

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **039794**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.03.15**

**(51)** Int. Cl. **A61K 47/48 (2006.01)**

**(21)** Номер заявки  
**201791024**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.12.03**

---

**(54) КОНЪЮГАТЫ БИОМОЛЕКУЛ**

---

**(31)** **62/087,369**

**(56)** WO-A1-2014065661  
WO-A2-2014134483

**(32)** **2014.12.04**

**(33)** **US**

**(43)** **2017.11.30**

**(86)** **PCT/US2015/063774**

**(87)** **WO 2016/090157 2016.06.09**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**СЕЛДЖИН КОРПОРЕЙШН (US)**

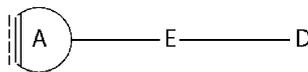
ERIK S. ZIMMERMAN ET AL.: "Production of Site-Specific Antibody-Drug Conjugates Using Optimized Non-Natural Amino Acids in a Cell-Free Expression System", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 25, no. 2, 17 January 2014 (2014-01-17), pages 351-361, XP055107336, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc400490z, the whole document and especially the abstract and figures 1 and 4

**(72)** Изобретатель:  
**Шварц Эрик, Д'агостино Лаура  
Акуллиан, Куэрво Эрнан, Остин  
Уэсли (US)**

**(74)** Представитель:  
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев  
А.В. (RU)**

---

**(57)** Изобретение относится к конъюгатам биомолекул формулы



формула I,

где А, Е и D являются такими, как определено в описании изобретения, которые содержат биомолекулу, где по меньшей мере одна аминокислота неприродного происхождения (NNAА) является встроенной в структуру биомолекулы и в которой NNAА представляет собой точку присоединения линкера, к которой присоединяется полезная нагрузка, в частности цитотоксическое средство. В частности, изобретение относится к конъюгатам клеточносвязывающих средств и продуктам активного высвобождения, состоящих из цитотоксических средств, где конъюгаты получены посредством реакции циклоприсоединения. Предусматриваются способы получения, фармацевтические композиции и способы применения.

**039794**  
**B1**

**039794**  
**B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявляется преимущество предварительной заявки на патент США с серийным номером 62/087369, поданной 4 декабря 2014 года.

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к конъюогатам биомолекул, которые содержат биомолекулу, в которой по меньшей мере одна аминокислота неприродного происхождения (NNAА) является встроенной в структуру биомолекулы и в которой NNAА представляет собой точку присоединения линкера, к которой присоединяется полезная нагрузка, в частности цитотоксическое средство. Данное изобретение дополнительно относится к конъюогатам клеточно-связывающих средств и цитотоксических средств, где конъюогаты получены посредством реакции циклоприсоединения. Предусматриваются способы получения, фармацевтические композиции и способы применения.

### Уровень техники изобретения

Терапевтические средства на основе антител нового поколения (NGA) с модификациями архитектуры антител представляют собой ключевую сферу научных исследований и разработок в области моноклональных антител (mAb). Основным направлением является онкология, где приблизительно 50% всего ассортимента разрабатываемых онкологических препаратов на основе mAb составляют NGA. Syed, B.A., et al., Next-Generation Antibodies, Nature Reviews Drug Discovery, 13:413 (2014).

Конъюогаты лекарственных средств на основе антител (ADC), наиболее показательные среди новых технологических платформ для антител, обычно содержат цитотоксическое средство, присоединенное к mAb посредством химических линкеров. Обладая способностью нацеленно доставлять химиотерапевтические средства напрямую в раковую ткань, ADC могут увеличивать клиническую эффективность mAb и позволяют использовать цитотоксины, которые являются слишком высокоактивными для системного применения. Первый продукт на основе ADC, гемтузумаб озогамидин (MYLOTARG®; Wyeth), калихеамицин-связанное CD33-специфичное mAb для лечения острого миелоидного лейкоза (AML), одобрили в 2000 году, однако, отозвали в 2010 году по соображениям безопасности. Появились новые платформы для разработки ADC, такие как платформа с использованием нацеленных антител в качестве полезной нагрузки (TAP; Seattle Genetics and ImmunoGen). В конце 2011 года брентуксимаб ведотин (ADCETRIS®; Seattle Genetics), CD30-специфичное mAb, присоединенное к антимиотическому средству монотетил ауристатину E (MMAE) для лечения неходжкинских лимфом (NHL), стал первым среди новых ADC, которые были одобрены Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA). Вторым был одобрен адо-трастузумаб-эмтанзин (KADCYLA®; Genentech/Roche) в начале 2013 года. Адо-трастузумаб-эмтанзин и mAb пертузумаб (PERJETA®; Roche (одобренный в 2012 году)) разрабатывали как расширение ассортимента для трастузумаба (HERCEPTIN®; Roche), нацеленного на HER2 (также известный как ERBB2), с разными механизмами действия; PERJETA® ингибирует HER2-HER3 димеризацию, при этом адо-трастузумаб-эмтанзин доставляет цитотоксическую полезную нагрузку к клеткам.

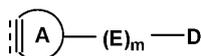
Цитотоксические молекулы, радионуклиды и определенные химиотерапевтические лекарственные средства были химически присоединены к моноклональным антителам, которые связывают опухолеспецифичные или ассоциированные с опухолью антигены клеточной поверхности. См., например, международную заявку на патент (PCT) № WO 00/02587, WO 02/060955, WO 02/092127; и патенты США № 8198417, 8012485, 5475092, 6340701 и 6171586.

В существующих способах разработки mAb обычно используют такие методики, как конструирование шарнирной части и созревание аффинности. Однако еще остается непростая задача повышения эффективности и сведения к минимуму нежелательных побочных эффектов при терапии с применением иммуноконъюогатов.

### Сущность изобретения

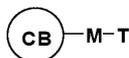
Изобретение относится к выделенным конъюогатам биомолекул и выделенным конъюогатам биомолекул, полученным посредством реакции циклоприсоединения, описанной в данном документе.

Настоящее изобретение также относится к способам получения выделенных конъюогатов биомолекул посредством циклоприсоединения, включающим



формула I,

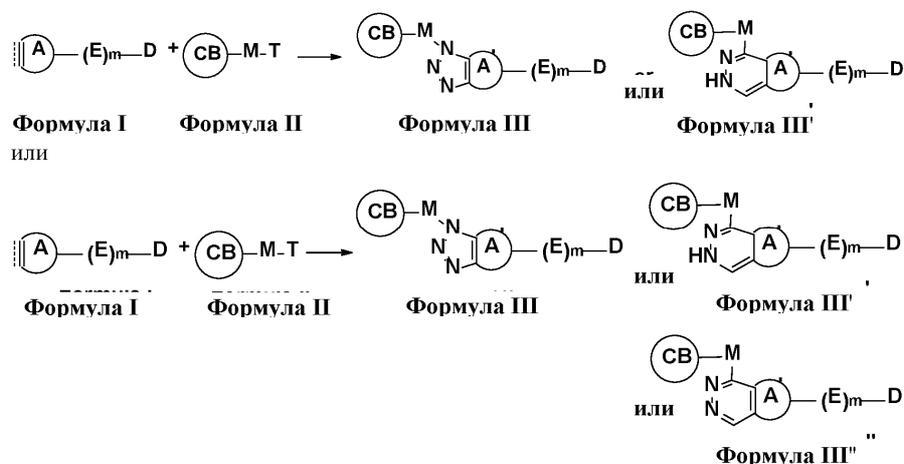
получение соединения формулы I, которое содержит циклический напряженный алкин или алкен, (A) присоединенный к линкеру (спейсерной группе), ((E)<sub>m</sub>), и где полезная нагрузка (D) также присоединена к линкеру; и



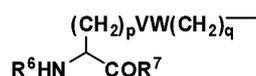
Формула II

получение соединения формулы II, биомолекулы (CB), содержащей по меньшей мере одну амино-

кислоту неприродного происхождения (NNAА) (M), встроенную в ее структуру, где NNAА имеет азидную (например, азидо-фенилаланин или азидо-пара-метил-фенилаланин) или тетразиновую группу (Т); и проведение реакции соединения формулы I с соединением формулы II с образованием соединения (конъюгата биомолекулы) формулы III, формулы III' или формулы III''



Настоящее изобретение дополнительно направлено на выделенные конъюгаты биомолекул формулы III, III' или III'', полученные посредством реакций циклоприсоединения, описанных в данном документе, где конъюгаты биомолекул включают по меньшей мере одну аминокислоту неприродного происхождения (NNAА) (M), встроенную в биомолекулу

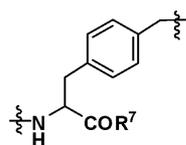


Формула IV

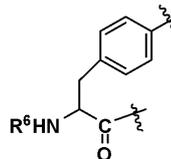
где каждый из p и q представляет собой целое число от 0 до 10; R<sup>6</sup> представляет собой H, аминокислоту в полипептиде или связь; R<sup>7</sup> представляет собой OH, аминокислоту в полипептиде или связь;

V представляет собой алкил или арил, карбоцикл, гетероцикл или отсутствует; и W представляет собой O, N, S или отсутствует.

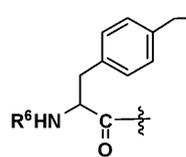
Изобретение соответственно дополнительно направлено на выделенные конъюгаты биомолекул формулы III, III' (или III'' (III'' также будет рассматриваться по всему объему данного раскрытия)), полученные посредством реакции циклоприсоединения, описанной в данном документе, где конъюгаты биомолекул содержат по меньшей мере одну аминокислоту неприродного происхождения (NNAА) (M), встроенную в структуру биомолекулы, выбранной из группы, по сути состоящей из формул



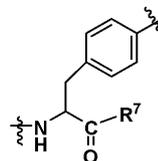
V



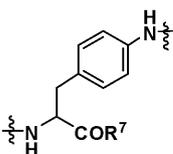
VI



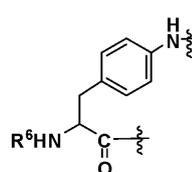
VII



VIII



IX



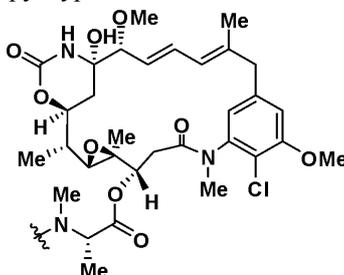
X.

В дополнение, настоящее изобретение направлено на выделенные конъюгаты биомолекул формулы III или III', полученные посредством реакций циклоприсоединения, описанных в данном документе, где конъюгаты биомолекул содержат по меньшей мере одну полезную нагрузку (D), которая представляет

собой цитотоксическое средство.

Настоящее изобретение, соответственно, дополнительно направлено на выделенные конъюгаты биомолекул формулы III или III', полученные посредством реакций циклоприсоединения, описанных в данном документе, где конъюгаты биомолекул содержат по меньшей мере один майтанзиноид в качестве полезной нагрузки (D).

Настоящее изобретение, соответственно, дополнительно направлено на выделенные конъюгаты биомолекул формулы III или III', полученные посредством реакций циклоприсоединения, описанных в данном документе, где конъюгаты биомолекул содержат по меньшей мере одно цитотоксическое средство в качестве полезной нагрузки (D) структуры



C1.

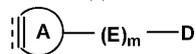
Настоящее изобретение дополнительно направлено на фармацевтические композиции, которые содержат терапевтически эффективное количество конъюгата биомолекул, описанного в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение дополнительно направлено на способ лечения патологического физиологического состояния у млекопитающего, включающий введение эффективного количества конъюгата биомолекул, описанного в данном документе.

Настоящее изобретение, соответственно, дополнительно направлено на способ лечения нарушения пролиферации клеток у млекопитающего, включающий введение эффективного количества конъюгата биомолекул, описанного в данном документе.

Настоящее изобретение соответственно дополнительно направлено на способ лечения гематологического нарушения онкологического характера у млекопитающего, включающий введение эффективного количества конъюгата биомолекул, описанного в данном документе.

Настоящее изобретение также направлено на выделенное соединение



Формула I

где A представляет собой напряженное алкиновое или алкеновое кольцо, где кольцо представляет собой карбоциклил или гетероциклил,

D представляет собой полезную нагрузку;

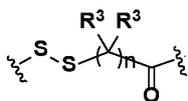
каждый E независимо выбран из группы, состоящей из -CO-, -CR R -, -NR -, -S-S-, -S-, -SO-, -SO<sub>2</sub>-, -O-, -CR<sup>3</sup>=N-NR<sup>3</sup>-, -CR<sup>3</sup>=N-O-, -CR<sup>3</sup>=N-NR<sup>3</sup>-CO-, -N=N-CO-, алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>карбоциклила, -O-(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>a</sub>-, арила, -(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>a</sub>-арила, гетероарила, -(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>a</sub>-гетероарила, -(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>a</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>карбоциклила, гетероциклила, -(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>a</sub>-гетероциклила, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>a</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>a</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>C(O)-, аминокислоты и пептида;

каждый из R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо выбран из группы, состоящей из H, F, Cl, Br, I, OH, -N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>, -N(R<sup>3</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкилгалогенида, карбоксилата, сульфата, сульфамата, сульфоната, -SO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>, -S(=O)R<sup>3</sup>, -SR<sup>3</sup>, -SO<sub>2</sub>N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>, -C(=O)R<sup>3</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>, -C(=O)N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>, -CN, -N<sub>3</sub>, -NO<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкокси, полиэтиленокси, фосфоната, фосфата, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>алкинила, арила, гетероарила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>карбоциклила и C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>гетероциклила; или, если взятые вместе, R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> образуют карбонил (=O) или спирокарбоциклическое кольцо, содержащее от 3 до 7 атомов углерода; и

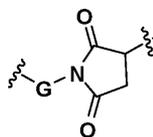
R<sup>3</sup> выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>алкинила, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>арила, C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>гетероарила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>карбоциклила и C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>гетероциклила; при этом алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил, карбоциклил и гетероциклил необязательно независимо замещены одним или несколькими заместителями, выбранными из группы, состоящей из F, Cl, Br, I, OH, -N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>, -N(R<sup>3</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкилгалогенида, карбоксилата, сульфата, сульфамата, сульфоната, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкилсульфоната, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкиламино, 4-диалкиламинопиридиния, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкилгидроксила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкилтиола, -SO<sub>2</sub>R, -S(=O)R<sup>3</sup>, -SR<sup>3</sup>, -SO<sub>2</sub>N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>, -C(=O)R<sup>3</sup>, -CO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>, -C(=O)N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>, -CN, -N<sub>3</sub>, -NO<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкокси, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>трифторалкила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>карбоциклила, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>арила, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>гетероарила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>карбоциклила, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>гетероциклила, полиэтиленокси, фосфоната и фосфата; m представляет собой целое число от 1 до 100; и каждый из a и b представляет собой целое число от 1 до 100.

Настоящее изобретение дополнительно направлено на выделенное соединение формулы I, где каждый E независимо выбран из группы, состоящей из -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>a</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>C(O)NR<sup>3</sup>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>NR<sup>3</sup>C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>C(O)NR<sup>3</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>C(O)NR<sup>3</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>b</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>C(O)NR<sup>3</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>b</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-,

$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a\text{C}(\text{O})\text{NR}^3(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b-$ ,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a\text{C}(\text{O})\text{NR}^3(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_b$ ,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a\text{C}(\text{O})\text{NR}^3(\text{CH}_2)_b-$ ,  
 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a(\text{CH}_2)_b$ ,  $-(\text{CH}_2)_a\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{CR}^3=\text{N}-\text{NR}^3-$ ,  $-\text{CR}^3=\text{N}-\text{O}-$ ,  $-\text{CR}^3=\text{N}-\text{NR}^3-\text{CO}-$ ,  $-\text{N}=\text{N}-\text{CO}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{SO}-$ ,  
 $-\text{SO}_2-$ , аминокислоты, дипептида, трипептида

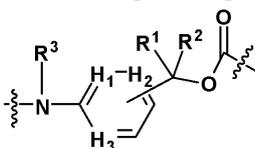


E1 и



E2,

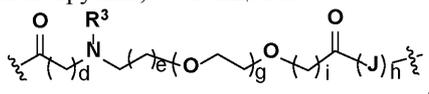
где G выбран из группы, состоящей из алкила, арила, карбоциклила и гетероциклила; и



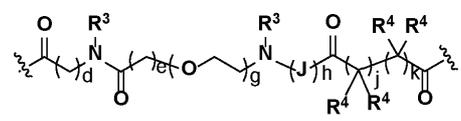
G1,

где каждый из H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> и H<sub>3</sub> независимо выбран из N или CR<sup>1</sup>.

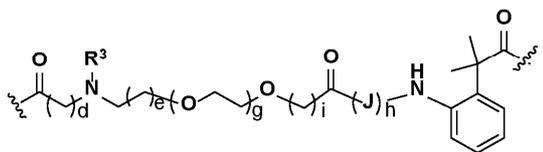
Настоящее изобретение дополнительно направлено на выделенное соединение формулы I, где каждый E независимо выбран из группы, состоящей из



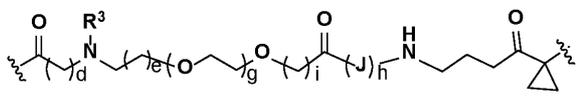
E3



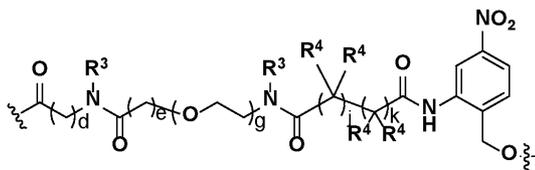
E4



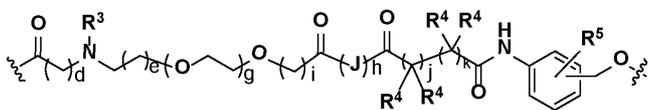
E5



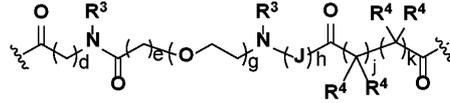
E6



E7

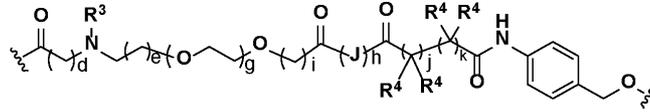


E8



E9

И



E10

где J представляет собой аминокислоту или пептид;

каждый из d, e, g, i, j и k независимо представляет собой целое число от 1 до 30;

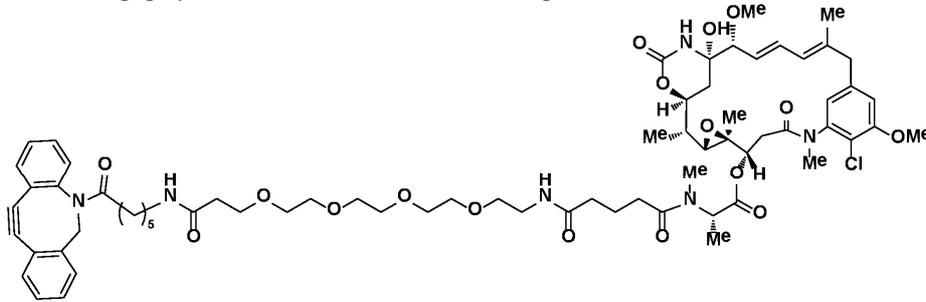
h представляет собой целое число от 0 до 30;

R<sup>3</sup> определен, как указано выше;

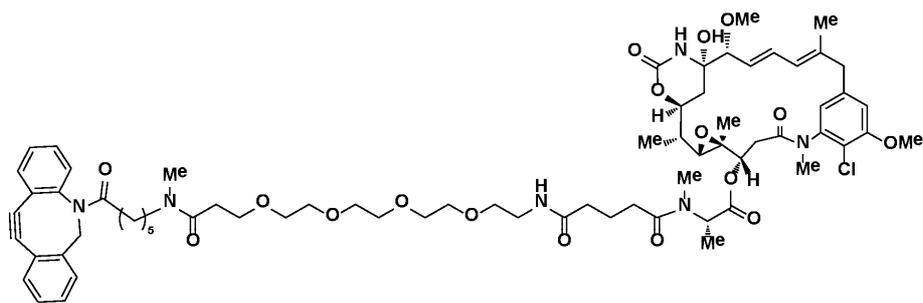
каждый R<sup>4</sup> независимо выбран из группы, состоящей из H, алкила, -N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>, -SR<sup>3</sup> и C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкокси, арила; и

R<sup>5</sup> выбран из группы, состоящей из H, -N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>, -SR<sup>3</sup>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкокси, арила и NO<sub>2</sub>.

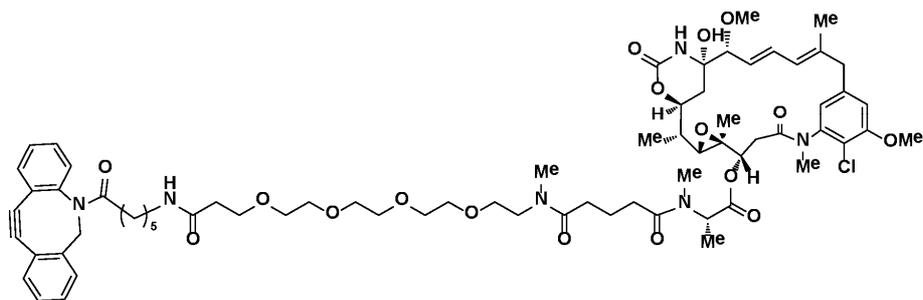
Настоящее изобретение дополнительно направлено на каждое из следующих иллюстративных выделенных соединений формулы I, а также на их аналоги и производные



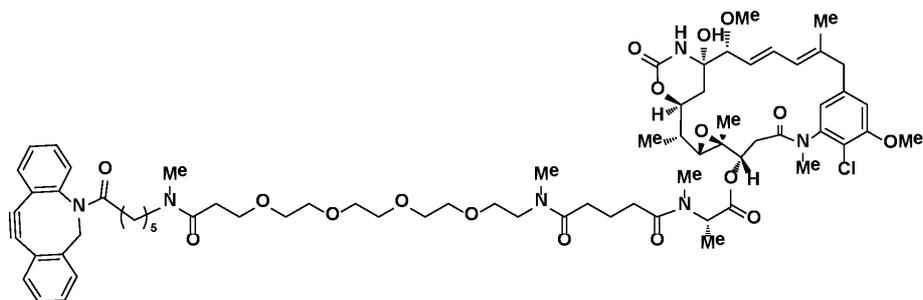
II,



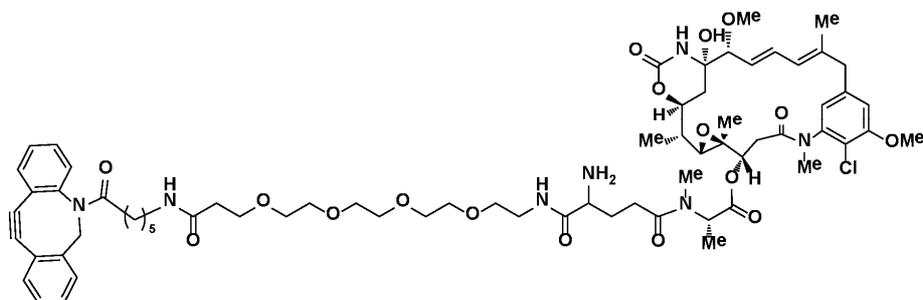
12,



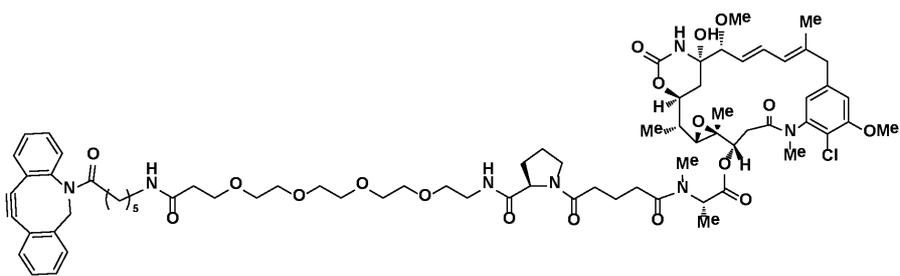
13,



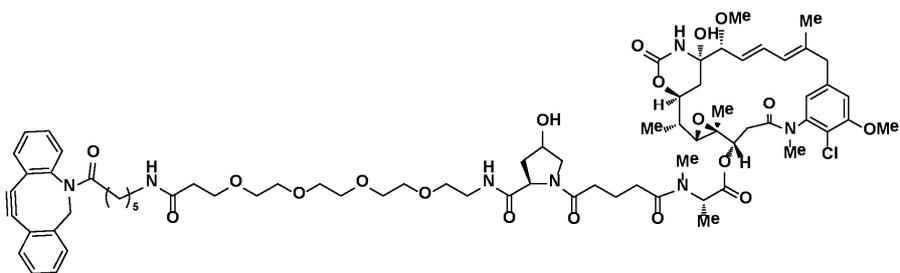
14,



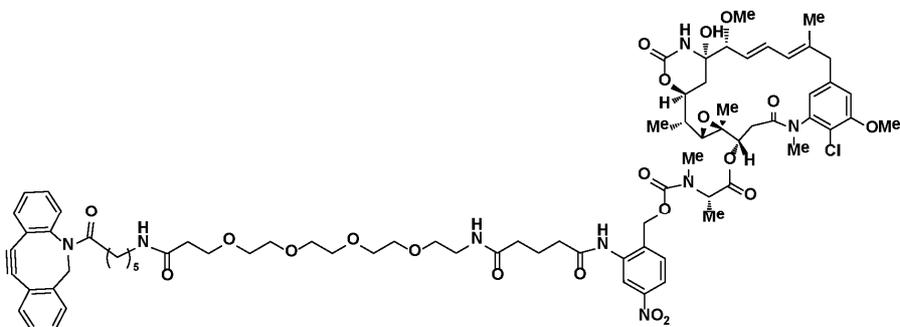
15,



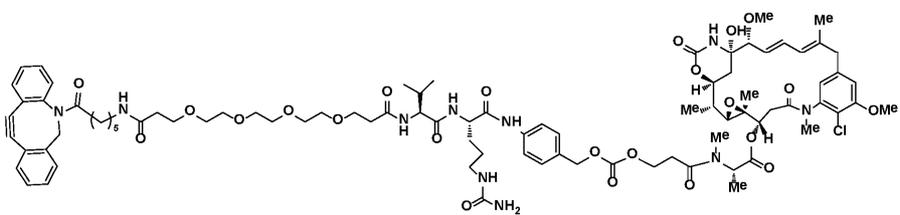
16,



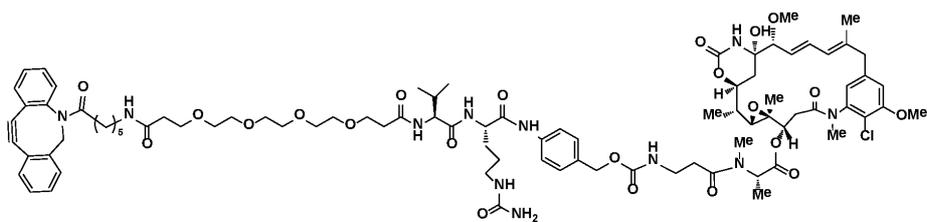
17,



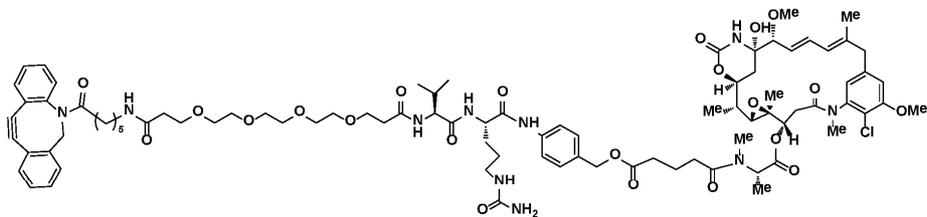
18,



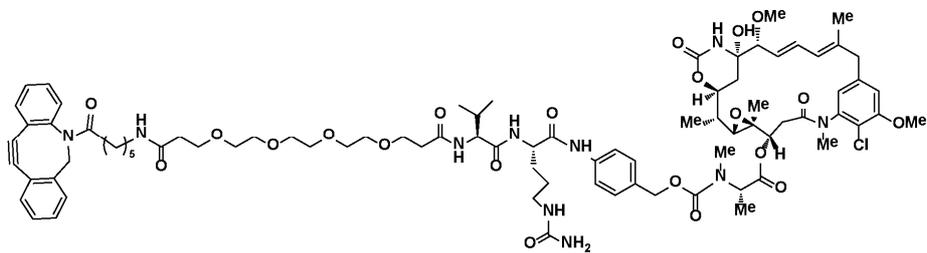
19,



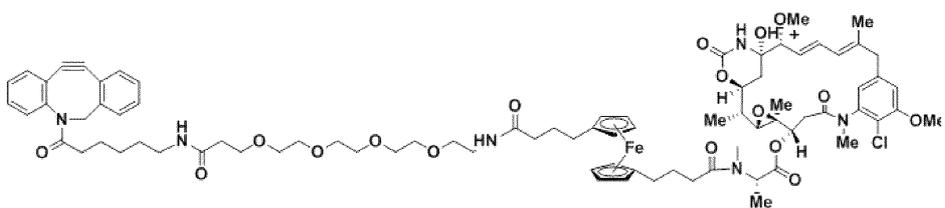
I10,



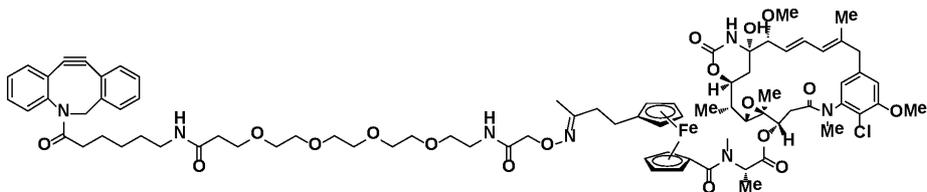
I11,



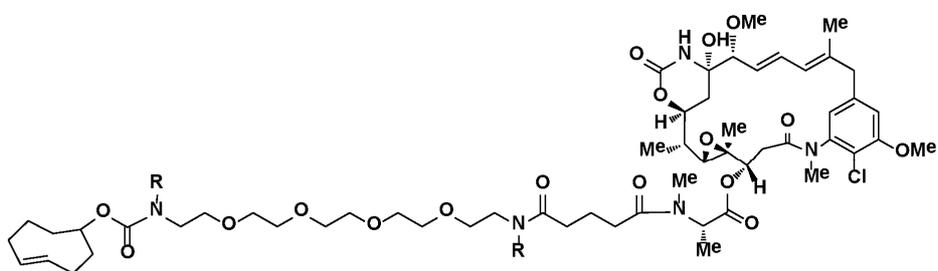
I12,



I13,

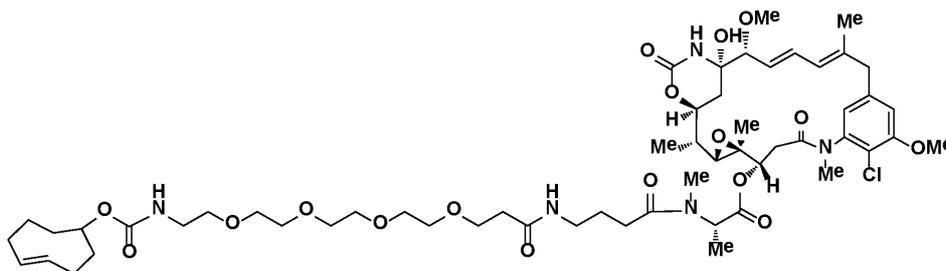


I14,



I15,

R представляет собой H или CH<sub>3</sub> (метил); и



116.

### Краткое описание фигур

На фиг. 1 изображен пример получения соединения формулы I сначала путем образования группы амидных связей с последующим удлинением линкера;

на фиг. 2 - пример получения соединения формулы I и соответствующих промежуточных соединений;

на фиг. 3 показано получение промежуточного соединения, где напряженный алкин присоединен к фрагменту линкера;

на фиг. 4 описано получение соединения формулы I сначала путем образования группы амидных связей с последующим удлинением линкера;

на фиг. 5 - получение промежуточного соединения, где напряженный алкин присоединен к линкеру;

на фиг. 6А изображена реакция 1,3-диполярного циклоприсоединения;

на фиг. 6В - реакция 4+2-циклоприсоединения напряженного алкена и тетразина;

на фиг. 7 схематично изображены амидные связи, применяемые для присоединения цитотоксических средств;

на фиг. 8 показан пример NNAА для применения в настоящем изобретении;

на фиг. 9А-С изображены некоторые примеры соединений по настоящему изобретению;

на фиг. 10 - пример схемы синтеза соединения по настоящему изобретению;

на фиг. 11 - пример схемы синтеза соединения по настоящему изобретению;

на фиг. 12 - пример схемы синтеза соединения по настоящему изобретению;

на фиг. 13 - пример схемы синтеза соединения по настоящему изобретению;

на фиг. 14 - пример схемы синтеза соединения по настоящему изобретению;

на фиг. 15 - пример схемы синтеза соединения по настоящему изобретению;

на фиг. 16 - пример схемы синтеза соединения по настоящему изобретению;

на фиг. 17 - пример схемы синтеза соединения по настоящему изобретению;

на фиг. 18 - пример схемы синтеза соединения по настоящему изобретению;

на фиг. 19 - пример схемы синтеза соединения по настоящему изобретению;

на фиг. 20 - пример схемы синтеза соединения по настоящему изобретению;

на фиг. 21 - пример схемы синтеза соединения по настоящему изобретению;

на фиг. 22 - пример схемы синтеза соединения по настоящему изобретению;

на фиг. 23 - пример схемы синтеза соединения по настоящему изобретению;

на фиг. 24 - пример схемы синтеза соединения по настоящему изобретению;

на фиг. 25 - пример схемы синтеза соединения по настоящему изобретению.

### Подробное описание изобретения

Если не определено иное, все технические и научные термины, использованные в данном документе, имеют то же значение, которое принято среди специалистов в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Все публикации и патенты, упомянутые в данном документе, включены посредством ссылки.

Нацеленные противораковые терапевтические средства, описанные в данном документе, разработаны для снижения неспецифической токсичности и увеличения эффективности в отношении традиционной химиотерапии при раке. Такой подход осуществили благодаря мощной способности к нацеливанию моноклональных антител для специфической доставки высокоактивных конъюгированных терапевтических средств к клетке, которая содержит рак-специфические или рак-ассоциированные антигены. Полезные нагрузки, в частности цитотоксические средства, связаны с нацеливающимися молекулами, такими как антитела или лиганды, которые связываются с высоким уровнем специфичности к раковым клеткам, с образованием соединений, называемых в данном документе конъюгаты биомолекул (конъюгаты), или конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), или иммуноконъюгаты. Конъюгаты, описанные в данном документе, должны быть менее токсичными, поскольку они направляют цитотоксическое средство к клеткам, например, клеткам рака крови, которые проявляют или иным образом сверхэкспрессируют конкретный клеточный поверхностный антиген или рецептор.

Сейчас будет приведена подробная ссылка на некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, примеры которых проиллюстрированы в сопроводительных структурах и формулах. Хотя изо-

бретение будет описано в связи с раскрытыми в данном документе вариантами осуществления, следует понимать, что они не предназначены для ограничения настоящего изобретения этими вариантами осуществления. Напротив, изобретение предназначено для охвата всех альтернатив, модификаций и эквивалентов, которые могут быть включены в объем настоящего изобретения, а также определяются прилагаемой формулой изобретения. Специалист в данной области техники будет знаком с многими способами и материалами, подобными или эквивалентными описанным в данном документе, которые могут применяться в практическом осуществлении настоящего изобретения. Настоящее изобретение каким-либо образом не ограничено описанными способами и материалами. Следует понимать, что в следующем подробном описании и прилагаемой формуле изобретения используются аббревиатуры и номенклатура, которые по сути являются стандартными в химии.

Если не указано иное, следующие термины и фразы, применяемые в данном документе, имеют следующие определения.

"Алкил" представляет собой  $C_1$ - $C_{18}$ углеводородный фрагмент, содержащий нормальные, вторичные, третичные атомы углерода или атомы углерода, замкнутые в цикл. Примеры алкильных радикалов включают  $C_1$ - $C_8$ углеводородные фрагменты, такие как метил (Me,  $-CH_3$ ), этил (Et,  $-CH_2CH_3$ ), 1-пропил (n-Pr, n-пропил,  $-CH_2CH_2CH_3$ ), 2-пропил (i-Pr, изопропил,  $-CH(CH_3)_2$ ), 1-бутил (n-Bu, n-бутил,  $-CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-метил-1-пропил (i-Bu, изо-бутил,  $-CH_2CH(CH_3)_2$ ), 2-бутил (s-Bu, втор-бутил,  $-CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 2-метил-2-пропил (t-Bu, трет-бутил,  $-C(CH_3)_3$ ), 1-пентил (n-пентил,  $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-пентил ( $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$ ), 3-пентил ( $-CH(CH_2CH_3)_2$ ), 2-метил-2-бутил ( $-C(CH_3)_2CH_2CH_3$ ), 3-метил-2-бутил ( $-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$ ), 3-метил-1-бутил ( $-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$ ), 2-метил-1-бутил ( $-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 1-гексил ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 2-гексил ( $-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$ ), 3-гексил ( $-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$ ), 2-метил-2-пентил ( $-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$ ), 3-метил-2-пентил ( $-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$ ), 4-метил-2-пентил ( $-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$ ), 3-метил-3-пентил ( $-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$ ), 2-метил-3-пентил ( $-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$ ), 2,3-диметил-2-бутил ( $-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$ ), 3,3-диметил-2-бутил ( $-CH(CH_3)C(CH_3)_3$ ), 1-гептил, 1-октил, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил и циклооктил. Алкильная группа может быть замещенной или незамещенной.

"Алкенил" представляет собой  $C_2$ - $C_{18}$ углеводородный фрагмент, содержащий нормальные, вторичные, третичные атомы углерода или атомы углерода, замкнутые в цикл, по меньшей мере с одним центром ненасыщенности, т.е. углерод-углеродной двойной  $sp^2$ -связью. Примеры алкенильных радикалов включают  $C_2$ - $C_8$ углеводородные фрагменты, такие как, без ограничений, этилен или винил ( $-CH=CH_2$ ), аллил ( $-CH_2CH=CH_2$ ), 1-циклопент-1-енил, 1-циклопент-2-енил, 1-циклопент-3-енил, 5-гексенил ( $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH=CH_2$ ), 1-циклогекс-1-енил, 1-циклогекс-2-енил и 1-циклогекс-3-енил. Алкенильная группа может быть замещенной или незамещенной.

"Алкинил" представляет собой  $C_2$ - $C_{18}$ углеводородный фрагмент, содержащий нормальные, вторичные, третичные атомы углерода атомы углерода, замкнутые в цикл, по меньшей мере с одним центром ненасыщенности, т.е. углерод-углеродной тройной  $sp$ -связью. Примеры алкинильных радикалов включают  $C_2$ - $C_8$ углеводородные фрагменты, такие как, без ограничений, ацетиленовый ( $-C\equiv CH$ ) и пропаргиловый ( $-CH_2C\equiv CH$ ). Алкинильная группа может быть замещенной или незамещенной.

"Амино" является замещенным или незамещенным, если не указано иное. Аминогруппа может быть замещена одним или двумя заместителями, выбранными из водорода, алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, циклоалкилалкила, арилалкила, гидроксипалкила, алкоксипалкила, галогеналкила, незамещенного или замещенного арила, аминалкила, ацила, например формила, алкилкарбонила, арилкарбонила, алкилсульфонила или арилсульфонила и является преимущественно амино, метиламино, диметиламино, пропиламино, бензиламино, гидроксиэтилметиламино, ди(гидроксиэтил)амино, диметиламиноэтиламино, ацетиламино, ацетилметиламино, бензоиламино, метилсульфониламино или фенилсульфониламино, в частности, амино или диметиламино.

"Арил" обозначает любую ароматическую группу на основе углерода, включающую без ограничений бензол, нафталин, фенил, бифенил, феноксибензол и подобные. Арильная группа может быть замещенной или незамещенной. Термин "гетероарил" определяется как группа, содержащая ароматическую группу, имеющую по меньшей мере один гетероатом, встроенный в кольцо ароматической группы. Примеры гетероатомов включают без ограничений азот, кислород, серу, 10 и фосфор. Термин "не относящийся к гетероарилу", который включен в термин "арил", определяет группу, содержащую ароматическую группу, которая не содержит гетероатом. Арильная или гетероарильная группа может быть замещенной или незамещенной. Арильная или гетероарильная группа может быть замещена одной или несколькими группами, включающими без ограничений алкил, галогенированный алкил, алкокси, алкенил, алкинил, арил, гетероарил, альдегид, амино, карбоновую кислоту, сложный эфир, простой эфир, 15 галогенид, гидрокси, кетон, нитро, силил, сульфо-оксо, сульфонил, сульфен, сульфоксид или тиол, как описано в данном документе. Термин "биарил" представляет собой конкретный тип арильной группы и включен в определение арила. Биарил относится к двум арильным группам, которые связаны вместе посредством конденсированной кольцевой структуры, как в нафталине, или присоединены посредством одной или нескольких углерод-углеродных связей, как в бифениле.

