

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202092361 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.02.02

(51) Int. Cl. *A61K 47/64* (2017.01)  
*A61P 7/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.04.02

(54) КОНЬЮГАТ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА И  
ПРОЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА УКАЗАННОГО КОНЬЮГАТА

(31) 18305390.9

(32) 2018.04.03

(33) EP

(86) PCT/EP2019/058226

(87) WO 2019/192979 2019.10.10

(71) Заявитель:  
СИНДИВИА (FR)

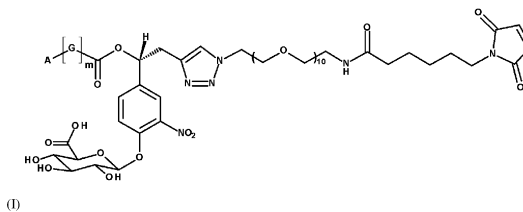
(72) Изобретатель:

Коньев Александр, Колодич Сергей,  
Боннефуа Жан-Ив (FR)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к специфическому конъюгату цитотоксических лекарственных средств и пролекарственным формам указанного конъюгата для применения в лечении рака и воспалительных заболеваний. Конъюгат представлен формулой (I), где А представляет собой радикал, производный от цитотоксического лекарственного средства, G представляет собой саморасщепляющийся фрагмент и m имеет значение 0 или 1, и его фармацевтически приемлемые соли.



A1

202092361

202092361

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565128EA/042

### КОНЬЮГАТ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА И ПРОЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА УКАЗАННОГО КОНЬЮГАТА

#### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к специфическому конъюгату цитотоксических лекарственных средств и к пролекарственным формам указанного конъюгата для применения в лечении рака и воспалительных заболеваний.

#### **Область техники, к которой относится изобретение**

Рак и воспалительные заболевания являются одними из самых частых заболеваний в настоящее время. В частности, рак является одной из главных причин смерти в промышленно развитых странах, и в настоящее время число людей, у которых диагностирован рак, продолжает расти. К настоящему времени разработано несколько режимов лечения, однако химиотерапия остается единственной, которая может использоваться против циркулирующих опухолей, таких как лимфомы, лейкозы и метастазы.

В химиотерапии одна стратегия заключается в подавлении полимеризации тубулина и, таким образом, предотвращении деления клеток (антимитотические средства). Это может достигаться с использованием соединений семейства доластатинов, в частности природного доластатина 10, который может быть выделен из обитающего в Индийском океане морского моллюска *Dolabella auricularia* и состоит из четырех аминокислот, три из которых являются специфическими для него. Синтетические производные доластатина 10, такие как ауристин PE, ауристин E и монометилауристин E (ММАЕ), также существуют и оказались эффективными ингибиторами. Главный недостаток таких соединений заключается в отсутствии избирательности в отношении раковых клеток, что приводит к разрушению здоровых тканей и, следовательно, к сильным побочным эффектам, таким как выпадение волос или тошнота. Разработка конъюгатов белок-лекарственное средство с использованием таких активных веществ оказалась интересной и эффективной стратегией преодоления недостатка селективности.

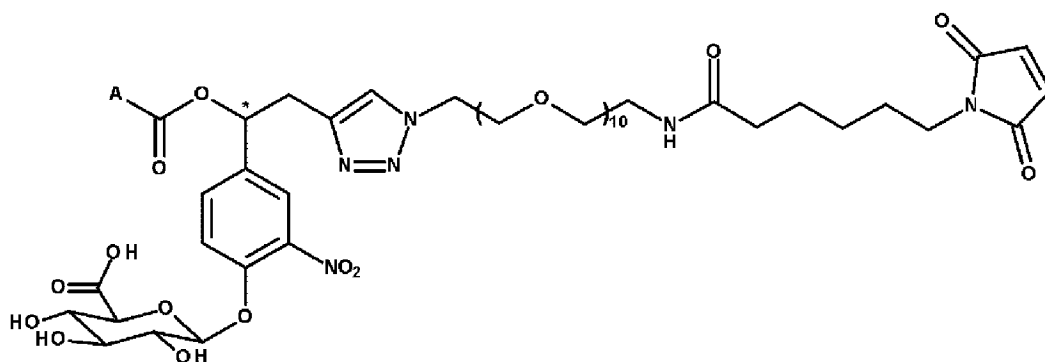
Конъюгаты белок-лекарственное средство на сегодняшний день представляют собой наиболее быстрорастущий класс высокоэффективных активных фармацевтических ингредиентов. Конструкции конъюгатов белок-лекарственное средство обычно включают белок, такой как антитело, ковалентно связанный с одним концом линкерной группы, на другом конце которой находится цитотоксин, то есть очень сильный убивающий клетки токсин. Белковый компонент биомолекулы обеспечивает специфичность в отношении мишени. Как только конъюгат попадает в клетку, токсин высвобождается, например, под действием клеточных ферментов. Большинство конъюгатов белок-лекарственное средство действительно предназначены для лечения рака. Помимо имеющегося в продаже трастузумаба эмтансина (имеющего название Т-DM1 или Kadcyla®) и брентуксимаба

ведотина (Adcetris®), ряд конъюгатов белок-лекарственное средство в настоящее время проходят клинические испытания для лечения различных онкологических заболеваний.

Одним из основных условий активности таких конъюгатов является эффективное высвобождение цитотоксического лекарственного средства при интернализации раковыми клетками, при этом линкер между белком и лекарственным средством должен быть стабильным в кровотоке до того, как конъюгат достигнет своей биологической мишени.

В этом отношении настоящий прорыв был достигнут за счет введения в конструкцию конъюгата фермент-расщепляемых линкеров.

WO 2015/118497, таким образом, описывает  $\beta$ -глюкуронидаза-чувствительный альбумин-связывающий конъюгат формулы (I)



(I),

где А типично представляет собой ММАЕ. Его малеимидная концевая группа предусмотрена для обеспечения селективного связывания с циркулирующим альбумином после внутривенного введения. Глюкуронидная группа, которая является глюкуронидаза-чувствительной, также присутствует в молекуле и связана с аутореактивным фрагментом. Поскольку альбумин аккумулируется в опухолях, а  $\beta$ -глюкуронидаза присутствует в опухолевом окружении, соединение достигает участка опухоли, где фермент катализирует расщепление гликозидной связи и затем индуцирует высвобождение лекарственного средства (ММАЕ). Конъюгат существует в виде смеси 1:1 двух изомеров, варьирующийся стереогенный центр которых находится на аутореактивном фрагменте (помечен звездочкой на формуле (I)).

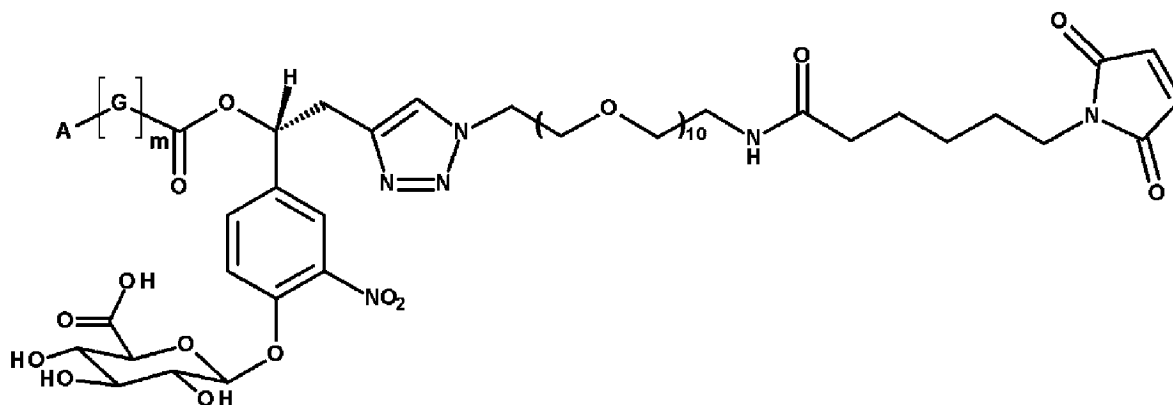
### Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что два изомера указанного выше конъюгата, которые не могут быть разделены обычными способами, могут быть получены в результате ВЭЖХ энантиомерного разделения первоначально полученного промежуточного соединения. Два выделенных изомера оказались стабильными, в частности в плазме человека, но изомер, варьирующийся стереогенный центр которого имеет R конфигурацию, показал более высокую кинетику ферментативного расщепления, по сравнению с другим. Эта более высокая кинетика, наблюдаемая с одним изомером, тем более неожиданна, что стереогенный центр не является частью фармакофора,

распознаваемого ферментом. Это неожиданное свойство может быть особенно выгодным для пациентов, имеющих более низкую экспрессию фермента.

Авторы настоящего изобретения также продемонстрировали, что встраивание саморасщепляющегося фрагмента в структуру, более конкретно между цитотоксическим лекарственным средством и остальной частью конъюгата, может повышать стабильность конъюгата, сохраняя при этом его способность расщепляться (т.е. высвободить цитотоксическое лекарственное средство).

Указанный изомер, к которому относится настоящее изобретение, представляет собой конъюгат, представленный формулой (I):



(I),

где А представляет собой радикал, производный от цитотоксического лекарственного средства,

G представляет собой саморасщепляющийся фрагмент, и

m имеет значение 0 или 1,

и его фармацевтически приемлемые соли.

Изобретение также предоставляет способ получения конъюгата, определенного выше, включающий следующие стадии:

а) получение рас-4-(1-гидроксибут-3-ин-1-ил)-2-нитрофенола из 4-гидрокси-3-нитробензальдегида;

б) разделение и выделение (R)-4-(1-гидроксибут-3-ин-1-ил)-2-нитрофенола, предпочтительно хиральной высокоэффективной жидкостной хроматографией;

с) взаимодействие (R)-4-(1-гидроксибут-3-ин-1-ил)-2-нитрофенола с производным глюконовой кислоты, таким как метилацетобром- $\alpha$ -D-глюкуронат, в основных условиях;

д) взаимодействие соединения, полученного на стадии (с), с 4-нитрофенилхлорформиатом;

е) связывание соединения, полученного на стадии (д), с цитотоксическим лекарственным средством или с А-Г-Н фрагментом, в котором А представляет собой радикал, производный от цитотоксического лекарственного средства, и G представляет собой саморасщепляющийся фрагмент;

f) удаление защиты глюкуронидного фрагмента соединения, полученного на стадии (e), предпочтительно в основных условиях; и

g) связывание соединения, полученного на стадии (f), с азидом формулы  $N_3-(CH_2-CH_2-O)_{10}-(CH_2)_2-NH-(CO)-(CH_2)_5-X$ , где X представляет собой малеимидную группу.

Изобретение также относится к пролекарству, включающему по меньшей мере одну молекулу конъюгата, определенного выше, при этом указанная молекула конъюгата связана через ковалентную связь с молекулой белка, предпочтительно альбумина, или его фрагментом или производным.

Оно также направлено на фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере эффективное количество по меньшей мере одного конъюгата, определенного выше, или по меньшей мере одного пролекарства, определенного выше, и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится независимо к конъюгату, определенному выше, пролекарству, определенному выше, или фармацевтической композиции, определенной выше, для применения в лечении рака и/или воспалительного заболевания.

### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1 показывает молекулярную структуру соединения **R1a**, полученную методом рентгеновской кристаллографии. Эллипсоиды смещения представлены с уровнем вероятности 50%.

Фиг. 2 показывает кинетику  $\beta$ -глюкуронидаза-индуцированного высвобождения ММАЕ в содержащих плазму растворах соединений **R5** и **S5**.

Фиг. 3 показывает кинетику  $\beta$ -глюкуронидаза-индуцированного высвобождения ММАЕ в содержащих плазму растворах соединений **R6** и **S6**.

Фиг. 4 показывает кинетику  $\beta$ -глюкуронидаза-индуцированного высвобождения SN-38 в содержащих плазму растворах соединений **R7** и **S7**.

Фиг. 5 показывает кинетику  $\beta$ -глюкуронидаза-индуцированного высвобождения Доксорубина в содержащих плазму растворах соединений **R8** и **S8**.

Фиг. 6 показывает стабильность соединений **R5** и **S5** в PBS при pH 7,4.

Фиг. 7 показывает плазма-связывающую кинетику соединений **R5** и **S5**.

Фиг. 8 показывает стабильность в плазме альбумин-связанного **R5** и **S5**.

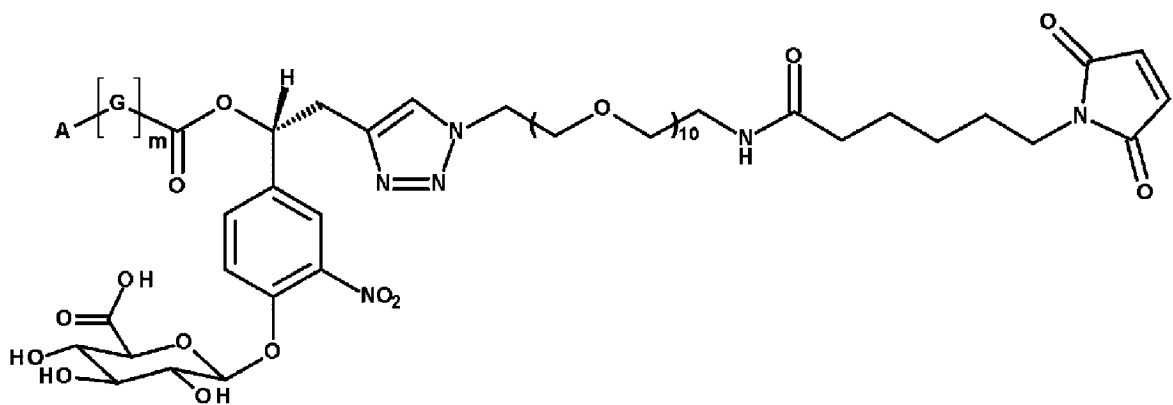
Фиг. 9 показывает ВЭЖХ профиль смеси 1:1 **R5** и **S5**.

Фиг. 10 показывает ВЭЖХ профиль смеси 1:1 **R4** и **S4**.

### **Подробное описание изобретения**

#### Конъюгаты

Изобретение относится к конъюгату, имеющему следующую формулу (I):



(I),

где  $A$  представляет собой радикал, производный от цитотоксического лекарственного средства,

$G$  представляет собой саморасщепляющийся фрагмент, и

$m$  имеет значение 0 или 1,

и его фармацевтически приемлемым солям.

В контексте изобретения “фармацевтически приемлемая соль” относится к соли конъюгата или пролекарства или лекарственного средства в соответствии с изобретением и щелочного металла, щелочноземельного металла или аммония, включая соли, полученные с органическими аммониевыми основаниями, или к солям конъюгата, или пролекарства или лекарственного средства в соответствии с изобретением и органической или неорганической кислоты.

Соли, которые являются наиболее подходящими для изобретения, могут представлять собой соли натрия, калия, кальция, магния, соли четвертичного аммония, например тетраметиламмония или тетраэтиламмония, и аддитивные соли с аммиаком и фармацевтически приемлемыми органическими аминами, такими как метиламин, диметиламин, триметиламин, этиламин, триэтиламин, этаноламин или трис(2-гидроксиэтил)амин.

Соли конъюгата или пролекарства или лекарственного средства в соответствии с изобретением и неорганической кислоты, подходящие для изобретения, можно получить с хлористоводородной кислотой, бромистоводородной кислотой, серной кислотой, азотной кислотой или фосфорной кислотой.

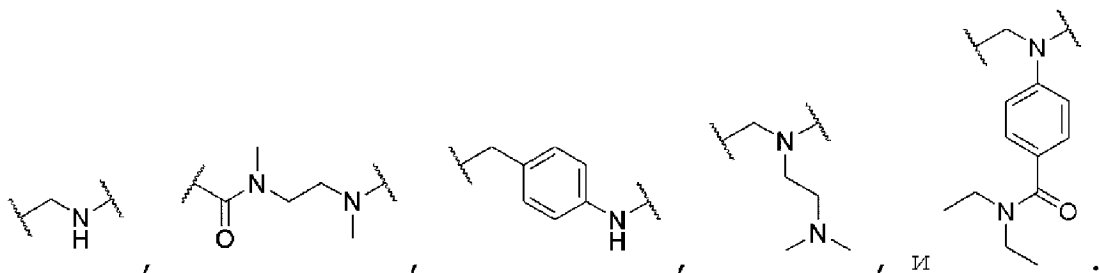
Соли конъюгата или пролекарства или лекарственного средства в соответствии с изобретением и органической кислоты, подходящие для изобретения, можно получить с карбоновыми кислотами и сульфоновыми кислотами, такими как муравьиная кислота, уксусная кислота, щавелевая кислота, лимонная кислота, молочная кислота, яблочная кислота, янтарная кислота, малоновая кислота, бензойная кислота, малеиновая кислота, фумаровая кислота, винная кислота, метансульфоновая кислота, бензолсульфоновая кислота или *p*-толуолсульфоновая кислота.

В соответствии с изобретением, “саморасщепляющийся фрагмент” означает двухвалентную химическую группу, которая соединяет радикал, производный от

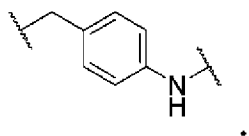
цитотоксического лекарственного средства, с остальной частью конъюгата и которая становится лабильной при активации (например, ферментативном расщеплении глюкуронидного остатка), приводя к высвобождению свободных фрагментов, в частности цитотоксического лекарственного средства. Саморасщепляющиеся фрагменты хорошо известны специалистам в данной области (Polym. Chem. 2011, 2, 773-790).

В одном варианте осуществления  $m$  имеет значение 0.

В другом варианте осуществления  $m$  имеет значение 1, и G представлен формулой, выбранной из:



В предпочтительном варианте осуществления G представлен следующей формулой:



В соответствии с изобретением, “радикал, производный от цитотоксического лекарственного средства”, означает фрагмент, состоящий из цитотоксического лекарственного средства, лишённого одного или более атомов одной из его функциональных групп (например, атома H), который прореагировал с остальной частью конъюгата.

Лекарственное средство в соответствии с изобретением представляет собой цитотоксическое лекарственное средство. В контексте настоящей заявки термин “цитотоксическое лекарственное средство” относится к молекуле, которая при контактировании с клеткой, необязательно при интернализации в клетку, изменяет функцию клетки (например, рост и/или пролиферацию, и/или дифференцировку, и/или метаболизм, например, синтез белка и/или ДНК) неблагоприятным образом или приводит к клеточной гибели. В контексте настоящей заявки термин “цитотоксическое лекарственное средство” охватывает токсины, в частности цитотоксины. В принципе, цитотоксическое лекарственное средство определяется как АТС LO1 молекула (“Система анатомо-терапевтической химической классификации”, где LO1 означает подгруппу, определяющую противоопухолевые и иммуномодулирующие средства, определенную Центром сотрудничества ВОЗ по методологии статистики лекарственных средств).

Цитотоксическое лекарственное средство в соответствии с изобретением может быть выбрано из доластатинов, таких как доластин 10, доластин 15, ауристин E,

ауристин EB (AEB), ауристин EFP (AEFP), монометил ауристин F (MMAF), монометилауристин-D (MMAD), монометил ауристин E (MMAE), АЕ-эфир 5-бензоилвалериановой кислоты (AEVB) или их производных.

Предпочтительными доластатинами являются MMAF, MMAD, MMAE, или их производные.

Более предпочтительными доластатинами являются MMAE, MMAF, или их производные.

В конкретном варианте осуществления цитотоксическое лекарственное средство в соответствии с изобретением представляет собой антрациклин, такой как доксорубин, идарубин, эпирубин, даунорубин или валрубин, предпочтительно доксорубин.

В другом конкретном варианте осуществления цитотоксическое лекарственное средство в соответствии с изобретением представляет собой лекарственное средство камптотецинового семейства (также указанное в настоящей заявке как “аналог камптотецина”), такое как камптотecin, SN-38, топотекан, иринотекан, экзатекан, силатекан, козитекан, луртотекан, гиматекан, белотекан или рубитекан, предпочтительно SN-38, экзатекан, белотекан, и более предпочтительно SN-38.

В предпочтительном варианте осуществления цитотоксическое лекарственное средство выбрано из доксорубина, SN-38, MMAE, MMAF, MMAD и их производных.

Доластатины представляют собой семейство соединений, имеющих структуру из по меньшей мере 4 аминокислот, предпочтительно 4 аминокислот, по меньшей мере 3 из которых являются специфическими для них, поскольку отличаются от 20 аминокислот, обычно присутствующих в природе. В соответствии с изобретением, производное доластатина имеет химическую структуру, близко родственную по меньшей мере одному соединению доластатинового семейства, и демонстрирует такие же антимитотические свойства. Структурные различия между указанным производным и соединением доластатинового семейства могут быть в замещении на по меньшей мере одной боковой цепи по меньшей мере одной аминокислоты любым подходящим заместителем, который часто встречается. Например, указанный заместитель может представлять собой:

- алкильную группу, т.е. линейную или разветвленную насыщенную углеводородную цепь, такую как метильная, этильная, пропильная, изопропильная, бутильная, втор-бутильная, трет-бутильная, пентильная, гексильная, гептильная, октильная, нонильная или децильная группа;

- гетероалкильную группу, т.е. линейную или разветвленную углеводородную цепь, прерываемую одним или несколькими гетероатомами, преимущественно O, N и S, такую как метокси или этокси группа;

- арильную группу, т.е. ароматическую карбоциклическую группу, такую как фенильная или нафтильная группа, которая необязательно может быть замещена группами в количестве до четырех, включая, но не ограничиваясь этим: -COOH, -SO<sub>3</sub>H, -OCH<sub>3</sub>, -F, -Cl, -Br, -I, -OH, -NH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -CN;



- гетероарильную группу, т.е. ароматическую группу, которая содержит один или несколько гетероатомов, такую как пиридилная, оксазолильная, фуранильная или тиазолильная группа; или

- атом галогена, такой как -F, -Cl, -Br, -I.

