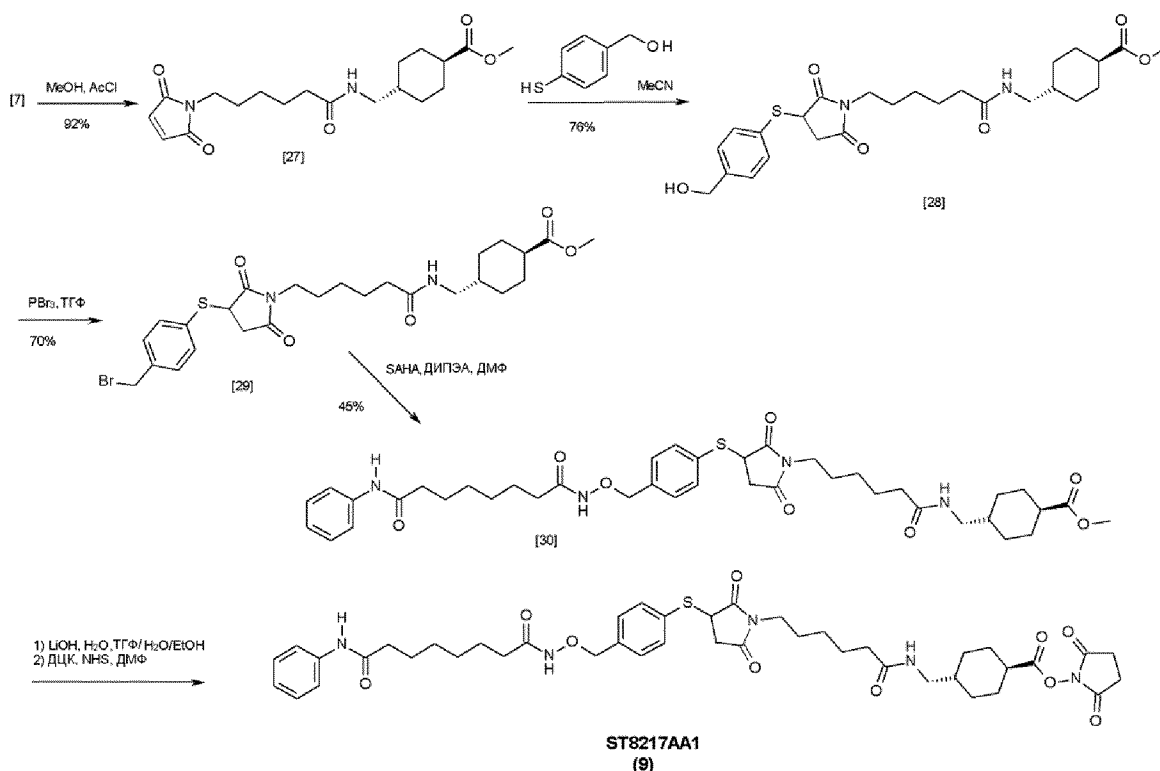
4-((2,5-Диоксо-3-(((6S)-7-оксо-6-(5-оксопирролидин-2-карбоксамидо)-7-(фениламино) гептил) тио)-пирролидин-1-ил)метил)циклогексан-1-карбоновую кислоту (80 мг, 0,11 ммоль) в сухом CH₂Cl₂ (5 мл) добавляют при комнатной температуре к раствору, содержащему дициклогексилкарбодиимид (0,11 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (0,1 ммоль) в сухом CH₂Cl₂, и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 3 часов. Белое твердое вещество фильтруют с дихлорметаном для удаления дициклогексилмочевины, органическую фазу промывают HCl 0,1N и H₂O, затем сушат над сухим сульфатом натрия и растворитель удаляют при пониженном давлении. Полученный остаток очищают флэш-хроматографией на колонке с получением активированной кислоты в виде белого воскообразного продукта (выход 90%), который растворяют в диметоксиэтаноле (5 мл) и обрабатывают 20-амино-3,6,9,12,15,18-гексаоксаэйкозановой кислотой (46 мг, 0,1 ммоль), растворенной в смеси тетрагидрофурана и водного бикарбоната натрия (15 мг, 0,15 ммоль в 2 мл воды). Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 16 часов. Добавляют раствор лимонной кислоты 15% в воде (2,5 мл), и смесь экстрагируют 10% изопропиловым спиртом в этилацетате (2×5 мл). Растворитель удаляют роторным выпариванием. После добавления

диэтилового эфира и облучения ультразвуком образуется твердое вещество. Фильтрация с последующим промыванием диэтиловым эфиром дает соединение [26] в виде белого твердого вещества, 65 мг (70%). **МС:** m/z 918 $[M-H]^-$.

2,5-Диоксопирролидин-1-ил 1-(4-(2,5-диоксо-3-((6S)-7-оксо-6-(5-оксопирролидин-2-карбоксамидо)-7-(фениламино) гептил) тию) пирролидин-1-ил) метил) циклогексил)-1-оксо-5,8,11,14,17,20-гексаокса-2-азадокозан-22-оат (6), ST8191AA1.

Соединение [26] (65 мг, 0,07 ммоль) в сухом CH_2Cl_2 (5 мл) добавляют при комнатной температуре к раствору дициклогексилкарбодиимида (0,1 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (0,07 ммоль), и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 3 часов. Белое твердое вещество фильтруют дихлорметаном для удаления дициклогексилмочевины, органическую фазу промывают HCl 0,1N и H_2O , затем сушат над сухим сульфатом натрия и растворитель удаляют при пониженном давлении. Полученный остаток очищают флэш-хроматографией на колонке с получением активированной кислоты в виде белого твердого вещества 61 мг (85%). **МС:** m/z 1020 $[M+H]^+$.

Пример 7: Синтез и исследование полезной нагрузки (9), ST8217A1



Метил (1R,4R)-4-((6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил) гексанамидо) метил) циклогексан-1-карбоксилат [27]

Ацетилхлорид (1,01 мл, 14,26 ммоль) добавляют к раствору кислоты [7] (1,00 г, 2,85 ммоль) в MeOH (50 мл) в круглодонной колбе под N₂. Полученный раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 3 ч, и затем раствор концентрируют в вакууме. Остаток растворяют в CH₂Cl₂ (30 мл) и промывают насыщенным раствором водного бикарбоната натрия (3×15 мл) и насыщенным раствором соли (2×15 мл). Органическую фазу сушат над сульфатом натрия, фильтруют и концентрируют в вакууме с получением 950 мг (2,61 ммоль) соединения [27] в виде белого твердого вещества (выход 92%). ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃, δ ч./млн., J Гц): δ 6,65 (с, 2H), 3,62 (с, 3H), 3,50-3,46 (м, 2H), 3,07 (т, J=6,4, 2H), 2,23-2,11 (м, 3H), 1,97 (дд, J=13,6, 2,8, 2H), 1,78 (дд, J=12,8, 2,0, 2H), 1,66-1,55 (м, 4H), 1,44-1,26 (м, 5H), 0,99-0,92 (м, 2H). MS: m/z 365 [M+1]⁺; 387 [M+23]⁺. ТСХ R_f: 0,75 (CH₂Cl₂:MeOH 9:1).

Метил (1R,4R)-4-((6-(3-((4-(гидроксиметил) фенил) тио)-2,5-диоксопирролидин-1-ил) гексанамидо) метил) циклогексан-1-карбоксилат [28]

(4-Меркаптофенил)метанол [36] (548 мг, 3,91 ммоль) добавляют к раствору соединения [27] (950 мг, 2,61 ммоль) в CH_3CN (20 мл) в круглодонной колбе в атмосфере N_2 . Полученный раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 3 ч, и затем раствор концентрируют в вакууме. Неочищенную реакционную смесь очищают флэш-хроматографией на силикагеле (петролейный эфир:EtOAc 1:4) с получением 1024 мг (2,03 ммоль) соединения [28] в виде бледно-желтого вязкого масла (выход 78%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , δ ч./млн., J Гц): δ 7,46 (д, $J=7,6$, 2H), 7,31 (д, $J=8,0$, 2H), 5,81 (шс, 1H), 4,67 (с, 2H), 3,91-3,89 (м, 1H), 3,63 (с, 3H), 3,38-3,32 (м, 2H), 3,16-3,03 (м, 4H), 2,82 (шс, 1H), 2,21-1,96 (м, 5H), 1,77 (д, $J=12,8$, 2H), 1,50-1,23 (м, 9H), 1,02-0,92 (м, 2H). **МС:** m/z 527 $[\text{M}+23]^+$; 543 $[\text{M}+39]^+$. **ТСХ** R_f : 0,3 (EtOAc).

Метил (1R,4R)-4-((6-(3-((4-(бромметил)фенил)тио)-2,5-диоксопирролидин-1-ил)гексанамидо)метил)циклогексан-1-карбоксилат [29]

PBr_3 (28 мкл, 0,30 ммоль) добавляют при 0°C к раствору спирта [28] (100 мг, 0,20 ммоль) в сухом ТГФ (5 мл) в круглодонной колбе в атмосфере N_2 . Полученный раствор перемешивают при 0°C в течение 2 ч, и затем нагревают до комнатной температуры; после добавления CH_2Cl_2 (1 мл) раствор становится оранжевым, и его концентрируют в вакууме. Неочищенную реакционную смесь очищают флэш-хроматографией на силикагеле (EtOAc 100%) с получением 78 мг (0,14 ммоль) соединения [29] в виде ярко-оранжевого масла (выход 70%). ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , δ ч./млн., J Гц): δ 7,56 (д, $J=8$, 2H), 7,31 (д, $J=8,0$, 2H), 4,66 (с, 2H), 3,92-3,89 (м, 1H), 3,60 (с, 3H), 3,37-3,32 (м, 2H), 3,16-3,05 (м, 4H), 2,21-1,99 (м, 5H), 1,77 (д, $J=12,4$, 2H), 1,50-1,28 (м, 9H), 1,01-0,92 (м, 2H). **МС:** m/z 589,591 $[\text{M}+23]^+$. **ТСХ** R_f : 0,6 (EtOAc).

л-{[N-8-Анилино-8-оксооктаноил(аминоокси)]метил}фенилтио)-2,5-диоксо-1-пирролидинил]гексаноиламино}метил)циклогексанкарбоксилат [30]

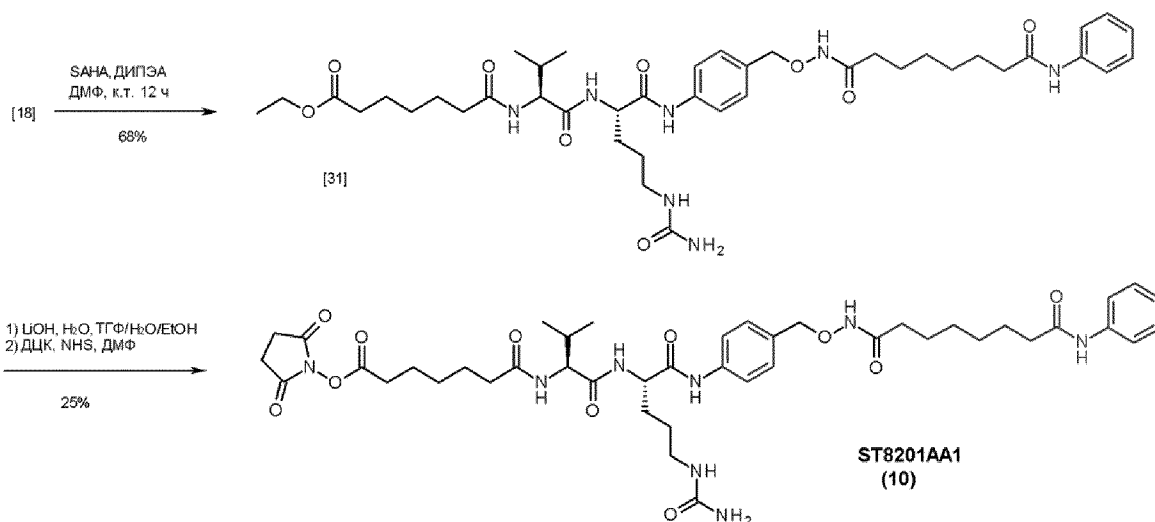
В пробирке в атмосфере N_2 бромид [29] (78 мг, 0,14 ммоль),

SAHA (50 мг, 0,18 ммоль) и 1 мл сухого ДМФ смешивают при комнатной температуре. Свежедистиллированный ДИПЭА (45 мг, 0,36 ммоль) добавляют по каплям, и раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 12 ч. Растворитель затем удаляют роторным выпариванием и высоким вакуумом. Остаток очищают флэш-хроматографией на колонке с градиентом 0–20% метанол в дихлорметане с получением продукта [30] в виде белого твердого вещества, 48 мг, 45% выход. МС: m/z 751,4 [M+H]⁺.

2,5-Диоксо-1-пирролидинил 4-({6-[3-(p-{[N-8-анилино-8-оксооктаноил (аминоокси)]метил}фенилтио)-2,5-диоксо-1-пирролидинил]гексаноиламино}метил)циклогексанкарбоксилат (9), ST8217AA1

Моногидрат гидроксида лития (8 мг, 0,18 ммоль) добавляют к раствору [30] (48 мг, 0,063 ммоль) в смеси тетрагидрофуран/вода/этанол 1:1:1 (6 мл). Реакционную смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 2 часов, затем ее разбавляют этилацетатом и промывают HCl 1N. Неочищенный продукт (25 мг) сразу применяют на следующей стадии без дальнейшей очистки. Дициклокарбодиимид (11 мг, 0,05 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (6 мг, 0,045 ммоль) добавляют при комнатной температуре к перемешиваемому раствору неочищенного продукта, полученного ранее (25 мг, 0,034 ммоль) в сухом ДМФ (0,80 мл). Смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 16 часов. Белое твердое вещество, полученное в этой реакции, фильтруют с дихлорметаном для удаления дициклогексилмочевины, органическую фазу промывают HCl 0,1N и водой, затем сушат над безводным сульфатом натрия, и растворитель удаляют роторным выпариванием. Полученный остаток подвергают флэш-хроматографии на колонке с градиентом 0–2% метанол в дихлорметане с получением активированной кислоты **ST8217AA1** в виде белого вязкого твердого вещества; МС: m/z 856,4 [M+Na]⁺.

Пример 8: Синтез и исследование полезной нагрузки (10), ST8201AA1



Этил 7-(((S)-3-метил-1-оксо-1-(((S)-1-оксо-1-(4-((8-оксо-8-(фениламино) октанамидо) окси) метил) фенил) амино)-5-уреидопентан-2-ил) амино) бутан-2-ил) амино)-7-оксогептаноат [31]

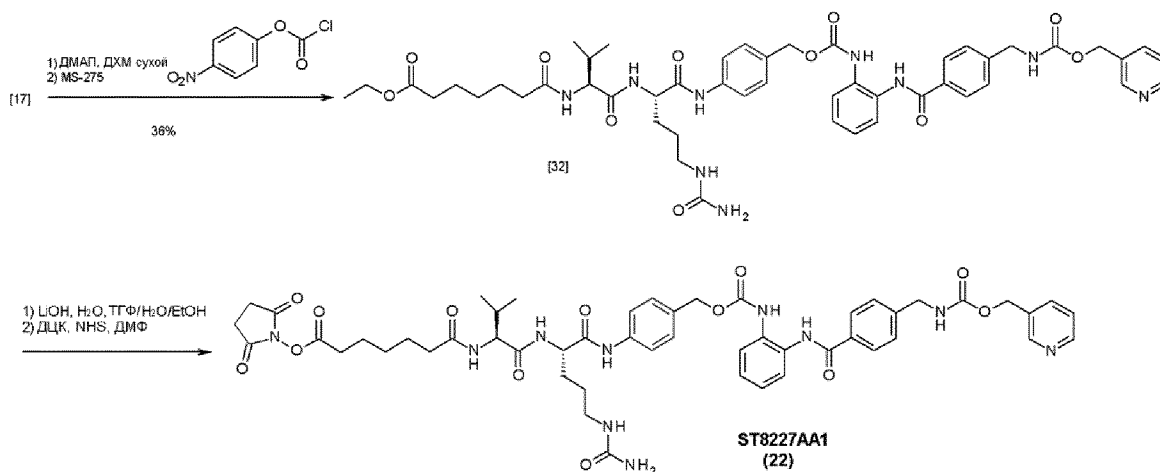
В пробирке в атмосфере N_2 бромид [18] (60 мг, 0,09 ммоль), **SAHA** (28 мг, 0,10 ммоль) и 1 мл сухого ДМФ смешивают при комнатной температуре. Свежедистиллированный ДИПЗА (25 мг, 0,20 ммоль) добавляют по каплям, и раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 12 ч. Растворитель затем удаляют роторным выпариванием и в высоком вакууме. Остаток очищают флэш-хроматографией на колонке с градиентом 0-20% метанол в дихлорметане с получением продукта [31] в виде белого твердого вещества 48 мг, 68% выход. **МС:** m/z 795,9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 818,0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **^1H ЯМР** (400 МГц, ДМСО) δ 7,63-7,598 (м, 2H), 7,57 (д, $J=8$ Гц, 2H), 7,39 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,313 (т, $J=8$ Гц, 2H), 7,09 (т, $J=8$; 1H), 4,89 (с, 2H), 4,58 (с, 2H), 4,20 (д, $J=7,2$, 1H), 4,14 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 4,10 (т, $J=7,4$ Гц, 1H), 3,56-3,45 (м, 1H), 3,34 (д, $J=7,8$ Гц, 2H), 2,41-2,37 (м, 1H), 2,34-2,30 (м, 2H), 2,13-2,06 (м, 2H), 1,79-1,60 (м, 4H), 1,42-1,36 (м, 4H), 1,28-1,24 (м, 3H), 1,01-0,97 (м, 6H).

2,5-Диоксопирролидин-1-ил 7-(((S)-3-метил-1-оксо-1-(((S)-1-оксо-1-(4-(((S)-7-оксо-6-((R)-5-оксопирролидин-2-карбоксамидо)-7-(фениламино) гептил) тио) метил) фенил) амино)-5-уреидопентан-2-ил) амино) бутан-2-ил) амино)-7-оксогептаноат (10), ST8201AA1

Моногидрат гидроксида лития (8 мг, 0,18 ммоль) добавляют к

раствору соединения **40** (48 мг, 0,06 ммоль) в смеси тетрагидрофурана/воды/этанола 1:1:1 (6 мл). Реакционную смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 6 часов, затем разбавляют этилацетатом и промывают HCl 1N. Неочищенный продукт (25 мг) применяют на следующей стадии без очистки. МС: m/z 765,7 $[M-H]^-$. Дициклокарбодиимид (11 мг, 0,05 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (6 мг, 0,045 ммоль) добавляют при комнатной температуре к перемешиваемому раствору полученного ранее неочищенного продукта (25 мг, 0,03 ммоль) в сухом ДМФ (0,80 мл). Смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 16 часов. Белое твердое вещество, полученное в этой реакции, фильтруют с дихлорметаном для удаления дициклогексилмочевины, органическую фазу промывают HCl 0,1N и водой, затем сушат над безводным сульфатом натрия и растворитель удаляют роторным выпариванием. Полученный остаток подвергают флэш-хроматографии на колонке с градиентом 0–2% метанол в дихлорметане с получением активированной кислоты **ST8201AA1** в виде белого вязкого твердого вещества; МС: m/z 887,2 $[M+Na]^+$.

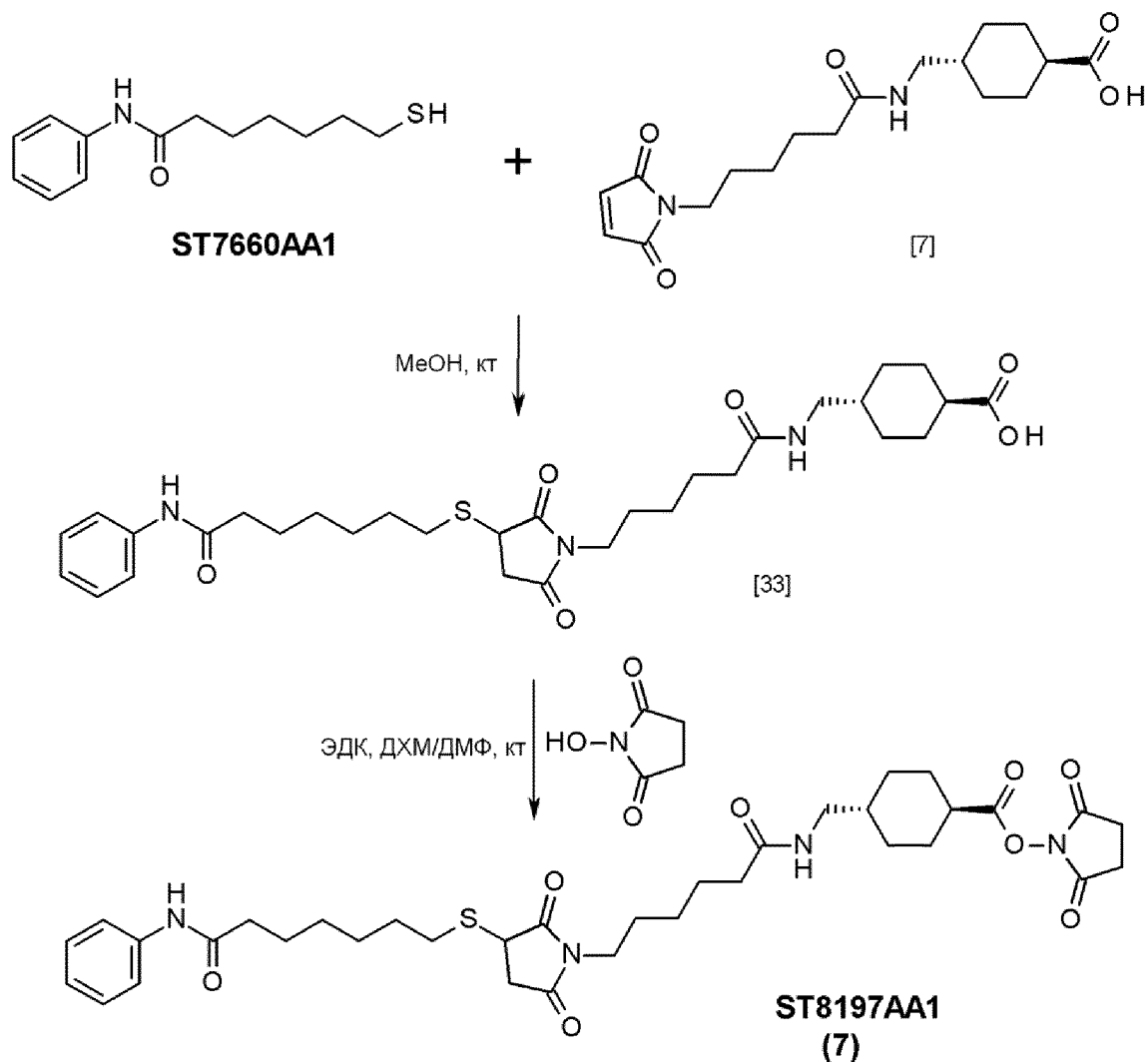
Пример 9: Синтез и исследование полезной нагрузки (22), ST8227AA1



Синтез и исследование полезной нагрузки (22), ST8227AA1: В пробирке, охлажденной до 0°C, в атмосфере N₂ соединение [17] (50 мг, 0,09 ммоль) и 4-нитрофенилхлорформиат (62 мг, 0,3 ммоль), 3 мл сухого ДХМ (с 1 каплей сухого ДМФ) и 4-диметиламинопиридин (60 мг, 0,49 ммоль) смешивают. Затем смесь перемешивают при комнатной температуре и отслеживают ТСХ. Когда превращение

соединения [17] завершится, добавляют **MC275** (40 мг, 0,10 ммоль) и реакционную смесь перемешивают в течение еще 12 ч при комнатной температуре. Затем смесь разбавляют дихлорметаном и промывают HCl 1N, сушат над безводным сульфатом натрия и растворитель удаляют роторным выпариванием. Неочищенный сложный эфир растворяют в 1:1:1 смеси H₂O, ТГФ и EtOH (5 мл) и добавляют моногидрат LiOH (8,2 мг, 0,2 ммоль). Смесь перемешивают при кипении с обратным холодильником в течение 2 ч, затем добавляют HCl до pH 7. Растворители выпаривают при пониженном давлении, и полученное твердое вещество промывают EtOH (2×10 мл). Раствор выпаривают с получением бесцветного масла. Неочищенный сложный эфир растворяют в 1:1:1 смеси H₂O, ТГФ и EtOH (5 мл) и добавляют моногидрат LiOH (8,2 мг, 0,2 ммоль). Смесь перемешивают при кипении с обратным холодильником в течение 2 ч, затем добавляют HCl до pH 7. Растворители выпаривают при пониженном давлении, и полученное твердое вещество промывают EtOH (2×2 мл). Остаток очищают флэш-хроматографией на колонке с градиентом 0–20% метанол в дихлорметане с получением продукта **ST8227AA1** в виде твердого вещества (12 мг, 13% выход). **МС:** m/z 1044,3 [M+Na]⁺.

Пример 10. Синтез и исследование полезной нагрузки (7), ST8197AA1



N-Фенил-7-сульфанилгептанами́д (**ST7660AA1**) (60 мг, 0,25 ммоль) суспендируют в дегазированном метаноле (1 мл); соединение **[7]** (84 мг, 0,24 ммоль) добавляют при комнатной температуре к перемешиваемой смеси, и через несколько минут получают прозрачный раствор. Раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 20 часов до тех пор, пока отслеживание ТСХ не покажет полное превращение соединения **[7]**. Растворитель затем удаляют роторным выпариванием, и неочищенный продукт очищают хроматографией на колонке с градиентом 2-10% метанол в дихлорметане. Соединение **[33]** получают в виде белого твердого вещества, 115 мг (81% выход). **МС:** m/z 610 [M+Na]⁺.