"Гетероциклическое соединение или гетероцикл" представляет собой насыщенное, частично насыщенное или ненасыщенное моно- или бициклическое кольцо, содержащее 4-12 атомов, из которых по меньшей мере один атом выбран из азота, серы или кислорода, который может, если не определено иное, представлять собой связанный атом углерода или азота, где группа  $-CH_2-$  может необязательно быть заменена  $-C(O)-$ , а атом серы в кольце может быть необязательно окислен с образованием 3-оксида(ов). Примеры гетероциклов включают без ограничений пирролидинил, морфолино, пиперидил, пиридил, пиранил, пирролил, изотиазолил, индолил, хинолил, тиенил, фурил, 1,3-бензодиоксолил, тиазолил, пиперазинил, изоксазолил, тиазолил, тиазолидин, пирролидинил, тиоморфолино, пиразолил, пирролинил, гомопиперазинил, тетрагидропиранил, имидазолил, пиримидил, пиразинил, пиридазинил, изоксазолил, 4-пиридон, 1-изохинолон, 2-пирролидон, 4-тиазолидон, имидазо[1,2-а]пиридин или 3-аза-8-оксабицикло[3,2,1]гексан. Гетероциклы описаны в Raquette, Leo A., "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), в частности, главы 1, 3, 4, 6, 7 и 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, с 1950 по настоящее время), в частности, тома 13, 14, 16, 19 и 28; и J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. Гетероциклическая группа может быть замещенной или незамещенной.

"Карбамоил" может быть замещенным или незамещенным, если не указано иное. Карбамоильная группа может быть замещена одним или двумя заместителями, выбранными из водорода, алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, циклоалкилалкила, арилалкила, гидроксиалкила, алкоксиалкила, галогеналкила, незамещенного или замещенного арила, или аминокалкила, или карбамоила, где заместители и атом азота карбамоильной группы представлены 5- или 6-членным гетероциклом, дополнительно содержащим 0, 1 или 2 гетероатома, выбранных из N, O и S, и при этом предпочтительно представляет собой карбамоил, метилкарбамоил, диметилкарбамоил, пропилкарбамоил, гидроксиэтилметилкарбамоил, ди(гидроксиэтил)карбамоил, диметиламиноэтилкарбамоил или пирролидинокарбонил, пиперидинокарбонил, N-метилпиперазинокарбонил или морфолинокарбонил, в частности карбамоил или диметилкарбамоил.

"Карбоцикл" и "карбоцикл" являются синонимичными, обозначают насыщенное или ненасыщенное кольцо, содержащее от 3 до 7 атомов углерода в виде моноцикла, или от 7 до 12 атомов углерода в виде бицикла. Моноциклические карбоциклы содержат от 3 до 6 атомов кольца, однако, более типично 5 или 6 атомов кольца. Бициклические карбоциклы содержат от 7 до 12 атомов кольца, расположенных, например, в виде бицикло-систем [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6], или 9, или 10 атомов кольца, расположенных в виде бицикло-систем [5,6] или [6,6]. Примеры моноциклических карбоциклов включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, 1-циклопент-1-енил, 1-циклопент-2-енил, 1-циклопент-3-енил, циклогексил, 1-циклогекс-1-енил, 1-циклогекс-2-енил, 1-циклогекс-3-енил, циклогептил и циклооктил. Карбоциклическая группа может быть замещенной или незамещенной.

Аминокислота неприродного происхождения (NNAА), в сущности, относится к аминокислоте, которая не относится к одной из 20 аминокислот, встречающихся в природе. Примеры такой NNAА включают без ограничений аминокислоты, содержащие азидную группу или тетразиновую группу. Пример NNAА включает без ограничений азидо-фенилаланин или азидо-пара-метил-фенилаланин.

"Связующая группа", как определено в данном документе, например, относится к функциональной группе между линкером (E) и полезной нагрузкой (D). Примеры связующей группы включают, без ограничений, амидную, сложноэфирную, карбаматную, эфирную, тиозфирную, дисульфидную, гидразиновою, оксимовую, семикарбазидную, мочевиновую, карбонатную, кислотолабильную группу, фотоллабильную группу, пептидазолабильную группу и эстеразолабильную группу. См., US 5208020; 5475092; 6441163; 6716821; 6913748; 7276497; 7276499; 7368565; 7388026 и 7414073.

"Линкер" (спейсерная группа) (E) относится к химическому фрагменту между двумя связующими группами. СВ-E-D. Линкер (E) представляет собой химический фрагмент между связующей группой клеточносвязывающего средства (СВ) и связующей группой полезной нагрузки (D). Линкер (E) может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Линкер соединяет цитотоксическое средство с клеточносвязывающим средством или химическим фрагментом, который может быть дополнительно присоединен к клеточносвязывающему средству. Например, линкер (E) соединяет майтанзиноид с химическим фрагментом, таким как напряженный алкин, способный соединяться, как описано в данном документе, с антителом, содержащим азид-замещенную аминокислоту неприродного происхождения, посредством циклоприсоединений Хьюсгена (также называемых "клик"-реакциями Шарплесса).

Получение и применение линкеров легко доступно специалистам в данной области техники. Goldmacher et al., Antibody-drug Conjugates and Immunotoxins: From Pre-clinical Development to Therapeutic Applications, глава 7, в Linker Technology and Impact of Linker Design on ADC Properties, под редакцией Phillips GL; Ed. Springer Science and Business Media, New York (2013). Структуры линкеров для применения в настоящем изобретении также раскрыты, например, в US 8198417; 8012485; 7989434; 6333410; 5416064 и 5208020; все раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки.

Расщепляемые линкеры (E) представляют собой линкеры, которые могут расщепляться в мягких условиях. Дисульфидсодержащие линкеры представляют собой линкеры, расщепляемые посредством дисульфидного обмена, происходящего при физиологических условиях. Кислотолабильные линкеры

представляют собой линкеры, расщепляемые при кислом значении pH. Например, некоторые внутриклеточные компартменты, такие как эндосомы и лизосомы, имеют кислое значение pH (pH 4-5) и обеспечивают подходящие условия для расщепления кислотолабильных линкеров. Линкеры, которые являются фототолабильными, применимы на поверхности тела и во многих полостях тела, которые доступны для света. Кроме того, инфракрасный свет может проникать в ткань. Некоторые линкеры могут расщепляться естественными пептидазами. См., например, Trouet et al. 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982) и Umemoto, et al, 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989). Пептиды состоят из  $\alpha$ -аминокислот и пептидных связей, которые представляют собой амидные связи между карбоксилатом одной аминокислоты и  $\alpha$ -аминогруппой другой аминокислоты и так далее. Другие амидные связи, такие как связь между карбоксилатом и  $\epsilon$ -аминогруппой лизина, не принято относить к пептидным связям, и они считаются нерасщепляемыми. Многие линкеры, известные из уровня техники, могут расщепляться эстеразами. Только некоторые сложные эфиры, известные из уровня техники, могут расщепляться эстеразами, присутствующими внутри или на поверхности клеток. Сложные эфиры образуются посредством конденсации карбоновой кислоты и спирта. Простые сложные эфиры представляют собой сложные эфиры, полученные из простых спиртов, таких как алифатические спирты, а также циклические и ароматические спирты с небольшой молекулярной массой.

Нерасщепляемый линкер (E) представляет собой любой химический фрагмент, способный связывать полезную нагрузку, например, цитотоксическое средство с клеточносвязывающим средством устойчиво, ковалентно и не попадает под категории, перечисленные выше, как расщепляемые линкеры. Таким образом, нерасщепляемые линкеры, как правило, устойчивы к кислотно-индуцированному расщеплению, расщеплению, индуцированному светом, пептидазоиндуцированному расщеплению, эстеразоиндуцированному расщеплению и расщеплению дисульфидной связи. Термин "фармацевтически приемлемая соль", применяемый в данном документе, относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям соединения по настоящему изобретению, в том числе конъюгатам биомолекул. Иллюстративные соли включают без ограничений сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, йодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат "мезилат", этансульфонат, бензолсульфонат, *p*-толуолсульфонат, памоатовые (т.е. 1,1'-метилден-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)) соли, соли щелочных металлов (например, натрия и калия), соли щелочно-земельных металлов (например, магния) и аммонийные соли. Фармацевтически приемлемая соль может содержать включение другой молекулы, такое как ацетатный ион, сукцинат-ион или другой противоположно заряженный ион. Противоположно заряженный ион может быть любым органическим или неорганическим фрагментом, стабилизирующим заряд на исходном соединении. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь более одного заряженного атома в своей структуре. Существуют случаи, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, могут иметь несколько противоположно заряженных ионов. Таким образом, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или несколько заряженных атомов и/или один или несколько противоположно заряженных ионов.

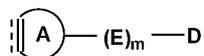
Термин "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" означает количество активного соединения или конъюгата, которое вызывает желаемый биологический ответ или терапевтический эффект у субъекта. Такой ответ включает облегчение симптомов подлежащего лечению заболевания или расстройства, предотвращение, ингибирование или задержку повторения симптома заболевания или самого заболевания, увеличение продолжительности жизни субъекта по сравнению с отсутствием лечения или профилактики, ингибирования или задержки прогрессирования симптома заболевания или самого заболевания. Определение эффективного количества вполне соответствует возможностям специалистов в данной области техники, особенно в свете подробного раскрытия, представленного в данном документе. Токсичность и терапевтическую эффективность определяют с помощью стандартных фармацевтических процедур в культуре клеток и при испытаниях на животных. Эффективное количество соединения или конъюгата по настоящему изобретению или другого терапевтического средства, вводимого субъекту, будет зависеть от стадии, категории и статуса состояния, например, множественной миеломы или лейкоза, и характеристик субъекта, таких как общее состояние здоровья, возраст, пол, масса тела и переносимость препарата. Эффективное количество соединения или конъюгата по настоящему изобретению или другого вводимого терапевтического средства также будет зависеть от пути введения и лекарственной формы. Предпочтительными являются внутривенный (IV) и подкожный (SC) пути введения. Чтобы обеспечить достаточный для поддержания желаемых терапевтических эффектов уровень активного соединения в плазме, количество и интервал дозирования можно регулировать индивидуально.

Стереохимические определения и условные обозначения, применяемые в данном документе, обычно следуют S.P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; и Eliel, E. и Wilen S., "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. Если не указано иное, предусматривается, что соединения по настоящему изобретению включают все стереоизомеры, существующие как отдельный изомер или в смеси с другими изомерами.

В формуле I соединения по настоящему изобретению (A) представляют собой напряженное кольцо, т.е. напряженное алкиновое кольцо или напряженное алкеновое кольцо. Напряженный алкин (A) или напряженный алкен (A) и, например, цитотоксическое средство (D) соединены посредством линкера (E)<sub>m</sub>. Различные связующие группы, используемые в точке присоединения (E)<sub>m</sub> (к (A) или (D), или к обоим), включают, например, без ограничений, сложный эфир, амид, карбамат, амин и тиоэфир.

Формула I.

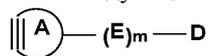
Соединение формулы I



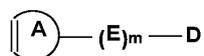
формула I,

A представляет собой кольцо, при этом A представляет собой кольцо с напряженным алкином, когда пунктирная линия представляет собой связь, или A представляет собой кольцо с напряженным алкеном, когда пунктирная линия отсутствует;

формула I, другими словами, содержит обе следующие структуры:



формула Ia



формула Ib

D представляет собой цитотоксическое средство;

каждый E независимо выбран из группы, состоящей из -CO-, -CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>-, -NR<sup>3</sup>-, -S-S-, -S-, -SO-, -SO<sub>2</sub>-, -O-, -CR<sup>3</sup>=N-NR<sup>3</sup>-, -CR<sup>3</sup>=N-O-, -CR<sup>3</sup>=N-NR<sup>3</sup>-CO-, -N=N-CO-, алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>карбоциклила, -O-(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>a</sub>-, арила, -(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>a</sub>-арила, гетероарила, -(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>a</sub>-гетероарила, -(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>a</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>карбоциклила, гетероциклила, -(CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)<sub>a</sub>-гетероциклила, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>a</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>a</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>C(O)-, аминокислоты и пептида;

каждый из R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо выбран из группы, состоящей из H, F, Cl, Br, I, OH, -N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>-, -N(R<sup>3</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкилгалогенида, карбоксилата, сульфата, сульфамата, сульфоната, -SO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>-, -S(=O)R<sup>3</sup>-, -SR<sup>3</sup>-, -SO<sub>2</sub>N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>-, -C(=O)R<sup>3</sup>-, -CO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>-, -C(=O)N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>-, -CN-, -N<sub>3</sub>-, -NO<sub>2</sub>-, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкокси, полиэтиленокси, фосфоната, фосфата, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>алкинила, арила, гетероарила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>карбоциклила и C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>гетероциклила; или, если взятые вместе, R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> образуют карбонильное (=O) или спиро-карбоциклическое кольцо, содержащее от 3 до 7 атомов углерода;

R<sup>3</sup> независимо выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкила, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>алкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>алкинила, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>арила, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>гетероарила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>карбоциклила и C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>гетероциклила;

В случае замещения алкил, карбоциклил, алкенил, алкинил, арил, гетероарил, карбоциклил и гетероциклил независимо замещаются одним или несколькими заместителями выбранными из группы, состоящей из F, Cl, Br, I, OH, -N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>-, -N(R<sup>3</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкилгалогенида, карбоксилата, сульфата, сульфамата, сульфоната, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкилсульфоната, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкиламино, 4-диалкиламинопиридиния, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкилгидроксила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкилтиола, -SO<sub>2</sub>R, -S(=O)R<sup>3</sup>-, -SR<sup>3</sup>-, -SO<sub>2</sub>N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>-, -C(=O)R<sup>3</sup>-, -CO<sub>2</sub>R<sup>3</sup>-, -C(=O)N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>-, -CN-, -N<sub>3</sub>-, -NO<sub>2</sub>-, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкокси, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>трифторалкила, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкила, C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>карбоциклила, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>арила, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>гетероарила, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>карбоциклила, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>гетероциклила, полиэтиленокси, фосфоната и фосфата;

m представляет собой целое число от 1 до 100; и

каждый из a и b представляет собой целое число от 1 до 100.

В некоторых вариантах осуществления m представляет собой целое число от 1 до 30. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой целое число от 1 до 25. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой целое число от 1 до 20. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой целое число от 1 до 15. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой целое число от 1 до 10. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой целое число от 1 до 5. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой целое число от 1 до 3. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой целое число от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления m представляет собой 1.

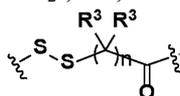
В некоторых вариантах осуществления каждый из a и b независимо представляет собой целое число от 1 до 100. В некоторых вариантах осуществления каждый из a и b независимо представляет собой целое число от 1 до 30. В некоторых вариантах осуществления каждый из a и b независимо представляет собой целое число от 1 до 25. В некоторых вариантах осуществления каждый из a и b независимо представляет собой целое число от 1 до 20. В некоторых вариантах осуществления каждый из a и b независимо представляет собой целое число от 1 до 15. В некоторых вариантах осуществления каждый из a и b независимо представляет собой целое число от 1 до 10. В некоторых вариантах осуществления каждый из a и b независимо представляет собой целое число от 1 до 5. В некоторых вариантах осуществления каждый из a и b независимо представляет собой целое число от 1 до 3. В некоторых вариантах осуществ-

ления каждый из а и b независимо представляет собой целое число от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления каждый из а и b независимо представляет собой 1.

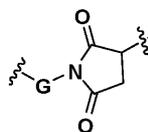
Каждый E в  $-(E)_m-$  может быть одним и тем же или отличаться. В одном из вариантов осуществления, например, соединение алкила и карбоцикла приводит к  $-(E)_2-$ , где один E представляет собой алкил, а другой E представляет собой карбоцикл.

В неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления каждый E может быть производным фрагментов на основе малеимида, выбранных из N-сукцинимидил-4-(малеимидометил)-циклогексанкарбоксилата (SMCC), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксо-(6-амидокапроата) (LC-SMCC),  $\kappa$ -малеимидоундециловой кислоты N-сукцинимидилового эфира (KMUA),  $\gamma$ -малеимидобутировой кислоты N-сукцинимидилового эфира (GMBS),  $\epsilon$ -малеимидкапроновой кислоты N-гидроксисукцинимидного эфира (EMCS), m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидного эфира (MBS), N-( $\alpha$ -малеимидоацетокси)сукцинимидного эфира (AMAS), сукцинимидил-6-( $\beta$ -малеимидо-пропионамидо)гексаноата (SMPH), N-сукцинимидил 4-(п-малеимидофенил)бутирата (SMPB), N-(п-малеимидофенил)изоцианата (PMPI) или соответствующего сульфо-сукцинимидилового варианта или аналога. В других неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления каждый E также может быть производным фрагмента на основе галогенацетила, выбранного из N-сукцинимидил-4-(йодоацетил)аминобензоата (SIAB), N-сукцинимидил йодоацетата (SIA), N-сукцинимидил бромацетата (SBA), N-сукцинимидил 3-(бромацетамидо)пропионата (SBAP) или соответствующего сульфосукцинимидилового варианта или аналога.

В некоторых вариантах осуществления каждый E независимо выбран из группы, состоящей из  $-(CH_2CH_2O)_a-$ ,  $-(CH_2)_aC(O)NR^3-$ ,  $-(CH_2)_aNR^3C(O)-$ ,  $-(CH_2)_aC(O)NR^3(CH_2)_b-$ ,  $-(CH_2)_aC(O)NR^3(CH_2CH_2O)_b-$ ,  $-(CH_2)_aC(O)NR^3(CH_2CH_2O)_b(CH_2)_c-$ ,  $-(CH_2CH_2O)_aC(O)NR^3(CH_2CH_2O)_b-$ ,  $-(CH_2CH_2O)_aC(O)NR^3(CH_2CH_2O)_b$ ,  $-(CH_2CH_2O)_aC(O)NR^3(CH_2)_b-$ ,  $-(CH_2CH_2O)_a-(CH_2)_b$ ,  $-(CH_2)_aC(O)-$ ,  $-CR^3=N-NR^3-$ ,  $-CR^3=N-O-$ ,  $-CR^3=N-NR^3-CO-$ ,  $-N=N-CO-$ ,  $-S-S-$ ,  $-S-$ ,  $-SO-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-O-$ , аминокислоты, пептида

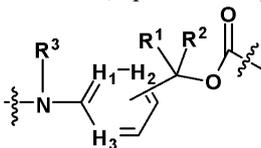


E1



E2

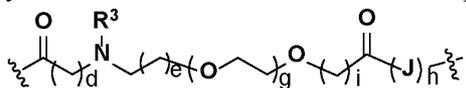
где G выбран из группы, состоящей из алкила, арила и гетероцикла, и



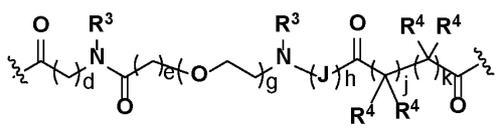
G1

где каждый из H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> и H<sub>3</sub> представляет собой N или CR<sup>1</sup>; и R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> определены, как показано выше.

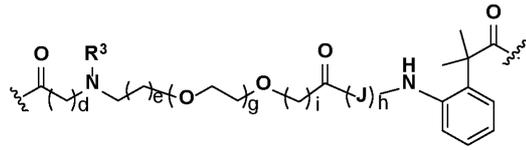
В некоторых вариантах осуществления каждый E независимо выбран из группы, состоящей из



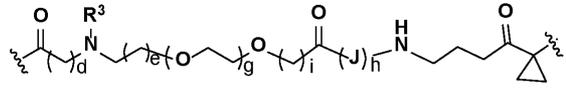
E3



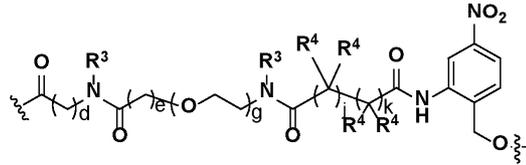
E4



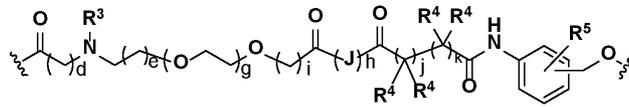
E5



E6



E7



E8,

где J представляет собой аминокислоту или пептид;

каждый из d, e, g, i, j и k независимо представляет собой целое число от 1 до 30;

h представляет собой целое число от 0 до 30;

$R^1$ ,  $R^2$  и  $R^3$  как определено выше.

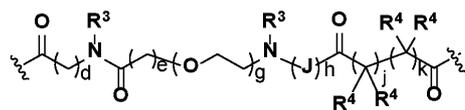
Каждый  $R^4$  независимо выбран из группы, состоящей из H, алкила,  $-N(R^3)_2$ ,  $-SR^3$  и  $C_1$ - $C_8$ алкокси, арила;

$R^5$  выбран из группы, состоящей из H,  $-N(R^3)_2$ ,  $-SR^3$ ,  $C_1$ - $C_8$ алкокси, арила и  $NO_2$ .

В некоторых вариантах осуществления каждый из d, e, g, i, j и k независимо представляет собой целое число от 1 до 30. В некоторых вариантах осуществления каждый из d, e, g, i, j и k независимо представляет собой целое число от 1 до 25. В некоторых вариантах осуществления каждый из d, e, g, i, j и k независимо представляет собой целое число от 1 до 20. В некоторых вариантах осуществления каждый из d, e, g, i, j и k независимо представляет собой целое число от 1 до 15. В некоторых вариантах осуществления каждый из d, e, g, i, j и k независимо представляет собой целое число от 1 до 10. В некоторых вариантах осуществления каждый из d, e, g, i, j и k независимо представляет собой целое число от 1 до 5. В некоторых вариантах осуществления каждый из a и b независимо представляет собой целое число от 1 до 3. В некоторых вариантах осуществления каждый из d, e, g, i, j и k независимо представляет собой целое число от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления каждый из d, e, g, i, j, и k независимо представляет собой 1.

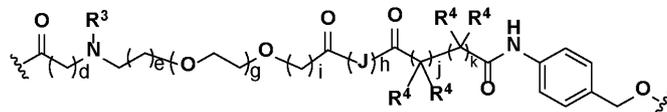
В некоторых вариантах осуществления h представляет собой целое число от 0 до 30. В некоторых вариантах осуществления h представляет собой целое число от 0 до 25. В некоторых вариантах осуществления h представляет собой целое число от 0 до 20. В некоторых вариантах осуществления h представляет собой целое число от 0 до 15. В некоторых вариантах осуществления h представляет собой целое число от 0 до 10. В некоторых вариантах осуществления h представляет собой целое число от 0 до 5. В некоторых вариантах осуществления h представляет собой целое число от 0 до 3. В некоторых вариантах осуществления h представляет собой целое число от 0 до 2. В некоторых вариантах осуществления h представляет собой 1. В некоторых вариантах осуществления h представляет собой 0.

В некоторых вариантах осуществления каждый E независимо выбран из группы, состоящей из



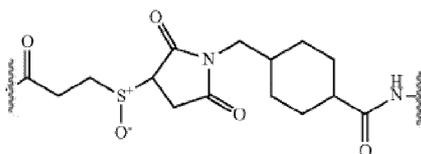
E9

и

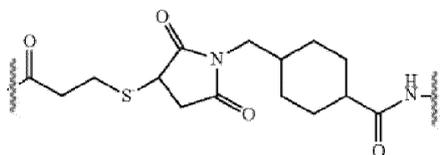


E10

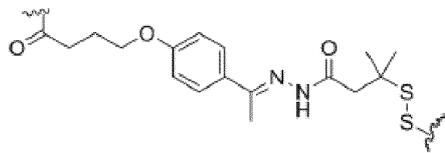
В неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления Е может иметь одну из следующих структур:



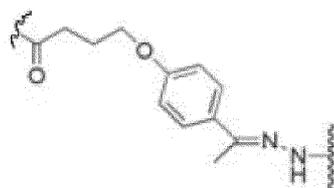
E11



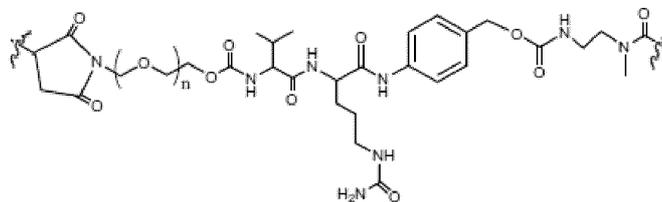
E12



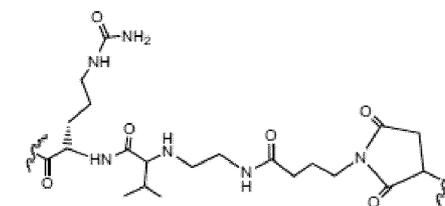
E13



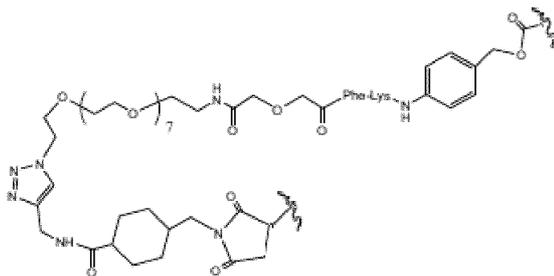
E14



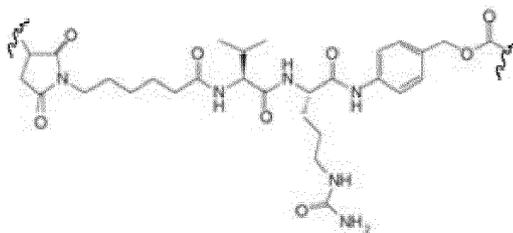
E15



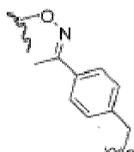
E16



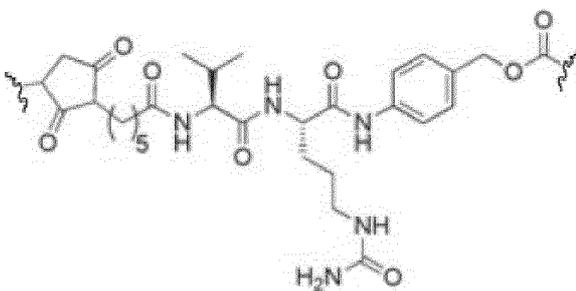
E17



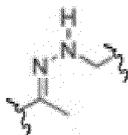
E18



E19



E20

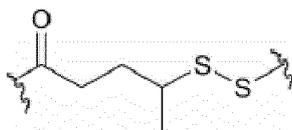


E21

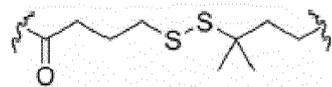


X = O, S, NH  
Y = CH<sub>2</sub>, NR, O

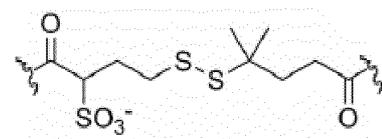
E22



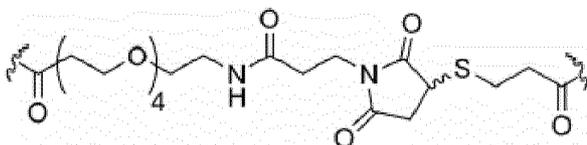
E23



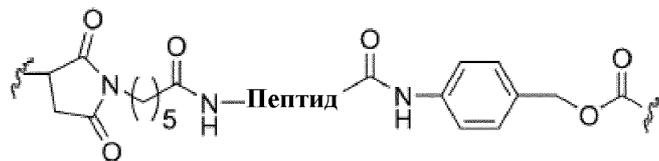
E24



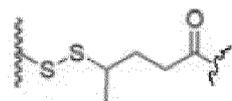
E25



E26



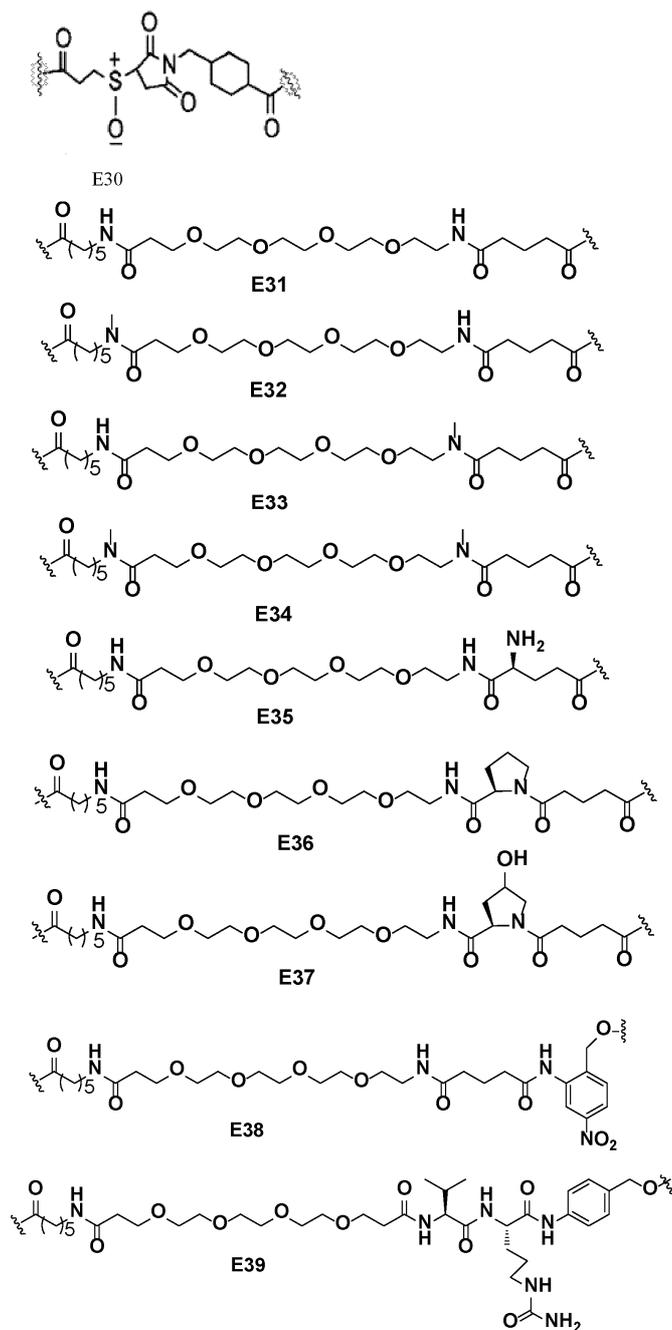
E27



E28



E29



Синтез соединений формулы I вполне входит в компетенцию специалиста в данной области техники. Не ограничиваясь каким-либо конкретным химическим подходом, легко осуществимые иллюстративные пути синтеза соединений и промежуточных продуктов формулы I изображены на фиг. 1 и 2.

Термин "напряженное кольцо" (A) в контексте данного документа относится к напряженному алкиновому или напряженному алкеновому кольцу.

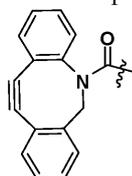
Напряженные алкиновые кольца (A) формулы I.

Напряженные алкиновые кольца (A), в отличие от линейных алкинов, имеют углы связей sp-гибридизованных атомов углерода менее чем в  $180^\circ$ . Напряженные алкиновые кольца могут быть замещенными у атомов кольца и/или на их боковых цепях. Напряженные алкины, как упоминается в данном документе, могут также включать производные соединения с реактивными функциональными группами для присоединения линкеров (E).

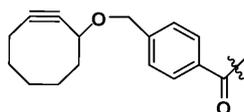
Напряженный алкин A формулы I позволяет ей активно реагировать с азид-содержащей NNAA в мягких условиях без дополнительных медных катализаторов. Препараты различных напряженных алкинов и их реакции с азидсодержащими соединениями хорошо известны в литературе, в том числе Martell et al., *Molecules*, 2014, 19(2), 1378-93; Sletten et al., *Org. Lett.* 2014, 16(6), 1634-7; Debets et al., *Acc. Chem. Res.* 2011, 44(9), 805-15; Jewett et al., *Org. Lett.* 2011, 13(22), 5937-9; Jewett et al., *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39(4), 1272-9; Bertozzi et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 3688; Jewetter al. *Chem. Soc. Rev.* 2010 Apr; 39(4):1272-9.

Неограничивающие иллюстративные варианты осуществления включают такие напряженные алкиновые реагенты, как дибензоциклооктин, циклоокт-4-инол, (1R,8S,9S)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметил N-сукцинимидила карбонат, а также их производные и аналоги.

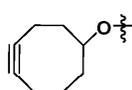
Напряженные алкины могут быть присоединены к линкеру (E), например, посредством амидной связи, аминной связи, эфирной связи или сложноэфирной связи



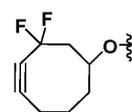
SA1



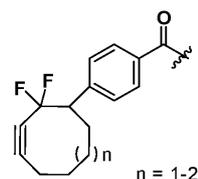
SA2



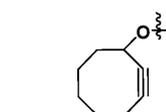
SA3



SA4



SA5

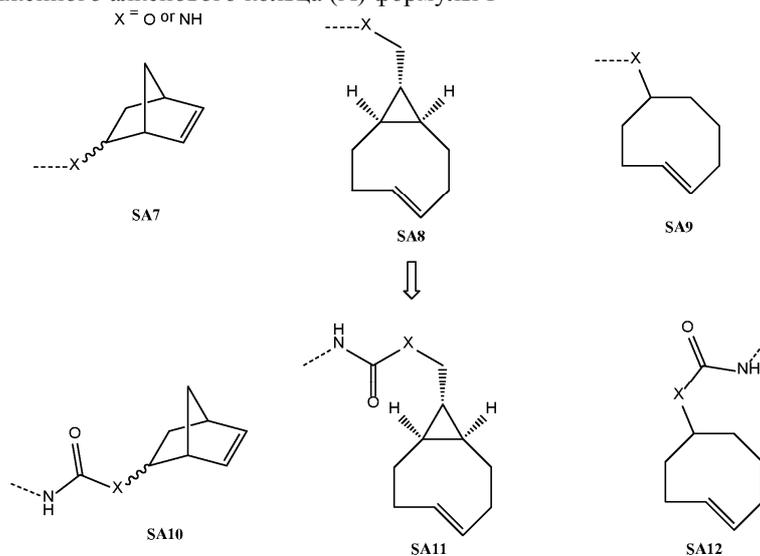


SA6

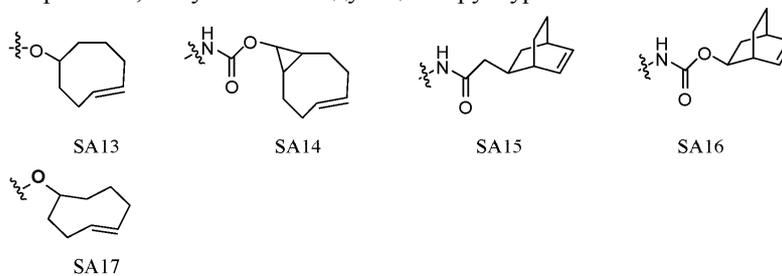
Реакции Дильса-Альдера с обратными электронными требованиями между напряженными алкенами (включая норборнены и транс-циклооктены) и тетразинами стали важным классом быстрых биоортгональных реакций. Реакции могут часто протекать при очень мягких условиях. Многие литературные источники описывают получение и реакции напряженных алкенов, включая Kim et al, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2013, 17(3), 412-9; Sečkutė et al, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2013, 17(5), 761-7; Seitchik et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134(6), 2898-2901; Taylor et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 9646; Devaraj et al., *Bioconjugate Chem.* 2008, 19, 2297; Devaraj N.K.; Weissleder R. *Acc. Chem. Res.* 2011, 44, 816; Taylor M.T. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 9646; Blackman M.L. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 13518.

Напряженные алкины могут быть присоединены к линкеру (E), например, с помощью эфира, амида, карбамата или сложного эфира.