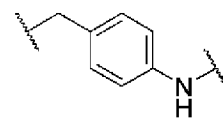
Структурное различие также может заключаться в модификации доластатина, такого как доластатин 10, доластатин 15, ауристатин E, ауристатин EB (AEB), ауристатин EFP (AEFP), монометилауристатин F (MMAF), монометилауристатин-D (MMAD), монометил ауристатин E (MMAE) или AE-эфир 5-бензоилвалериановой кислоты (AEVB), например, на уровне его третичного амина в N-концевом положении, чтобы сделать эту функцию совместимой с установлением ковалентной связи с рассматриваемой линкерной группой.

Специалист в данной области техники сможет выбрать для этих целей подходящие модификации, в частности подходящие заместители.

В соответствии с другим вариантом осуществления, лекарственное средство может быть выбрано из майтанзинов, таких как DM1 и DM4, антрациклинов, таких как доксорубин, неморубин и PNU-159682, калихеамицинов, дуокаримицинов, таких как CC-1065 и дуокармицин A, пирролобензодиазепинов, пирролобензодиазепиновых димеров, индолинобензодиазепинов, индолинобензодиазепиновых димеров,  $\alpha$ -амантинов, эрибулина, акалбрутиниба, блеомицина, беритиниба, кладрибина, клофарабина, кобиметиниба, копанлисиба, кризотиниба, цитарабина, дабрафениба, дактиномицина, даунорубицина, децитабина, эпирубицина, ибрутиниба, идарубицина, лапатиниба, леналидомида, митомицина C, митоксантрона, неларабина, нирапариба, паклитаксела, панобиностата, помалидомида, преднизона, рибоциклиба, палбоцицилба, ролапитанта, рукапариба, сонидегиба, тамоксифена, темсиролимуса, топотекана, трабектедина, валрубицина, винбластина, винкристина и их фармацевтически приемлемых солей.

В конкретном варианте осуществления цитотоксическое лекарственное средство

представляет собой SN-38, m имеет значение 1 и G представляет собой



В другом конкретном варианте осуществления цитотоксическое лекарственное средство представляет собой доластатин или антрациклин, и m имеет значение 0.

### Способ

Термин “растворитель” относится к органическому растворителю, неорганическому растворителю, такому как вода, или их смеси. Примеры органических растворителей включают, но не ограничиваются этим, алифатические углеводороды, такие как пентан или гексан, алициклические углеводороды, такие как циклогексан, ароматические углеводороды, такие как бензол, стирол, толуол, орто-ксилол, мета-ксилол или пара-ксилол, галогенированные углеводороды, такие как дихлорметан, хлороформ

или хлорбензол, растворители на основе азота, такие как пиридин, ацетонитрил или триэтиламин, растворители на основе кислорода, в частности кетоны, такие как ацетон, простые эфиры, такие как диэтиловый эфир, трет-бутилметилвый эфир (ТВМЕ), циклопентилметилвый эфир (СРМЕ), тетрагидрофуран (ТНФ) или метилтетрагидрофуран (Ме-ТНФ), и спирты, такие как метанол или этанол, сложные эфиры, такие как н-бутилацетат, или амиды, такие как диметилформамид (DMF), и их смеси.

“Кислотные условия” относятся к условиям, в которых используются одна или более кислот. Примеры кислоты включают, но не ограничиваются этим, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, иодистоводородную кислоту, фтористоводородную кислоту, азотную кислоту, серную кислоту, гексафторфосфорную кислоту, тетрафторборную кислоту, трифторуксусную кислоту, уксусную кислоту, сульфоновую кислоту, такую как метансульфоновая кислота, моно- или поликарбоновую кислоту или их смеси, предпочтительной является хлористоводородная кислота.

“Щелочные условия” относятся к условиям, в которых используется одно или более оснований. Примеры основания включают, но не ограничиваются этим, гидроксид лития или гидроксид натрия, карбонаты, такие как карбонат калия, карбонат натрия или гидрокарбонат натрия, алкоксиды, такие как метоксид натрия, амины, такие как триэтиламин, и азотные циклические основания, такие как имидазол, N-метилимидазол, пиридин или диметиламинопиридин (DMAP), предпочтительным является гидроксид лития.

Конъюгат в соответствии с изобретением может быть получен из коммерческого 4-гидрокси-3-нитробензальдегида путем многостадийного синтеза, включая стадию энантиомерного разделения гас-4-(1-гидроксибут-3-ин-1-ил)-2-нитрофенольного промежуточного продукта хиральной высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ).

Условия (температура, концентрация, растворители, реагенты, эквиваленты реагентов), описанные ниже для каждой стадии, могут быть отрегулированы специалистом в данной области техники, используя его/ее общие знания в области органического синтеза. Каждый промежуточный продукт или продукт, полученный в конце стадии, может быть выделен и необязательно очищен, или, альтернативно, несколько стадий можно осуществить в одном сосуде без выделения указанного промежуточного соединения или продукта. Порядок стадий способа, описанных ниже, может быть изменен.

#### *Стадия (а)*

В одном варианте осуществления гас-4-(1-гидроксибут-3-ин-1-ил)-2-нитрофенол можно получить в одну стадию из 4-гидрокси-3-нитробензальдегида. Реакция включает введение пропаргильной группы путем присоединения последней на альдегидной функции 4-гидрокси-3-нитробензальдегида. Типично, указанную реакцию можно осуществить путем взаимодействия 4-гидрокси-3-нитробензальдегида с нуклеофильной

пропаргильной группой, т.е. любой анионной или металлоорганической формой пропаргильной группы, которая способна присоединяться на электрофильном участке. Указанную реакцию можно осуществить при помощи катализатора, такого как  $\text{HgCl}_2$ . Указанная нуклеофильная пропаргильная группа может быть образована *in situ* или получена заранее в отдельном сосуде из любого источника пропаргила, такого как пропаргилбромид. В предпочтительном варианте осуществления реакцию осуществляют с 4-гидрокси-3-нитробензальдегидом и пропаргилбромидом в присутствии металлического алюминия и  $\text{HgCl}_2$ .

*Стадия (b)*

Затем два энантиомера гас-4-(1-гидроксибут-3-ин-1-ил)-2-нитрофенола можно разделить такими методами, как хиральная ВЭЖХ, образование и разделение диастереоизомерных солей, кристаллизация, каталитическое разделение или ферментативное разделение, или их комбинации. Предпочтительно, два энантиомера разделяют хиральной ВЭЖХ. Хиральная ВЭЖХ представляет собой метод хроматографии, в котором неподвижная фаза является хиральной. Хиральная неподвижная фаза может быть фазой на основе амилозы, циклодекстрина или целлюлозы. Предпочтительно хиральная неподвижная фаза представляет собой фазу на основе амилозы.

Эта стадия энантиомерного разделения позволяет выделить (R)-4-(1-гидроксибут-3-ин-1-ил)-2-нитрофенол. Энантиомерная чистота (R)-4-(1-гидроксибут-3-ин-1-ил)-2-нитрофенола после стадии разделения предпочтительно составляет более 90%, более предпочтительно больше чем 95%. Энантиомерную чистоту можно измерить методом аналитической хиральной ВЭЖХ.

*Стадия (c)*

С целью введения глюкуроидной части можно осуществить взаимодействие (R)-4-(1-гидроксибут-3-ин-1-ил)-2-нитрофенола с производным глюкуроновой кислоты в условиях, обеспечивающих возможность селективного O-глюкуронирования фенольной группы. Предпочтительно указанное производное глюкуроновой кислоты представляет собой полностью защищенную глюкуроновую кислоту, типично ацетилированный глюкуронат, и оно функционализовано таким образом, что оно может взаимодействовать с фенольной группой. Указанное производное глюкуроновой кислоты предпочтительно представляет собой алкилацетобром- $\alpha$ -D-глюкуронат, более предпочтительно метилацетобром- $\alpha$ -D-глюкуронат. В предпочтительном варианте осуществления O-глюкуронирование фенольной группы осуществляют в основных условиях. Например, реакцию можно осуществить в присутствии  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  и НМТТА (1,1,4,7,10,10-гексаметилтриэтиленetetрамин).

*Стадия (d)*

Продукт O-глюкуронирования, полученный на стадии (c), может быть преобразован для целей стадии связывания (e). Для этого можно осуществить взаимодействие вторичной спиртовой функциональной группы указанного продукта с

хлорформиатом, предпочтительно 4-нитрофенилхлорформиатом, приводя к образованию карбоната. Реакцию можно катализировать нуклеофилом, который также может действовать в качестве основания, таким как пиридин.

*Стадии (e), (f) и (g)*

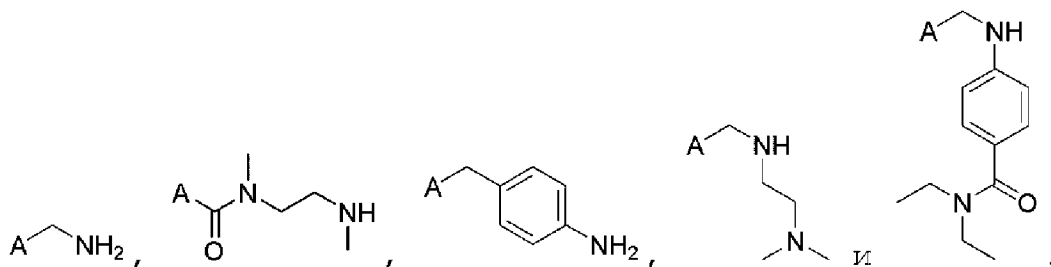
На стадии (e) соединение, полученное на стадии (d), затем связывают с цитотоксическим лекарственным средством, определенным выше (таким как ММАЕ), или с А-Г-Н фрагментом, в котором А представляет собой радикал, производный от цитотоксического лекарственного средства, и G представляет собой саморасщепляющийся фрагмент. В первом варианте осуществления, где цитотоксическое лекарственное средство непосредственно связывают с соединением, полученным на стадии (d), аминная группа (или гидроксигруппа) указанного цитотоксического лекарственного средства взаимодействует с карбонатом соединения, полученного на стадии (d), с образованием амидной группы. Можно использовать активирующий агент, такой как HOAt, HOBT, HOCt. Предпочтительно, указанный активирующий агент представляет собой HOBT.

Осуществление стадий (f) и (g), как описано ниже, после такого первого варианта осуществления, приводит к конъюгату формулы (I), определенному выше, где m имеет значение 0.

Во втором варианте осуществления, где цитотоксическое лекарственное средство связывают с соединением, полученным на стадии (d), через саморасщепляющийся фрагмент, соединение, полученное на стадии (d), подвергают взаимодействию с А-Г-Н фрагментом, в котором А представляет собой радикал, производный от цитотоксического лекарственного средства, и G представляет собой саморасщепляющийся фрагмент.

А-Г-Н связывается с соединением, полученным на стадии (d), через функциональную группу, которая предпочтительно представляет собой  $-NH_2$  или  $-NH-$ .

Примеры А-Г-Н фрагментов включают, но не ограничиваются этим:



Указанный А-Г-Н фрагмент типично можно получить путем взаимодействия цитотоксического лекарственного средства с соединением формулы X-G-N, где X представляет собой удаляемую группу, такую как сульфонат (например, метансульфонат, трифторметансульфонат, толуолсульфонат, нитробензолсульфонат) или галоген (например, хлор, бром, иод). Предпочтительно, X представляет собой бром. Цитотоксическое лекарственное средство взаимодействует типично с X-G-N, через его (или одну из его) аминную или гидроксигруппу, с образованием А-Г-Н, определенного выше. В конкретном варианте осуществления X-G-N находится в защищенной форме при

взаимодействии с цитотоксическим лекарственным средством. “Защищенная форма” относится к форме, где одна или несколько реакционноспособных функциональных групп соединения существуют в нереакционноспособной форме, например,  $\text{NH}_2$  группа, защищенная в форме  $\text{N}_3$  группы. После взаимодействия X-G-H с цитотоксическим лекарственным средством получают A-G-H, и он может быть также в “защищенной форме”. Указанный A-G-H можно подвергнуть процедуре “удаления защиты”, чтобы освободить реакционноспособную функциональную группу(группы) (например, путем преобразования  $\text{N}_3$  группы в  $\text{NH}_2$  группу).

Осуществление стадий (f) и (g), как описано ниже, после такого второго варианта осуществления, приводит к конъюгату формулы (I), определенному выше, где m имеет значение 1.

В одном варианте осуществления на стадии (f) затем осуществляют удаление защитных ацетильных и сложноэфирных групп на глюкуронидном фрагменте до гидроксидных и карбоновых кислотных функциональных групп, соответственно. Указанную стадию (f) удаления защиты глюкуронидного фрагмента соединения, полученного на стадии (e), предпочтительно осуществляют в основных условиях, более предпочтительно в основных условиях при низкой температуре. Альтернативно, указанную стадию (f) можно осуществить в кислотных условиях и в любом органическом растворителе, таком как ацетонитрил. Алкиновую функциональную группу соединения, полученного на стадии (f), затем связывают с азидом формулы  $\text{N}_3\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{10}\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_5\text{-X}$ , где X представляет собой малеимидную группу, в хорошо известных условиях клик-химии, приводя к селективному образованию 1,4-дизамещенного триазольного региоизомера и, таким образом, к образованию конъюгата по изобретению.

Азид формулы  $\text{N}_3\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{10}\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_5\text{-X}$ , где X представляет собой малеимидную группу, типично можно получить путем взаимодействия  $\text{N}_3\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{10}\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH}_2$  с 2,5-диоксопирролидин-1-ил-6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексаноатом.

В другом варианте осуществления стадия (f) включает связывание соединения, полученного на стадии (e), с азидом формулы  $\text{N}_3\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{10}\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH}_2$  в условиях клик-химии, что приводит к селективному образованию 1,4-дизамещенного триазольного региоизомера. На стадии (g)  $\text{-NH}_2$  группу преобразовывают в алкиламид, замещенный малеимидной группой на конце алкильной цепи, типично путем взаимодействия соединения, полученного на стадии (f), с 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексаноатом. Затем осуществляют конечное удаление защиты глюкуронидного фрагмента соединения, полученного на стадии (g). Это удаление защиты предпочтительно осуществляют в основных условиях, более предпочтительно в основных условиях при низкой температуре.

Способ в соответствии с изобретением обеспечивает доступ к конъюгату, существующему в виде единственного изомера, чистота которого предпочтительно больше чем 90%, предпочтительно больше чем 95%.

### Пролекарство

Конъюгат в соответствии с изобретением содержит малеимидную группу, которая очень реакционноспособна по отношению к нуклеофильным группам, более конкретно к тиольной группе (-SH). Такие группы обычно присоединяют к малеимидному фрагменту путем присоединения по Михаэлю. Таким образом, малеимидная группа является предпочтительной реакционноспособной группой для связывания конъюгата по изобретению с макромолекулой. В контексте изобретения макромолекула предпочтительно представляет собой эндогенную молекулу.

В соответствии с изобретением, пролекарство относится к по меньшей мере одному конъюгату, ковалентно связанному с макромолекулой, более конкретно с белком. Указанное пролекарство способно транспортировать, в инактивированной форме, цитотоксическое лекарственное средство в организме и высвободить указанное лекарственное средство в орган, ткань или клетки, которые являются специфическими мишенями, под действием β-глюкуронидазы. Пролекарство может быть образовано *in vivo* или *in vitro* путем взаимодействия с макромолекулой, более конкретно с белком.

В частности, белок выбран из тех, которые специфически связываются с молекулой, присутствующей на мембране раковой клетки, предпочтительно молекулой, выбранной из группы, состоящей из белков, гликопротеинов, гликолипидов, углеводов или их комбинации, еще более предпочтительно белок специфически связывается с белком, присутствующим на мембране раковой клетки. Мембранная молекула, с которой белок способен связываться, представляет собой молекулу, преимущественно или исключительно присутствующую на мембране раковой клетки. В конкретном варианте осуществления мембранная молекула, распознаваемая белком, представляет собой белок, сверхэкспрессируемый на мембране раковой клетки. В предпочтительном варианте осуществления белок может быть выбран из группы, состоящей из антител и альбуминов.

В контексте настоящей заявки термин “антитело” относится к молекулам иммуноглобулина и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулина, то есть молекулам, которые содержат антиген-связывающий сайт, который иммуноспецифически связывает антиген. Таким образом, термин “антитело” охватывает не только целые молекулы антитела, но также антиген-связывающие фрагменты антител, а также варианты (включая производные) антител и фрагментов антител. В частности, антитело в соответствии с изобретением может соответствовать моноклональному антителу (например, химерному, гуманизированному или человеческому антителу) или фрагменту моноклонального антитела. Термин “антитело” относится к классическим антителам, а также к антителам, состоящим только из тяжелых цепей, и их фрагментам и производным, таким как (VH)<sub>2</sub> фрагменты и однодоменные антитела.

Фрагменты антител, распознающие специфические эпитопы, можно получить известными методами. Фрагменты антител представляют собой антиген-связывающие части антитела, такие как F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fv, scFv и т.п. Другие фрагменты антител включают, но не ограничиваются этим: F(ab')<sub>2</sub> фрагменты, которые могут быть получены

расщеплением молекулы антитела пепсином, и Fab' фрагменты, которые могут быть получены путем восстановления дисульфидных мостиков F(ab')<sub>2</sub> фрагментов. В качестве альтернативы могут быть созданы библиотеки экспрессии Fab' (Huse et al., 1989, Science, 246:1274-1281), чтобы обеспечить быструю и легкую идентификацию моноклональных Fab' фрагментов с желаемой специфичностью.

Антитела в соответствии с изобретением могут быть получены любым способом, известным в данной области, таким как, без ограничения, любой химический, биологический, генетический или ферментативный метод, отдельно или в комбинации. Антитела по настоящему изобретению можно получить путем получения и культивирования гибридом. Получение синтетических однодоменных антител см. также в WO 2015/063331.

Антитело по изобретению может быть мономерным антителом или мультимерным антителом, и оно может включать по меньшей мере переменный домен, в частности, когда антитело является мультимерным. Предпочтительно антитело в соответствии с изобретением представляет собой IgG, предпочтительно подтипы IgG1 или IgG4, например, трастузумаб или ритуксимаб.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения белок представляет собой молекулу альбумина, которая имеет свободные тиольные функции. Может быть предусмотрен эндогенный или экзогенный альбумин и, в частности, человеческий сывороточный альбумин, рекомбинантный альбумин или фрагмент альбумина.

Известно, что эндогенный альбумин накапливается посредством “EPR” эффекта (“повышенная проникающая способность и удерживание”) в микроокружении солидных опухолей, поэтому связывание *in situ* конъюгата по изобретению с молекулой эндогенного альбумина позволяет нацеливать образованное таким образом связанное соединение, также называемое пролекарством, в микроокружение опухоли и, таким образом, преодолевает недостаточную селективность свободных форм некоторых производных цитотоксических лекарственных средств, таких как доластатин. Следует отметить, что такой “EPR” эффект распространяется на микроокружение воспаленных тканей.

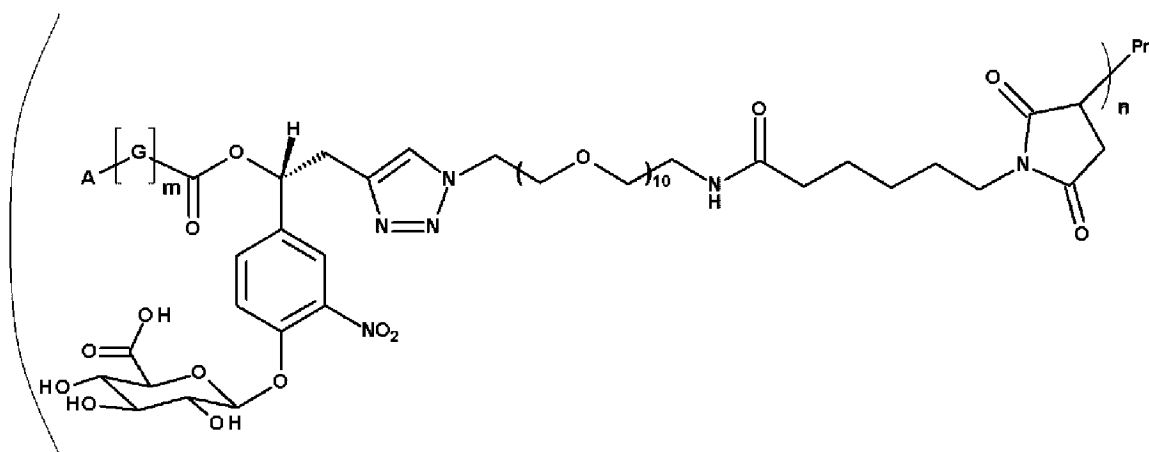
Таким образом, пролекарство может быть получено посредством селективного образования, *in vivo*, ковалентной связи между конъюгатом через его реакционноспособную малеимидную группу и свободной и комплементарно реакционноспособной функциональной группой, обычно тиольной функциональной группой, белка, предпочтительно эндогенной молекулы альбумина, более предпочтительно человеческого сывороточного альбумина или его производного. Указанное пролекарство может включать по меньшей мере одну молекулу конъюгата по изобретению, ковалентно связанную с молекулой белка или фрагментом или производным такой молекулы.