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆) δ 11,97 (шс, 1H), 9,85 (с, 1H), 7,72 (т, J=5,6 Гц, 1H), 7,59 (д, J=7,8 Гц, 2H), 7,28 (т, J=7,8 Гц, 2H), 7,02 (т, J=7,3 Гц, 1H), 3,93 (дд, J=9,0, 3,7 Гц, 1H), 3,35 (т, J=6,8 Гц, 2H), 3,18 (дд, J=18,3, 9,0, 1H), 2,88 (т, J=6,3 Гц, 2H), 2,79-2,63 (м, 2H), 2,30 (т, J=7,3 Гц, 2H), 2,14-

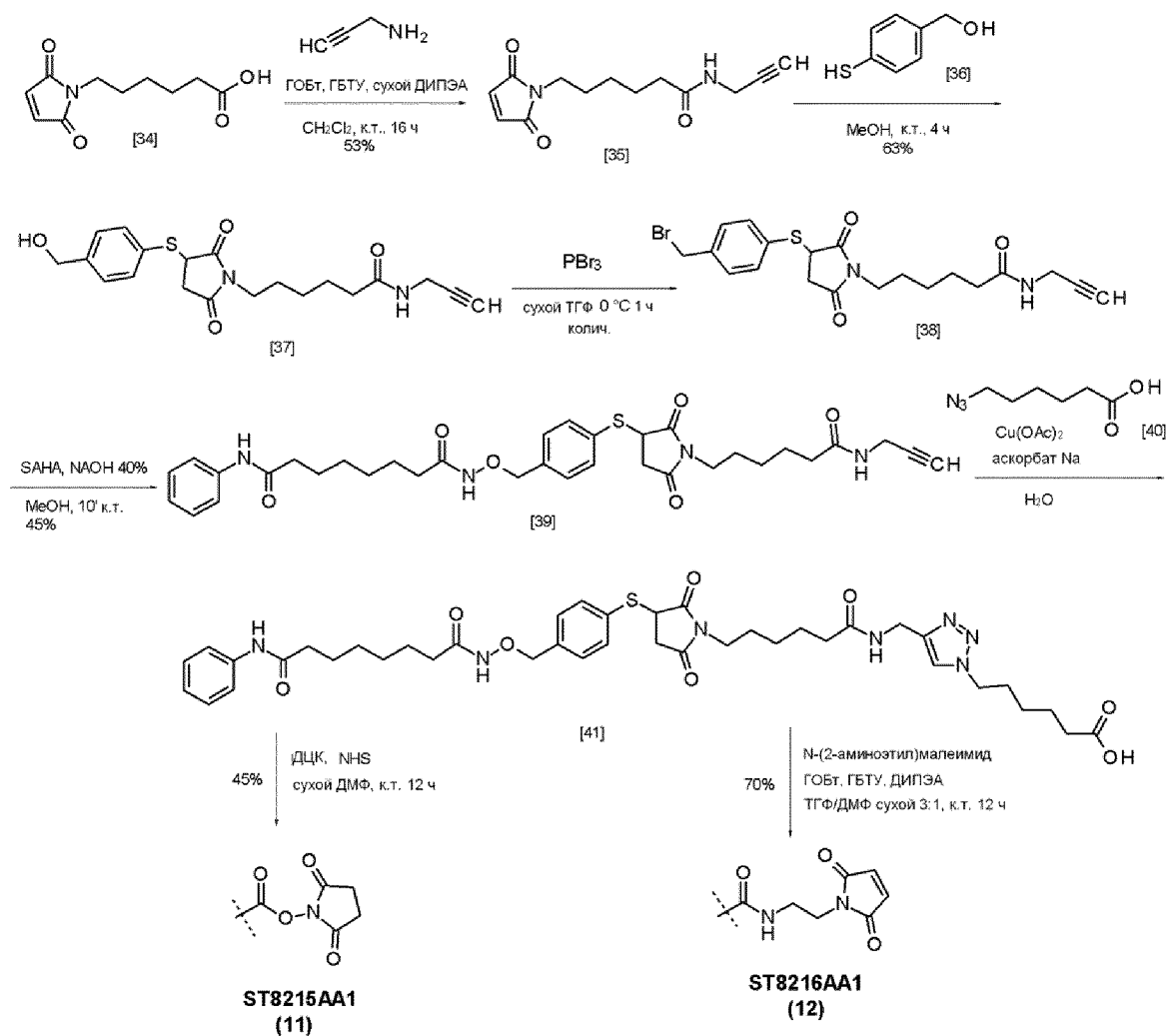
2,05 (м, 1H), 2,04 (т, $J=7,5$ Гц, 2H), 1,92-1,84 (м, 2H), 1,74-1,67 (м, 2H), 1,63-1,15 (м, 18H), 0,94-0,83 (м, 2H).

Соединение [33] (110 мг, 0,19 ммоль) суспендируют в безводном дихлорметане (5,5 мл), содержащем 0,12 мл сухого диметилформамида. N-гидроксисукцинимид (33 мг, 0,28 ммоль) и гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида (61 мг, 0,32 ммоль) добавляют при комнатной температуре, и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 24 часов. Смесь разбавляют дихлорметаном (70 мл) и промывают водой (40 мл) и насыщенным раствором соли (30 мл). Органическую фазу сушат над Na_2SO_4 , фильтруют и концентрируют роторным выпариванием. Неочищенный продукт очищают флэш-хроматографией в 2-6% метаноле в дихлорметане. Продукт **ST8197AA1** получают в виде белого твердого вещества, 97 мг (76% выход). **МС:** m/z 707 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

^1H ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ 9,83 (с, 1H), 7,73 (т, $J=5,4$ Гц, 1H), 7,59 (д, $J=7,8$ Гц, 2H), 7,28 (т, $J=7,3$ Гц, 2H), 7,02 (т, $J=7,3$ Гц, 1H), 3,94 (дд, $J=8,8$, 3,4 Гц, 1H), 3,36 (т, $J=6,8$ Гц, 2H), 3,18 (дд, $J=18,3$, 8,8, 1H), 2,91 (т, $J=6,0$ Гц, 2H), 2,81 (с, 4H), 2,80-2,62 (м, 3H), 2,30 (т, $J=7,3$ Гц, 2H), 2,18-1,97 (м, 4H), 1,80-1,72 (м, 2H), 1,64-1,27 (м, 16H), 1,27-1,15 (м, 2H), 1,06-0,94 (м, 2H).

^{13}C ЯМР (500 МГц, DMSO-d_6) δ 177,2, 175,6, 172,3, 171,6, 171,4, 170,7, 139,8, 129,1, 123,4, 119,5, 44,8, 39,6, 38,5, 37,1, 36,8, 36,3, 35,6, 30,8, 29,3 (4C), 29,0, 28,7, 28,6, 28,4, 27,3, 26,3, 25,9, 25,4, 25,3.

Пример 11: Синтез и исследование полезных нагрузок (11) и 12, ST8215AA1 и ST8216AA1, соответственно



6-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-N-(проп-2-ин-1-ил)гексанамид [35]: В колбу, содержащую раствор соединения [34] (500 мг, 2,37 ммоль) в сухом CH_2Cl_2 (25 мл), в атмосфере N_2 , добавляют пропаргиламин (162 мкл, 2,37 ммоль), ГОБТ H_2O (435 мг, 2,84 ммоль), ГВТУ (1077 мг, 2,84 ммоль) и ДИПЭА (1,24 мл, 7,10 ммоль) при 0°C , и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 16 ч. После завершения реакции смесь разбавляют дихлорметаном и промывают водой, HCl 1N и насыщенным раствором соли. Органический слой собирают, сушат над безводным сульфатом натрия, и растворитель удаляют роторным выпариванием. Полученный остаток очищают флэш-хроматографией на колонке в системе среднего давления Sepacore® Buchi (силикагель; градиент петролейный эфир/этилацетат В% 0-65 за 4 минуты, 65-65 за 7', 65-100 за 2') с получением соединения [35] (312 мг, выход 53%) в виде белого твердого вещества. **МС:** m/z 270,8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ^1H ЯМР (400

МГц, CDCl_3) δ 6,64 (с, 2H), 5,95 (с, 1H), 3,98 (дд, $J=4$, 4 Гц, 2H), 3,45 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 2,16 (дт, $J=15,0$, 4,9 Гц, 2H), 1,68–1,47 (м, 4H), 1,31–1,19 (м, 2H).

(4-Меркаптофенил)метанол [36]: К перемешиваемому раствору 4-меркаптобензойной кислоты (2,0 г, 13 ммоль) в сухом ТГФ (25 мл) в трехгорлой колбе в атмосфере N_2 добавляют LiAlH_4 1М в ТГФ (39 мл, 39 ммоль) при 0°C в течение 30'. Смесь перемешивают при кт в течение 12 часов. Затем реакционную смесь охлаждают при 0°C , гасят 3 мл воды и подкисляют до pH 2 добавлением HCl 1 М. Добавляют этилацетат, и органический слой промывают H_2O и насыщенным раствором соли, сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют, и растворитель удаляют роторным выпариванием. Полученный остаток очищают флэш-хроматографией на колонке в системе среднего давления Sepacore® Buchi (силикагель; градиент петролейный эфир/этилацетат В% 0–25 за 3 минуты, 25–25 за 6', 25–100 за 3') с получением спирта [36] (1,2 мг, выход 66%) в виде желтого твердого вещества. **МС:** m/z 141,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 7,25–7,06 (м, 4H), 4,43 (с, 2H), 3,72 (с, 1H), 3,48 (с, 1H).

6-(3-(4-(Гидроксиметил)фенил)тио)-2,5-диоксопирролидин-1-ил)-N-(проп-2-ин-1-ил)гексанамид [37]: К перемешиваемому раствору малеимида [35] (200 мг, 0,8 ммоль) в сухом MeCN (8 мл) добавляют тиол [36] (135 мг, 0,96 ммоль), и реакционную смесь перемешивают под N_2 при комнатной температуре в течение 4 часов. После завершения реакции растворитель удаляют роторным выпариванием и остаток очищают флэш-хроматографией на колонке в системе среднего давления Sepacore® Buchi (силикагель; градиент петролейный эфир/этилацетат В% 0–80 за 5 минут, 80–90 за 8', 90–100 за 1') с получением соединения [37] (134 мг, выход 43%) в виде желтого масла. **МС:** m/z 410,8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 426,9 $[\text{M}+\text{K}]^+$; ^1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,58 (дд, $J=16,5$, 8,1 Гц, 2H), 7,44 (дд, $J=14,6$, 8,1 Гц, 2H), 4,68 (с, 2H), 4,24 (дд, $J=9,1$, 3,7 Гц, 1H), 4,01 (д, $J=4$ Гц, 2H), 3,42 (дд, $J=15,1$, 7,9 Гц, 2H), 3,29 (дд, $J=18,7$, 9,1 Гц, 1H), 2,72 (дд, $J=18,7$, 3,7 Гц, 1H), 2,23 (т,

$J=7,5$ Гц, 3H), 1,68-1,60 (м, 3H), 1,53-1,44 (м, 3H), 1,31-1,16 (м, 2H).

6-(3-((4-(Бромметил)фенил)тио)-2,5-диоксопирролидин-1-ил)-N-(проп-2-ин-1-ил)гексанамида [38]: PBr₃ (76 мкл, 0,81 ммоль) добавляют при 0°C к раствору соединения [37] (210 мг, 0,54 ммоль) в сухом ТГФ (3 мл), и смесь выдерживают при 0°C в течение 3 ч. После выпаривания растворителя неочищенный продукт очищают флэш-хроматографией с градиентом 0-60% этилацетат в петролейном эфире с получением продукта [38] (245 мг, выход >99%) в виде оранжевого твердого вещества. **МС:** m/z 472,8 [M+Na]⁺; 488,9 [M+K]⁺; **¹H ЯМР** (400 МГц, CDCl₃) δ 7,49 (д, $J=8,1$ Гц, 2H), 7,36 (д, $J=8,1$ Гц, 2H), 4,46 (с, 2H), 4,04 (с, 2H), 3,58-3,34 (м, 4H), 3,16 (дд, $J=18,7, 9,2$ Гц, 1H), 2,69 (дд, $J=18,8, 4,0$ Гц, 1H), 2,30-2,12 (м, 3H), 1,74-1,58 (м, 3H), 1,56-1,43 (м, 3H), 1,27 (дд, $J=16,0, 8$ Гц, 2H).

N1-((4-((2,5-Диоксо-1-(6-оксо-6-(проп-2-ин-1-иламино)гексил)пирролидин-3-ил)тио)бензил)окси)-N8-фенилоктандиамида [39]: SANA (96 мг, 0,36 ммоль) растворяют в 6 мл MeOH и добавляют NaOH 40% раствор (76 мкл, 0,76 ммоль). Через 10 мин раствор перемешивают в атмосфере N₂ в колбе, содержащей бромид [38] (245 мг, 0,54 ммоль). Сразу же раствор становится пурпурным, и через 5-10 минут ТСХ показывает образование продукта [39]. Метанол быстро концентрируют, и неочищенную реакционную смесь разбавляют дихлорметаном и промывают HCl 1N для нейтрализации основания. Органический слой сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и растворитель удаляют роторным выпариванием. Остаток очищают флэш-хроматографией на колонке с градиентом 0-80% этилацетат в петролейном эфире с получением продукта [39] (90 мг, выход 40%) в виде белого твердого вещества. **МС:** m/z 656,8 [M+Na]⁺. **¹H ЯМР** (400 МГц, CDCl₃) δ 8,16 (с, 2H), 7,50 (д, $J=4$ Гц, 2H), 7,41 (д, $J=4$ Гц, 2H), 7,33-7,23 (м, 3H), 7,03 (д, $J=4$ Гц, 2H), 4,84 (с, 2H), 3,95 (с, 2H), 3,40-3,31 (м, 2H), 3,10 (дд, $J=20, 8$ Гц, 1H), 2,64 (дд, $J=18,8, 4,0$ Гц, 1H), 2,29 (с, 2H), 2,19 (с, 2H), 2,11 (с, 2H), 1,64-1,57 (м, 6H), 1,29-1,22 (м, 8H), 1,10 (с, 2H), 0,83 (д, $J=8,4$ Гц,

1H). ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ 175,02 (с), 174,58 (д, $J=89,2$ Гц), 172,58 (с), 171,55 (с), 137,86 (с), 137,84 (с), 134,37-127,29 (м), 127,98-127,29 (м), 123,66 (с), 119,52 (с), 79,30 (с), 71,03 (с), 43,28 (с), 36,62 (дд, $J=207,0$, 92,0 Гц), 35,71 (с), 35,59 (д, $J=25,1$ Гц), 35,46 (с), 29,24 (с), 28,20 (дд, $J=148,7$, 99,9 Гц), 26,74-26,34 (м), 26,34-24,48 (м), 24,49 (с), 24,49 (с).

6-Азидогексановая кислота [40]: 6-Бромгексановую кислоту (200 мг, 1,02 ммоль) и азид натрия (333 мг, 5,12 ммоль) в 5 мл диметилформамида нагревают при 100°C в течение 16 часов в герметично закрытой пробирке. После охлаждения реакционную смесь разбавляют этилацетатом и промывают KHSO_4 1M, H_2O и насыщенным раствором соли. Органический слой собирают и сушат над безводным сульфатом натрия, и растворитель удаляют роторным выпариванием. Продукт [40] (158 мг, 99%) получают чистым в виде коричневого масла. **МС:** m/z 155,8 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 10,49 (с, 1H), 3,21-3,18 (м, 2H), 2,28 (т, $J=7,4$ Гц, 2H), 1,84-1,45 (м, 4H), 1,38-1,31 (м, 2H).

6-(4-((6-(2,5-диоксо-3-((4-((8-оксо-8-(фениламино) октанамидо) окси) метил) фенил) тио) пирролидин-1-ил) гексанамидо) метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил) гексановая кислота [41]: Перемешиваемый раствор соединения [40] (17 мг, 0,11 ммоль) и соединения [39] (90 мг, 0,14 ммоль) в сухом ДМФ (11 мл) дегазируют при комнатной температуре аргонными/вакуумными циклами (3х). К этому раствору добавляют свежеприготовленную водную смесь (5,5 мл) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (7 мг, 0,03 ммоль) и аскорбата натрия (13 мг, 0,07 ммоль), ранее дегазированную аргонными/вакуумными циклами. Реакционную смесь снова дегазируют и оставляют под аргоном при комнатной температуре в течение 72 часов. После завершения реакции, неочищенный продукт концентрируют, и растворитель удаляют роторным выпариванием. Полученный остаток подвергают флэш-хроматографии на колонке с градиентом 0-16% метанол в дихлорметане с получением триазола [441] (55 мг, выход 62%) в виде оранжевого твердого вещества; **МС:** m/z 813,8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ^1H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,86 (с, 2H), 7,59-7,46 (м, 4H), 7,37 (д, $J=7,2$ Гц, 2H), 7,26 (д, $J=7,2$ Гц,

3H), 7,04 (д, $J=7,1$ Гц, 1H), 4,37 (с, 2H), 4,21 (с, 2H), 3,33 (дд, $J=12,9, 4,9$ Гц, 4H), 3,18 (дд, $J=20, 8$ Гц, 1H), 2,60 (дд, $J=18,8, 4,0$ Гц, 1H), 2,42-2,12 (м, 5H), 2,02 (с, 2H), 1,88 (с, 2H), 1,76-1,47 (м, 8H), 1,49-1,23 (м, 10H), 1,17 (с, 2H), 0,86 (с, 1H). ^{13}C ЯМР (100 МГц, MeOD) δ 140,29-139,14 (м), 139,14-134,26 (м), 132,86 (с), 139,14-108,94 (м), 107,34 (с), 76,31 (с), 35,28 (с), 28,04 (с), 25,16 (д, $J=61,4$ Гц), 24,57 (с).

2,5-Диоксопирролидин-1-ил 6-(4-((6-(2,5-диоксо-3-((4-((8-оксо-8-(фениламино) октанамидо) окси) метил) фенил) тию) пирролидин-1-ил) гексанамидо) метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил) гексаноат (11), ST8215AA1: Дициклогексилкарбодиимид (21 мг, 0,10 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (10 мг, 0,09 ммоль) добавляют при комнатной температуре к перемешиваемому раствору соединения [41] (55 мг, 0,06 ммоль) в безводном диметилформамиде (0,80 мл). Смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 16 часов. Белое твердое вещество, образовавшееся в этой реакции, фильтруют с дихлорметаном, и органическую фазу промывают водой, затем сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и растворитель удаляют роторным выпариванием. Полученный остаток подвергают флэш-хроматографии на колонке с градиентом 0-8% метанол в дихлорметане с получением активированной кислоты **ST8215AA1** в виде белого вязкого твердого вещества (24 мг, 45%); **МС:** m/z 910,8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,07 (с, 2H), 7,52 (с, 2H), 7,44 (с, 2H), 7,32 (с, 2H), 7,23 (с, 3H), 7,04 (с, 1H), 4,87 (с, 2H), 4,45 (с, 2H), 4,31 (с, 2H), 3,32 (с, 2H), 3,13 (с, 1H), 2,79 (с, 4H), 2,65 (с, 2H), 2,55 (с, 2H), 2,29 (с, 2H), 2,12 (с, 2H), 1,89 (с, 2H), 1,78-1,48 (м, 8H), 1,47-1,12 (м, 10H), 1,07 (с, 2H), 0,83 (с, 1H). ^{13}C ЯМР (100 МГц, CDCl_3) δ 134,50 (с), 129,24 (с), 128,49 (с), 124,47-123,71 (м), 121,49 (д, $J=420,4$ Гц), 49,89 (с), 43,30 (с), 38,48 (с), 36,87 (с), 35,65 (с), 34,39 (с), 32,54 (с), 30,25 (с), 29,25 (с), 28,04 (с), 26,23 (д, $J=107,2$ Гц), 24,84 (с), 25,38-23,33 (м), 24,55 (с), 24,96-23,33 (м), 23,47 (с).

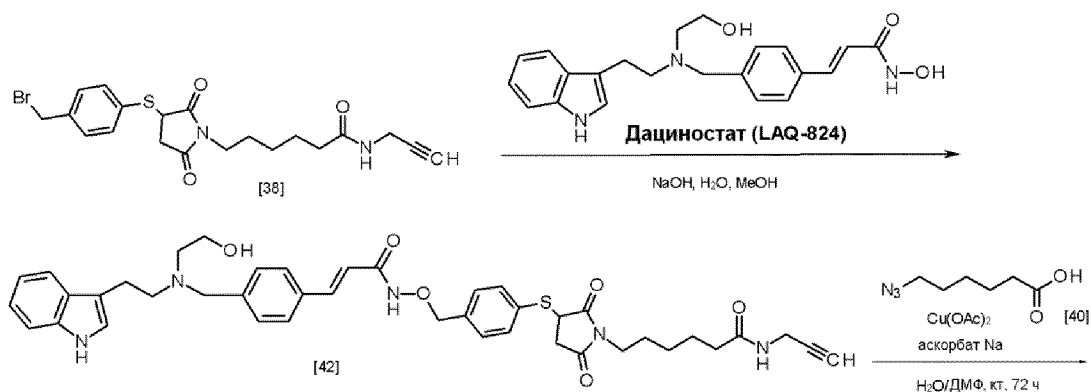
N1-((4-((1-(6-((1-(6-((2-(2,5-Диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил) этил) амино)-6-оксогексил)-1H-1,2,3-триазол-4-

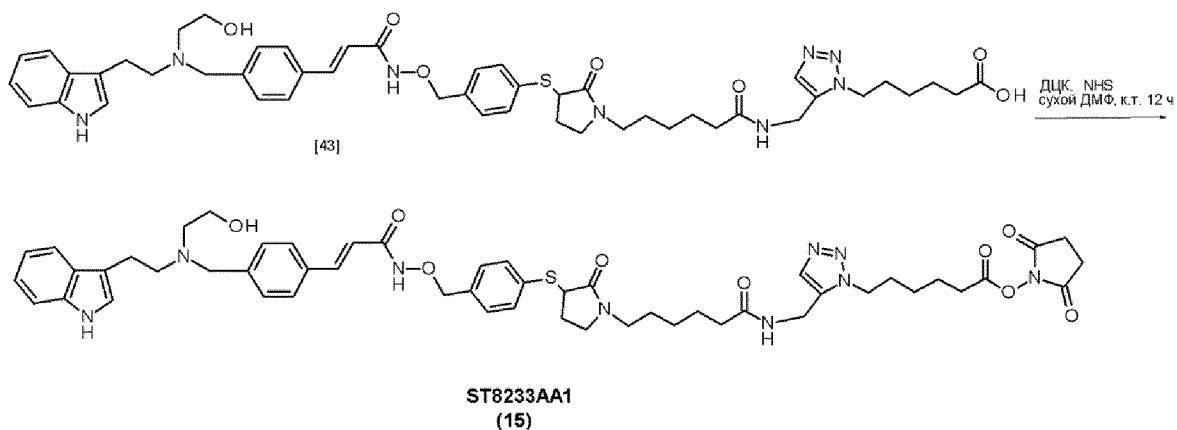
ил) метил) амино) -6-оксогексил) -2,5-диоксопирролидин-3-

ил) тию) бензил) окси) -N8-фенилоктандиамид (12), ST8216AA1: К перемешиваемому раствору соединения [41] (15 мг, 0,02 ммоль) в смеси сухого ТГФ/ДМФ 3:1 (1,33 мл) в атмосфере N₂, добавляют N-(2-аминоэтил)малеимид (3,3 мг, 0,02 ммоль), ГОБТ Н₂O (4 мг, 0,03 ммоль), ГВТУ (11 мг, 0,03 ммоль) и ДИПЭА (7 мкл, 0,05 ммоль) при 0°C. После добавления смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 12 часов, затем разбавляют дихлорметаном и промывают водой. Органическую фазу затем сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и растворитель удаляют роторным выпариванием. Полученный остаток подвергают флэш-хроматографии на колонке с градиентом 0-8% метанол в дихлорметане с получением продукта ST8216AA1 (13 мг, выход 72%) в виде белого вязкого твердого вещества. МС: m/z 936,6 [M+Na]⁺; ¹H ЯМР (400 МГц, MeOD) δ 7,86 (с, 3H), 7,60-7,42 (м, 5H), 7,38-7,35 (м, 2H), 7,25 (т, J=7,9 Гц, 2H), 7,03 (т, J=7,4 Гц, 1H), 6,77 (с, 2H), 4,86 (с, 2H), 4,35 (дд, J=15,7, 8,7 Гц, 4H), 3,69 (т, J=4 Гц, 2H), 3,56 (т, J=4 Гц, 2H), 3,43-3,28 (м, 5H), 3,24-3,13 (м, 2H), 2,32 (т, J=8 Гц, 2H), 2,15 (дд, J=14,9, 7,5 Гц, 2H), 2,04 (дд, J=13,3, 6,0 Гц, 2H), 1,92-1,77 (м, 2H), 1,77-1,50 (м, 8H), 1,50-1,12 (м, 10H), 0,86 (с, 1H).

Пример 12: Общая методика синтеза полезных нагрузок на основе панобиностата и дациностата.

Синтез и исследование полезной нагрузки на основе дациностата (15), ST8233AA1





3- (p- { [N- (E) -3- [p- ({ (2-Гидроксиэтил) [2- (1H-индол-3-ил) этил] амино} метил) фенил] акрилоил (аминоокси)] метил} фенилтио) -1- [6-оксо-6- (2-пропиниламино) гексил] -2,5-пирролидиндион [42]:
Дацинонат (100 мг, 0,29 ммоль) растворяют в 6 мл MeOH, содержащего NaOH (40% в воде, 40 мкл, 0,4 ммоль). После перемешивания 15 мин при кт раствор добавляют в пробирку, содержащую бромид [38] (181 мг, 0,40 ммоль). Через 5-10 минут перемешивания при кт анализ ТСХ показал образование продукта. Метанол быстро выпаривают, и неочищенную реакционную смесь разбавляют дихлорметаном и промывают HCl 1N для нейтрализации основания, сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют и растворитель удаляют роторным выпариванием. Остаток очищают флэш-хроматографией на колонке с градиентом 0-80% этилацетат в петролейном эфире с получением продукта [42] (95 мг, выход 44%) в виде белого твердого вещества. **МС:** m/z 772,6 [M+Na]⁺. **¹H ЯМР** (400 МГц, CDCl₃) δ, 7,83-7,72 (м, 2H), 7,65-7,30 (м, 10H), 7,25-7,07 (м, 2H), 7,13-7,05 (м, 1H), 6,81 (м, 1H), 6,64 (т-подобный, 1H), 4,80 (м, 1H), 4,69-4,54 (м, 2H), 4,34-4,18 (м, 2H), 4,05 (м, 1H), 3,91-3,45 (м, 7H), 3,32-2,77 (м, 8H), 2,66 (м, 1H), 2,36-2,12 (м, 4H), 1,76-1,26 (м, 8H).