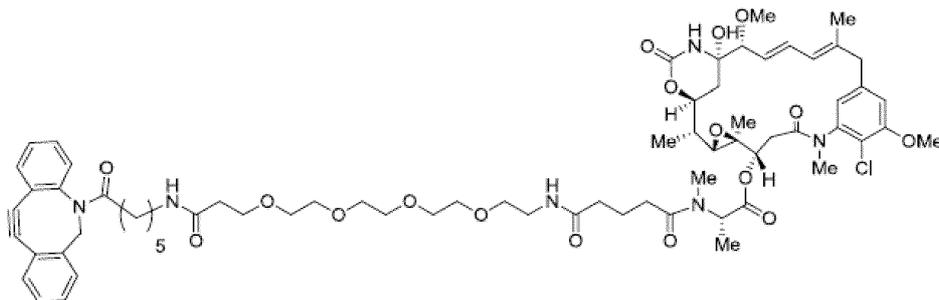
Пример напряженного алкенового кольца (A) формулы I



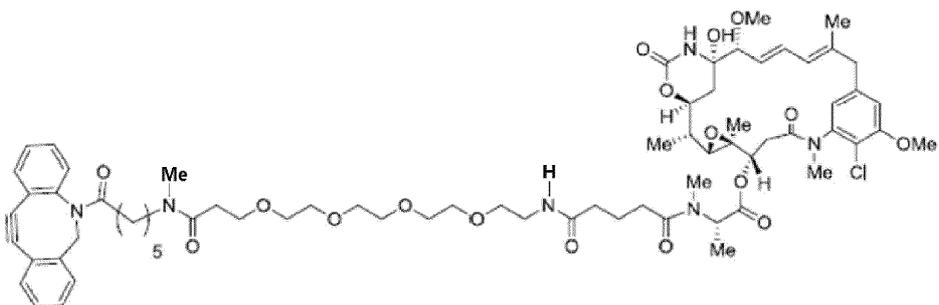
В неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления напряженные алкены, используемые в настоящем изобретении, могут иметь следующие структуры:



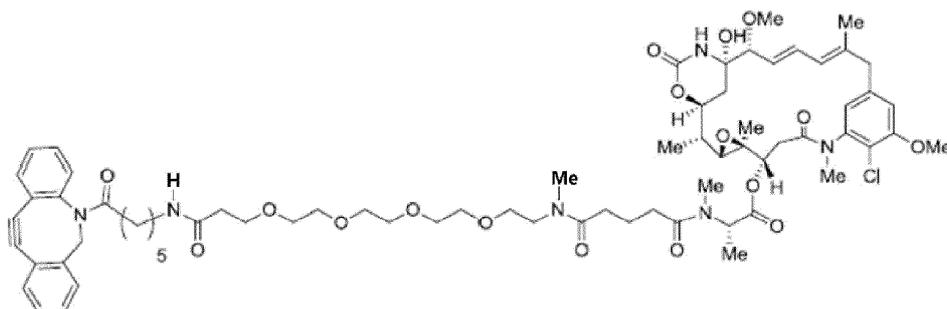
## Примеры соединений формулы I



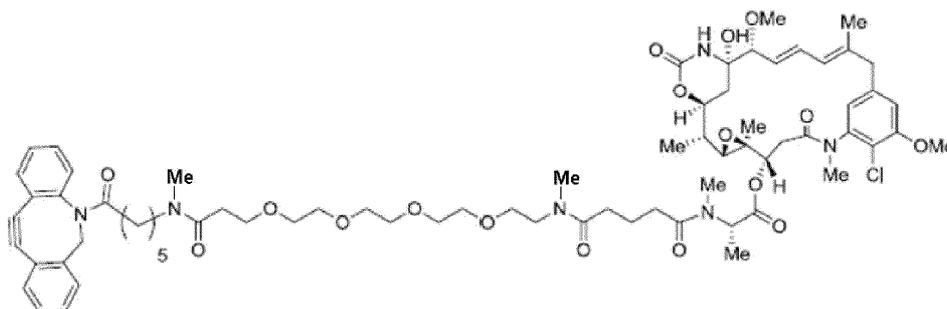
I17,



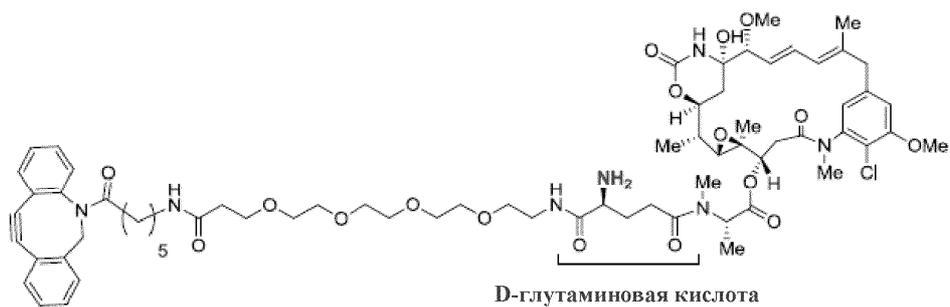
I18



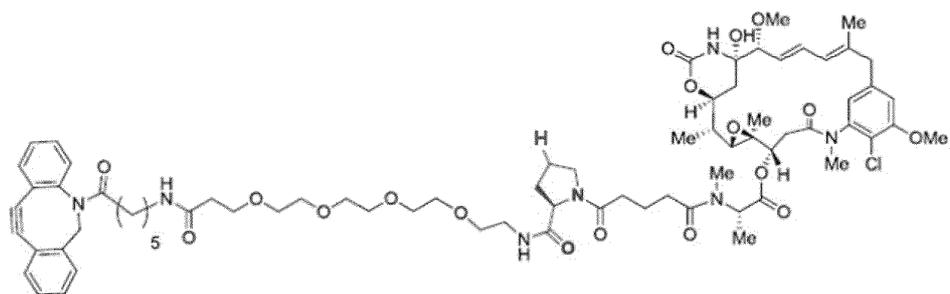
I19



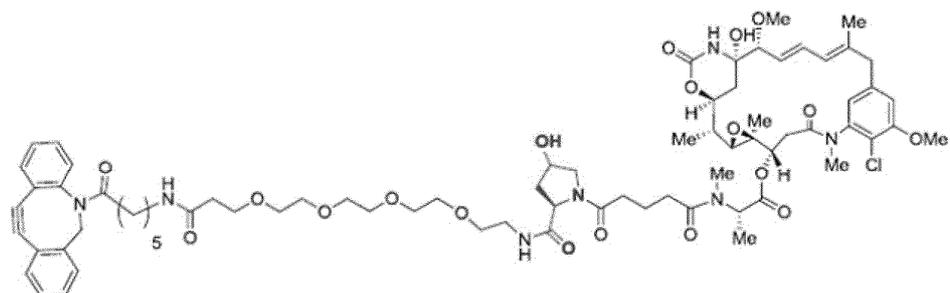
I20



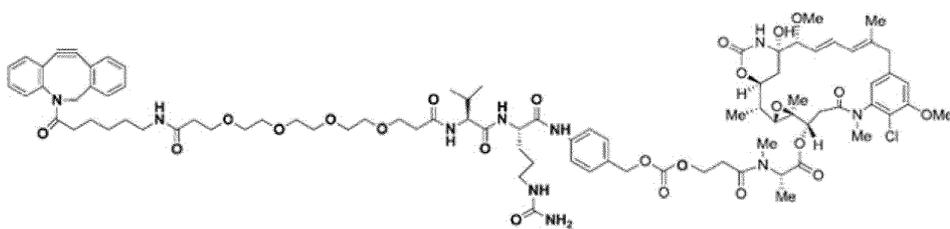
I21



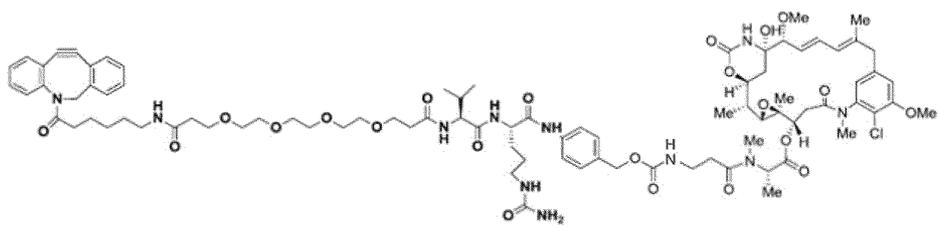
I22



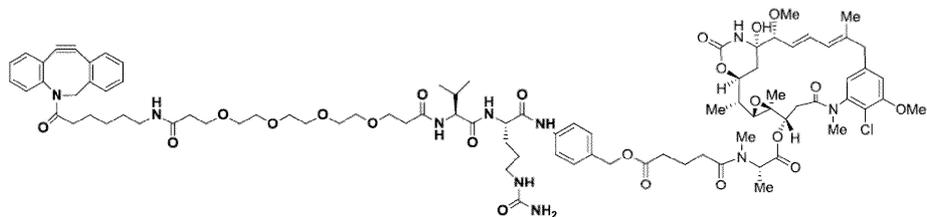
I23



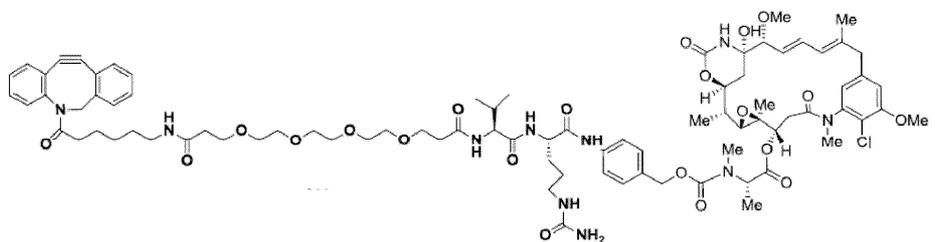
I24



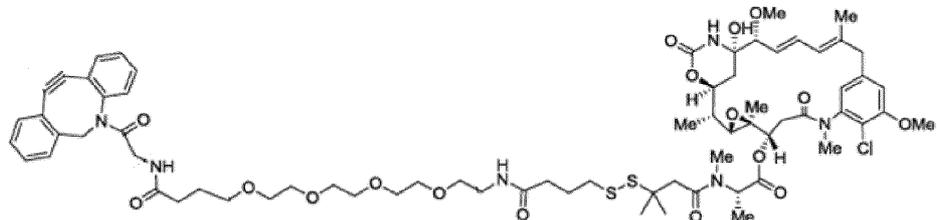
I25



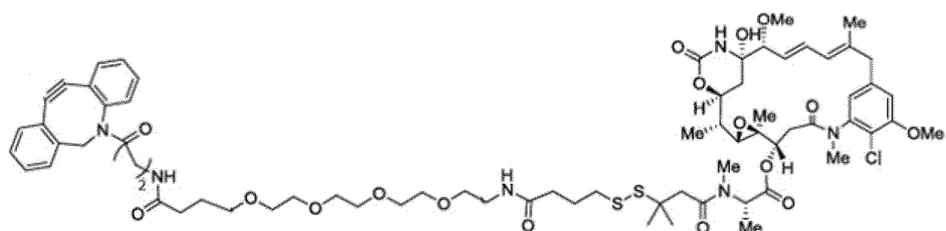
I26



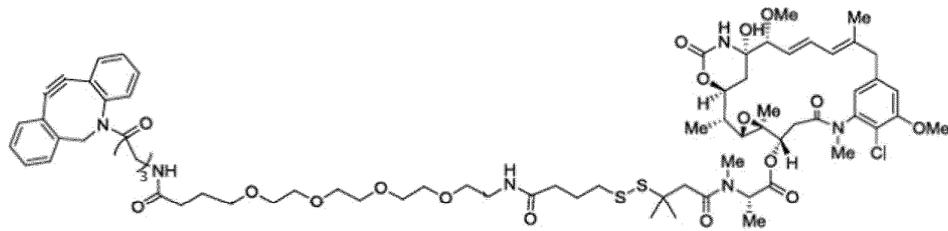
I27



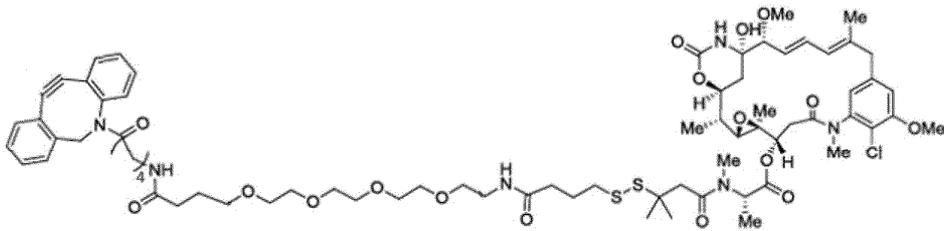
I28



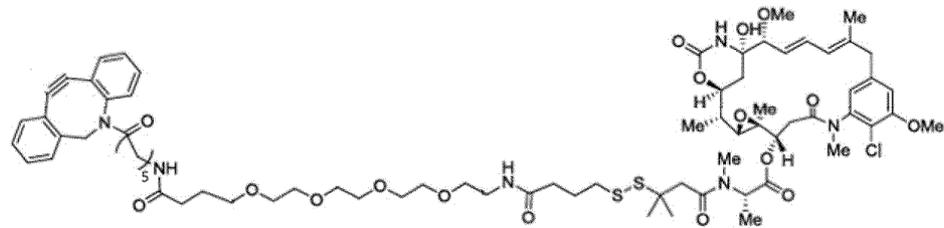
I29



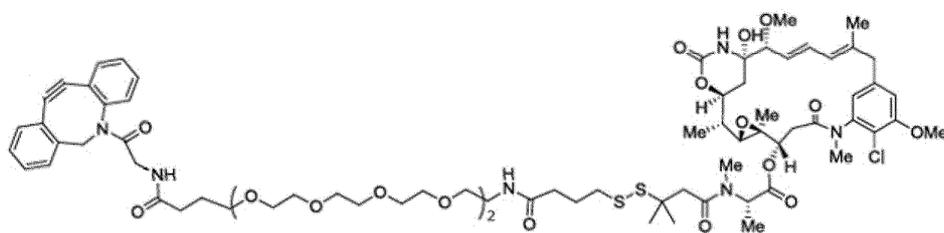
I30



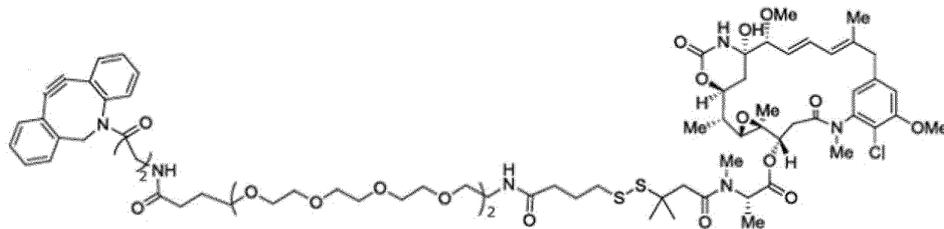
I31



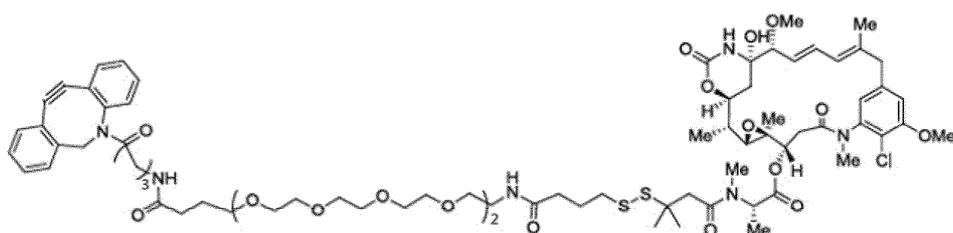
I32



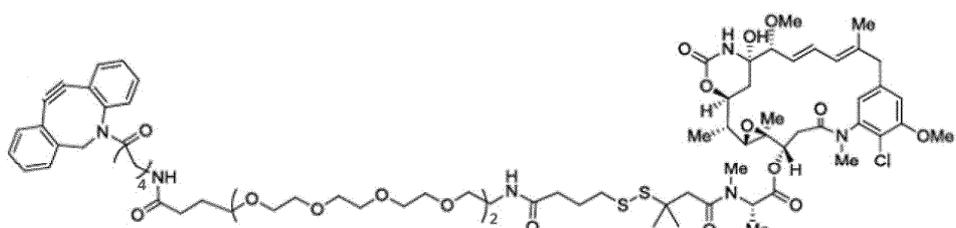
I33



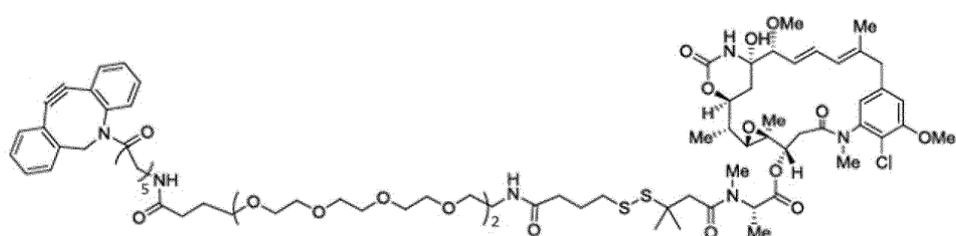
I34



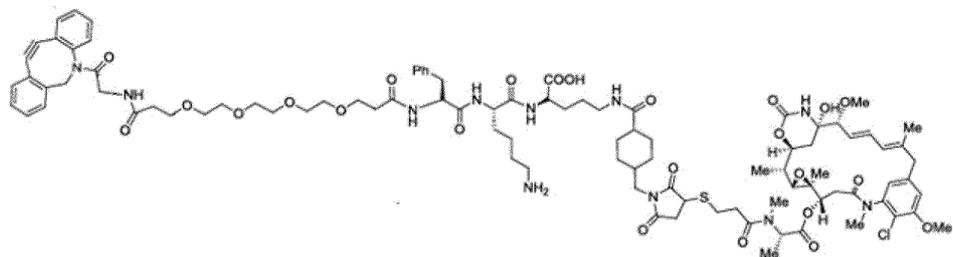
I35



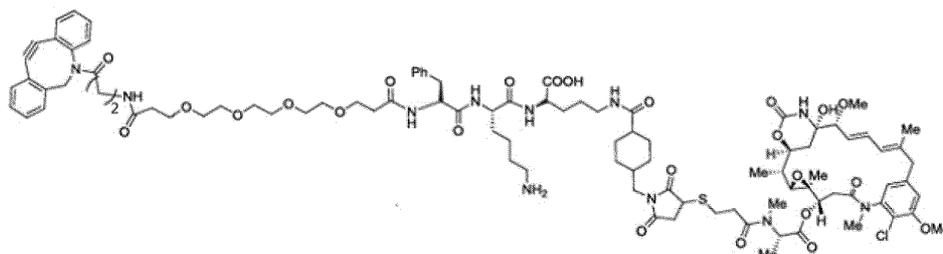
I36



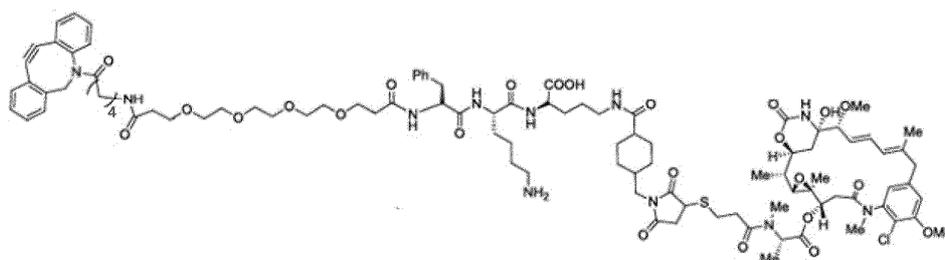
I37



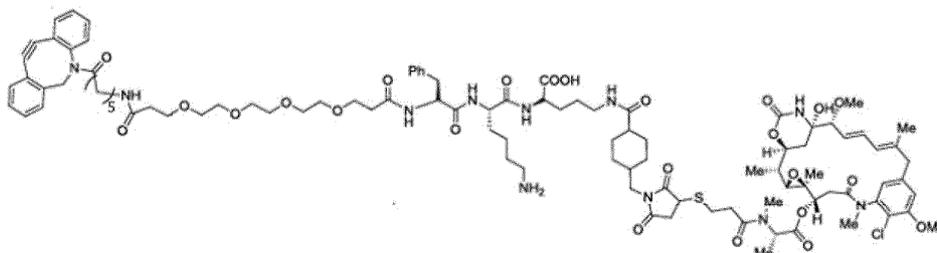
I38



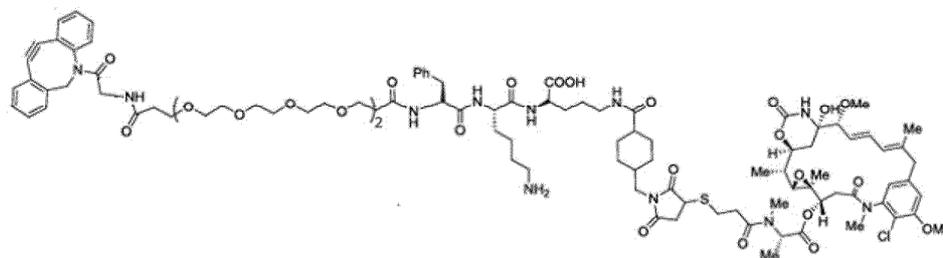
139



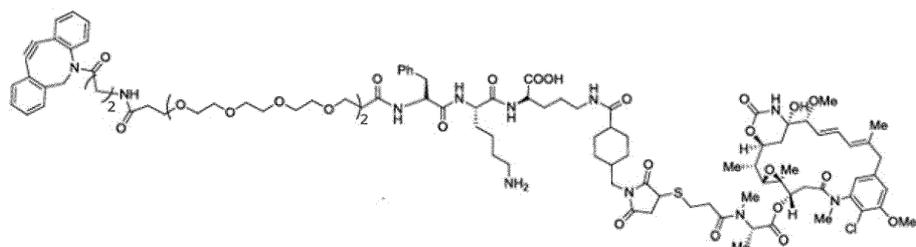
140



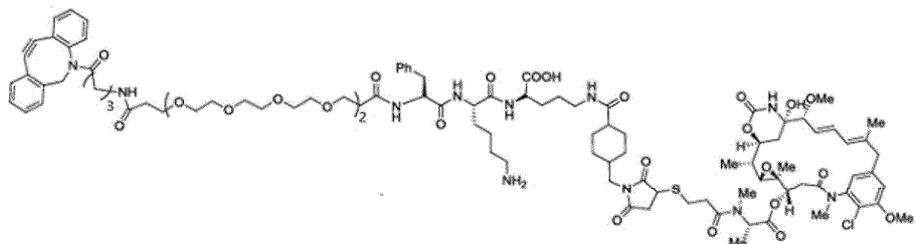
141



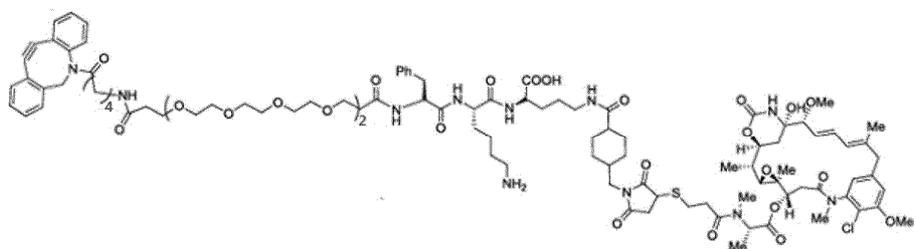
142



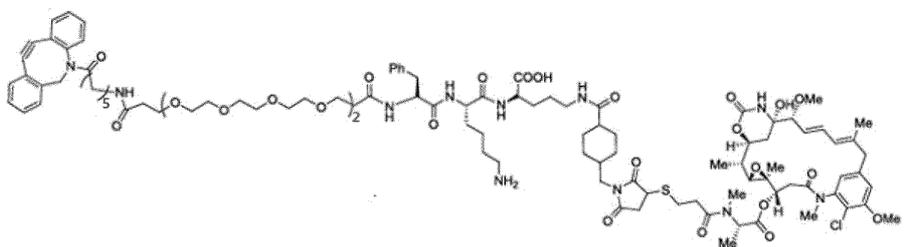
143,



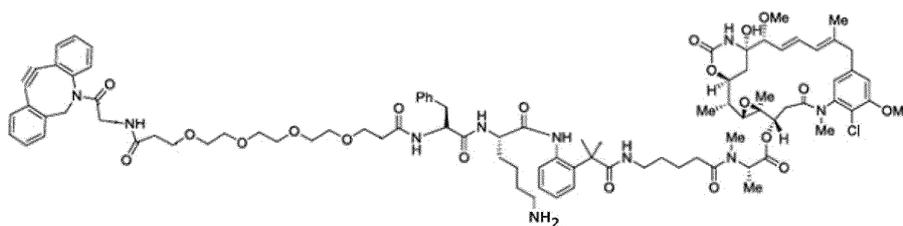
144,



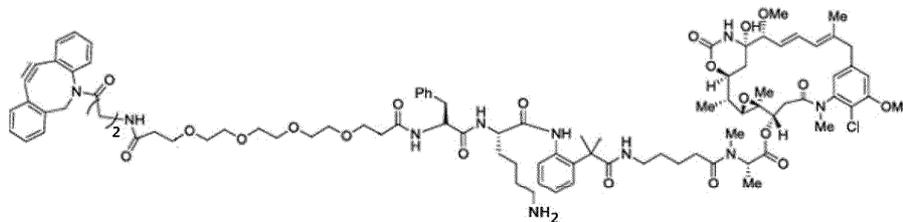
145,



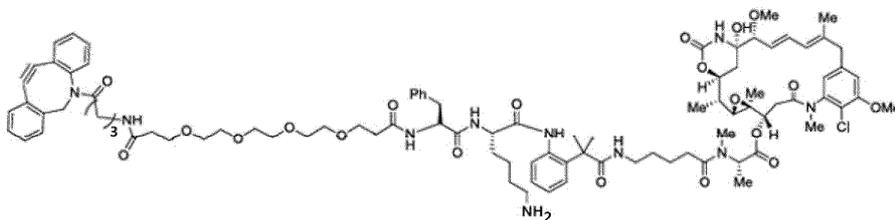
146,



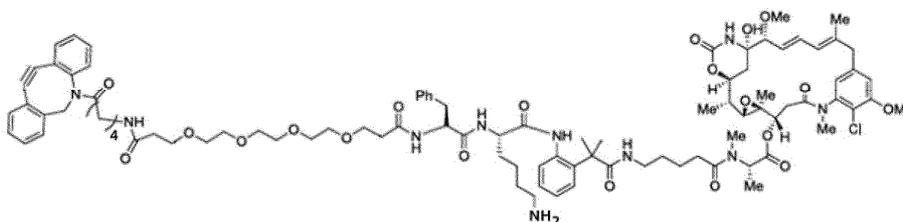
147,



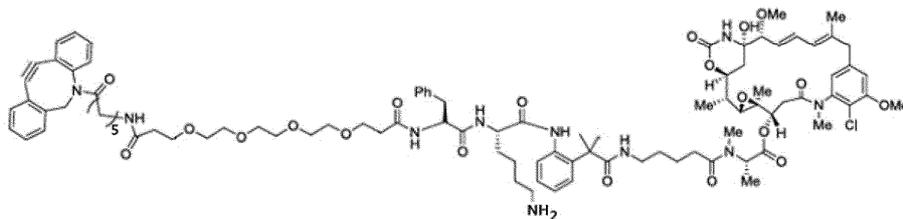
148,



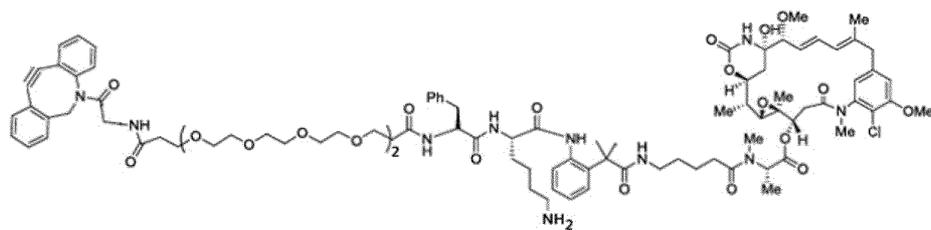
149,



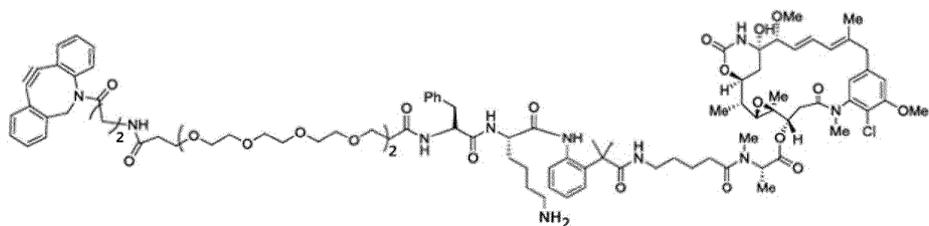
150,



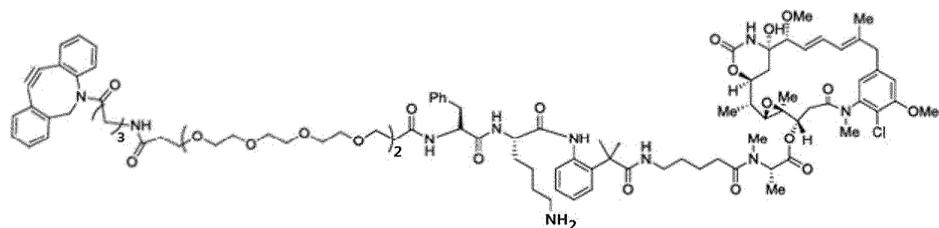
151,



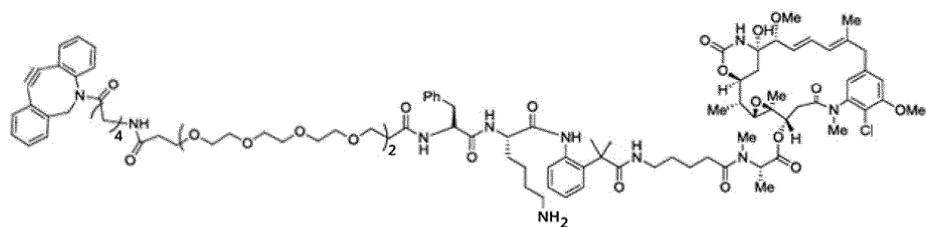
152,



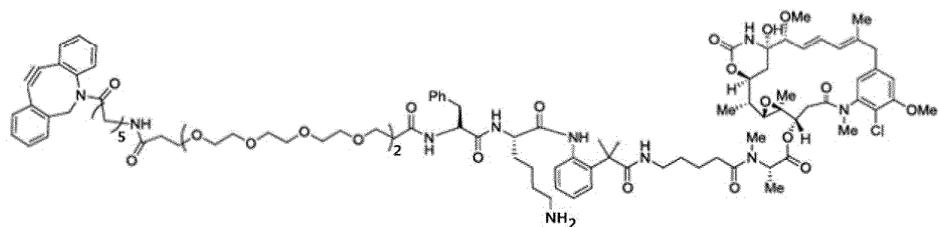
153,



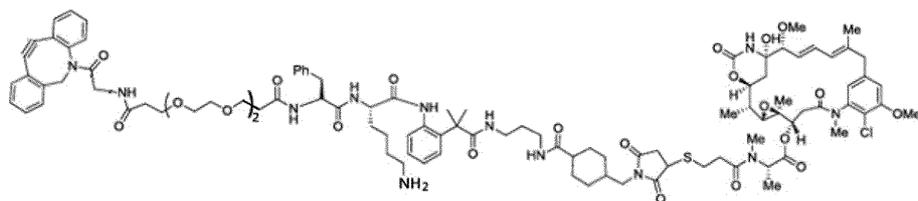
154,



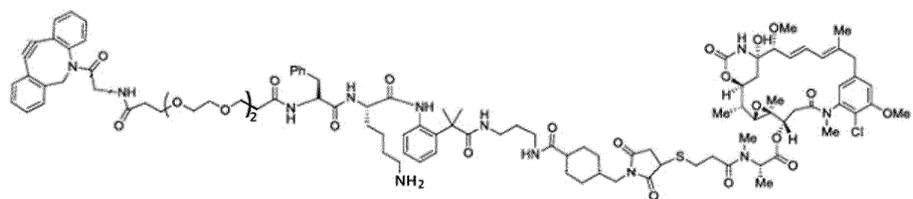
155,



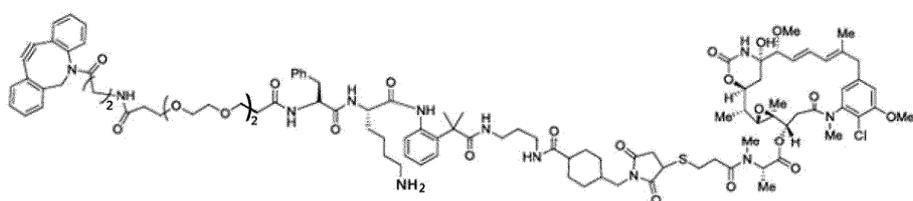
156,



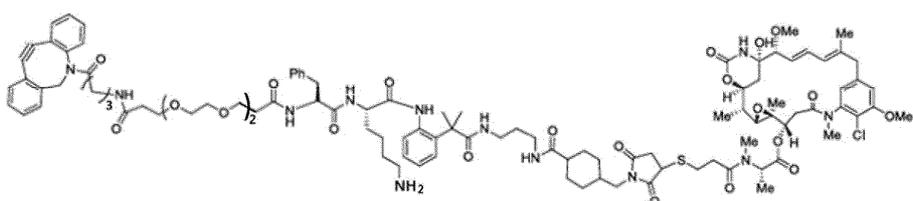
I57



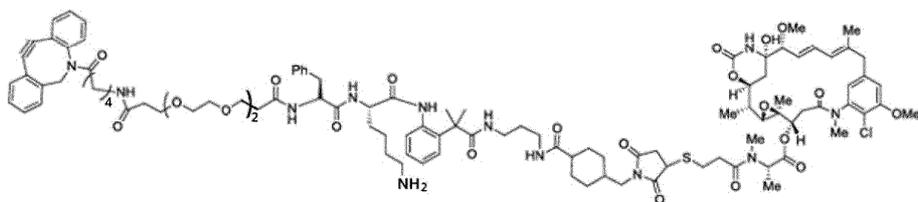
I58,



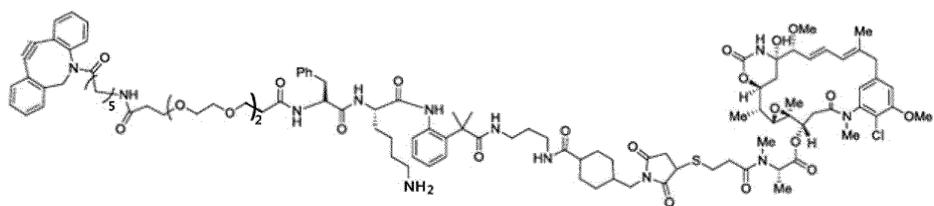
I59,



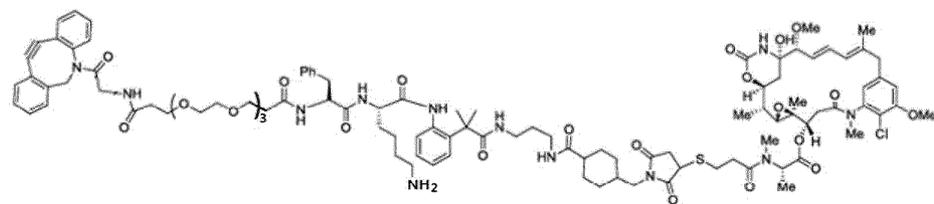
I60,



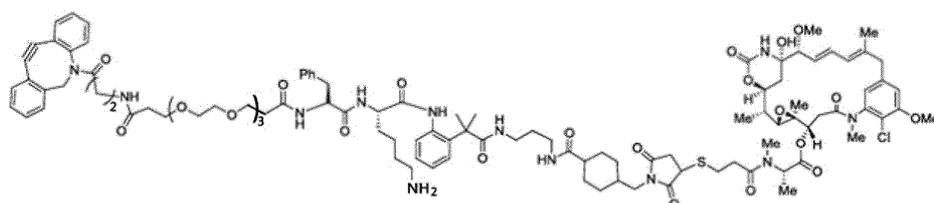
I61,



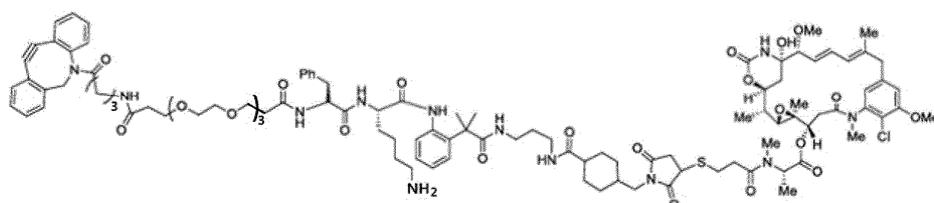
162,



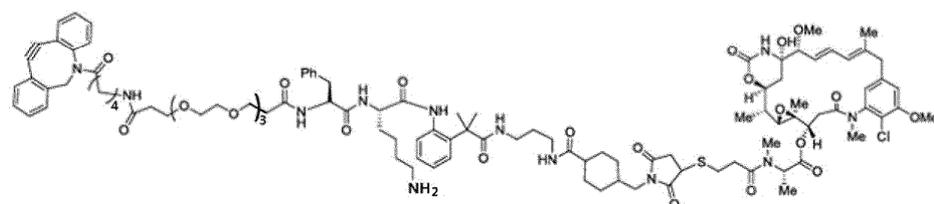
163,



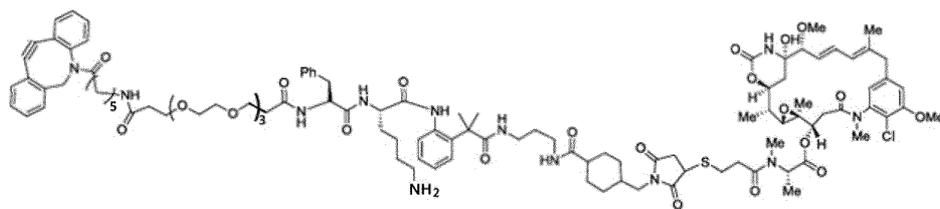
164,



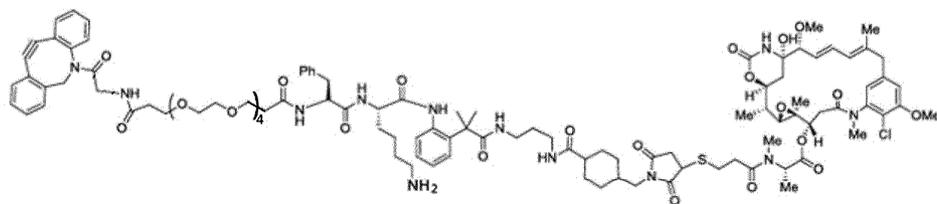
165,



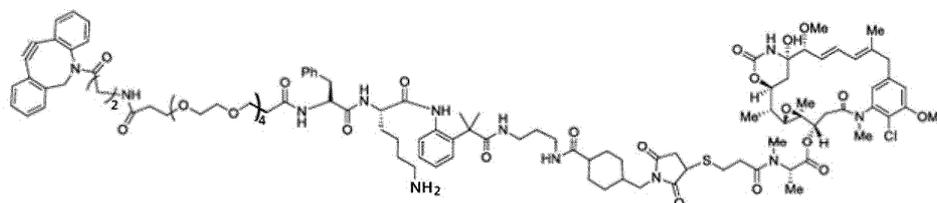
166,



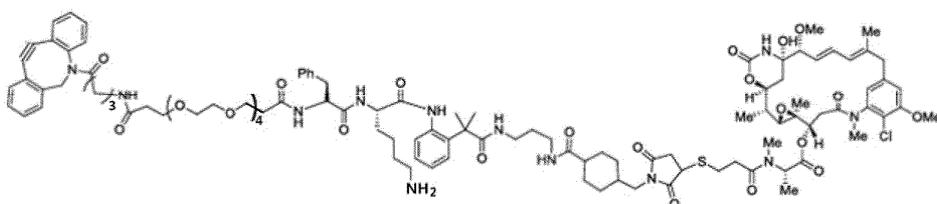
167,



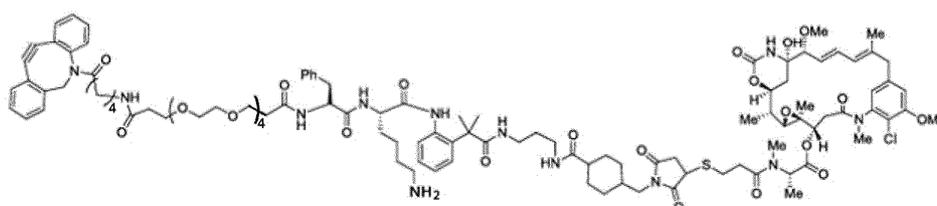
168,



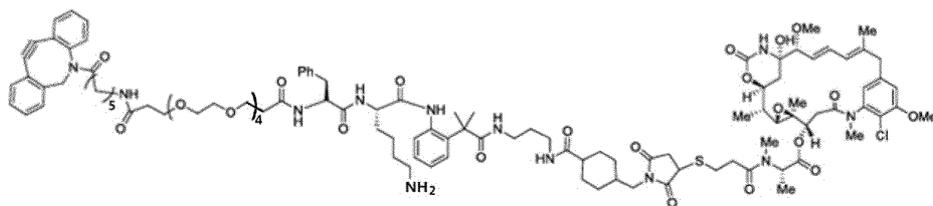
169,



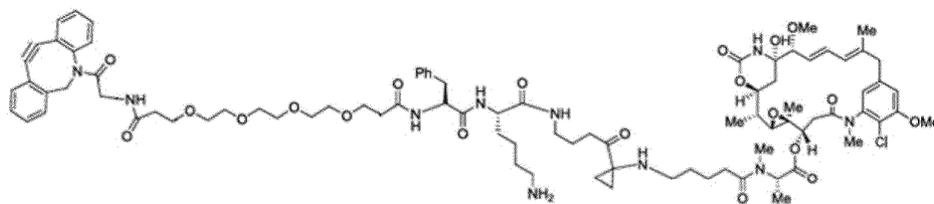
170,



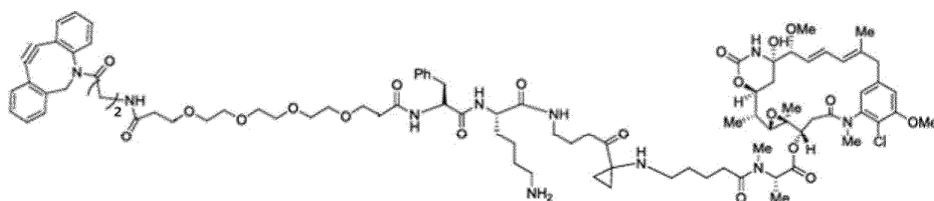
171,



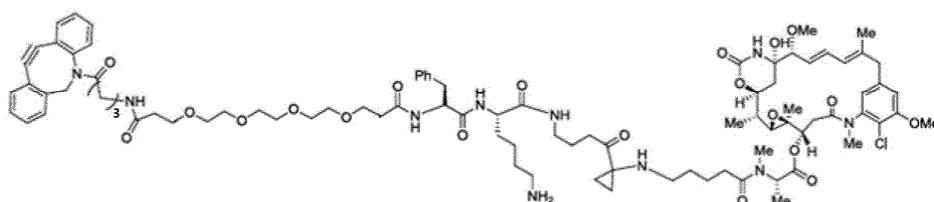
172,



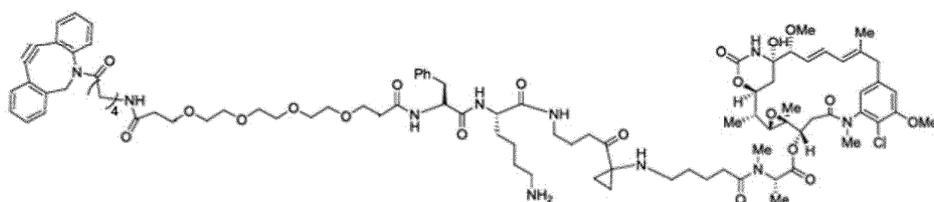
173,



174,

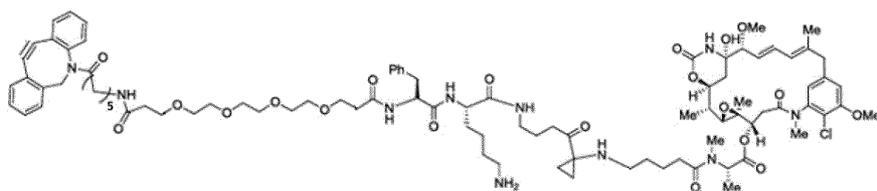


175,

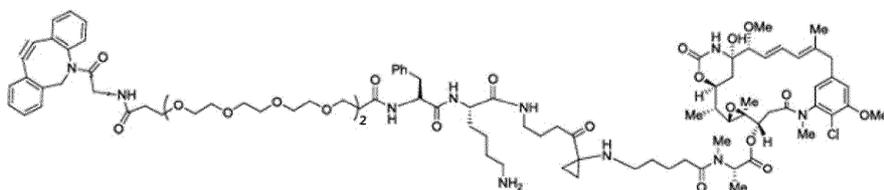


176,

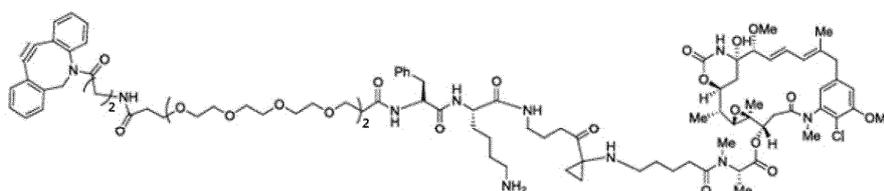
039794



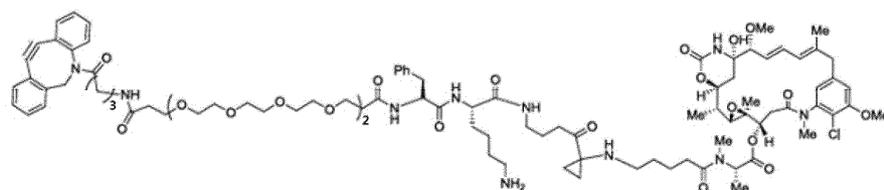
177,



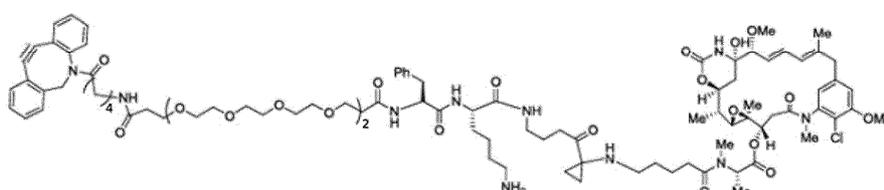
178,



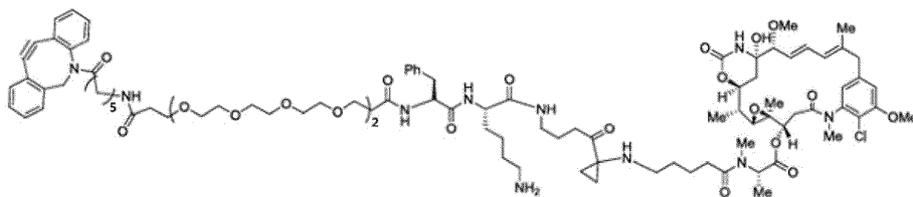
179,



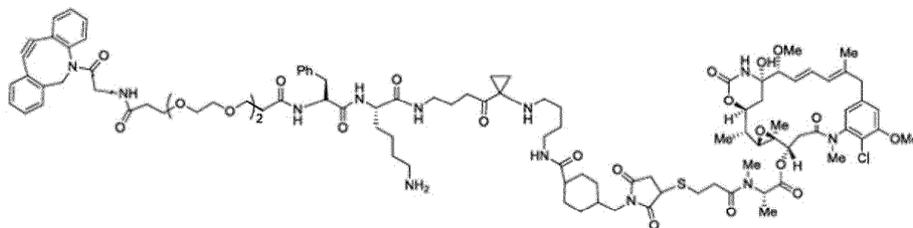
180,



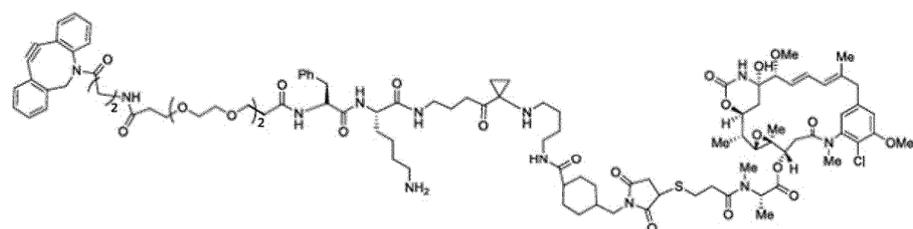
181,



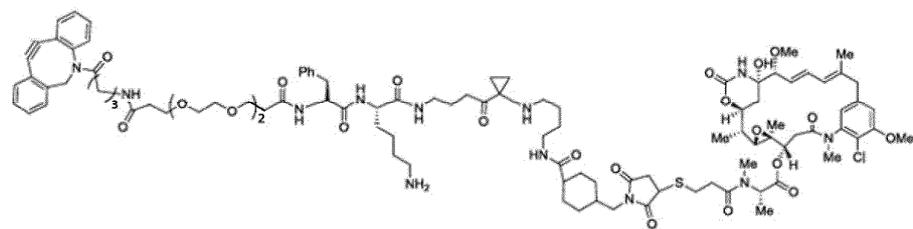
182,



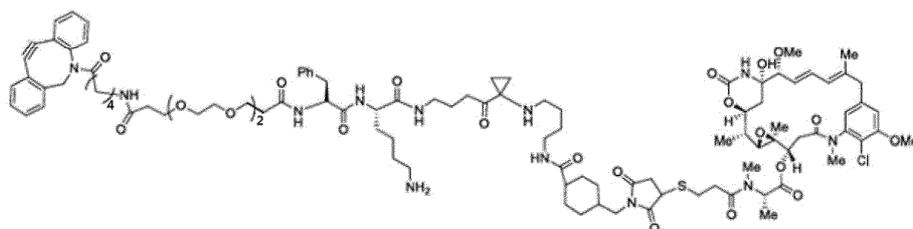
183,



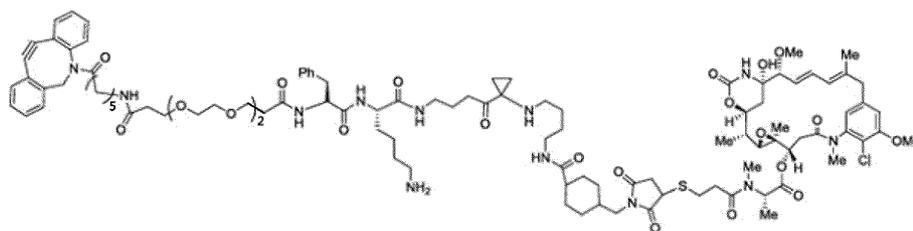
184,



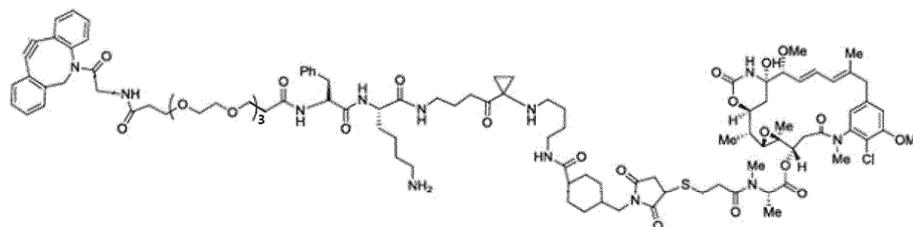
185,



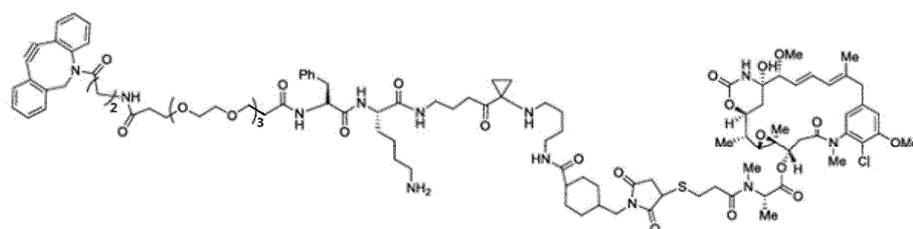
186,



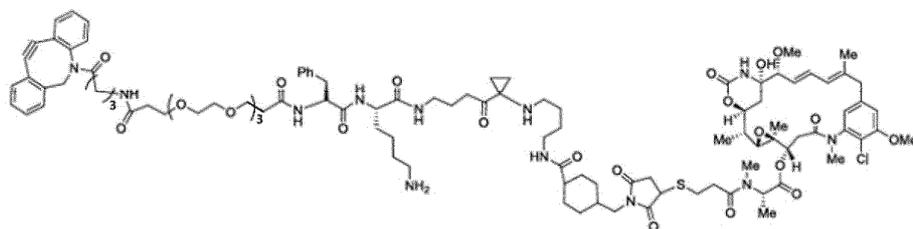
187,



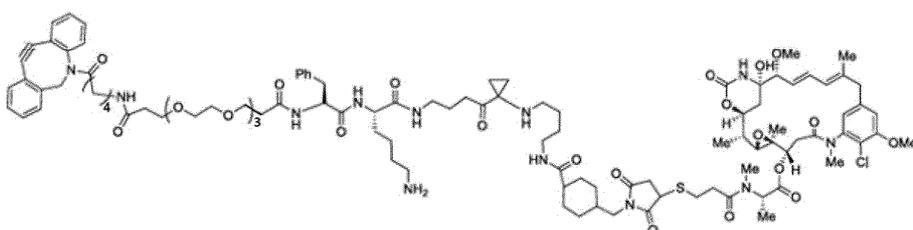
188,



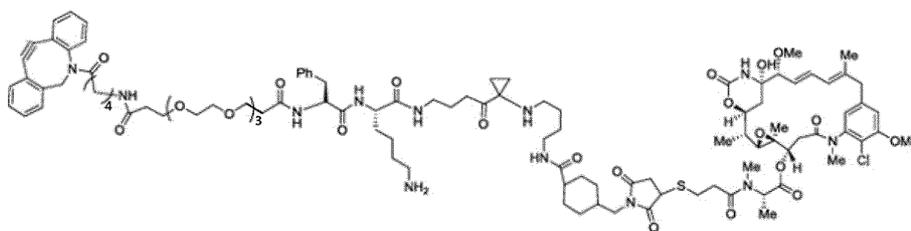
189,



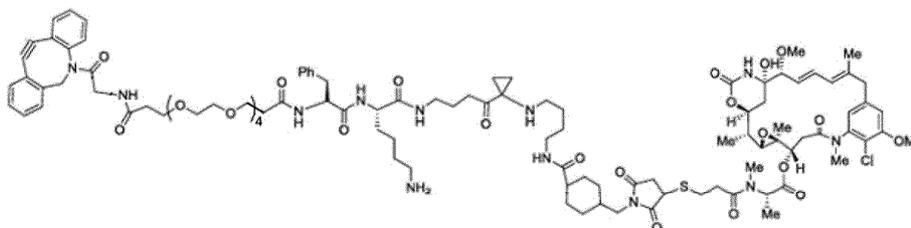
190,



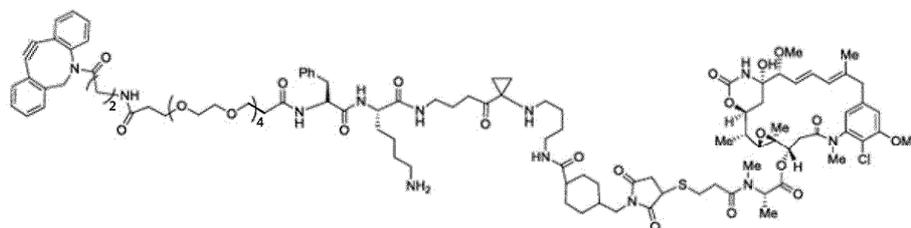
191,



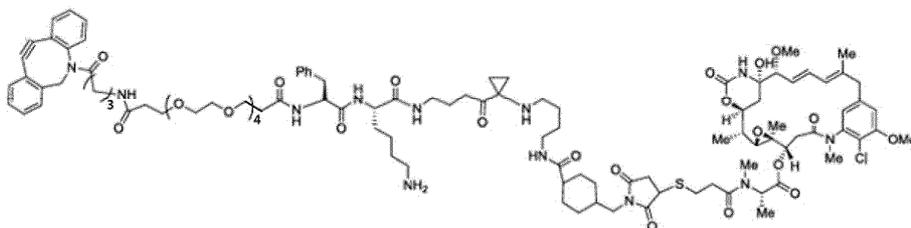
192,



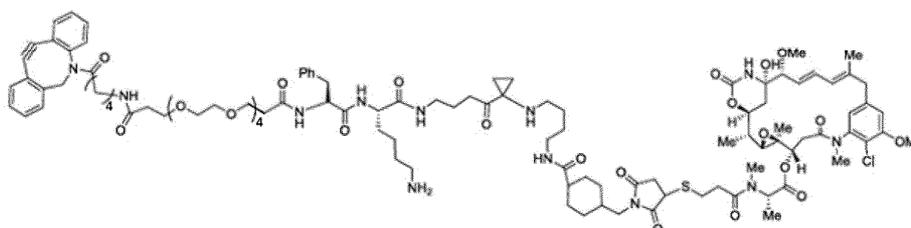
193,



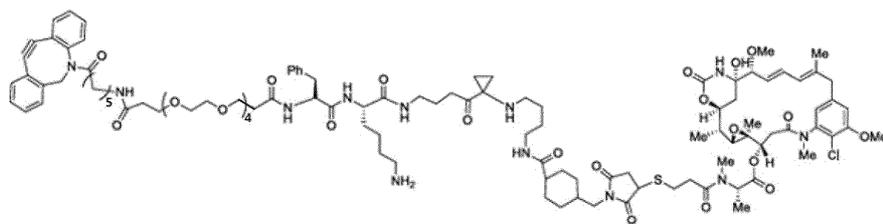
194,



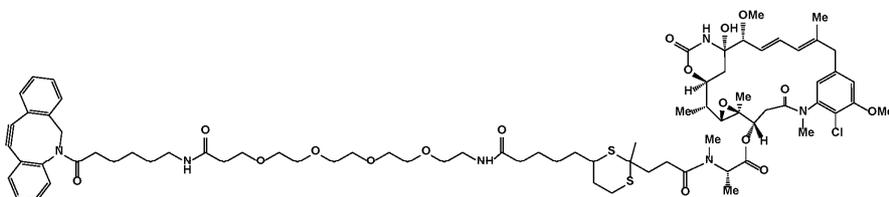
195,



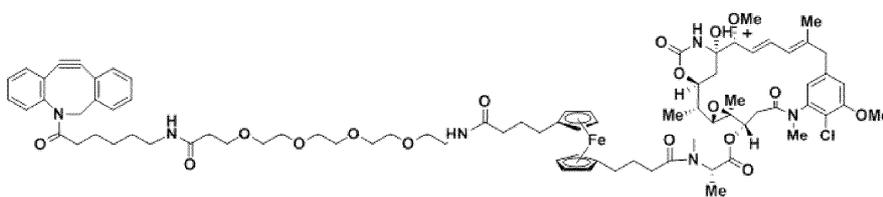
196,



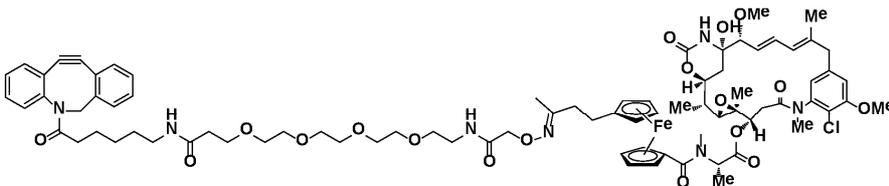
I97,



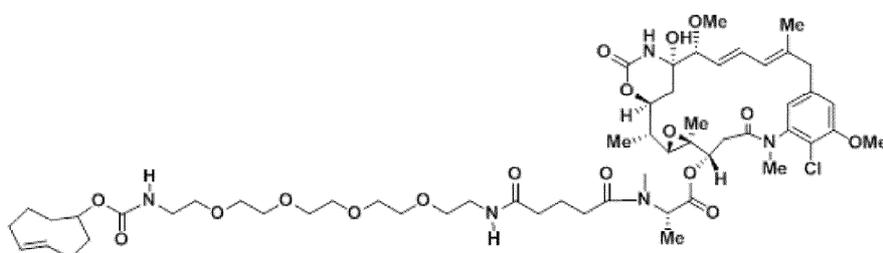
I98,



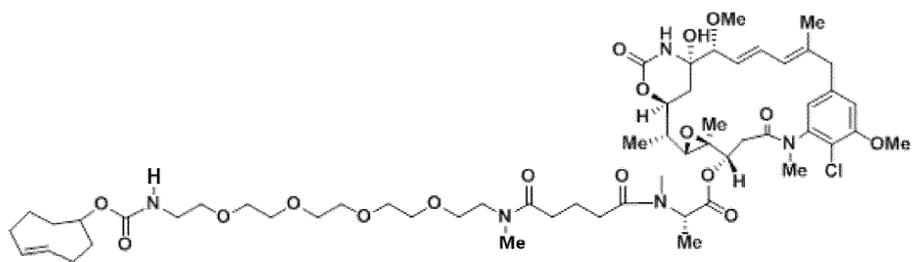
I99,



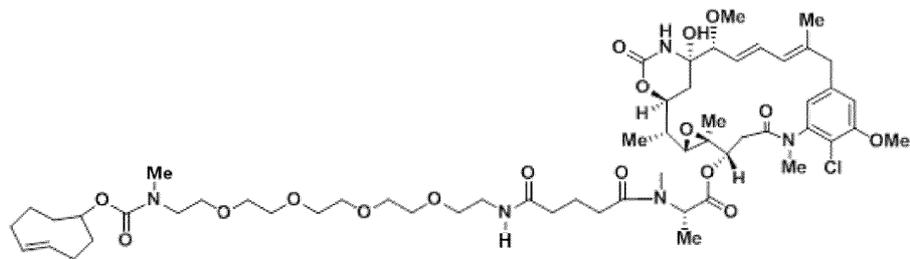
I100,



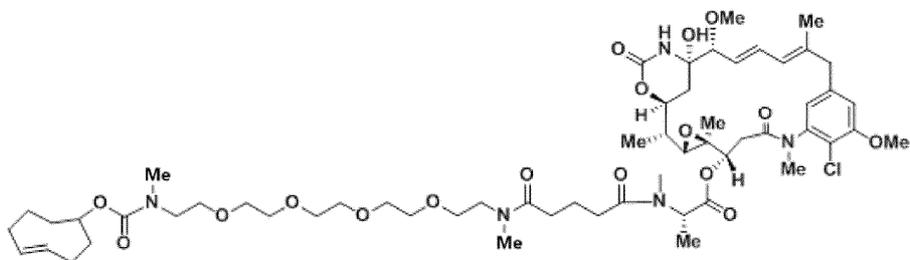
I101,



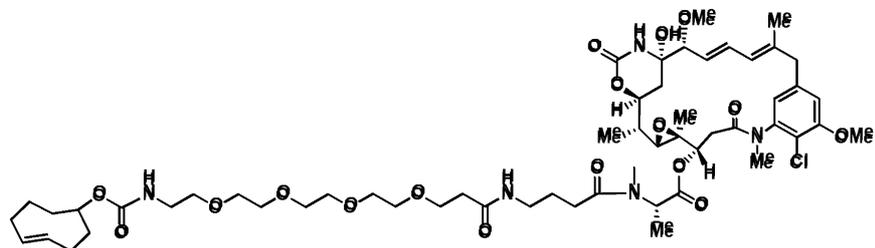
II02,



II03,



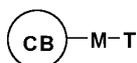
II04,



II05

Формула II.

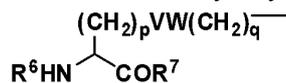
Настоящее изобретение предусматривает соединения формулы II следующим образом:



Формула II

где CB представляет собой клеточносвязывающее средство; M представляет собой аминокислоту неприродного происхождения; и T представляет собой азидную группу или тетразиновую группу.

В некоторых вариантах осуществления M имеет следующую структуру:



Формула IV,

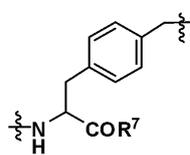
где каждый из p и q независимо представляет собой целое число от 0 до 10; R<sup>6</sup> представляет собой H, аминокислоту, полипептид, или группу модификации N-конца, или связь;

R<sup>7</sup> представляет собой OH, аминокислоту, полипептид, или группу модификации карбоксильного конца, или связь; V представляет собой алкил, арил, карбоцикл, гетероцикл или отсутствует; и

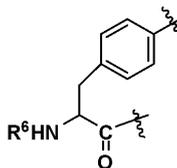
W представляет собой O, N, S или отсутствует; в случае если R<sup>6</sup> представляет собой связь, то аминокислота неприродного происхождения присоединена к клеточносвязывающему средству посредством R<sup>6</sup>, а когда R<sup>7</sup> представляет собой связь, аминокислота неприродного происхождения присоединена к клеточносвязывающему средству посредством R<sup>7</sup>.

В некоторых вариантах осуществления каждый из  $p$  и  $q$  независимо представляет собой целое число от 0 до 8. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $p$  и  $q$  независимо представляет собой целое число от 0 до 6. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $p$  и  $q$  независимо представляет собой целое число от 0 до 4. В некоторых вариантах осуществления каждый из  $p$  и  $q$  независимо представляет собой целое число от 0 до 2.

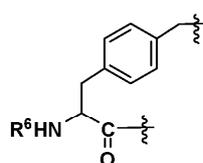
В неограничивающих иллюстративных вариантах осуществления  $M$  может иметь следующие структурные формулы:



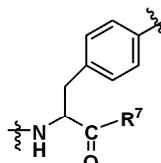
V



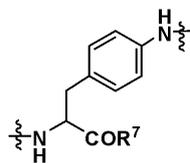
VI



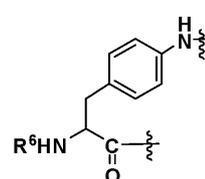
VII



VIII



IX



X.

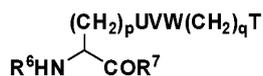
Аминокислоты не природного происхождения ( $M$ ) (фрагмент и точка ( $T$ ) присоединения линкера ( $E$ )).

NNAA ( $M$ ) несут боковую цепь ( $T$ ), которая представляет собой любой заместитель, отличающийся от боковых цепей, представленных в любой из двадцати аминокислот природного происхождения. Поскольку NNAA, как правило, отличаются от аминокислот природного происхождения только структурой боковой цепи, NNAA участвуют в образовании амидных связей с другими аминокислотами, включая без ограничения аминокислоты природного происхождения, таким же образом, каким они образуются во встречающихся в природе полипептидах, природного происхождения. Боковая цепь аминокислоты не природного происхождения необязательно содержит алкильную группу, арильную группу, ацильную группу, кетогруппу, азидогруппу, гидроксильную группу, гидразиновую группу, цианогруппу, группу галогена, гидразидную группу, алкенильную группу, алкинильную группу, группу простого эфира, тиольную группу, селеновую группу, сульфонильную группу, боратную группу, боронатную группу, фосфогруппу, фосфогруппу, фосфиногруппу, гетероциклическую группу, еноновую группу, иминогруппу, альдегидную группу, эфирную группу, тиокислотную группу, гидроксиламиновою группу, аминогруппу, тетразиновую группу или т.п. или любые их комбинации. Другие не встречающиеся в природе аминокислоты, представляющие интерес, которые подходят для применения согласно настоящему изобретению, включают без ограничения, аминокислоты, содержащие фотоактивируемый кросс-линкер, спин-меченые аминокислоты, флуоресцентные аминокислоты, металлсвязывающие аминокислоты, металлсодержащие аминокислоты, радиоактивные аминокислоты, аминокислоты с новыми функциональными группами, аминокислоты, которые ковалентно или нековалентно взаимодействуют с другими молекулами, фотоокисленные и/или фотоактивируемые аминокислоты, аминокислоты, содержащие биотин или аналог биотина, гликозилированные аминокислоты, такие как серин, замещенный сахаром, другие модифицированные углеводом аминокислоты, аминокислоты, содержащие кетогруппу, аминокислоты, содержащие полиэтиленгликоль или полиэфир, аминокислоты, замещенные атомом тяжелого металла, химически расщепляемые и/или фоторасщепляемые аминокислоты, аминокислоты с боковыми цепями, удлиненными по сравнению с аминокислотами природного происхождения, включающие без ограничения, полиэфир или длинноцепочечные углеводороды, включающие без ограничения более приблизительно 5 или более приблизительно 10 атомов углерода, аминокислоты, содержащие сахар, связанный с атомом углерода, редокс-активные аминокислоты, аминокислоты, содержащие тиаминокислоту и аминокислоты, содержащие один или несколько токсичных фрагментов. Различные аминокислоты не природного происхождения и их синтез представлены в US 7632924, US 20140046030, US 20140066598 и US 20140051836, полные раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки. На фиг. 8 показана NNAA, используемая согласно настоящему изобретению. Spicer C.D. et al., Nature Communica-

tions, 5:4740 (2014).

В некоторых вариантах осуществления аминокислоты, не закодированные естественным образом, включают функциональные группы боковых цепей, которые эффективно и селективно вступают в реакцию с функциональными группами, которые не обнаруживаются в 20 стандартных аминокислотах (включая без ограничения азидогруппы, кетогруппы, альдегидные группы и аминоксигруппы), с образованием стабильных конъюгатов. Например, клеточно-связывающее средство, включающее аминокислоту, не закодированную естественным образом, содержащую азидную функциональную группу, может вступать в реакцию с соединением, содержащим алкиновый фрагмент, с образованием стабильного конъюгата, полученного в результате селективной реакции азидной и алкиновой функциональных групп, с образованием продукта реакции циклоприсоединения Хьюсгена [3+2].

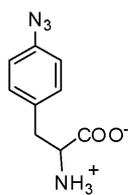
Иллюстративные азид-содержащие или тетразин-содержащие аминокислоты не природного происхождения для включения в клеточно-связывающее средство могут быть представлены следующим образом:



Формула XI

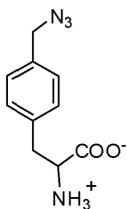
где каждый из  $p$  и  $q$  представляет собой 0-10;  $\text{R}^6$  представляет собой H, аминокислоту, полипептид или группу модификации аминоконца;  $\text{R}^7$  представляет собой OH, аминокислоту, полипептид или группу модификации карбоксиконца; U представляет собой карбонил, аминокарбониламино, карбамоил, аминокарбонилокси или отсутствует; V представляет собой алкил, арил, карбоцикл, гетероцикл или отсутствует; W представляет собой O, N, S или отсутствует; и T представляет собой азидогруппу или тетразиную группу.

В некоторых вариантах осуществления V представляет собой арил, а W отсутствует. В некоторых вариантах осуществления  $\text{R}^6$  представляет собой H, а  $\text{R}^7$  представляет собой OH. В некоторых вариантах осуществления U представляет собой карбонил, аминокарбониламино, карбамоил или аминокарбонилокси; V представляет собой гетероцикл или отсутствует; W отсутствует; и T представляет собой азидогруппу. В настоящем изобретении однозначно рассматриваются все изомеры, включая без ограничения таутомеры и стереоизомеры (R и S), в виде отдельного изомера или в виде смеси, и все солевые формы аминокислоты не природного происхождения. Иллюстративные азидосодержащие аминокислоты не природного происхождения включают без ограничения следующие:



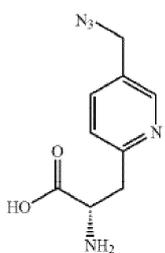
азидо-фенилаланин

M1

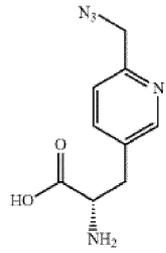


азидо-пара-метил-фенилаланин

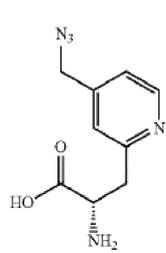
M2



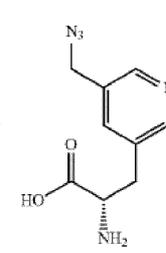
M3



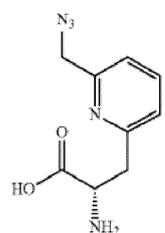
M4



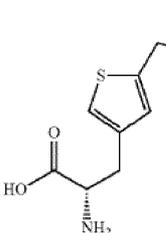
M5



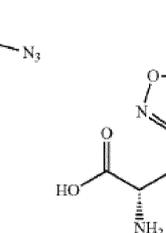
M6



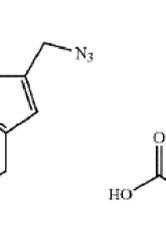
M7



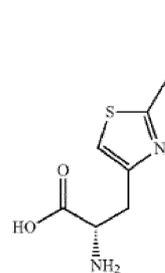
M8



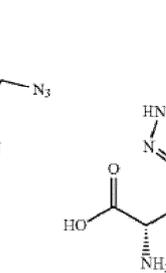
M9



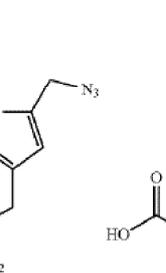
M10



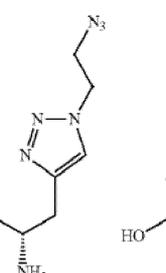
M11



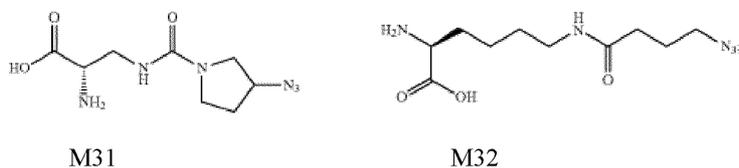
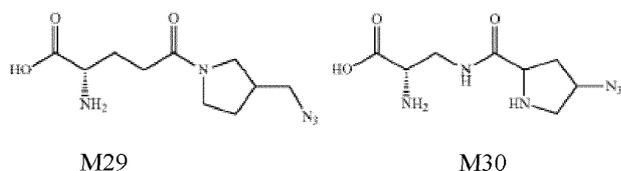
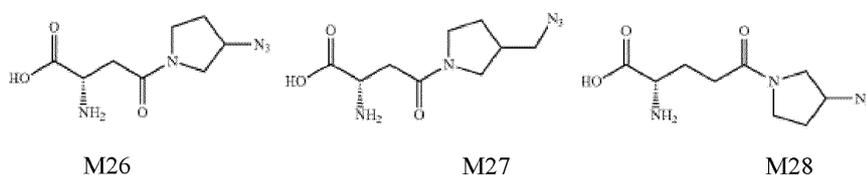
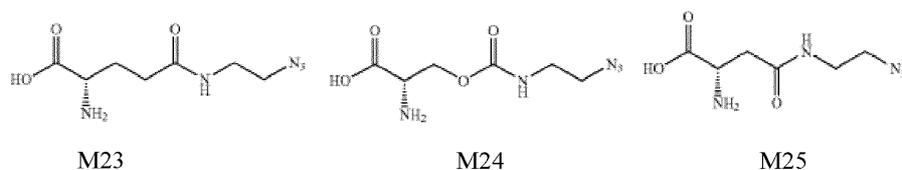
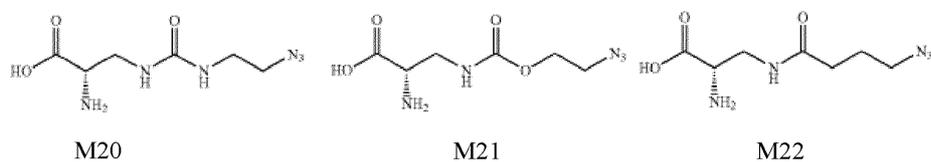
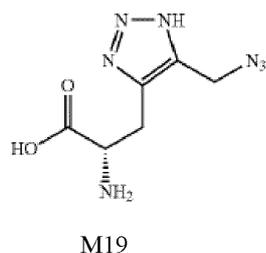
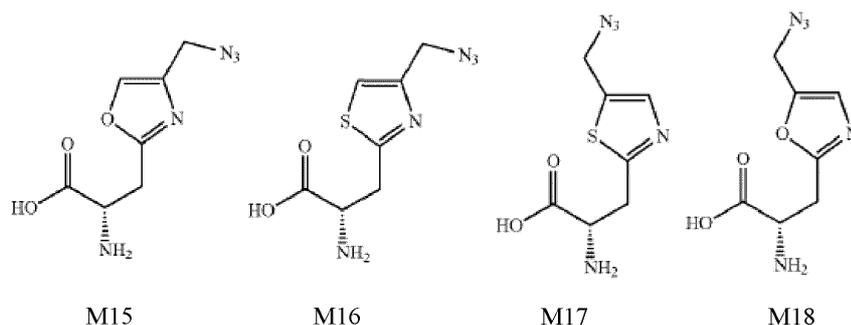
M12



M13



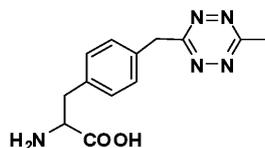
M14



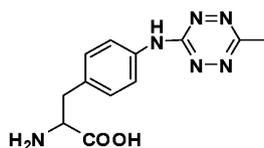
Согласно настоящему изобретению термины "азидо" и "азид" применяются взаимозаменяемо и оба относятся к  $-N_3$  группе. Многие азидсодержащие аминокислоты доступны в коммерческих источниках. Например, 4-азидофенилаланин можно приобрести в Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, Ill.). Коммерчески доступными от Sigma-Aldrich являются дициклогексиламмониевая соль (S)-5-азидо-2-(Pтос-амино)пентановой кислоты, дициклогексиламмониевая соль (S)-(-)-2-азидо-6-(Вос-амино)гексановой кислоты, циклогексиламмониевая соль (S)-2-азидо-3-(4-трет-бутоксифенил)пропионовой кислоты, циклогексиламмониевая соль (S)-2-азидо-3-(3-индолил)пропионовой кислоты, циклогексиламмониевая соль (S)-2-азидо-3-метилмасляной кислоты, циклогексиламмониевая соль (S)-2-азидо-4-(метилтио)бутановой кислоты, дициклогексиламмониевая соль (S)-2-азидо-3-фенилпропионовой кислоты и циклогексиламмониевая соль (S)-2-азидопропионовой кислоты. В случае тех азидсодержащих аминокислот, которые не являются коммерчески доступными, азидогруппу можно относительно легко получить, с приме-

нением общепринятых способов, известных специалистам в данной области техники, включая, например, вытеснение подходящей уходящей группы (включающей без ограничения галогенид, мезилат, тозилат) или путем раскрытия подходящим образом защищенного лактона. См., например, *Advanced Organic Chemistry by March* (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York).

Иллюстративные тетразин-содержащие аминокислоты не природного происхождения включают без ограничения следующие:



M33



M34

Тетразин-содержащие NNAА легко могут быть включены в состав пептидов и полипептидов клеточно-связывающих средств с применением методик, известных из литературы.

Аминокислоты не природного происхождения, замещенные азидом или замещенные тетразином, могут быть сайт-селективно включены в белки с применением описанных способов. Hallam T., et al. (SUTRO), *Future Med Chem.* 2014 Jul; 6(11): 1309-24 и *Bioconjug. Chem.* 2014 Feb 19;25(2):351-61; L. Wang et al., (2001), *Science* 292:498-500; J.W. Chin et al., *Science* 301:964-7 (2003); J.W. Chin et al., (2002), *Journal of the American Chemical Society* 124:9026-9027; J.W. Chin & P.G. Schultz, (2002), *Chem. Bio Chem.* 11:1135-1137; J.W. Chin et al., (2002), *PNAS* 99:11020-11024, L. Wang & P.G. Schultz, (2002), *Chem. Comm.*, 1-10.

Синтез биомолекул и NNAА.

Антитела, содержащие сайт-специфичные NNAА, можно получать, например, в прокариотической бесклеточной системе *in vitro*. *In vitro* сайт-специфичную вставку азидофенилаланина или азидо-пара-метил-фенилаланина, например, в растущий синтетический пептид с помощью ортогональной пары тРНК-синтеза/тРНК выполняют там, где нагруженная тРНК узнает стоп-кодон.

Масштабируемые бесклеточные системы синтеза белков известны из уровня техники для сайт-специфичной вставки NNAА и для полномасштабного производства антител, включающих дисульфидные мостики. Swartz J.R., et al. *Simplifying and Streamlining Escherichia Coli-Based Cell-Free Protein Synthesis.* *Biotechnol. Prog.* 28(2):413 (2012) PMID: 22275217; Swartz J.R. et al. *Cell-free Production of Antibody Fragment Bioconjugates for Ex Vivo Detection of Tumor Cells.* *Biochem Biophys Res Commun.* 390(3):971(2009) PMID: 19852937; Swartz J.R. et al., *An Integrated Cell-Free Metabolic Platform for Protein Production and Synthetic Biology.* *Mol. Syst. Biol.* 4:220 (2008). См., например, Swartz et al. Способы синтеза белков *in vitro* US 7338789 и связанных документах. US 8715958. См. также US 7332571, 7385028, 7696312, 7928163 и 8008428. Schultz P.G. et al. *Development of Improved tRNAs for In Vitro Biosynthesis of Proteins Containing Unnatural Amino Acids.* *Chem. Biol.* 3(12): 1033 (1996); Schultz P.G. et al. *A General Method for Site-Specific Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins.* *Science* 244(4901): 182 (1989); Dieter Soil et al. *When Protein Engineering Confronts the tRNA World.* *PNAS US* 94(19): 10007 (1997). Voloshin et al., 8778631 *Method for Introducing Non-Native Amino Acids into Preselected Positions of a Polypeptide Using a Cell-Free Synthesis System.* Сайт-специфичное *in vivo* встраивание не встречающихся в природе аминокислот, см., например, US 7045337; 8173392; 8114648; 8030074; 7915025; 7638300; 7368275; 8173364; 8183012; 7713721; 7354761; 7083970; 8012739; 7083970; 7432092; 8114629; 8071344; 7910345; 7524647; 7608423.

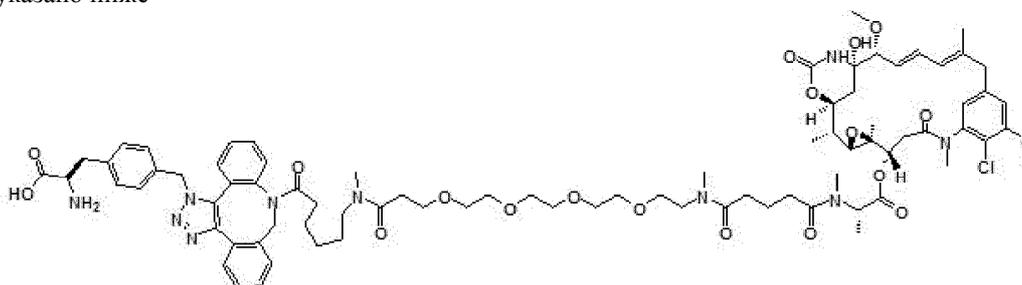
Активные продукты высвобождения.

Конъюгаты биомолекул по настоящему изобретению предусматриваются для введения млекопитающим, например, для лечения болезненных состояний. Конъюгаты биомолекул содержат биомолекулу, в которой по меньшей мере одна аминокислота не природного происхождения (NNAА) является встроенной в структуру биомолекулы и в которой NNAА представляет собой точку присоединения линкера, к которому присоединена полезная нагрузка, в частности цитотоксическое средство. После введения конъюгаты биомолекул по настоящему изобретению обычно высвобождают активные соединения, содержащие цитотоксическое средство полезной нагрузки.

Соответственно, другим аспектом настоящего изобретения является продукт высвобождения, соответствующий каждому из соединений формулы I, описанных в данном документе, содержащих полезную нагрузку. Дополнительный аспект настоящего изобретения представляет собой продукт высвобождения, соответствующий каждому соединению формулы I, описанному в данном документе, содержащему лин-

кер и полезную нагрузку.

Один вариант осуществления высвобождающегося активного соединения (соответствующий использованию NNAA азидо-пара-метил-фенилаланина (M2) и формулы I (соединение I4) по настоящему изобретению обычно содержит аминокислоту не природного происхождения, линкер и полезную нагрузку, как указано ниже



AR4

Данный активный продукт высвобождения, например, находится в региоизомерной форме. Поскольку I4 находится в виде двух региоизомеров, катаболит также находится в виде двух региоизомеров. Специалистам в данной области техники должно быть понятно с учетом данного раскрытия, что аналогичные активные продукты высвобождения, в основном содержащие аминокислоту не природного происхождения, линкер и полезную нагрузку, образуются в процессе/после введения конъюгатов биомолекул, описанных в данном документе. В соответствии с другим аспектом настоящее изобретение, примером которого является AR4, представляет собой продукт высвобождения, соответствующий каждому из соединений формулы I, описанных в данном документе, содержащих аминокислоту не природного происхождения, описанную в данном документе, линкер и полезную нагрузку.

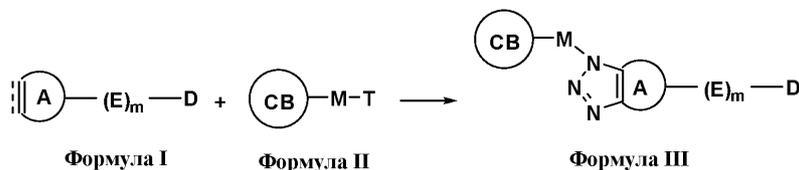
Получение конъюгатов биомолекул.

Образование конъюгатов формулы III посредством реакций 1,3-биполярного циклоприсоединения.

Реакция циклоприсоединения между соединениями формулы I, содержащими напряженный алкин, и соединениями формулы II, содержащими по меньшей мере одну аминокислоту не природного происхождения, замещенную азидом, представляет собой селективный и биосовместимый подход (циклоприсоединение [3+2] по азидной и тройной связям (или "клик"-реакция)) к получению конъюгатов формулы III.

Пунктирная линия формулы I (A) представляет напряженный алкин. Формула II (T) представляет собой азидогруппу в NNAA (M). Другие группы и заместители определены выше.

Схема I



Азидные функциональные группы и функциональные группы напряженного алкина в значительной степени инертны по отношению к биологическим молекулам в водной среде, что позволяет применять реакции циклоприсоединения азид-алкин, описанные в данном документе, для соединения цитотоксических средств (D), например, с клеточно-связывающими средствами (CB), как проиллюстрировано на схеме I. См., например, фиг. 6A.

Полученные триазолы имеют сходства с повсеместно распространенным амидным фрагментом, встречающимся в природе, однако, в отличие от амидов не подвержены гидролитическому или ферментативно катализируемому расщеплению. Кроме того, триазолы почти невозможно окислять или восстанавливать при физиологических условиях. Реакции циклоприсоединения, используемые при сборке конъюгатов по настоящему изобретению, также известные как "клик"-химия, представляют собой реакцию между 1,3-диполом, например азидом, и диполярофилом, например замещенным азидом, с образованием пятичленного кольца. Повышенная реакционная способность, возникающая из-за напряженного алкина, позволяет реакции циклоприсоединения между соединениями формулы I и соединениями формулы II плавно протекать при комнатной температуре без использования меди или других катализаторов. Методики для реакции циклоприсоединения без использования меди хорошо известны в области химии. См., например, Lutz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2008, 47(12), 2182-4; Bertozzi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 6974; Bertozzi et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 3688; Jewett et al., *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39(4), 1272-9, Schultz et al., *Org. Lett.* 2010, 12 (10), 2398-401, полный объем которых включен в данный документ посредством ссылки. Реакционные условия для универсального циклоприсоединения без использования меди на простых субстратах хорошо известны в данной области техники (например, комнатная температура в случае ацетонитрила). См., например, фиг. 6A.