В случае альбумина указанная ковалентная связь может быть установлена с тиольной функциональной группой цистеина в положении 34 альбумина.

В конкретном варианте осуществления пролекарство по изобретению может быть получено до его введения. Пролекарство по изобретению может быть образовано *in vitro* путем образования ковалентной связи между по меньшей мере одним конъюгатом по изобретению и свободной и комплементарной функциональной группой, обычно тиольной функциональной группой, белка, такого как молекула альбумина, молекула рекомбинантного альбумина или ее фрагмент или производное. Указанная ковалентная связь может быть установлена с тиольной функциональной группой цистеина в положении 34 альбумина.

В контексте изобретения “фрагмент молекулы альбумина” означает фрагмент молекулы альбумина, имеющий размер, достаточный, чтобы гарантировать удовлетворительную биодоступность, проникающую способность по отношению к опухолевым тканям и непроницаемость по отношению к эндотелиальному барьеру здоровых тканей пролекарства, полученного таким образом. В конкретном варианте осуществления фрагмент молекулы альбумина содержит цистеин, соответствующий цистеину 34 последовательности эндогенного альбумина.

Пролекарство в соответствии с изобретением может быть представлено формулой (II):



(II),

где A, G и m имеют значение, определенное выше,

Pr<sub>t</sub> представляет собой радикал, производный от белка,

n имеет значение между 0,1 и 16, предпочтительно между 0,1 и 8,

и его фармацевтически приемлемые соли.

В одном конкретном варианте осуществления Pr<sub>t</sub> представляет собой радикал, производный от антитела, и n представляет собой среднее количество конъюгатов, связанных с указанным антителом, и имеет значение между 0,1 и 16, предпочтительно между 0,1 и 8.

В другом конкретном варианте осуществления, Pr<sub>t</sub> представляет собой радикал, производный от альбумина, и n имеет значение 1.

Значение n можно измерить масс-спектрометрией (MS) и хроматографией



гидрофобных взаимодействий (НС).

В соответствии с изобретением, “радикал, производный от белка” означает фрагмент, состоящий из белка, лишённого одного или более атомов одной из его функциональных групп, который прореагировал с остальной частью конъюгата. Более конкретно, “радикал, производный от белка” означает белок, включающий по меньшей мере один цистеиновый фрагмент, лишённый атома водорода его -SH группы.

#### Фармацевтические композиции

Конъюгаты или пролекарства по настоящему изобретению могут доставляться в фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере эффективное количество по меньшей мере одного конъюгата по настоящему изобретению или по меньшей мере одного пролекарства по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция может быть в твердом или жидком состоянии и может быть в любой из фармацевтических форм, обычно используемых в медицине и/или ветеринарии, например в форме простых таблеток или таблеток с сахарным покрытием, пилюль, лепешек, гелевых капсул, капель, гранул, препаратов для инъекций, мазей, кремов или гелей. Фармацевтическую композицию можно получить обычными способами.

В контексте настоящей заявки термин “фармацевтически приемлемый носитель” относится к любому ингредиенту, за исключением активных ингредиентов (а именно эксципиентам), который присутствует в фармацевтической композиции. Его добавление может быть направлено на придание конечному продукту определенной консистенции или других физических или вкусовых свойств. Эксципиент или фармацевтически приемлемый носитель должен быть лишен способности к какому-либо взаимодействию, в частности химическому, с активными ингредиентами. Обычные эксципиенты можно использовать в соответствии с методами, хорошо известными специалистам в данной области. В контексте настоящей заявки термин “эффективное количество” относится к количеству активного ингредиента, которое предотвращает, устраняет или снижает вредные эффекты заболевания.

#### Применения

Конъюгаты по изобретению или пролекарства по изобретению можно использовать для лечения рака и/или воспалительного заболевания.

В контексте настоящей заявки термин “лечение”, “лечить” или “осуществление лечения” относится к любому действию, направленному на улучшение состояния здоровья пациентов, такому как лечение, предотвращение, профилактика и замедление развития заболевания. В некоторых вариантах осуществления этот термин относится к облегчению или устранению заболевания или симптомов, связанных с заболеванием. В других вариантах осуществления этот термин относится к минимизации распространения или обострения заболевания в результате введения одного или более терапевтических средств субъекту с таким заболеванием.

В контексте настоящей заявки термины “субъект”, “индивидуум” или “пациент”

являются взаимозаменяемыми и относятся к животному, предпочтительно к млекопитающему, еще более предпочтительно к человеку. Однако термин “субъект” может также относиться к отличным от человека животным, в частности к млекопитающим. Субъект, в соответствии с изобретением, представляет собой животное, предпочтительно млекопитающее, еще более предпочтительно человека. Субъектом может быть животное, не являющееся человеком, в частности, выбранное из млекопитающих, таких как собаки, кошки, лошади, коровы, свиньи, овцы и отличные от человека приматы, среди прочих. Предпочтительно, субъектом является человек, предпочтительно взрослый человек, более предпочтительно взрослый человек по меньшей мере 40 лет, еще более предпочтительно взрослый человек по меньшей мере 50 лет, еще более предпочтительно взрослый человек по меньшей мере 60 лет.

Изобретение также относится к применению конъюгата в соответствии с изобретением, пролекарства в соответствии с изобретением или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением для получения лекарственного средства. Предпочтительно оно относится к конъюгату в соответствии с изобретением, пролекарству в соответствии с изобретением или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением для получения лекарственного средства для лечения рака и/или воспалительного заболевания у субъекта.

Кроме того, оно относится к способу лечения у субъекта рака и/или воспалительного заболевания, где терапевтически эффективное количество конъюгата в соответствии с изобретением, терапевтически эффективное количество пролекарства в соответствии с изобретением или терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции в соответствии с изобретением вводят указанному субъекту, страдающему раком и/или воспалительным заболеванием.

Оно также относится к способу лечения у субъекта рака и/или воспалительного заболевания, где терапевтически эффективное количество конъюгата в соответствии с изобретением, терапевтически эффективное количество пролекарства в соответствии с изобретением или терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции в соответствии с изобретением вводят указанному субъекту, страдающему раком и/или воспалительным заболеванием, в комбинации с другим лечением, выбранным из группы, состоящей из химиотерапии, лучевой терапии, лечения по меньшей мере одним противовоспалительным средством и их комбинаций.

Конъюгат в соответствии с изобретением, пролекарство в соответствии с изобретением или фармацевтическую композицию в соответствии с изобретением можно вводить любым удобным путем субъекту, нуждающемуся в этом. Например, их можно вводить системным путем, в частности, подкожно, внутримышечно, внутривенно или внутрикочно, предпочтительно путем внутривенной инъекции. Конъюгат в соответствии с изобретением, пролекарство в соответствии с изобретением или фармацевтическую композицию в соответствии с изобретением можно вводить в виде разовой дозы или в виде нескольких доз. Конъюгат в соответствии с изобретением, пролекарство в

соответствии с изобретением или фармацевтическую композицию в соответствии с изобретением можно вводить от одного раза в день до одного раза в месяц, предпочтительно раз в неделю или раз в две недели, более предпочтительно раз в неделю. Продолжительность лечения конъюгатом в соответствии с изобретением, пролекарством в соответствии с изобретением или фармацевтической композицией в соответствии с изобретением предпочтительно составляет от 1 до 20 недель, предпочтительно от 1 до 10 недель. Альтернативно, лечение может длиться до тех пор, пока сохраняются симптомы заболевания. Количество конъюгата в соответствии с изобретением, пролекарства в соответствии с изобретением или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением для введения должно определяться стандартной процедурой, хорошо известной специалистам в данной области. Для определения подходящей дозировки необходимо учитывать физиологические данные пациента (например, возраст, размер и массу тела) и способы введения, чтобы вводить пациенту терапевтически эффективное количество.

### Рак

Термин "рак" или "опухоль", в контексте настоящей заявки относится к наличию клеток, обладающих характеристиками, типичными для вызывающих рак клеток, такими как неконтролируемая пролиферация, и/или бессмертие, и/или метастатический потенциал, и/или быстрый рост, и/или скорость пролиферации, и/или определенные характерные морфологические признаки. Этот термин относится к любому типу злокачественного новообразования (первичному или метастазам) у субъекта любого типа. Это может относиться как к солидной опухоли, так и к гемопоэтической опухоли.

Предпочтительно, рак согласно изобретению выбран из группы, состоящей из рака предстательной железы, рака легких, рака молочной железы, рака желудка, рака почки, рака яичников, гепатоцеллюлярного рака, остеосаркомы, меланомы, рака гипофаринкса, рака пищевода, рака эндометрия, рака шейки матки, рака поджелудочной железы, рака печени, рака толстой кишки или колоректального рака, нейроэндокринных опухолей, злокачественной опухоли мышц, рака надпочечников, рака щитовидной железы, рака матки, рака кожи, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, лимфомы и лейкоза.

Конъюгаты по настоящему изобретению, пролекарства по настоящему изобретению или фармацевтические композиции по настоящему изобретению, в частности, предназначены для лечения рака молочной железы, толстой кишки, яичников, предстательной железы, поджелудочной железы и легких.

Конъюгаты по настоящему изобретению, пролекарства по настоящему изобретению или фармацевтические композиции можно использовать для их применения в профилактике и/или лечении метастазов.

### Воспалительные заболевания

Термин "воспалительное заболевание" в контексте настоящей заявки относится, в частности, к хроническим патологическим состояниям кишечника или ревматоидным патологическим состояниям.

## **ПРИМЕРЫ**

Настоящее изобретение будет более понятно в свете следующих примеров, которые представлены только в иллюстративных целях.

### **Метод 1 - препаративная ВЭЖХ**

Система препаративной ВЭЖХ состояла из двух насосов Shimadzu LC-8A, детектора SPD-10A VP (Shimadzu), контроллера SCL-10A VP (Shimadzu), автодозатора SIL-10A, 2 мл дозирующей петли и колонки SunFire C18 (150 мм × 19 мм в.д., 5 мкм, Waters). Образец инжесктировали в дозирующую петлю и элюировали при скорости потока 17 мл/мин (время анализа 50 мин, детекция при 254 нм; буфер А: H<sub>2</sub>O miliQ+0,05% TFA; буфер В: ацетонитрил; градиент: 40 мин - от 5% до 95% В, 5 мин - 95% В, 5 мин - 5% В).

### **Метод 2 - аналитическая ВЭЖХ**

Аналитическую ВЭЖХ осуществляли на разделительных модулях Waters 2695, снабженных УФ-детектором Waters 2487 и колонкой Gemini-NX, 5мкм, C18, 150 × 4,6 мм. Скорость потока составляла 1 мл/мин. Растворитель А: 0,05% TFA в воде. Растворитель В: 0,05% TFA в ацетонитриле. Градиент: 0-1 мин - 30% В; 1-11 мин - 30% до 80% В; 11-12 мин - 80 до 95% В; 12-14,5 мин - 95% В; 14,5-14,7 мин - 95% до 30% В; 14,7-17 мин - 30% В.

### **Метод 3 - ЖХМС**

ЖХМС осуществляли на разделительных модулях Waters 2695, снабженных УФ-детектором Waters 2487, масс-детектором Waters Acquity QDa и колонкой CORTECS, 2,7 мкм, C18, 50 × 4,6 мм. Скорость потока составляла 1 мл/мин. Растворитель А: 0,05% HCOOH в воде. Растворитель В: 0,05% HCOOH в ацетонитриле. Градиент: 0-5 мин - 5% до 95% В; 5-6 мин - 95% В; 6-7,8 мин - 5% В. Масс-детектор работал в положительном режиме МС-сканирования при температуре зонда 600°C, напряжении на капилляре 1,5 кВ и напряжении на конусе 10 В.

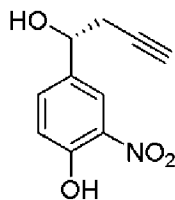
### **Метод 4 - хиральная ВЭЖХ**

Хиральную ВЭЖХ осуществляли на системе Shimadzu SCL-10AVP, снабженной автодозатором Shimadzu SIL-10A, УФ-детектором Shimadzu SCL-10AVP (установленным на 254 нм), двумя насосами Shimadzu LC-8A, полупрепаративной колонкой CHIRALPAK® IG (5мкм, в.д. 20мм × дл. 250мм) и 2 мл дозирующей петлей. Скорость потока составляла 20 мл/мин. Элюент представлял собой дихлорметан. Разделение осуществляли в течение 5 минут.

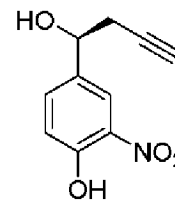
### **Метод 5 - хиральная ВЭЖХ**

Хиральную ВЭЖХ осуществляли на системе Shimadzu SCL-10AVP, снабженной автодозатором Shimadzu SIL-10A, УФ-детектором Shimadzu SCL-10AVP (установленным на 254 нм), двумя насосами Shimadzu LC-8A, полупрепаративной колонкой CHIRALPAK® IG (5мкм, в.д. 20мм × дл. 250мм) и 2 мл дозирующей петлей. Скорость потока составляла 20 мл/мин. Элюент представлял собой смесь гептана и этанола (70:30). Разделение осуществляли в течение 25 минут.

### **Синтез рацемической смеси соединений R1 и S1**

**R1**

**(R) -4- (1-гидроксIBUT-3-ин-1-ил) -2-нитрофенол**

**S1**

**(S) -4- (1-гидроксIBUT-3-ин-1-ил) -2-нитрофенол**

В колбу, снабженную холодильником и капельной воронкой, добавляли алюминиевый порошок (6,17 экв., 14156 мг, 524 ммоль) и каталитическое количество  $\text{HgCl}_2$  (0,00248 экв., 57,2 мг, 0,211 ммоль) с безводным THF (218 мл). Затем добавляли по каплям пропаргилбромид (6,2 экв., 78439 мг, 58,8 мл, 527 ммоль) 80% раствор в толуоле (внимание: экзотермическая реакция; пик экзотермы и его интенсивность зависят от дисперсности порошка алюминия). Когда добавление было завершено, полученную реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 6 часов. Раствор затем охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  и добавляли по каплям раствор 4-гидрокси-3-нитробензальдегида (1 экв., 14210 мг, 85 ммоль) в THF (109 мл). После 30 мин перемешивания альдегид исчезал полностью (контролировали при помощи ТСХ), и реакционную смесь охлаждали до  $0^\circ\text{C}$ . Реакционную смесь гасили добавлением по каплям 1 N раствора HCl (10 мл) и затем экстрагировали 3 раза при помощи EtOAc. Органический слой сушили над  $\text{MgSO}_4$  и затем упаривали с получением коричневого масла, которое очищали флэш-хроматографией (циклогексан/EtOAc - 70/30). Для удаления следовых количеств побочного продукта реакции Вюрца полученное желтое масло солубилизировали в DCM (655 мл), органический слой экстрагировали 3 раза 1 N раствором NaOH (каждый раз по 1/3 объема DCM). К полученному объединенному водному слою затем добавляли DCM (равный объем). Реакционную смесь подкисляли концентрированной HCl до pH 1. Водную фазу экстрагировали DCM еще 3 раза (каждый раз по 1/3 объема водного раствора). Объединенный органический слой сушили над  $\text{MgSO}_4$  и упаривали с получением рацемической смеси (R)-4-(1-гидроксIBUT-3-ин-1-ил)-2-нитрофенола и (S)-4-(1-гидроксIBUT-3-ин-1-ил)-2-нитрофенола (7927 мг, 38,3 ммоль, 45%).

**$^1\text{H}$  ЯМР (ХЛОРОФОРМ- $d$ )** Сдвиг: 10,63 (с, 1H), 8,23 (с, 1H), 7,73 (дд,  $J=8,5, 1,5$  Гц, 1H), 7,25 (д,  $J=8,5$  Гц, 1H), 4,97 (т,  $J=6,1$  Гц, 1H), 2,67-2,97 (м, 3H), 2,20 (т,  $J=2,5$  Гц, 1H).

**$^{13}\text{C}$  ЯМР (ХЛОРОФОРМ- $d$ )** Сдвиг: 154,6, 135,2, 135,0, 133,3, 122,3, 120,1, 79,6, 71,9, 70,8, 29,3.

**MS (ESI, Метод 3)  $m/z$ : 230,1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$**

#### **Разделение энантиомеров R1 и S1**

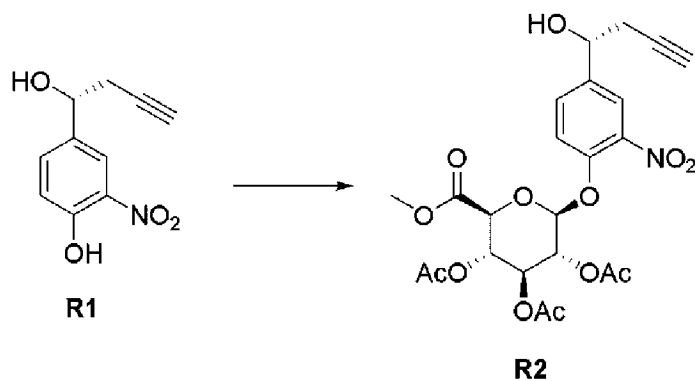
Энантиомеры **R1** и **S1** разделяли с использованием хиральной хроматографии. Хиральную хроматографию осуществляли на системе Shimadzu SCL-10AVP, снабженной автодозатором Shimadzu SIL-10A, УФ-детектором Shimadzu SCL-10AVP (установленным

на 254 нм), коллектором фракций Shimadzu FRC-10A, двумя насосами Shimadzu LC-8A, полупрепаративной колонкой CHIRALPAK® IG (5мкм, в.д. 20мм × дл. 250мм) и 2 мл дозирующей петлей. Очистку осуществляли при скорости потока 20 мл/мин с использованием смеси гептана и этанола (70:30) в качестве элюента. К 250 мг смеси R1 и S1 добавляли 0,15 мл этанола и 0,35 мл гептана. Полученную смесь инжигировали в дозирующую петлю и осуществляли очистку в течение 25 минут. Первую фракцию, содержащую чистый R1 изомер, собирали между 4 мин и 8 мин. Вторую фракцию, содержащую чистый S1 изомер, собирали между 10 мин и 22 мин. Элюент выпаривали и чистые энантиомеры R1 и S1 использовали на следующих стадиях. Энантиомерную чистоту R1 и S1 подтверждали хиральной ВЭЖХ (Метод 5).

**Соединение R1 ВЭЖХ (Метод 5) RT: 6,53 мин**

**Соединение S1 ВЭЖХ (Метод 5) RT: 16,79 мин**

**Соединение R2**



Раствор НМТТА (0,7 экв., 2,11 г, 2,5 мл, 9,17 ммоль; 1,1,4,7,10,10-гексаметилтриэтиленetetрамин, CAS 3083-10-1) и  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  (3,7 экв., 13,4 г, 48,5 ммоль) в безводного ацетонитрила (20 мл) перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Добавляли раствор (R)-4-(1-гидроксибут-3-ин-1-ил)-2-нитрофенола (1 экв., 2,71 г, 13,1 ммоль) и (2R,3R,4S,5S,6S)-2-бром-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триил триацетата (1,1 экв., 5,7 г, 14,3 ммоль) в ацетонитриле (11,9 мл) при 0°C и полученную смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь гасили водой с последующим добавлением EtOAc (50 мл). Полученную реакцию смесь перемешивали в течение 3 минут и затем фильтровали для удаления солей серебра. Осуществляли экстрагирование, используя еще 4 порции  $\text{Et}_2\text{O}$ ; объединенные органические фракции сушили над  $\text{MgSO}_4$  и упаривали. Полученное неочищенное вещество очищали флэш-хроматографией (циклогексан/EtOAc градиент 0-100% EtOAc за 20 минут; 30 колоночных объемов) с получением метил R2 (3428 мг, 6,55 ммоль, 50%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

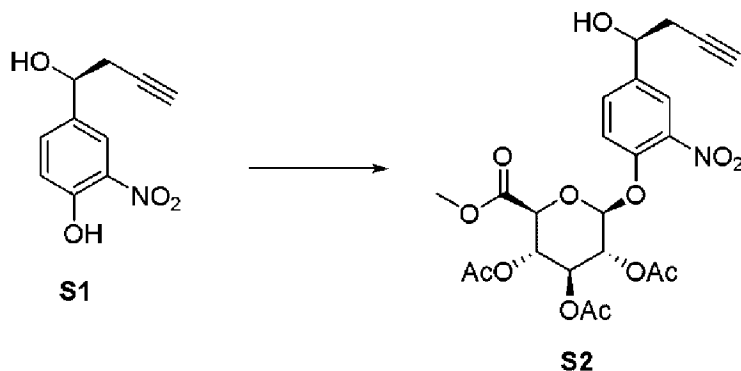
$^1\text{H}$  ЯМР (ХЛОРОФОРМ-d) Сдвиг: 7,86 (дд, J=6,1, 1,9 Гц, 1H), 7,49-7,65 (м, 1H), 7,36 (д, J=8,5 Гц, 1H), 5,25-5,39 (м, 3H), 5,17-5,25 (м, 1H), 4,90 (т, J=6,1 Гц, 1H), 4,21 (д, J=8,8 Гц, 1H), 3,74 (с, 3H), 2,53-2,70 (м, 2H), 1,98-2,20 (м, 10H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (ХЛОРОФОРМ-d) Сдвиг: 170,0, 169,3, 169,3, 166,7, 148,5, 141,2, 138,9,

131,2, 122,6, 120,0, 99,8, 90,3, 79,4, 72,6, 72,0, 71,2, 70,7, 70,2, 68,8, 53,0, 29,4, 20,6, 20,5.