6- [4- ({6- [3- (p- { [N- (E) -3- [p- ({ (2-Гидроксиэтил) [2- (1H-индол-3-ил) этил] амино} метил) фенил] акрилоил (аминоокси)] метил} фенилтио) -2,5-диоксо-1-пирролидинил] гексаноиламино} метил) -1H-1,2,3-триазол-1-ил] гексановая кислота [43]:

Перемешиваемый раствор соединения [42] (40 мг, 0,05 ммоль) и 6-азидогексановой кислоты (16 мг, 0,10 ммоль) в сухом ДМФ (10 мл) дегазируют при комнатной температуре аргоновыми/вакуумными

циклами (3×). К этому раствору добавляют свежеприготовленную водную смесь (5,5 мл) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (7 мг, 0,03 ммоль) и аскорбата натрия (13 мг, 0,07 ммоль), ранее дегазированную аргонными/вакуумными циклами (3×). Реакционную смесь снова дегазируют и оставляют под аргоном при комнатной температуре в течение 72 часов. После завершения реакции, неочищенный продукт концентрируют, и растворитель удаляют роторным выпариванием. Полученный остаток подвергают флэш-хроматографии на колонке с градиентом 0–16% метанол в дихлорметане с получением триазола [43] (35 мг, выход 77%) в виде твердого вещества. **МС:** m/z 930,7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Синтез полезной нагрузки (15), ST8233AA1:
Дициклогексилкарбодиимид (16 мг, 0,08 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (7,7 мг, 0,07 ммоль) добавляют при комнатной температуре к перемешиваемому раствору соединения [43] (35 мг, 0,04 ммоль) в безводном ДМФ (0,80 мл). Смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 16 ч. Белое твердое вещество, образованное в этой реакции, фильтруют с дихлорметаном, и органическую фазу промывают водой, затем сушат над безводным сульфатом натрия, фильтруют, и растворитель удаляют роторным выпариванием. Полученный остаток подвергают флэш-хроматографии на колонке с градиентом 0–8% метанол в дихлорметане с получением активированной кислоты **ST8233AA1** в виде белого вязкого твердого вещества (14 мг, 35%); **МС:** m/z 1026,4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

^1H ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9,94 (шс, 1H), 8,92 (шс, 1H), 7,90 (шс, 1H), 7,61–7,47 (м, 1H), 7,50–7,37 (м, 1H), 7,33 (м, 2H), 7,20 (м, 1H), 7,15–6,86 (м, 1H), 6,69 (м, 1H), 4,80 (м, 1H), 4,69–4,54 (м, 1H), 4,49–4,12 (м, 2H), 3,84 (м, 1H), 3,69–3,52 (м, 1H), 3,43–2,87 (м, 3H), 2,88–2,35 (м, 3H), 2,35–2,08 (м, 1H), 2,02–1,23 (м, 5H).

Пример 13: Синтез и исследование КАЛС конъюгированием с ϵ -аминогруппами лизиновых остатков с N-гидроксисукцинимидом (NHS).

В качестве примера, КАЛС, полученные из ГДАЦ, конъюгируют с четырьмя разными антителами (Трастузумаб Herceptin® Roche; Цетуксимаб Erbitux® Merck; Бевацизумаб Avastin® Genentech/Roche;

Панитумумаб Vectibix® Amgen) и двумя мышинными анти-человеческими CD4 антителами, коммерчески доступными, клон SK3 (также известный как Leu3a) и клон RPA-T4. Более конкретно, одобренными антителами являются Трастузумаб, распознающий ErbB2, Цетуксимаб и Панитумумаб, распознающие ErbB1, Бевацизумаб, распознающий VEGFR.

Антитела подвергают буферному обмену с применением 10 кДа отсекающей диализной мембраны с получением раствора антител в ФРФБ, pH 7,4 и для удаления вводящегося консерванта. Концентрацию после диализа определяют измерением OD₂₈₀ и значения абсорбции образца – деленного на 1,36.

10 мМ исходного раствора, содержащего амин-реакционноспособную N-гидроксисукцинимидную (сложный эфир **NHS**) полезную нагрузку готовят в ДМСО, и 20-кратный молярный избыток полезной нагрузки добавляют в каждый раствор антител.

Реакции инкубируют при комнатной температуре при осторожном непрерывном перемешивании, и через 1 час их гасят добавлением 20 мМ водного раствора глицина.

Конечные продукты затем диализируют в ФРФБ в течение ночи при 4°C с применением 10 кДа отсекающей мембраны для удаления избытка непрореагировавшей полезной нагрузки.

ОЛА (отношение лекарственное средство-антитело) определяют масс спектрометрией MALDI с применением масс спектрометра Ultraflex III (Bruker, GmbH), работающего в положительном линейном режиме.

Коротко, 100 мкл неконъюгированных антител и полученных КАЛС обессоливают с применением PD спиновой ловушки G25 (GE Healthcare), элюируя в воде.

10 мг/мл s-DHB MALDI матричного раствора готовят в 0,1% ТФК, растворенной в H₂O:АЦН (50:50, об./об.). 2 мкл раствора образцов (антител или КАЛС) наносят на цель MALDI с применением способа осаждения образцов двойным слоем. Масс спектр получают в диапазоне массы к заряду от 50 кДа до 180 кДа.

Разность масс между неконъюгированными и конъюгированными антителами применяют для определения ОЛА.

Антитела Трастузумаб, Цетуксимаб, Панитумумаб, Бевацизумаб, а также два мышинных анти-человеческих CD4 антитела применяют в реакциях конъюгирования в экспериментальных условиях, описанных выше. Получают КАЛС с ОЛА 3-9.

Все синтезированные КАЛС исследуют на масс спектре MALDI. Пример КАЛС на основе лизина и пример КАЛС на основе цистеина представлены на **фигурах 1-2**.

Только в качестве примера, представлен масс спектр MALDI для КАЛС **(24)**, ST8154AA1 (Фиг. 1).

Пример 14: Синтез и исследование КАЛС, полученных конъюгированием на цистеиновом остатке с малеимидсодержащими полезными нагрузками.

Антитела подвергают буферному обмену с применением 10 кДа отсекающей диализной мембраны с получением раствора антител в ФРФБ, рН 7,4 и для удаления вводимого консерванта. Концентрацию после диализа определяют измерением OD₂₈₀ и значения абсорбции образца делят на 1,36.

Мягкое восстановление межцепочечных дисульфидов в антителах дает денатурированные цистеины в восстановленной форме, подходящие для конъюгирования с обычными малеимидными линкерами с получением гомогенных КАЛС с 2-6 лекарственными средствами/антителами.

Для этой цели, 1 мМ ТСЕР-HCl исходного раствора готовят в воде, и 5-кратный молярный избыток добавляют в растворы антител. Реакции выдерживают при 37°C в течение 2 часов при осторожном непрерывном перемешивании. Реакции охлаждают.

Так как ТСЕР является соединением, не содержащим тиол, удаление избытка восстановления не является необходимым, и 20-кратный молярный избыток 10 мМ исходного раствора полезной нагрузки на основе малеимида, полученного в ДМСО, добавляют в каждый восстановленный раствор антитела.

Реакции инкубируют при комнатной температуре при осторожном непрерывном перемешивании, и через 1 час их гасят добавлением 20 мМ водного раствора цистеина.

Конечные продукты затем диализируют экстенсивно в ФРФБ в

течение ночи при 4°C с применением 10 кДа отсекающей мембраны для удаления избытка непрореагировавшей полезной нагрузки.

ОЛА (отношение лекарственное средство-антитело) определяют гидрофобной хроматографией с применением колонки MabPac HIC-Butyl 100 мм × 4,6 мм, 5 мкм (Thermo Fisher Scientific). Подвижной фазой А является 1,5 сульфат аммония, 50 мМ фосфат натрия, рН 7 и изопропанол (95:5; об./об.) и подвижной фазой В является 50 мМ фосфат натрия, рН 7 и изопропанол (80:20; об./об.).

Подвижную фазу А сохраняют 100% в течение 1 минуты после впрыска, и затем подвижную фазу В повышают до 100% за 30 минут и хранят в течение 5 минут.

УФ профили регистрируют при 220 и 280 нм. Все антитела, такие как Трастузумаб и Цетуксимаб, в соответствии с данным изобретением, готовят способом, который включает реакции конъюгирования в экспериментальных условиях, описанных выше. Получают КАЛС со средним ОЛА 3,5–4,6.

Только в качестве примера, представлена ГИХ хроматограмма КАЛС **(28)**, ST8176AA1 (Фиг. 2). ОЛА рассчитывают с учетом площадей пиков и с применением следующей формулы:

$$\text{ОЛА} = \frac{\sum_{n=0}^8 n \text{AreaDAR}_n}{\sum_{n=0}^8 \text{AreaDAR}_n}$$

Пример 15: Определение связывания КАЛС с ErbB1 и ErbB2 рецепторами на опухолевых клетках

Связывание КАЛС с ErbB1- и ErbB2-экспрессирующими опухолевыми клетками подтверждают анализом FACS. Различные колонии опухолевых клеток с различными уровнями экспрессии EGFR и ErbB2, включая колонии клеток рака легкого (A549, H1975), молочной железы (SKBR3), толстой кишки (LS174T), яичников (SKOV3), поджелудочной железы (CAPAN1 и MIAPACA-2) и желудка (N87), применяют в экспериментах. Дебрис инкубируют в течение 1 часа при 4°C с 10 мкг/мл антителами или КАЛСs в ФРФБ, и затем, после двух промывок в ФРФБ, окрашивают в течение 1 часа при 4°C

мышинными анти-человеческими FITC-конъюгированными IgG (BD Pharmingen). После двух последующих промывок добавляют йодид пропидия (PI) и проводят анализ ассоциированной с клеткой люминесценции с помощью FACScalibur (Becton Dickinson). Все соединения показали связывание с рецепторами, сравнимое с таковым для свободных антител, Цетуксимаба и Трастузумаба (см. таблицу 3 и фигуры 3 и 4).

Таблица 3. Связывание КАЛС с ErbB1 и ErbB2 рецепторами и поглощение

Ид.№	Код №	Лекарственное средство	Полезная нагрузка	mAb	ОЛА	Связывание (анализ FACS)	Поглощение (изображение ОМА)
(24)	ST8154AA1	ST7464AA1	ST8128AA1	Cet	5,0-9,0	++	++
(25)	ST8155AA1	ST7464AA1	ST8132AA1	Cet	6,1-6,2	++	++
(26)	ST8177AA1	ST7464AA1	ST8152AA1	Cet	3,2-4,6	++	++
(27)	ST8178AA1	ST7464AA1	ST8128AA1	Tras	7,9	++	++
(28)	ST8176AA1	ST7464AA1	ST8152AA1	Tras	4,1-4,5	++	++
(29)	ST8179AA1	ST7464AA1	ST8132AA1	Tras	6,3	++	++
(30)	ST8205AA1	ST7660AA1	ST8197AA1	Tras	6,2	++	++
(36)	ST8218AA1	Воринонат	ST8217AA1	Tras	5,0	++	++
(37)	ST8219AA1	Воринонат	ST8217AA1	Cet	4,0	++	++
				Cet		++	++
				Tras		++	++

++ является оценкой, представляющей высокую степень связывания или поглощения.

Cet=Цетуксимаб; Tras=Трастузумаб

16: Определение поглощения опухолевыми клетками.

Способность КАЛС быть поглощенными опухолевыми клетками после их связывания с родственными рецепторами оценивают с помощью получения изображений флуоресценции ОМА через систему Operetta (Perkin Elmer). Тестируют несколько типов опухолевых клеток, включая колонии клеток рака легкого (A549, H1975), молочной железы (SKBR3), толстой кишки (LS174T), яичников (SKOV3), поджелудочной железы (CAPAN1) и желудка (N87). Клетки высевают в 96-луночные титровальные микропланшеты (0,5-1×10⁴/лунку) и затем инкубируют с 5 мкг/мл антител в культуральной среде, в течение 3 часов при 37°C. После двух

промывок клетки фиксируют 4% формальдегидом в ФРФБ, пермеабилзируют ФРФБ 0,2% Tween-20 (ФРФБ-Т) и блокируют 2% АБС в ФРФБ-Т, и в конечном счете, окрашивают мышиными анти-человеческими FITC-конъюгированными IgG (BD Pharmingen). Флуоресценцию записывают и анализируют с помощью системы одновременного многопараметрического анализа (OMA) Operetta (Perkin Elmer). Клетки докрашивают красителем Draq5 (Cell Signaling).

Все КАЛС связываются с родственными рецепторами и поглощаются целевыми клетками образом, сравнимым с таковым для природных соответствующих антител, Цетуксимаба и Трастузумаба (см. таблицу 3).

Пример 17: Определение связывания КАЛС на рецепторах с помощью ELISA и Biacore

Иммунореактивность КАЛС тестируют антиген-специфическим ELISA. Коротко, 96-луночные планшеты Immuno MAXISORP (Nunc) покрывают в течение ночи при 4°C 50 нг/лунку химерой рекомбинантного человеческого EGF-R/ErbB1 Fc (R&D) или белком рекомбинантного человеческого ErbB2/HER2 (Sino Biological Inc.). После промывания раствором ФРФБ/0,1% Tween (PT) планшеты блокируют в течение 2 часов при комнатной температуре (КТ) с раствором PT, содержащим 1% АБС (PTB), и затем инкубируют с серийными разведениями антител, 1 ч при комнатной температуре. После дополнительных промывок добавляют антитело, конъюгированное с анти-человеческой К легкой цепью пероксидазы хрена (HRP) (Sigma Aldrich), разведенное 1:1000 в блокирующем растворе, в течение 1 ч при комнатной температуре. После четырех промываний раствором PT добавляют 200 мкл/лунку субстрата TMB (Sigma Aldrich), и планшеты инкубируют 30 мин при 37°C. Реакцию блокируют добавлением 100 мкл/лунку 0,5М раствора H₂SO₄, и оптическую плотность при 450 нм измеряют ELISA спектрофотометром.

Все тестированные КАЛС показали взаимодействие с их специфическим рецептором с эффективностью, сравнимой с эффективностью природных антител Цетуксимаба и Трастузумаба

(фигуры 5А и 5В) .

Сродство связывания Цетуксимаба и его соответствующих КАЛС, ST8155AA1 и ST8154AA1, с EGFR/ErbB1 Fc химерным белком измеряют с помощью анализа поверхностным плазмонным резонансом (ППР) на биодатчике Biacore T200 (GE). Коротко, EGFR/ErbB1 Fc химерный белок сочетают с карбоксиметилированным декстрановым сенсорным чипом высокой чистоты (CM5, Biacore) с применением набора для аминного сочетания, поставляемого производителем. Кинетический анализ проводят с применением однотоктного анализа кинетики, для того, чтобы избежать экстенсивного применения методики регенерации, что наносит вред лиганду (регенерация оказалась необходимой, так как антитела не диссоциируют в конце каждого цикла). Антитела и КАЛС впрыскивают в концентрации 6,25-100 нМ в ФРФБ электродный буфер при pH 7,2. Соединения впрыскивают от низкой до высокой концентрации со временем контакта 180 с и временем диссоциации 600 с между ними. Инъекции проводят при 25°C со скоростью потока 30 мкл/мин. Поверхность сенсорного чипа регенерируют 10 мМ глицина/HCl pH 2,5 в течение 12-20 с. Все эксперименты проводят дважды. Представленные значения k_{on} и k_{off} являются средними для значений, полученных в двух экспериментах. $KD = k_{off}/k_{on}$ (см. таблицу 4) .

Таблица 4. Анализ Biacore для ST8154AA1 (24) и ST8155AA1 (25) .

	Kon (1/Мс)	Koff (1/с)	KM (М)
Цетуксимаб	$1,59 \times 10^5$	$4,54 \times 10^{-4}$	$2,85 \times 10^{-9}$
ST8154AA1	$1,77 \times 10^5$	$4,24 \times 10^{-4}$	$2,40 \times 10^{-9}$
ST8155AA1	$6,82 \times 10^4$	$3,51 \times 10^{-4}$	$5,15 \times 10^{-9}$

Пример 18: Определение целостности КАЛС после процесса распыления .

Недавно было показано, что распыление является многообещающим способом доставки mAbs в респираторных заболеваниях, представляя не инвазивный способ, подходящий для нацеленной доставки лекарственных средств непосредственно в легкие, ограничивая воздействие на вторичные органы.

Согласно этому предположению авторы данного изобретения

пытались оценить с помощью анализа ВЭЖХ восстановление и целостность КАЛС после распыления. Коротко, растворы 300 мкг/мл (в ФРФБ) КАЛСs и их исходных антител, Цетуксимаба и Трастузумаба, распыляют в течение 5 минут через обычный струйный распылитель (система AirFamily, Pic indolor). Затем распыленные лекарственные средства собирают, перемещая аэрозоль в пробирках falcon, и 100 мкл конденсированного раствора анализируют эксклюзионной ВЭЖХ (колонка TSKgel G3000 SWXL, TOSOH Bioscience) по сравнению с предварительно распыленными образцами.

Процент восстановления после распыления рассчитывают измерением площади каждого соответственного пика относительно предварительно распыленных образцов, и ранжируют от 50% до 30% и от 40% до 20% для КАЛС на основе Цетуксимаба и Трастузумаба, соответственно. Целостность и частоту агрегации также оценивают для каждого распыленного КАЛС, согласно профилю каждой хроматограммы, и сравнивают с не распыленными образцами (см. таблицу 5).

Таблица 5. Исследование КАЛС с помощью ВЭЖХ после распыления

Код №		Целостность (%)	Агрегаты (%)	Разложение (%)	Восстановление основного пика (%)
Цетуксимаб	Пред расп	100	0	0	72
	расп	100	0	0	
ST8154AA1 (24)	Пред расп	98	2	0	47
	расп	76	24	0	
ST8155AA1 (25)	Пред расп	95	4	1	33
	расп	69	30	1	
ST8177AA1 (26)	Пред расп	84	1	15	30
	расп	82	5	13	
Трастузумаб	Пред расп	100	0	0	58
	расп	100	0	0	
ST8178AA1 (27)	Пред расп	98	2	0	20
	расп	85	15	0	
ST8176AA1 (28)	Пред расп	83	5	12	21
	расп	76	11	13	
ST8179AA1 (29)	Пред расп	97	3	0	27
	расп	76	24	0	

Пример 19: Определение эффективности КАЛС в ингибировании пролиферации опухолевых клеток

Действие КАЛС на пролиферацию клеток оценивают на двух колониях клеток рака легкого (NCI-H1975 и Calu-3). Более подробно, опухолевые клетки NCI-H1975 исследуют через сверхэкспрессию двойного мутанта (L858R, T790M) *ErbB1* ген, а Calu-3 экспрессирует дикую форму EGFR, но мутантный K-Ras (G13D) ген, а также мутантные TP53 и CDKN2A гены.

Клетки высевают (3000-5000 клеток/лунку) в 96-луночные планшеты в полной культуральной среде, и затем инкубируют в течение 6 дней, четыре раза, со скалярными концентрациями КАЛС, ранжируя от 500 до 6,25 нМ. Ингибирование пролиферации клеток измеряют анализом CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega), через люминометр Veritas (Promega). Данные показывают как средний ($\pm$ CO) процент ингибирования из двух независимых экспериментов. Значения IC₅₀ в итоге рассчитывают с применением программы GraphPad Prism 5,0. Результаты показали, что КАЛС ST8154AA1 значительно ингибирует пролиферацию клеток в обеих колониях опухолевых клеток (со значениями IC₅₀ 250 нМ и 450 нМ, на клетках NCI-H1975 и Calu-3, соответственно) по сравнению с только Цетуксимабом, который, наоборот, был неэффективен (IC₅₀>500 нМ) (Фигуры 6-7).

Пример 20: Определение активности КАЛС по ацетилированию гистона H3 и α -Тубулина в опухолевых клетках

Действие КАЛС на ацетилирование типовых субстратов ГДАЦ, т.е. гистон H3 и α -тубулин белок, оценивают с помощью получения изображений флуоресценции ОМА на различных опухолевых клетках. Тестируют несколько колоний опухолевых клеток, экспрессирующих разные уровни EGFR и HER2 рецепторов, включая колонии клеток рака легкого (A549, H1975), молочной железы (SKBR3), толстой кишки (LS174T), яичников (SKOV3), поджелудочной железы (CAPAN1 и MIAPACA-2) желудка (N87). Клетки высевают в 96-луночные титровальные микропланшеты (0,5-1×10⁴/лунку) в полной культуральной среде, и через день инкубируют с 5 мкг/мл антителами или КАЛС, в течение 3 или 24 часов при 37°C. После

двух промываний ФРФБ клетки фиксируют с 4% формальдегидом в ФРФБ, пермеабелизируют с ФРФБ 0,2% Tween-20 (ФРФБ-Т) и блокируют с 2% АБС в ФРФБ-Т. Затем добавляют мышиный анти-ацетилованный- α -тубулин IgG (клон 6-11B-1, от Sigma Aldrich) или кроличий анти-ацетилованный-гистон H3 IgG (от Active Motif) в ФРФБ-Т, и клетки инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре. После двух промываний ФРФБ клетки, в конечном счете, окрашивают в течение еще 1 дополнительного часа FITC-конъюгированным козьим анти-мышинным или анти-кроличьим IgG (BD Pharmingen), в соответствии с первичным применяемым антителом. Флуоресценцию оценивают и анализируют с помощью системы одновременного многопараметрического анализа (OMA) Operetta (Perkin Elmer). Клетки докрашивают красителем Draq5 (подача клеточных сигналов).

Все тестируемые КАЛС вызывают релевантное повышение уровня ацетилирования обоих α -тубулина и гистона H3 во всех тестируемых колониях клеток, в результате прямого ферментного ингибирования ГДАЦ6 и ГДАЦ I класса, соответственно (фигуры 8-11). Этот результат согласуется со способностью КАЛС быть поглощенными и разлагаться для выделения группы ST7464AA1.

Повышенное ацетилирование α -тубулина и гистона H4 также наблюдается с помощью вестерн-блоттинга на белковых лизатах различных опухолевых клеток. Коротко, за день до начала эксперимента опухолевые клетки высевают в 6-луночные чашки в полной культуральной среде. Затем клетки обрабатывают в течение 3 часов при 37°C с 20 мкг/мл тестируемых антител. После обработки клетки дважды промывают ледяным ФРФБ и затем полный лизат клеток готовят инкубированием в течение 10 мин на льду с 1X лизисным буфером (Cell Signaling) с добавлением ингибиторов протеазы. Клеточные лизаты подвергают обработке ультразвуком до центрифугирования при 14000 $\times$ g, в течение 10 мин при 4°C, для удаления клеточного дебриса. Содержания белка определяют классическим колориметрическим методом Брадфорда (набор для исследования белка Coomassie Bradford; Pierce) согласно инструкции производителя. Для оценки степени ацетилирования, равные количества белков для каждого образца разделяют SDS-PAGE

и переносят в нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-C extra, Amersham-GE Healthcare). Молекулярные массы оценивают на основе относительно миграции с белковыми маркерами молекулярной массы (Prestained Kaleidoscope Standards; Bio-Rad). Места неспецифического связывания затем блокируют инкубированием мембран с 5% нежирным сухим молоком в TBS в течение ночи при 4°C. Специфические первичные антитела (кроличье анти-ацетил-гистон H4 антитело от Santa Cruz; мышинное анти-гистон H4 моноклональное антитело от Cell Signaling; мышинное анти-ацетилованное α -тубулиновое моноклональное антитело от Sigma Aldrich, кроличье анти- α -тубулиновое антитело от abcam) добавляют к мембранам при оптимальном разведении в 5% нежирном сухом молоке/TBST в течение ночи при 4°C. После четырех промывок в TBST, мембраны инкубируют в течение 1 ч с HRP-конъюгированными вторичными антителами в 5% нежирном сухом молоке/TBST. Иммунореакционные полосы наконец визуализируют усилением химиolumинесценции с определяющим реагентом для ECLplus вестерн-блоттинга (GE Healthcare), и анализируют системой формирования изображения на фосфорном покрытии (STORM, Molecular Dynamics). Типовые блоты представлены на **фигуре 12**.

Пример 21: Определение in vivo противоопухолевого действия ST8154AA1 и ST8155AA1 на NCI-H1975 клетки немелкоклеточного рака легких

Голым мышам Nu/Nu (от Charles River, Italy) делают одну подкожную инъекцию 5×10^6 NCI-H1975 клеток немелкоклеточного рака легкого, суспендированных в 100 мкл клеточной культуральной среды RPMI с добавлением 10% ФТС. Цетуксимаб и ST8154AA1 и ST8155AA1 дают внутривбрюшинно каждые 4 дня в течение 4 дней (q4dx4) в дозе 50 мг/кг, а ST7612AA1 вводят внутривбрюшинно в дозе 120 мг/кг по схеме q4dx4. Группу носителя обрабатывают ФРФБ. Рост опухоли измеряют циркулем, и объем опухоли рассчитывают с применением формулы $\text{длина (мм)} \times \text{ширина}^2 \text{ (мм)} / 2$. Ингибирование опухоли рассчитывают по уравнению: $\%TVI = 100 - (\text{средний объем опухоли леченной группы} / \text{средний объем опухоли контрольной группы}) \times 100$. Токсичность оценивают на основе

снижения массы тела.

Животных умерщвляют ингаляцией CO₂, когда опухоли достигают объема около 1200 мм³.

Все процедуры, принятые для содержания и обращения с животными, строго соответствуют итальянским и европейским руководящим принципам по содержанию лабораторных животных.

Результаты показали, что КАЛС были значительно более эффективными, чем Цетуксимаб ($P < 0,001$ и $P < 0,01$). В частности, ST8155AA1 обладает большей способностью ингибировать объем опухоли по сравнению с Цетуксимабом на 77% (фигура 13, таблица 6), а ST8154AA1 способен снижать рост опухоли на 95% относительно Цетуксимаба (фигура 13, таблица 7). ST7612AA1, пролекарство загруженного токсина ST7464, при введении отдельно в дозе 120 мг/кг, вб, q4dx4, было полностью неактивным, так как оптимальной схемой для ингибитора ГДАЦ является ежедневное введение (qdx5/w). (Фигура 13).

Интересно, что включенная доза лекарственного средства ST8154AA1 и ST8155AA1 на mAb на mAb Цетуксимаб составляла около 0,1 мг/кг.

Таблица 6. Противоопухолевая эффективность ST8155AA1 к Цетуксимабу против NCI-H1975 НМКРЛ.