Способы получения биомолекул, содержащих по меньшей мере одну азидзамещенную NNAA,

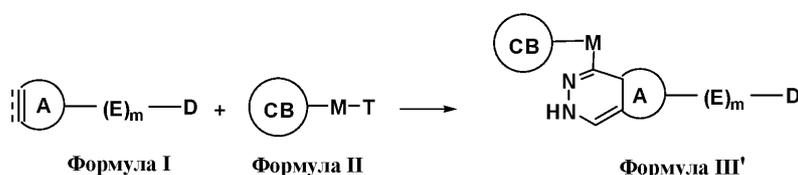
предпочтительно множество каждой из них, например, 2-50, 2-25, 2-15, 2-10 или 2-5 каждой из них, принадлежат к объему настоящего изобретения, описанного в данном документе. Дополнительно, способы получения биомолекул, например, молекул антител по меньшей мере с одной молекулой полезной нагрузки, конъюгированной посредством циклоприсоединения [3+2] по азидной и тройной связям, принадлежат к объему настоящего изобретения, описанного в данном документе. Биомолекулы, например, молекулы антител с множеством, например, 2-100, 2-50, 2-25, 2-10 или 2-5 молекулами полезной нагрузки, конъюгированной посредством циклоприсоединения [3+2] по азидной и тройной связям, принадлежат к объему настоящего изобретения, описанного в данном документе.

Образование конъюгатов формулы III' посредством реакций циклоприсоединения 4+2.

В качестве альтернативного химического подхода к циклоприсоединению [3+2] по азидной и тройной связям (или "клик"-реакции), реакция напряженной транс-двойной связи (напряженного алкена) с тетразиновым фрагментом приводит к циклоприсоединению [4+2] с последующим вытеснением N<sub>2</sub> с образованием циклического диазена. См., например, фиг. 6B.

Подобно реакции между алкином и азидом, напряженный алкен и тетразин подвергаются циклоприсоединению [4+2] при мягких условиях с получением конъюгатов формулы III', как показано на схеме II. В формуле I (A) пунктирная линия отсутствует, т.е. напряженный алкен (а не напряженный алкин), а формула II (T) представляет собой тетразиновую группу на NNAA (M).

Схема II



Реакционные условия и процедуры для осуществления соединения напряженных алкенов и тетразиновых фрагментов, как обсуждалось и проиллюстрировано в данном документе, хорошо известны в данной области техники. Реакции напряженных алкенов и тетразиновых фрагментов, проводимые таким образом, описаны, например, в Wang et al., *Nature Chem.* (2014) 6, 393-403; Kim et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2013) 17(3), 412-9; Sečkutè et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2013) 17(5), 761-7; Lang et al., *Nature Chem.* (2012) 4, 298-304; Seitchik et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2012) 134(6), 2898-2901; Taylor et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2011) 133, 9646; Devaraj et al., *Bioconjugate Chem.* (2008) 19, 2297; Devaraj et al., *Acc. Chem. Res.* (2011) 44, 816; Taylor et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2011) 133, 9646; Blackman et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2008) 130, 13518, все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

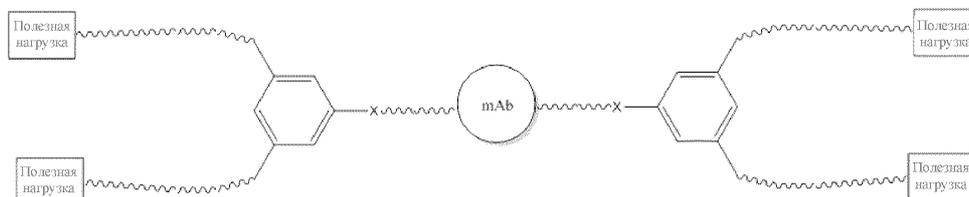
Способы получения биомолекул, которые содержат по меньшей мере одну NNAA, замещенную тетразином, предпочтительно множество каждой из них, например, 2-50, 2-25, 2-15, 2-10 или 2-5 каждой из них, принадлежат к объему настоящего изобретения, описанного в данном документе. Дополнительно, способы получения биомолекул, например, молекул антител по меньшей мере с одной молекулой полезной нагрузки, конъюгированной посредством циклоприсоединения [4+2] по напряженному алкену и тетразиновому фрагменту, принадлежат к объему настоящего изобретения, описанного в данном документе. Биомолекулы, например, молекулы антител с множеством, например, 2-100, 2-50, 2-25, 2-10 или 2-5 молекулами полезной нагрузки, конъюгированными посредством циклоприсоединения [4+2] по напряженному алкену и тетразиновому фрагменту, принадлежат к объему настоящего изобретения, описанного в данном документе.

Различные молекулы полезной нагрузки (D) могут быть конъюгированы с одной и той же биомолекулой, сначала посредством образования биомолекулы, например, молекулы антитела с двумя аминокислотами неприродного происхождения, одна из которых предназначена для встраивания [4+2] линкера/полезной нагрузки, а другая аминокислота предназначена для встраивания [3+2] другого линкера и/или полезной нагрузки. Соответственно, различные молекулы полезной нагрузки (D) могут быть конъюгированы с одной и той же биомолекулой, если иное не указано в данном документе (CB), с помощью включения разных NNAA (M) в одну и ту же биомолекулу (CB) (формула II), например, (1) азидзамещенной NNAA (M-T) и (2) тетразинзамещенной NNAA (M-T). В соответствии со способами, описанными в данном документе, т.е. получение конъюгатов формулы III посредством реакций 1,3-биполярного циклоприсоединения и получение конъюгатов формулы III' посредством реакций циклоприсоединения [4+2], такие реакции можно проводить с использованием одной и той же биомолекулы (CB). Отдельные биомолекулы, например, отдельная молекула антитела, содержащая по меньшей мере одну азидзамещенную NNAA и по меньшей мере одну тетразинзамещенную NNAA, каждая NNAA из которых описана в данном документе, принадлежат к объему настоящего изобретения. Дополнительно, отдельные биомолекулы, например отдельная молекула антитела с двумя разными конъюгированными молекулами полезной нагрузки (D) и/или линкерами ((E)<sub>m</sub>), принадлежат к объему настоящего изобретения, описанного в данном документе. Способы получения таких биомолекул, содержащих по меньшей мере одну азидзамещенную NNAA и по меньшей мере одну тетразинзамещенную NNAA, предпочтительно множество каждой из них, например, 2-50, 2-25, 2-15, 2-10 или 2-5 каждой из них, принадлежат, в

соответствии с настоящим раскрытием, к объему настоящего изобретения. Способы получения биомолекул с двумя разными конъюгированными молекулами полезной нагрузки (D) и/или линкерами ((E)<sub>m</sub>), дополнительно принадлежат к объему настоящего изобретения, описанного в данном документе.

Разветвленные линкеры.

В случае прикрепления приблизительно 2 линкеров на антитело, если иное не указано в данном документе, каждый линкер имеет точку ветвления, так что могут быть присоединены, например, две полезные нагрузки



Формула XII

Существует множество модификаций подхода данного типа, как должно быть известно специалистам.

Полезная нагрузка, цитотоксические средства и майтанзиноиды.

"Цитотоксическое средство" в контексте данного документа относится к любому соединению, которое приводит к статическому росту, уменьшенной жизнеспособности или индукции гибели определенных типов клеток. Подходящие цитотоксические средства полезной нагрузки включают, например, майтанзиноиды и аналоги майтанзиноидов, таксоиды, СС-1065 и аналоги, доластатин и аналоги, зелесин и аналоги, димеры пирролобензодиазепина и аналоги; цитотоксины, являющиеся природными продуктами, и синтетические аналоги, включая криптофицины, аматоксины, тубулизин, а также любые другие активные средства, представляющие собой молекулы природного или не природного происхождения. Соединения монометилваланина. См., например, US 7994135; 7964567; 7964566; 7745394; 7498298.

Майтанзиноиды, например, ингибируют образование микротрубочек и являются высокотоксичными для клеток млекопитающих. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения полезная нагрузка представляет собой цитотоксическое средство, которое представляет собой майтанзиноид, включающий майтанзинол, аналоги майтанзинола, ансамитоцин и аналоги ансамитоцина.

Майтанзиноиды.

Майтанзиноиды являются высокоцитотоксичными лекарственными средствами. Майтанзин впервые был выделен Kurchan, et al. из восточного африканского кустарника *Maytenus serrata* и показано, что он в 100-1000 раз более цитотоксичен, чем традиционные химиотерапевтические средства для лечения рака, такие как метотрексат, дауномицин и винкристин (US 3896111). Впоследствии было обнаружено, что определенные микроорганизмы также вырабатывают майтанзиноиды, такие как майтанзинол и С-3 сложные эфиры майтанзинола (US 4151042). Синтетические С-3 сложные эфиры майтанзинола и аналоги майтанзинола также были описаны (Kurchan, et al, 21 J. Med. Chem. 31-37 (1978); Higashide, et al, 270 Nature 721-722 (1977); Kawai, et al, 32 Chem. Pharm. Bull. 3441-3451 (1984)). Примеры аналогов майтанзинола, из которых были получены С-3 сложные эфиры, включая майтанзинол с модификациями в ароматическом кольце (например, дез-хлор) или в С-9, С-14 (например, гидроксированная металлическая группа), С-15, С-18, С-20 и С-4,5. Несколько иммуноконъюгатов, содержащих майтанзиноиды, были описаны, например, US 8685920, 8624003, 8613930, 8603483, 8563509, 8337856, 8236319, 6333410, 6441163 и US 20140023665, полные раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки.

Майтанзиноиды, подходящие для применения согласно настоящему изобретению, хорошо известны из уровня техники. Примеры подходящих аналогов майтанзинола включают те, которые имеют модифицированные ароматические кольца и/или модификации в других положениях. Такие майтанзиноиды описаны, например, в US 4256746, 4294757, 4307016, 4313946, 4315929, 4322348, 4331598, 4361650, 4362663, 4364866, 4424219, 4371533, 4450254, 5475092, 5585499, 5846545, 6333410 и US 20140023665, полные раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки.

Примеры подходящих аналогов майтанзинола, имеющих модифицированное ароматическое кольцо, включают:

- (1) С-19-дез-хлор (US 4256746) (полученный посредством восстановления ансамитоцина P2);
- (2) С-20-гидрокси (или С-20-деметил)+/-С-19-дез-хлор (US 4361650 и № 4307016) (полученный с помощью деметилирования с применением стрептомицетов или актиномицетов или дехлорирования с применением LAN) и (3) С-20-диметокси, С-20-ацилокси (-OCOR), +/-дез-хлор (US 4294757) (полученный посредством ацилирования с применением хлорангидридов).

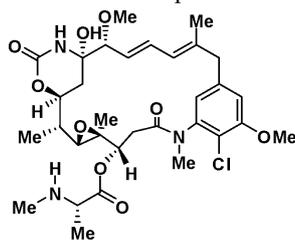
Определенные примеры подходящих аналогов майтанзинола с модификациями в других положениях включают:

- (1) С-9-SH (US 4424219) (полученный с помощью реакции майтанзинола с H<sub>2</sub>S или P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>);

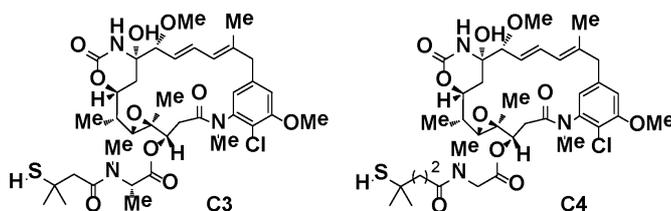
- (2) С-14-алкоксиметил(деметокси/CH<sub>2</sub>OR) (US 4331598);  
 (3) С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH<sub>2</sub>OH или CH<sub>2</sub>OAc) (US 4450254) (полученный из нокардий);  
 (4) С-15-гидрокси/ацилокси (US 4364866) (полученный посредством превращения майтанзинола стрептомицетами);  
 (5) С-15-метокси (US 4313946 и 4315929) (выделенный из *Trewia nudiflora*);  
 (6) С-18-N-деметил (US 4362663 и № 4322348) (полученный с помощью деметилирования майтанзинола стрептомицетами); и  
 (7) 4,5-дезоксид (US 4371533) (полученный путем восстановления майтанзинола с помощью трихлорида титана/LAH).

Кроме того, в US 6333410, полное раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки, предусматривается улучшенный способ получения и очистки тиолсодержащих майтанзиноидов, подходящих для присоединения к клеточно-связывающему средству.

Примеры майтанзиноидов также включают без ограничения следующие:

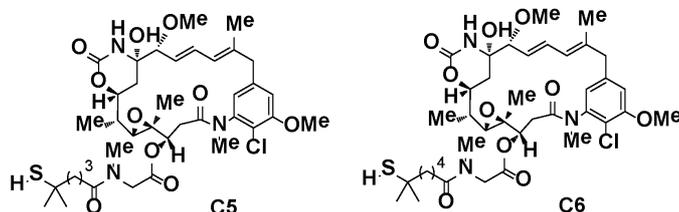


C2



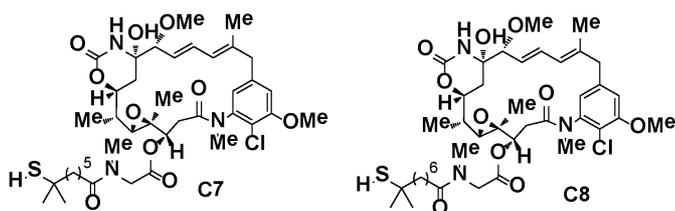
C3

C4



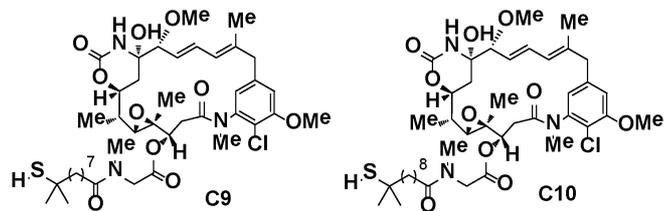
C5

C6



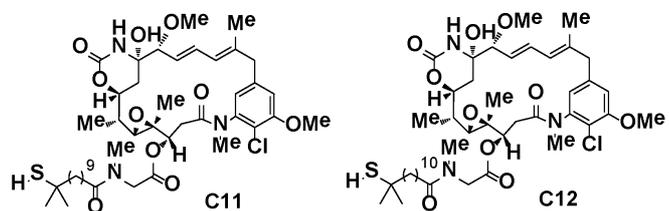
C7

C8



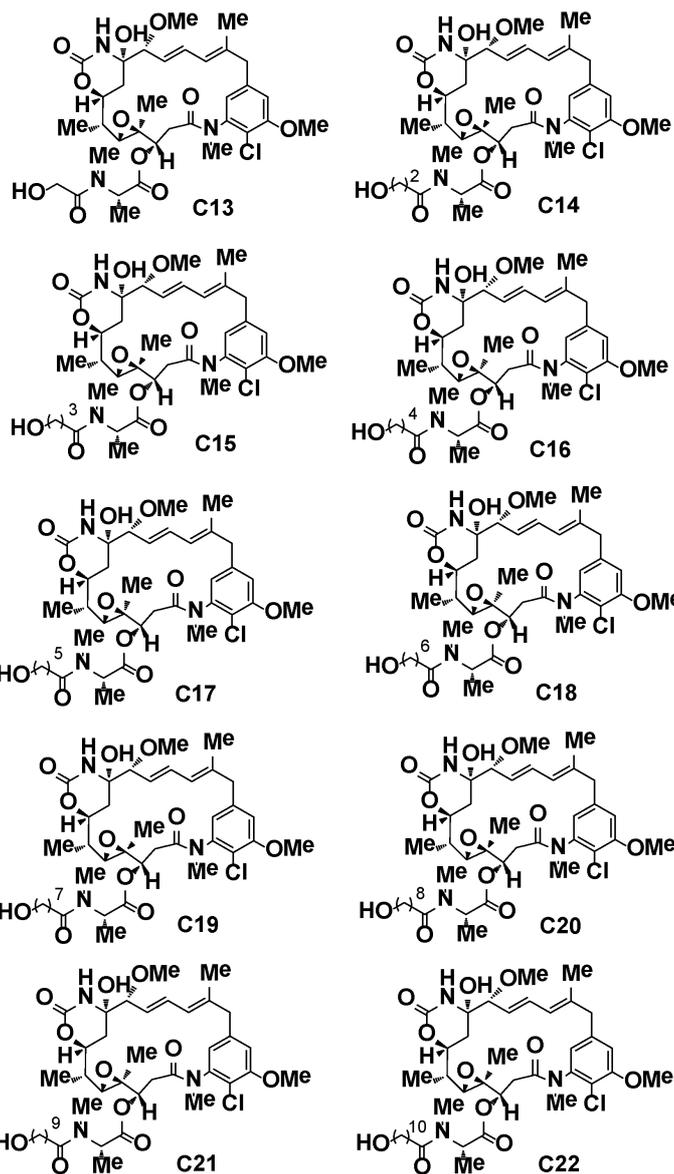
C9

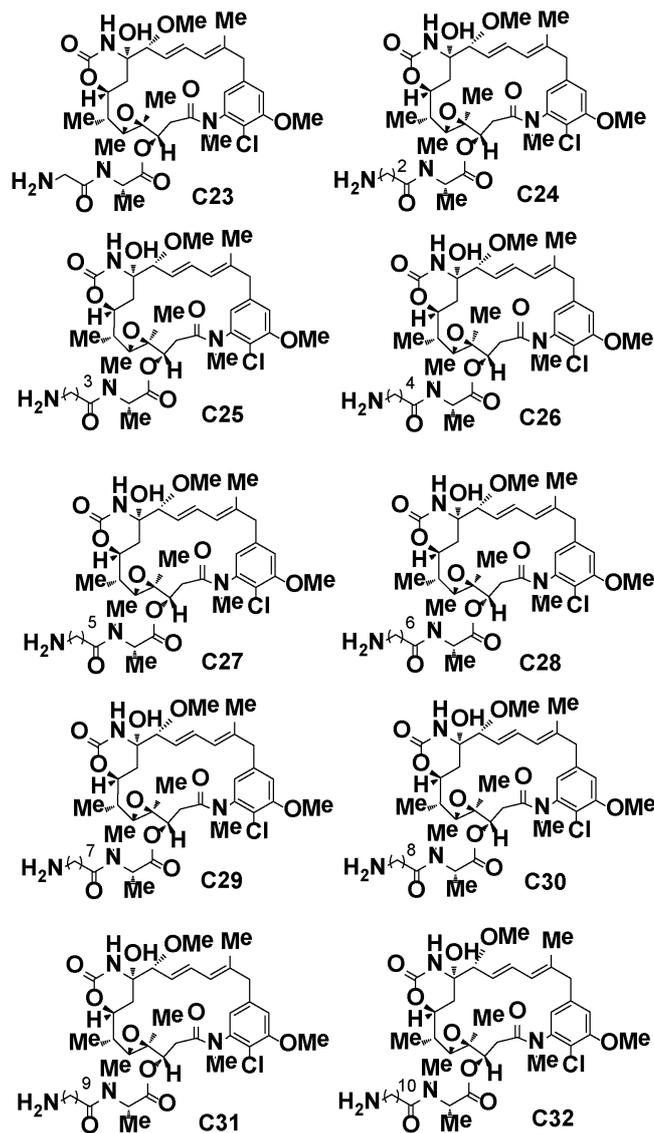
C10

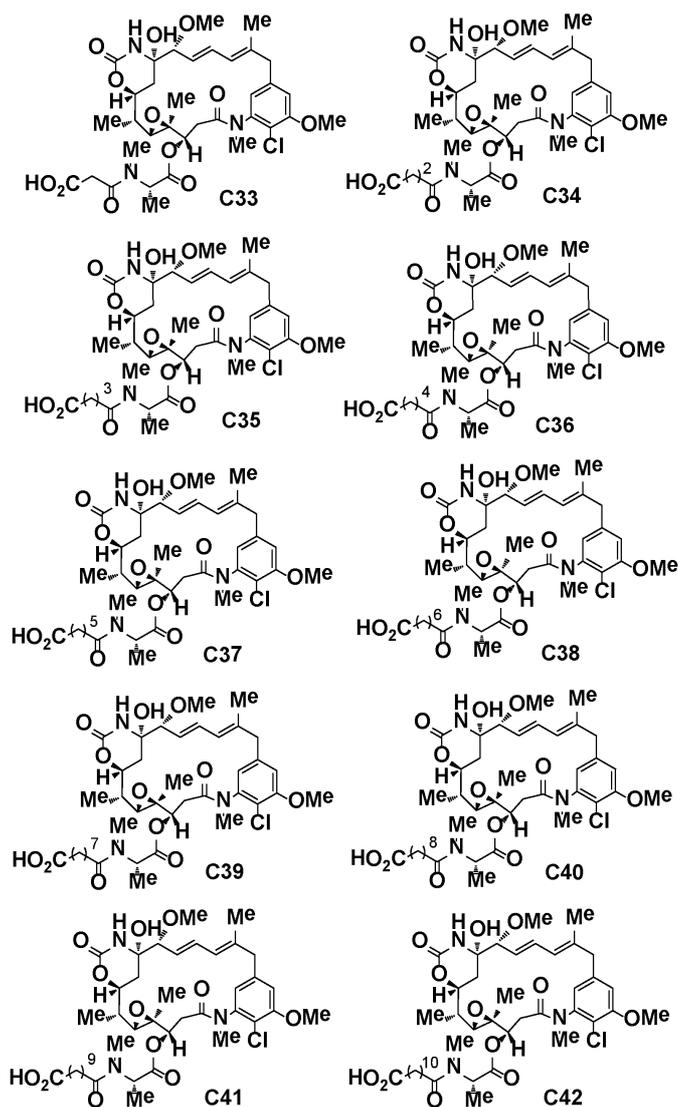


C11

C12







В некоторых из таких вариантов осуществления, относящихся к майтанзиноидам, р представляет собой 1-8. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой 1-6. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой 1-4. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой 1-2. В некоторых вариантах осуществления р представляет собой 1.

Известно, что многие положения в молекуле майтанзинола можно использовать в качестве положений для связывания в зависимости от типа связи. Например, для образования сложноэфирной связи подходящими являются все положения, из положения С-3 с гидроксильной группой, положения С-14, модифицированного с помощью гидроксиметила, положение С-15, модифицированное с помощью гидроксильной группы, и положения С-20 с гидроксильной группой. Предпочтительным является положение С-3.

Цитотоксические средства, содержащие майтанзиноиды, и их терапевтическое применение. См. US 5208020; 5416064; 7276497; 7851432; 7473796; 7601354; 7303749; 8198417; 8163888; 7989598; 8088387.

Связь для присоединения майтанзиноидов.

Предпочтительным является положение С-3 майтанзинола. Связующая группа между линкером (Е) и майтанзиноидом включает без ограничения амидную, сложноэфирную, карбаматную, карбонатную, эфирную, гидразоновую, тиоэфирную и дисульфидную. В некоторых вариантах осуществления связующая группа представляет собой амидную. В некоторых вариантах осуществления связующая группа представляет собой карбаматную. В некоторых вариантах осуществления связующая группа представляет собой сложноэфирную. Химический процесс, в результате которого образуется связующая группа между линкером и майтанзиноидом, хорошо известен из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления майтанзиноид может быть связан с (Е) в один этап. В некоторых вариантах осуществления с участием майтанзиноида сначала может образовываться связующая группа с фрагментом линкера с последующим удлинением линкера. На фиг. 1 и 2, например, проиллюстрированы неограничивающие подходы для связывания майтанзиноида с линкером сначала путем образования амидной связующей группы, а затем удлинения линкера.

Биомолекулы, включающие клеточно-связывающие средства.

Термин "биомолекула" в контексте данного документа обычно относится к структуре природного или синтетического происхождения, которая проявляет аффинность или, иначе, способность связывать определенную биологическую мишень или взаимодействовать с ней, предпочтительно *in vivo*. Биомолекулы, используемые согласно настоящему изобретению, представляют собой, например, частицы на основе белка, которые характеризуются вторичной, а в некоторых вариантах осуществления третичной и/или четвертичной структурой. Биомолекулы могут обладать посттрансляционную модификацию (модификации), включающие, например, гликозилирование, фосфорилирование, дезаминирование и/или окисление. Лиганды и рецепторы, в каждом случае, представляют собой типовые классы биомолекул, используемые в конъюгатах по настоящему изобретению. Растворимые формы лигандов и рецепторов, например, как правило, конструкции слияния, хорошо известны из уровня техники, включая, например, конструкции слияния IgG1 человека-Fc. Растворимые формы конструкций слияния на основе лиганда, равно как и на основе рецептора, представляют собой иллюстративные классы биомолекул, используемые в структурах конъюгатов по настоящему изобретению. Предпочтительные биомолекулы в случае конъюгатов лекарственных средств по настоящему изобретению, в этом случае, представляют собой антитела, в частности, моноклональные антитела (mAb), в том числе биспецифические антитела и их функциональные фрагменты. Модификации структуры антител также являются иллюстративным аспектом биомолекул, используемых в конъюгатах согласно настоящему изобретению. См. Next-Generation Antibodies, Nature Reviews Drug Discovery, 13:413 (2014). Дополнительный подход в отношении биомолекул предусматривает использование альтернативного лиганда, который может выполнять антителоподобные функции, связанные с аффинностью, включая варианты осуществления DARP (сконструированного белка с анкириновым повтором).

Эффективность конъюгатов по настоящему изобретению в качестве терапевтических средств зависит от правильного выбора соответствующего клеточно-связывающего средства. Клеточно-связывающие средства могут быть любого вида из известных в настоящее время или тех, которые станут известными, включая пептиды и средства не относящиеся к пептидам. Наиболее предпочтительными обычно являются антитела, конструкции слияния лигандов и биспецифические антитела. Примеры клеточно-связывающих средств включают моноклональные антитела, фрагменты антител, такие как Fab, Fab' и F(ab')<sub>2</sub>, Fv и, в частности, биспецифические антитела.

Активность и эффективность.

Конъюгаты клеточно-связывающего средства и майтанзиноида по настоящему изобретению можно оценивать в отношении их способности подавлять рост и/или пролиферацию различных линий клеток *in vitro*. Например, линии клеток, такие как линия карциномы толстой кишки человека COLO205, линия клеток меланомы человека A375, линия клеток миелоидного лейкоза человека HL60, линия клеток карциномы молочной железы человека SKBR3 или линия клеток эпидермоидной карциномы человека KB, можно применять для оценки цитотоксичности данных конъюгатов. Исследуемые клетки можно подвергать воздействию, например, соединений в течение 24 ч, и при этом выжившие фракции клеток исследуют в прямом анализе с помощью известных способов. См., например, Goldmacher et al., 135 J. Immunol. 3648-3651 (1985), и Goldmacher et al., 102 J. Cell Biol. 1312-1319 (1986).). Значение IC<sub>50</sub> для ингибирования роста и/или гибели клеток рассчитывают на основании результатов анализов.

Способы применения.

Конъюгаты, описанные в данном документе, можно применять в способе нацеливания цитотоксического средства на выбранную популяцию клеток, при этом способ включает приведение в контакт популяции клеток или ткани, предположительно содержащей выбранную популяцию клеток с конъюгатом цитотоксического средства и клеточно-связывающего средства, где одно или несколько цитотоксических средств ковалентно связаны с клеточно-связывающим средством через линкер. Клеточно-связывающее средство связывается с клетками выбранной популяции клеток. Конъюгаты, описанные в данном документе, можно также применять в способе уничтожения клеток, при этом способ включает приведение клеток в контакт с конъюгатом клеточно-связывающего средства и майтанзиноида, например, где один или несколько майтанзиноидов ковалентно связаны с клеточно-связывающим средством через линкер, например, и клеточно-связывающее средство связывается с клетками. В некоторых случаях после связывания с CD74, например, весь конъюгат поглощается клеткой-мишенью. Конъюгаты по настоящему изобретению можно также применять в способе лечения болезней, включая без ограничения злокачественные опухоли, аутоиммунные заболевания, отторжения трансплантата, реакцию "трансплантат против хозяина", вирусные инфекционные заболевания, инфекционные заболевания, вызванные микроорганизмами, и инфекционные заболевания, вызванные паразитами, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в лечении, эффективного количества конъюгата клеточно-связывающего средства и цитотоксического средства, где одно или несколько цитотоксических средств ковалентно связаны с клеточно-связывающим средством через линкер, и при этом клеточно-связывающее средство связывает пораженные болезнью или инфицированные клетки.

Примеры медицинских состояний, которые можно лечить в соответствии со способами по настоящему изобретению, включают без ограничения любой тип злокачественного новообразования, в том чис-

ле, например, гематологические состояния, включающие различные формы рака крови, MDS, состояния, связанные с лейкозом, лимфому, миелому, рак легкого, молочной железы, толстой кишки, предстательной железы, почки, поджелудочной железы, яичника и органов лимфатической системы; аутоиммунные заболевания, такие как системная красная волчанка, ревматоидный артрит и рассеянный склероз; отторжения трансплантата, такие как отторжение трансплантата почки, отторжения трансплантата печени, отторжение трансплантата легкого, отторжение трансплантата сердца и отторжение трансплантата костного мозга; реакцию "трансплантат против хозяина"; вирусные инфекционные заболевания, такие как инфекция CMV, ВИЧ-инфекция; и другие состояния, определенные специалистом в данной области техники. Конъюгаты по настоящему изобретению можно применять для лечения состояний, связанных с онкологическими заболеваниями, опухолей, гематологических состояний, в частности В-клеточных злокачественных новообразований, множественной миеломы и форм В-клеточной лимфомы, например.

Для клинического применения *in vivo* конъюгаты по настоящему изобретению могут быть представлены в виде раствора или лиофилизированного порошка, который проверяют на стерильность и уровень токсинов. Конъюгаты можно вводить, например, еженедельно в течение 4 недель в виде внутривенного болюса каждую неделю. Болюсные дозы можно вводить растворенными в 50-500 мл нормального физиологического раствора, к которому можно добавить, например, 5-10 мл человеческого сывороточного альбумина. Дозировка может составлять от 10 до 2000 мг на введение, внутривенно (в диапазоне, например, от 100 нг до 200 мг/кг в день). Через от одной до шести (1-6) недель, например, от двух до четырех (2-4) недель, например, лечения пациент может продолжать получать лечение на еженедельной основе.

Условия клинического и неклинического применения будут легко определены специалистом в данной области техники. Конкретные *in vivo* клинические протоколы относительно пути введения, вспомогательных средств, разбавителей, дозировок, времени и т. д., определяются специалистами в данной области техники.

Другие активные средства можно вводить в сочетании с конъюгатом.

Пример I. Конъюгирование антитела и лекарственного средства.

#### 1. Хранение.

Белок хранят при  $-80^{\circ}\text{C}$ , а линкер для лекарственного средства хранят при 4 или  $-20^{\circ}\text{C}$  в случае долгосрочного хранения.

#### 2. Расчет.

Подсчет количества белка и линкера для лекарственного средства. Исходная концентрация белка X1 мг/мл, конечная желаемая концентрация белка X2 мг/мл, исходная концентрация лекарственного средства X3 мМ и конъюгируемый белок СВ составляет X4 мг. Рекомендуемое молярное отношение белка к лекарственному средству представляет собой 10:1, однако, может быть и ниже, например, 5:1. Может возникнуть необходимость корректировки расчета, обусловленная MW белка если он не равняется 150К.

Исходная концентрация белка	мг/мл	4,5	4,5	X1
Конечная желаемая концентрация белка	мг/мл	3	3	X2
Исходная концентрация лекарственного средства	мМ	5	5	X3
Соединяемый белок	мг	0,1	10	X4
Соотношение белка и лекарственного средства		10	10	10
MW белка	KDa	150	150	150
Конечная концентрация линкера лекарственного средства	мкМ	200	200	
Объем реакционной смеси	мкл	33,3	3333,3	
белок, необходимый для соединения	мкл	22,2	2222,2	
Лекарственное средство, необходимое для соединения	мкл	1,3	133,3	
Необходимый буфер PBS	мкл	9,8	977,8	

## 3. Соединение.

Соответствующие количества белка и линкера лекарственного средства получают при комнатной температуре и смешивают для конъюгации.

Пример 1. [Исходная концентрация белка]=4,5 мг/мл, [конечная желаемая концентрация белка]=3 мг/мл, [исходная концентрация лекарственного средства]=5 мМ, 0,1 мг белка для конъюгации.

В микропробирку к 22,2 мкл белка добавляют 9,8 мкл буфера PBS и 1,3 мкл лекарственного средства. Пробирку помещают в ротор для пробирок при комнатной температуре (~22°C) на 16 ч. Как правило, такого количества конъюгата антитело-лекарственное средство достаточно для анализа DAR, анализов связывания и гибели клеток.

Пример 2. [Исходная концентрация белка]=4,5 мг/мл, [конечная желаемая концентрация белка]=3 мг/мл, [исходная концентрация лекарственного средства]=5 мМ, 10 мг белка для конъюгации.

В 15-мл центрифужную пробирку к 2222,2 мкл белка добавляют 977,8 мкл буфера PBS и 133,3 мкл лекарственного средства. Пробирку помещают в ротор для пробирок для соединения при комнатной температуре (~22°C) в течение 16 ч.

Длительность соединения и температура могут варьировать для различных вариантов антител. Рекомендуемыми являются комнатная температура и 16 ч.

## 4. Удаление свободного лекарственного средства.

Свободное лекарственное средство может перемещаться путем высаливания смеси для конъюгации с применением обессоливающих колонок Thermo scientific zeba spin 7K MWCO. Выберите размер колонки на основании объема выборки.

	Объем выборки
Колонки Zeba Spin Desalting, 7K MWCO, 0,5 мл	30-130 мкл
Колонки Zeba Spin Desalting Columns, 7K MWCO, 2 мл	200-700 мкл
Колонки Zeba Spin Desalting Columns, 7K MWCO, 5 мл	500-2000 мкл
Колонки Zeba Spin Desalting, 7K MWCO, 10 мл	700-4000 мкл

## Пример II.

## Анализ гибели клеток.

Цитотоксические эффекты конъюгатов биомолекул на клетки-мишени определяли с помощью анализа клеточной пролиферации. Клетки-мишени и клетки не являющиеся клетками-мишенями получали из ATCC и сохраняли в RPMI, при высоком уровне глюкозы (Cellgro-Mediatech, Manassas, VA), дополненный 20% термоинактивированной сывороткой эмбриона телёнка (Hyclone; Thermo Scientific; Waltham, MA), 2 мМ глутамакса (Invitrogen; Carlsbad, CA) и 1x пенициллин/стрептомицин (Cellgro-Mediatech; Manassas, VA). В общем 20000 клеток в объеме 40 мкл высевали в 96-луночный полуплощадный плоскостонный белый полистирольный планшет в день анализа. Соединенные структуры составляли при концентрации 2x в среде RPMI и фильтровали через MultiScreen HTS 96-Well Filter Plates (Millipore; Billerica, MA). Стерилизованные с помощью фильтра соединенные структуры добавляли в лунки для обработки и планшеты культивировали при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 72 ч. Для определения жизнеспособности клетки в каждую лунку добавляли 80 мкл реактива Cell Titer-Glo® (Promega Corp.; Madison, WI) и планшеты обрабатывали согласно инструкциям продукта. Относительную люминесценцию определяли на планшет-ридере ENVISION® (Perkin-Elmer; Waltham, MA). Показатели относительной люминесценции превращали в % жизнеспособности с применением необработанных клеток в качестве контроля. Данные согласовывали с помощью нелинейного регрессионного анализа с применением log(ингибитора) по сравнению с ответом, переменным уклоном, используя 4 параметра эмпирического уравнения GraphPad Prism (GraphPad v 5.00, Software; San Diego, CA). Данные выражали в виде % относительной жизнеспособности клеток по сравнению с дозой ADC в нМ.

## Пример III.

## Синтетический I1.

А. Синтез майтан-N-Me-L-Ala-глутаровой кислоты из майтан-N-Me-L-Ala.

Майтан-N-Me-L-Ala (250 мг, 0,385 ммоль) (полученный в соответствии с процедурой, приведенной в J. Med. Chem. 2006, 49, 4392), глутаровый ангидрид (440 мг, 3,85 ммоль) и водный насыщенный NaHCO<sub>3</sub> (1 мл) растворяли в THF (10 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 2 ч. Реакционную смесь разбавляли водой и доводили pH до 2 конц. муравьиной кислотой. Полученную реакционную смесь дважды экстрагировали этилацетатом. Объединенный органический слой промывали соевым раствором, высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии с обращенной фазой с применением колонки C18, 20-40 мкм (50 г) с элюированием при градиенте (10-95% в течение 18 мин) ацето-

нитрила (0,1% АсОН) в воде (0,1% АсОН), лиофилизировали с получением майтан-N-Ме-L-Ala-глутаровой кислоты 32 (205 мг, 0,268 ммоль, выход 70%) в виде белого твердого вещества. MS масса/заряд: 764,7 [MН<sup>+</sup>], 747,1 [M-18], 786,7 [M+Na]; <sup>1</sup>НЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,74 (3H, S), 1,19-1,27 (8H, m), 1,38-1,42 (1H, m), 1,62 (3H, S), 1,80-1,85 (1H, m), 1,91-1,96 (2H, m), 2,12-2,18 (1H, m), 2,30-2,45 (5H, m), 2,55 (1H, t), 2,79 (3H, s), 2,95 (1H, d), 3,05 (1H, d), 3,15 (3H, s), 3,32 (3H, s), 3,44 (1H, d), 3,58 (1H, d), 3,93 (3H, s), 4,24 (1H, t), 4,68-4,72 (1H, m), 5,32 (1H, bs), 5,58-5,63 (1H, m), 6,34-6,39 (1H, m), 6,58-6,65 (2H, m), 6,78 (1H, s).

В. Синтез NHS-сложного эфира майтан-N-Ме-L-Ala-глутаровой кислоты из майтан-N-Ме-L-Ala-глутаровой кислоты.

Раствор майтан-N-Ме-L-Ala-глутаровой кислоты (205 мг, 0,268 ммоль) растворяли в дихлорметане (10 мл) и обрабатывали N-гидроксисукцинимидом (NHS, 62 мг, 0,54 ммоль) и 1-[3-(диметиламино)пропил]-3-этилкарбодиимида гидрохлоридом (EDCI, 128 мг, 0,67 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре в атмосфере аргона. Реакционную смесь промывали водой, потом соевым раствором, высушивали над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Растворитель выпаривали при пониженном давлении с получением неочищенного остатка. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии с обращенной фазой с применением колонки C18, 20-40 микрон (50 г) с элюированием при градиенте (10-95% в течение 18 мин) ацетонитрила (0,1% АсОН) в воде (0,1% АсОН), лиофилизировали с получением NHS-сложного эфира майтан-N-Ме-L-Ala-глутаровой кислоты 33 (190 мг, 0,22 ммоль, выход 82%) в виде белого твердого вещества. MS масса/заряд: 862,0 [MН<sup>+</sup>], 844,6 [M-18], 884,0 [M+Na]; <sup>1</sup>НЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,73 (3H, s), 1,16-1,24 (8H, m), 1,35-1,42 (1H, m), 1,45-1,54 (4H, m), 1,58 (3H, s), 1,85-1,91 (1H, m), 2,01-2,12 (2H, m), 2,29-2,36 (1H, m), 2,42-2,57 (3H, m), 2,62 (2H, t), 2,78 (3H, s), 2,98 (1H, d), 3,05 (1H, d), 3,12 (3H, s), 3,21 (1H, bs), 3,29 (3H, s), 3,43 (1H, d), 3,56 (1H, d), 3,92 (3H, s), 4,21 (1H, t), 4,71 (1H, dd), 5,28-5,34 (1H, m), 5,57-5,63 (1H, m), 6,15 (1H, s), 6,33-6,38 (1H, m), 6,58 (1H, s), 6,67 (1H, d), 6,75 (1H, s).

С. Синтез майтан-N-Ме-L-Ala-PEG4-глутаровой кислоты из NHS-сложного эфира майтан-N-Ме-L-Ala-глутаровой кислоты.

Раствор NHS-сложного эфира майтан-N-Ме-L-Ala-глутаровой кислоты (190 мг, 0,22 ммоль) и PEG4-аминокислоты (133 мг, 0,50 ммоль) растворяли в смеси ацетонитрила (25 мл) и воды (8 мл) и обрабатывали насыщенным водным NaHCO<sub>3</sub> (6 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре в атмосфере аргона и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии с обращенной фазой с применением колонки C18, 20-40 микрон (50 г) с элюированием при градиенте (10-95% в течение 18 мин) ацетонитрила (0,1% АсОН) в воде (0,1% АсОН), лиофилизировали с получением майтан-N-Ме-L-Ala-PEG4-глутаровой кислоты (170 мг, 0,168 ммоль, выход 76%) в виде белого твердого вещества. MS масса/заряд: 1012,7 [MН<sup>+</sup>], 995,4 [M-18], 1034,2 [M+Na]; <sup>1</sup>НЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,73 (3H, s), 1,13-1,28 (8H, m), 1,32-1,42 (1H, m), 1,53-1,61 (5H, m), 1,78-1,85 (1H, m), 1,89-1,95 (1H, m), 2,08-2,13 (1H, m), 2,15-2,28 (3H, m), 2,39-2,47 (1H, m), 2,49-2,55 (2H, m), 2,82 (3H, s), 2,93 (1H, d), 3,05 (1H, d), 3,12 (3H, s), 3,29-3,38 (5H, m), 3,42 (1H, d), 3,50-3,61 (16H, m), 3,66-3,72 (2H, m), 3,95 (3H, s), 4,23 (1H, t), 4,71-4,77 (1H, m), 5,13-5,19 (1H, bs), 5,57-5,62 (1H, m), 6,32-6,38 (2H, m), 6,51-6,59 (2H, m), 6,75 (1H, s).