**MS (Метод 3) m/z:** 546,2 [M+Na]<sup>+</sup>

**Соединение S2**



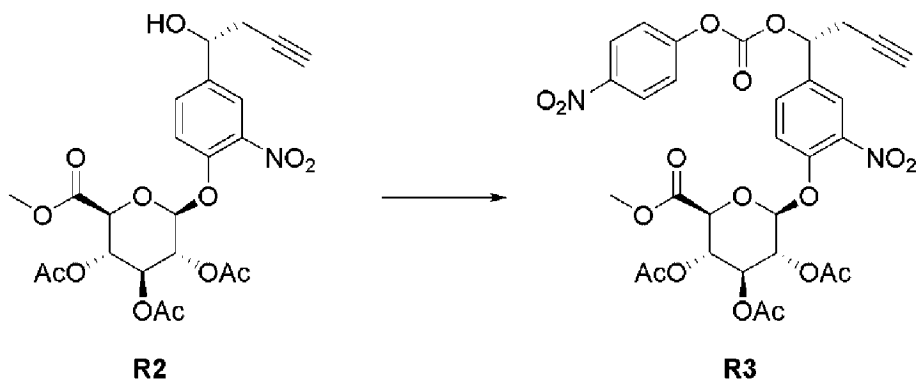
Раствор НМТТА (0,7 экв., 3,4 г, 4 мл, 14,76 ммоль; 1,1,4,7,10,10-гексаметилтриэтилететрамина, CAS 3083-10-1) и Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,7 экв., 21,5 г, 78 ммоль) в безводном ацетонитриле (30 мл) перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Добавляли раствор (S)-4-(1-гидроксибут-3-ин-1-ил)-2-нитрофенола (1 экв., 4,37 г, 21,1 ммоль) и метил (2R,3R,4S,5S,6S)-2-бром-6-(метоксикарбонил)тетрагидро-2H-пиран-3,4,5-триил триацетата (1,1 экв., 10 г, 25,3 ммоль) в ацетонитриле (20 мл) при 0°C и полученную смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь гасили водой с последующим добавлением EtOAc (80 мл). Полученную реакционную смесь перемешивали в течение 3 минут и затем фильтровали для удаления солей серебра. Осуществляли экстрагирование, используя еще 4 порции Et<sub>2</sub>O; объединенные органические фракции сушили над MgSO<sub>4</sub> и упаривали. Полученное неочищенное вещество очищали флэш-хроматографией (циклогексан/EtOAc градиент 0-100% EtOAc за 20 минут; 30 колоночных объемов) с получением **S2** (6100 мг, 11,6 ммоль, 55%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

**<sup>1</sup>H ЯМР** (ХЛОРОФОРМ-d) Сдвиг: 7,86 (дд, J=6,1, 1,9 Гц, 1H), 7,49-7,65 (м, 1H), 7,36 (д, J=8,5 Гц, 1H), 5,25-5,39 (м, 3H), 5,17-5,25 (м, 1H), 4,90 (т, J=6,1 Гц, 1H), 4,21 (д, J=8,8 Гц, 1H), 3,74 (с, 3H), 2,53-2,70 (м, 2H), 1,98-2,20 (м, 10H).

**<sup>13</sup>C ЯМР** (ХЛОРОФОРМ-d) Сдвиг: 170,0, 169,3, 169,3, 166,7, 148,5, 141,2, 138,9, 131,2, 122,6, 120,0, 99,8, 90,3, 79,4, 72,6, 72,0, 71,2, 70,7, 70,2, 68,8, 53,0, 29,4, 20,6, 20,5.

**MS (Метод 3) m/z:** 546,3 [M+Na]<sup>+</sup>

**Соединение R3**



К раствору **R2** (1 экв., 1600 мг, 3,05 ммоль) и 4-нитрофенилхлорформиата (2 экв., 1230 мг, 6,1 ммоль) в безводном DCM (30 мл) добавляли пиридин (2,5 экв., 0,62 мл, 7,62 ммоль) при 0°C. Смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре и затем гасили насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub>. Смесь экстрагировали три раза DCM (равный объему реакции) и объединенные органические слои сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали в вакууме. Очистка флэш-хроматографией (циклогексан/EtOAc градиент 0-100% EtOAc за 20 минут; 30 колоночных объемов) давала **R3** (1469 мг, 2,13 ммоль, 70%) в виде не совсем белого твердого вещества.

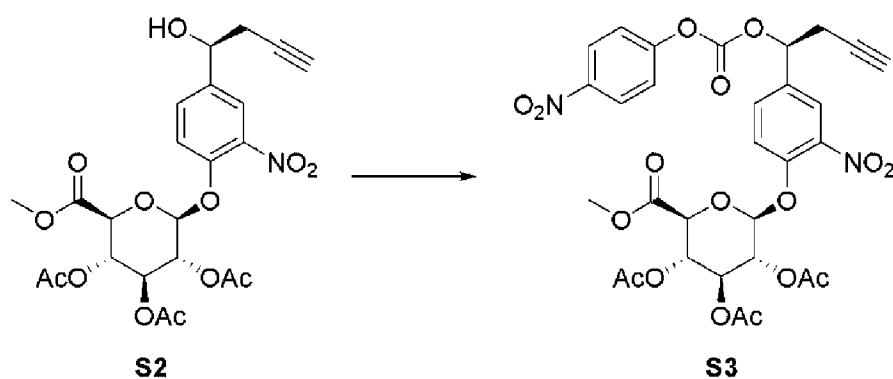
<sup>1</sup>H ЯМР (ХЛОРОФОРМ-d) Сдвиг: 8,17-8,34 (м, 2H), 7,94 (д, J=2,0 Гц, 1H), 7,65 (дд, J=8,7, 2,1 Гц, 1H), 7,43 (д, J=8,5 Гц, 1H), 7,33-7,40 (м, 2H), 5,81 (т, J=6,5 Гц, 2H), 5,21-5,43 (м, 4H), 4,25 (д, J=8,8 Гц, 1H), 3,74 (с, 3H), 2,78-3,02 (м, 2H), 2,13 (с, 3H), 2,09-2,12 (м, 1H), 2,02-2,09 (м, 6H).

<sup>13</sup>C ЯМР (ХЛОРОФОРМ-d) Сдвиг: 169,9, 169,2, 169,1, 166,7, 155,2, 151,5, 149,5, 145,6, 141,2, 133,4, 132,1, 125,3, 123,6, 121,7, 119,9, 99,5, 72,7, 72,5, 71,0, 70,2, 68,6, 53,0, 26,3, 20,6, 20,5, 20,5.

MS (Метод 3) m/z: 711,2 [M+Na]<sup>+</sup>

ВЭЖХ (Метод 4) RT: 2,77 мин

Соединение S3



К раствору **S2** (1 экв., 2600 мг, 5,0 ммоль) и 4-нитрофенилхлорформиата (2 экв., 2000 мг, 9,9 ммоль) в безводном DCM (50 мл) добавляли пиридин (2,5 экв., 1 мл, 12,42 ммоль) при 0°C. Смесь перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре, гасили насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub>. Смесь экстрагировали три раза DCM



(равный объему реакции) и объединенный органический слой сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и концентрировали в вакууме. Очистка флэш-хроматографией в циклогексан/этилацетат (циклогексан/ $\text{EtOAc}$  градиент 0-100%  $\text{EtOAc}$  за 20 минут; 30 колоночных объемов) давала **S3** (2300 мг, 2,13 ммоль, 68%) в виде не совсем белого твердого вещества.

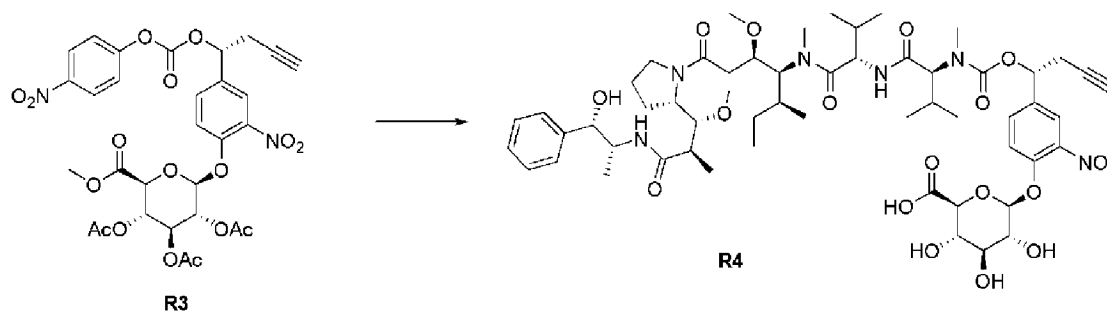
$^1\text{H}$  ЯМР (ХЛОРОФОРМ-d) Сдвиг: 8,17-8,34 (м, 2H), 7,94 (д,  $J=2,0$  Гц, 1H), 7,65 (дд,  $J=8,7, 2,1$  Гц, 1H), 7,43 (д,  $J=8,5$  Гц, 1H), 7,33-7,40 (м, 2H), 5,81 (т,  $J=6,5$  Гц, 2H), 5,21-5,43 (м, 4H), 4,25 (д,  $J=8,8$  Гц, 1H), 3,74 (с, 3H), 2,78-3,02 (м, 2H), 2,13 (с, 3H), 2,09-2,12 (м, 1H), 2,02-2,09 (м, 6H).

$^{13}\text{C}$  ЯМР (ХЛОРОФОРМ-d) Сдвиг: 170,0, 169,3, 169,2, 166,7, 155,2, 151,5, 149,5, 145,6, 141,1, 133,4, 132,1, 125,4, 123,7, 121,7, 119,9, 99,5, 72,6, 72,5, 71,0, 70,2, 68,6, 53,1, 26,2, 20,6, 20,6, 20,5.

MS (Метод 3)  $m/z$ : 711,2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

ВЭЖХ (Метод 4) RT: 2,84 мин

Соединение R4

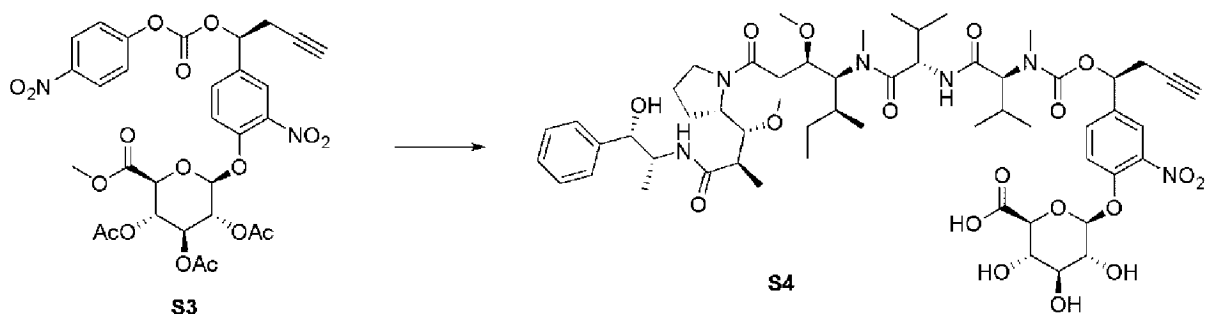


К раствору **R3** (1 экв., 41,3 мг, 0,06 ммоль) и **ММАЕ** (1 экв., 43,1 мг, 0,06 ммоль) в DMF (1,15 мл) добавляли раствор **НОВt** (1 экв., 8,11 мг, 0,06 ммоль) в пиридине (0,287 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24ч, затем разбавляли при помощи  $\text{MeOH}$  (11,5 мл) и охлаждали до  $0^\circ\text{C}$ . К полученному раствору добавляли  $\text{LiOH}$  (10 экв., 1 М в  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,6 мл, 0,6 ммоль) и смесь инкубировали при  $4^\circ\text{C}$  в течение 16ч. Полученный раствор гасили при помощи  $\text{HCOOH}$  (20 экв., 1 М в  $\text{H}_2\text{O}$ , 1,2 мл, 1,2 ммоль) и концентрировали до 3 мл при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (Метод 1) с получением **R4** (41,9 мг, 0,0372 ммоль, 62%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

ВЭЖХ (Метод 2) RT: 7,81 мин

MS (Метод 3)  $m/z$ : 1127,7  $[\text{M}+\text{H}]^+$

Соединение S4

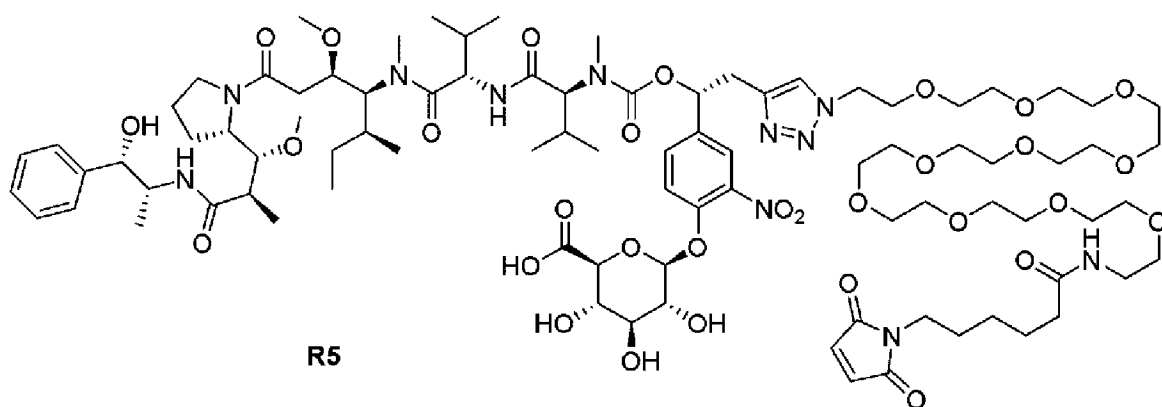


К раствору **S3** (1 экв., 37,9 мг, 0,055 ммоль) и **ММАЕ** (1 экв., 39,5 мг, 0,055 ммоль) в DMF (1,05 мл) добавляли раствор **НОВt** (1 экв., 7,43 мг, 0,055 ммоль) в пиридине (0,263 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24ч, затем разбавляли при помощи MeOH (10,5 мл) и охлаждали до 0°C. К полученному раствору добавляли LiOH (10 экв., 1 М в H<sub>2</sub>O, 0,55 мл, 0,55 ммоль) и смесь инкубировали при 4°C в течение 16ч. Полученный раствор гасили при помощи HCOOH (20 экв., 1 М в H<sub>2</sub>O, 1,1 мл, 1,1 ммоль) и концентрировали до 3 мл при пониженном давлении. Остаток очищали препаративной ВЭЖХ (Метод 1) с получением **S4** (36,6 мг, 0,0325 ммоль, 59%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

**ВЭЖХ (Метод 2) RT:** 7,66 мин

**MS (Метод 3) m/z:** 1127,9 [M+H]<sup>+</sup>

**Соединение R5**



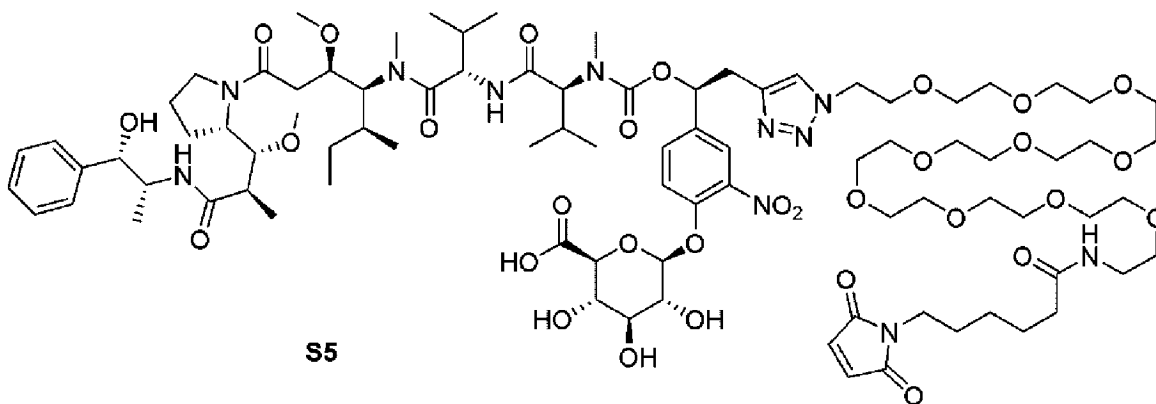
К раствору 32-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-декаоксадотриаконтан-1-амина (1,2 экв., 19 мг, 0,036 ммоль) в безводном DMF (0,5 мл) добавляли 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексаноат (1,2 экв., 11,1 мг, 0,036 ммоль). Смесь перемешивали при 21°C в течение 1 часа и затем добавляли **R4** (1 экв., 33,8 мг, 0,03 ммоль). Получали ТВТА-Cu(II) комплекс путем смешивания трис[(1-бензил-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил]амина (0,2 экв., 0,2 М в DMF, 0,03 мл, 0,006 ммоль) и сульфата меди пентагидрата (0,2 экв., 0,2 М в H<sub>2</sub>O, 0,03 мл, 0,006 ммоль) и инкубации при 21°C в течение 2 минут. ТВТА-Cu(II) комплекс (0,2 экв., 0,1 М в DMF/H<sub>2</sub>O 50/50, 0,06 мл, 0,006 ммоль) добавляли к реакционной смеси с последующим добавлением аскорбата натрия (1 экв., 1 М в H<sub>2</sub>O, 0,03 мл, 0,03 ммоль). Полученную смесь инкубировали при 21°C в течение 1 часа и очищали препаративной ВЭЖХ с получением **R5** (30,5 мг, 0,0165 ммоль, 55%) в

виде белого твердого вещества.

**ВЭЖХ (Метод 2) RT:** 6,85 мин

**MS (Метод 3) m/z:** 924,2  $[M+2H]^{2+}/2$

**Соединение S5**

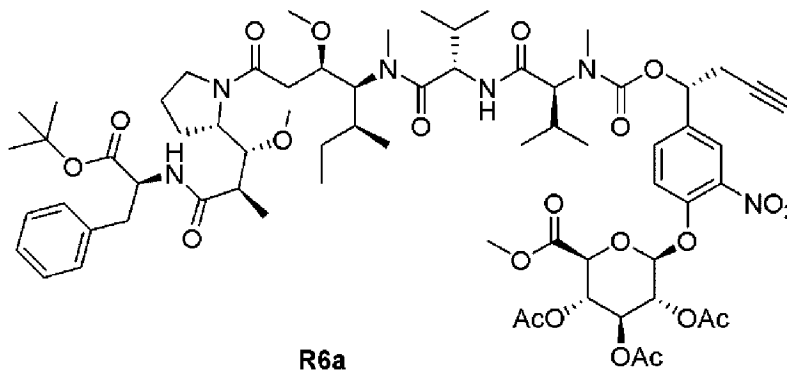


К раствору 32-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-декаоксадотриаконтан-1-амина (1,2 экв., 15,8 мг, 0,03 ммоль) в безводном DMF (0,417 мл) добавляли 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексаноат (1,2 экв., 9,25 мг, 0,03 ммоль). Смесь перемешивали при 21°C в течение 1 часа и затем добавляли **S4** (1 экв., 28,2 мг, 0,025 ммоль). Получали ТВТА-Cu(II) комплекс путем смешивания трис[(1-бензил-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метил]амина (0,2 экв., 0,2 М в DMF, 0,025 мл, 0,005 ммоль) и сульфата меди пентагидрата (0,2 экв., 0,2 М в H<sub>2</sub>O, 0,025 мл, 0,005 ммоль) и инкубации при 21°C в течение 2 минут. ТВТА-Cu(II) комплекс (0,2 экв., 0,1 М в DMF/H<sub>2</sub>O 50/50, 0,05 мл, 0,005 ммоль) добавляли к реакционной смеси с последующим добавлением аскорбата натрия (1 экв., 1 М, 0,025 мл, 0,025 ммоль). Полученную смесь инкубировали при 21°C в течение 1 часа и очищали препаративной ВЭЖХ с получением **S5** (26,8 мг, 0,0145 ммоль, 58%) в виде белого твердого вещества.