Гитотип опухоли	Имплантация опухоли	Доставка лекарственных средств	Ингибирование опухоли или метастазов (%) ST8155AA1 к Цетуксимабу на 47 день значение P к Цетуксимабу
NCI-H1975 НМКРЛ	п.к.	вб, q4dx4	77, $P < 0,01$

Таблица 7. Противоопухолевая и антиметастазная эффективность ST8154AA1 к Цетуксимабу на моделях различных опухолей

Гистотип опухоли	Имплантация опухоли	Доставка лекарственного средства	Ингибирование опухоли или метастазов (%) ST8154AA1 и Цетуксимаба к носителю значение P к Цетуксимабу
NCI-H1975 НМКРЛ	п.к.	в.б., q4dx4	95 (к Цетуксимабу потому что на день 90), $P < 0,001$
A549 НМКРЛ	п.к.	в.б., q4dx4	60 к 34, $P < 0,05$

A549 НМКРЛ	в.в.	Аэрозоль, q7dx4	90 к 50, P<0,01
CAPAN-1 рак поджелудочной железы	Ортотопическая в поджелудочную железу	в.б., q4dx4	84 к 49 и CR 6/10 к 2/10, P<0,05
ППК рака поджелудочной железы PA5363	п.к.	в.б., q4dx5	50 к 25, P<0,05

Пример 22: Определение in vivo противоопухолевого действия ST8154AA1 против A549 немелкоклеточного рака легкого.

Голым мышам делают подкожную инъекцию 5×10^6 A549 клеток немелкоклеточного рака легких, суспендированных в 100 мкл клеточной культуральной среды RPMI с добавлением 10% ФТС. Цетуксимаб и ST8154AA1 вводят внутрибрюшинно каждые 4 дня в течение 4 дней (q4dx4) в дозе 50 мг/кг. Измерения опухоли и данных такие, как в примере 21.

Лечение показало, что ST8154AA1 является значительно более эффективным, чем Цетуксимаб (P<0,05) (фигура 14, таблица 7).

Пример 23: Определение in vivo противоопухолевого действия ST8154AA1, доставляемого аэрозолем, против метастатического A549 немелкоклеточного рака легких.

Метастатический рак легких устанавливают введением 5×10^6 клеток A549-luc-C8 (A549luc) в хвостовую вену иммунодефицитных мышей SCID/beige. Через 1 неделю мышей произвольно делят и обрабатывают все тело аэрозолем (с помощью системы AirFamily, Pic indolor) КАЛС или Цетуксимабом (3,5 мл раствора 100 мкг/мл). Обработку повторяют по схеме q7dx4. Изображения биолюминесценции опухоли (ИБЛ) записывают в различные моменты времени на системе Xenogen IVIS Imaging System 200 (Perkin Elmer), через 15 мин после в.б. введения люциферина (150 мкг/мышь). Оценка биолюминесценции показала, что КАЛС способны значительно ингибировать метастазы опухоли с высокой эффективностью по сравнению с Цетуксимабом и в различные моменты сбора опухоли and (P<0,01 и P<0,05) (фигура 15, таблица 7).

Пример 24: Определение in vivo противоопухолевого действия ST8154AA1, вводимого в.б. против CAPAN-1 рака поджелудочной железы

Сравнение ST8154AA1 (40 мг/кг, в.б., q4dx4), ST7612AA1 (200 мг/кг, в.б., q4dx4) и Цетуксимаба (40 мг/кг, в.б., q4dx4) оценивают в ортотопической мышинной модели рака поджелудочной железы CAPAN-1. Клетки Capon-1 (1×10^6) вводят непосредственно в поджелудочную железу экспериментальных групп. Обработка ST8154AA1, ST7612AA1 и Цетуксимабом начинают через 6 дней после инокулирования опухоли и, через 90 дней после инъекции опухоли, мышей умерщвляют для анализа массы опухоли. ST8154AA1 показал ингибирование роста опухоли на 84% у 6 из 10 мышей с полными реакциями, а Цетуксимаб дает 49% ингибирования роста опухоли у 2 из 10 мышей с полными реакциями. Только ST7612AA1 показал более низкую активность на рост опухоли (32%), так как схема q4dx4 не является оптимальной для ингибитора ГДАЦ. Массу опухоли оценивают через 90 дней после инъекции опухоли и выражают как средняя и СОС, $P < 0,05$ к Сtx) (фигура 16, таблица 7).

Пример 25: Определение in vivo противоопухолевого действия ST8154AA1, вводимого в.б., против ППК (полученного у пациента ксенотрансплантата) рака поджелудочной железы

Мышам NOD-SCID (от Jackson Laboratories) делают одну подкожную инъекцию клеток пациента PA5363 P2 в количестве 51000 клеток/100 мкл, ресуспендированных в равном объеме Cultrex 10× сфероидной формации ЕСМ.

Цетуксимаб и ST8154AA1 вводят внутрибрюшинно каждые 4 дня в течение 5 дней (q4dx5) в дозе 40 мг/10 мл/кг. Измерения роста опухоли и данных такие, как в примере 20.

Обработка показала, что ST8154AA1 значительно более эффективен, чем Цетуксимаб ($P < 0,05$) (фигура 17, таблица 7).

Пример 26. Определение in vivo противоопухолевого действия ST8178AA1 и ST8176AA1, введенных в.б., против рака яичников SKOV-3

Самкам голых мышей Nu/Nu (от Charles River, Italy) делают одну подкожную инъекцию 5×10^6 клеток рака яичников SKOV-3, суспендированных в 100 мкл клеточной культуральной среды RPMI с добавлением 10% ФТС.

Мышей каждой экспериментальной группы обрабатывают в.б.

каждые четыре дня, 4 обработки (q4dx4) в дозе 15 мг/10 мл/кг. Результаты показали, что ST8178AA1 и ST8176AA1 значительно более эффективны, чем Трастузумаб ($P < 0,05$) (фигуры 18-19, таблицы 8 и 9). Измерения опухоли и данных такие, как в примере 20. Эти данные позволяют предположить двойной эффект КАЛС по сравнению с Трастузумабом на рост опухоли.

Таблица 8. Противоопухолевое действие ST8178AA1 к Трастузумабу против рака яичников SKOV-3

Гистотип опухоли	Имплантация опухоли	Доставка лекарственного средства	Ингибирование опухоли или метастазов (%) ST8176 и Трастузумаба к носителю значение P к Трастузумабу
SKOV-3 рак яичников	п.к.	в.б., q4dx4	65 к 40, $P < 0,05$

Пример 27. Определение in vivo противоопухолевого действия ST8176AA1, введенного в.б., против ортотопически имплантированного рака яичников SKOV-3

Самкам голых мышей Nu/Nu (от Charles River, Italy) делают одну внутрибрюшинную инъекцию 10×10^6 клеток рака яичников SKOV-3, суспендированных в 200 мкл клеточной культуральной среды RPMI с добавлением 10% ФТС.

Мышам вводят в.б. ST8176AA1, Трастузумаб (4 дозы 15 мг/кг один раз каждые 4 дня) или носитель (ФРФБ), начиная через 3 дня после инъекции опухоли. Трастузумаб или ST8176AA1 были эффективными, но КАЛС также показал выздоровление 4 из 9 мышей через 90 дней после имплантации опухоли (фигура 20, таблица 9).

Таблица 9. Противоопухолевое и антиметастатическое действие ST8176AA1 к Трастузумабу в различных моделях опухоли

Гистотип опухоли	Имплантация опухоли	Доставка лекарственного средства	Ингибирование опухоли (%) ST8176 и Трастузумаба к носителю значение P к Трастузумабу
SKOV-3 рак яичников	п.к.	в.б., q4dx4	65 к 40, $P < 0,05$
SKOV-3 рак яичников	ортотопическая	в.б., q4dx4	повышение срока жизни 95 к 72, $P < 0,05$
LS174-T рак толстой кишки	п.к.	в.б., q4dx4	25 к 0, $P < 0,05$

LS174-Т рак толстой кишки	ортотопическая	в.б., q4dx4	повышение срока жизни 35 к 0, $P<0,05$
ППК рака поджелудочной железы PA5363	п.к.	в.б., q4dx5	35 к 0, $P<0,05$

Пример 28: Определение *in vivo* противоопухолевого действия ST8176AA1, введенного в.б., против внутрибрюшинного рака толстой кишки LS174-Т

КАЛС также оценивают против внутрибрюшинного рака, такого как рак толстой кишки, модели ксенотрансплантата агрессивной опухоли.

Целью этого исследования является демонстрация того, что КАЛС может также применяться для местного введения для лечения заболеваний, таких как карциноматоз брюшной полости. Для демонстрации такой активности клетки рака толстой кишки LS-174Т вводят в.б. Клетки собирают и промывают два раза ФРФБ. Десять миллионов клеток суспендируют в 0,2 мл среды ЕМЕМ, содержащей 20% Matrigel™ и вводят в брюшную полость каждой мыши. Все обработки КАЛС проводят в.б. инъекцией в объеме 200 мкл через 3 дня после инъекции опухоли, по схеме q4dx4.

Ежедневно отслеживают смертность мышей, массу записывают два раза в неделю. Животных, показывающих признаки дискомфорта, дистресса или в умирающем состоянии исследуют ветеринары или авторизованный персонал и, при необходимости, гуманно умерщвляют для минимизации боли или страданий.

Данные смертности обрабатывают наиболее подходящим методом статистического анализа для определения повышения продолжительности жизни среди леченных групп, и для получения графика Каплана-Майера. Весь статистический анализ проводят с применением программы *GraphPad-Prism6*.

Результаты показали среднее время выживания (СВВ) 37 дней в группах обработки носителем и Трастузумабом. Наоборот, КАЛС ST8176AA1 показал значительное увеличение среднего времени выживания до 50 дней ($P<0,05$) (**фигура 21, таблица 9**).

В настоящее время традиционное лечение рака брюшной полости включает системную химиотерапию, с или без паллиативной

хирургии, которая малоэффективна в смысле результатов и имеющихся фармакологических ограничений в смысле плохого распределения лекарственного средства в брюшной полости и проникновения в брышинные узлы (*Oyais A 2014 Zentralbl Chir. 2014 141: 421-4*).

Наоборот, недавний инновационный способ местной доставки, называемый PIPAC (внутрибрюшинная аэрозольная терапия под давлением), показал улучшение эффективности внутрибрюшинной терапии (*Solass W 2014 Ann Surg Oncol 21:553-9*) и эта методика оказалась безопасной, без почечной или печеночной токсичности после лечения (*Blanco 2014 20:2311-6; Solass 2013 Ann Surg Oncol 20: 3504-11*).

Так как новые КАЛС показали противоопухолевое действие на местную опухоль при введении аэрозолем и внутрибрюшинно, эти данные вдохновляют на применение в PIPAC описанных здесь КАЛС в дополнение к стандартному парентерального введению.

PIPAC (внутрибрюшинная аэрозольная терапия под давлением) является инновационным способом местной доставки, который улучшает эффективность внутрибрюшинной терапии (*Solass W 2014 Ann Surg Oncol 21:553-9*).

Эта методика является безопасной, без почечной или печеночной токсичности после лечения (*Blanco 2014 20:2311-6; Solass et al 2013 Ann Surg Oncol 20: 3504-11*).

Наоборот, традиционное лечение рака брюшной полости включает системную химиотерапию, с или без паллиативной хирургии, которая малоэффективна в смысле результатов. Другой проблемой являются фармакологические ограничения в смысле плохого распределения лекарственного средства в брюшной полости и проникновения в брышинные узлы (*Oyais A et al 2014 Zentralbl Chir. 2014 141: 421-4*). На основании биохимического анализа, подтверждающего стабильность КАЛС, описанных здесь, после распыления, и данных об эффективности внутрибрюшинной доставки, применение КАЛС в PIPAC также оправдано.

Пример 29: Определение in vivo противоопухолевого действия ST8176AA1, введенного в.б., против рака толстой кишки LS-174T

Опухоли выращивают у мышей Nu/Nu в течение 6 дней после

п.к. инъекции 5×10^6 LS174T клеток рака толстой кишки. Развитие очага и реакцию на лечение антителом отслеживают с применением цифрового циркуля. Мышам вводят в.б. ST8176AA1, Трастузумаб (4 дозы 15 мг/кг один раз каждые 4 дня) или носитель (ФРФБ). КАЛС ST8176AA1 значительно ингибирует рост опухоли рака толстой кишки ($P < 0,05$ к Трастузумабу) (**фигура 22, таблица 9**).

Пример 30: Определение in vivo противоопухолевого действия ST8176AA1, введенного в.б., против ППК рака поджелудочной железы

Мышам NOD-SCID (от Jackson Laboratories) вводят одну подкожную инъекцию клеток пациента PA5363 P2 в количестве 77000 клеток/100 мкл, ресуспендированных в равном объеме Cultrex 10× сфероидной формации ECM.

Трастузумаб и ST8176AA1 вводят внутрибрюшинно каждые 4 дня в течение 5 дней (q4dx5) в дозе 15 мг/ /кг в экспериментальных группах по 10 мышей в каждой группе. Измерения опухоли и данных как в примере 20.

Лечение показало, что ST8176AA1 значительно более эффективен, чем Трастузумаб ($P < 0,05$) и к обработанной носителем группе ($P < 0,05$) (**фигура 23, таблица 9**).

Пример 31: Определение in vivo противоопухолевого действия сочетания Цетуксимаба с низкой дозой ST7612AA1, соответствующей введенной дозе к mAb, против A549 рака легкого

Противоопухолевое действие КАЛС ST8154AA1 по сравнению с эквимоллярным сочетанием или Цетуксимабом и ST7612AA1 также оценивают против модели A549 немелкоклеточного рака легкого. Оптимальные дозы ST7612AA1 или Цетуксимаба также исследуют.

Клетки A549 рака легкого человека культивируют в подходящей полной среде. В день ввода опухоли клетки собирают из субконфлюэнтных культур трипсинизацией, промывают ФРФБ, суспендируют в ФРФБ и подкожно вводят в правый бок иммунодефицитных мышей (5×10^6 /100 мкл). Лечение начинают, когда размер опухоли составляет около 80 мм³, и мышей произвольно делят на экспериментальные группы (10 мышей/группу):

Введение ST8154AA1 q4dx4, в.б., вызывает ингибирование роста опухоли, что оценивают калибровкой во время исследования и

посмертной массой опухоли, хотя эквимоллярная смесь компонентов КАЛС, Цетуксимаба (40 мг/кг, в.б., q4dx4) и иГДАЦ (0,1 мг/кг, в.б., q4dx4) не была эффективной (таблица 10).

В этом эксперименте только Цетуксимаб (40 мг/кг, в.б., q4dx4) не показывает противоопухолевое действие.

Ассоциация оптимальных доз Цетуксимаба (40 мг/кг, в.б., q4dx4) с ST7612AA1 (40 мг/кг, п.о., qdx5/wx3w) показала сравнимое противоопухолевое действие с только ST7612AA1 (40 мг/кг, п.о., qdx5/wx3w).

ST7612AA1 в дозе 40 мг/кг, п.о., qdx5/wx3w показал подобное противоопухолевое действие к действию КАЛС ST8154AA1, где ST7612AA1 в дозе 0,1 мг/кг, в.б., q4dx4 не был эффективным (таблица 10).

Таблица 10. Противоопухолевое действие сочетания ST7612AA1 с Цетуксимабом против A549 НМКРЛ.

Группа	Доза (мг/кг), способ, схема	TVI на 50 день, значение P к носителю	TVI на 56 день, значение P к носителю
Носитель	0	–	–
Цетуксимаб	40, в.б., q4dx4	0, P=0,91	0, P=0,79
ST7612AA1	40, п.о., qdx5/wx3w	33, P=0,007	35, P=0,0009
Цет+ST7612AA1	40 в.б.+40 п.о.	20, P=0,11	27, P=0,07
ST7612AA1	0,1, в.б., q4dx4	0, P=0,95	0, P=0,88
Цет+ST7612AA1	40 в.б.+0,1 в.б.	9, P=0,22	8, P=0,55
ST8154AA1	40, q4dx4	21, P=0,05	20, P=0,04

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство формулы (I)

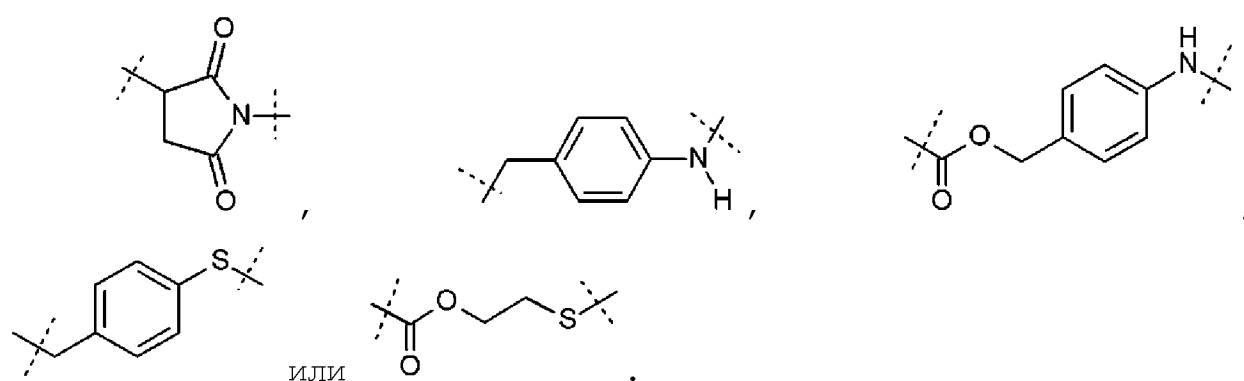
$D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)_o-(CG)_p-Ab$

(формула I)

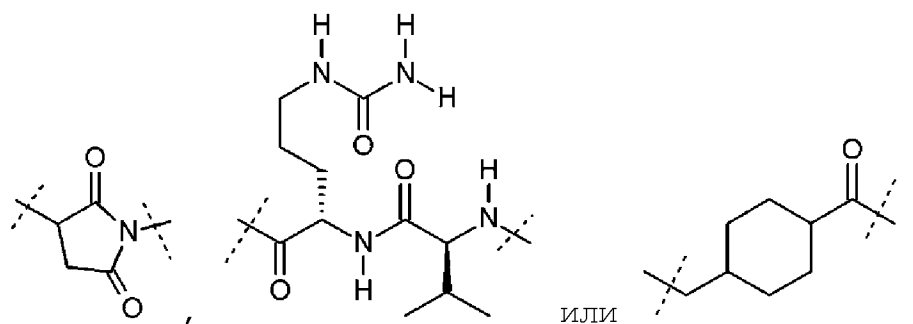
или его фармацевтически приемлемая соль, где

D является лекарственным ингибитором гистондеацетилазы, выбранным из ингибиторов гистондеацетилазы на основе тиола, ингибиторов гистондеацетилазы на основе гидроксаминной кислоты или ингибиторов гистондеацетилазы на основе бензамида,

CU является соединительной единицей, которая может отсутствовать или которую выбирают из

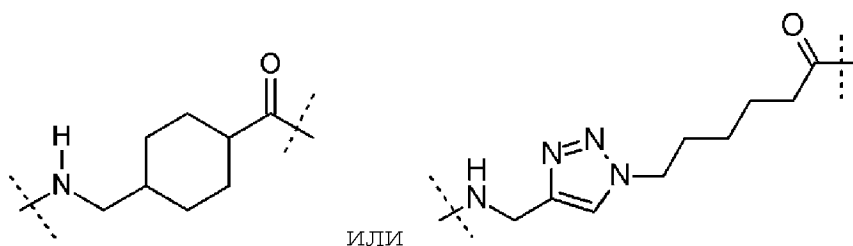


S1 является разделителем и может отсутствовать или является

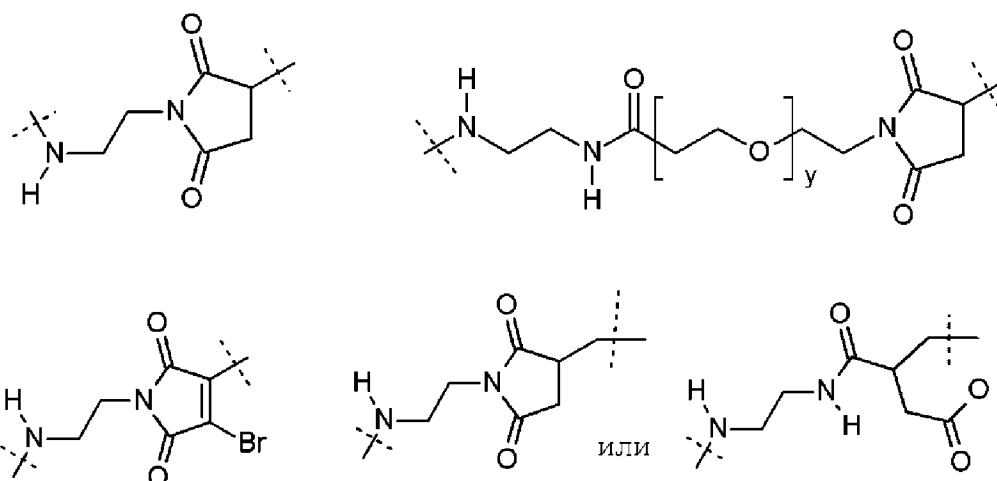


L является линкером, который выбирают из $(CH_2)_q-CO$, $NH-(CH_2)_r-(PЭГ)_s-(CH_2)_w-CO$, $NH-CO-(CH_2)_r-(PЭГ)_s-X-(CH_2)_w-CO$, где X может отсутствовать, является NH или O, q является целым числом 2-8, r может отсутствовать или является целым числом 1-4, s может отсутствовать или является целым числом 1-6, и w может отсутствовать или является целым числом 1-2,

S2 является разделителем и может отсутствовать или является



СГ является соединительной группой, полученной после конъюгирования с цистеинтиол- или лизинаминогруппами антител, которая может отсутствовать или является одной из следующих групп:

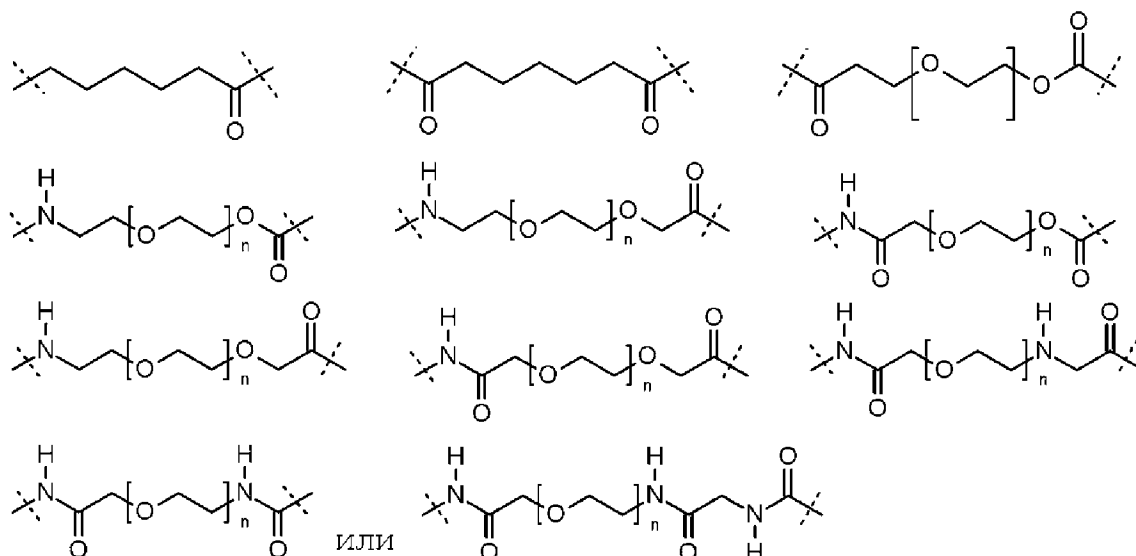


где y является целым числом от 0 до 8

Ab является антителом или его антиген-связывающим фрагментом, и

m , n , o и p являются целыми числами 0 или 1.