Д. Синтез NHS-сложного эфира майтан-N-Ме-L-Ala-PEG4-глутаровой кислоты из майтан-N-Ме-L-Ala-PEG4-глутаровой кислоты.

Раствор майтан-N-Ме-L-Ala-PEG4-глутаровой кислоты (170 мг, 0,168 ммоль) растворяли в дихлорметане (15 мл) и обрабатывали N-гидроксисукцинимидом (NHS, 39 мг, 0,336 ммоль) и 1-[3-(диметиламино)пропил]-3-этилкарбодиимида гидрохлоридом (EDCI, 81 мг, 0,42 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре в атмосфере аргона и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии с обращенной фазой с применением колонки C18, 20-40 мкм (50 г) с элюированием при градиенте (10-95% в течение 18 мин) ацетонитрила (0,1% АсОН) в воде (0,1% АсОН), лиофилизировали с получением NHS-сложного эфира майтан-N-Ме-L-Ala-PEG4-глутаровой кислоты (150 мг, 0,135 ммоль, 80%) в виде белого твердого вещества. MS масса/заряд: 1109,6 [MН<sup>+</sup>], 1092,5 [M-18], 1131,3 [M+Na]; <sup>1</sup>НЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,74 (3H, s), 1,14-1,27 (8H, m), 1,34-1,42 (1H, m), 1,43-1,52 (4H, m), 1,59 (3H, s), 1,77-1,84 (1H, m), 1,88-1,96 (1H, m), 2,10-2,18 (3H, m), 2,21-2,28 (1H, m), 2,37-2,43 (1H, m), 2,53 (1H, t), 2,82-2,88 (4H, m), 2,96 (1H, d), 3,05 (1H, d), 3,15 (3H, s), 3,29-3,36 (5H, m), 3,42-3,49 (4H, m), 3,52-3,61 (16H, m), 3,78 (1H, t), 3,92 (3H, s), 4,20 (1H, t), 4,69-4,73 (1H, m), 5,28 (1H, bs), 5,55-5,63 (1H, m), 6,18 (1H, s), 6,32-6,40 (1H, m), 6,60-6,68 (2H, m), 6,75 (1H, s).

Е. Синтез майтан-N-Ме-L-Ala-PEG4-глутаровая кислота-DIBCO (II) из NHS-сложного эфира майтан-N-Ме-L-Ala-PEG4-глутаровой кислоты.

Раствор NHS-сложного эфира майтан-N-Ме-L-Ala-PEG4-глутаровой кислоты (150 мг, 0,135 ммоль) и трициклического амина (55 мг, 0,173 ммоль) растворяли в смеси ацетонитрила (12 мл) и воды (4 мл) и обрабатывали насыщенным водным NaHCO<sub>3</sub> (3 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре в атмосфере аргона и концентрировали при пониженном давлении. Неочи-

щенный остаток очищали с помощью хроматографии с обращенной фазой с применением колонки C18, 20-40 мкм (50 г) с элюированием при градиенте (10-95% в течение 18 мин) ацетонитрила (0,1% AcOH) в воде (0,1% AcOH), лиофилизировали с получением майтан-N-Me-L-Ala-PEG4-глутаровая кислота-DIBCO (105 мг, 0,08 ммоль, выход 60%) в виде белого твердого вещества. MS масса/заряд: 1312,9 [M<sup>+</sup>], 1295,4 [M-18], 1334,6 [M+Na]; <sup>1</sup>HЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,82 (3H, s), 1,01-1,08 (2H, m), 1,23-1,32 (8H, m), 1,39-1,51 (3H, m), 1,58-1,66 (4H, m), 1,88-1,96 (2H, m), 1,98-2,03 (1H, m), 2,19-2,26 (4H, m), 2,30-2,36 (1H, m), 2,42 (2H, t), 2,47-2,52 (1H, m), 2,59-2,65 (1H, m), 2,88 (3H, s), 3,02-3,14 (4H, m), 3,21 (3H, s), 3,35-3,43 (5H, m), 3,49-3,52 (3H, m), 3,58-3,70 (18H, m), 4,00 (3H, s), 4,31 (1H, t), 4,79-4,82 (1H, m), 5,17 (1H, d), 5,33 (1H, bs), 5,65-5,70 (1H, m), 6,19 (1H, dd), 6,26 (1H, d), 6,32 (1H, dd), 6,41-6,47 (1H, m), 6,68-6,71 (2H, m), 6,84 (1H, s), 7,31-7,44 (7H, m), 7,70-7,72 (1H, m).

Ф. Синтез 6-(2,2,2-трифторацетиламино)гексановой кислоты из 6-аминогексановой кислоты.

Этилтрифторацетат (5,7 мл, 6,8 г, 48 ммоль) и триэтиламин (5,4 мл, 3,9 г, 39 ммоль) добавляли к суспензии 6-аминогексановой кислоты (5,00 г, 38,1 ммоль) в сухом метаноле (19 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 17 ч при комнатной температуре в атмосфере аргона. Затем добавляли эфир (100 мл) и промывали с помощью 100 мл водного HCl. Водный слой дважды экстрагировали с помощью 100 мл эфира. Органические слои объединяли, промывали с помощью 150 мл солевого раствора и высушивали над безводным сульфатом натрия. После фильтрования, концентрирования и высушивания под вакуумом получали продукт (8,66 г, 100%, 38,1 ммоль) в виде грязно-белого твердого вещества. MS (ESI+) масса/заряд: 228 [M<sup>+</sup>+H<sup>+</sup>]; MS (ESI-) масса/заряд: 226 [M<sup>-</sup>-H<sup>-</sup>]; <sup>1</sup>HЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 1,21-1,29 (2H, m), 1,41-1,53 (4H, m), 2,16-2,21 (2H, t), 3,12-3,18 (2H, q), 9,39 (1H, s, br), 11,99 (1H, s).

Г. Синтез 6-(2,2,2-трифторацетиламино)гексаноилхлорида из 6-(2,2,2-трифторацетиламино)гексановой кислоты.

Суспензию майтан-N-Me-L-Ala-PEG4-глутаровая кислота-DIBCO (8,66 г, 38,1 ммоль) в хлористом метиле (190 мл) охлаждали до 0°C. По каплям добавляли оксалилхлорид (16,1 мл, 24,2 г, 190 ммоль) в течение 6 мин. Затем добавляли DMF (8 капель). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч, а затем при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Затем ее концентрировали и высушивали под вакуумом с получением продукта (9,36 г, 100%, 38,1 ммоль) в виде светлого янтарного сиропа. <sup>1</sup>HЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,36-1,46 (2H, m), 1,57-1,67 (2H, m), 1,70-1,80 (2H, m), 2,89-2,94 (2H, t), 3,34-3,41 (2H, q), 6,40 (1H, br).

Н. Синтез дибензо[a,d]циклогептен-5-он оксима из дибензо[a,d]циклогептен-5-она.

Раствор дибензо[a,d]циклогептен-5-она (25,0 г, 121 ммоль) и гидроксилamina HCl (12,6 г, 181 ммоль) в пиридине (70 мл) нагревали с обратным холодильником в течение 15,5 ч. Реакционной смеси давали остыть до комнатной температуры и концентрировали in vacuo. Остаток разделяли между 300 мл 5% водного HCl/лед и 200 мл этилацетата. Водный слой дважды экстрагировали с помощью 150 мл этилацетата. Органические слои объединяли и промывали с помощью 250 мл солевого раствора. После высушивания с помощью безводного сульфата натрия, фильтрования, концентрирования и высушивания получали продукт в виде светлого желто-бежевого твердого вещества (26,8 г, 121 ммоль). MS (ESI+) масса/заряд: 222 [M<sup>+</sup>+H<sup>+</sup>]; MS (ESI-) масса/заряд: 220 [M<sup>-</sup>-H<sup>-</sup>]; <sup>1</sup>HЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6,91-6,92 (2H, d), 7,33-7,43 (6H, m), 7,56-7,61 (1H, m), 7,65-7,68 (1H, m), 8,55 (1H, s).

Т. Из дибензо[a,d]циклогептен-5-он оксима в 5,6-дигидродибензо[b,f]азоцин.

Раствор диизобутилалюминия гидрида в дихлорметане (1,0 M, 192 мл) охлаждали на водяной бане и порциями добавляли твердый дибензо[a,d]циклогептен-5-он оксим (8,48 г, 38,3 ммоль) с такой скоростью, чтобы поддерживать температуру между 15 и 27°C. Водяную баню убирали и полученный раствор перемешивали при температуре окружающей среды в течение 3 дней. Раствор охлаждали на водяной бане и порциями добавляли твердый декагидрат сульфата натрия (20,4 г, 63,3 ммоль) с такой скоростью, чтобы поддерживать температуру между 12 и 30°C. Добавляли целит и смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 1 ч. Неорганические вещества отделяли путем фильтрования и тщательно промывали этилацетатом. Органические растворы объединяли и растворители выпаривали in vacuo. Остаток наносили на колонку с силикагелем (150 г) и элюировали при градиенте дихлорметана (от 20% до 100%) в гексанах с получением продукта 5,0 г (63%) в виде желтого твердого вещества. MS масса заряд: 208,4 M<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H ЯМР(300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4,29 (1H, br s), 4,59 (2H, s), 6,39 (1H, d), 6,50 (1H, dd), 6,58 (1H, d), 6,61-6,66 (1H, m), 6,89-6,95 (1H, m), 7,00 (1H, dd), 7,19-7,32 (4H, m).

Ж. Синтез N-[6-(6H-дibenzo[b,f]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-2,2,2-трифторацетиламида (26) из 5,6-дигидродибензо[b,f]азоцина и 6-(2,2,2-трифторацетиламино)гексаноилхлорида.

Пиридин (8,5 мл, 8,3 г, 110 ммоль) добавляли к раствору 5,6-дигидродибензо[b,f]азоцина (7,29 г, 35,2 ммоль) в сухом хлористом метиле (72 мл).

Далее добавляли 6-(2,2,2-трифторацетиламино)гексаноилхлорид (10,7 г, 45,6 ммоль) в 25 мл хлористого метилена в течение 4 мин. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение приблизительно 2 ч, затем разбавляли с помощью 180 мл хлористого метилена и промывали с помощью 3×150 мл воды. Органический слой промывали с помощью 150 мл солевого раствора, высушивали с помощью безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт подвер-

гали флэш-хроматографии (Isco) с применением картриджа с 330 г силикагеля при градиенте 0-50% этилацетата/гексана. После концентрирования и высушивания получали 14,0 г (95,9%, 33,6 ммоль) чистого продукта в виде очень бледной прозрачной янтарной смолы. MS (ESI+) масса/заряд: 417 [M<sup>+</sup>H<sup>+</sup>], MS (ESI-) масса/заряд: 415 [M<sup>-</sup>H<sup>-</sup>]; <sup>1</sup>НЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 0,95-1,03 (2H, m), 1,22-1,37 (4H, m), 1,69-1,79 (1H, m), 1,87-1,97 (1H, m), 3,00-3,06 (2H, q), 4,14-4,19 (1H, d), 5,34-5,39 (1H, d), 6,61-6,65 (1H, d), 6,74-6,78 (1H, d), 7,15-7,19 (3H, m), 7,27-7,38 (5H, m), 9,31 (1H, br).

К. Синтез N-[6-(11,12-дибром-11,12-дигидро-6H-дibenzo[b,f]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-2,2,2-трифторацетамида из N-[6-(6H-дibenzo[b,f]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-2,2,2-трифторацетамида.

Трибромид пиридиния (8,48 г, 26,5 ммоль) добавляли к раствору N-[6-(6H-дibenzo[b,f]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-2,2,2-трифторацетамида (9,95 г, 23,9 ммоль) в хлористом метилена (200 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 4,5 ч, затем промывали с помощью 1) 2×120 мл 0,5M водного HCl, 2) 120 мл воды и 3) 120 мл солевого раствора. После высушивания с помощью безводного сульфата натрия, фильтрования и концентрирования неочищенный продукт подвергали флэш-хроматографии (Isco) с применением картриджа с 330 г силикагеля при градиенте 0-50% этилацетата/гексана. После концентрирования и высушивания продукт дважды растворяли в 150 мл хлористого метилена и концентрировали. Его высушивали in vacuo с получением 10,5 г (76,1%, 18,2 ммоль) продукта в виде пены очень бледного шиферно-серого цвета. MS (ESI+) масса/заряд: 577 [M<sup>+</sup>H<sup>+</sup>]; MS (ESI-) масса/заряд: 575 [M<sup>-</sup>H<sup>-</sup>]; <sup>1</sup>НЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 1,13-1,20 (2H, m), 1,35-1,59 (4H, m), 1,95-2,29 (2H, m), 3,07-3,13 (2H, q), 4,17-5,08 (1H, m), 5,69-5,87 (2H, m), 6,97-7,31 (7H, m), 7,55-7,65 (1H, m), 9,33 (1H, s).

Л. Синтез N-(6-трифторацетамидогексаноил)-5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[b,f]азоцина из N-[6-(11,12-дибром-11,12-дигидро-6H-дibenzo[b,f]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-2,2,2-трифторацетамида.

Раствор N-[6-(11,12-дибром-11,12-дигидро-6H-дibenzo[b,f]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-2,2,2-трифторацетамида (6,76 г, 11,7 ммоль) в сухом THF (31 мл) добавляли в 1M раствор трет-бутоксид калия/THF (35 мл, 35 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 2 ч. Медленно добавляли приблизительно 8,5 мл воды, чтобы погасить реакционную смесь, и ее разбавляли с помощью приблизительно 180 мл этилацетата. Затем ее промывали с помощью 200 мл 1% водного HCl, 200 мл воды и 200 мл солевого раствора. Органический слой высушивали с помощью безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (Isco) с применением картриджа с 120 г силикагеля при градиенте 0-10% этилацетата/хлористого метилена. После концентрирования и высушивания получали продукт в виде окрашенной в коралловый цвет смолы/пены (3,05 г, 62,8%, 7,36 ммоль). MS (ESI-) масса/заряд: 413 [M<sup>-</sup>H<sup>-</sup>]; <sup>1</sup>НЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,96-1,15 (2H, m), 1,23-1,49 (4H, m), 1,88-1,98 (1H, m), 2,04-2,26 (1H, m), 3,02-3,27 (2H, m), 3,64-3,69 (1H, d), 5,14-5,18 (1H, d), 6,58 (1H, br), 7,24-7,44 (7H, m), 7,68-7,70 (1H, d).

М. Синтез N-(6-аминогексаноил)-5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[b,f]азоцина из N-(6-трифторацетамидогексаноил)-5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[b,f]азоцина.

Раствор карбоната калия (1,00 г, 7,24 ммоль) в воде (7,5 мл) медленно добавляли к раствору N-(6-трифторацетамидогексаноил)-5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[b,f]азоцина (1,04 г, 2,51 ммоль) в метаноле (10 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 49 ч. Ее концентрировали и разделяли в 40 мл хлороформа/40 мл солевого раствора. Водный слой экстрагировали с помощью 40 мл хлороформа. Органические слои объединяли и добавляли 40 мл этилацетата для повышения растворимости. После высушивания с помощью безводного сульфата натрия, фильтрования и концентрирования неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (Isco) за 2 впрыскивания с применением колонки 275 г, C18, 20-40 мкм с элюированием с помощью 5-95% ацетонитрила (0,1% AcOH)/воды (0,1% AcOH). После лиофилизации получали продукт в виде соли уксусной кислоты (светлая желто-бежевая пена: 0,577 г, 60,7%, 1,52 ммоль). MS (ESI+) масса/заряд: 319 [M<sup>+</sup>H<sup>+</sup>]. <sup>1</sup>НЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,98-1,07 (2H, m), 1,27-1,44 (4H, m), 1,85-1,95 (4H, m), 2,14-2,23 (1H, m), 2,54-2,59 (2H, t), 3,62-3,67 (2H, d), 5,13-5,17 (1H, d), 6,20 (3H, br), 7,23-7,42 (7H, m), 7,67-7,70 (1H, d).

Пример IV. Синтетический I4.

А. Синтез майтан-N-Me-L-Ala-глутаровая кислота-N-Me-PEG4-N-Me-DIBCO (I4) из NHS-сложного эфира майтан-N-Me-L-Ala-глутаровой кислоты и DIBCO-диметил-PEG4-амина.

Раствор NHS-сложного эфира майтан-N-Me-L-Ala-глутаровой кислоты (160 мг, 0,186 ммоль) и DIBCO-диметил-PEG4-амина (210 мг, 0,354 ммоль) растворяли в смеси ацетонитрила (5 мл) и воды (1 мл) и обрабатывали с помощью насыщенного водного NaHCO<sub>3</sub> (0,5 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре в атмосфере аргона, а затем концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали с помощью хроматографии с обращенной фазой с применением колонки C18, 20-40 мкм (50 г) с элюированием при градиенте (10-95% в течение 18 мин) ацетонитрила (0,1% AcOH) в воде (0,1% AcOH), лиофилизовали с получением майтан-N-Me-L-Ala-глутаровая кислота-N-Me-PEG4-N-Me-DIBCO (I4) (135 мг, 0,10 ммоль, выход 54%) в виде белого твердого вещества. MS масса/заряд: 1340,9 [MH<sup>+</sup>], 1323,4 [M-18], 1362,6 [M+ Na]; <sup>1</sup>НЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,82 (3H, s), 0,99-1,01 (2H, m), 1,26-1,33 (8H, m), 1,42-1,48 (3H, m), 1,60-1,67 (4H, m), 1,88-1,96 (2H, m),

1,98-2,03 (1H, m), 2,11 (3H, s), 2,19-2,21 (2H, m), 2,36-2,38 (2H, m), 2,42-2,44 (1H, m), 2,53-2,64 (5H, m), 2,82-2,90 (6H, m), 3,00-3,14 (5H, m), 3,19-3,22 (4H, m), 3,38 (3H, s), 3,47-3,70 (17H, m), 3,78 (2H, m), 4,00 (3H, s), 4,31 (1H, t), 4,78-4,81 (1H, m), 5,19 (1H, d), 5,40 (1H, bs), 5,67-5,72 (1H, m), 6,35 (1H, s), 6,42-6,48 (1H, m), 6,70-6,76 (2H, m), 6,85 (1H, s), 7,29-7,44 (8H, m), 7,72-7,74 (1H, m).

В. Синтез 3-[2-(2-{2-[2-(2,2,2-трифторацетиламино)этоксид]этоксид]этоксид]пропиононовой кислоты из 3-(2-{2-[2-(2-аминоэтоксид]этоксид]этоксид]пропиононовой кислоты и этилтрифторацетата.

Этилтрифторацетат (1,4 мл, 1,7 г, 12 ммоль) и триэтиламин (1,3 мл, 0,94 г, 9,3 ммоль) добавляли к раствору 3-(2-{2-[2-(2-аминоэтоксид]этоксид]этоксид]пропиононовой кислоты (2,43 г, 9,16 ммоль) в метаноле (8,0 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 17,5 ч и концентрировали. Затем неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии с обращенной фазой (Isco) на колонке Isco gold, 275 г, C18, при градиенте 5-95% ацетонитрила/воды (с 0,1% уксусной кислотой). После лиофилизации получали продукт в виде бледно-желтого сиропа (1,79 г, 54,1%, 4,95 ммоль). MS масса/заряд  $MH^+$  362;  $^1H$ ЯМР (300 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 2,40-2,45 (2H, t), 3,32-3,36 (2H, m), 3,47-3,51 (14H, m), 3,56-3,60 (2H, m), 9,47 (1H, br), 12,15 (1H, br).

С. Синтез сложного метилового эфира 3-[2-(2-{2-[2-(2,2,2-трифторацетиламино)этоксид]этоксид]этоксид]пропиононовой кислоты из 3-[2-(2-{2-[2-(2,2,2-трифторацетиламино)этоксид]этоксид]этоксид]пропиононовой кислоты.

Раствор 3-[2-(2-{2-[2-(2,2,2-трифторацетиламино)этоксид]этоксид]этоксид]пропиононовой кислоты (0,520 г, 1,43 ммоль) в дихлорметане (10 мл) и метаноле (5 мл) обрабатывали 2М раствором (триметилсилил)диазометана в диэтиловом эфире (1 мл, 2 ммоль) и перемешивали при rt в течение 1 ч. Добавляли дополнительную аликвоту 2М раствора (триметилсилил)диазометана в диэтиловом эфире (1 мл, 2 ммоль) и раствор перемешивали при r.t. в течение 1 дня. Растворители выпаривали in vacuo. Продукт наносили на колонку с силикагелем (40 г) и элюировали при градиенте (1-10%) метанола в дихлорметане с получением конечного продукт в виде бледно желтого масла, 0,536 г (100%). MS (ESI+) масса/заряд: 376,0 [ $MH^+$ ].  $^1H$ ЯМР (300 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 2,60 (2H, t), 3,51-3,56 (2H, m), 3,60-3,64 (14H, m), 3,66 (3H, s), 3,73 (2H, t) и 7,86 (1H, br s).

Д. Синтез сложного метилового эфира 3-{2-[2-(2-{2-[метил-(2,2,2-трифторацетил)амино]этоксид]этоксид]этоксид]пропиононовой кислоты из сложного метилового эфира 3-[2-(2-{2-[2-(2,2,2-трифторацетиламино)этоксид]этоксид]этоксид]пропиононовой кислоты.

Раствор сложного метилового эфира 3-[2-(2-{2-[2-(2,2,2-трифторацетиламино)этоксид]этоксид]этоксид]пропиононовой кислоты 175 (0,290 г, 0,77 ммоль) в DMF (4 мл) обрабатывали карбонатом калия (0,320 г, 2,31 ммоль) и йодистым метилом (0,287 мл, 4,63 ммоль) и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 дня. Смесь охлаждали на ледяной бане и обрабатывали холодной 1н. хлористоводородной кислотой (1 мл). Полученный раствор наносили на колонку с обращенной фазой C18, 20-40 мкм (50 г), и элюировали при градиенте (5-95%) ацетонитрила (0,1% АсОН) в воде (0,1% АсОН), и лиофилизировали с получением 0,217 г (72%) продукта в виде бесцветного масла 0,29 г (64%). LCMS (ESI+) масса/заряд: 390,0 [ $MH^+$ ].  $^1H$ ЯМР (300 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 2,60 (2H, t), 3,21 (2H, q), 3,58-3,70 (17H, m), наложенный на 3,68 (3H, s) и 3,75 (2H, t).

Е. Синтез натриевой соли 3-(2-{2-[2-(2-метиламиноэтоксид]этоксид]этоксид]пропиононовой кислоты из сложного метилового эфира 3-{2-[2-(2-{2-[метил-(2,2,2-трифторацетил)амино]этоксид]этоксид]этоксид]пропиононовой кислоты.

Раствор сложного метилового эфира 3-{2-[2-(2-{2-[метил-(2,2,2-трифторацетил)амино]этоксид]этоксид]этоксид]пропиононовой кислоты (0,433 г, 1,1 ммоль) в метаноле (1 мл) обрабатывали 1М водным гидроксидом натрия (2,9 мл, 2,9 ммоль) и нагревали при 60°C в течение 2 ч. Раствор охлаждали до rt и растворители выпаривали in vacuo. Материал растворяли в ацетонитриле и растворитель выпаривали in vacuo (повторяли дважды). Полученный остаток высушивали под вакуумом и применяли без дополнительной очистки на следующей стадии. MS (ESI+) масса/заряд: 280,4 [ $MH^+$ ].  $^1H$ ЯМР (300 МГц, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 1,89 (2H, t), 1,94-1,99 (6H, m), 2,99-3,14 (10H, m), 2,95 (6H, d) и 8,90 (1H, br s).

Ф. Синтез 3-{2-[2-(2-{2-[метил-(2,2,2-трифторацетил)амино]этоксид]этоксид]этоксид]пропиононовой кислоты из натриевой соли 3-(2-{2-[2-(2-метиламиноэтоксид]этоксид]этоксид]пропиононовой кислоты.

Ангидрид трифторуксусной кислоты (6 мл) добавляли к натриевой соли 3-(2-{2-[2-(2-метиламиноэтоксид]этоксид]этоксид]пропиононовой кислоты и смесь перемешивали при rt в течение 3 ч. Растворитель выпаривали in vacuo. Остаток растворяли в смеси ацетонитрил:вода (1:1), и наносили на колонку с обращенной фазой C18, 20-40 мкм (150 г), и элюировали при градиенте (5-95%) ацетонитрила (0,1% АсОН) в воде (0,1% АсОН), и лиофилизировали с получением продукта в виде бесцветного масла, 0,383 г (92%, за 2 стадии). MS (ESI+) масса/заряд: 376,0 [ $MH^+$ ]. MS (ESI-) масса/заряд: 374,0 [ $MH^-$ ].  $^1H$ ЯМР (300 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 2,58-2,71 (2H, m), 3,13 и 3,22 (3H, каждый s), 3,63 (16H, m) и 3,76 (2H, t).

Г. Синтез N-[6-(5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[b,f]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-N-метил-3-{2-[2-(2-{2-[метил-(2,2,2-трифторацетил)амино]этоксид]этоксид]этоксид]пропионамида из уксуснокислой соли 1-(5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[b,f]азоцин-5-ил)-6-метиламиногексан-1-она и 3-{2-[2-(2-{2-

[метил-(2,2,2-трифторацетил)амино]этокси}этокси}этокси}пропионовой кислоты.

Раствор уксуснокислой соли 1-(5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[b,f]азоцин-5-ил)-6-метиламиногексан-1-она (0,283 г, 0,721 ммоль) в дихлорметане (20 мл) промывали насыщенным водным бикарбонатом натрия (20 мл) и высушивали над сульфатом натрия. Растворитель выпаривали *in vacuo* с получением свободного основания 1-(5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[b,f]азоцин-5-ил)-6-метиламиногексан-1-она, 0,22 г (92%), которое применяли на следующей стадии.

Раствор 3-{2-[2-(2-{2-[метил-(2,2,2-трифторацетил)амино]этокси}этокси}этокси}пропионовой кислоты (0,248 г, 0,660 ммоль) в DMF (4 мл) обрабатывали пентафторфенилдифенилфосфинатом (0,305 г, 0,794 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламин. Полученный раствор добавляли к свободному основанию 1-(5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[b,f]азоцин-5-ил)-6-метиламиногексан-1-она (0,22 г, 0,662 ммоль) и перемешивали при *rt* в течение 20 ч. Добавляли воду (1 мл) и раствор наносили на колонку с обращенной фазой C18, 20-40 мкм (150 г), и элюировали при градиенте (30-95%) ацетонитрила (0,1% AcOH) в воде (0,1% AcOH), и лиофилизировали с получением продукта в виде бесцветного масла, 0,322 г (71%). MS (ESI+) масса/заряд: 690,0 [MН<sup>+</sup>] и 712,0 [MNa<sup>+</sup>]. <sup>1</sup>НЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ: 0,92-1,03 (2H, m), 1,26-1,34 (2H, m), 1,35-1,46 (2H, m), 1,87-1,97 (1H, m), 2,15-2,21 (1H, m), 2,50-2,57 (2H, m), 2,79 и 2,89 (вместе 3H, каждый s), 3,04-3,07 (1H, m), 3,10 и 3,21 (вместе 3H, каждый s), 3,14-3,19 (1H, m), 3,61-3,69 (1H, m), 3,73-3,77 (2H, m), 5,16 (1H, dd), 7,22-7,43 (7H, m) и 7,70 (1H, d).

Н. Синтез N-[6-(5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[b,f]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-N-метил-3-(2-{2-[2-(2-метиламиноэтокси)этокси}этокси}этокси)пропионамида из N-[6-(5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[b,f]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-N-метил-3-{2-[2-(2-{2-[метил-(2,2,2-трифторацетил)-амино]этокси}этокси}этокси}пропионамида.

Раствор N-[6-(5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[b,f]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-N-метил-3-{2-[2-(2-{2-[метил-(2,2,2-трифторацетил)амино]этокси}этокси}этокси}пропионамида (0,322 г, 0,467 ммоль) в метаноле (10 мл) обрабатывали карбонатом калия (0,323 г, 2,33 ммоль) и смесь перемешивали при *rt* в течение одного дня. Добавляли дополнительную порцию карбоната калия (0,323 г, 2,33 ммоль) и продолжали перемешивание в течение дополнительного дня. Неорганические вещества удаляли путем фильтрования и растворитель выпаривали *in vacuo*. Остаток растворяли в смеси ацетонитрил/вода (1/1), и наносили на колонку с обращенной фазой C18, 20-40 мкм (150 г), и элюировали при градиенте (5-95%) ацетонитрила (0,1% AcOH) в воде (0,1% AcOH), и лиофилизировали с получением N-[6-(5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[b,f]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-N-метил-3-{2-[2-(2-{2-[метил-(2,2,2-трифторацетил)амино]этокси}этокси}этокси}пропионамида, 0,218 г (71%), и продукта с небольшим количеством примесей, 0,048 г (16%). MS (ESI+) масса/заряд: 594,0 [MН<sup>+</sup>]. <sup>1</sup>НЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,85-0,90 (2H, m), 1,11-1,29 (4H, m), 1,75-1,86 (1H, m), 2,12-2,17 (1H, m), 2,27 (3H, m), 2,40 (1H, t), 2,46 (1H, t), 2,59 (2H, t), 2,66 и 2,80 (вместе 3H, каждый s), 2,98-3,09 (2H, m), 3,42-3,63 (17H, m), 5,04 (1H, d), 7,30-7,49 (6H, m), 7,57 (1H, d) и 7,63 (1H, d).

I. Синтез гидрохлорида 6-метиламиногексановой кислоты из N-метилкапролактама.

Раствор N-метилкапролактама (1,12 г, 8,81 ммоль) в 5,3 мл концентрированной водной HCl и 6,7 мл воды нагревали с обратным холодильником в течение 19,5 ч. Реакционной смеси давали остыть до комнатной температуры и добавляли 20 мл воды. Затем ее концентрировали. Добавляли 10 мл воды и смесь снова концентрировали. Следующее проводили дважды: затем добавляли 5 мл ацетона и смесь концентрировали. Ее высушивали *in vacuo* с получением продукта (1,57 г, 98,1%, 8,64 ммоль) в виде окрашенного в кремовый цвет полутвердого вещества. (45-149) MS масса/заряд MН<sup>+</sup> 146; <sup>1</sup>НЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 1,24-1,34 (2H, m), 1,44-1,62 (4H, m), 2,18-2,23 (2H, t), 2,77-2,86 (2H, m), 8,70 (2H, br), 12,05 (1H, s, br). (45-149-1 ЯМР).

J. Синтез 6-[метил-(2,2,2-трифторацетил)амино]гексановой кислоты из гидрохлорида 6-метиламиногексановой кислоты.

Гидрохлорид 6-метиламиногексановой кислоты (5,38 г, 29,6 ммоль) растворяли в 20 мл метанола и добавляли этилтрифторацетат (4,4 мл, 5,3 г, 37 ммоль) и триэтиламин (8,3 мл, 6,0 г, 60 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 19,5 ч в атмосфере аргона при комнатной температуре. Добавляли 80 мл 2M водного HCl и смесь экстрагировали с помощью 3×60 мл эфира. Затем объединенные органические слои промывали с помощью 100 мл солевого раствора, высушивали с помощью безводного сульфата натрия, фильтровали, концентрировали и высушивали *in vacuo* с получением продукта в виде прозрачного бледно-желтого сиропа (6,86 г, 96,1%, 28,4 ммоль). (53-15) MS масса/заряд MН<sup>+</sup> 242; <sup>1</sup>НЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 1,16-1,28 (2H, m), 1,45-1,60 (4H, m), 2,17-2,24 (2H, m), 2,94 (1H, s), 3,06-3,07 (2H, q), 3,32-3,39 (2H, m). (45-150-1 ЯМР).

K. Синтез 6-[метил-(2,2,2-трифторацетил)амино]гексаноилхлорида из 6-[метил-(2,2,2-трифторацетил)амино]гексановой кислоты.

Раствор 6-[метил-(2,2,2-трифторацетил)амино]гексановой кислоты (6,84 г, 28,4 ммоль) в хлористом метиле (140 мл) охлаждали до 0°C в атмосфере аргона. Медленно добавляли оксалилхлорид (12 мл, 18 г, 142 ммоль), а затем добавляли 6 капель DMF. Смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч и при комнатной температуре в течение 1,5 ч. Затем ее концентрировали и высушивали *in vacuo* с получением про-

дукта в виде светлого янтарного масла (6,54 г, 88,9%, 25,2 ммоль). (53-16)  $^1\text{H}$ ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,35-1,43 (2H, m), 1,57-1,81 (4H, m), 2,89-2,94 (2H, m), 3,02 (1H, s), 3,11-3,13 (2H, q), 3,37-3,46 (2H, m). (45-152-1 для ЯМР).

Л. Синтез дибензо[а,д]циклогептен-5-он оксима из дибензо[а,д]циклогептен-5-она.

Раствор дибензо[а,д]циклогептен-5-она (25,0 г, 121 ммоль) и гидроксилamina HCl (12,6 г, 181 ммоль) в пиридине (70 мл) нагревали с обратным холодильником в течение 15,5 ч. Реакционной смеси давали остыть до  $rt$  и концентрировали *in vacuo*. Остаток разделяли между 5% водной HCl/лед (300 мл) и этилацетатом (200 мл). Водный слой дважды экстрагировали этилацетатом (150 мл). Органические слои объединяли, и промывали солевым раствором (250 мл), и высушивали над сульфатом натрия. Растворитель выпаривали *in vacuo* с получением продукта в виде светлого желто-бежевого твердого вещества, 26,8 г (100%). MS (ESI+) масса/заряд: 222 [ $\text{MH}^+$ ]; MS (ESI-) масса/заряд: 220 [ $\text{M-H}^-$ ];  $^1\text{H}$ ЯМР (300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6,91-6,92 (2H, d), 7,33-7,43 (6H, m), 7,56-7,61 (1H, m), 7,65-7,68 (1H, m), 8,55 (1H, s).

М. Дибензо[а,д]циклогептен-5-он оксим в 5,6-дигидродибензо[б,ф]азоцин.

Раствор диизобутилалюминия гидрида в дихлорметане (1,0М, 192 мл) охлаждали на водяной бане и порциями добавляли твердый дибензо[а,д]циклогептен-5-он оксим (8,48 г, 38,3 ммоль) с такой скоростью, чтобы поддерживать температуру между 15-27°C. Водяную баню убирали и полученный раствор перемешивали при  $rt$  в течение 3 дней. Раствор охлаждали на водяной бане и порциями добавляли твердый декагидрат сульфата натрия (20,4 г, 63,3 ммоль) с такой скоростью, чтобы поддерживать температуру между 12-30°C. Добавляли целит и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Неорганические вещества отделяли путем фильтрования и тщательно промывали этилацетатом. Органические растворы объединяли и растворители выпаривали *in vacuo*. Остаток наносили на колонку с силикагелем (150 г) и элюировали при градиенте дихлорметана (20-100%) в гексанах с получением продукта, 5,0 г (63%), в виде желтого твердого вещества. MS масса/заряд: 208,4 [ $\text{MH}^+$ ];  $^1\text{H}$ ЯМР(300 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4,29 (1H, br s), 4,59 (2H, s), 6,39 (1H, d), 6,50 (1H, dd), 6,58 (1H, d), 6,61-6,66 (1H, m), 6,89-6,95 (1H, m), 7,00 (1H, dd), 7,19-7,32 (4H, m).

Н. Синтез N-[6-(6H-дибензо[б,ф]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-2,2,2-трифтор-N-метилацетамида из 5,6-дигидродибензо[б,ф]азоцина (24) и 6-[метил-(2,2,2-трифторацетил)амино]-гексаноилхлорида.

Пиридин (3,6 мл, 3,5 г, 45 ммоль) и 6-[метил-(2,2,2-трифторацетил)амино]гексаноилхлорид (4,64 г, 17,9 ммоль) в хлористом метиле (8 мл) добавляли к раствору N-[6-(6H-дибензо[б,ф]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-2,2,2-трифтор-N-метилацетамида (26а), полученному из 5,6-дигидродибензо[б,ф]азоцина (3,11 г, 15,0 ммоль) в хлористом метиле (40 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение 2,5 ч. Затем ее разбавляли с помощью 150 мл хлористого метилена и промывали с помощью 150 мл воды. Водный слой экстрагировали с помощью 150 мл хлористого метилена. Затем объединенные органические слои промывали с помощью 150 мл солевого раствора, высушивали с помощью безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт подвергали флэш-хроматографии (Isco) с применением картриджа с 220 г силикагеля при градиенте 0-50% этилацетата/гексана. После концентрирования и высушивания *in vacuo* получали продукт в виде густого желтого сиропа. (5,64 г, 87,4%, 13,1 ммоль). (53-36) MS масса/заряд  $\text{MH}^+$  431;  $^1\text{H}$ ЯМР (300 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 0,90-1,00 (2H, m), 1,26-1,40 (4H, m), 1,70-1,82 (1H, m), 1,88-1,98 (1H, m), 2,86 (1H, s), 2,99-3,01 (2H, q), 3,18-3,26 (2H, m), 4,12-4,18 (1H, dd), 5,32-5,39 (1H, dd), 6,61-6,66 (1H, dd), 6,73-6,79 (1H, dd), 7,13-7,20 (3H, m), 7,25-7,38 (5H, m). (53-6-1 для ЯМР).

О. Синтез N-[6-(11,12-дибром-11,12-дигидро-6H-дибензо[б,ф]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-2,2,2-трифтор-N-метилацетамида из N-[6-(6H-дибензо[б,ф]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-2,2,2-трифтор-N-метилацетамида.

Трибромид пиридиния (1,47 г, 4,60 ммоль) добавляли к раствору N-[6-(6H-дибензо[б,ф]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-2,2,2-трифтор-N-метилацетамида (1,80 г, 4,18 ммоль) в хлористом метиле (7,8 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение приблизительно 3 ч. Ее разбавляли с помощью 100 мл хлористого метилена и промывали 2X с помощью 55 мл 5% водной HCl. Затем органический слой промывали с помощью 55 мл солевого раствора, высушивали с помощью безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт подвергали флэш-хроматографии (Isco) с применением картриджа со 120 г диоксида кремния при градиенте 0-50% этилацетата/гексана. Его концентрировали и высушивали *in vacuo* с получением продукта в виде белой пены (1,93 г, 78,1%, 3,27 ммоль). (53-21) MS масса/заряд  $\text{MH}^+$  591;  $^1\text{H}$ ЯМР (300 МГц,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 1,10-1,19 (2H, m), 1,38-1,63 (4H, m), 2,02-2,33 (2H, m), 2,90 (1H, s), 3,02-3,03 (2H, d), 3,28-3,34 (2H, m), 4,18-5,09 (1H, m), 5,69-5,75 (1H, m), 5,81-5,87 (1H, t), 6,97-7,31 (7H, m), 7,55-7,65 (1H, m). (45-162-1 ЯМР).

Р. Синтез N-[6-(5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[б,ф]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-2,2,2-трифтор-N-метилацетамида из N-[6-(11,12-дибром-11,12-дигидро-6H-дибензо[б,ф]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-2,2,2-трифтор-N-метилацетамида.

Раствор трет-бутоксидка калия в THF (1,0М, 5,3 мл, 5,3 ммоль) по каплям добавляли к раствору N-[6-(11,12-дибром-11,12-дигидро-6H-дибензо[б,ф]азоцин-5-ил)-6-оксогексил]-2,2,2-трифтор-N-метилацетамида (1,2 г, 2,03 ммоль) в THF (15 мл), охлаждали на ледяной бане и перемешивали в течение 1 ч. Рас-

твор разбавляли этилацетатом и медленно выливали в 1 н. HCl при быстром перемешивании, охлаждали на ледяной бане. Отделяли органический слой и водный слой экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические фазы промывали соевым раствором и высушивали над сульфатом натрия. Растворители выпаривали *in vacuo* и остаток наносили на колонку с силикагелем (40 г) и элюировали при градиенте (20-80%) этилацетата в гексанах с получением продукта, 0,681 г (80%), в виде янтарного масла. MS (ESI+) масса/заряд: 429,2 [МН<sup>+</sup>]. <sup>1</sup>НЯМР (300 МГц, CDCl<sub>3</sub>): 0,93-1,05 (2H, m), 1,31-1,48 (4H, m), 1,87-1,99 (1H, m), 2,15-2,24 (1H, m), 2,94 (3H, d), 3,14-3,27 (2H, m), 3,66 (1H, dd), 5,16 (1H, dd), 7,24-7,431 (7H, m) и 7,70 (1H, d).

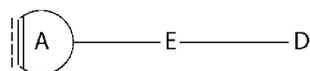
Q. Синтез уксуснокислой соли 1-(5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[b,f]азоцин-5-ил)-6-метил-аминогексан-1-она (29a) из N-[6-(5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[b,f]азоцин)-6-оксогексил]-2,2,2-трифтор-N-метилацетамида (28a).