**ВЭЖХ (Метод 2) RT:** 6,65 мин

**MS (Метод 3) m/z:** 924,1  $[M+2H]^{2+}/2$

**Соединение R6a**



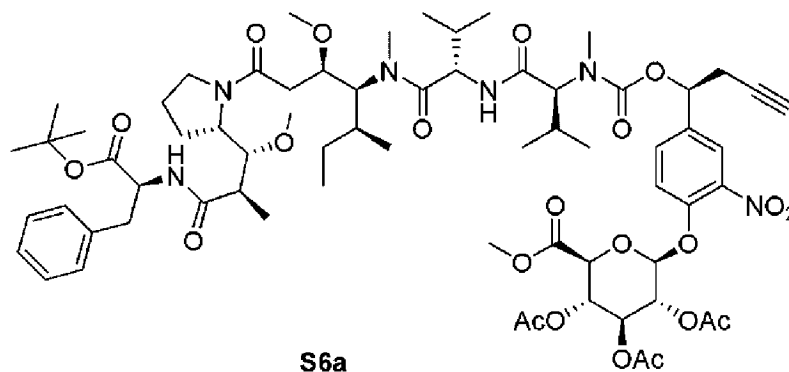
К раствору **R3** (1 экв., 41,5 мг, 0,06 ммоль) и **MMAF** (1 экв., 47,5 мг, 0,06 ммоль) в DMF (1,3 мл) добавляли раствор HOBT (1 экв., 8,14 мг, 0,06 ммоль) в пиридине (0,291 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 66ч, гасили при помощи

НСООН (3 экв., 6,8 мкл, 0,18 ммоль) и очищали препаративной ВЭЖХ (Метод 1) с получением **R6a** (57 мг, 0,043 ммоль, 71% выход) в виде белого твердого вещества.

**ВЭЖХ (Метод 2) RT:** 6,0 мин

**MS (Метод 3) m/z:** 669,5  $[M+2H]^{2+}/2$

**Соединение S6a**

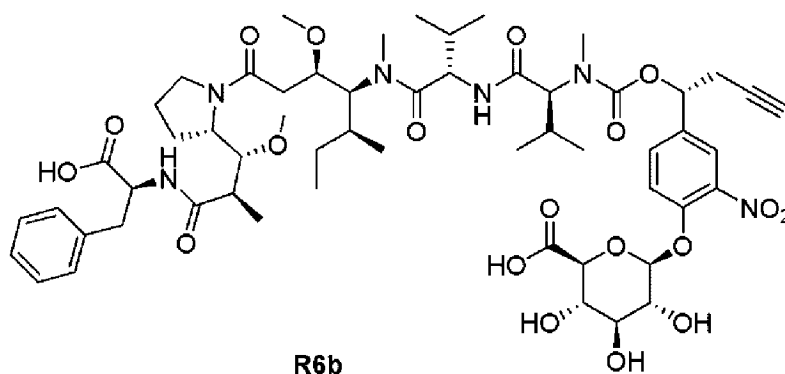


К раствору **S3** (1 экв., 41,5 мг, 0,06 ммоль) и **MMAF** (1 экв., 47,5 мг, 0,06 ммоль) в DMF (1,3 мл) добавляли раствор **HOBT** (1 экв., 8,14 мг, 0,06 ммоль) в пиридине (0,291 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 66ч, гасили при помощи НСООН (3 экв., 6,8 мкл, 0,18 ммоль) и очищали препаративной ВЭЖХ (Метод 1) с получением **S6a** (26,6 мг, 0,02 ммоль, 33% выход) в виде белого твердого вещества.

**ВЭЖХ (Метод 2) RT:** 6,0 мин

**MS (Метод 3) m/z:** 669,4  $[M+2H]^{2+}/2$

**Соединение R6b**

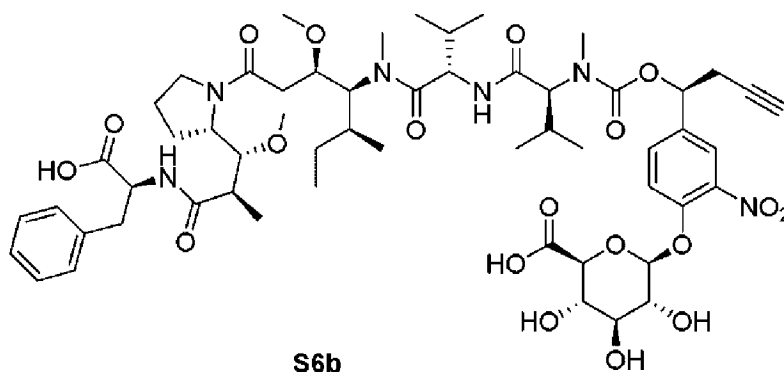


К раствору **R6a** (1 экв. 26,5 мг, 0,02 ммоль) в MeCN (233 мкл) добавляли концентрированный водный раствор HCl (233 мкл) и раствор перемешивали при 40°C в течение 20ч. Смесь затем разбавляли 0,5 мл MeCN и центрифугировали для отделения осадка. Супернатант очищали препаративной ВЭЖХ (Метод 1) с получением **R6b** (6,7 мг, 5,9 мкмоль, 30% выход) в виде не совсем белого твердого вещества.

**ВЭЖХ (Метод 2) RT:** 4,4 мин

**MS (Метод 3) m/z:** 1141,6  $[M+H]^+$

**Соединение S6b**

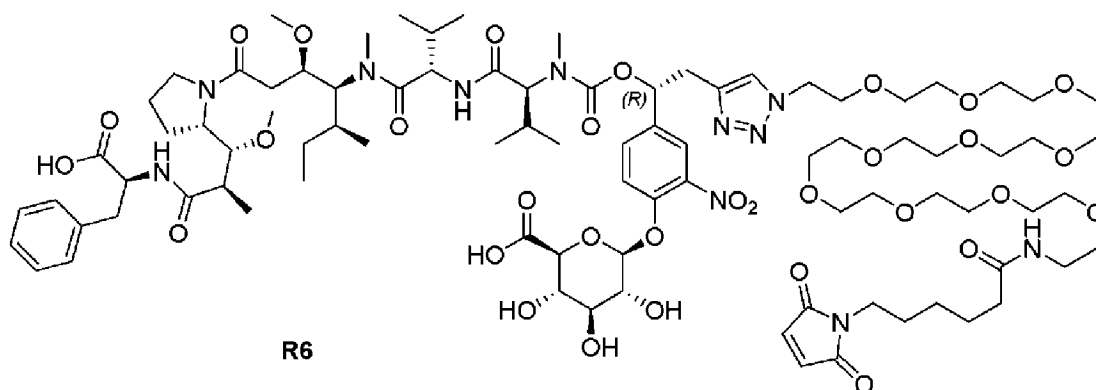


К раствору **S6a** (1 экв. 26,5 мг, 0,02 ммоль) в MeCN (233 мкл) добавляли концентрированный водный раствор HCl (233 мкл) и раствор перемешивали при 40°C в течение 20ч. Смесь затем разбавляли 0,5 мл MeCN и центрифугировали для отделения осадка. Супернатант очищали препаративной ВЭЖХ (Метод 1) с получением **S6b** (10,4 мг, 9,1 мкмоль, 46% выход) в виде не совсем белого твердого вещества.

**ВЭЖХ (Метод 2) RT:** 4,4 мин

**MS (Метод 3) m/z:** 1141,6 [M+H]<sup>+</sup>

**Соединение R6**

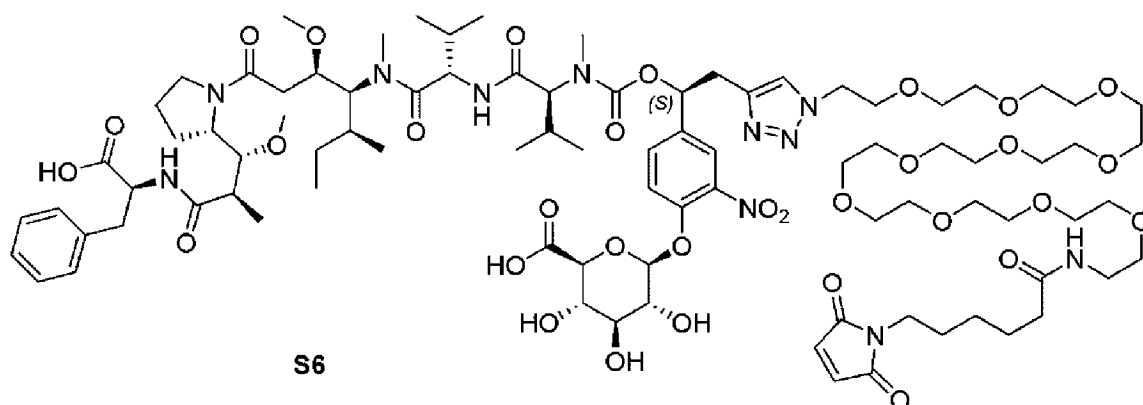


К раствору 32-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-декаоксадотриаконтан-1-амина (1,2 экв., 3,53 мг, 6,7 мкмоль) в безводном DMF (0,15 мл) добавляли раствор 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексаноата (1,2 экв., 2,07 мг, 6,7 мкмоль) в безводном DMF (0,15 мл). Смесь перемешивали при 21°C в течение 1 часа и затем добавляли **R6b** (1 экв., 6,4 мг, 5,6 мкмоль) в DMSO (0,15 мл). Получали ТНРТА-Сu(II) комплекс путем смешивания трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амина (1,5 экв., 0,1 М в DMF, 0,084 мл, 8,4 мкмоль) и сульфата меди пентагидрата (1,5 экв., 0,1 М в H<sub>2</sub>O, 0,084 мл, 8,4 мкмоль) и инкубации при 21°C в течение 1 минуты. ТНРТА-Сu(II) комплекс (1,5 экв., 0,05 М в DMF/H<sub>2</sub>O 50/50, 0,168 мл, 8,4 мкмоль) добавляли к реакционной смеси с последующим добавлением аскорбата натрия (7,46 экв., 0,5 М в H<sub>2</sub>O, 0,084 мл, 41,5 мкмоль). Полученную смесь инкубировали при 21°C в течение 15 мин и очищали препаративной ВЭЖХ (Метод 1) с получением **R6** (3,7 мг, 1,99 мкмоль, 36%) в виде белого твердого вещества.

**ВЭЖХ (Метод 2) RT:** 4,18 мин

**MS (Метод 3) m/z:** 931,1 [M+2H]<sup>2+</sup>/2

**Соединение S6**

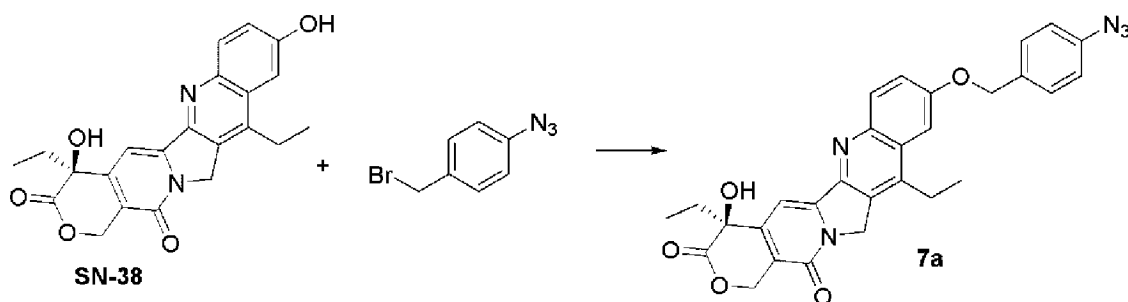


К раствору 32-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-декаоксадотриаконтан-1-амина (1,2 экв., 4,63 мг, 8,8 мкмоль) в безводном DMF (0,15 мл) добавляли раствор 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексаноата (1,2 экв., 2,71 мг, 8,8 мкмоль) в безводном DMF (0,15 мл). Смесь перемешивали при 21°C в течение 1 часа и затем добавляли **S6b** (1 экв., 8,3 мг, 7,3 мкмоль) в DMSO (0,15 мл). Получали ТНРТА-Сu(II) комплекс путем смешивания трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амина (1,5 экв., 0,1 М в DMF, 0,109 мл, 10,9 мкмоль) и сульфата меди пентагидрата (1,5 экв., 0,1 М в H<sub>2</sub>O, 0,109 мл, 10,9 мкмоль) и инкубации при 21°C в течение 1 минуты. ТНРТА-Сu(II) комплекс (1,5 экв., 0,05 М в DMF/H<sub>2</sub>O 50/50, 0,218 мл, 10,9 мкмоль) добавляли к реакционной смеси с последующим добавлением аскорбата натрия (7,46 экв., 0,5 М в H<sub>2</sub>O, 0,109 мл, 54,4 мкмоль). Полученную смесь инкубировали при 21°C в течение 15 мин и очищали препаративной ВЭЖХ (Метод 1) с получением **S6** (6,2 мг, 3,33 мкмоль, 46%) в виде белого твердого вещества.

**ВЭЖХ (Метод 2) RT:** 4,14 мин

**MS (Метод 3) m/z:** 931,1 [M+2H]<sup>2+</sup>/2

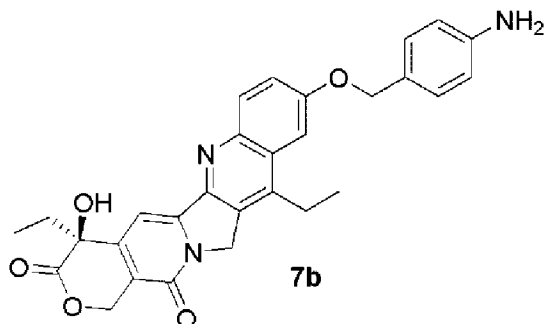
**Соединение 7a**



К раствору SN-38 (1 экв., 72,2 мг, 0,18 ммоль) и 1-азидо-4-(бромметил)бензола (1 экв., 39 мг, 0,18 ммоль) в DMF (7,22 мл) добавляли K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 экв., 76,3 мг, 0,55 ммоль). Полученный раствор продували азотом и перемешивали в течение 1ч при комнатной температуре для образования **7a**. Неочищенное соединение **7a** (92 мг, 0,18 ммоль, 96%) использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

**MS (Метод 3) m/z:** 524,2 [M+H]<sup>+</sup>

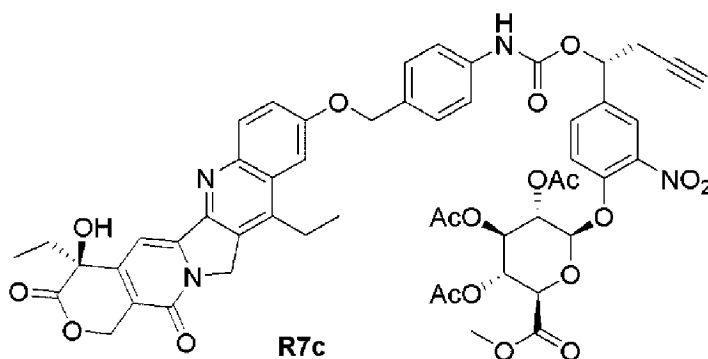
## Соединение 7b



К раствору **7a** (1 экв., 96 мг, 0,18 ммоль) в DMF (3мл) добавляли трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид (ТСЕР, 1,3 экв., 68,33 мг, 0,24 ммоль) с последующим добавлением  $K_2CO_3$  (3 экв., 76 мг, 0,55 ммоль). Смесь перемешивали в течение 1 часа, затем добавляли 5х объем EtOAc с последующим добавлением 1х объема воды. Органический слой отделяли и водный слой экстрагировали с использованием еще одного 5х объема EtOAc. Объединенный органический слой сушили над  $MgSO_4$  и концентрировали в вакууме с получением **7b** (90 мг, 0,18 ммоль, 99%) в виде бледно-желтого твердого вещества. Неочищенное соединение **7b** использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

**MS (Метод 3) m/z:** 498,2  $[M+H]^+$

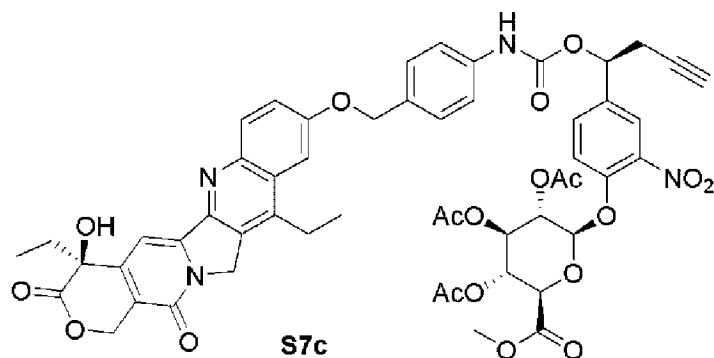
## Соединение R7c



Раствор **R3** (1 экв., 82 мг, 0,12 ммоль), **7b** (1 экв., 59 мг, 0,12 ммоль) и HOBt (1 экв., 16 мг, 0,12 ммоль) в DMF (2,4 мл) перемешивали при 25°C в течение 16 часов. Полученную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (Метод 1) с получением **R7c** (45 мг, 0,043 ммоль, 36%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

**MS (Метод 3) m/z:** 1047,3  $[M+H]^+$

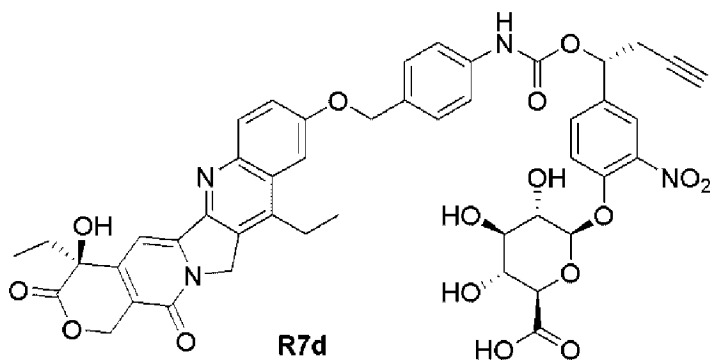
## Соединение S7c



Раствор **S3** (1 экв., 82 мг, 0,12 ммоль), **7b** (1 экв., 59 мг, 0,12 ммоль) и **HOBT** (1 экв., 16 мг, 0,12 ммоль) в **DMF** (2,4 мл) перемешивали при 25°C в течение 16 часов. Полученную смесь очищали препаративной ВЭЖХ (Метод 1) с получением **S7c** (63 мг, 0,06 ммоль, 50%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

**MS (Метод 3) m/z:** 1047,3 [M+H]<sup>+</sup>

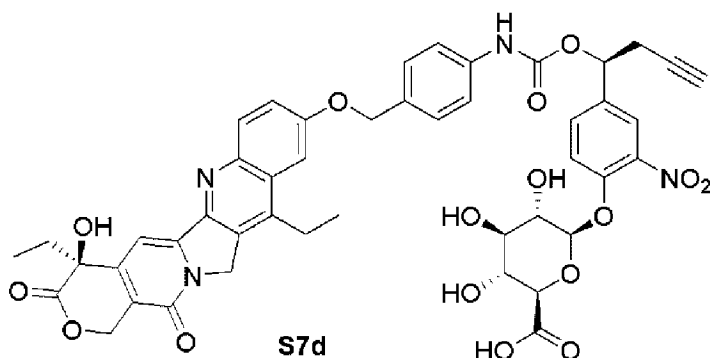
#### Соединение R7d



К раствору **R7c** (1 экв., 23 мг, 22 мкмоль) в **MeOH** (20 мл) добавляли 1М водный раствор **LiOH** (200 экв., 4,4 мл, 4,4 ммоль). Полученную реакцию смесь перемешивали при 25°C в течение 4ч и очищали препаративной ВЭЖХ с получением **R7d** (16 мг, 0,018 ммоль, 80%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

**MS (Метод 3) m/z:** 907,3 [M+H]<sup>+</sup>

#### Соединение S7d



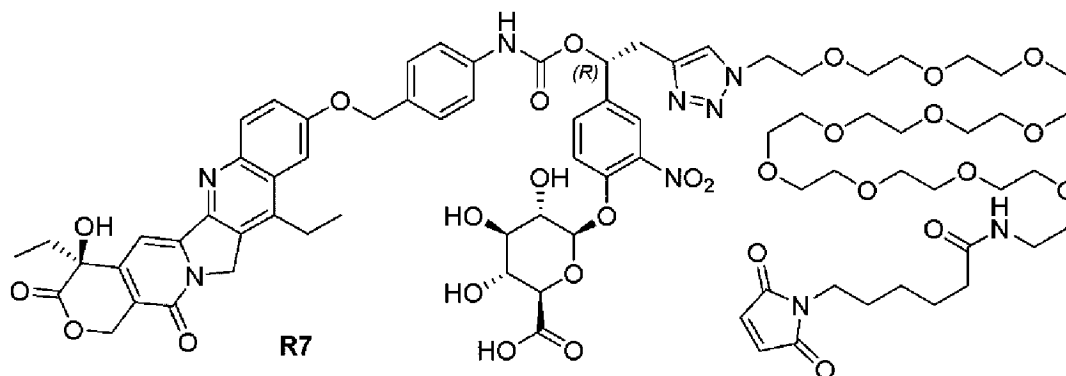
К раствору **S7c** (1 экв., 23 мг, 22 мкмоль) в **MeOH** (20 мл) добавляли 1М водный раствор **LiOH** (200 экв., 4,4 мл, 4,4 ммоль). Полученную реакцию смесь



перемешивали при 25°C в течение 4 ч и очищали препаративной ВЭЖХ с получением **S7d** (13,9 мг, 0,016 ммоль, 69,6%) в виде бледно-желтого твердого вещества.