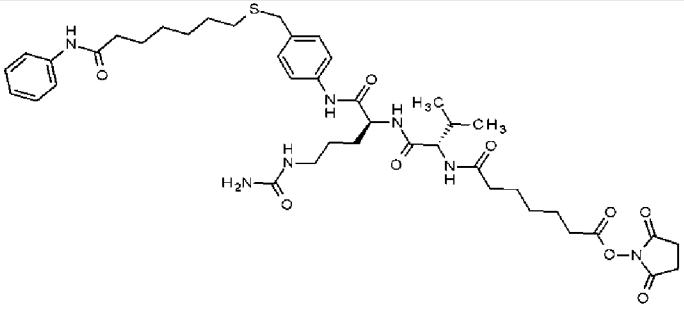
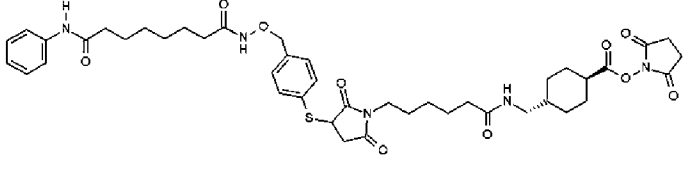
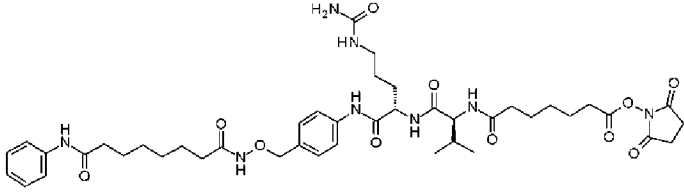
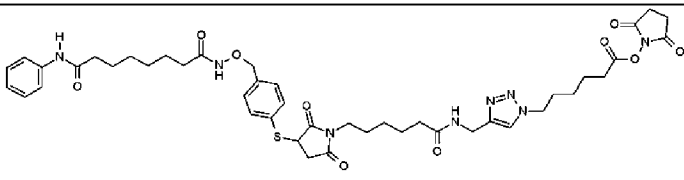
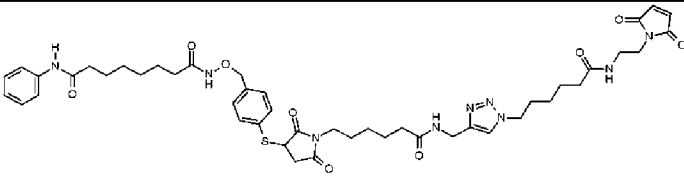
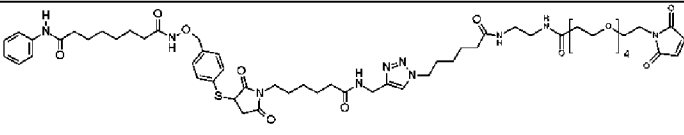
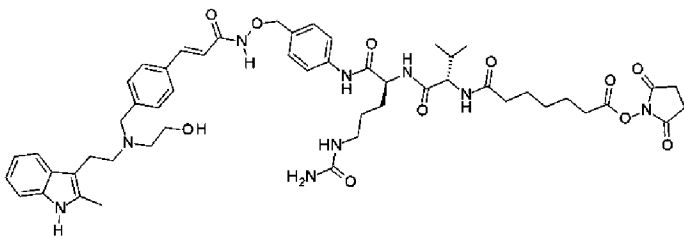
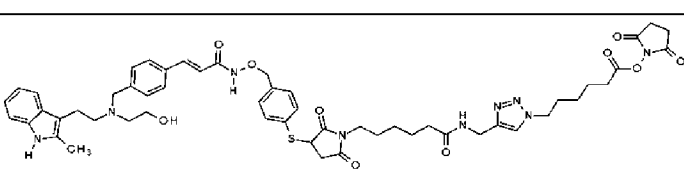
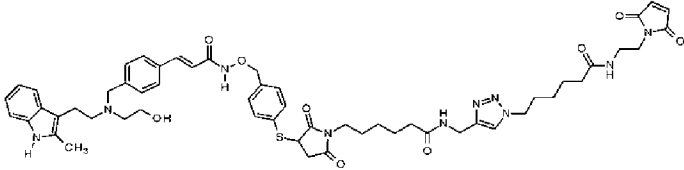
2. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 1, где линкер L является группой, выбранное из:

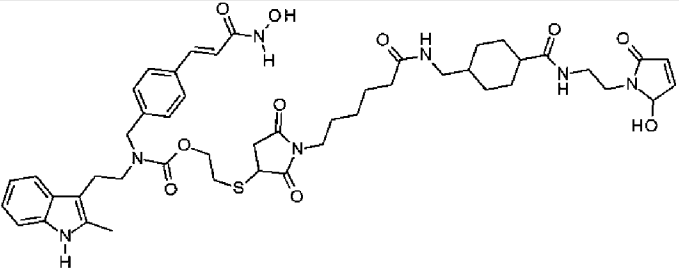
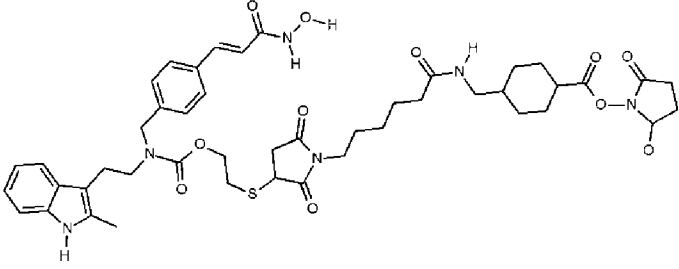
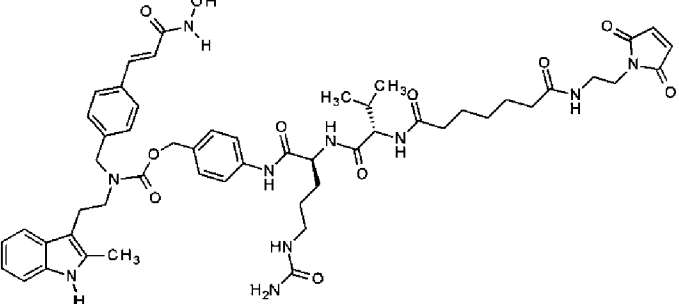
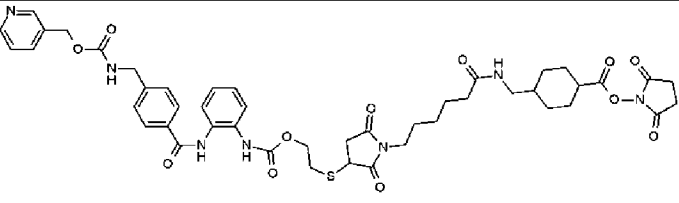
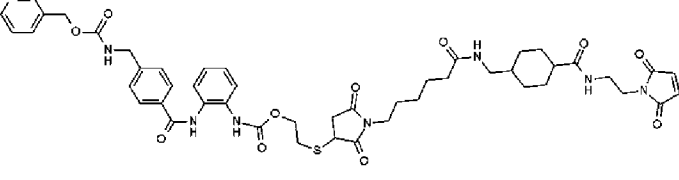
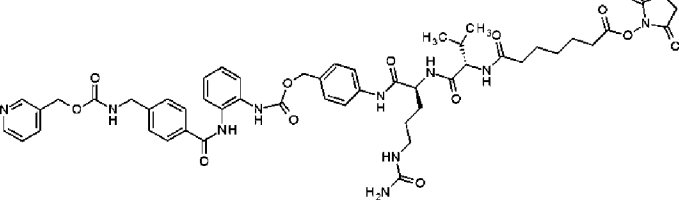
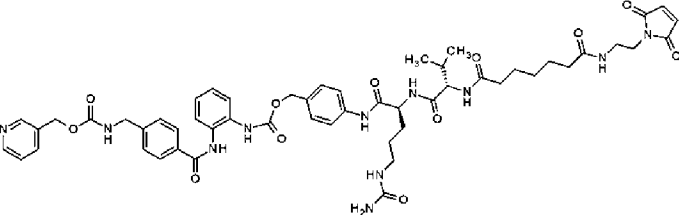


где n является целым числом от 2 до 5.

3. The конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 1, где лекарственный ингибитор гистондеацетилазы и полезная нагрузка, содержащая структуру $D-(CU)_m-(S1)_n-L-(S2)_o-(CT)'_p$ - формулы I, является соединением, выбранным из:

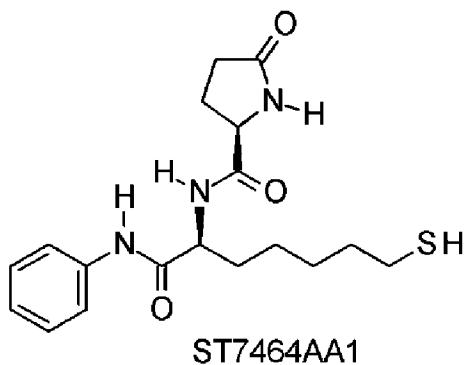
Ид. №	Код ST	Химическая структура	М.М.	Класс
(1)	8128AA1		810,9	NHS
(2)	8152AA1		836,0	Малеим ид
(3)	8132AA1		964,1	NHS
(4)	8190AA1		1030,2	Малеим ид
(5)	8189AA1		1044,2	Малеим ид
(6)	8191AA1		889,0	NHS
(7)	8197AA1		684,8	Малеим ид

(8)	8235AA1		838,0	NHS
(9)	8217AA1		834,0	NHS
(10)	8201AA1		865,0	NHS
(11)	8215AA1		889,0	NHS
(12)	8216AA1		914,1	Малеим ид
(13)	8236AA1		1161,4	Малеим ид
(14)	8232AA1		994,1	Малеим ид
(15)	8233AA1		1018,2	NHS
(16)	8234AA1		1043,2	Малеим ид

(17))	8229AA1		928,1	Малеим ид
(18))	8230AA1		903,0	NHS
(19))	8231AA1		1019,2	Малеим ид
(20))	8225AA1		928,0	NHS
(21))	8226AA1		953,1	Малеим ид
(22))	8227AA1		1021,1	NHS
(23))	8228AA1		1046,1	Малеим ид

4. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 3, где лекарственный ингибитор гистондеацетилазы на основе тиола

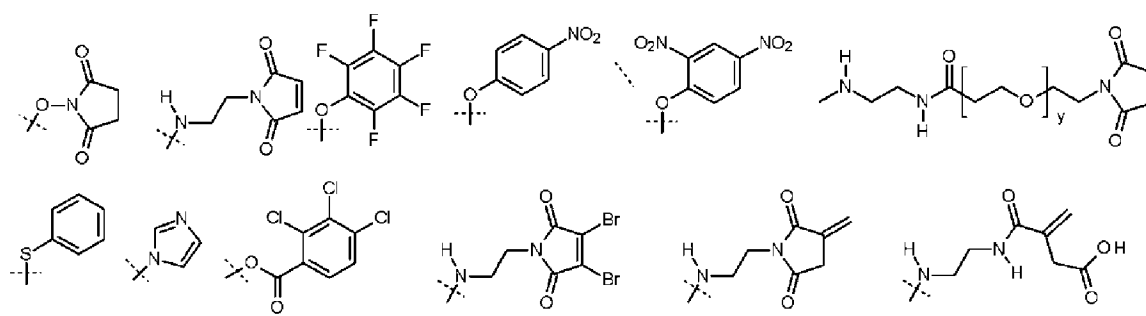
ST7464AA1 имеет следующую формулу:



и полезной нагрузкой является соединение, очевидное из следующей таблицы:

1	8128AA1	
2	8152AA1	
3	8132AA1	
4	8190AA1	

5. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 1, где соединяющую единицу (СЕ) выбирают из



6. Конъюгат антитело-лекарственное средство по одному из пунктов 1-5, где антитело направлено против ингибитора гистондеацетилазы или против рецептора, поглощенного опухолевыми клетками с выделением ингибитора гистондеацетилазы, такого как рецепторы c-met или интегрина.

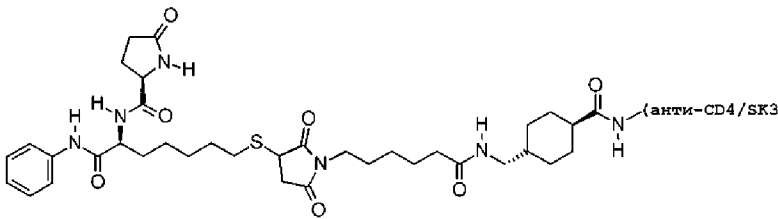
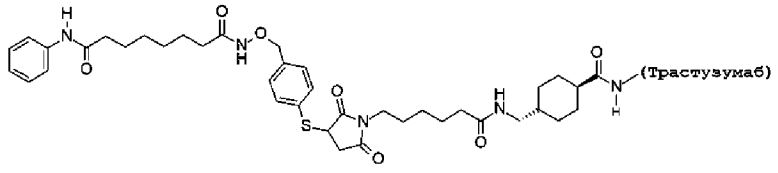
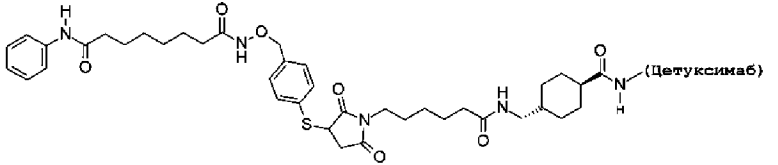
7. Конъюгат антитело-лекарственное средство по одному из пунктов 1-6, где антителом является антитело белка семейства анти-EGFR.

8. Конъюгат антитело-лекарственное средство по одному из пунктов 1-7, где антитело выбирают из Трастузумаба, Цетуксимаба, Бевацизумаба, Панитумумаба или родственных биоподобных препаратов.

9. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 8, имеющий формулу, выбранную из

Ид. № код ST	Химическая структура	МК	ОЛА
(24) 8154AA1		Lys	8,0 (± 1)
(25) 8155AA1		Lys	6,1 (± 1)
(26) 8177AA1		Cys	4,0 (± 0,7)

(27) 8178AA1		Lys	8,0 (± 0,2)
(28) 8176AA1		Cys	4,5 (± 0,5)
(29) 8179AA1		Lys	6,1 (± 0,2)
(30) 8205AA1		Lys	6,2 (± 0,2)
(31) 8202AA1		Lys	5,5 (± 0,5)
(32) 8193AA1		Lys	9,0 (± 2)
(33) 8194AA1		Lys	6,5 (± 0,5)
(34) 8212AA1		Lys	8,0 (± 0,2)

(35) 8213AA1		Lys	4,0 (± 1)
(36) 8218AA1		Lys	5,0 (± 0,5)
(37) 8219AA1		Lys	4,0 (± 0,5)

10. Конъюгат антитело-лекарственное средство по одному из пунктов 1-9 для применения в качестве лекарственного средства.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество конъюгата антитело-лекарственное средство по одному из пунктов 1-9 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

12. Конъюгат антитело-лекарственное средство по одному из пунктов 1-9 или фармацевтическая композиция для применения в лечении рака или опухоли, экспрессирующей рецептор, выбранный из ErbB1, ErbB2 или ErbB3.

13. Конъюгат антитело-лекарственное средство по одному из пунктов 1-9 или фармацевтическая композиция для применения по пункту 12, где рак выбирают из рака легкого, брюшной полости, молочной железы, толстой кишки, мозга, головы и шеи, эндометрия, шейки матки-эндометрия, почек, поджелудочной железы, желудка, толстой кишки, аппендикса, пищевода и простаты; или из лейкоза, псевдомиксомы брюшины, рака поджелудочной железы, метастазов в печени и саркомы брюшной полости не кишечных тканей.

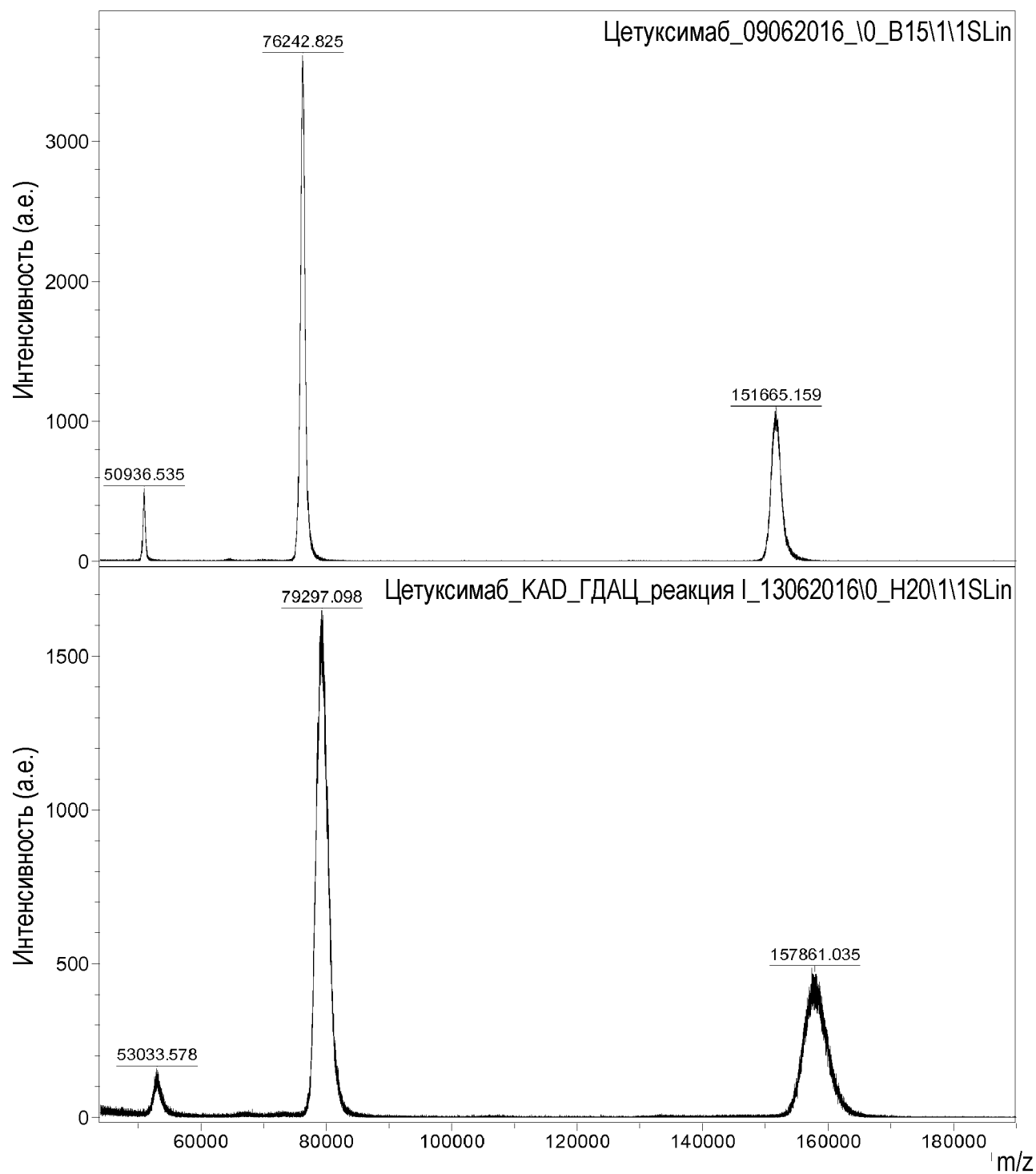
14. Конъюгат антитело-лекарственное средство по одному из пунктов 1-9 или фармацевтическая композиция для применения в качестве терапевтического адъюванта в лечении ВИЧ.

15. Конъюгат антитело-лекарственное средство по одному из пунктов 1-13 или фармацевтическая композиция в составе, подходящем для местной доставки распылением.

16. Конъюгат антитело-лекарственное средство или

фармацевтическая композиция по пункту 15 для применения в лечении рака легкого, молочной железы, толстой кишки, мозга, головы и шеи, рака эндометрия, рака почек, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака пищевода, рака яичников и простаты, и лейкоза.