Раствор N-[6-(5,6-дигидро-11,12-дидегидробензо[b,f]азоцин)-6-оксогексил]-2,2,2-трифтор-N-метилацетамида (0,681 г, 1,61 ммоль) в метаноле (10 мл) обрабатывали карбонатом калия (0,67 г, 4,85 ммоль) и водой (1 мл) и перемешивали при *rt* в течение 18 ч. Растворитель выпаривали *in vacuo* и остаток растворяли в дихлорметане и промывали водой. Растворитель выпаривали *in vacuo* и остаток наносили на колонку с обращенной фазой C18, 20-40 мкм (150 г) и элюировали при градиенте (5-95%) ацетонитрила (0,1% AcOH) в воде (0,1% AcOH). Растворители удаляли путем лиофилизации с получением продукта в виде уксуснокислой соли, 0,533 г (84%), липкого желтовато-коричневого твердого вещества. MS (ESI+) масса/заряд: 333,2 [МН<sup>+</sup>]. <sup>1</sup>НЯМР (300 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 0,88-0,96 (2H, m), 1,11-1,28 (4H, m), 1,75-1,85 (1H, m) наложенный на 1,80 (3H, s), 2,07-2,18 (1H, m), 2,22 (3H, s), 2,31 (2H, t), 3,61 (1H, d), 5,04 (1H, d) и 7,28-7,64 (8H, m).

Все публикации и патенты, приведенные в данном документе, включены посредством ссылки. Модификации и варианты описанных композиций и способов на данный момент очевидны для специалистов в данной области техники, не выходя за пределы объема и сути данного раскрытия. Хотя изобретение было описано в связи с конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что заявленное изобретение не должно ограничиваться конкретными вариантами осуществления. В действительности подразумевается, что модификации описанных композиций и способов осуществления изобретения, очевидные на данный момент для специалистов в данной области техники в свете данного раскрытия, находятся в рамках объема заявленного объекта изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### 1. Соединение формулы I

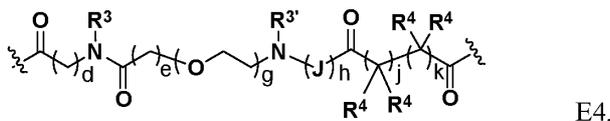


формула I,

где A представляет собой дибензоциклооктинил, циклоокт-4-иноксил или (1R,8S,9S)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси;

D представляет собой майтанзиноид;

E представляет собой



E4,

где J представляет собой природную аминокислоту;

h представляет собой целое число от 0 до 30;

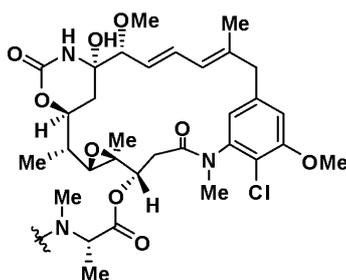
каждый из d, e, g, j и k независимо представляет собой целое число от 1 до 30;

каждый R<sup>4</sup> независимо представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкил, -N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>, -SR<sup>3</sup>, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкокси или арил, выбранный из группы, состоящей из бензола, нафталина, фенила, бифенила и феноксибензола; и

каждый из R<sup>3</sup> или R<sup>3'</sup> представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>алкил,

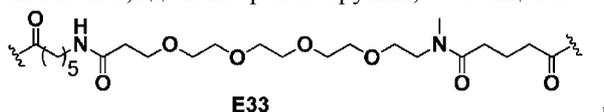
при условии что, когда d равен 5, тогда R<sup>3'</sup> не является H.

2. Соединение по п.1, где майтанзиноид имеет структуру

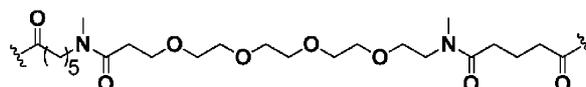


C1

3. Соединение формулы I по п.1, где E выбран из группы, состоящей из



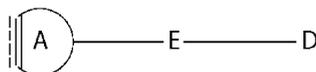
E33



E34

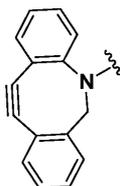
4. Соединение формулы I по п.1, где d представляет собой 2.

5. Соединение формулы I

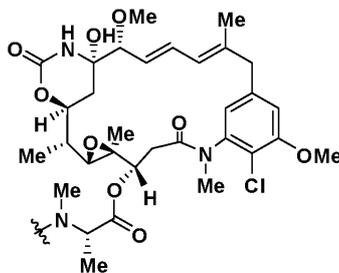


Формула I,

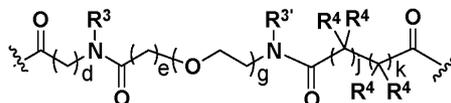
где A представляет собой



D представляет собой



E представляет собой



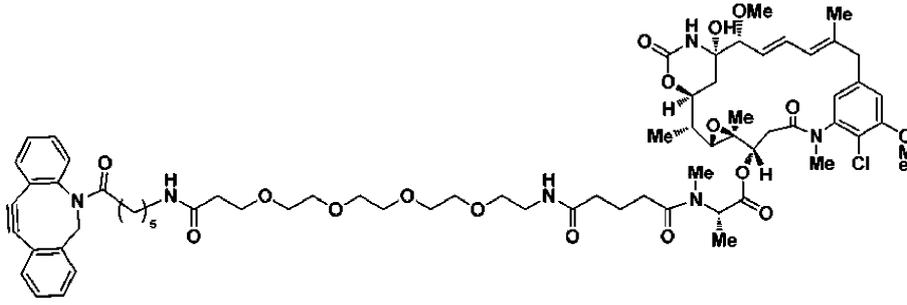
d представляет собой целое число от 1 до 5;

каждый из e, g, j и k независимо представляет собой целое число от 1 до 5;

каждый  $R^4$  независимо представляет собой H,  $C_1$ - $C_8$ алкил,  $-N(R^3)_2$ ,  $-SR^3$ ,  $C_1$ - $C_8$ алкокси или арил, выбранный из группы, состоящей из бензола, нафталина, фенила, бифенила и феноксибензола; и

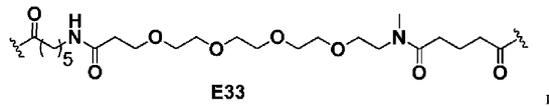
каждый из  $R^3$  или  $R^{3'}$  представляет собой H,  $C_1$ - $C_8$ алкил,

при условии, что соединение формулы I не является

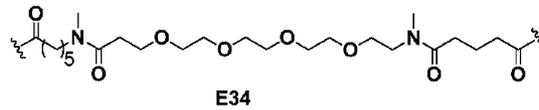


II

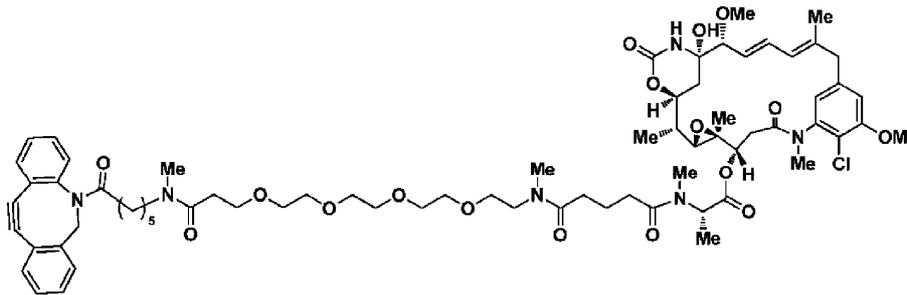
6. Соединение по п.5, где каждый  $R^4$  представляет собой H.  
 7. Соединение по п.6, где  $R^3$  представляет собой H; и  $R^3$  представляет собой метил.  
 8. Соединение по п.7, где e представляет собой 2; g представляет собой 4; j представляет собой 1 и k представляет собой 2, или j представляет собой 2 и k представляет собой 1.  
 9. Соединение формулы I по п.8, где d представляет собой 2.  
 10. Соединение формулы I по п.5, где E выбран из группы, состоящей из



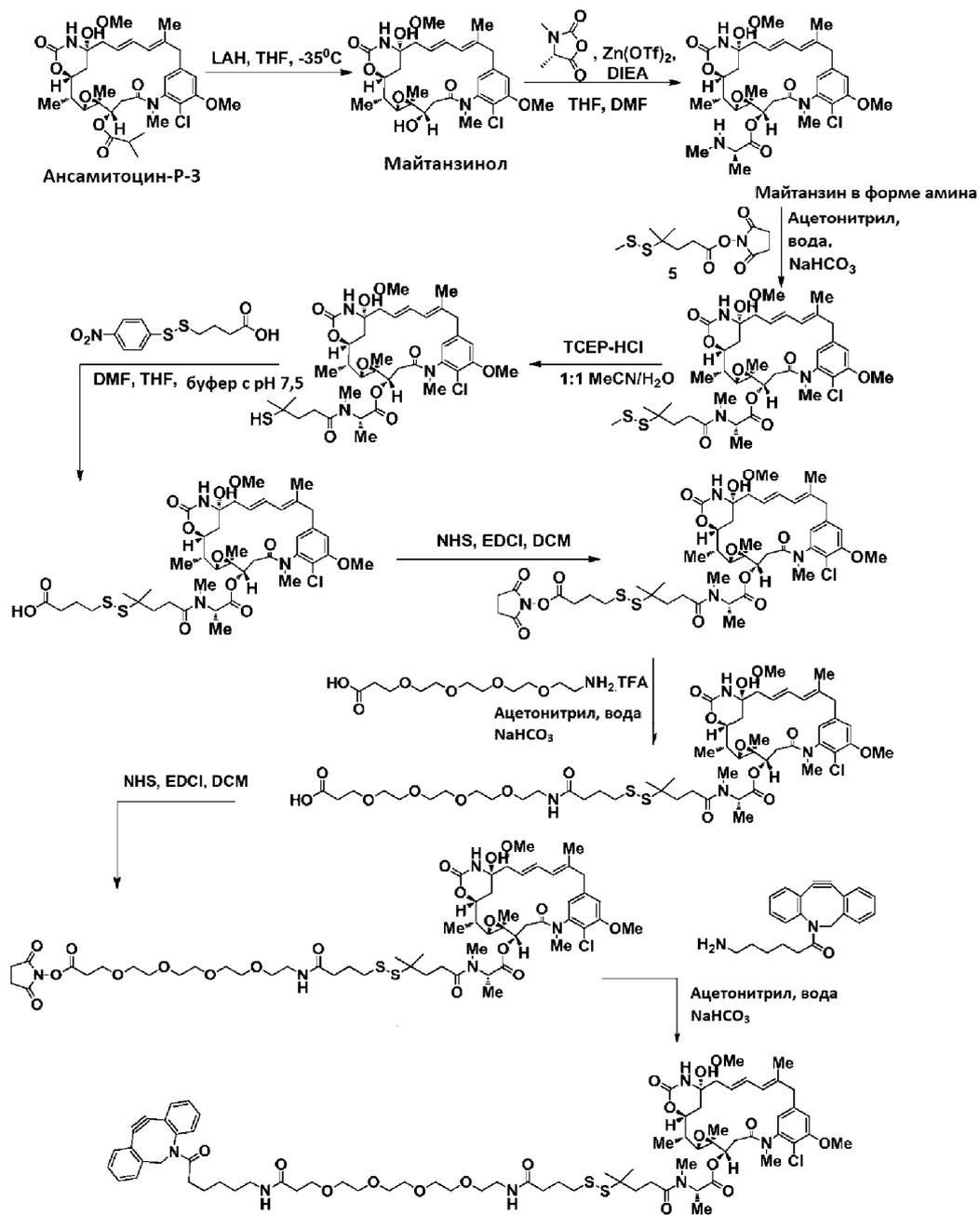
и



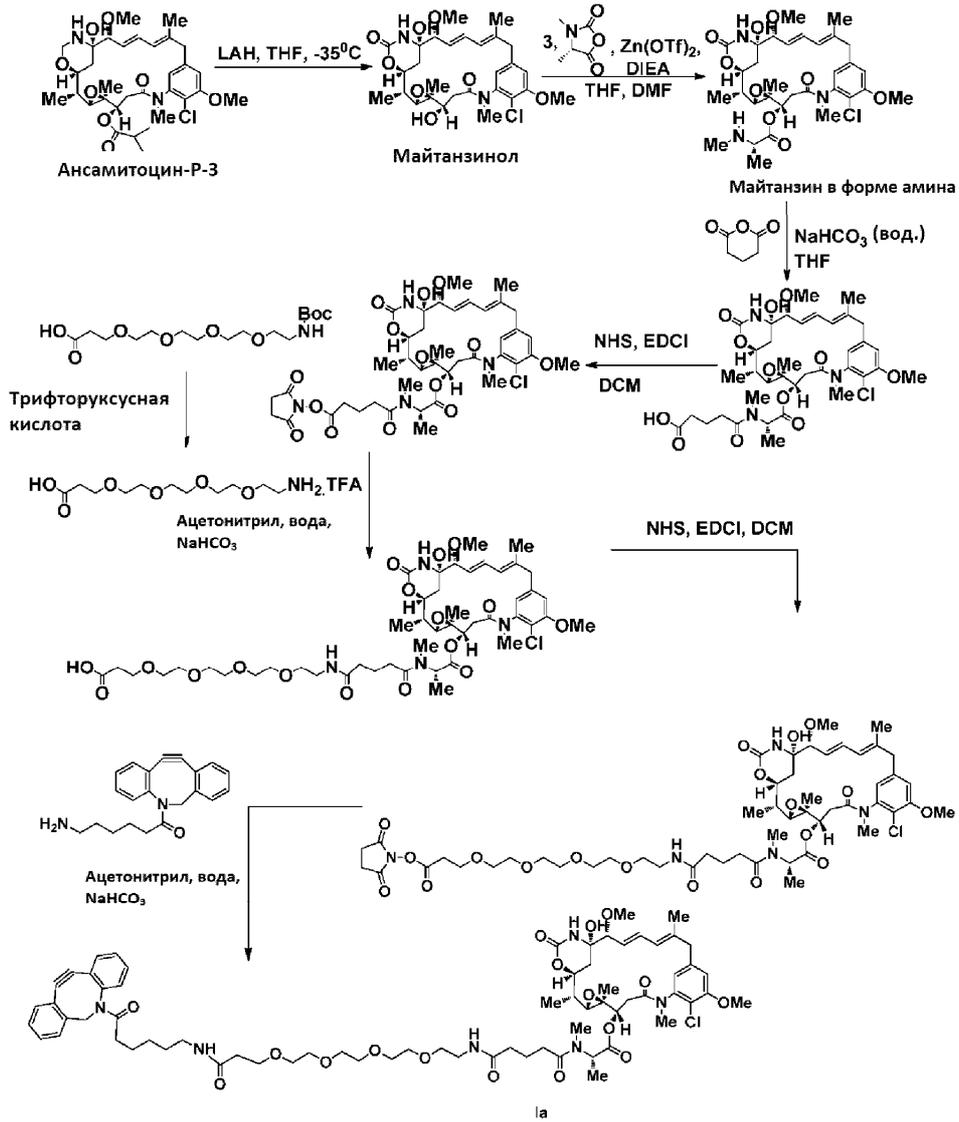
11. Соединение формулы I по п.5, представляющее собой