**MS (Метод 3) m/z:** 907,3 [M+H]<sup>+</sup>

**Соединение R7**

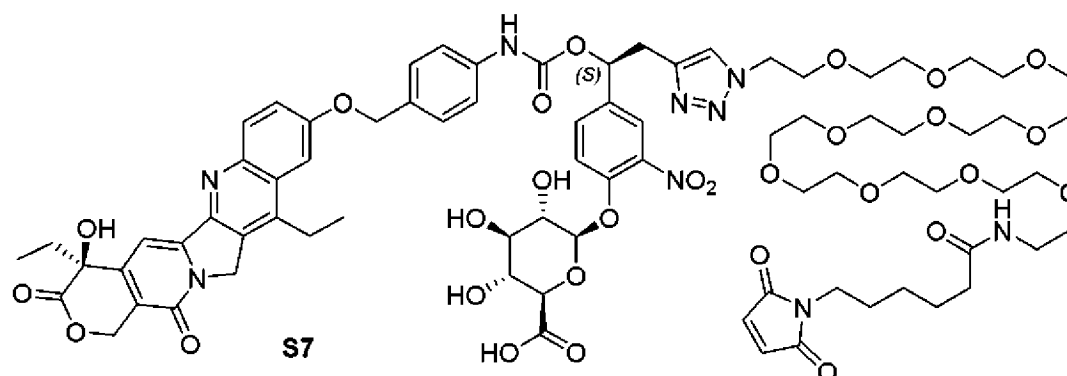


К раствору 32-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-декаоксадотриаконтан-1-амина (1,5 экв., 5,92 мг, 11,3 мкмоль) в безводном DMF (0,1 мл) добавляли раствор 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексаноата (1,5 экв., 3,47 мг, 11,3 мкмоль) в безводном DMF (0,1 мл). Смесь перемешивали при 21°C в течение 1 часа и затем добавляли **R7d** (1 экв., 6,8 мг, 7,5 мкмоль) в DMSO (0,1 мл). Получали ТНРТА-Сu(II) комплекс путем смешивания трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амина (0,5 экв., 0,1 М в DMF, 37,5 мкл, 3,75 мкмоль) и сульфата меди пентагидрата (0,5 экв., 0,1 М в H<sub>2</sub>O, 37,5 мкл, 3,75 мкмоль) и инкубации при 21°C в течение 1 минуты. ТНРТА-Сu(II) комплекс (0,5 экв., 0,05 М в DMF/H<sub>2</sub>O 50/50, 75 мкл, 3,75 мкмоль) добавляли к реакционной смеси с последующим добавлением аскорбата натрия (2,5 экв., 0,5 М в H<sub>2</sub>O, 37,5 мкл, 18,75 мкмоль). Полученную смесь инкубировали при 21°C в течение 15 мин и очищали препаративной ВЭЖХ (Метод 1) с получением **R7** (6,95 мг, 4,28 мкмоль, 57%) в виде белого твердого вещества.

**ВЭЖХ (Метод 2) RT:** 3,92 мин

**MS (Метод 3) m/z:** 813,9 [M+2H]<sup>2+</sup>/2

**Соединение S7**



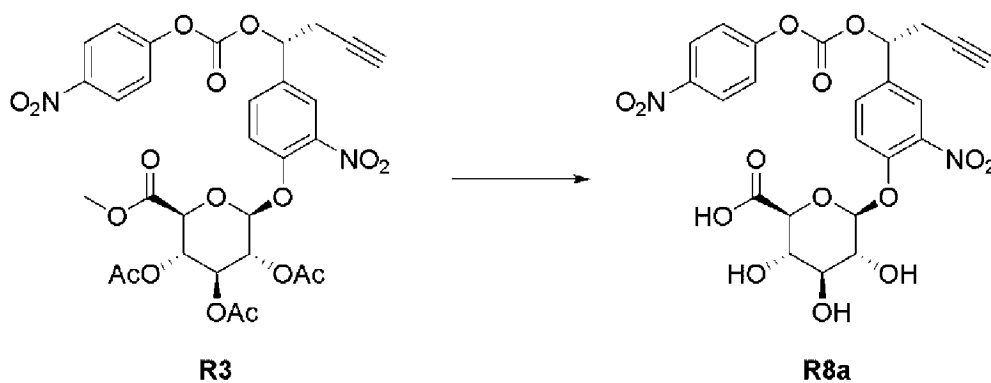
К раствору 32-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-декаоксадотриаконтан-1-амина (1,5 экв., 5,92 мг, 11,3 мкмоль) в безводном DMF (0,1 мл) добавляли раствор 2,5-

диоксопирролидин-1-ил 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексаноата (1,5 экв., 3,47 мг, 11,3 мкмоль) в безводном DMF (0,1 мл). Смесь перемешивали при 21°C в течение 1 часа и затем добавляли **S7d** (1 экв., 6,8 мг, 7,5 мкмоль) в DMSO (0,1 мл). Получали ТНРТА-Сu(II) комплекс путем смешивания трис(3-гидроксипропилтриазилилметил)амин (0,5 экв., 0,1 М в DMF, 37,5 мкл, 3,75 мкмоль) и сульфата меди пентагидрата (0,5 экв., 0,1 М в H<sub>2</sub>O, 37,5 мкл, 3,75 мкмоль) и инкубации при 21°C в течение 1 минуты. ТНРТА-Сu(II) комплекс (0,5 экв., 0,05 М в DMF/H<sub>2</sub>O 50/50, 75 мкл, 3,75 мкмоль) добавляли к реакционной смеси с последующим добавлением аскорбата натрия (2,5 экв., 0,5 М в H<sub>2</sub>O, 37,5 мкл, 18,75 мкмоль). Полученную смесь инкубировали при 21°C в течение 15 мин и очищали препаративной ВЭЖХ (Метод 1) с получением **S7** (7,44 мг, 4,58 мкмоль, 61%) в виде белого твердого вещества.

**ВЭЖХ (Метод 2) RT:** 3,95 мин

**MS (Метод 3) m/z:** 813,9 [M+2H]<sup>2+</sup>/2

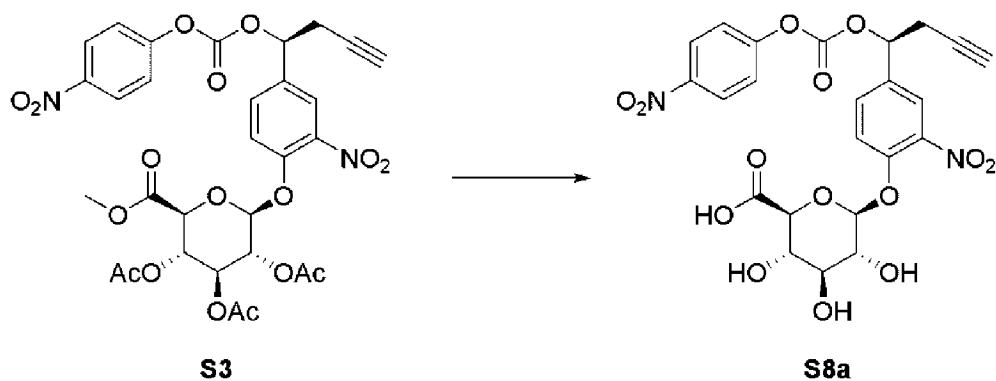
**Соединение R8a**



К раствору **R3** (1 экв., 317 мг, 0,46 ммоль) в ацетонитриле (2 мл) добавляли концентрированную HCl (52,2 экв., 2 мл, 24 ммоль) и смесь перемешивали при 37°C в течение 16ч. К полученной смеси добавляли EtOAc (8 мл) с последующим добавлением воды (8 мл). Органический слой отделяли и водный слой экстрагировали три раза EtOAc. Объединенный органический слой сушили над MgSO<sub>4</sub> и концентрировали в вакууме с получением неочищенного **R8a** (250 мг, 0,46 ммоль, 99%), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

**MS (Метод 3) m/z:** 549,1 [M+H]<sup>+</sup>

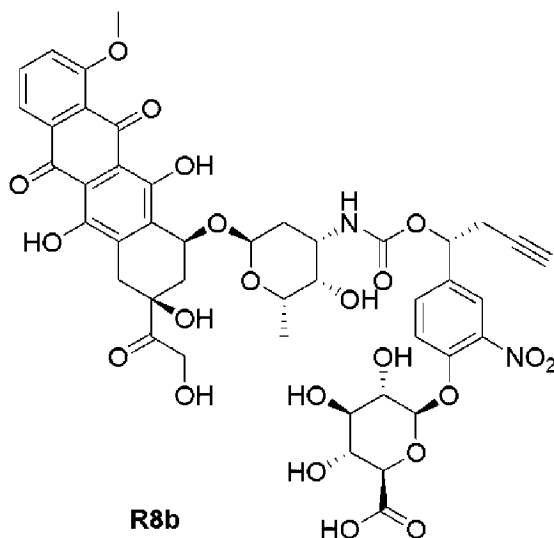
**Соединение S8a**



К раствору **S3** (1 экв., 317 мг, 0,46 ммоль) в ацетонитриле (2 мл) добавляли концентрированную HCl (52,2 экв., 2 мл, 24 ммоль) и смесь перемешивали при 37°C в течение 16ч. К полученной смеси добавляли EtOAc (8 мл) с последующим добавлением воды (8 мл). Органический слой отделяли и водный слой экстрагировали три раза EtOAc. Объединенный органический слой сушили над MgSO<sub>4</sub> и концентрировали в вакууме с получением неочищенного **S8a** (247 мг, 0,45 ммоль, 98%), который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

**MS (Метод 3) m/z:** 549,1 [M+H]<sup>+</sup>

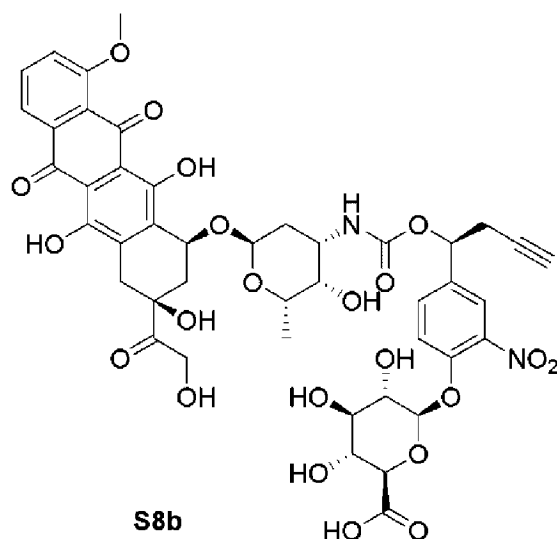
#### Соединение R8b



К раствору доксорубина гидрохлорида (1 экв., 10 мг, 0,017 ммоль) в DMF (0,35 мл) добавляли раствор TEA (2 экв., 0,35 мл, 0,1 М в DMF, 0,035 ммоль) с последующим добавлением **R8a** (1 экв., 9,5 мг, 0,017 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 16ч и очищали препаративной ВЭЖХ (Метод 1) с получением **R8b** (12,2 мг, 0,013 ммоль, 74%) в виде красного твердого вещества.

**MS (Метод 3) m/z:** 953,3 [M+H]<sup>+</sup>

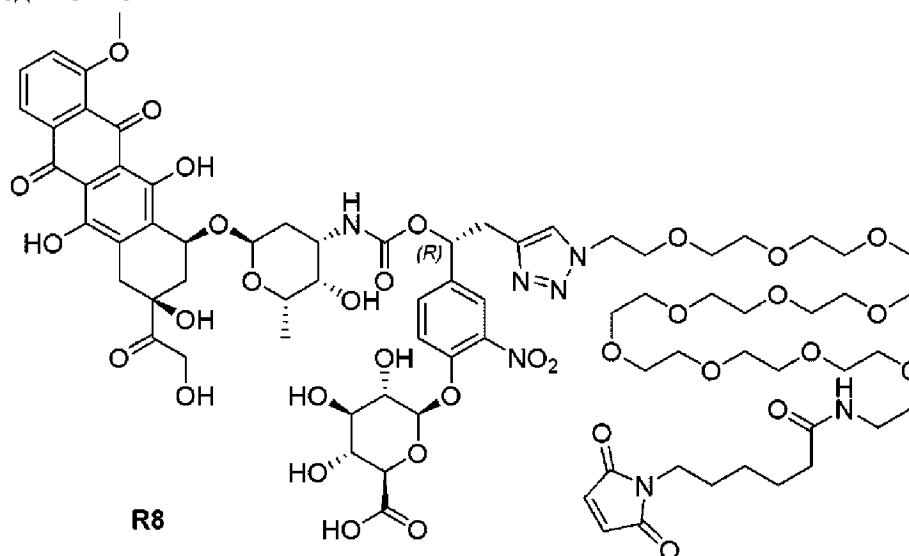
#### Соединение S8b



К раствору доксорубина гидрохлорида (1 экв., 10 мг, 0,017 ммоль) в DMF (0,35 мл) добавляли раствор TEA (2 экв., 0,35 мл, 0,1 М в DMF, 0,035 ммоль) с последующим добавлением **S8a** (1 экв., 9,5 мг, 0,017 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 16ч и очищали препаративной ВЭЖХ (Метод 1) с получением **S8b** (13,2 мг, 0,014 ммоль, 80%) в виде красного твердого вещества.

**MS (Метод 3) m/z:** 953,3 [M+H]<sup>+</sup>

#### Соединение R8



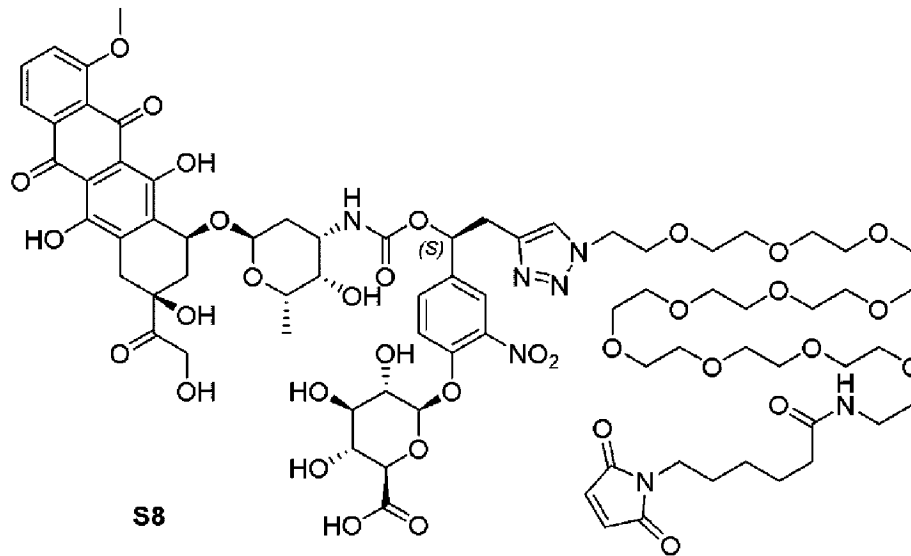
К раствору 32-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-декаоксадотриаконтан-1-амина (1,5 экв., 11,82 мг, 22,45 мкмоль) в безводном DMF (0,2 мл) добавляли раствор 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексаноата (1,5 экв., 6,92 мг, 22,45 мкмоль) в безводном DMF (0,2 мл). Смесь перемешивали при 21°C в течение 1 часа и затем добавляли **R8b** (1 экв., 12 мг, 14,97 мкмоль) в DMSO (0,2 мл). Получали ТНРТА-Сu(II) комплекс путем смешивания трис(3-гидроксипропилтриазилилметил)амина (1 экв., 0,1 М в DMF, 150 мкл, 14,97 мкмоль) и сульфата меди пентагидрата (1 экв., 0,1 М в H<sub>2</sub>O, 150 мкл, 14,97 мкмоль) и инкубации при 21°C в течение 1 минуты. ТНРТА-Сu(II) комплекс (1 экв., 0,05 М в DMF/H<sub>2</sub>O 50/50, 300

мкл, 14,97 мкмоль) добавляли к реакционной смеси с последующим добавлением аскорбата натрия (2 экв., 0,5 М в H<sub>2</sub>O, 60 мкл, 29,94 мкмоль). Полученную смесь инкубировали при 21°C в течение 15 мин и очищали препаративной ВЭЖХ (Метод 1) с получением **R8** (14,35 мг, 9,43 мкмоль, 63%) в виде красного твердого вещества.

**ВЭЖХ (Метод 2) RT:** 3,70 мин

**MS (Метод 3) m/z:** 836,9 [M+2H]<sup>2+</sup>/2

**Соединение S8**



**Химическая формула:** C<sub>76</sub>H<sub>101</sub>N<sub>7</sub>O<sub>35</sub>

**Точная масса:** 1671,63

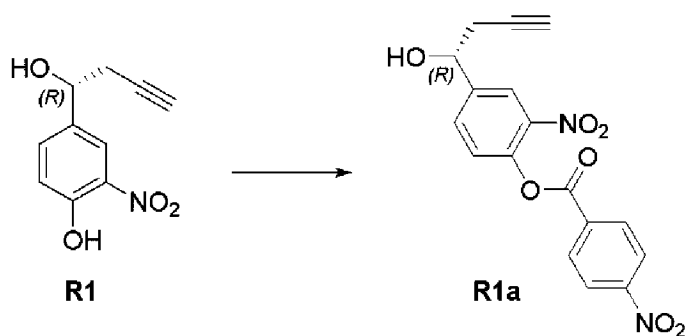
К раствору 32-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-декаоксадотриаконтан-1-амина (1,5 экв., 11,82 мг, 22,45 мкмоль) в безводном DMF (0,2 мл) добавляли раствор 2,5-диоксопирролидин-1-ил 6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексаноата (1,5 экв., 6,92 мг, 22,45 мкмоль) в безводном DMF (0,2 мл). Смесь перемешивали при 21°C в течение 1 часа и затем добавляли **S8b** (1 экв., 12 мг, 14,97 мкмоль) в DMSO (0,2 мл). Получали ТНРТА-Сu(II) комплекс путем смешивания трис(3-гидроксипропилтриазилилметил)амина (1 экв., 0,1 М в DMF, 150 мкл, 14,97 мкмоль) и сульфата меди пентагидрата (1 экв., 0,1 М в H<sub>2</sub>O, 150 мкл, 14,97 мкмоль) и инкубации при 21°C в течение 1 минуты. ТНРТА-Сu(II) комплекс (1 экв., 0,05 М в DMF/H<sub>2</sub>O 50/50, 300 мкл, 14,97 мкмоль) добавляли к реакционной смеси с последующим добавлением аскорбата натрия (2 экв., 0,5 М в H<sub>2</sub>O, 60 мкл, 29,94 мкмоль). Полученную смесь инкубировали при 21°C в течение 15 мин и очищали препаративной ВЭЖХ (Метод 1) с получением **S8** (15,5 мг, 10,18 мкмоль, 68%) в виде красного твердого вещества.

**ВЭЖХ (Метод 2) RT:** 3,65 мин

**MS (Метод 3) m/z:** 836,9 [M+2H]<sup>2+</sup>/2

**Определение абсолютной конфигурации R1 посредством R1a с использованием рентгеновской кристаллографии**

1) *Получение R1a*



Для определения абсолютной конфигурации **R1** осуществляли синтез сложного эфира **R1a**, его кристаллизацию и анализ методом рентгеновской кристаллографии. К охлажденному до 0°C раствору **R1** (1 экв., 111 мг, 0,536 ммоль) и триэтиламина (2 экв., 108 мг, 0,149 мл, 1,07 ммоль) в THF (3,61 мл) добавляли по каплям раствор 4-нитробензоилхлорида (1,5 экв., 149 мг, 0,804 ммоль) в THF (3,61 мл). Полученный раствор нагревали до комнатной температуры и оставляли на 30 минут. Добавляли этилацетат (22 мл) с последующим добавлением 7 мл воды. Органический слой отделяли и промывали насыщенным раствором NaCl. Органический слой упаривали и остаток очищали флэш-хроматографией (циклогексан/EtOAc градиент 0-100% EtOAc за 20 минут; 30 колоночных объемов) с получением **R1a** (60,5 мг, 0,17 ммоль, 88% выход).