ФИГ.1

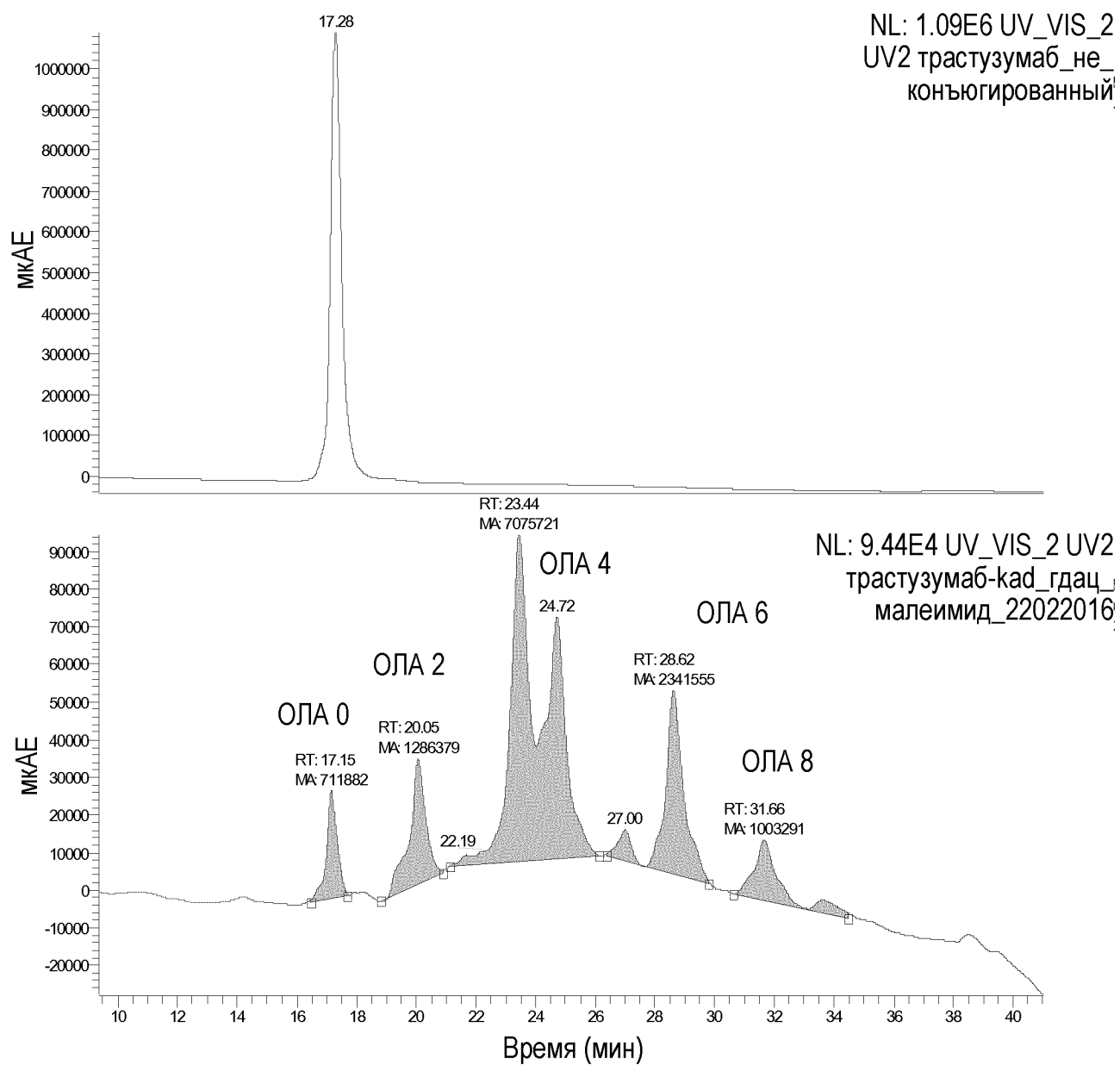


ФИГ.2

трастузумаб-kad_гдац_малеимид_22022016

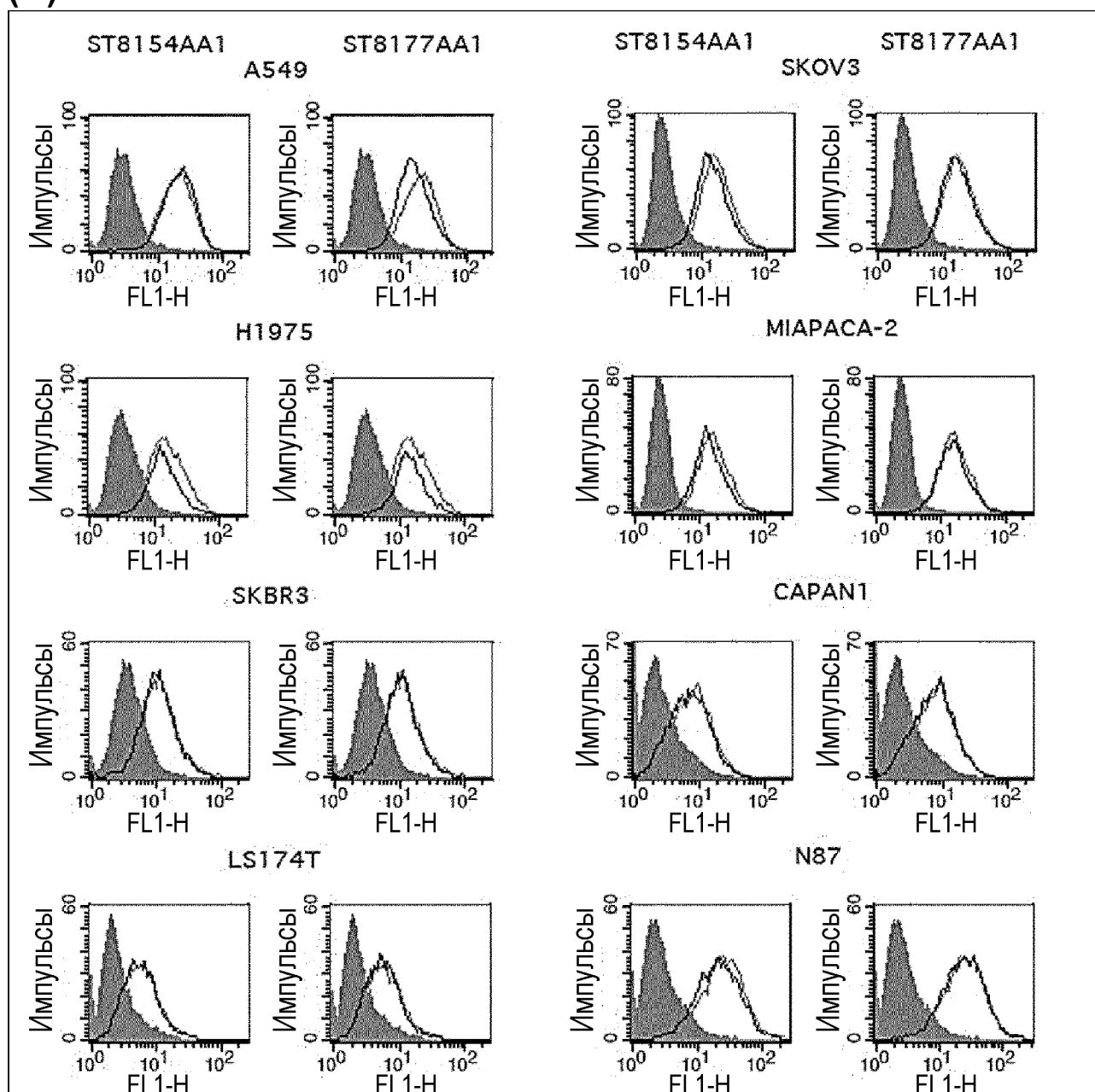
2/22/2016 12:35:28 PM

RT: 9.35 - 41.00 SM: 11G

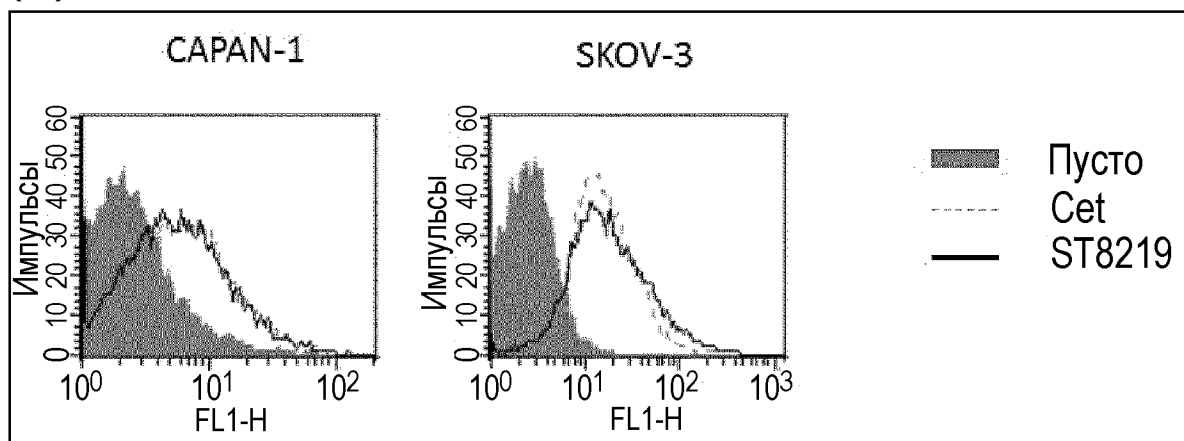


ФИГ.3

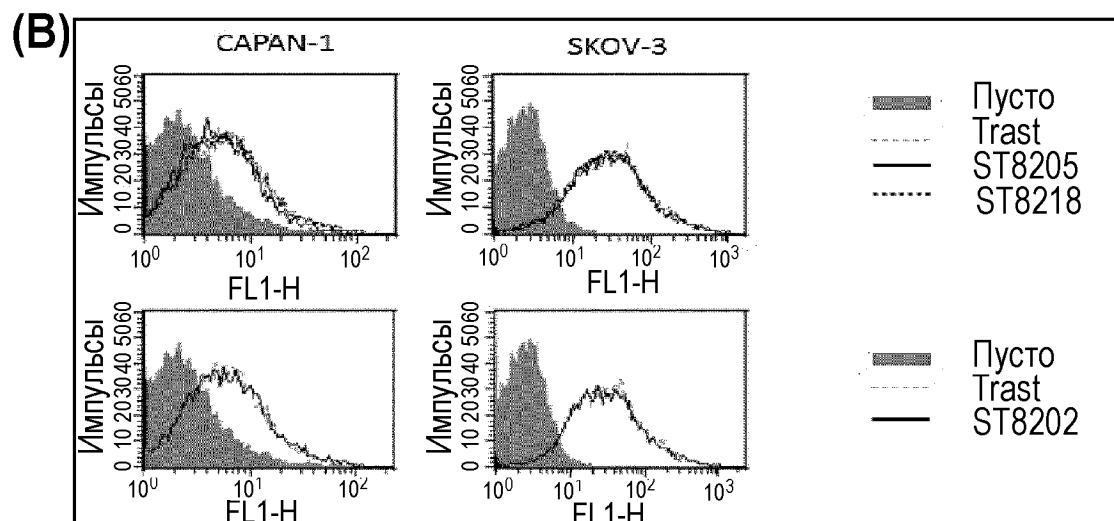
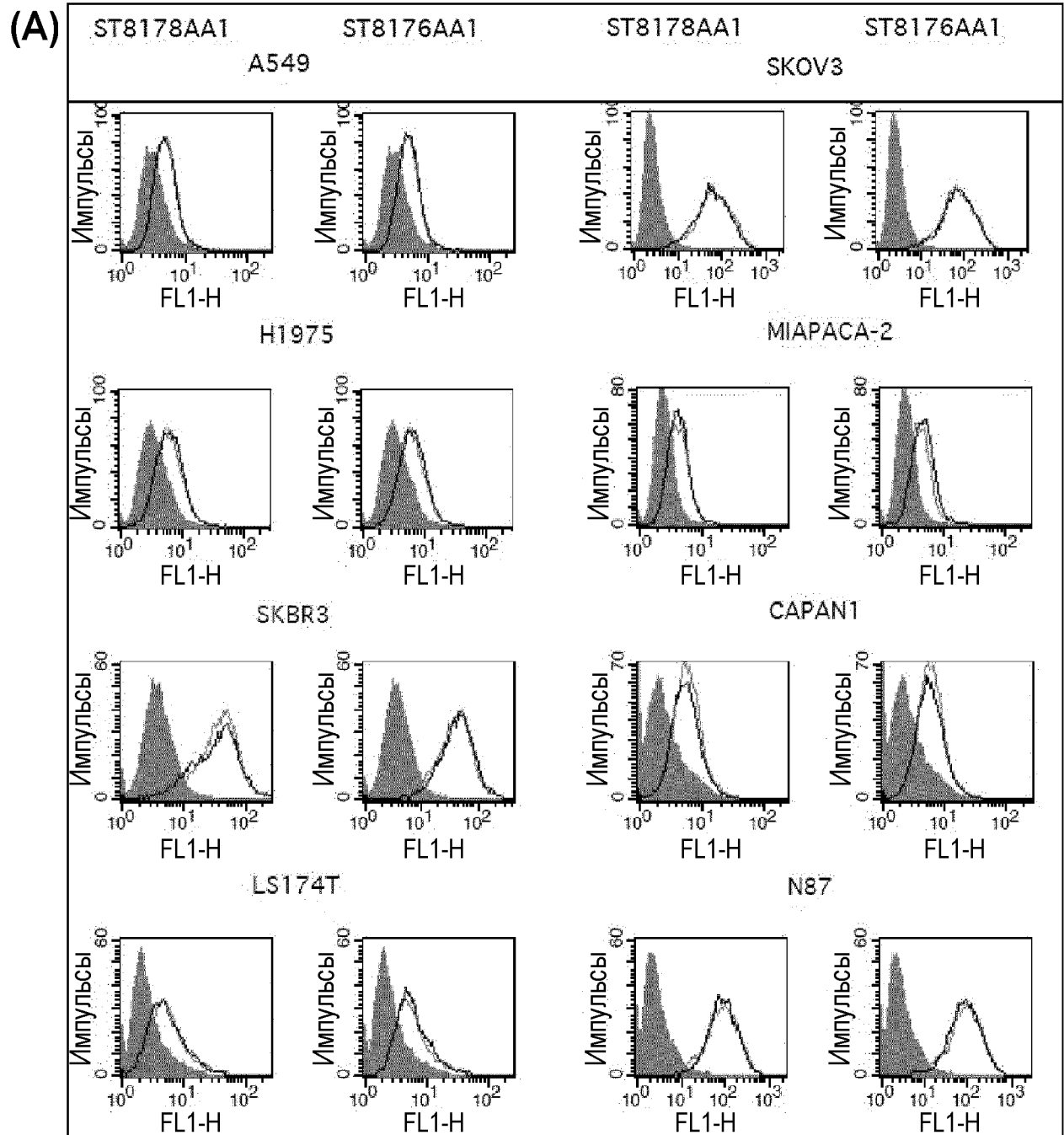
(A)



(B)

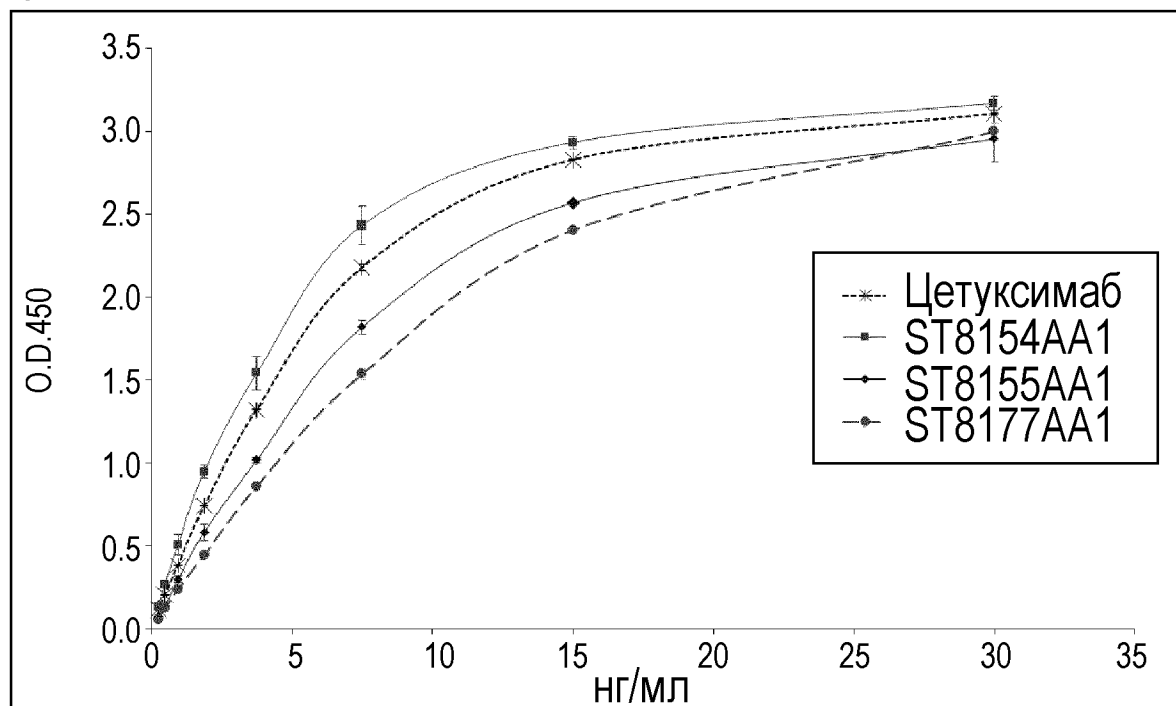


ФИГ.4

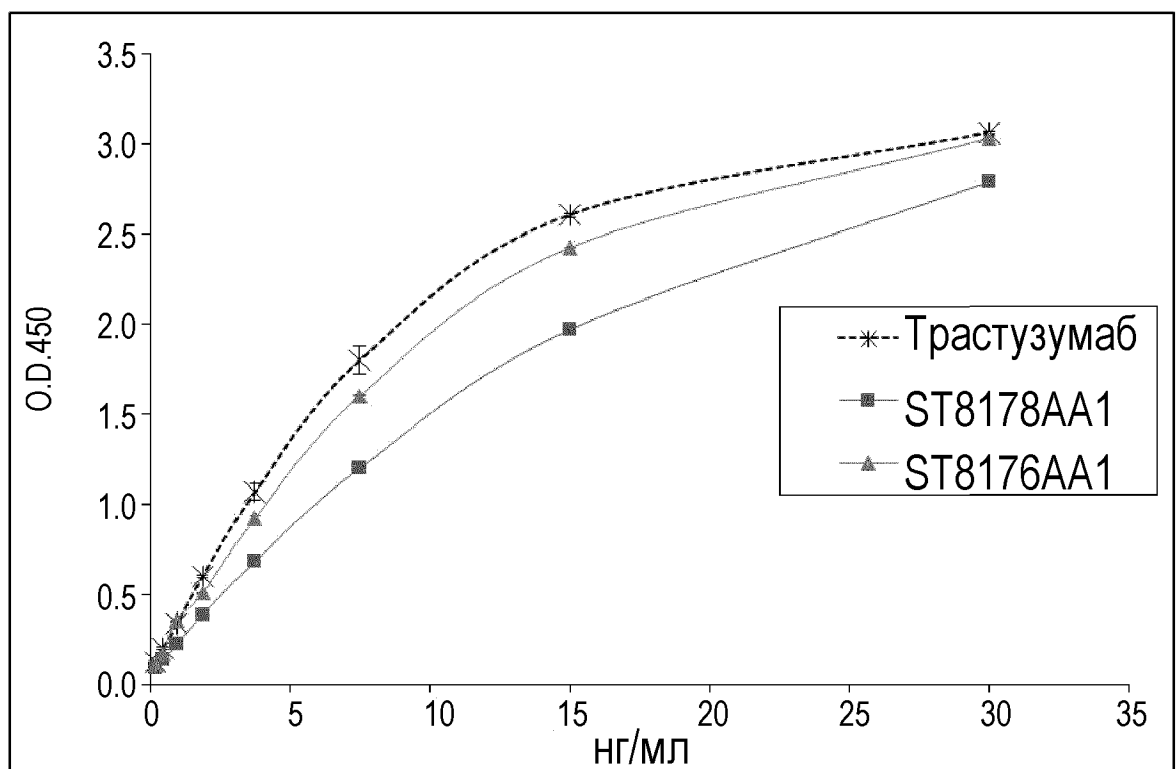


ФИГ.5

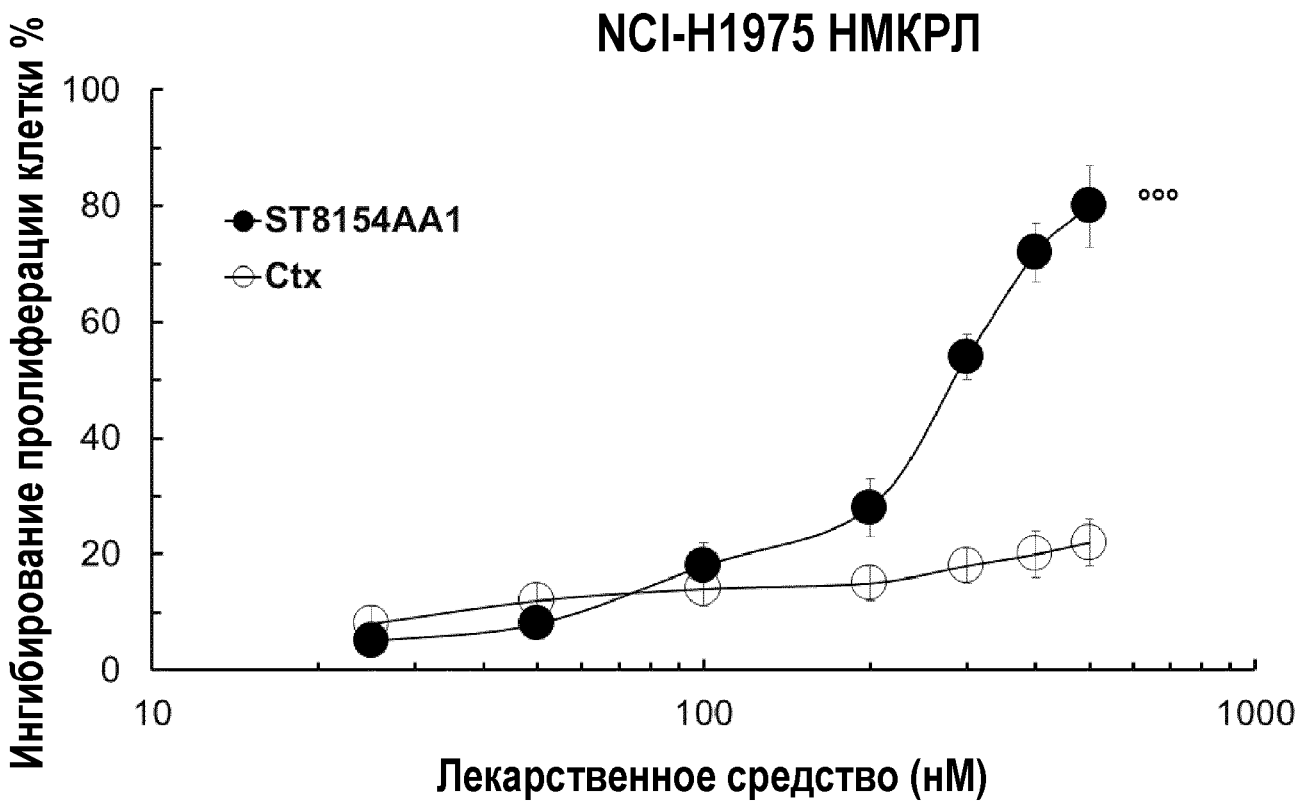
(A)



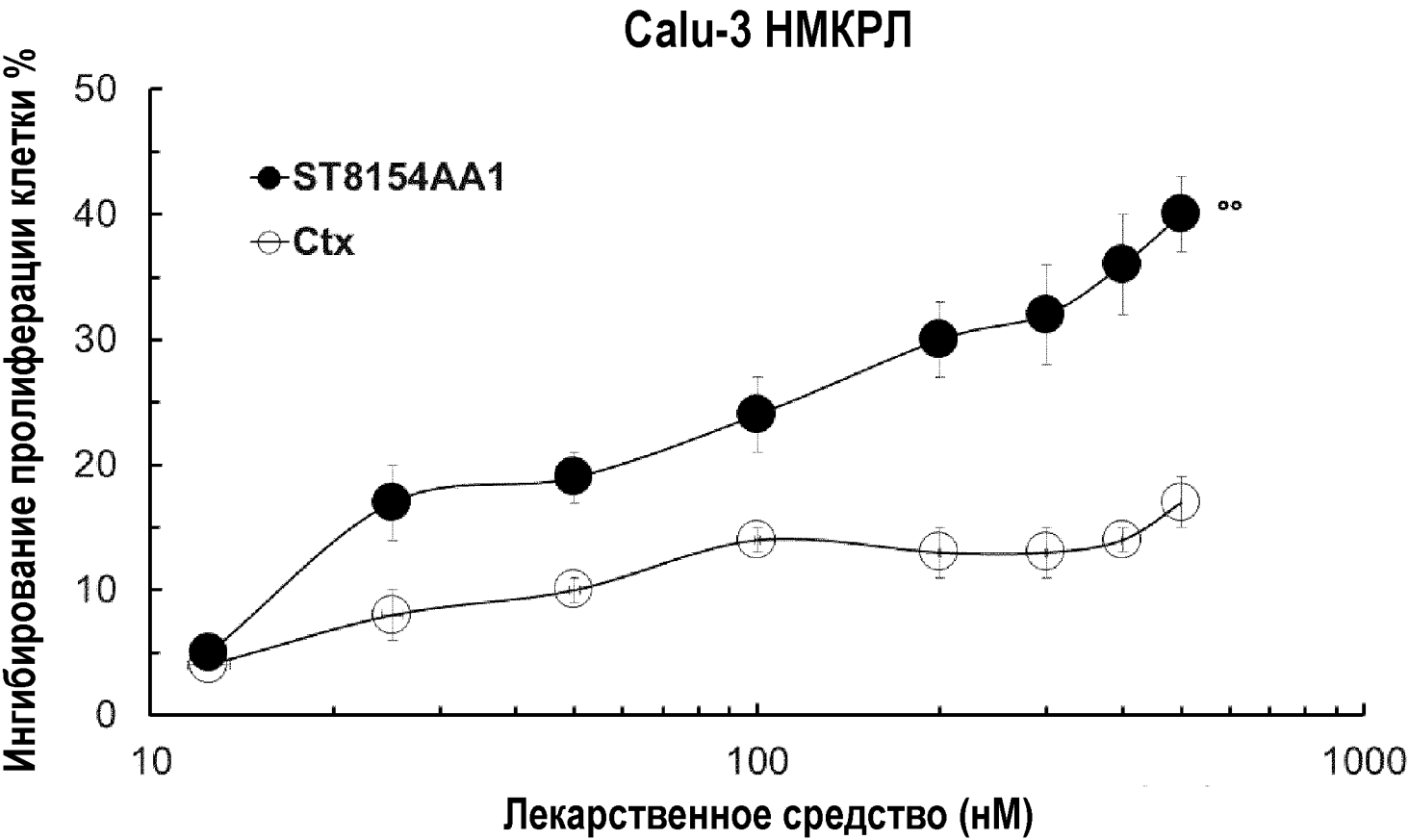
(B)



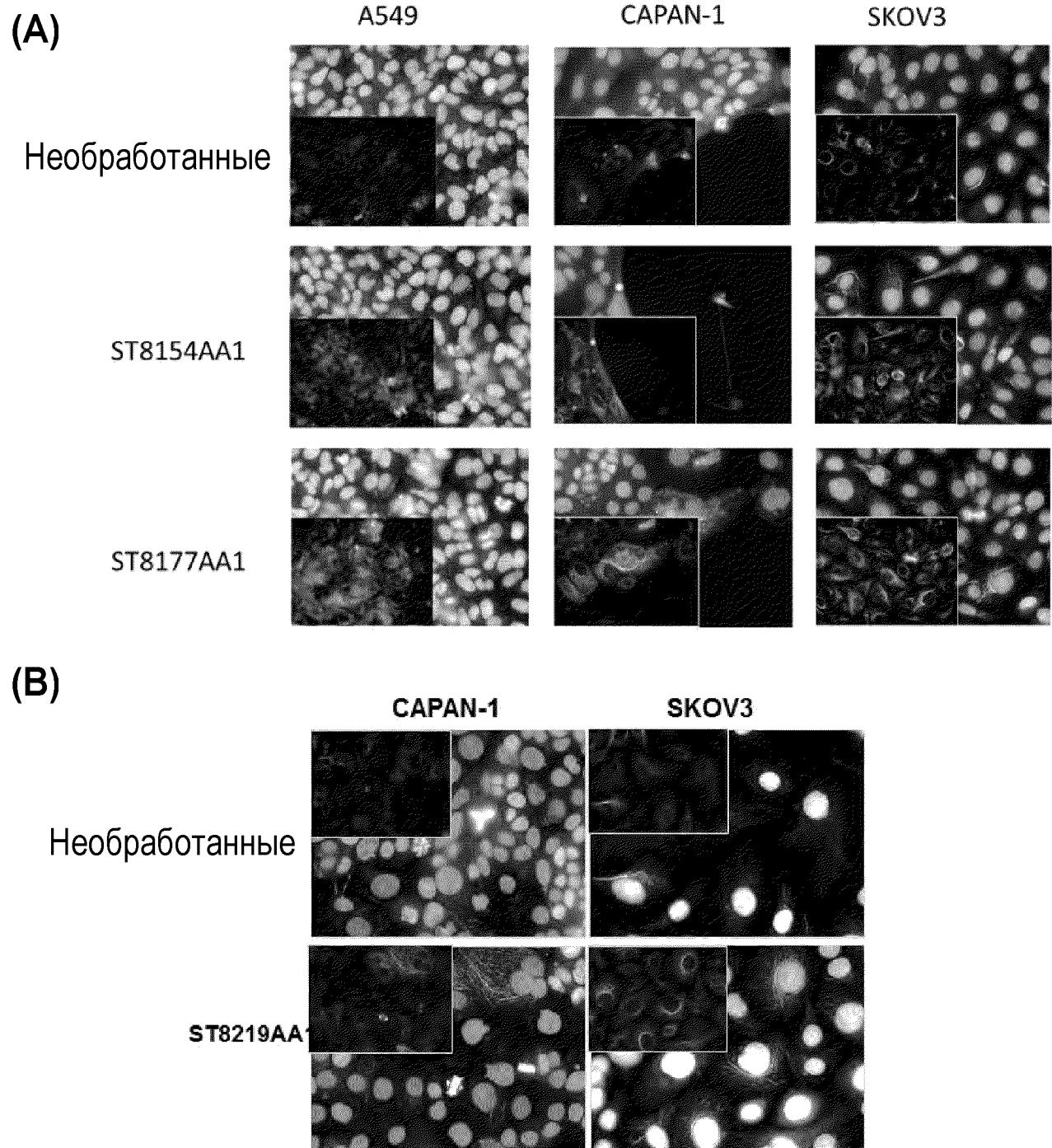
ФИГ.6



ФИГ.7

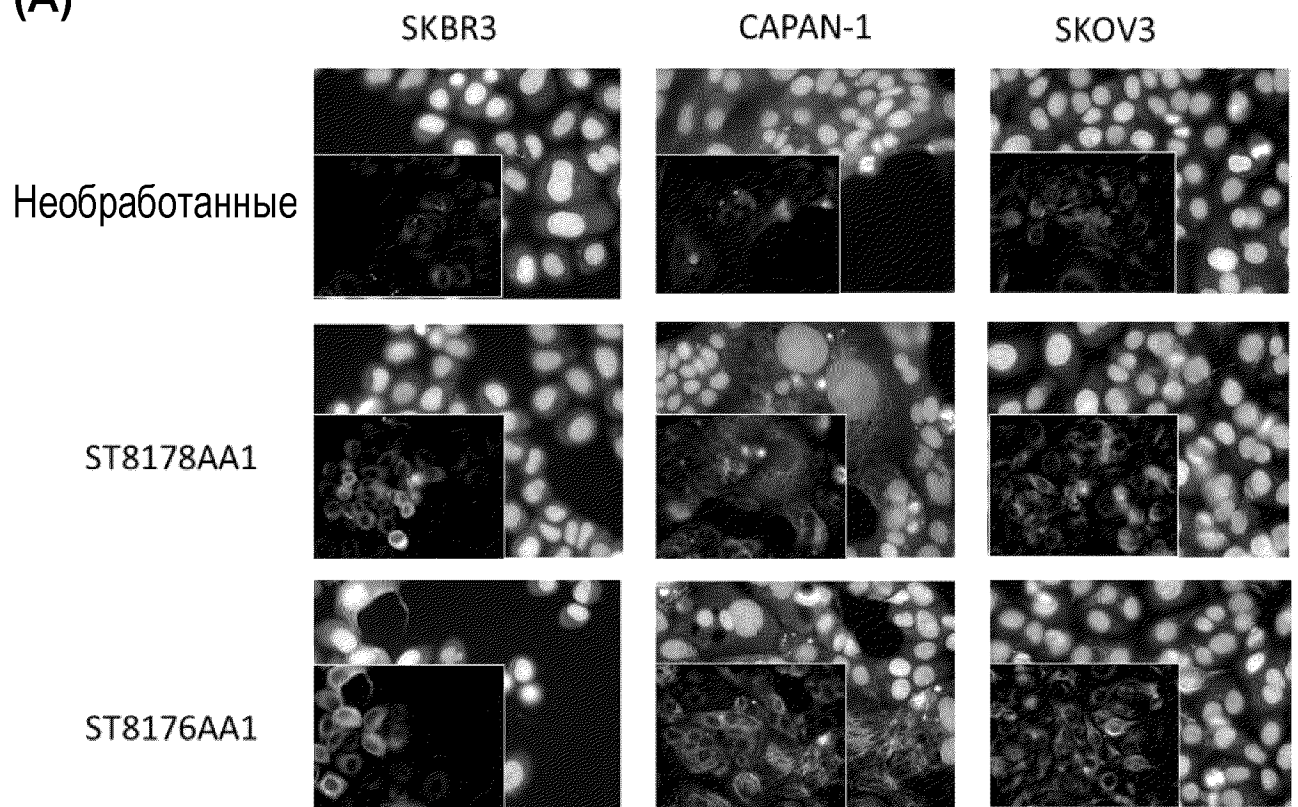


ФИГ.8



ФИГ.9а

(A)



ФИГ.9b

(B)