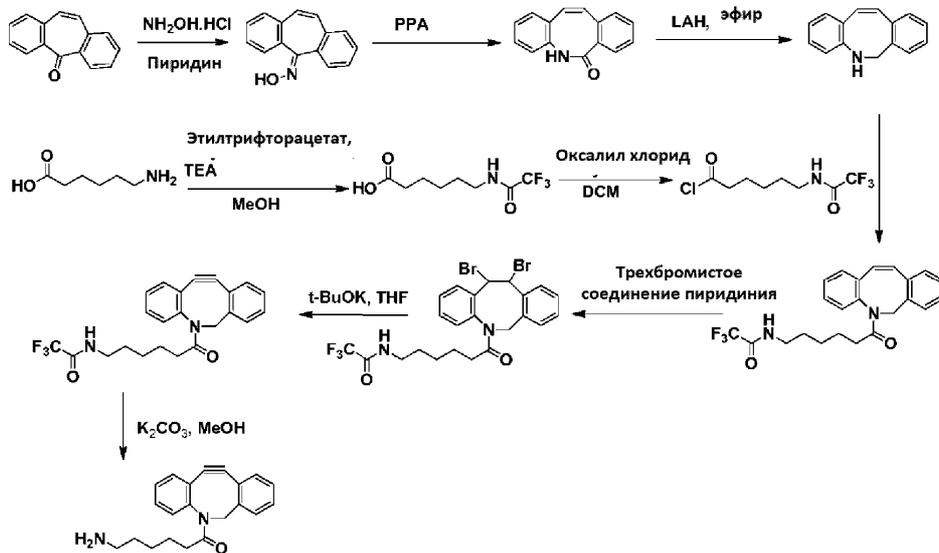
I4



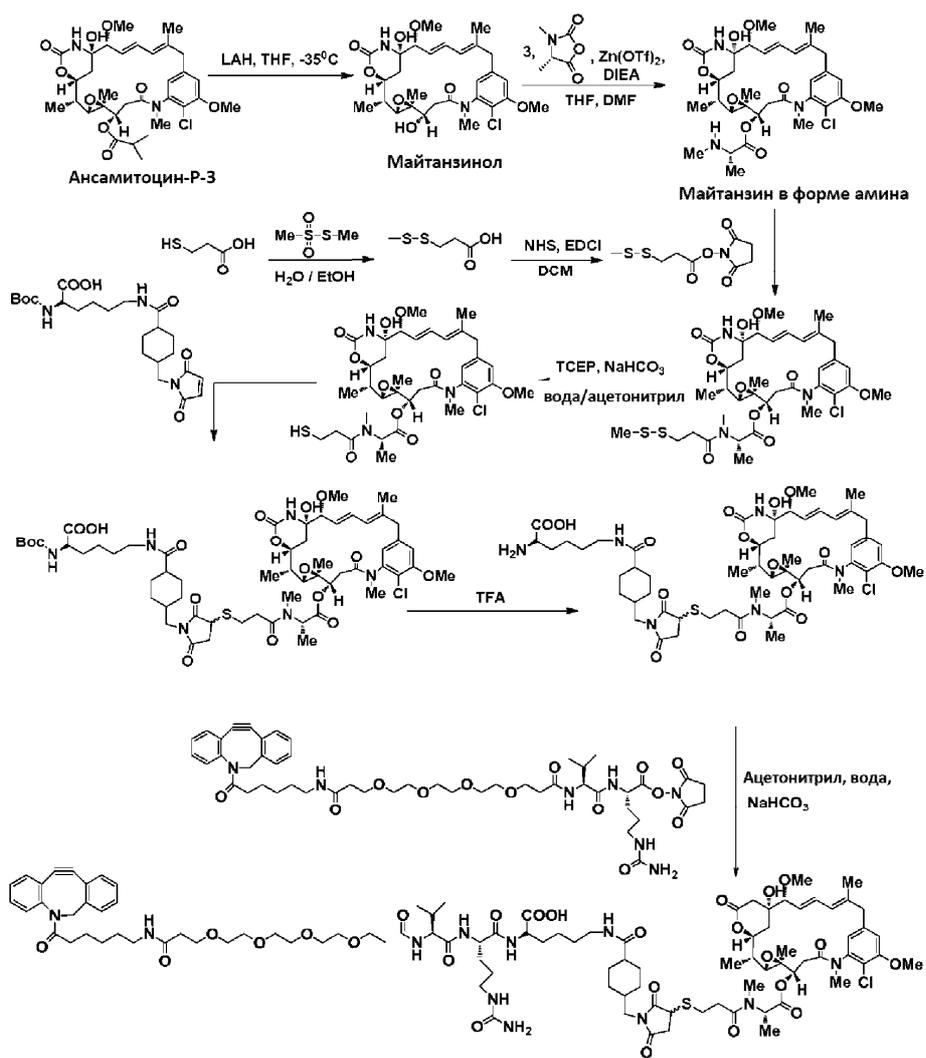
Фиг. 1



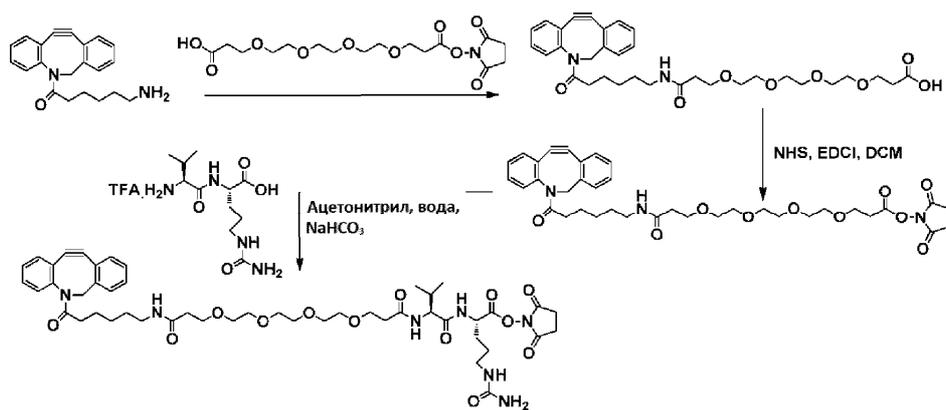
Фиг. 2



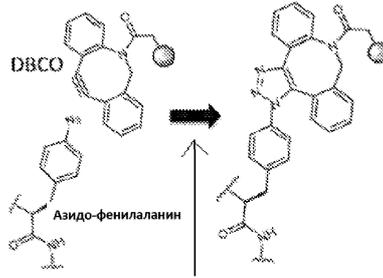
Фиг. 3



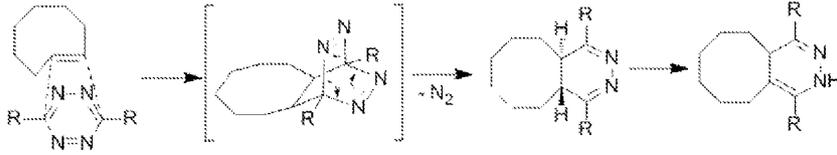
Фиг. 4



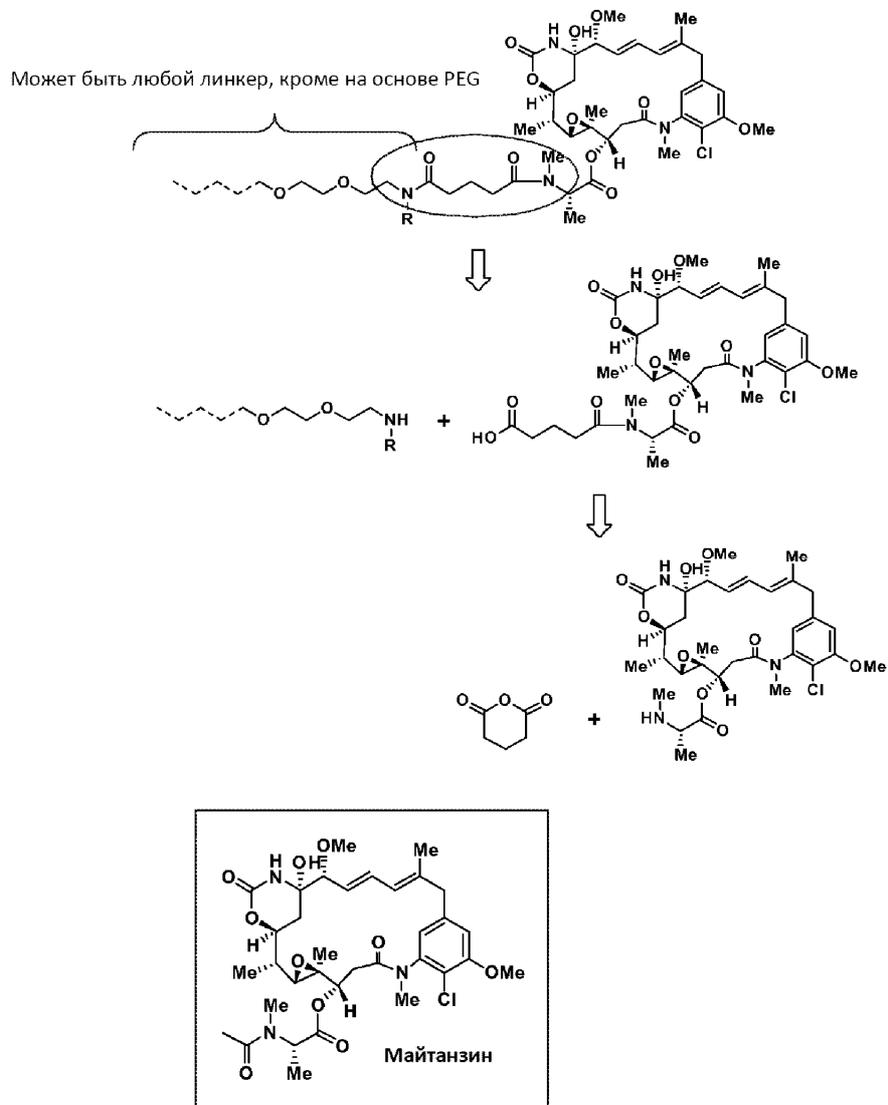
Фиг. 5



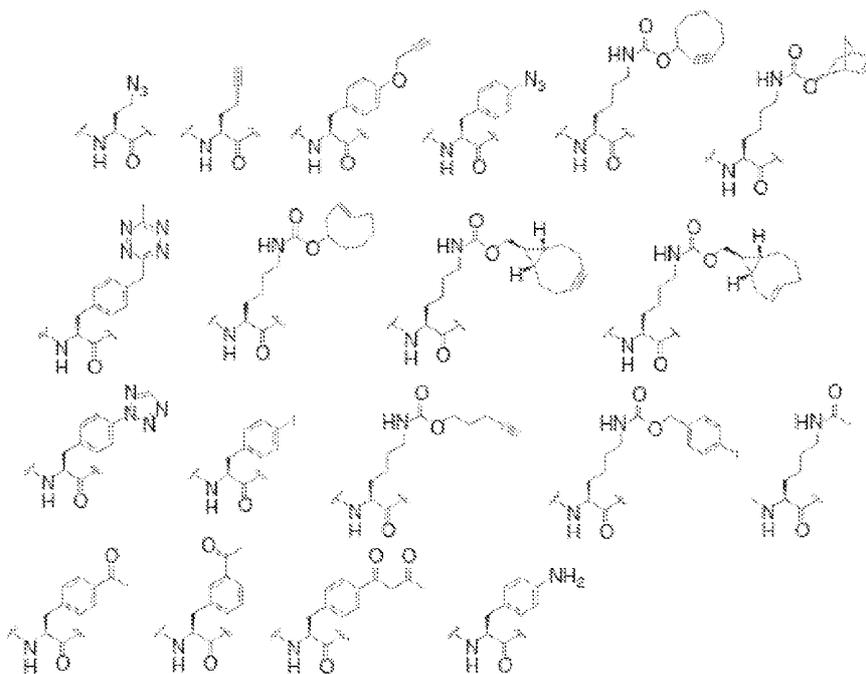
Фиг. 6А



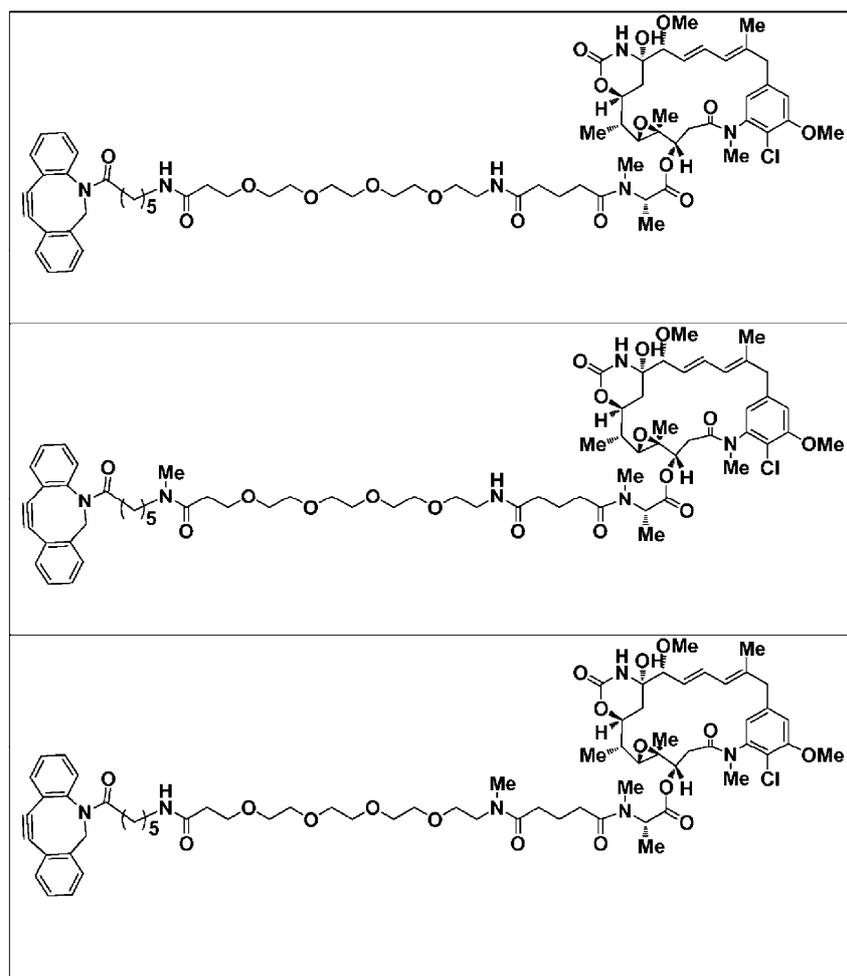
Фиг. 6В



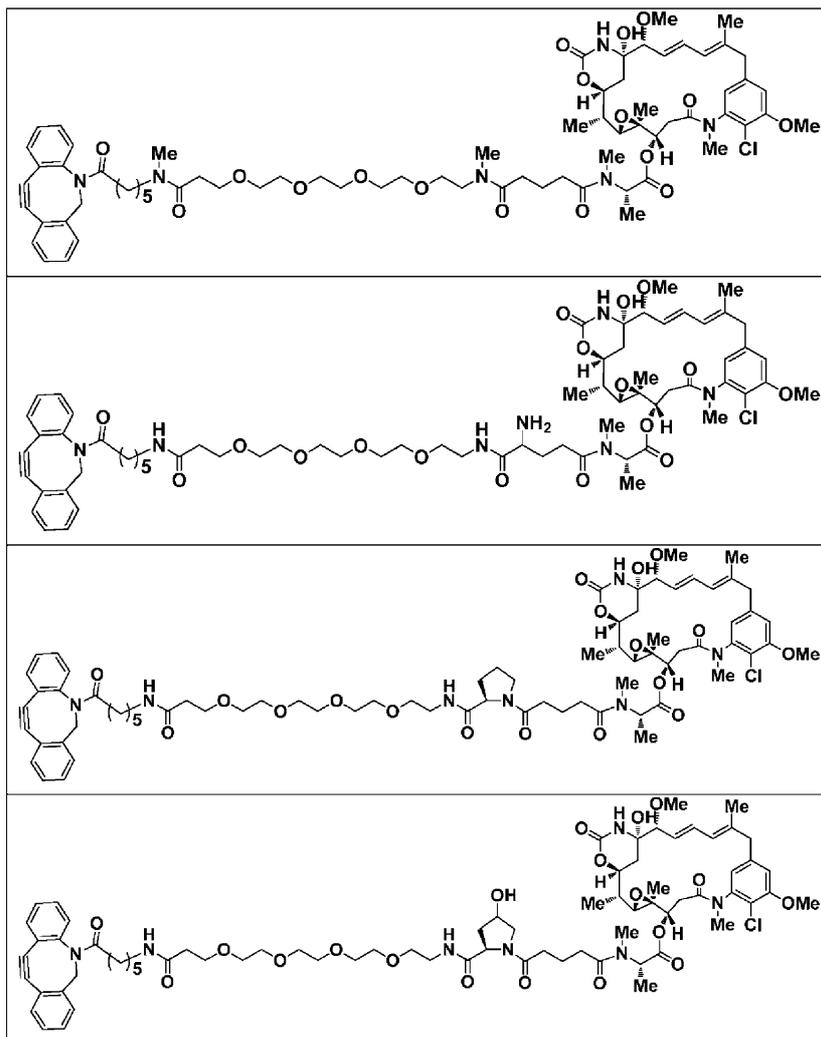
Фиг. 7

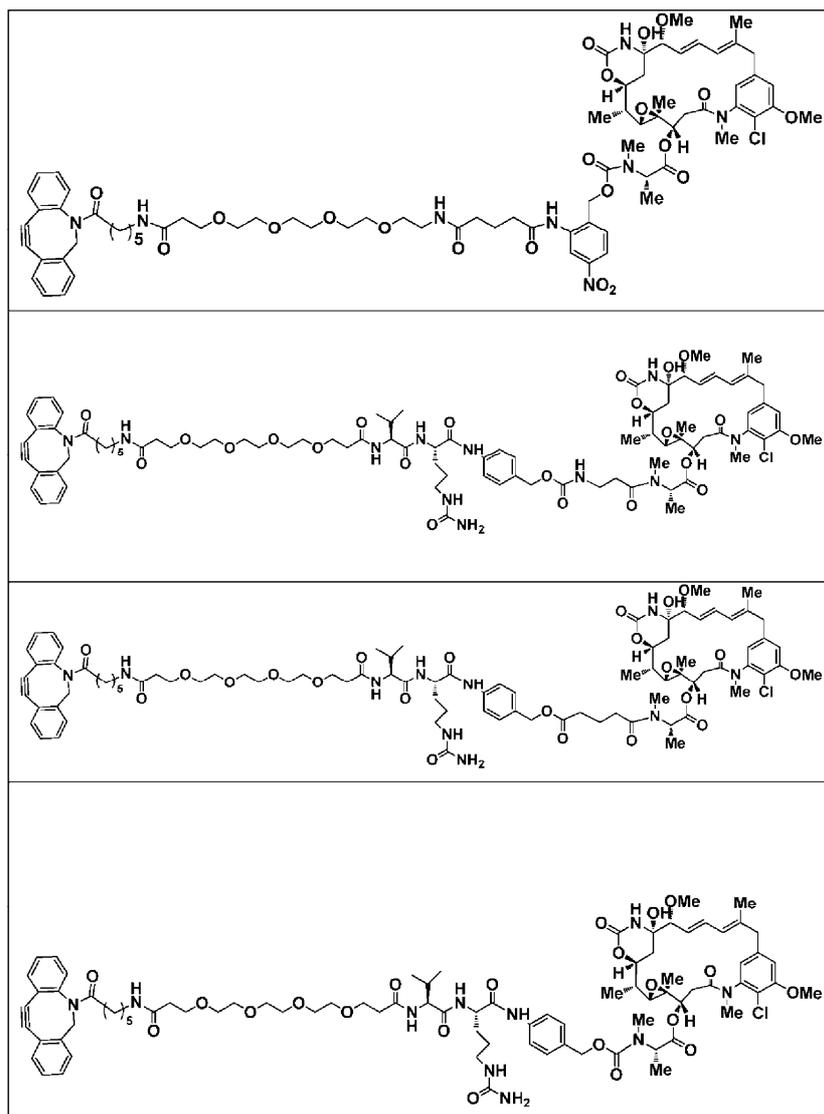


Фиг. 8

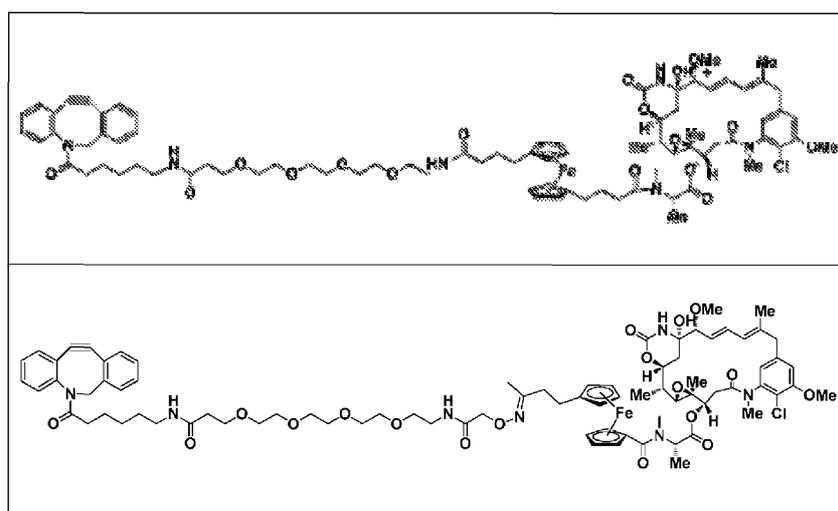


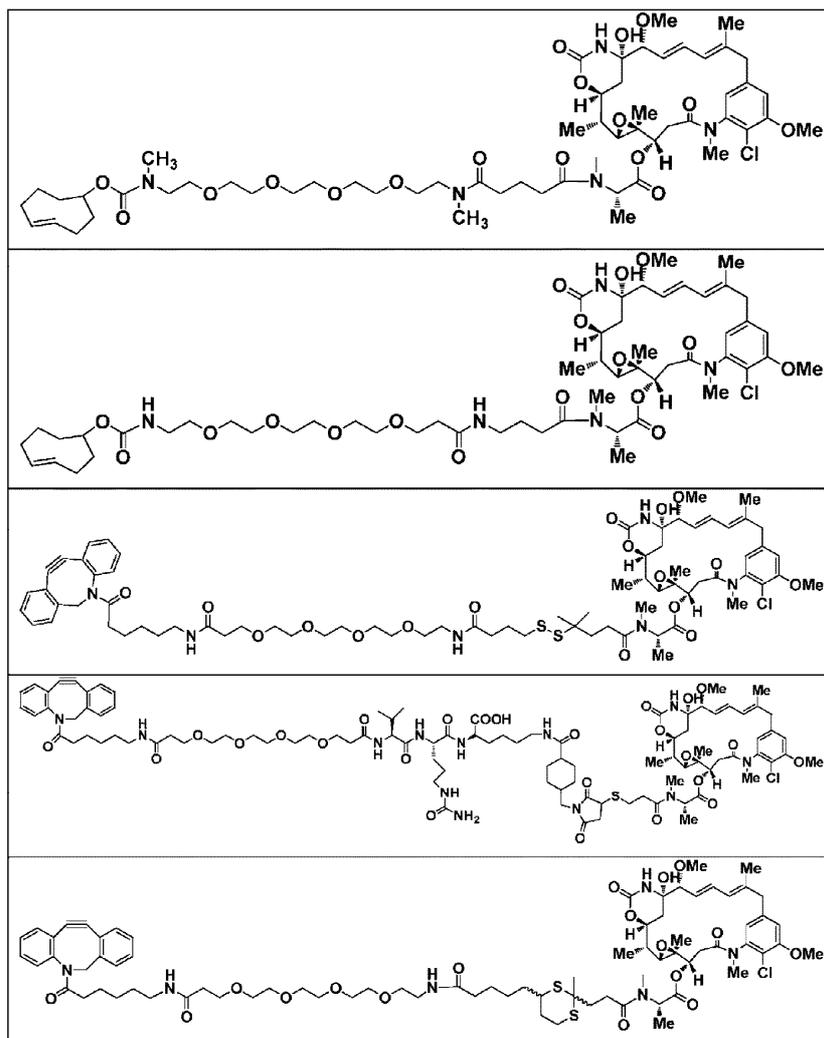
Фиг. 9А



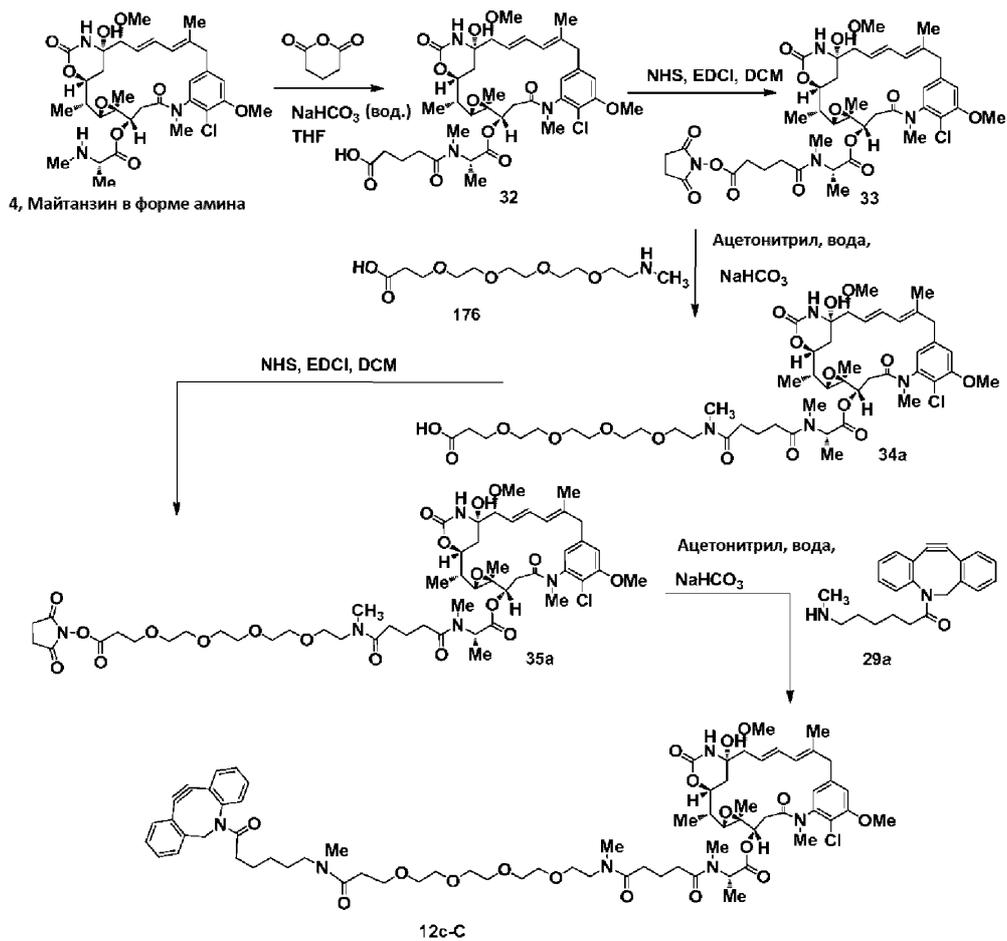


Фиг. 9В

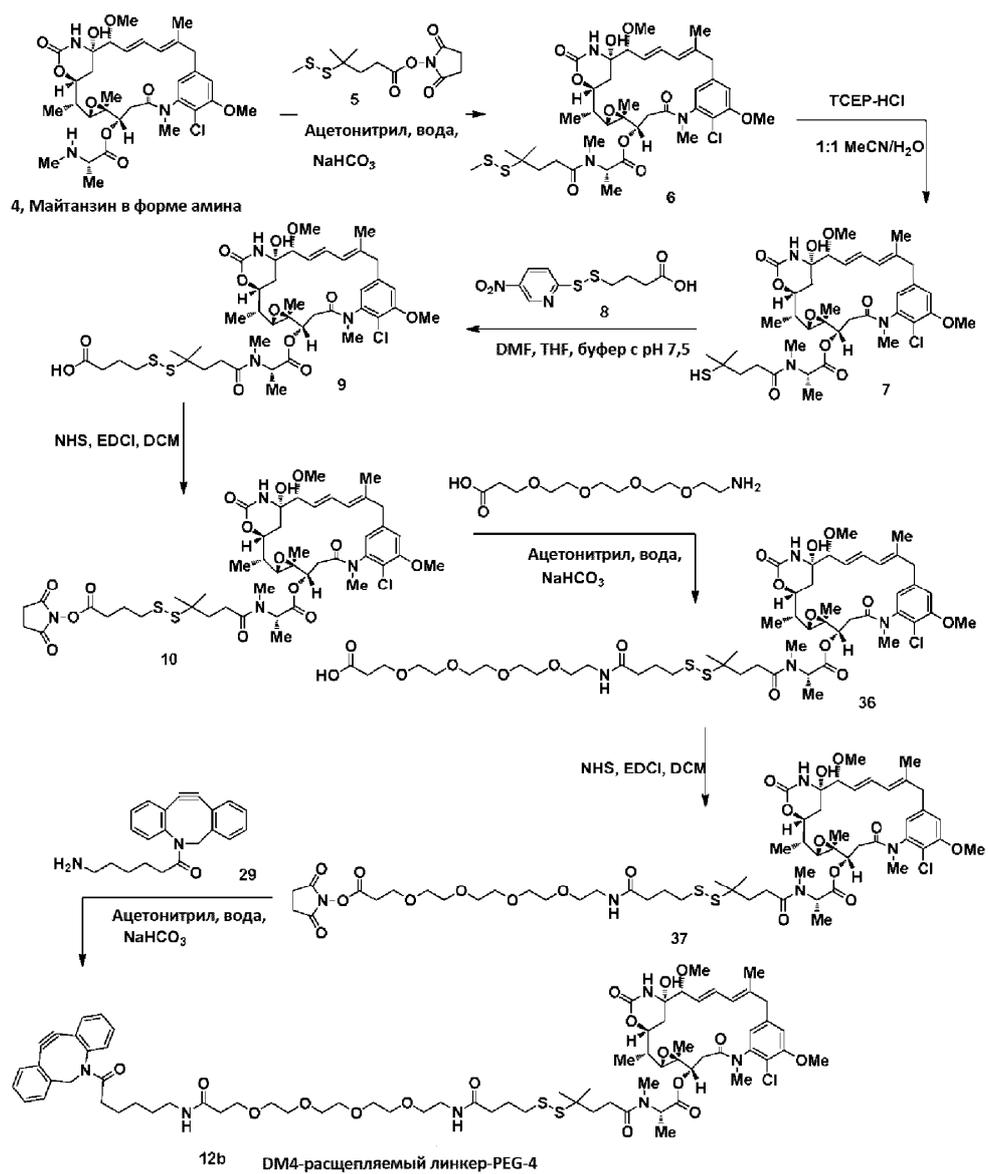


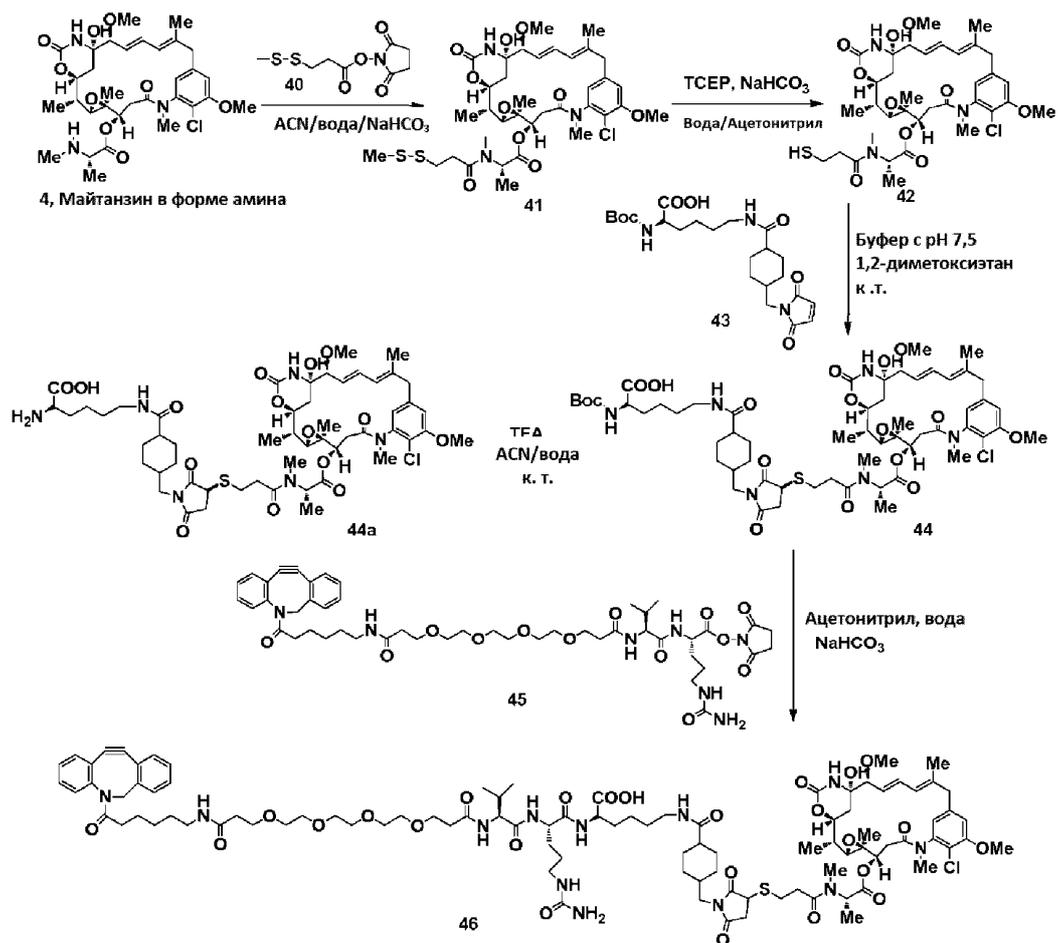


Фиг. 9С

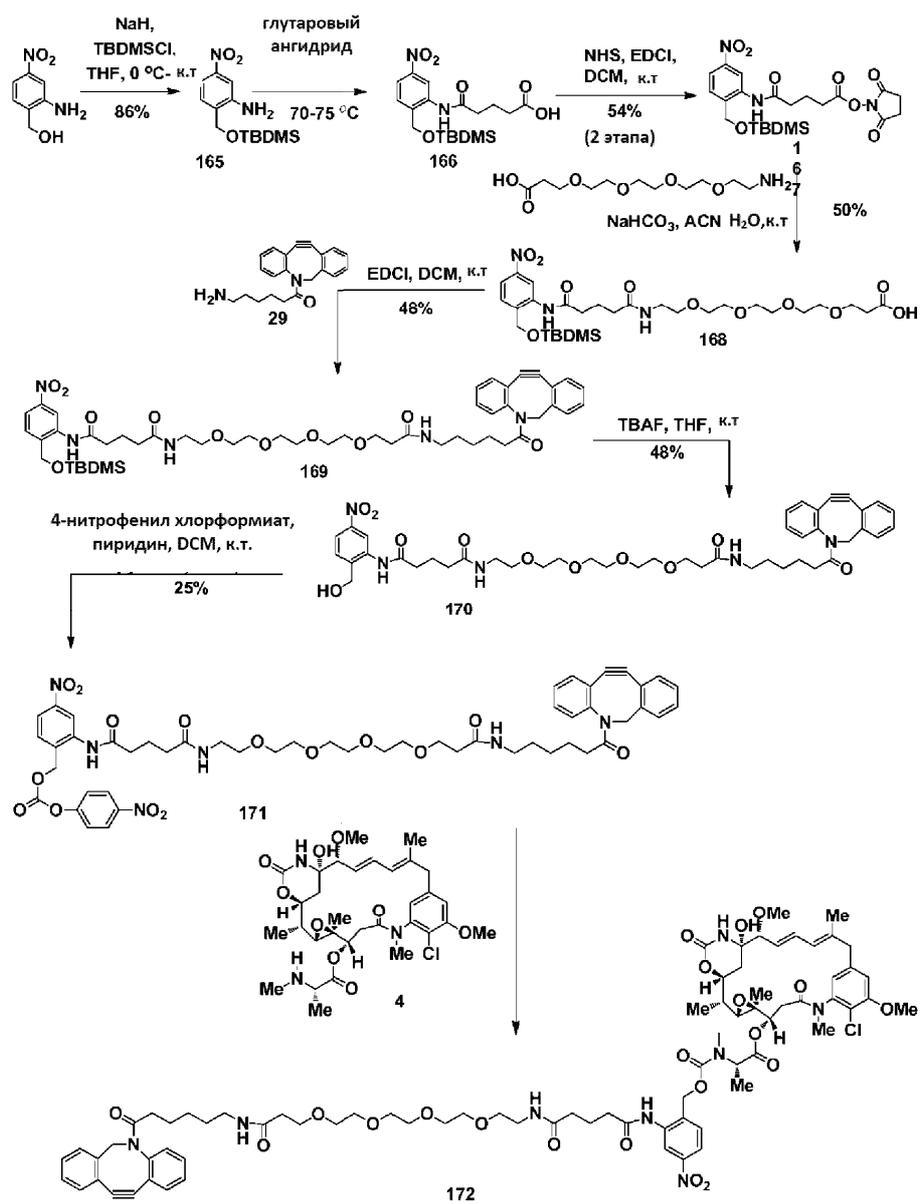


Фиг. 10

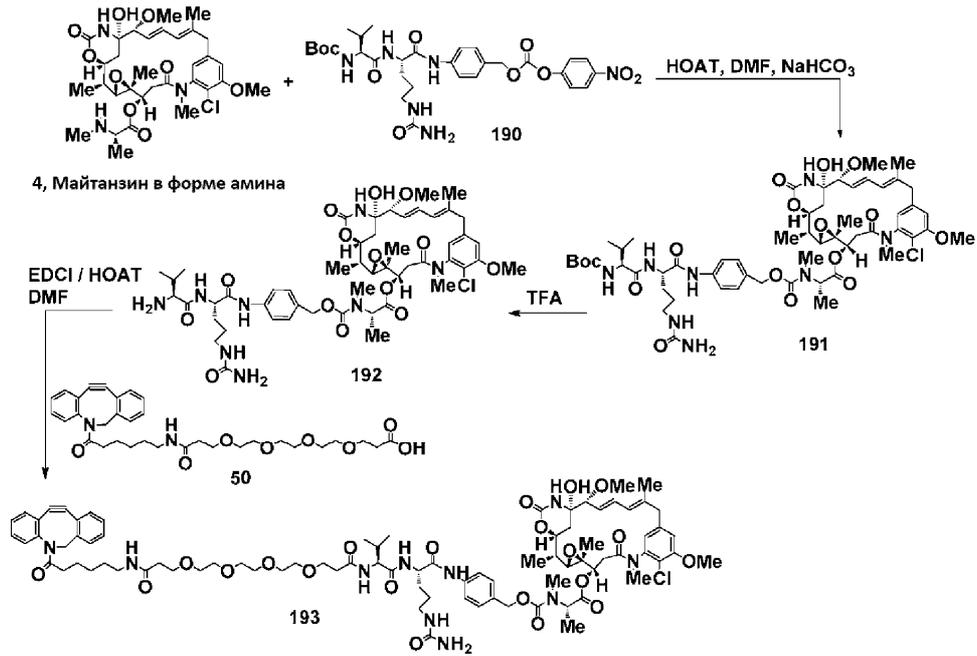




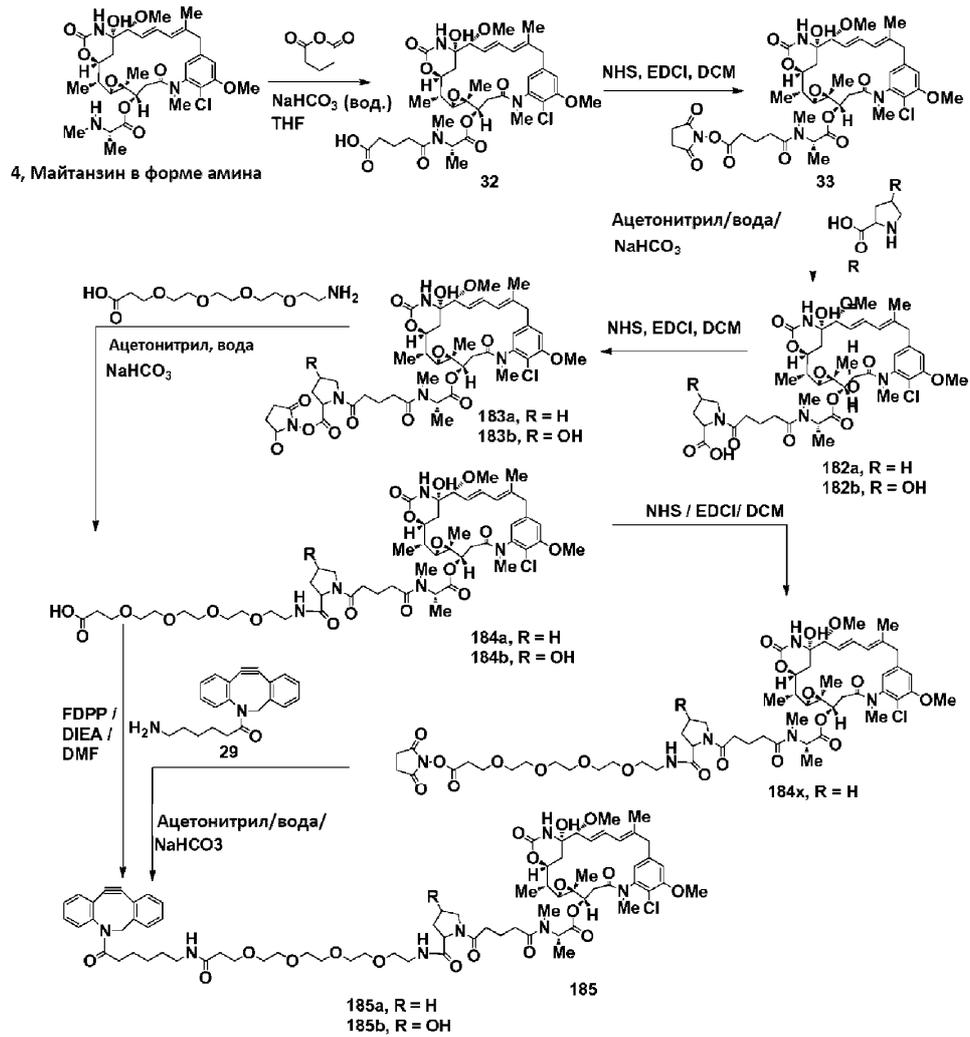
Фиг. 12



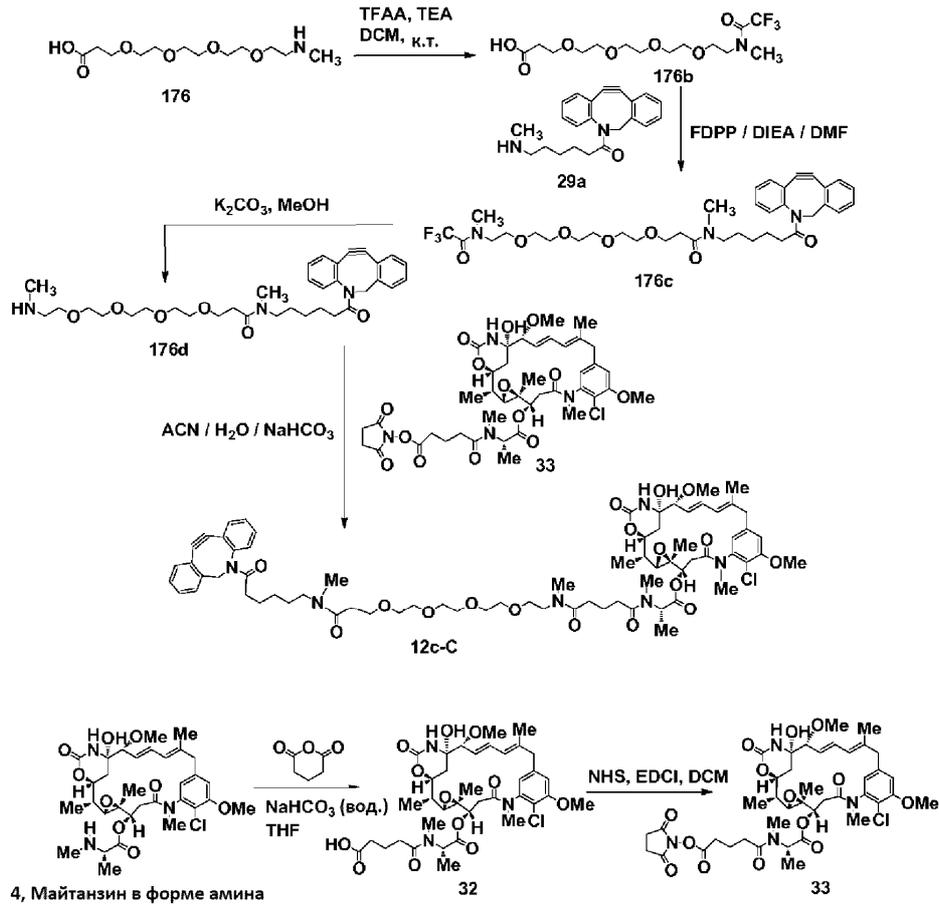
Фиг. 13



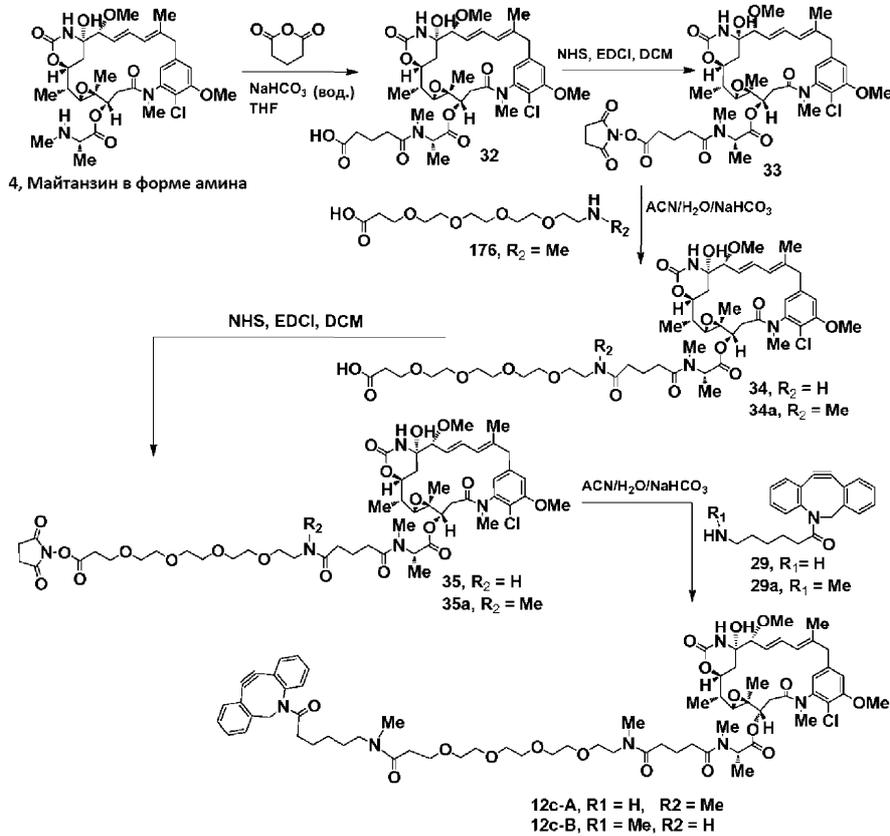
Фиг. 14



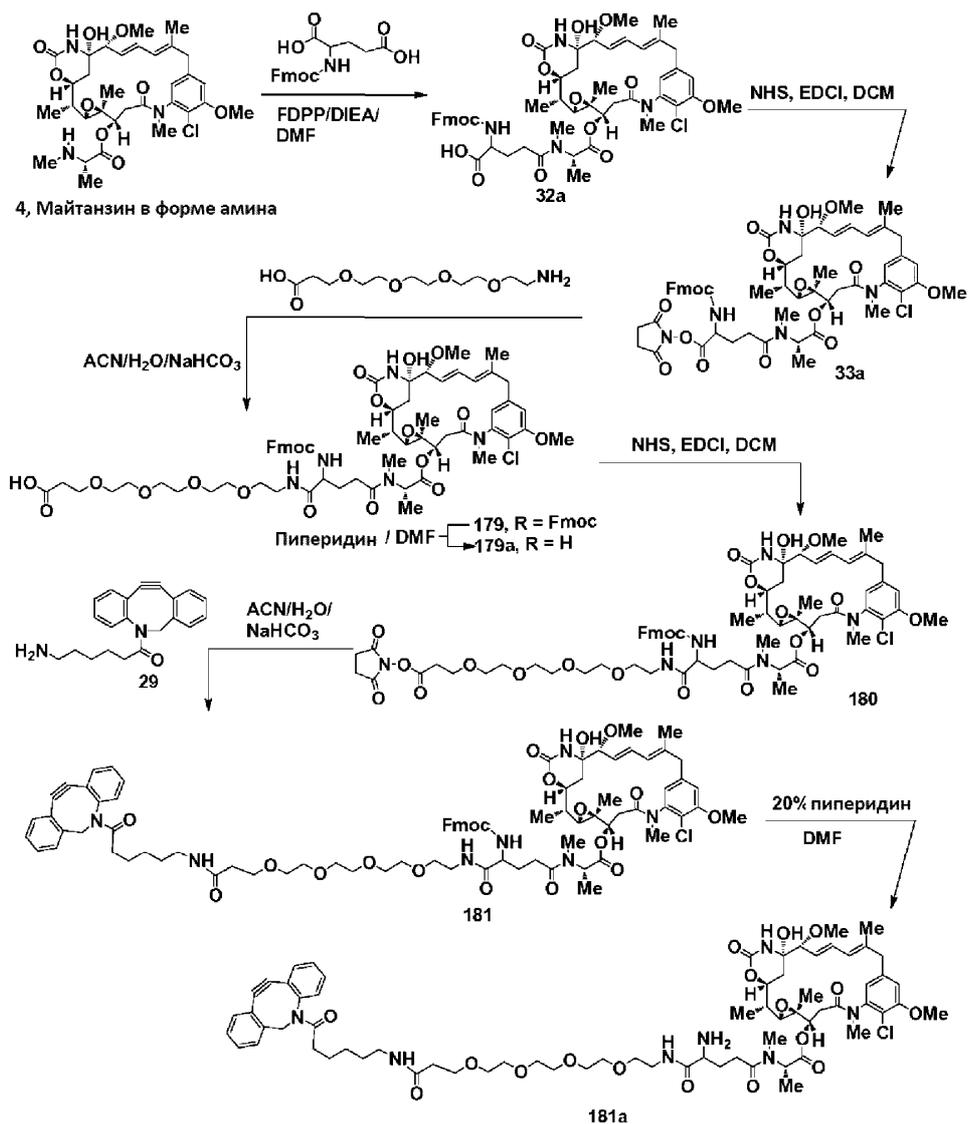
Фиг. 15



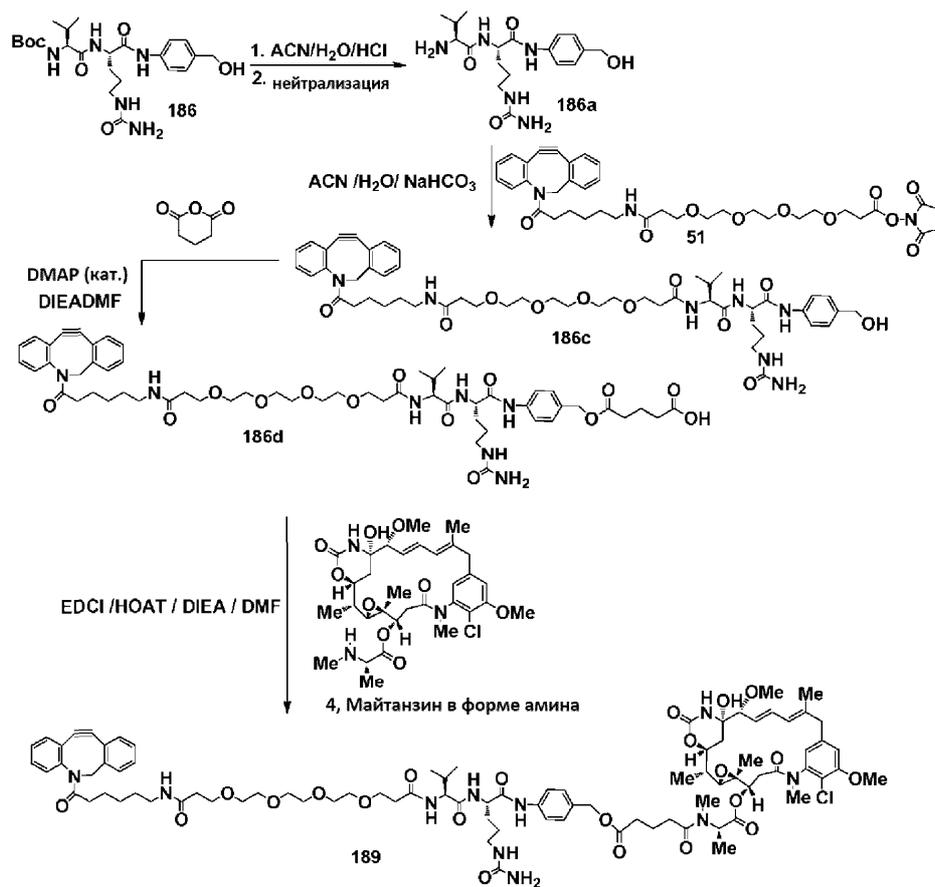
Фиг. 16



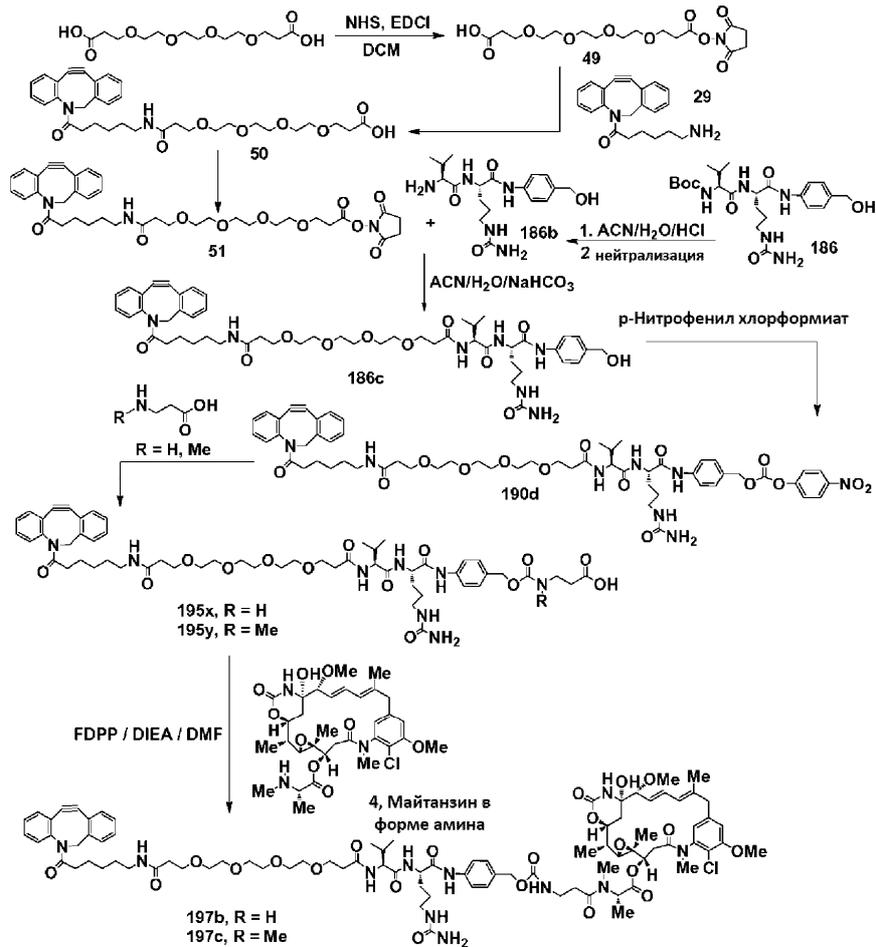
Фиг. 17



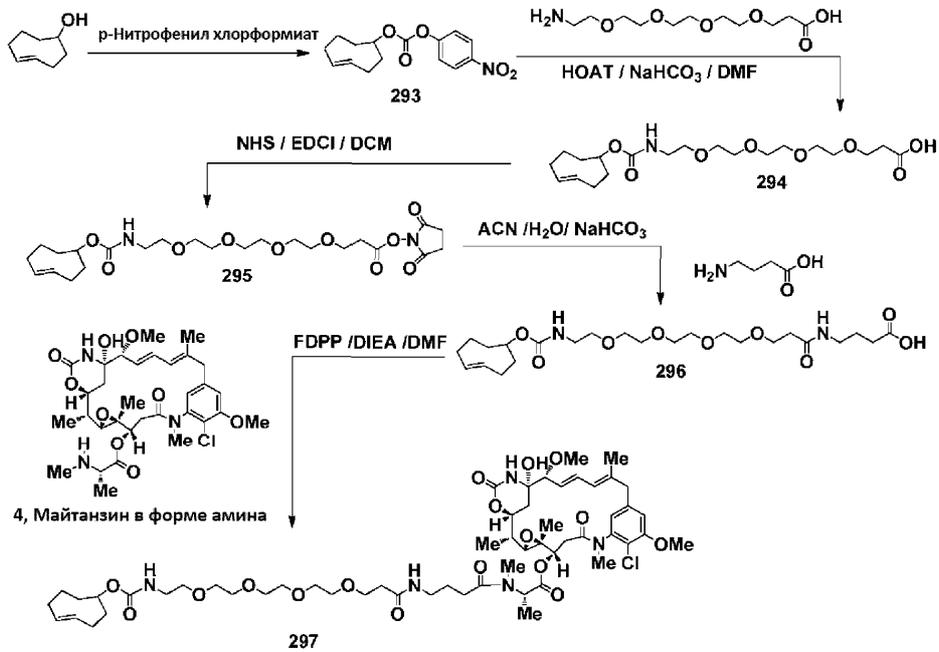
Фиг. 18



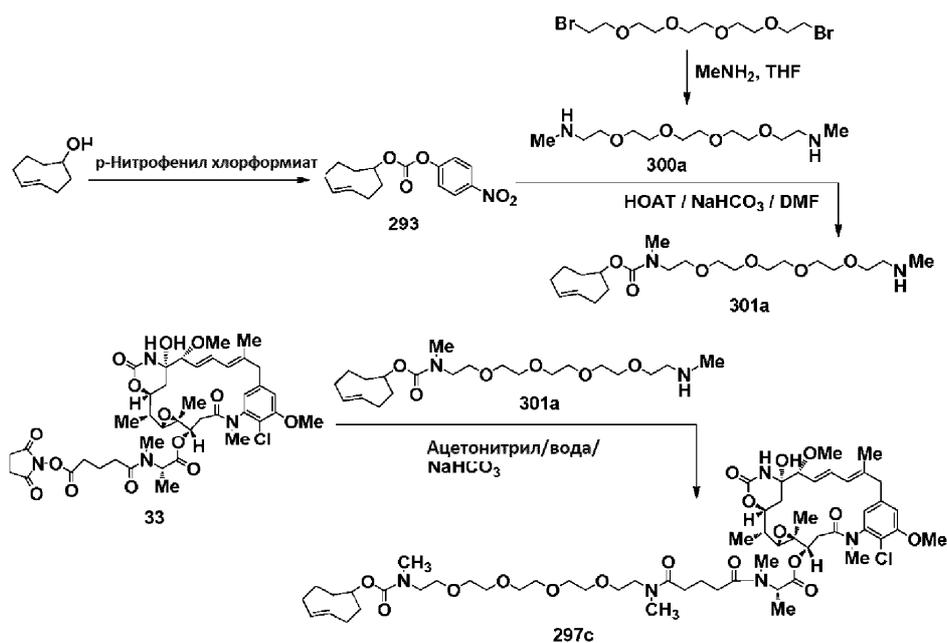
Фиг. 19



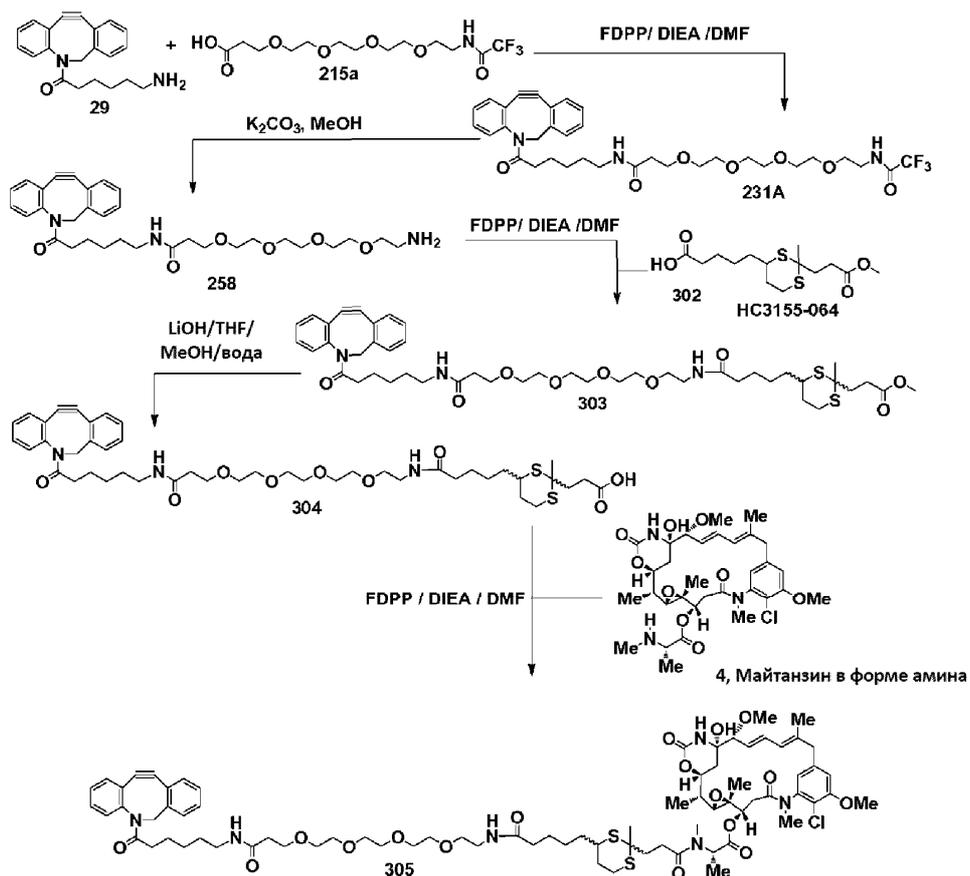
Фиг. 20



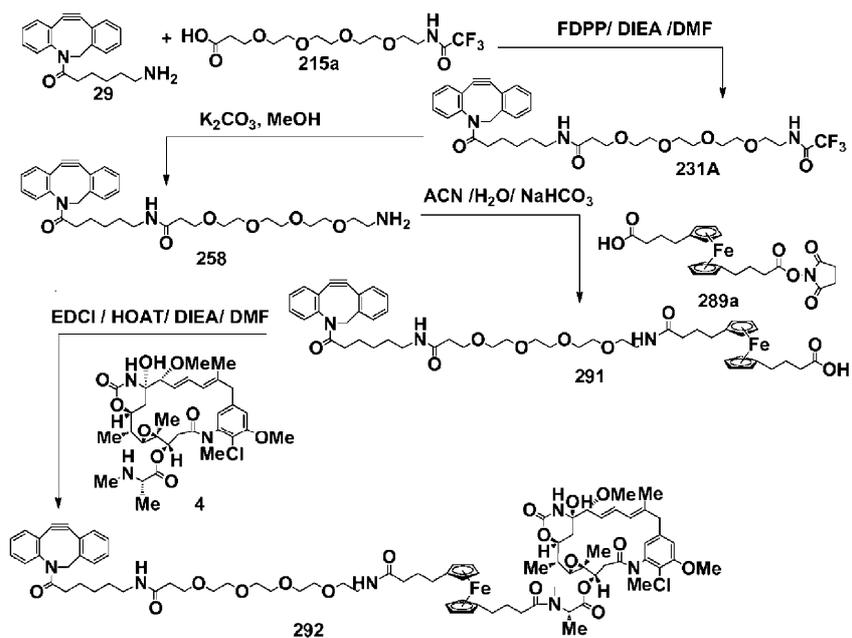
Фиг. 21



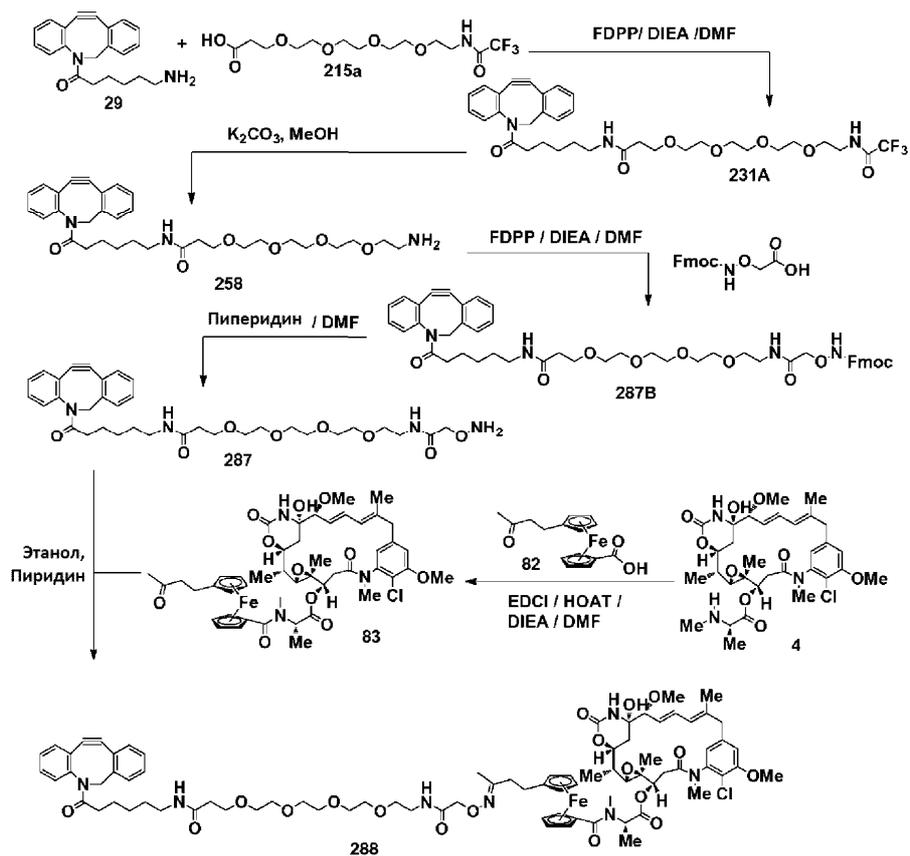
Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2