2) *Определение абсолютной конфигурации **R1a** методом рентгеновской кристаллографии*

**R1a** (60 мг) растворяли в 3 мл дихлорметана и разбавляли 3 мл гептана. Смесь оставляли для медленного упаривания в течение 2 недель, индуцируя образование кристаллов **R1a**. Кристаллы помещали в масло и отбирали бесцветный пластинчатый монокристалл, имеющий размер 0,50 × 0,40 × 0,18 мм, закрепляли на стекловолкне и помещали в низкотемпературный поток N<sub>2</sub>. Сбор данных рентгено-структурного анализа осуществляли на Bruker APEX II DUO Карра-CCD дифрактометре, снабженном устройством с жидким N<sub>2</sub> Oxford Cryosystem, используя Cu-Kα излучение ( $\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$ ). Расстояние кристалл-детектор составляло 40 мм. Параметры ячейки определяли (программа APEX3) по отражениям, взятым из трех наборов по 20 кадров, каждый при экспозиции 10 сек. Структуру определяли с использованием программы SHELXT-2014. Уточнение и все дальнейшие расчеты осуществляли с использованием SHELXL-2014. Положение атома водорода одной OH группы находили по разности Фурье. Остальные H-атомы были включены в расчетные позиции и рассматривались как движущиеся атомы с использованием параметров SHELXL по умолчанию. Не-H атомы были уточнены анизотропно с использованием взвешенного полноматричного метода наименьших квадратов на F<sup>2</sup>. Применяли полуэмпирическую поправку на поглощение с использованием SADABS в APEX3; коэффициенты пропускания: T<sub>min</sub>/T<sub>max</sub>=0,6111/0,7528.

Результаты рентгеноструктурного анализа представлены на Фиг. 1.

**Измерение кинетики  $\beta$ -глюкуронидаза-индуцированного высвобождения ММАЕ**

- Раствор образца R изомера получали путем добавления 10 мкл **R5** (10 мМ в DMSO) к 990 мкл плазмы человека и инкубации при 37°C в течение 20 мин.
- Раствор образца S изомера получали путем добавления 10 мкл **S5** (10 мМ в DMSO) к 990 мкл плазмы человека и инкубации при 37°C в течение 20 мин.
- Гасящий раствор (**Q**) получали путем добавления 50 мкл 1 М водного раствора HCl к 1,5 мл ацетонитрила.
- Раствор β-глюкуронидазы (**Glu**) получали путем добавления 20 мкл водно-глицеринового раствора β-глюкуронидазы из *Escherichia coli* (6,5 мг/мл) к 180 мкл H<sub>2</sub>O.
- Референсный раствор (**Ref**) получали путем добавления 10 мкл **MMAE** (10 мМ в DMSO) к 990 мкл плазмы человека и инкубации при 37°C в течение 20 мин.

К 1 мл каждого раствора изомера и референсного раствора добавляли 40,9 мкл **Glu**. Полученные смеси инкубировали при 37°C. 45 мкл аликвоты каждого раствора гасили при помощи 155 мкл **Q** в следующих временных точках: 1 мин, 2 мин, 3 мин, 4 мин, 5 мин, 6 мин и 7 мин. Гашеные аликвоты центрифугировали при 15000 g в течение 5 мин и супернатант анализировали методом ЖХМС (Метод 3) с селективным детектированием ионов, установленным на 719 Да (соответствует [MMAE+H]<sup>+</sup>). Количество высвобожденного MMAE в каждой временной точке рассчитывали как (площадь пика образца)/(площадь референсного пика) × 100% (Фиг. 2).

#### **Общая процедура для измерения кинетики β-глюкуронидаза-индуцированного высвобождения цитотоксического лекарственного средства**

- Растворы образцов R изомеров получали путем добавления 5 мкл соединений **R6**, **R7** или **R8** (10 мМ в DMSO) к 500 мкл 50/50 смеси плазмы человека и калий-фосфатного буфера (0,1М, pH 7,0) и инкубации при 37°C в течение 20 мин.
- Растворы образцов S изомеров получали путем добавления 5 мкл соединений **S6**, **S7** или **S8** (10 мМ в DMSO) к 500 мкл 50/50 смеси плазмы человека и калий-фосфатного буфера (0,1М, pH 7,0) и инкубации при 37°C в течение 20 мин.
- Гасящий раствор (**Q**) получали путем добавления 50 мкл 1 М водного раствора HCl к 1,5 мл ацетонитрила.
- Раствор β-глюкуронидазы (**Glu**) получали путем добавления 20 мкл водно-глицеринового раствора β-глюкуронидазы из *Escherichia coli* (6,5 мг/мл) к 180 мкл H<sub>2</sub>O.
- Референсный раствор (**Ref**) получали путем добавления 5 мкл соответствующего свободного цитотоксического лекарственного средства (10 мМ в DMSO) к 500 мкл 50/50 смеси плазмы человека и калий-фосфатного буфера (0,1М, pH 7,0) и инкубации при 37°C в течение 20 мин.

К каждому раствору образца и референсному раствору добавляли 10 мкл **Glu**. Полученные смеси инкубировали при 25°C. 45 мкл аликвоты каждого раствора гасили при помощи 155 мкл **Q** в конкретных временных точках, указанных на графиках (Фиг. 3-5). Гашеные аликвоты центрифугировали при 15000 g в течение 5 мин и супернатант анализировали методом ЖХМС (Метод 3) с селективным детектированием ионов, установленным на [M+H]<sup>+</sup>, где M соответствует молекулярной массе свободного

цитотоксического средства. Количество высвобожденного цитотоксического средства в каждой временной точке рассчитывали как (площадь пика образца)/(площадь референсного пика)  $\times$  100%.

Результаты проиллюстрированы на Фиг. 2-5:

Фиг. 2. Кинетика  $\beta$ -глюкуронидаза-индуцированного высвобождения ММАЕ в содержащих плазму растворах **R5** и **S5** демонстрирует значительно более быстрое расщепление плазма-связанного **R5** по сравнению с **S5** : после 7 минут инкубации 24% ММАЕ было высвобождено из плазма-связанного **R5** и только 12% из плазма-связанного **S5**.

Фиг. 3. Кинетика  $\beta$ -глюкуронидаза-индуцированного высвобождения ММАФ в содержащих плазму растворах **R6** и **S6** демонстрирует значительно более быстрое расщепление плазма-связанного **R6** по сравнению с **S6** : после 40 минут инкубации 86% ММАФ было высвобождено из плазма-связанного **R6** и только 57% из плазма-связанного **S6**.

Фиг. 4. Кинетика  $\beta$ -глюкуронидаза-индуцированного высвобождения SN-38 в содержащих плазму растворах **R7** и **S7** демонстрирует более быстрое расщепление плазма-связанного **R7** по сравнению с **S7** : после 40 минут инкубации 24% SN-38 было высвобождено из плазма-связанного **R7** и только 18% из плазма-связанного **S7**.

Фиг. 5. Кинетика  $\beta$ -глюкуронидаза-индуцированного высвобождения Доксорубина в содержащих плазму растворах **R8** и **S8** демонстрирует более быстрое расщепление плазма-связанного **R8** по сравнению с **S8** : после 40 минут инкубации 99% Доксорубина было высвобождено из плазма-связанного **R8** и 80% из плазма-связанного **S8**.

#### Измерение стабильности **R5** и **S5** в водном буфере при pH 7,4

- Раствор образца **R5-PBS** получали путем добавления 20 мкл **R5** (10 мМ в DMSO) к 180 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (pH 7,4).

- Раствор образца **S5-PBS** получали путем добавления 20 мкл **S5** (10 мМ в DMSO) к 180 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (pH 7,4).

- Образцы инкубировали при 25°C и анализировали методом ЖХМС (Метод 3) с селективным детектированием ионов, установленным на 924 Да (соответствует  $[R5+2H]^{2+}/2$  и  $[S5+2H]^{2+}/2$ ) и на 933 Да (основная образующая примесь, соответствующая гидролизованным продуктам  $[R5+H_2O+2H]^{2+}/2$  и  $[S5+H_2O+2H]^{2+}/2$ ). Образцы инжестрировали в следующих временных точках: 0 мин, 99 мин, 195 мин, 291 мин, 387 мин, 543 мин, 699 мин, 855 мин, 980 мин. Площади пиков образцов, инжестрированных при 0 мин, считались площадями референсных пиков.

- % Площади пика рассчитывали как (площадь пика 924 Да)/((площадь пика 924 Да) + (площадь пика 933 Да))  $\times$  100%.

Результаты проиллюстрированы на Фиг. 6. Для обоих образцов медленный гидролиз соединения (**R5** или **S5**) наблюдали при pH 7,4: 30-40% соединения гидролизовано через 1000 мин.



Такой же эксперимент осуществляли в фосфатно-солевом буферном растворе при рН 6,0. Никакого разложения **R5** или **S5** не наблюдали в этих условиях ни в какой временной точке.

#### **Кинетика связывания R5 и S5 с белками плазмы**

- Гасящий раствор (**Q**) получали путем добавления 50 мкл 1 М водного раствора HCl к 1,5 мл ацетонитрила.
- Раствор образца **R-Alb** получали путем добавления 10 мкл **R5** (10 мМ в DMSO) к 990 мкл плазмы человека и инкубации при 37°C.
- Раствор образца **S-Alb** получали путем добавления 10 мкл **S5** (10 мМ в DMSO) к 990 мкл плазмы человека и инкубации при 37°C.
- 45 мкл аликвоты каждого раствора образца добавляли к 155 мкл гасящего раствора в следующих временных точках: 0 мин, 1 мин, 2 мин, 3 мин, 4 мин, 5 мин, 6 мин, 7 мин.
- Гашеные аликвоты центрифугировали при 15000 g в течение 5 мин и супернатант анализировали методом ЖХМС (Метод 3) с селективным детектированием ионов, установленным на 924 Да (соответствует  $[R5+2H]^{2+}/2$  и  $[S5+2H]^{2+}/2$ ). Площади пиков аликвот, гашеных при 0 мин, считались площадями референсных пиков.
- % оставшегося свободного лекарственного средства в каждой временной точке рассчитывали как (площадь пика образца)/(площадь референсного пика)  $\times$  100%.

Оба соединения **R5** и **S5** быстро вступали в реакцию связывания с сывороточным альбумином, что приводило к резкому снижению концентрации их свободной формы, как показано на Фиг. 7. После 2 минут инкубации около 90% **S5** или **R5** было связано с сывороточным альбумином, и полная конверсия достигалась через 4 минуты.

#### **Стабильность в плазме альбумин-связанного R5 и S5**

- Раствор образца **R5-Alb** получали путем добавления 10 мкл **R5** (10 мМ в DMSO) к 990 мкл плазмы человека.
- Раствор образца **S5-Alb** получали путем добавления 10 мкл **S5** (10 мМ в DMSO) к 990 мкл плазмы человека.
- Гасящий раствор (**Q**) получали путем добавления 50 мкл 1 М водного раствора HCl к 1,5 мл ацетонитрила.
- Референсный раствор (**Ref**) получали путем добавления 10 мкл MMAE (10 мМ в DMSO) к 990 мкл плазмы человека.
- Растворы образцов и референсный раствор инкубировали при 37°C
- 45 мкл аликвоты каждого раствора образца добавляли к 155 мкл гасящего раствора в следующих временных точках: 0 ч, 8 ч, 24 ч, 48 ч, 102 ч, 192 ч.
- Гашеные аликвоты центрифугировали при 15000 g в течение 5 мин и супернатант анализировали методом ЖХМС (Метод 3) с селективным детектированием ионов, установленным на 719 Да (соответствует  $[MMAE+H]^+$ ).
- % Высвобожденного MMAE в каждой временной точке рассчитывали как (площадь пика образца)/(площадь референсного пика)  $\times$  100%.

Как показано на Фиг. 8, альбумин-связанные **R5** и **S5** остаются стабильными в плазме, поскольку только следовые количества цитотоксического лекарственного средства (ММАЕ) высвобождались при длительной инкубации (меньше чем 10% после 192 часов, т.е. 8 дней, инкубации).

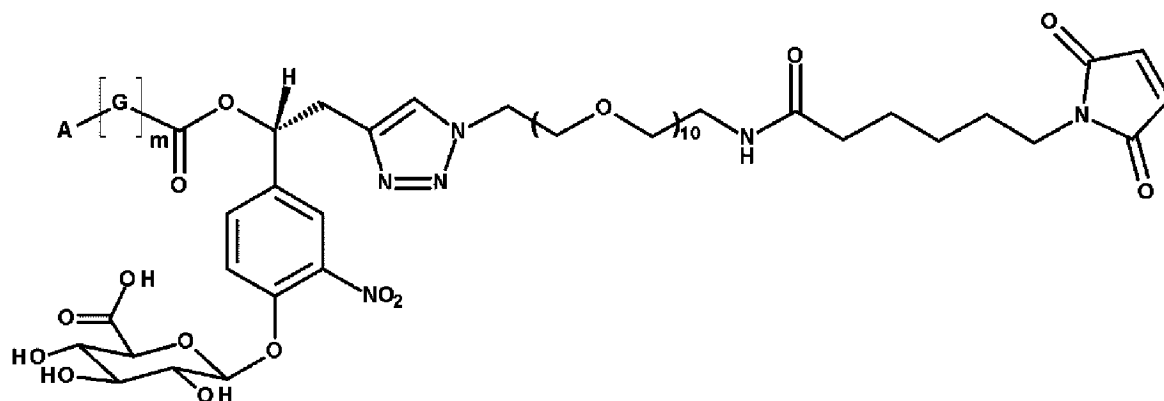
#### **Испытания на разделение**

Испытание, нацеленное на разделение соединений R5 и S5 в смеси 1:1, осуществляли с использованием ВЭЖХ в соответствии с Методом 2, но оно оказалось неудачным: как показано на Фиг. 9, были получены очень близкие RT значения 6,72 и 6,83 минут.

Подобное испытание осуществляли с смесью 1:1 R4 и S4, но разделение также оказалось неудачным, поскольку были получены RT значения 7,56 и 7,72 минут (Фиг. 10).

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, представленный формулой (I)



(I),

где

A представляет собой радикал, производный от цитотоксического лекарственного средства,

G представляет собой саморасщепляющийся фрагмент, и

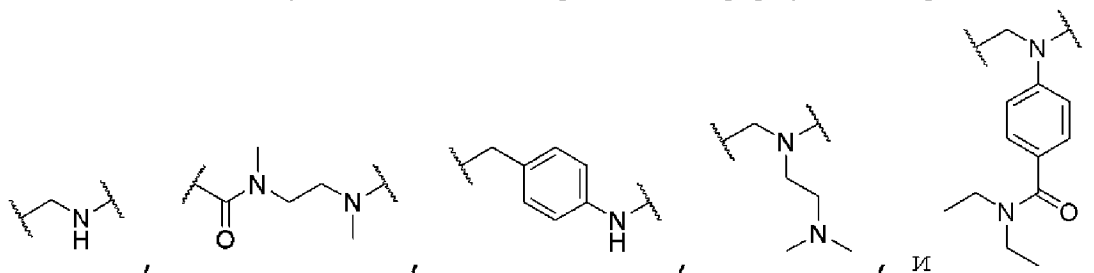
m имеет значение 0 или 1,

и его фармацевтически приемлемые соли.

2. Конъюгат по п. 1, где цитотоксическое лекарственное средство выбрано из антрациклинов, таких как доксорубин, доластатинов, таких как доластин 10, доластин 15, ауристин E, ауристин EB (AEB), ауристин EFP (AEFP), метил ауристин F (MMAF), метил ауристин D (MMAD), метил ауристин E (MMAE), AE-эфир 5-бензоилвалериановой кислоты (AEVB), или их производных и аналогов камптотецина, таких как SN-38.

3. Конъюгат по п. 2, где цитотоксическое лекарственное средство выбрано из группы, состоящей из SN-38, доксорубина, MMAF, MMAE, MMAD и их производных.

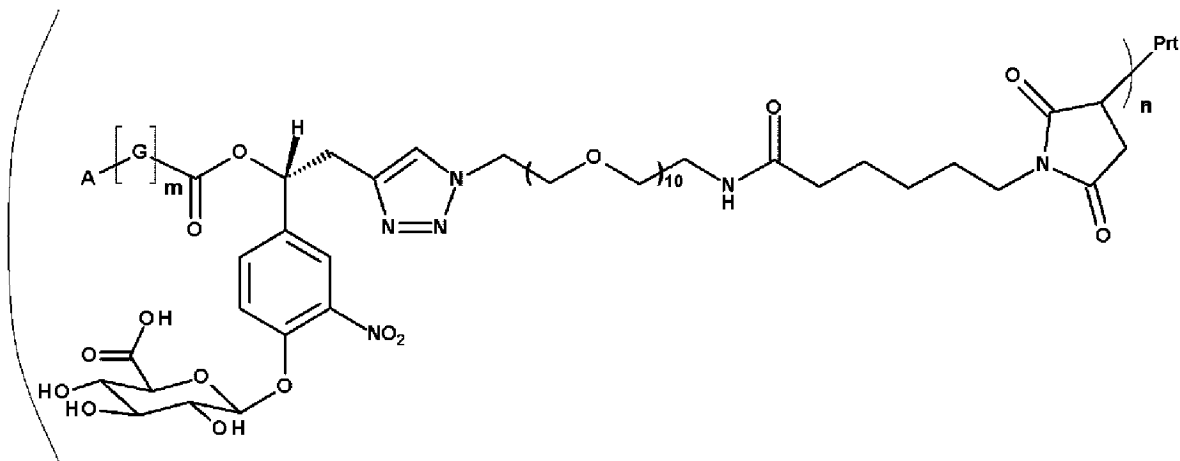
4. Конъюгат по любому из пп. 1-3, где G представлен формулой, выбранной из:



5. Пролекарство, включающее по меньшей мере одну молекулу конъюгата по любому из пп. 1-4, при этом указанная молекула конъюгата связана через ковалентную связь с молекулой белка, предпочтительно альбумина, или его фрагментом или производным.

6. Пролекарство по п. 5, где ковалентная связь установлена с тиольной функциональной группой цистеина в положении 34 альбумина.

7. Пролекарство по п. 5, представленное формулой (II),



(II),

где А представляет собой радикал, производный от цитотоксического лекарственного средства,

Prt представляет собой радикал, производный от белка,

n имеет значение между 0,1 и 16, предпочтительно между 0,1 и 8,

G представляет собой саморасщепляющийся фрагмент, и

m имеет значение 0 или 1,

и его фармацевтически приемлемые соли.

8. Пролекарство по п. 7, где Prt представляет собой радикал, производный от альбумина, и n имеет значение 1.

9. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере эффективное количество по меньшей мере одного конъюгата по любому из пп. 1-4 или по меньшей мере одного пролекарства по любому из пп. 5-8 и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Конъюгат по любому из пп. 1-4 для применения в лечении рака и/или воспалительного заболевания.

11. Пролекарство по любому из пп. 5-8 для применения в лечении рака и/или воспалительного заболевания.

12. Фармацевтическая композиция по п. 9 для применения в лечении рака и/или воспалительного заболевания.

13. Способ получения конъюгата по любому из пп. 1-4, включающий следующие стадии:

а) получение рас-4-(1-гидроксIBUT-3-ин-1-ил)-2-нитрофенола из 4-гидрокси-3-нитробензальдегида;

б) разделение и выделение (R)-4-(1-гидроксIBUT-3-ин-1-ил)-2-нитрофенола, предпочтительно хиральной высокоэффективной жидкостной хроматографией;

с) взаимодействие (R)-4-(1-гидроксIBUT-3-ин-1-ил)-2-нитрофенола с производным глюкуроновой кислоты, таким как метилацетобром- $\alpha$ -D-глюкуронат, в основных условиях;

д) взаимодействие соединения, полученного на стадии (с) с 4-

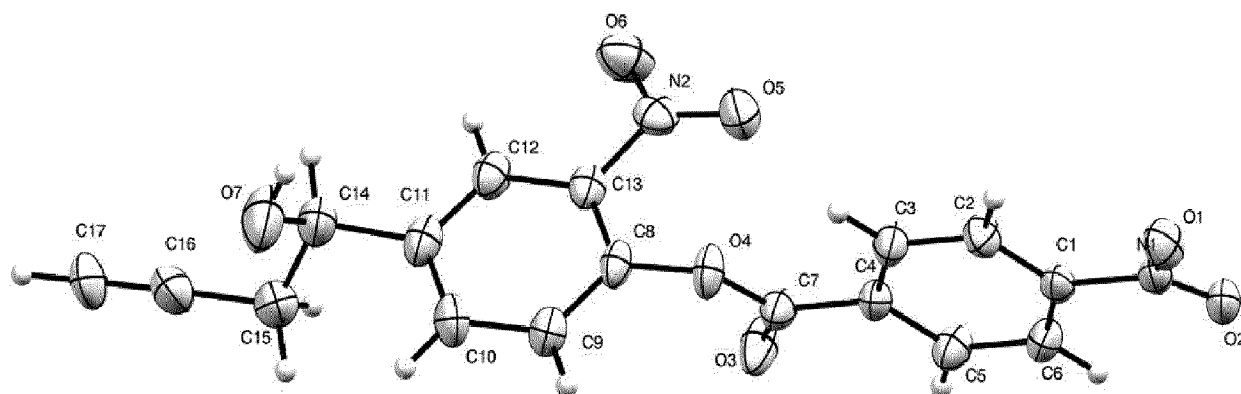
нитрофенилхлорформиатом;

е) связывание соединения, полученного на стадии (d), с цитотоксическим лекарственным средством или с А-Г-Н фрагментом, в котором А представляет собой радикал, производный от цитотоксического лекарственного средства, и G представляет собой саморасщепляющийся фрагмент;

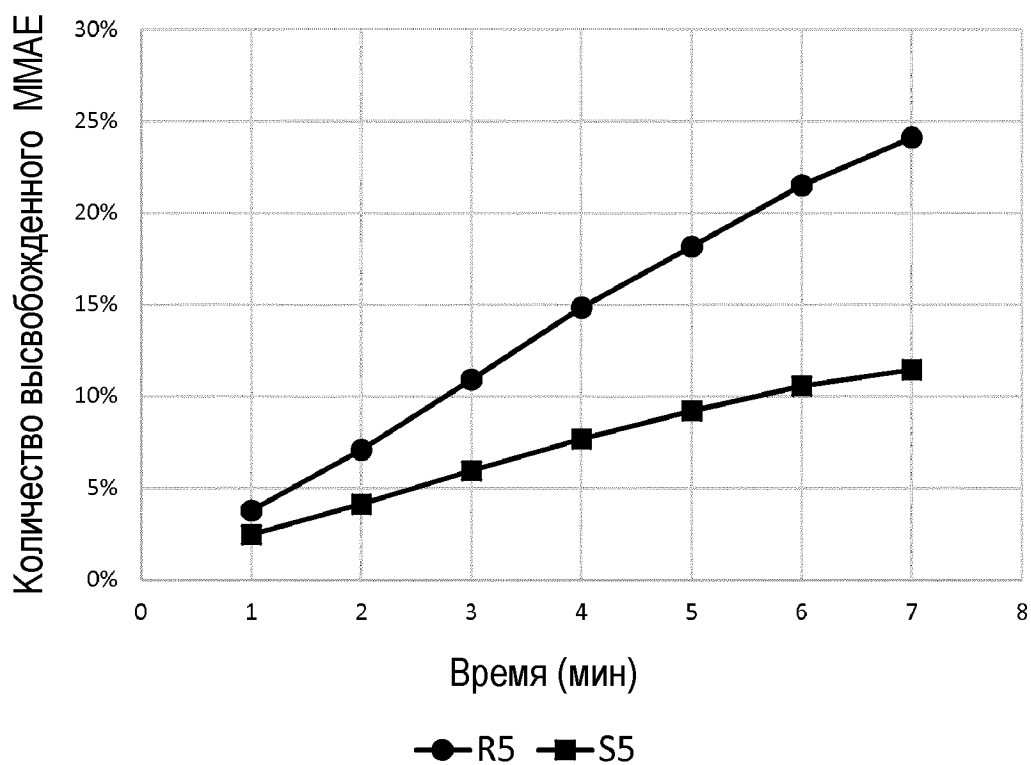
f) удаление защиты глюкуронидного фрагмента соединения, полученного на стадии (e), предпочтительно в основных условиях; и

g) связывание соединения, полученного на стадии (f), с азидом формулы  $N_3-(CH_2-CH_2-O)_{10}-(CH_2)_2-NH-(CO)-(CH_2)_5-X$ , где X представляет собой малеимидную группу.