Необработанные

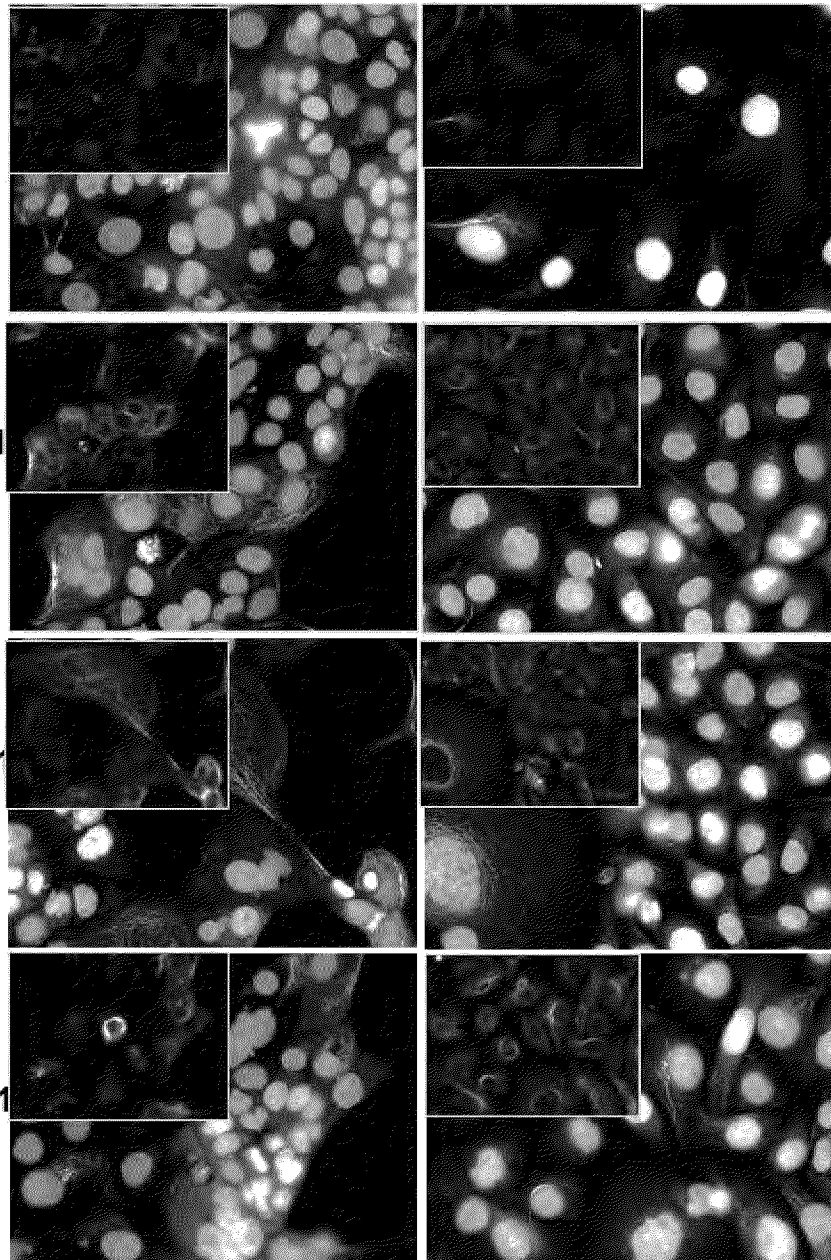
CAPAN-1

SKOV3

ST8202AA1

ST8205AA1

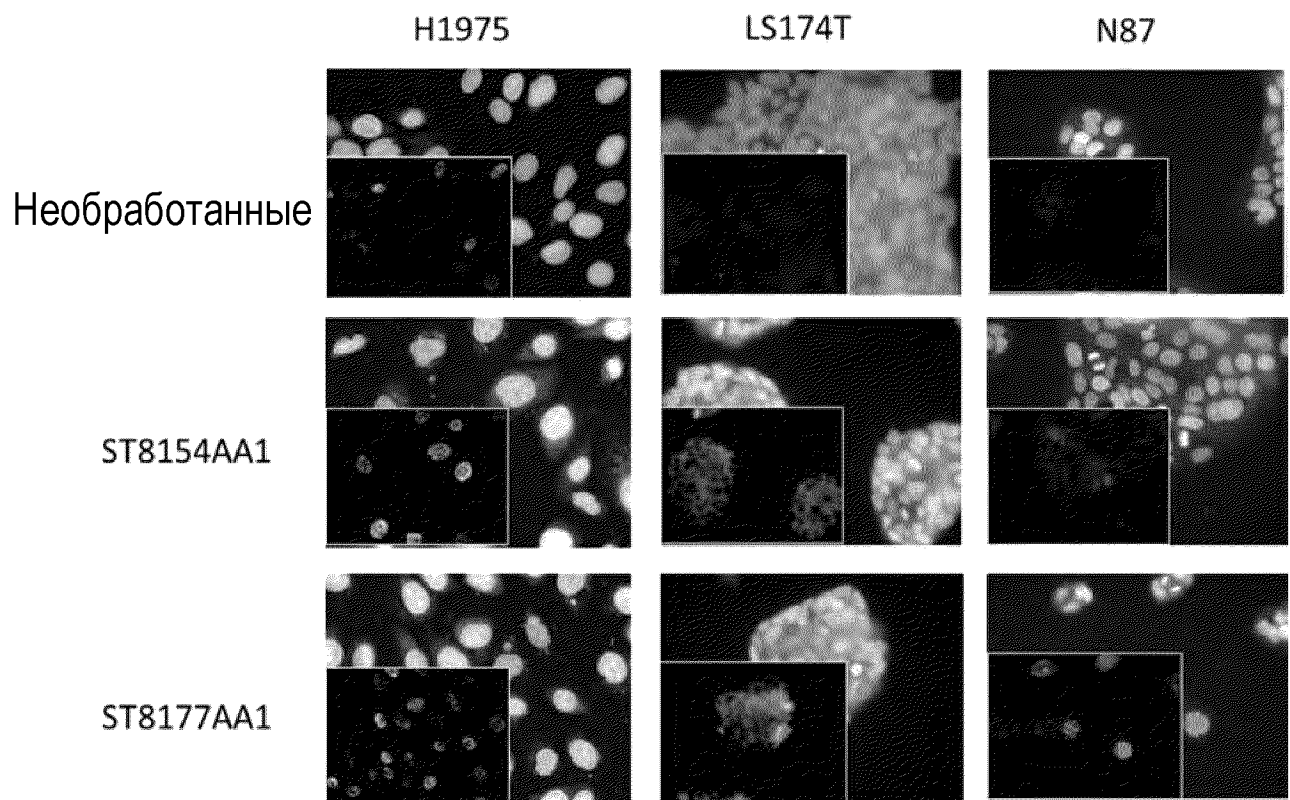
ST8218AA1



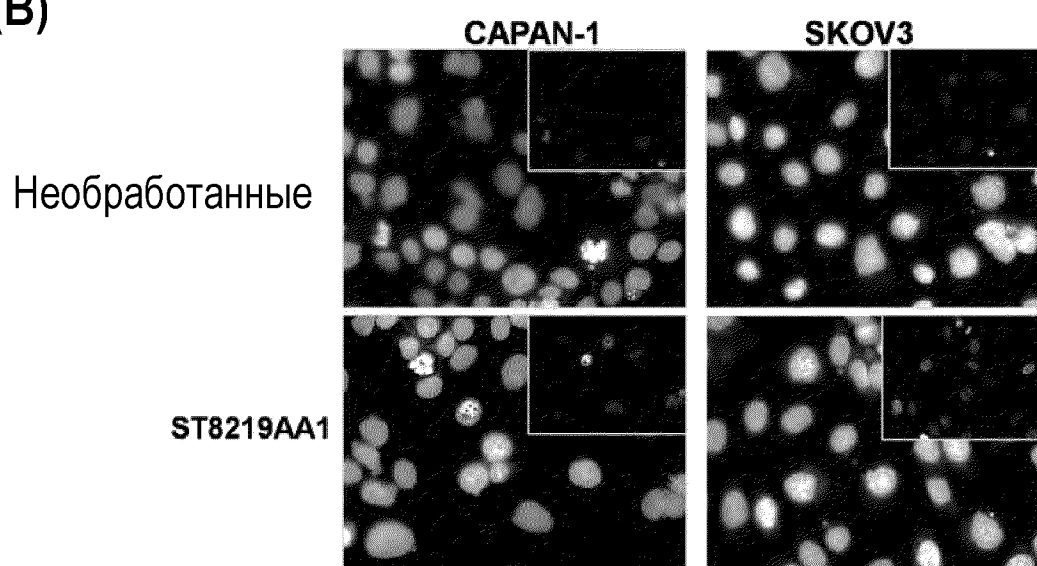
ФИГ.10

(A)

11/24

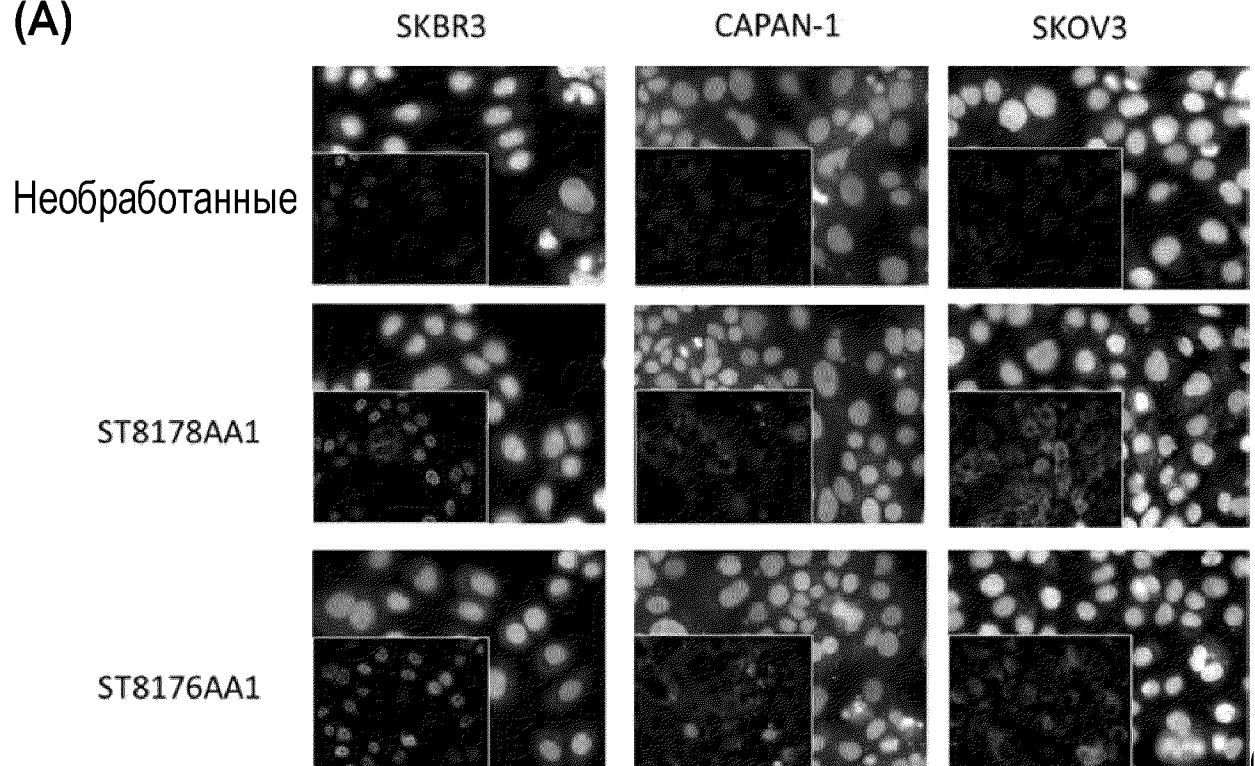


(B)

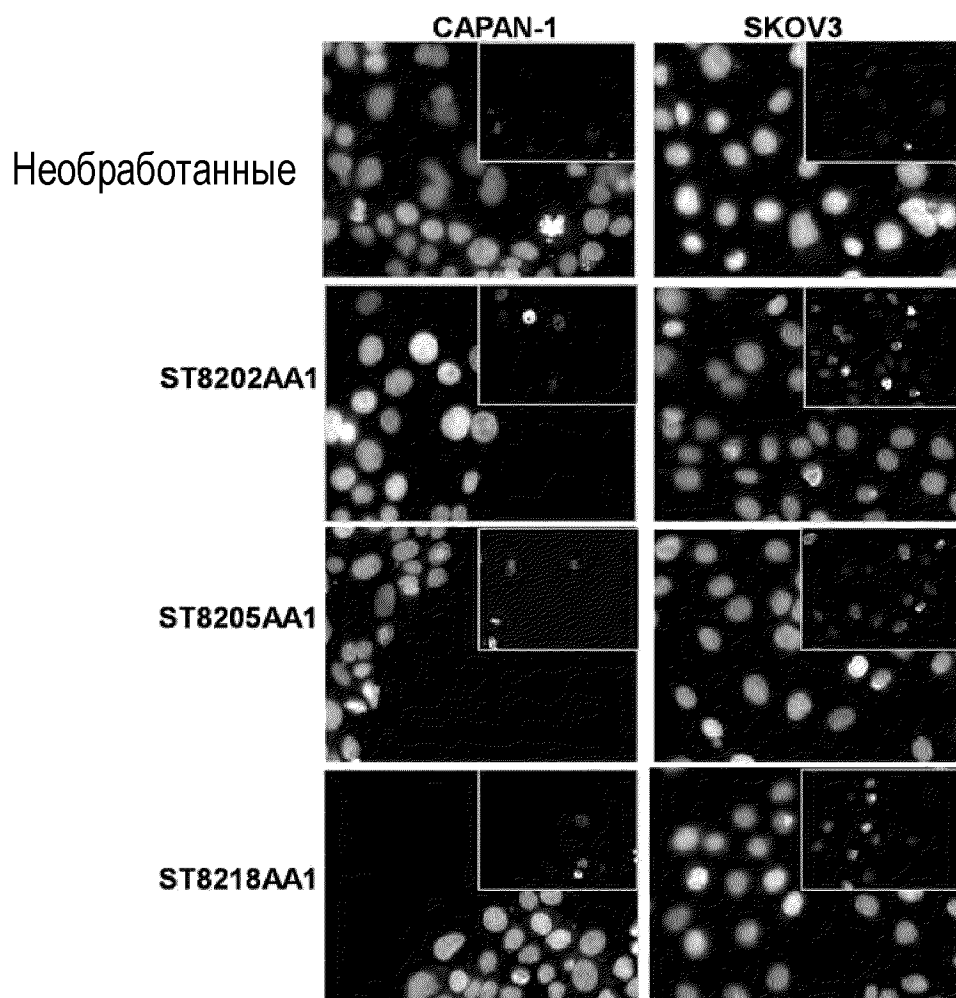


ФИГ.11

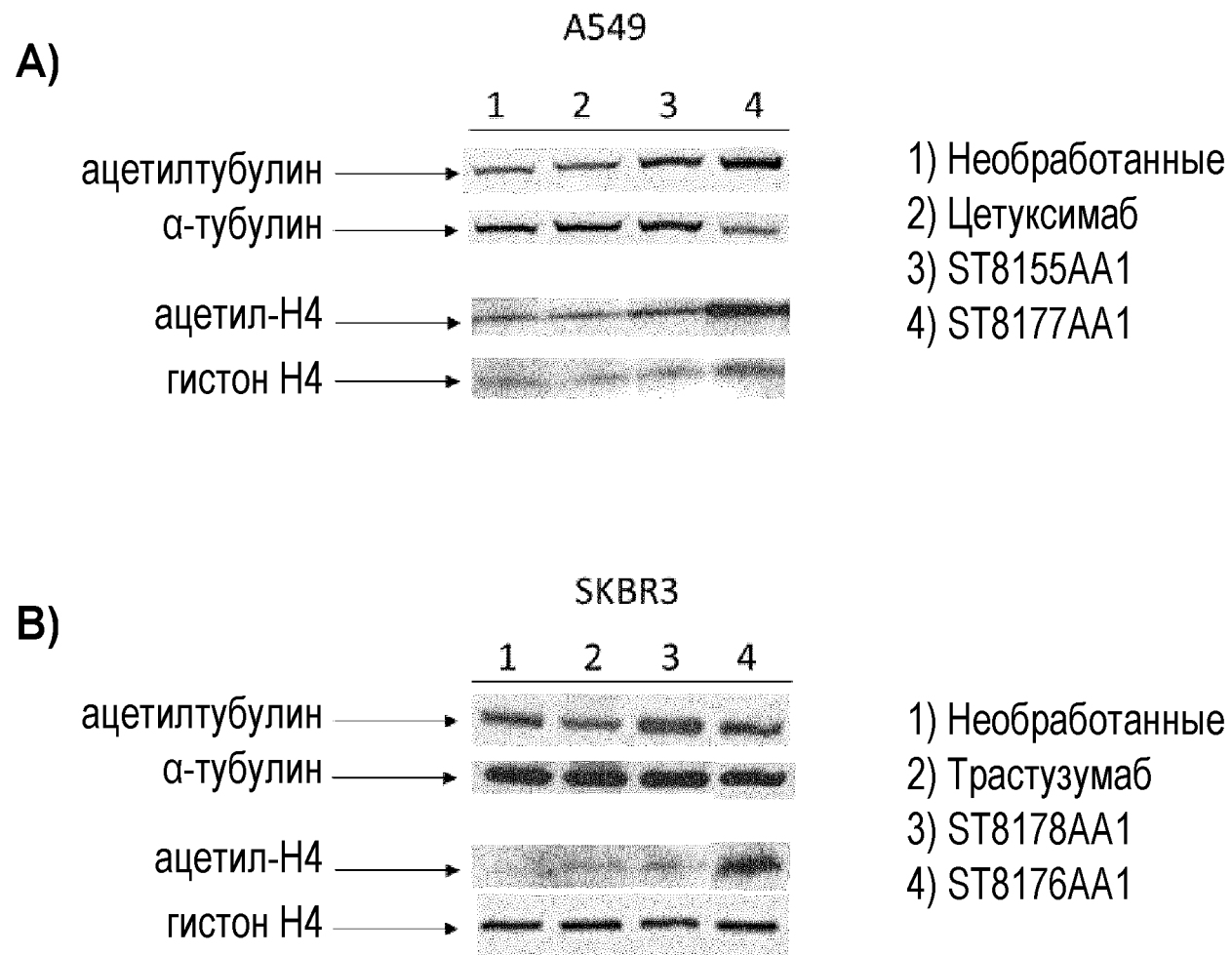
(A)



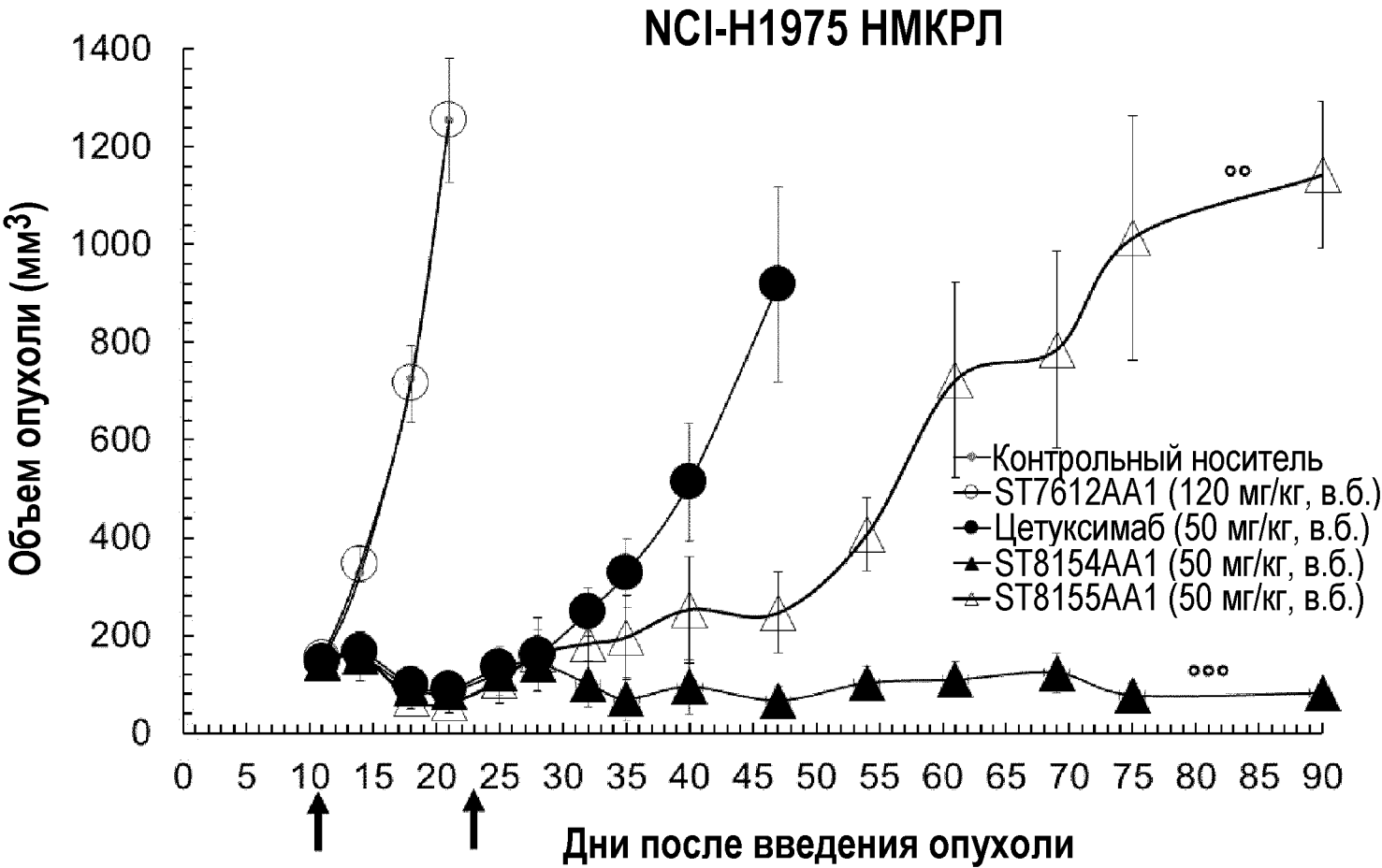
(B)