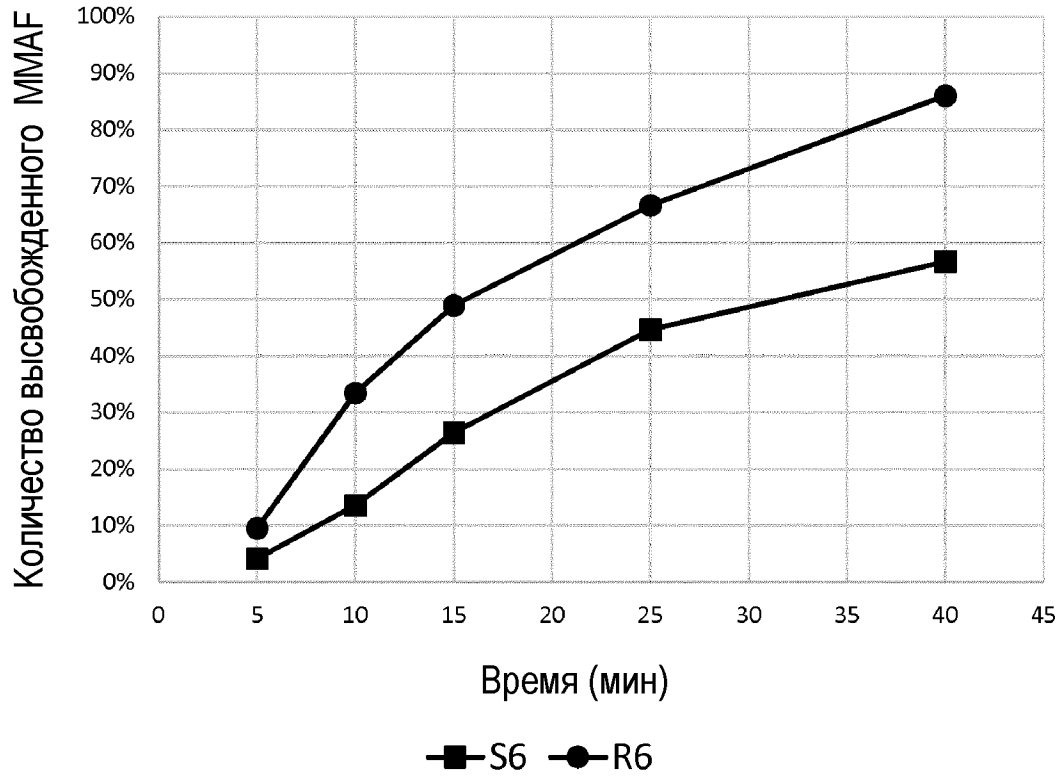
ФИГ.1



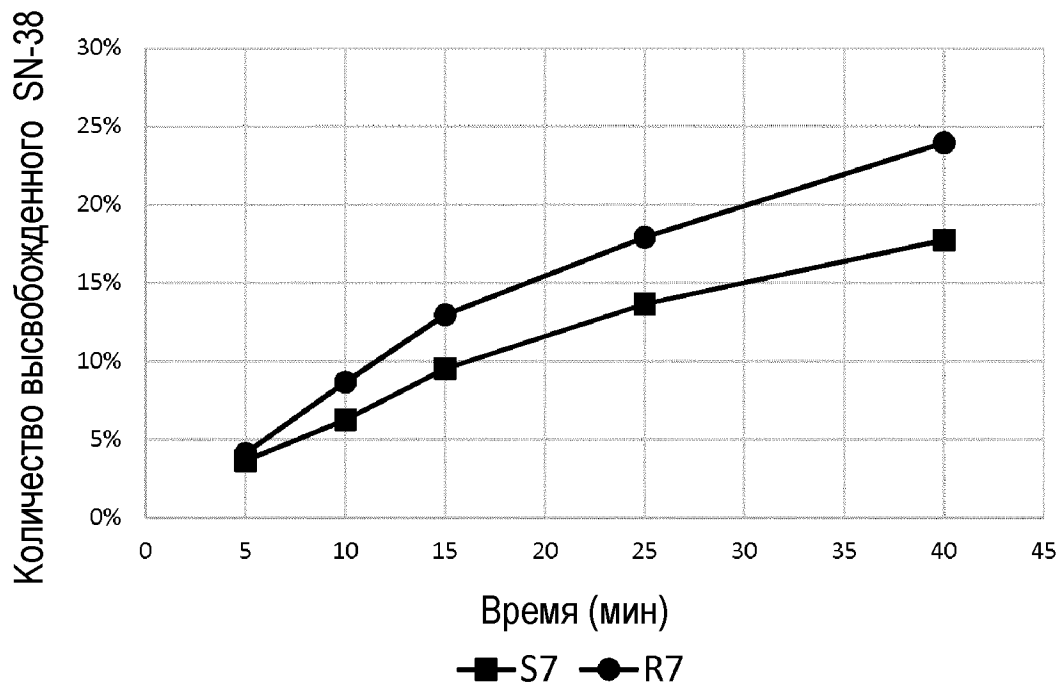
ФИГ.2



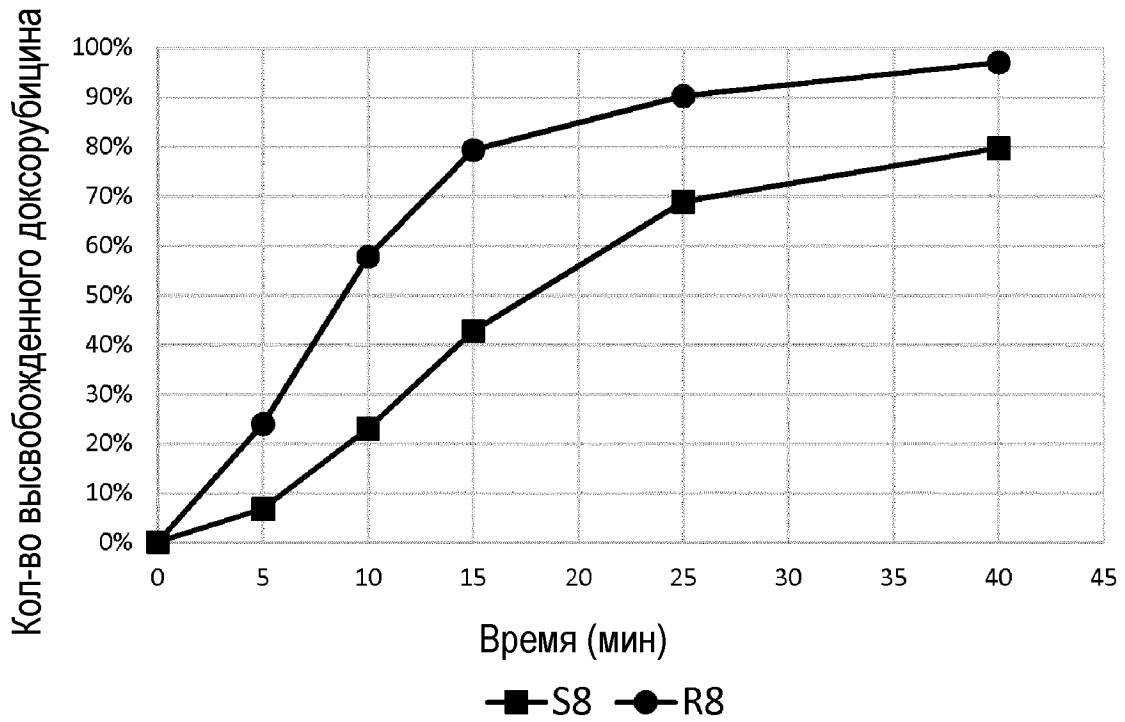
ФИГ.3



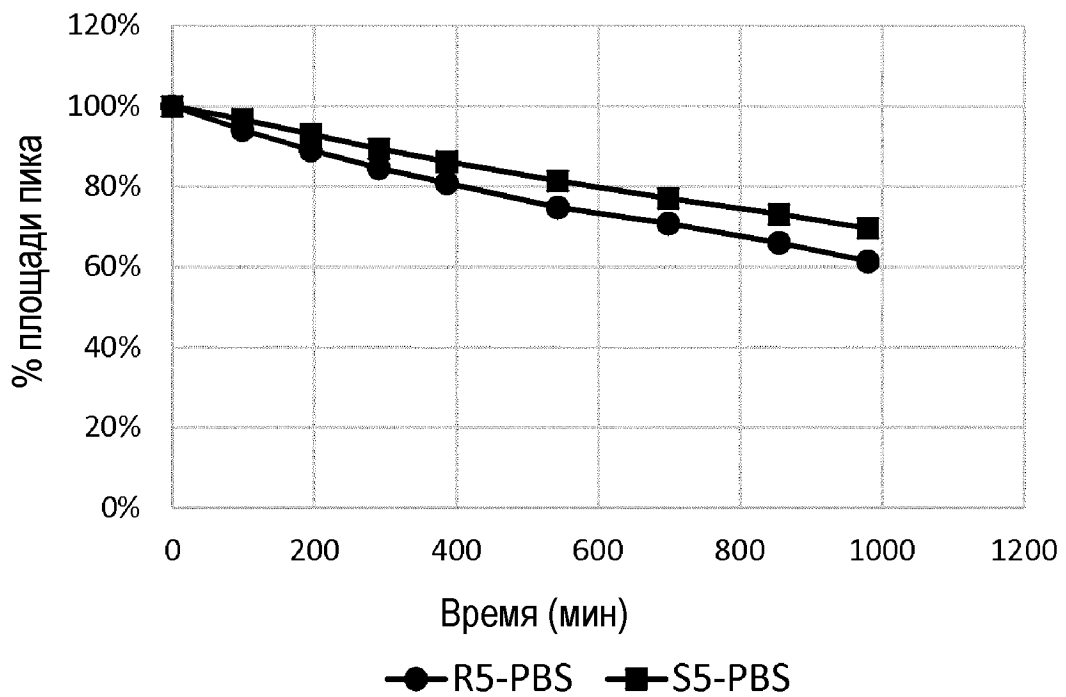
ФИГ.4



ФИГ.5

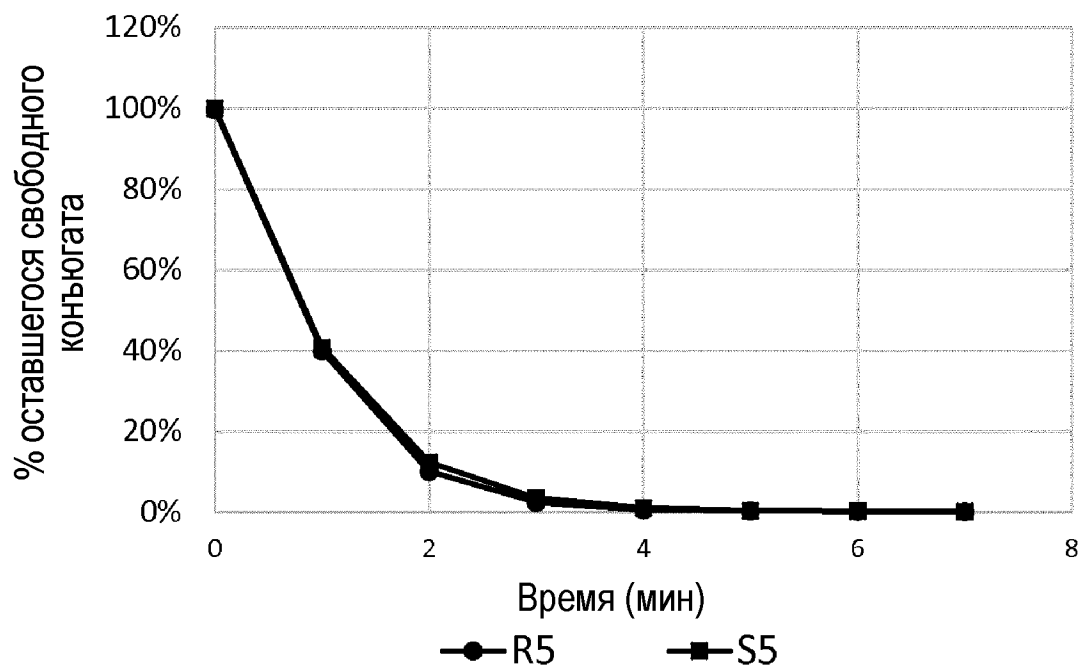


ФИГ.6

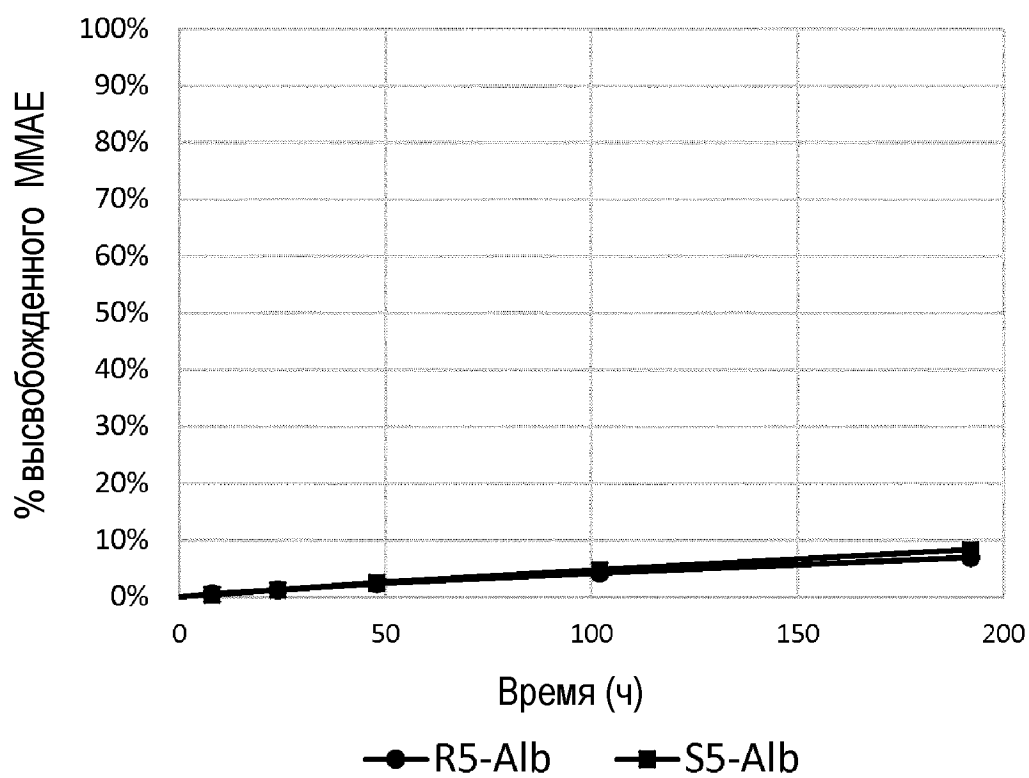




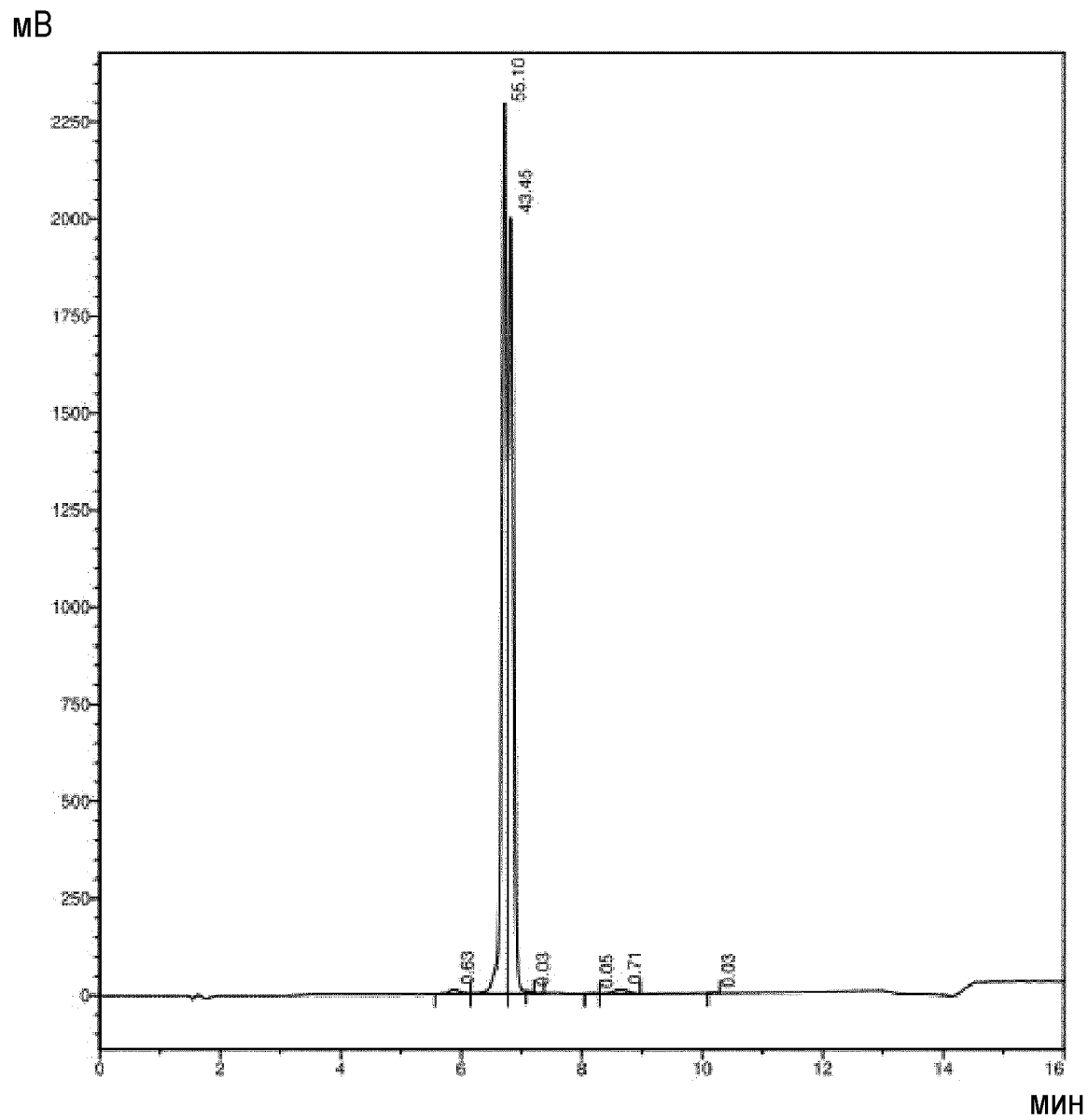
ФИГ.9



ФИГ.8



ФИГ.9



## ФИГ.10

мВ