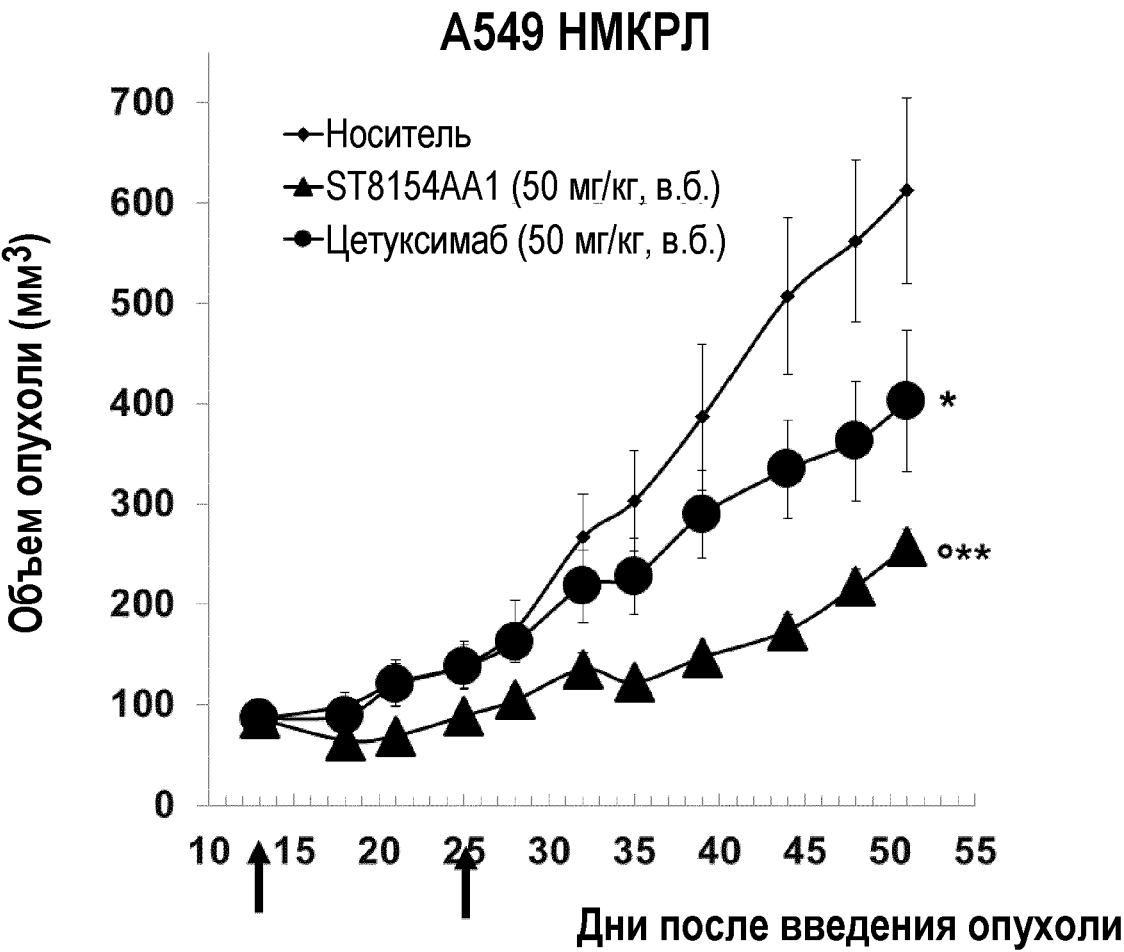
ФИГ.12



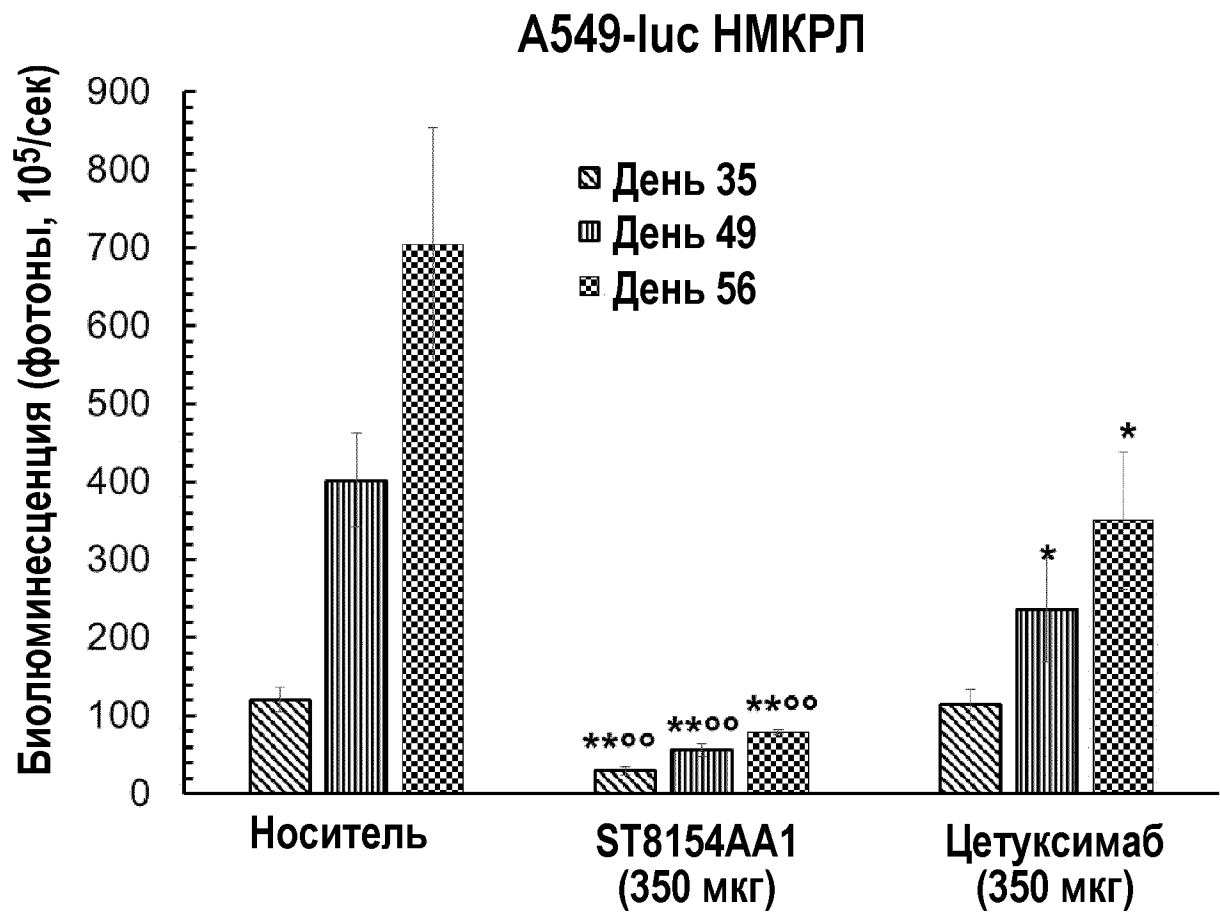
ФИГ.13



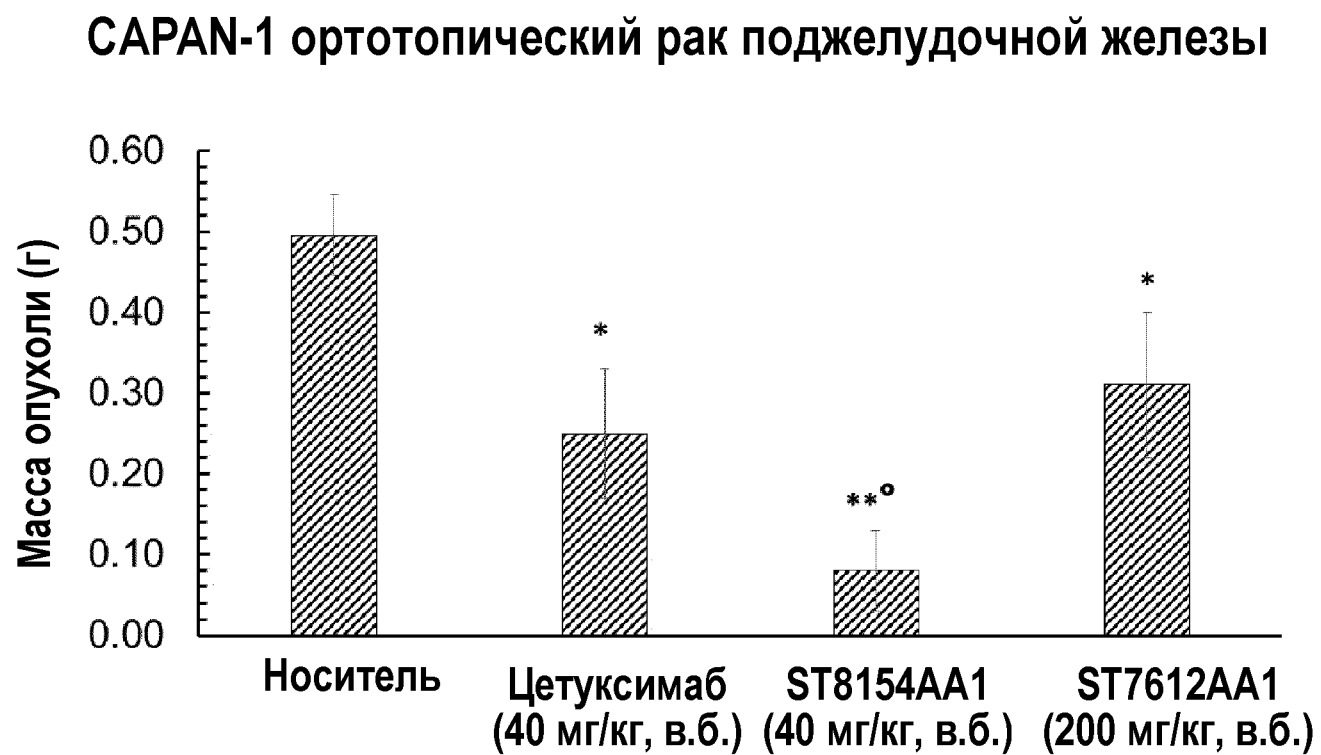
ФИГ.14



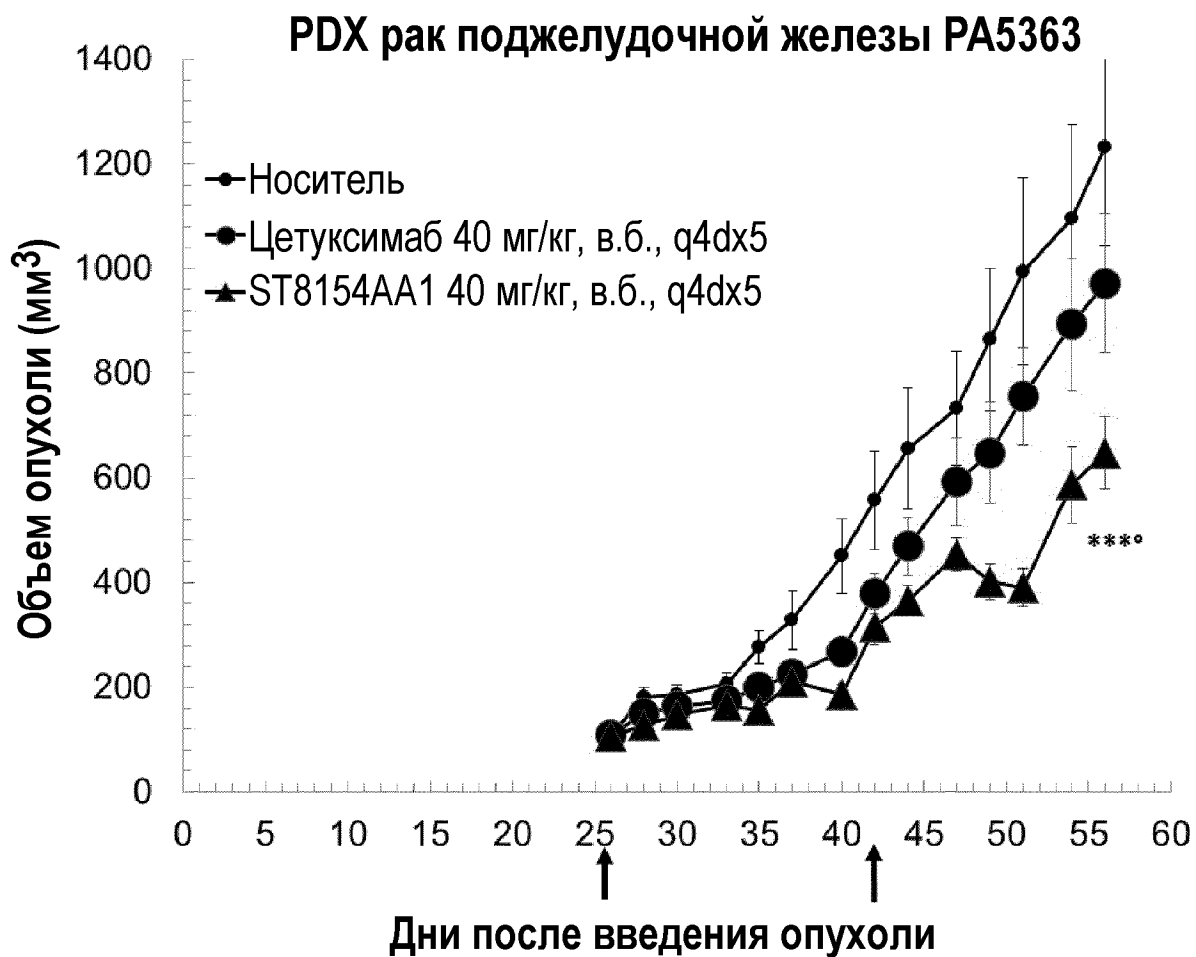
ФИГ.15



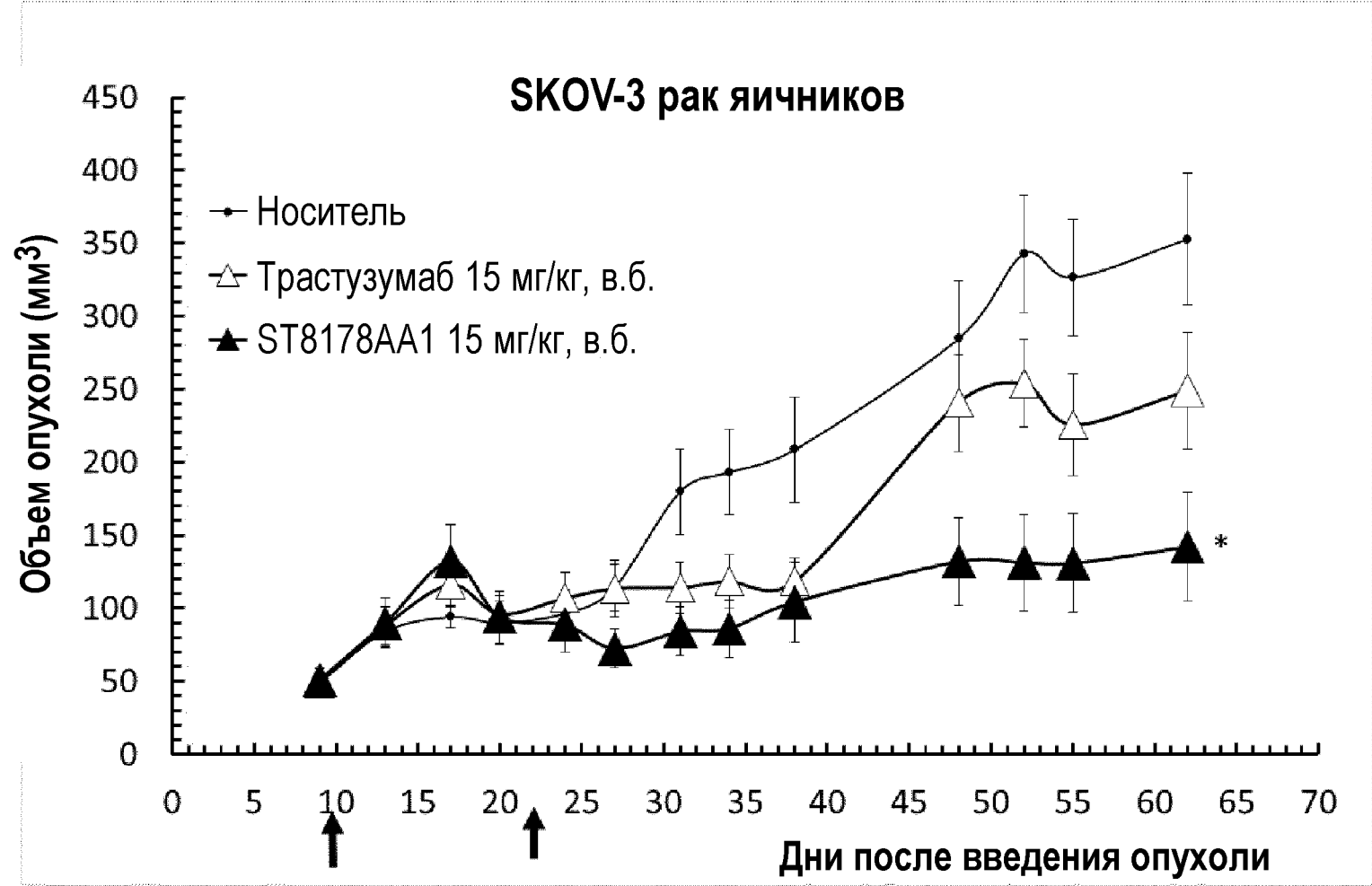
ФИГ.16



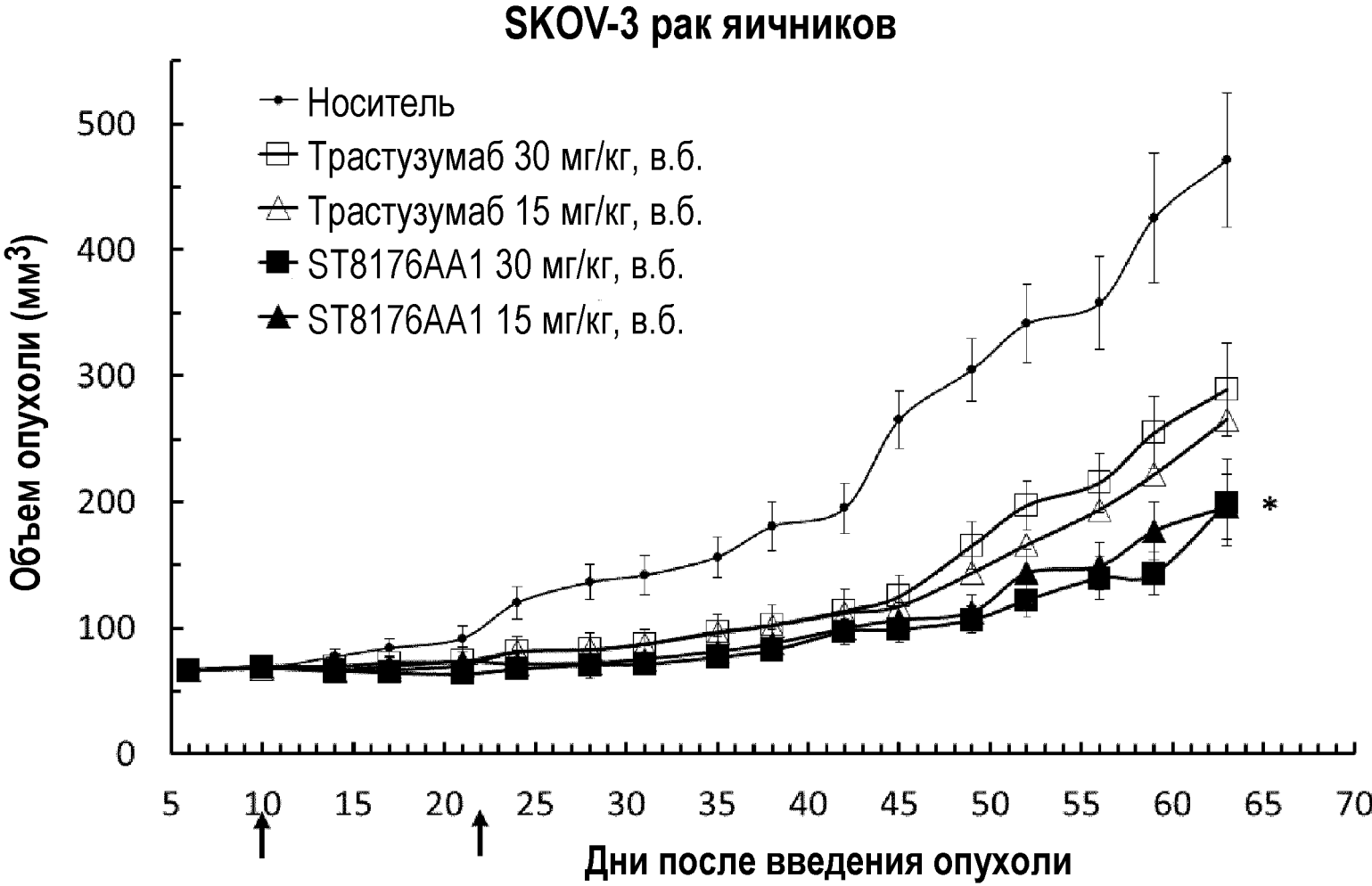
ФИГ.17



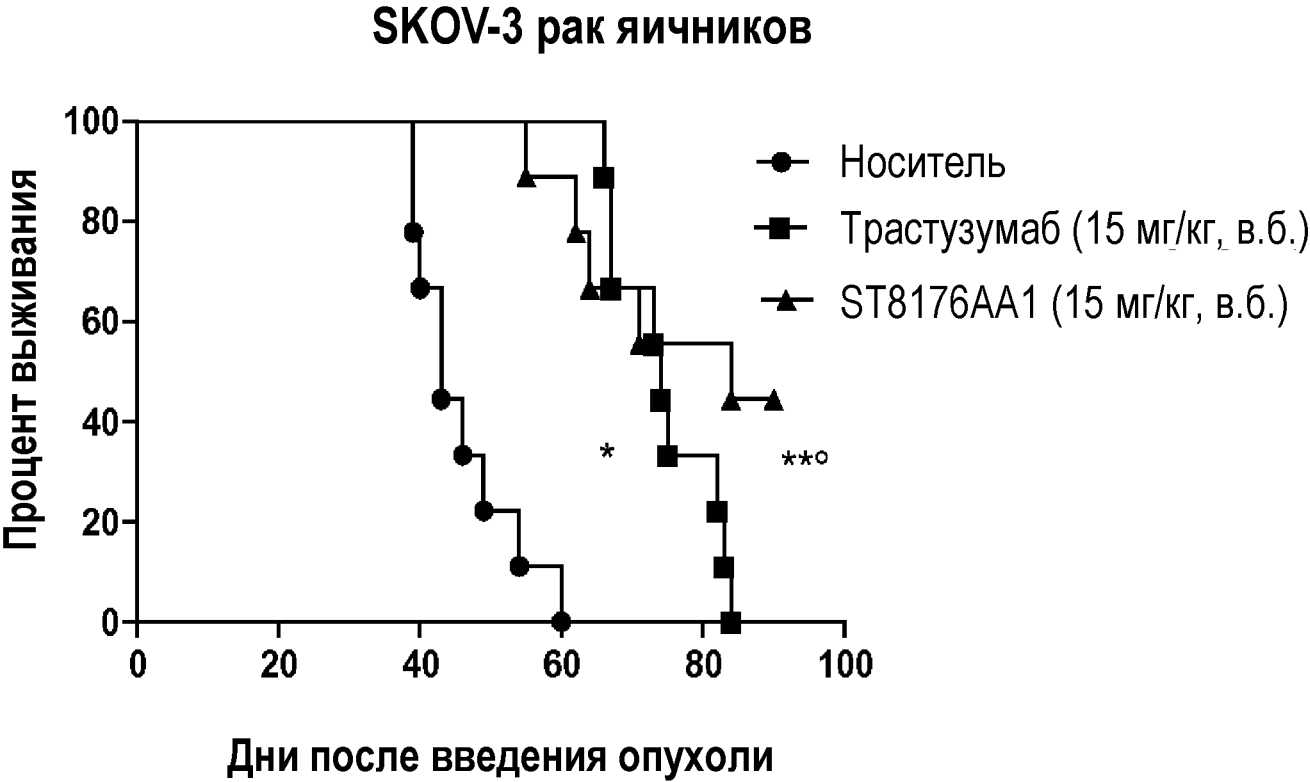
ФИГ.18



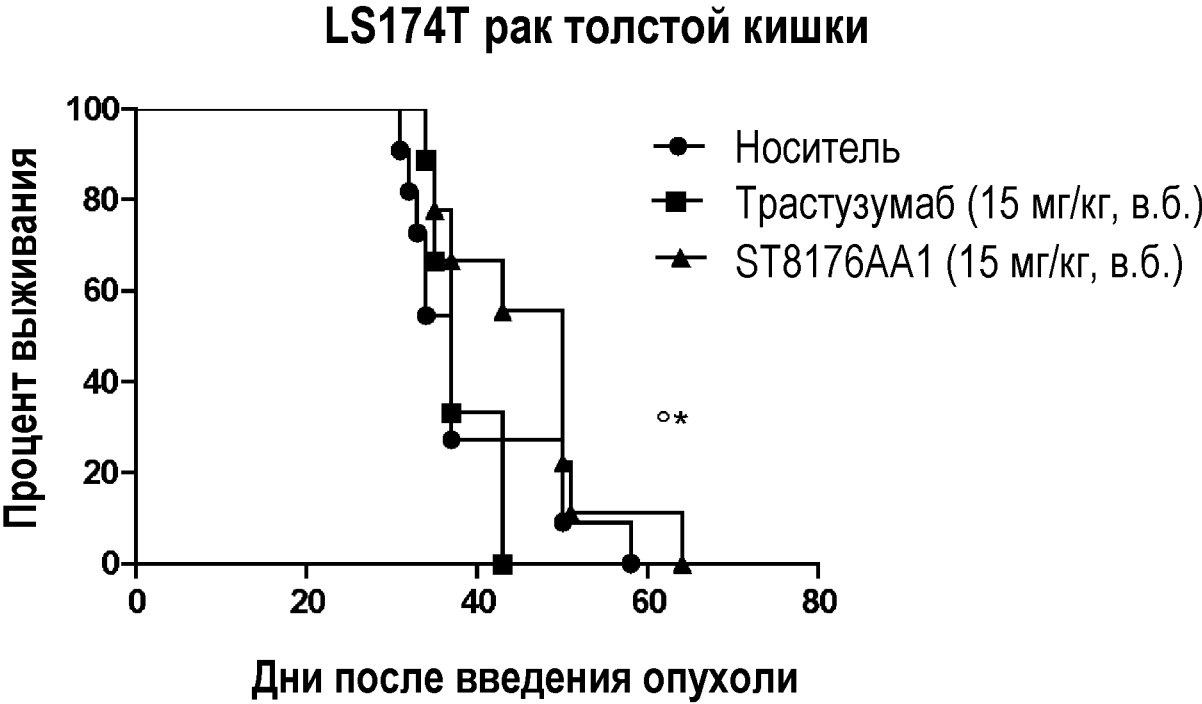
ФИГ.19



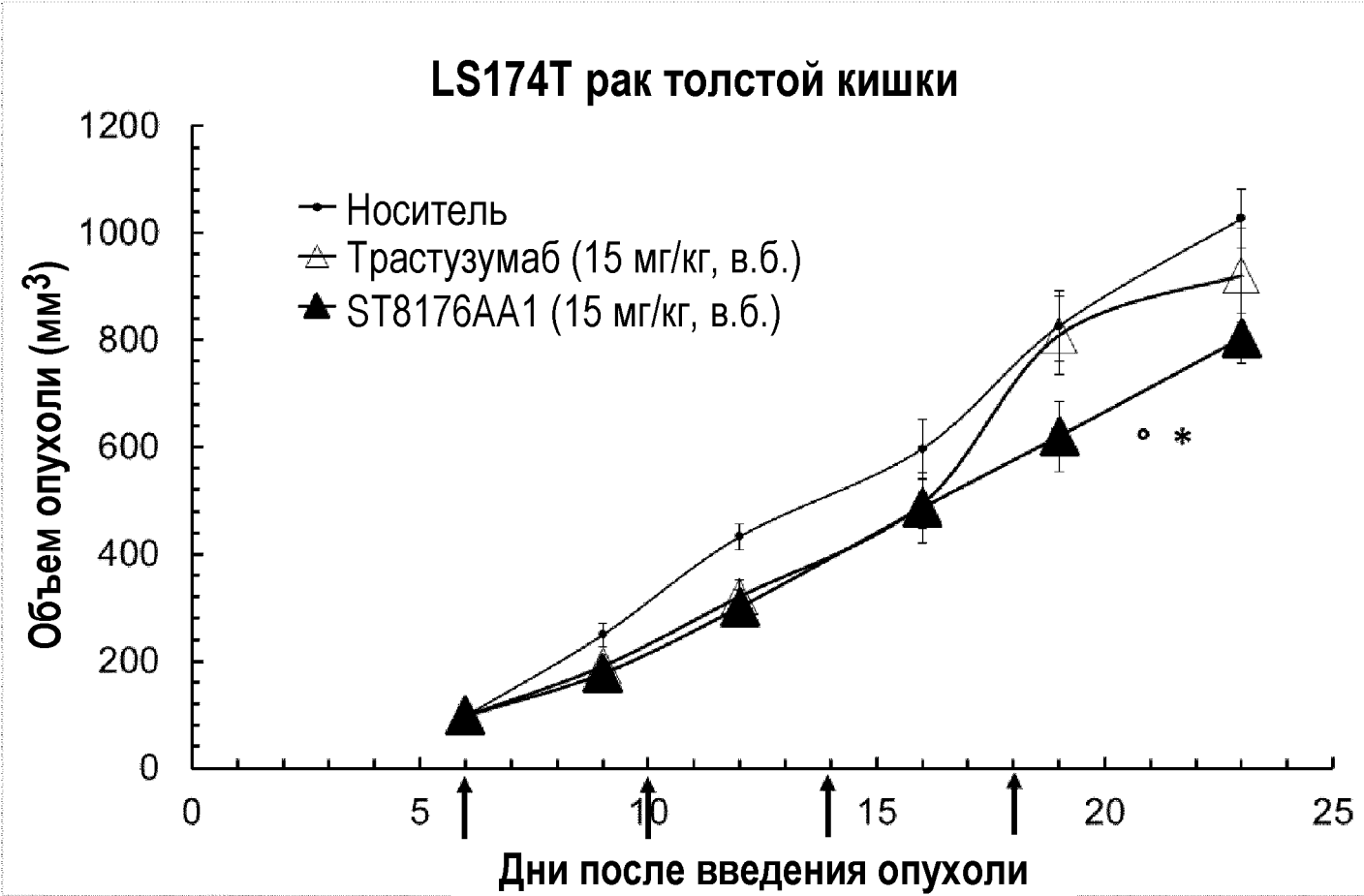
ФИГ.20



ФИГ.21



ФИГ.22



ФИГ.23

